



UNIVERSITATEA BABEȘ-BOLYAI CLUJ-NAPOCA



FACULTATEA DE FIZICĂ

REZUMAT TEZĂ DE DOCTORAT

**STUDII VIBRAȚIONALE CU APLICAȚII
BIOMEDICALE**

Luisa-Mihaela Andronie

Conducător de doctorat: Prof. Dr. Onuc Cozar

Cluj–Napoca

2012

Cuprins

Introducere	3
Cap.2. Studii Raman și SERS asupra moleculei de Paracetamol	4
2.1. Caracterizarea fizico-chimică și diferențierea speciilor de paracetamol (sinus și normal)	4
2.2. Prepararea experimentală a soluțiilor și suprafețelor SERS	5
2.3. Spectrele Raman ale paracetamolului în diferite formulări farmaceutice	6
2.4. Spectrele SERS ale paracetamolului pe filme subțiri de Ag	12
Cap.3. Tehnici Raman aplicate în studiul sistemelor biologice complexe (celule, țesuturi)	15
3.1. Generalități privind structura țesuturilor investigate și evoluția acestora în cazul cancerului de colon uman	15
3.2. Prepararea probelor analizate	16
3.3. Investigarea țesuturilor de colon cu ajutorul spectroscopiei FT-IR	17
3.4. Măsurători SERS pe țesutul sănătos și canceros de colon uman	19
Cap.4. Spectroscopia Raman a probelor preparate în vederea examenului histopatologic	22
4.1. Măsurători micro-Raman pe lamele preparate în vederea diagnosticării histopatologice (studiu de caz - 9 pacienți)	22
Concluzii	27
Bibliografie	29

**Cuvinte cheie: FT-Raman, Raman, SERS, Paracetamol normal, Paracetamol sinus
Nanoparticole de Ag , Ţesut colon, Adenomacarcinom.**

Introducere

Tehnicile utilizate, spectroscopia Raman și IR, împreună cu tehnici derivate (micro-Raman, confocal-Raman, surface enhanced Raman (SERS), Raman rezonant (RR), sau combinate (SERRS), combinate cu spectroscopia de absorbție IR, oferă informații valoroase despre structura, proprietățile, dinamica, identitatea anumitor specii moleculare în diferite medii biologice precum și disponibilitatea acestora de a interacționa cu alte specii sau de a fi absorbite pe nanostructuri de metal nobil.

Tehnicile spectrale vibraționale oferă o serie de avantaje în contextul cercetării actuale, datorită sensibilității deosebite, putând fi modalități ideale pentru realizarea unor instrumente foarte rapide, neinvazive și convenabile ca preț, pentru o diagnosticare precoce a bolii, deoarece prepararea probelor și măsurătorile sunt foarte simple, iar timpul de achiziție este foarte scurt.

Lucrarea actuală abordează studii experimentale originale asupra unor structuri moleculare utilizate în formularea farmaceutica (paracetamol-comercial) și respectiv al unor sisteme biologice complexe (țesuturi de colon uman) cu ajutorul tehnicilor spectroscopice vibraționale. Sunt analizate câteva specii moleculare cu efecte antipiretice și analgezice în diferite formulări farmaceutice pentru a testa potențialul tehnicilor în monitorizarea și detecția acestor specii în condiții fiziologice.

Activitatea biologică și proprietățile farmaceutice ale medicamentelor depind puternic de structura lor. În urma experimentelor efectuate s-a constatat că paracetamolul luat în supradoză, poate cauza necroză hepatică atât la oameni cât și la animalele folosite în cadrul unor experimente [1, 2]. Alcoolul constituie o premisă favorabilă pentru distrugerea ficatului, distrugere cauzată și de doze terapeutice mari de paracetamol [3]. Din cauza acestor efecte secundare toxice, paracetamolul a fost subiectul multor studii toxicologice [4, 5]. În contrast cu aspirina, paracetamolul se crede că acționează în mod aproape exclusiv asupra sistemului nervos central, cu efecte periferice scăzute.

Pornind de la ideea că evoluția bolilor este însoțită de modificări în ceea ce privește chimia/biochimia celulelor, țesuturilor, organelor sau fluidelor corpurilor, spectroscopia vibrațională ar putea fi cea mai potrivită metodă convențională pentru detecția ultrasenzitivă a acestor schimbări, care ar trebui detectate înainte ca manifestările morfologice și sistemice să permită diagnosticarea clinică prin metode convenționale. De exemplu, cancerul de colon, care face subiectul acestei lucrări, se depistează pe baza tehnici imagistice anatomice, precum endoscopia, tehnica ultrasenzitivă, urmate de examinări histopatologice ale biopsiei.

Aceste metode convenționale de diagnosticare se aplică adesea după ani de zile de la faza incipientă a bolii, ceea ce generează o întârziere nerecuperabilă în aplicarea unui tratament eficace. Dacă este detectată în stadiu incipient această boală este una dintre cele mai ușor vindecabile forme de cancer cu o rată de supraviețuire de 90%, de aceea depistarea în fază incipientă și supunerea la o schemă de tratament adecvat, ar salva multe vieți.

Capitolul 2. Studii Raman și SERS asupra moleculei de Paracetamol

2. 1. Caracterizarea fizico-chimică și diferențierea speciilor de paracetamol (sinus și normal)

Structura moleculară a paracetamolului ($C_8H_9NO_2$) este prezentată în Fig. 2.1, acesta fiind indicat pentru scăderea nivelului durerii de la mediu până la moderat, pentru reducerea febrei, fiind o componentă importantă a nenumăratelor analgezice pentru tratarea răcelilor și gripei.

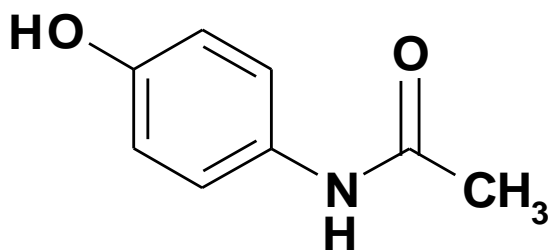


Fig. 2.1. Structura moleculară a paracetamolului.

Este cunoscut faptul că alcoolul constituie o premisă favorabilă pentru distrugerea ficatului, distrugere cauzată și de doze terapeutice mari de paracetamol [6]. Din cauza acestor efecte secundare toxice, paracetamolul a fost subiectul multor studii toxicologice [7, 8].

Studiile anterioare arată că folosirea pe termen lung, chiar zilnică a paracetamolului, este independent asociată cu un risc crescut de boli renale [9] și provoacă o inhibiție specifică imediată și ridicată a sintetizării DNA-ului replicativ [10].

Paracetamolul poate cristaliza în trei forme polimorfice diferite cunoscute ca forma I, II și III [11-16]. Forma monoclinică (forma I) este forma comercială obișnuită [17, 18], forma II a fost identificată prin recristalizare dintr-o soluție etanolică și corespunde unei forme ortorombice [19] și forma III a fost menționată ca fiind o formă foarte instabilă, care nu poate fi studiată tocmai din cauza acestei instabilități. Polimorfii metastabili ai paracetamolului sunt de un interes industrial special deoarece forma I comercială necesită conectori pentru formarea tabletei [20, 21]. Forma I a paracetamolului este stabilă la temperatură și presiune

ambientă [22, 23], în timp ce forma ortorombică a paracetamolului este potrivită pentru compresia directă a tabletelor și poate fi întrucâtva mai mult solubilă, dar a fost cristalizată doar în cantități extrem de mici și singura formă disponibilă din punct de vedere comercial este forma monoclinică a paracetamolului, modificarea cea mai stabilă din punct de vedere termodinamic[24-26].

Numeroase studii IR [27-31] și Raman [32, 33] au fost deja înregistrate pentru a caracteriza și identifica cele trei forme metastabile ale paracetamolului, tranzițiile dintre acestea și comparația dintre tablete și soluții [34].

Lucrarea de față, propune caracterizarea vibrațională Raman a două tablete diferite de paracetamol (normal și sinus), pentru a distinge modul de acțiune variat cu privire la valorile pH-ului, maniera de adsorbție pe suprafețele metalice de argint, de a verifica posibilitatea de monitorizare a ambelor specii farmaceutice folosind spectroscopia SERS.

2. 2. Prepararea experimentală a soluțiilor și suprafețelor

Doua tipuri comerciale de paracetamol tablete (Europharm), simplu și sinus (conținutul de substanță activă de 500 mg), au fost folosite în acest studiu fără purificări suplimentare. Soluțiile de paracetamol au fost preparate prin dizolvarea tabletelor în apă distilată la temperatura camerei.

Filmele insulare de Ag folosite ca substraturi SERS în măsurătorile, au fost preparate prin evaporare termică și prezintă rugozități de 1.9 și 2.9 Å [35]. Pentru prepararea probei SERS, am aplicat o picătură de soluție de paracetamol pe suprafața unui film și am lăsat-o să se usuce pentru câteva minute. În momentul în care picătura s-a uscat, am putut focaliza spotul laserului în această poziție.

Spectrele FT-Raman au fost obținute cu ajutorul spectrometrului Equinox 55, ce are integrat un modul Raman (Bruker (D) FRA-106/S) și o rezoluție de 2 cm⁻¹. Radiația de 1064 nm a unui Nd-YAG laser, cu o putere de 390 mW au fost folosite pentru excitație. A fost folosit un detector de Ge care operează la temperatura azotului lichid. Numărul scanărilor a fost de 200.

Spectrele Raman și SERS pe un film insular de Ag, au fost înregistrate cu ajutorul unui microspectrometru (Horiba-Jobin-Yvon, model LabRam) folosind linia de excitare de 514.5 nm a unui laser cu ion de argon (Spectra Physics, model 2016). Spectrele au fost achiziționate în geometria de împrăștiere la 180° folosind un microscop echipat cu obiectiv de 50x de tip Olympus LMPlanFL, cu o rezoluție spectrală de 5 cm⁻¹. Detectarea semnalului Raman a fost posibilă cu ajutorul unei camere CCD Peltier. Puterea laserului variază de la 100 la 200 mW și este indicată ca subtitlu la fiecare figură.

2. 3. Spectrele Raman ale paracetamolului în diferite formulări farmaceutice

Forma comercială a medicamentului paracetamol, simplu/normal și sinus, a fost investigată prin intermediul spectroscopiei Raman pentru a evidenția prezența formelor monoclinică și orthorhombică în stare solidă, în stare apoasă/lichidă, și pe suprafață de sticlă după recristalizare.

Modurile de vibrație fundamentale din spectrele FT-Raman și micro-Raman, reprezentate în Fig. 2.2 au fost analizate prin compararea acestor moduri vibraționale cu ale celor din literatura de specialitate [36-43], spectrele prezentând în general aceeași poziție a benzilor și aceleași intensități relative.

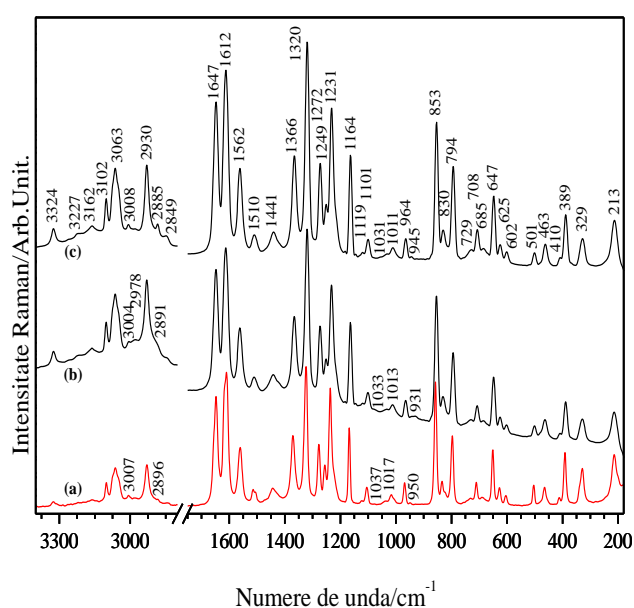


Fig. 2.2. Spectrele FT-Raman (a) și micro-Raman (b,c) ale tabletelor de paracetamol normal (a,b) și sinus (c). Excitare: 1064 nm, 390 mW (a); 514.5 nm, 100 mW (b, c).

Peak-urile de la 1562 și 1510 cm^{-1} au fost atribuite stretching-ului C-N de la gruparea Amida I, în timp ce benzile de la 1612 și 1441 cm^{-1} au fost atribuite întinderii asimetrice C-C. Aceste frecvențe împreună cu atribuirile lor sunt specifice formei monoclinice I a paracetamolului [44]. Pentru această formă, există niște peak-uri specifice prezente la 1231, 794 și 708 cm^{-1} , peak-uri ce corespund întinderii fenil-N, deformării în afara planului a sistemului aromatic p-substituit și modurilor de deformare în afara planului ale CN-H și fenil [45, 46].

Alte frecvențe caracteristice ale formei I a paracetamolului, care pot fi observate în spectrele FT și micro-Raman, în stare solidă, sunt: banda de intensitate medie de la 1272 cm^{-1} ,

care a fost atribuită deformării C-O [47] și peakul de intensitate mic-mijlocie de la 463 cm^{-1} care poate fi asociat cu bending-ul de schelet [45].

Forma I a paracetamolului prezintă benzi Raman la 1272, 1231, 708, 463 și 213 cm^{-1} , benzi care nu sunt prezente în spectrul formei II. Pe de alta parte, spectrul formei II ar putea avea benzi la 1185, 454, 201 cm^{-1} , care nu sunt prezente în spectrul formei I. Forma monoclinică există atât în tabletele de paracetamol simplu, cât și în cele de paracetamol sinus.

Dizolvând o tabletă a fiecărui tip de paracetamol în 10 ml de apă distilată și după ce o picătură din acea de soluție a fost lăsată la uscat pe o lama de sticlă, paracetamolul recrystalizează și spectrele Raman al ambelor forme de paracetamol arată puțin diferit (Fig. 2.3a,b). Peak-ul de intensitate medie detectat la 3324 cm^{-1} în spectrul paracetamolului în stare solidă, este regăsit la 3325 cm^{-1} în spectrele Raman ale paracetamolului normal după recrystalizat, iar la 3323 cm^{-1} pentru paracetamolul sinus.

În același caz, benzile de la 1559, 1099, 725 și 622 cm^{-1} (Fig. 2.3a) sunt specifice formei ortorombic a paracetamolului, pe când peak-urile de la 1562, 1101, 730 și 623 cm^{-1} (Fig. 2.3b) sunt specifice formei monoclinice a paracetamolului [46]. Aceste benzi ale spectrului sunt, așa cum am discutat mai sus, atribuite formei monoclinice a paracetamolului. În acest caz, putem presupune că după recrystalizare, paracetamolul normal include un amestec între formele monoclinice și ortorombice.

Analizând spectrele Raman ale paracetamolului normal și sinus de pe suprafețele de sticlă după recrystalizare (Fig. 2.3), se poate observa intensificarea anumitor benzi în comparație cu spectrele Raman ale tabletelor, unde semnalul Raman pare a fi asemănător pentru ambele tipuri de paracetamol.

Intensitatea benzii de la 2883 cm^{-1} pentru paracetamol sinus, (Fig. 2.3b) se poate datora prezenței de celuloză, lactoză, talc, acid stearic și stearat de magneziu, care de obicei au benzi foarte intense în intervalul $2870\text{-}2895\text{ cm}^{-1}$ [48-55].

În același spectru, peak-urile de la 708 și 388 cm^{-1} (Fig. 2.3b) cresc în intensitate relativă în comparație cu aceleași benzi din spectrul paracetamolului simplu (Fig. 2.3a) și cu spectrele tabletelor (Fig. 2.2).

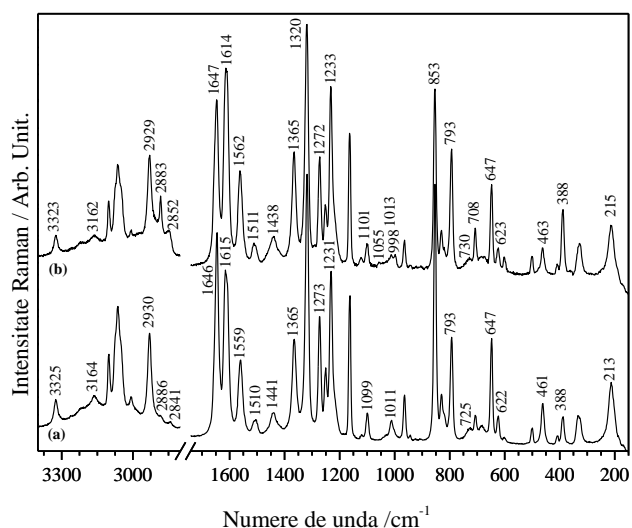


Fig. 2.3. Spectrele micro-Raman ale paracetamolului recristalizat normal (a) și sinus (b).
Excitare: 514.5 nm (a,b), 200 mW (a,b).

Această creștere poate fi produsă de lactoză, care prezintă benzi intense în regiunile spectrale $864\text{-}698\text{ cm}^{-1}$ și $357\text{-}377\text{ cm}^{-1}$, datorită celulozei care produce apariția de benzi substanțiale în jur de 382 cm^{-1} , și datorită amidonului de porumb, care produce o bandă intensă lângă poziția de 360 cm^{-1} [56-60].

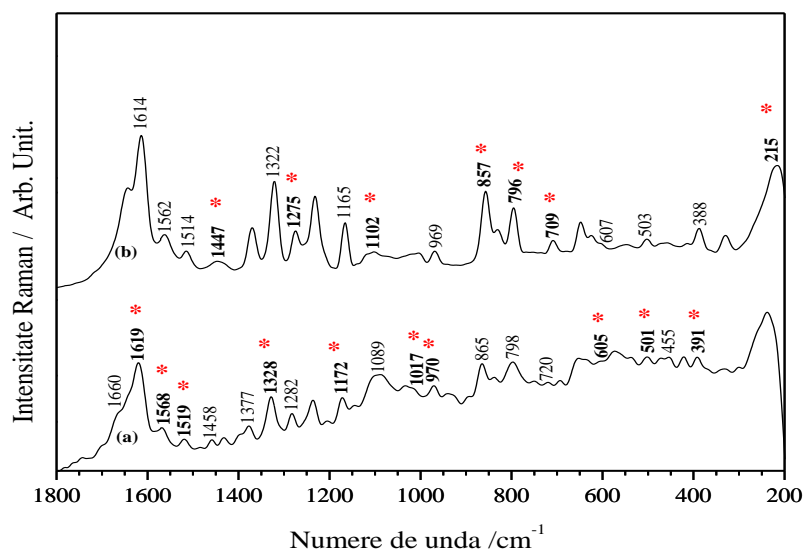


Fig. 2.4. Spectrele Raman ale soluțiilor de paracetamol ($3.3 \times 10^{-1}\text{ M}$) normal (a) și sinus (b).
Excitare: 514.5 nm (a,b), 200 mW (a,b).

Dependenta de pH a spectrelor Raman ale paracetamolului simplu și sinus în soluție apoasă, în mediu acid și bazic sunt prezentate în Figs. 2.5, 6 și 7, 8.

În spectrele Raman a soluției paracetamolului normal cu valori bazice ale pH-ului (Fig. 2.5), se observa o lărgire semnificativă a benzii de la 1619 cm^{-1} împreună cu cei doi umeri învecinați, de la 1696 și 1660 cm^{-1} . Banda de la 1619 cm^{-1} , în pH bazic, este deplasată spre roșu cu 12 cm^{-1} (1606 cm^{-1}) și poate fi atribuită întinderii asimetrice de C=C aromatic și întinderii de C-N (Fig. 2.5. pH13) umerii de la 1696 și 1660 cm^{-1} atribuiți întinderii de CNH și C=O (amide I) sunt deplasați către roșu imediat cu creșterea valorii pH-ului (1689 și 1637 cm^{-1} , Fig. 2.5. pH 13).

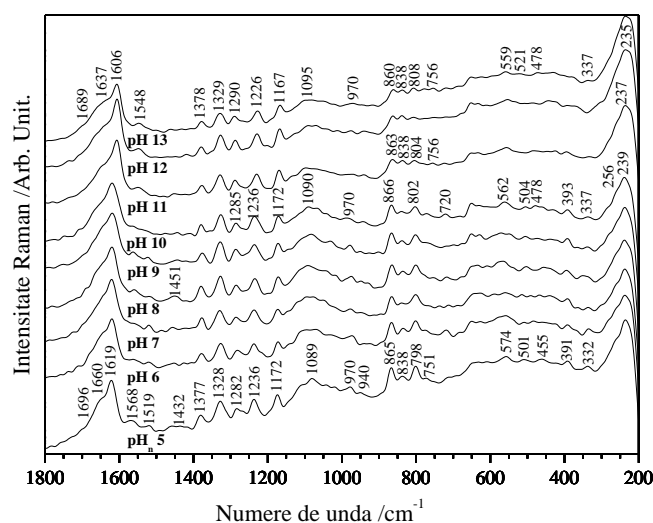


Fig. 2.5. Spectrele Raman ale unei soluții de $3.3 \times 10^{-1}\text{ M}$ de paracetamol normal la diferite valori bazice ale pH-ului. Excitare: 514.5 nm , 200 mW .

Banda de intensitate mică de la 1568 cm^{-1} , care este 20 cm^{-1} deplasată spre roșu la pH bazic, poate fi produsă de îndoirea în plan a N-H-ului (amide II). Prin analogie cu paracetamolul normal, în spectrul Raman al paracetamolului sinus la pH bazic (Fig. 2.6) pot fi observate: o creștere semnificativă a intensității relative și deplasate spre roșu cu 14 cm^{-1} a benzii de la 1614 cm^{-1} , care este atribuită întinderii de C=C aromatic și de C-N (Fig. 2.6, pH 13). Mai mult, banda intensă de la 1643 cm^{-1} , ce corespunde întinderii de C=O (amide I), descrește în intensitate relativă, devenind un umăr începând cu pH 10.5 și este 15 cm^{-1} deplasată spre roșu; banda mic-mijlocie de la 1562 cm^{-1} devine mai largă, este 22 cm^{-1} schimbată în roșu și se datorează îndoirii în plan de N-H (amide II) (Fig. 2.6, pH 13).

Pe deasupra, semnalul mediu de la 1432 cm^{-1} , ca o contribuție a îndoirii asimetrice a CH_3 -ului și întinderii de fenil în paracetamolul normal, devine mai larg și este 29 cm^{-1} schimbat în albastru la pH bazic, în timp ce banda medie de la 1377 cm^{-1} descrește ușor în intensitate relativă și este atribuită bending-ului simetric al de CH_3 .

Semnalul corespunzător întinderii C-N (amide III) (1328 cm^{-1}), descrește în intensitate relativă, pe când banda corespunzătoare întinderii de C-O și C-N (1282 cm^{-1}) crește în intensitate relativă în mediu bazic (Fig. 2.5, pH 13).

Odată cu creșterea valorii bazice a pH-ului, pot fi observate, mai întâi o lărgire și o deplasare spre roșu (20 cm^{-1}) a îndoirii de la fenil-N (1236 cm^{-1}), în comparație cu banda adiacentă (1172 cm^{-1}) atribuită întinderii de fenil-N și COH, care rămâne aproximativ constantă în intensitate relativă în mediu bazic (Fig. 2.5) și este ușor deplasată spre roșu (5 cm^{-1}).

Comparativ cu paracetamolul normal, în spectrul Raman al paracetamolului sinus (Fig. 2.6), peak-ul de intensitate mica de la 1447 cm^{-1} , cu aceeași atribuție ca în cazul paracetamolului normal, pare să crească în intensitate relativă la pH 8 și apoi, începând cu pH 9 devine mai larg și dispăre la pH bazic. Următoarele două benzi (1369 și 1323 cm^{-1}) în spectrul Raman al paracetamolului sinus, care au fost atribuite la fel ca și în cazul paracetamolului normal, descresc în intensitate relativă și se deplasează spre albastru. Următorul peak de la 1275 cm^{-1} este 5 cm^{-1} deplasat spre albastru și crește în intensitate relativă, întrucât semnalul de la 1233 cm^{-1} devine mai larg, crește ușor în intensitate relativă și este 10 cm^{-1} deplasează spre roșu (Fig. 2.6, pH 13). Benzile de la 865 , 838 , 798 cm^{-1} în spectrul Raman al paracetamolului normal (Fig. 2.5, ale pH 5 la 10) sunt ușor scăzute în intensitate relativă, devin mai mici cu creșterea valorii pH și ușor deplasate; ele au fost atribuite deformărilor în plan C-C, îndoirii C-H în afara planului și îndoirii fenil-N.

Aceleași benzi în spectrul Raman al paracetamolului sinus pot fi observate la 857 , 831 , și 796 cm^{-1} (Fig. 2.6), descresc în intensitate relativă, își schimbă forma și sunt ușor deplasate spre albastru.

Banda de la 574 cm^{-1} , ce corespunde deformării în afara planului a fenil-N în paracetamolul normal, este ușor crescută în intensitate relativă și 15 cm^{-1} deplasată spre roșu la pH bazic (Fig. 2.7, pH 13), pe când în cazul paracetamolului sinus, banda analoagă de la 547 cm^{-1} descrește în intensitate relativă și apoi dispăre (Fig. 2.6, pH 9-13). În general, toate benzile, datorită benzile datorate modurilor vibraționale ale C-N, N-H, fenil-N, COH și C=O în paracetamol, devin mai mici și se deplasează spre roșu; acest lucru indică deprotonarea paracetamolului la valori bazice ale pH-ului.

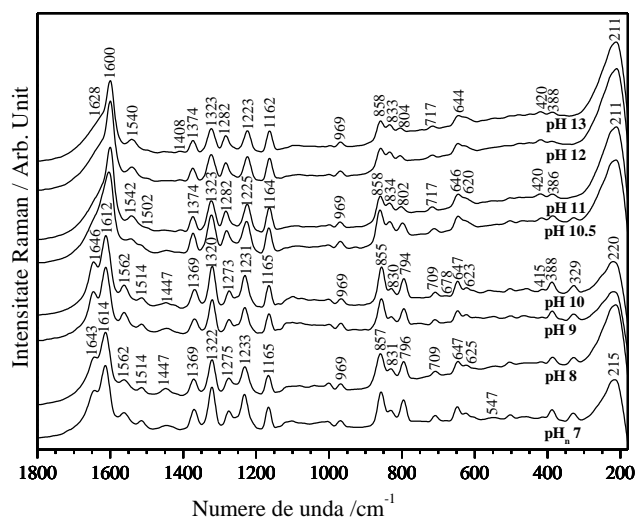


Fig. 2.6. Spectrele Raman ale unei soluții de 3.3×10^{-1} M de paracetamol sinus la diferite valori bazice ale pH-ului. Excitare: 514.5 nm, 200 mW.

Comparând Fig. 2.5 și Fig. 2.6, spectrele Raman ale paracetamolului normal în soluție, rămân neschimbate la valori ale pH-ului de la 5 la 3.

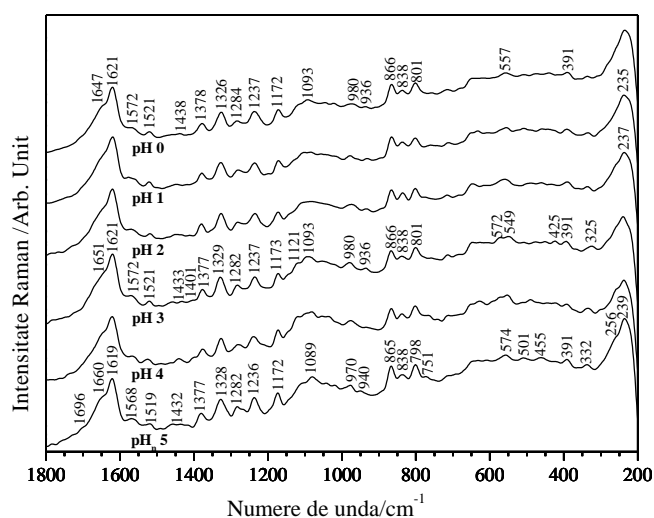


Fig. 2.7. Spectrele Raman ale unei soluții de 3.3×10^{-1} M de paracetamol normal la diferite valori acide ale pH-ului. Excitare: 514.5 nm, 200 mW.

Se poate observa că deformarea fenil-N în afara planului (574 cm^{-1}) este reprezentată de două peak-uri la pH3 (572 și 549 cm^{-1}) (Fig. 2.7) și la pH0 rămâne o singură bandă, este deplasată spre roșu cu 17 cm^{-1} (557 cm^{-1}).

Se poate concluziona astfel ca molecula de paracetamol normal este complet protonată la valori mici ale pH-ului [62]. Luând în considerare schimbarea majoră în forma benzilor Raman atribuite grupării fenil-N la valori acide ale pH-ului, rezulta ca protonarea cea mai posibilă este la gruparea NH [63].

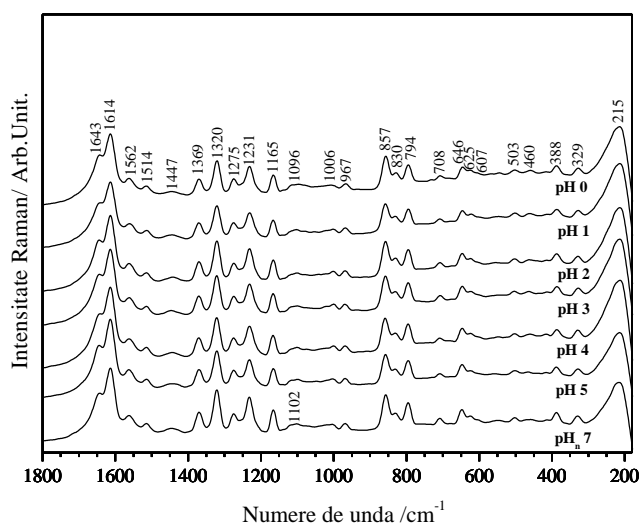


Fig. 2.8. Spectrele Raman ale unei soluții de 3.3×10^{-1} M de paracetamol sinus la diferite valori acide ale pH-ului. Excitare: 514.5 nm, 200 mW.

Comparând Fig. 2.6 și Fig. 2.8, spectrele Raman ale paracetamolului sinus rămân neschimbate între pH 7 și 0, ceea ce demonstrează că la pH7 și neutru, paracetamolul sinus există în formă amfionică.

2. 4. Spectrele SERS ale paracetamolului pe filmele subțiri de Ag

Spectrele SERS ale paracetamolului normal și sinus (8×10^{-2} M), sunt prezentate în și Fig. 2.9. și Fig. 2.10. în comparație cu spectrele Raman ale soluției (3.3×10^{-1} M) la pH5, respectiv 7. Se pot observa diferențe mari în poziția benzilor și a intensității relative, permițând presupunerea speciilor chemisorbite. Spectrele SERS au fost înregistrate pe două tipuri de filme insulare de Ag cu diferite rugozități (2.9 și 1.9 Å) [64]. Imaginile microscopice ale soluțiilor de paracetamol pe ambele tipuri de filme subțiri pot fi observate în Fig. 2.9e, f. și Fig. 2.10e, f.

Benzile medii observate în spectrele SERS ale paracetamolului normal la 1263 cm^{-1} și 1233 cm^{-1} (19 cm^{-1} și 3 cm^{-1} deplasate spre roșu față de spectrul Raman al soluției) sunt datorate modurilor de întindere a legăturilor C-N și fenil-N al grupării amidei și prezintă modificări în forma benzii.

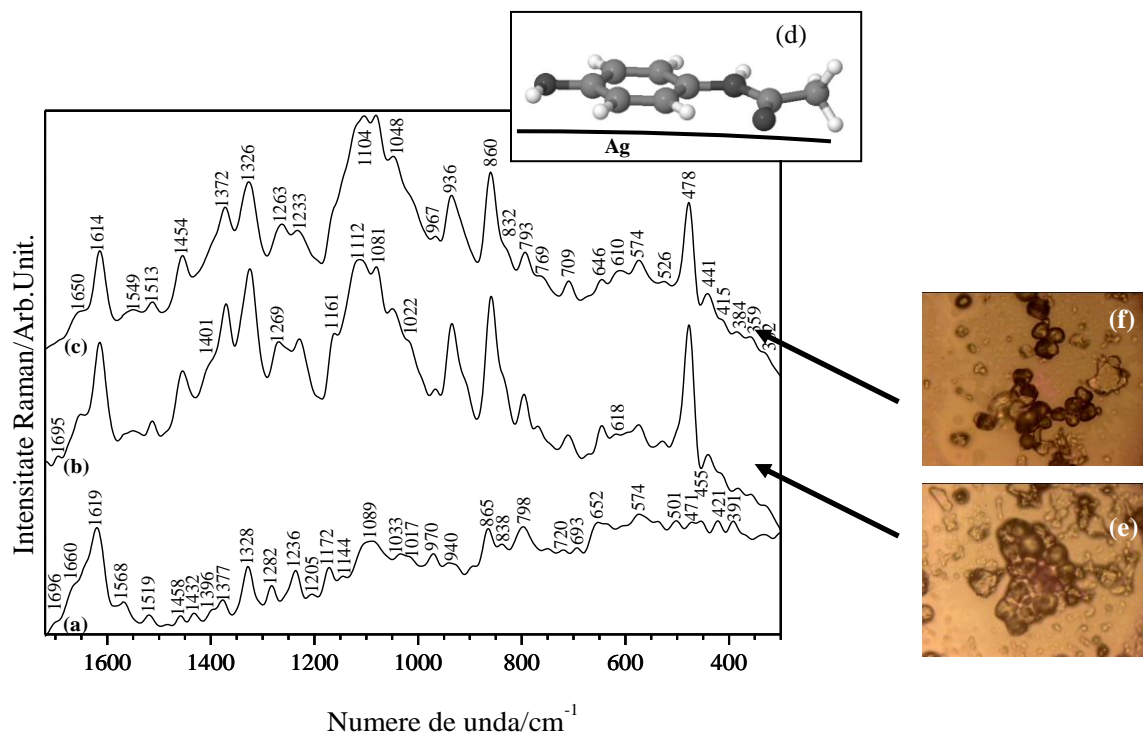


Fig. 2.9. Spectrul Raman al unei soluții de paracetamol normal de 3.3×10^{-1} M (pH 5) (a), spectrele SERS la o concentrație de 8×10^{-2} M a paracetamolului normal pe filme subțiri cu rugozități de 2.9 Å (b) și 1.9 Å (c) precum și orientarea propusă pe suprafața de Ag (d). Excitare: 514.5 nm (a-c), 200 mW (a) and 50 mW (b,c). Imaginile microscopice ale paracetamolului normal soluție (8×10^{-2} M) după uscare pe filmele de Ag cu rugozități de 2.9 Å (e) și 1.9 Å (f).

În cazul paracetamolului sinus Fig. 2.10, benzile medii observate în spectrele SERS la 1270 cm^{-1} și 1233 cm^{-1} (5 cm^{-1} și 2 cm^{-1} deplasate spre roșu față de spectrul Raman al soluției) au aceleași atribuiri ca și paracetamolul normal și prezintă de asemenea modificări ale formei. Benzile medii de la 1172 cm^{-1} (pentru paracetamolul normal) și de la 1164 cm^{-1} (pentru paracetamolul sinus) din spectrul Raman al soluției, devin umeri în spectrele SERS și sunt cu 11 cm^{-1} și 1 cm^{-1} deplasate spre roșu, fiind atribuite modurilor de îndoire a legăturii C-OH.

Semnalul mediu de la 1089 cm^{-1} din spectrul Raman al soluției de paracetamol normal (Fig. 2.9) este despicat în spectrul SERS în trei picuri și un umăr (1104 , 1081 , 1048 și 1022 cm^{-1}), care au fost atribuite modului de întindere a legăturii C-OH, modului de întindere asimetrică a legăturii C-O-C, modului de îndoire a legăturii CCC și respectiv modurilor de îndoire a legăturilor C-OH și fenil.

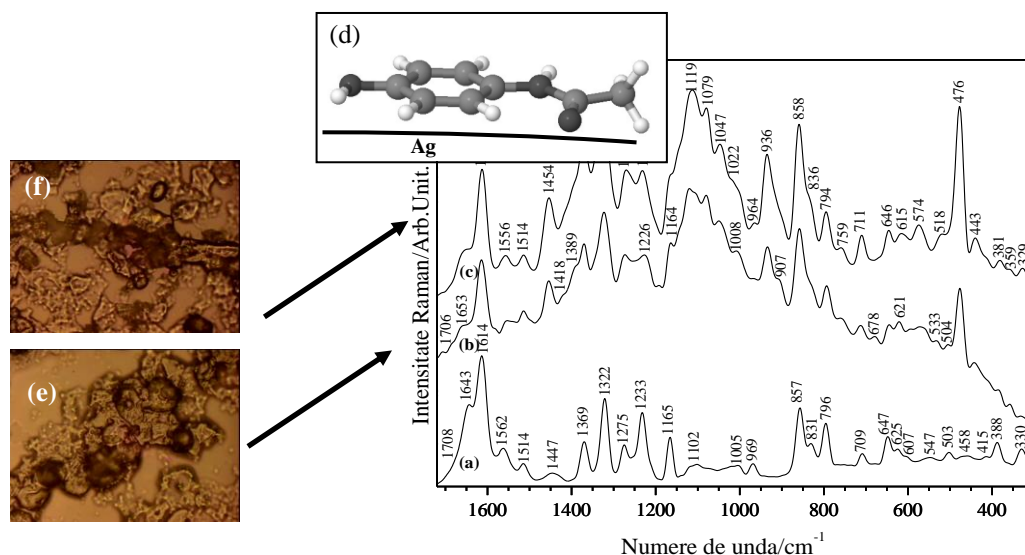


Fig. 2.10. Spectrul Raman al unei soluții de 3.3×10^{-1} M paracetamol sinus (pH 7) (a), spectrele SERS la o concentrație de 8×10^{-2} a paracetamolului sinus pe filme subțiri cu rugozități de 2.9 \AA (b) și 1.9 \AA (c) precum și orientarea propusă pe suprafața de Ag (d). Excitare: 514.5 nm (a-c), 200 mW (a) și 50 mW (b,c). Imaginile microscopice ale paracetamolului sinus soluție (8×10^{-2} M) după uscare pe filmele de Ag cu rugozități de 2.9 \AA (e) and 1.9 \AA (f).

În acest caz, conform regulilor de selecție de la suprafață [66], benzile amidelor I, II și III se așteaptă să fie amplificate. O altă posibilitate de chemisorbție a paracetamolului este prin intermediul electronilor π ai inelului fenil. Conform regulilor de selecție electromagnetice propuse de către Creighton [65] și Moskovits și Suh [66], modul de întindere a legăturii C-H ar trebui să fie amplificat când legătura C-H este perpendiculară pe planul suprafeței metalice, în comparație cu cazul în care legătura C-H se află paralel pe suprafața.

Interacțiunea azotului cu suprafața argintului este evidențiată de amplificarea vibrațiilor grupării amidice. Mai specific, benzile foarte intense din spectrele SERS de la 1454 , 1372 și 1326 cm^{-1} ale paracetamolului normal (Fig. 2.9a,b); de la 1454 , 1371 și 1326 cm^{-1} ale paracetamolului sinus (Fig. 2.10 a și b), deplasate spre roșu și respectiv spre albastru, față de spectrele Raman ale soluției principale (Fig. 2.9c. și Fig. 2.10c), atribuite modului de întindere simetrică a legăturii C=O (amida I), modurilor de întindere a legăturii $\text{H}_3\text{C}-\text{C}=\text{O}$ și de îndoire simetrică a legăturii CH_3 și modului de întindere a legăturii C-N (amida III), sunt în marea majoritate datorate grupării amidelor, demonstrând vecinătatea lui apropiată de suprafețele de Ag.

O orientare plană a inelului de fenil la suprafața metalului (Fig. 2.9f, Fig. 2.10f) este susținută de banda intensă datorată electronilor π -Ag din legătura fenil, care poate fi detectată

la 478 cm^{-1} și 441 cm^{-1} pentru paracetamolul normal și respectiv 476 cm^{-1} și 440 cm^{-1} pentru paracetamolul sinus, considerând ambele filme de argint în stare brută.

Orientarea plană a inelului de fenil este de asemenea susținută de creșterea importantă a intensității relative a benzii de la 936 cm^{-1} (în spectrele SERS atât ale paracetamolului normal cât și al paracetamolului sinus, Fig. 2.9a,b și Fig. 2.10a,b), care se datorează deformării în afara planului a legăturii C-H a inelului fenil, prin creșterea extremă a intensității relative a benzilor de la 860 cm^{-1} (spectrele SERS ale paracetamolului normal) și 858 cm^{-1} (spectrele SERS ale paracetamolului sinus), care au fost atribuite deformărilor de schelet (de bază) în afara planului a legăturilor C-H și C-C.

Luând în considerare regulile de selecție de la suprafață și datele prezentate în literatură, se poate da o explicație rezonabilă asupra structurilor adsorbite pe suprafețele metalice de Ag, din spectrele SERS. O interacțiune chimică puternică a ambelor tipuri de paracetamol (normal și sinus) cu filmele „insulă” de argint este realizată prin intermediul singurei perechi de electroni ai atomilor de azot din gruparea amidică și prin electronii π ai inelului de fenil, într-o orientare plană.

Capitolul 3. Tehnici Raman aplicate în studiul sistemelor biologice complexe (celule, tesuturi)

3. 1. Generalități privind structura țesuturilor investigate și evoluția acestora în cazul cancerului de colon uman

Adenocarcinomul este o tumoră epitelială malignă, originară din epiteliul glandular al mucoasei colorectale. Cancerul de colon este în prezent a treia cauză a deceselor dominantă în partea vestică a lumii, înregistrându-se 655 000 de decese pe an în întreaga lume. Studii referitoare la cancerul de colon prezintă modificări specifice ale acidului nucleic, ale cantităților și/sau conformației proteinelor, lipidelor și carbohidraților, caracteristice celulelor neoplastice [67].

Diagnosticarea actuală a cancerului este bazată pe diferite tehnici medicale imagistice, cum ar fi imagistica prin rezonanța magnetică, tomografia computerizată, ultrasonografia, care sunt urmate de examinarea histopatologică a unui specimen de biopsie prelevată de la un pacient. Analize mult mai precise și elucidarea mecanismului cancerului pot fi obținute prin folosirea tehnicilor spectroscopice care cercetează atent conținutul molecular al probelor investigate.

3. 2. Prepararea probelor analizate

Au fost izolate probe de țesut dintr-un specimen de colon uman, procurat până în 2h după rezecția de la un pacient care a suferit o intervenție chirurgicală la Spitalul CRF din Cluj-Napoca. S-a obținut și aprobarea etică pentru a studia proba de țesut uman.

Examinarea histopatologică standard a confirmat adenocarcinomul. Țesuturile recent recoltate de carcinom au fost păstrate timp de 2h în soluție fosfatică tamponată cu formol (10%) până la efectuarea măsurătorilor spectroscopice. Probele au fost fixate în formol și s-a arătat că acest procedeu nu a alterat observarea picurilor Raman ale țesutului și este așadar o metodă de fixare convenabilă/corespunzătoare. Pentru achiziția de date spectrale au fost selectate bucăți subțiri secționate transversal de țesut din colon normal și din adenocarcinom. Probele au fost secționate transversal prin peretele colonului și s-au observat trei zone distincte cu un aspect maro, galben, respectiv alb, corespunzătoare peretelui colonului de la exterior spre interior, fiind evidentă deformarea stratului epitelial datorită carcinogenezei.

Straturile subțiri secționate recent au fost izolate și puse la microscopul Raman pentru măsurătorile micro-Raman și de microscopie optică. Apoi, s-au adăugat micropicături de nanoparticule coloidale de argint, obținute prin metoda Lee-Meisel [68], pe suprafața țesutului pentru achiziționarea SERS. Focusarea cu laser a urmat depunerii argintului.

Spectrele SERS și micro-Raman au fost înregistrate cu un microspectrometru Dilor Raman (Horiba-Jobin-Yvon, model LabRam) folosind linia de excitație 632.8 nm a laserului He-Ne. Spectrele au fost achiziționate în cadrul geometriei împrăștierei înapoi, folosind un microscop echipat cu un obiectiv Olympus LMPlanFL 50x, 10x cu o rezoluție spectrală de 2 cm^{-1} . Detectarea semnalului Raman s-a realizat cu un cititor CCD răcit prin intermediul unui element Peltier, iar pentru achiziția semnalului s-a folosit pachetul de analiză software LabSpec. Puterea laserului aplicat pe probă a variat de la 15 la 25 mW și s-au acumulat 10 cicluri de câte 2 secunde. Examinarea microscopică utilizând obiective de 10x și 50x s-a efectuat înainte și după expunerea la laser pentru a monitoriza posibilele schimbări morfologice induse de fasciculul laserului asupra punctului de focalizare. Imaginea optică a țesutului a fost neschimbată după expunerea la laser. O cameră video a asistat la comportamentul țesutului supus expunerii laserului.

Spectrele FT-IR au fost obținute folosind spectrometrul Equinox 55 Bruker cu un modul Raman integrat (Bruker, FRA106), fibra optică fiind cuplată la un modul Ramanscope II. Datele spectrale au fost analizate folosind programele OPUS 2.0.5 și Origin 6.0.

3. 3. Investigarea țesuturilor de colon cu ajutorul spectroscopiei FT-IR

S-au raportat diverse studii pe țesuturi de colon normale, premaligne (polipi) și maligne de la pacienți cu diferite stadii de malignitate. Aceste studii au folosit o metodă care este bazată pe studiul mostrelor de țesut subțire prin microscopia în infraroșu (microscopia FT-IR) și compararea directă cu analizele histopatologice tradiționale, care se folosesc ca referințe de bază [69]. Spectrosopia FT-IR poate fi un potențial instrument pentru studierea complexelor biologice materialelor care formează țesuturi, și culturi celulare [70].

În Fig. 3.1 sunt prezentate spectrele FT-IR achiziționate din zona galbenă, de la ambele probe de țesut normal și canceros, această zonă reprezentând partea interioară a colonului uman.

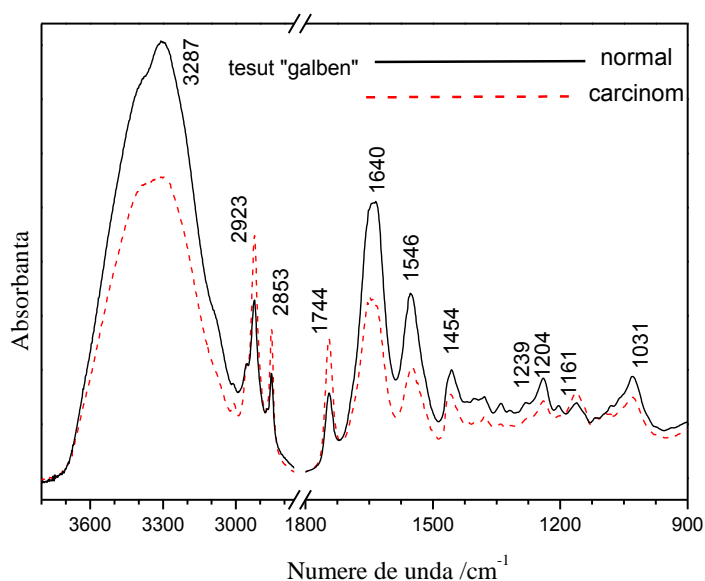


Fig. 3.1. Spectrul ATR- FT-IR de la țesutul normal și carcinom al colonului uman (zona galbenă-submucoasă).

În intervalul spectral al numerelor de undă mari, pot fi văzute diferențe minore în banda caracteristică amidei I atribuită modului de întindere al legăturii N-H din proteine, observată la 3287 cm^{-1} în țesutul normal.

În intervalul spectral al numerelor de undă mici, benzile caracteristice amidei I și II, apar atât în spectrul țesutului normal cât și în spectrul țesutului canceros la 1640 cm^{-1} . Benzile sunt mai intense în spectrul probelor cu țesut normal, în comparație cu probele provenite de la țesutul canceros. De asemenea, contribuțiile lipidelor de la 1454 cm^{-1} și a acizilor nucleici de la 1239 cm^{-1} sunt mai evidente în spectrul caracteristic al probelor canceroase.

În Fig. 3.2. se pot observa spectrele FT-IR a părții albe ale țesuturilor colonului de la probele normale și canceroase.

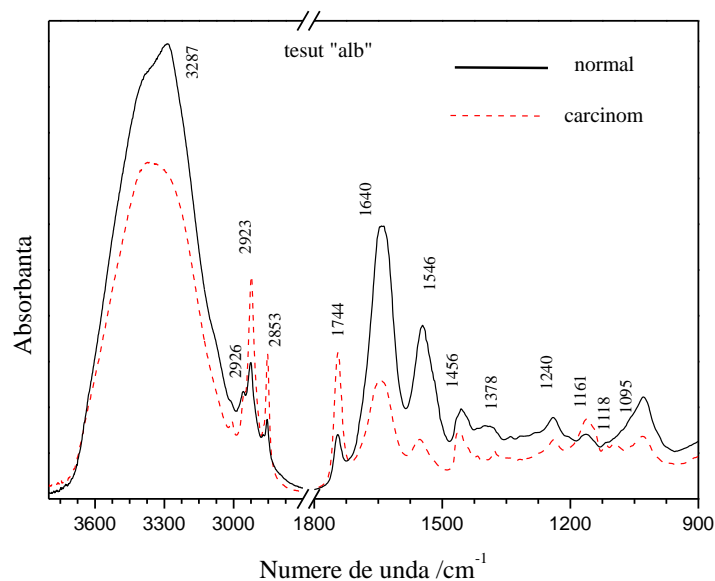


Fig. 3.2. Spectrul ATR-FT-IR de la țesutul normal și carcinom al colonului uman (zona albă-mucoasă)

Banda amidei I prezentă la 3287 cm^{-1} este mult mai intensă în spectrul țesutului normal decât cea care corespunde probelor canceroase.

Banda caracteristică modurilor de întindere asimetric și simetric al grupării CH_2 de la lipide, se observă la 2853 cm^{-1} atât pentru țesutul canceros cât și pentru cel normal, cu deosebirea că cea din spectrul țesutului canceros este mai intensă.

În regiunea „fingerprint”, $1800\text{-}1650\text{ cm}^{-1}$, diferențele dintre cele două spectre constau în intensitatea relativă a benzilor prezente, cât și în benzile noi, de intensitate slabă, care apar în spectrul probelor canceroase.

Modul de întindere al legăturii $\text{C}=\text{O}$ din lipide de la 1744 cm^{-1} din spectrul țesutului normal este mai puțin intens și ușor deplasat spre numere de undă mai mari, în comparație cu cel din spectrul probelor cu carcinom. Benzile de la 1640 cm^{-1} și 1543 cm^{-1} atribuite modului de întindere al legăturii $\text{C}=\text{O}$ din amida I, modului de îndoire al legăturii $\text{N}-\text{H}$ din amida II și modului de întindere al legăturii $\text{C}-\text{N}$ din proteine [71] au o intensitate mai mare în spectrul țesuturilor normale decât în cele canceroase.

Alte contribuții, observate în cele două spectre obținute din zonele albe ale probelor, sunt ale acizilor nucleici (1161 cm^{-1}), fosfolipidelor (1240 cm^{-1}). Noile benzi, de intensitate slabă, care apar în spectrul probelor canceroase pot fi observate la 1378 cm^{-1} sub forma unei benzi înguste, iar la 1118 cm^{-1} și 1095 cm^{-1} sub forma a două benzi de intensitate slabă.

În Fig. 3.3 sunt prezentate spectrele FT-IR obținute de la zonele maro corespunzătoare stratului muscular și al probelor normale și canceroase.

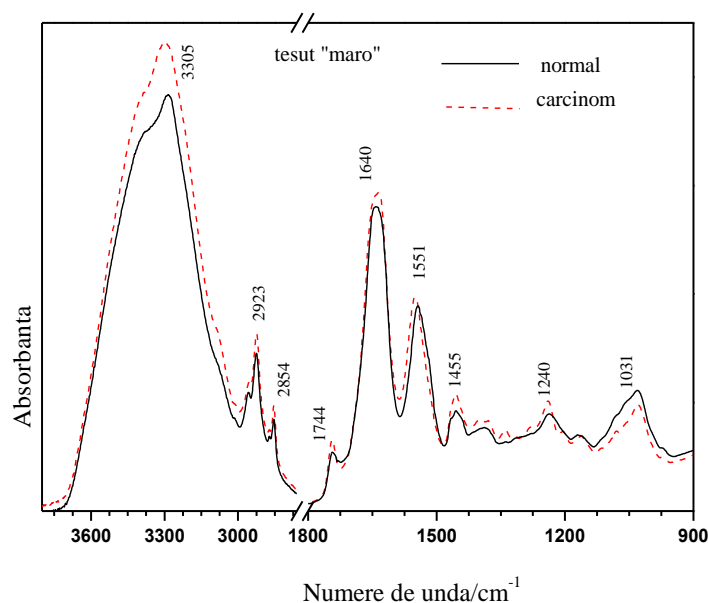


Fig. 3.3. Spectrul ATR- FT-IR de la țesutul normal și carcinom al colonului uman (zona maro musculara).

În regiunea cu numere de undă mari, banda amidei observată la 3305 cm^{-1} este mai intensă în spectrul probelor normale. Contribuțiile asimetrice și simetrice a lipidelor prezente la 2923 cm^{-1} și respectiv 2854 cm^{-1} , au intensități mai scăzute în probele normale decât în cele canceroase. În regiunea „fingerprint” modul de întindere al legăturii C=O din lipide observat la 1744 cm^{-1} este mai puțin intens în spectrul normal, în timp ce contribuțiile amidelor I și II observate la 1640 cm^{-1} și 1551 cm^{-1} sunt mai intense în comparație cu cele din spectrul probelor cu carcinom, amintind de aceeași situație observată în spectrele obținute de la zonele albe.

Benzile caracteristice amidei I și II specifice proteinelor s-au dovedit a fi de intensitate mai mare în spectrele obținute de la țesuturile normale, în timp ce benzile atribuite contribuțiilor lipidelor au fost mai intense în spectrele obținute din zonele canceroase.

3. 4. Măsurători SERS pe țesutul sănătos și canceros de colon uman

În ultimul deceniu, spectroscopia Raman a fost utilizată în biomedicină ca un instrument de diagnosticare a leziunilor țesuturilor, analiza componentelor sângelui precum și studii de celule și țesuturi [72, 73]. Cu scopul de găsire a unui remediu în tratarea cancerului, eu am aplicat tehnica Raman în a evalua posibilitatea acestei tehnici în studierea complexilor de pământuri rare—acenocumarol și pentru a investiga comportamentul de adsorbție al complexului de nanoparticule coloidale de Ag (SERS) [74], deoarece cumarinul conține un

grup de compuși naturali de mare interes datorită acțiunii sale anti-inflamatorii, antioxidant, antialergic, hepatoprotector, antitrombotic, antiviral și anticancerigen.

Trăsăturile SERS caracteristice stratului epitelial din colonul normal sunt prezentate în Fig.3.4 unde fluorescența țesutului se atenuează în urma excitației laserului în vizibil, datorită nanoparticulelor de Ag care sunt clar evidențiate.

O trăsătură reprezentativă, achiziționată în 20 secunde de la o probă recent secționată pe care s-a adăugat 1 μ l coloid de Ag, este prezentată în Fig. 3.4c, în timp ce spectrele micro-Raman de la aceleași puncte de achiziție înainte de adăugarea nanoparticulelor de Ag (Fig. 3.4d) prezintă doar o fluorescență reziduală mare, orice semnal Raman fiind complet acoperit. S-a observat o scădere impresionantă a intensității fluorescenței reziduale și benzi înguste rezolvate clar trecând de la spectrele Raman la cele SERS.

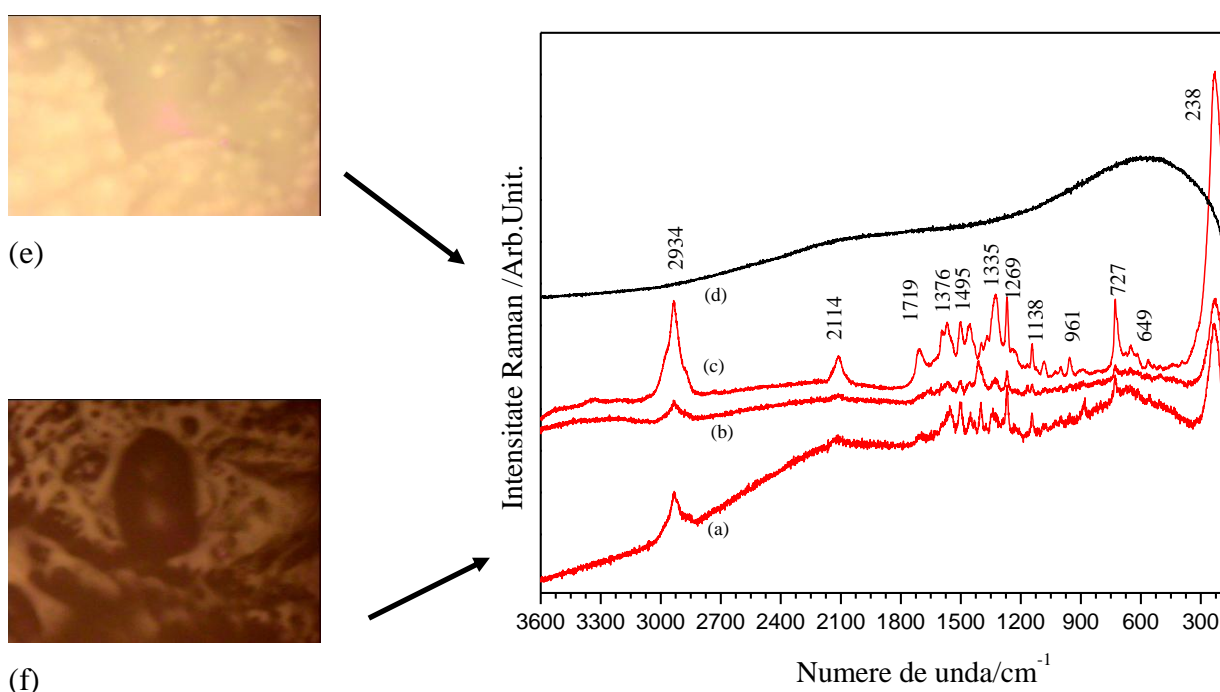


Fig. 3.4. Spectrul SERS corespunzător țesutului normal al colonului uman (starul epitelial, a-c), în comparație cu semnalul micro-Raman (florescența-d) de la același punct c) înainte de adăugarea nanoparticulelor de Ag coloidal. Excitare: 632,8 nm, 25mW (SERS) și 200 mW (Raman). Imaginile microscopice, înainte (e) și după (f) adăugarea nanoparticulelor de coloid, indicând locul unde spectrele SERS au fost achiziționate.

În Fig. 3.5 sunt prezentate spectrele SERS caracteristice țesutului de carcinom recent secționat, din diferite puncte, aleator alese. În ciuda anumitor diferențe care reflectă neomogenitatea țesutului, benzile intense de la 1138, 1269, 1495, 1572 și 2934 cm^{-1} sunt reprezentative pentru toate spectrele. Conform regulilor de selecție SERS [75], modurile de vibrație împreună cu componentele de polarizabilitate perpendiculare pe suprafața de Ag au

fost amplificate în mod preferențial. Astfel de moduri aparțin clar speciilor moleculare localizate în vecinătatea apropiată sau atașate nanoparticulelor de Ag. Benzile semnificative observate în spectrele SERS sunt atribuite provizoriu pe baza informațiilor Raman anterioare, realizate pe țesutul de carcinom și cel normal din colon și pe baza de date Raman, raportata recent, a moleculelor biologice [76].

În ceea ce privește caracteristica SERS pe carcinom, cea mai intensă bandă SERS de la 238 cm^{-1} este caracteristică modului Ag-N, când moleculele ce conțin N sunt adsorbite pe nanoparticulele de Ag. Benzile care sunt în mod exclusiv datorate modurilor de vibrație ale inelului de ADN și ARN, adenină ($727, 1138, 1335, 1495\text{ cm}^{-1}$), guanină (674 cm^{-1}), citozină (1269 cm^{-1}), timină (617 cm^{-1}) și aminoacizi cu lanțuri R ciclice (histidina – 1575 cm^{-1}), fenilalanina (1002 cm^{-1}) – această ultimă bandă fiind de asemenea specifică pentru triptofan sunt amplificate în mod deosebit. Modul de întindere PO_2^- al lanțului ADN de la 1069 cm^{-1} a prezentat o intensitate scăzută. Absența benzii atribuită amidelor I de la proteine din intervalul spectral $1600\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$ este demnă de menționat. În spectrul SERS al țesutului epitelial normal (Fig. 3.5c) s-au observat benzi înguste la $238, 727, 1495, 1572, 1719, 2114$ și 2934 cm^{-1} .

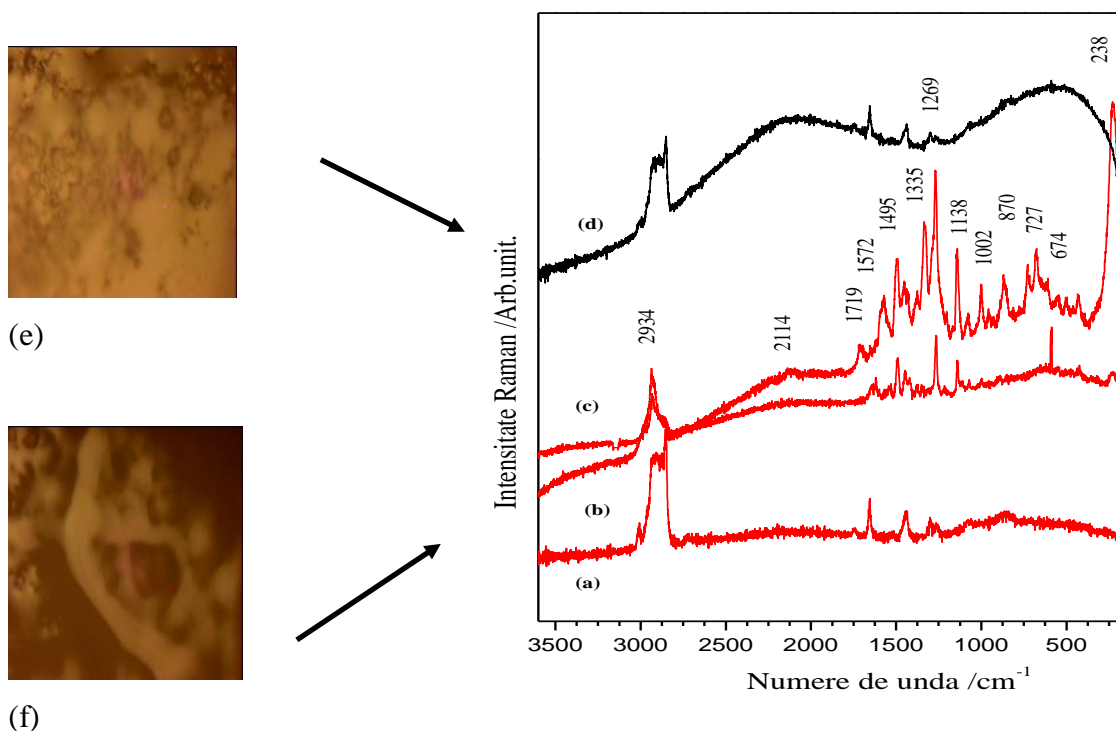


Fig. 3.5. Spectrele SERS corespunzătoare țesutului adenomacarcinom al colonului uman în comparație cu semnalul micro-Raman (floreștența-d) de la același punct c) înainte de adăugarea nanoparticulelor de Ag colidal. Excitare: $635,8\text{ nm}$, 25mW . Imaginile microscopice, înainte (sus) și după (partea de jos) adăugarea nanoparticulelor de coloid, indicând locul unde spectrele SERS au fost achiziționate.

Forma benzilor și intensitatea acestora diferențiază în mod clar comportamentul SERS al țesutului de carcinom și a celui normal. În ciuda faptului că majoritatea acestora pot fi atribuite acizilor nucleici, este de asemenea prezent și semnalul de la proteine sau lipide.

Comparând diferitele atribuiri din spectrele Raman ale țesutului din colon raportate anterior, datele sunt încă controversate. Acest fapt este aproape în întregime datorat semnalului micro-Raman slab și complicat care a rezultat din măsurătorile directe în FT sau în configurarea confocală. Capacitatea unică a tehnicii SERS de a amplifica semnalul provenit de la speciile moleculare localizate în imediata vecinătate a particulelor de Ag este demonstrată acum pentru măsurătorile pe țesuturi. Rezumând aceste constatări, se poate concluziona că acizii nucleici sunt prezenți preponderent în țesutul de carcinom, proteinele sau lipidele fiind mai puțin reprezentative [77]. Totuși, o astfel de presupunere va fi ulterior susținută de imagistica SERS pe țesuturi, întrucât rezultatele prezentate aici demonstrează posibilitatea de a înregistra benzi clar rezolvate de la țesutul de carcinom. Prin urmare, informații despre conformația ADN și modificările din interiorul procesului carcinogen, împreună cu scăderea conținutului de proteine ar putea fi extrase selectiv folosind tehnica SERS, fără nici o utilizare a coloranților sau a altor specii chimice ca și legături funcționalizate. Un avantaj major al investigațiilor bazate pe tehnica SERS asupra țesuturilor este timpul scurt de achiziție a spectrelor SERS cu un raport semnal/zgomot mult mai bun și cu o incidență mai mică a puterii laserului, decât în cazul măsurătorilor micro-Raman. Aceste rezultate preliminare sunt de mare interes în senzorii SERS pe bază de nanoparticule, folosiți pentru diagnosticarea gastrointestinală *in vivo* și monitorizarea terapiei.

Capitolul 4. Spectroscopia Raman a probelor de țesut preparate în vederea examenului histopatologic

4. 1. Investigații spectroscopice Raman asupra țesuturilor prelevate de la 9 pacienți diagnosticați histopatologic cu diverse stadii de cancer

În acest studiu, am investigat prin tehnica Raman țesuturi de colon uman de la 9 pacienți încercând să demonstrez abilitatea acestei tehnicii de a realiza simultan și imunohistochimie și diagnosticare Raman; să evaluez influența agenților de colorare asupra semnalului Raman al țesutului; să demonstrez specificitatea informației de la o persoană la alta. Pentru asta am monitorizat și discutat în acest studiu semnalul Raman al țesutului fixat cu formalină și colorat cu H&E de la țesut sănătos și canceros, în diferite stadii de diagnosticare obținute prin examen histopatologic. Markerii H&E, Xilenul și rășina Biomount

ce au fost implicați în procesul de colorare au fost de asemenea analizați prin Raman pentru a mă asigura de corecta interpretare a rezultatelor. Am ales mostre de țesut normal al colonului și țesut tumoral, luând în considerare creșterea drastică a incidenței acestei afecțiuni asupra populației și a cererii de proceduri senzitive pentru a asista excizia leziunilor și a țesuturilor reziduale, pentru o mai bună delimitare între țesutul sănătos și canceros și pentru a înțelege schimbările moleculare asociate carcinogenezei. Complexitatea exciziei luată în considerare de histopatolog poate fi susținută de rezultatele obținute și prin spectroscopia Raman. Spectroscopia Raman s-a dovedit ca fiind o metodă rapidă și precisă de diagnosticare a cancerului [78-82]. Totuși, diagnosticarea actuală este bazată pe un tipar standard, neexistând încă nici o metodă pentru a înlocui evoluția unui țesut fără excizie [83]. În acest sens, cu tehnica spectroscopică Raman se pot obține analize cantitative și calitative ce pot determina schimbări structurale în țesuturi biologice.

Examinarea histopatologică standard confirmă adenocarcinomul la 9 pacienți care au suferit o intervenție chirurgicală.

În timpul intervenției chirurgicale, ca o procedură de rutină, segmente din țesutul considerat „normal” sunt de obicei îndepărtate, datorită lipsei unei tehnici sensitive care să asiste la intervenție și să delimiteze clar țesutul normal de cel canceros. De aceea, în această lucrare și țesutul sănătos care a fost rezectat de la cei 9 pacienți a fost investigat.

Principalele spectre FT-Raman înregistrate în stratul epitelial al țesuturi de colon fixat cu formalină sunt prezentate în Fig. 4.1a pentru fiecare din cele 9 cazuri, cu anumite prelucrări spectrale pentru claritate, în timp ce în Fig.4.1b sunt cele pentru țesut canceros, fără modificări, pentru a evidenția specificitatea pacientului. Spectrele au fost obținute din zonele cu țesut sănătos, acestea fiind extirpate o dată cu cele canceroase. Fiecare spectru FT-Raman reprezintă medierea a 500 de scanări. Diferențele sistematice în regiunea numerelor de undă mari, între punctele investigate aleatoriu, pentru fiecare probă, se explică prin analiza rezultatelor anterioare pe celule [84]. Benzile atribuite lipidelor sunt cele de la numerele de undă 1658, 1441, 1303 și 1269 cm^{-1} , care sunt prezente într-un procentaj considerabil mai mare în cazul celulelor maligne (13.8%) față de cele sănătoase (1.8%), reprezentând astfel un indicator al malignității [84].

În urma analizei spectrelor obținute se poate observa că, semnalului FT-Raman al țesutului canceros este slab (Fig. 4.1b), probabil datorită degradării structurii. Totuși benzile principale sunt observate ca și în cazul țesutului sănătos, doar că având o intensitate mai mică. Poziția benzilor este bine corelată cu alte rezultate raportate pe celule canceroase [84].

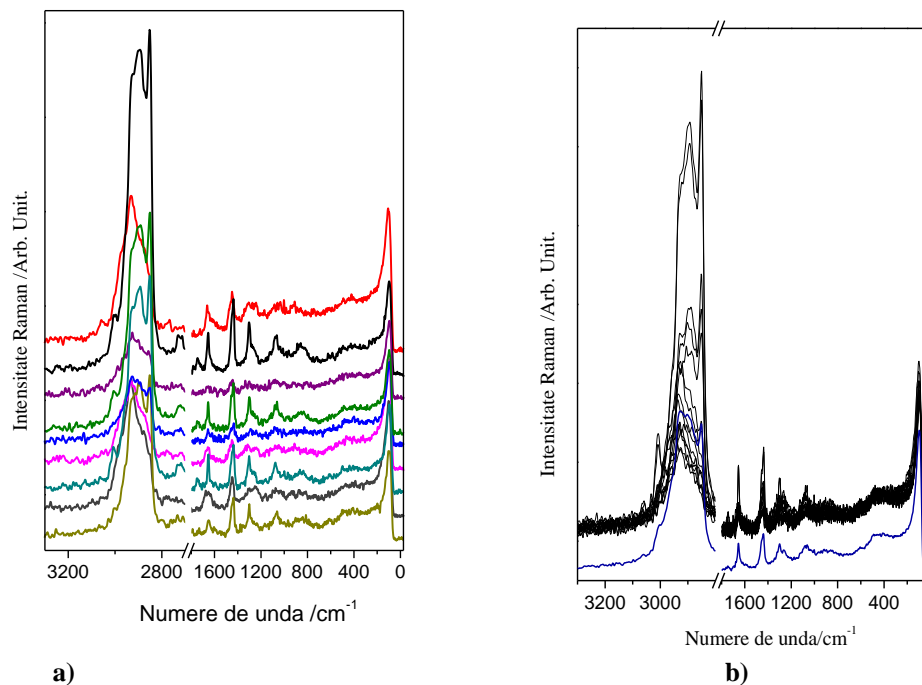


Fig .4.1. a) Spectrele FT-Raman colectate de la probele de țesut sănătos de colon de la cei 9 pacienți, după fixarea în formol. Offset-ul spectral a fost introdus pentru claritatea spectrelor. b) Spectrele FT-Raman colectate de la probele de țesut canceros de colon de la cei 9 pacienți, după fixarea în formol. Excitare laser: 1064 nm, 350 mW.

Benzile observate în regiunea numerelor de undă $600-1800\text{ cm}^{-1}$ din Fig.4.1a sunt analizate comparativ cu studii anterioare pe probe de țesut sănătos de colon [85].

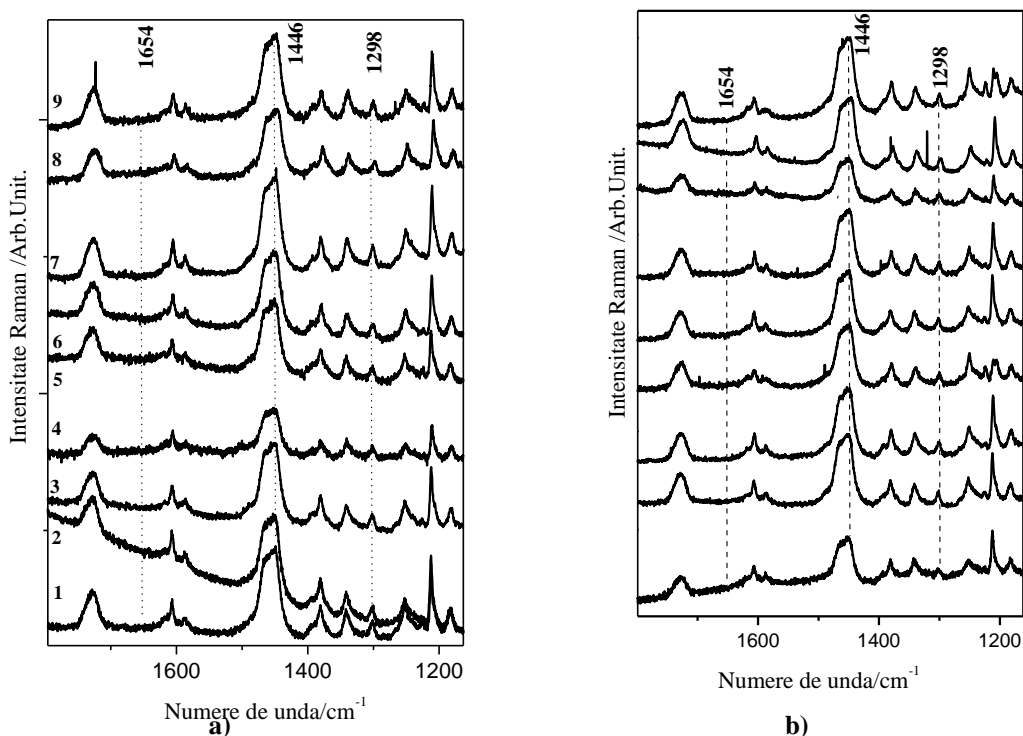


Fig. 4.2. Spectre Micro-Raman obținute de la țesuturi normale (a) și canceros (b) colorate cu H&E, de la 9 pacienți. Spectrele sunt afișate de la 1-9 în funcție de creșterea gradului de metastaze a cancerului, de la stadiul B (spectre 1-5), stadiul C (spectre 6-8) și stadiul D (spectru 9). Excitație: 632 nm, 3 mW.

Datorită neomogenității probei de țesut, de la un punct de achiziție la altul semnalul prezintă ușoare modificări, totuși, statistic, analiza amprentei specific spectrale identifică grupe de probă. Andrade [85] raportează mari variații în cadrul studiului său de la un individ la altul, ceea ce reflectă o calitate intrinsecă a semnalului, însă benzile importante se observă cu ușurință. Ca și o concluzie, semnalul FT-Raman prezintă constant benzi caracteristice probei de la o achiziție la alta. Toate probele normale au prezentat benzile discutate anterior pentru fiecare pacient, indiferent de locația geografică.

Spectrele Raman pentru țesutul colorat cu H&E, în regiunea numerelor de undă 1800-1100 cm^{-1} , sunt prezentate în Fig. 4.2, atât pentru țesuturile normale (a), cât și pentru cele canceroase (b).

Semnalul Raman pentru țesutul colorat reprezentând o suprapunere a fondului de fluorescență și a împrăștierii Raman pe țesut, la fel ca și semnalul Raman al agenților de colorare, respectiv semnalul neprocesat pe o probă sunt prezentate în Fig. 4.3.

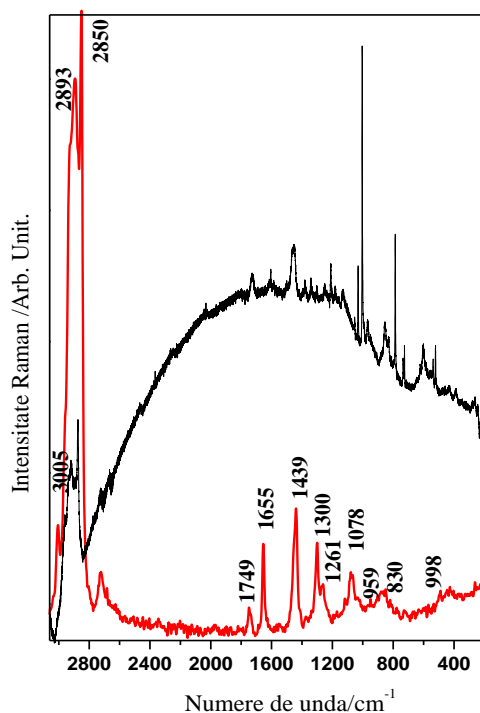


Fig. 4.3. Semnal tipic Raman neprocesat obținut de la țesut de colon sănătos colorat cu H&E (sus) evidențiind benzi suplimentare în comparative cu unul necolorat, fixat în formalin. Excitare: 632.8 și 1064 nm.

Semnalul FT-Raman al probei este de asemenea prezentat (Fig. 4.3, jos) iar benzile principale sunt discutate pentru țesutul colorat. Benzi adiționale la acestea, reprezentând contribuția agenților de colorare se pot de asemenea observa. Aceste contribuții au fost analizate prin înregistrarea și compararea semnalului FT-Raman pentru hematoxină, eozină, xilen și rășini *Biomont*, folosite în laboratorul clinic.

În Fig. 4.4 sunt prezentate spectrele țesutului în cazul celui colorat și a celui necolorat, împreună cu principalele componente folosite la prelucrare probelor în vederea examinării histopatologice.

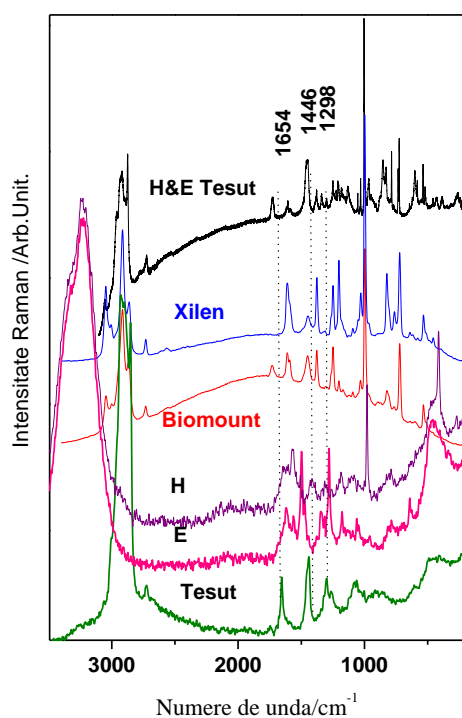


Fig. 4.4. Spectrele Raman ale speciilor implicate în protocolul de colorare al țesuturilor (H-hematoxină, Eosin, xilen și Biomount), așa cum se evidențiază pe fiecare spectru. Spectre de la țesutul colorat cu H&E și cel fixat în formol, sunt de asemenea prezentate. Liniile punctate reprezintă benzile principale ale țesutului necolorat. Excitație: 632 nm, 3 mW.

Pentru a evalua efectul interferențelor agenților de colorare în spectrele Raman ale țesutului, semnalul Raman al țesutului fixat cu formalină a fost comparat cu cel al probei colorate cu H&E de la același pacient și cu cel al agenților de colorare (Fig. 4.4). Cea mai reprezentativă bandă atribuită țesutului fixat cu formalină a fost prezentată cu linie punctată, pentru o ușoară delimitare.

Benzile specifice agentului de colorare H&E nu se regăsesc în spectrul țesutului colorat, evidențiindu-se lipsa benzii amidă I de la 1654 cm^{-1} în spectrele țesutului colorat, cât și un semnal puternic și în zona numerelor de undă $1723\text{-}1749\text{ cm}^{-1}$. Acest aspect se poate asocia cu o posibilă necroză a celulelor, distrugerea proteinelor. Pe lângă aceasta, lipsa benzii amidă I s-a observat și pentru spectrul pe țesut sănătos. E posibil ca în timpul procesării țesutului, proteinele să fie denaturate prin coagulare și eventuale reacții de polimerizare, rezultând blocaje și stoparea reacțiilor enzimatică și autoliza. Banda intensă de la 1446 cm^{-1} (Fig.4.4) nu pare să fie afectată de semnalul substanțelor de colorare. De aceea intensitatea acestei benzi va fi monitorizată pe parcurs în studiile de imagistică Raman, pentru a asista complementar la o corectă concluzie histopatologică. Această bandă reprezintă un indicator al malignității în diagnosticarea cancerului colorectal prin spectroscopia Raman [84].

În regiunea numerelor de undă mari ($3050\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$) spectrul țesutului colorat (Fig. 4.4) a fost complet afectat de semnalul emis de xilenu și *Biomont*, fiind imposibilă utilizarea acestei zone pentru diagnosticare. De regulă, intensitatea vibrațiilor de întindere

CH₃ și CH₂ ale lipidelor de la 2923 cm⁻¹ și 2875 cm⁻¹ este mai mare în cazul țesutului canceros decât în cel al țesutului sănătos [85], indicând o caracteristică a lipidelor constând într-o reacție de autoapărare a organismului. Această reacție este observabilă și în cazul țesutului necolorat [84, 85, 86]. Un raport recent arată comparații între spectrele Raman pe țesut proaspăt recoltat și pe țesut fixat cu formalină sau xilen. O reducere dramatică în intensitatea benzii amidă I a fost observată în cazul fixării cu respectivele substanțe [87]. Deși fiecare pas de procesare introduce noi modificări în rezultatul spectral obținut, autorii au concluzionat că se poate delimita o probă de alta dacă se cunosc condițiile exacte de procesare. Alt studiu recent a fost dedicat îmbunătățirii protocolului [88]. Probe de țesut cervical au fost preparate utilizând multiple metode de procesare, iar apoi s-au identificat contribuțiile agenților folosiți. Totuși, prezentele rezultate prezentate pentru țesutul colorat cu H&E oferă posibilitatea de a înregistra semnal specific, deschizând noi perspective în tehnica de diagnosticare Raman, prin rezoluția mărită, diferențierea componentelor nucleare de cele celulare, etc.

Concluzii

- Cu ajutorul spectroscopiei vibraționale s-au putut diferenția cele două forme de paracetamol, respectiv forma monoclinică (comercială) și forma ortorombică.
- S-a evidențiat faptul că după recristalizare paracetamolul normal poate să conțină o mixtură între cele două forme, în timp ce paracetamolul sinus conține doar forma monoclinică.
- Cele mai importante benzi ale anumitor excipienți, adăugați în procesul de preparare a medicamentelor, au putut fi identificate.
- S-a dedus interacțiunea moleculei de paracetamol cu suprafața filmului de Ag prin intermediul câtorva grupări funcționale.
- Utilizând spectroscopia vibrațională, s-a demonstrat faptul că se pot identifica principalele componente moleculare în probele studiate, precum și modificările moleculare ale acestora, permițând astfel o diferențiere între țesutul normal și cel canceros al colonului uman.
- S-a evidențiat faptul că țesuturile normale au conținut mai ridicat de proteine, în timp ce țesuturile canceroase au fost caracterizate ca având conținut mai scăzut de proteine și conținut mai mare de lipide.

- Prin analiza spectrelor obținute din cele trei zone supuse studiului, respectiv mucoasă, submucoasă și musculară s-a putut evidenția faptul că, cancerul, se extinde de la interior către exterior.
- În principiu, dacă ne bazăm pe presupunerile oferite de datele furnizate, este posibil să concluzionăm că spectroscopia FT-IR-Raman promite mult în ceea ce privește metodele de diagnosticare a cancerului și ar putea fi folosită ca un sistem de clasificare a țesutului.
- În urma obținerii unui semnal SERS se poate spune că, combinând tehnica micro-Raman cu proprietățile plasmonice a nanoparticulelor adecvate de metal nobile, se poate obține un adevărat progres spre o nouă platformă endoscopică bazată pe SERS, aceea de a studia mecanismele biochimice complexe a carcinogenezei și în consecință o eficacitate ridicată a diagnosticării timpurii a bolii.
- Analizând spectrele micro-Raman ale țesuturilor colorate cu H&E (studiu de caz 9 pacienți), s-a putut evidenția faptul că H&E nu prezintă benzi care să interfere drastic benziile obținute de la țesuturi.
- Benzile de la Xilenn și rășini interferează cu benzile țesutului, dar și așa, rămân câteva benzi nealterate, specifice țesutului biologic pur, netratat cu conservanți și nemarcat, și care pot fi utilizate în investigații Raman.

Bibliografie:

1. J. R. Mitchell, D. J. Jollow, W. Z. Potter, D. C. Davis, J. R. Gillette, B. B. Brodie, *J. Pharm. Exp. Ther.*, 1973; **187**: 185.
2. S. Morgan, S. Dorman, *Letters*, 2004; **27**: 99-101.
3. C. H. Lorén, P. Thesleff, A. Nilsson, *Med. Scand.*, 1987; **222**: 185-288.
4. J. A. Hinson, In *Reviews in Biochemical Toxicology* E. Hodgson, J. R. Bend, R. M. Philpot Eds., Elsevier, Amsterdam, 1980; **2**: 103-129.
5. M. W. Gemborys, G. W. Gribble, G. H. Mudge, *J. Med. Chem.*, 1978; **21**: 649-656.
6. C. H. Florén, P. Thesleff, A. Nilsson, *Med. Scand.* 1987; **222**: 185-288.
7. J. A. Hinson, In *Reviews in Biochemical Toxicology*, E. Hodgson, J. R. Bend, R. M. Philpot Eds., Elsevier, Amsterdam, 1980; **2**: 103-129.
8. M. W. Gemborys, G.W. Gribble, G. H. Mudge, *J. Med. Chem.* 1978; **21**: 649-652.
9. D. P. Sandler, J. C. Smith, C. R. Weinberg, Y. M. Buckalew, V. W. Dennis, W. B. Blythe, W. P. Burgess, *N. Engl. J. Med.* 1989; **320**: 1238.
10. A. M. Richard, J. K. Hongslo, P. F. Boone, J. A. Holme, *Chem. Res. Toxicol.* 1991; **4**: 151-156.
11. P. Di Martino, P. Conflant, M. Drache, J. P. Huvenne, A. M. Guyot-Hermann, *J. Therm. Anal.* 1997; **48**: 447-458.
12. T. Beyer, G. M. Day, S. L. Price, *J. Am. Chem. Soc.* 2001; **123**: 5086-5094.
13. A. Rossi, A. Savioli, M. Bini, D. Capsoni, V. Massarotti, R. Bettini, A. Gazzaniga, M. E. Sangalli, F. Giordano, *Therm. Acta* 2003; **406**: 55-67.
14. M. L. Peterson, S. L. Morissette, C. McNulty, A. Goldsweig, P. Shaw, M. LeQuesne, J. Monagle, N. Encina, J. Marchionna, A. Johnson, J. Gonzalez-Zugasti, A. V. Lemmo, S. J. Ellis, M. J. Clima, J. Almarsson, *J. Am. Chem. Soc.* 2002; **124**: 10958-10959.
15. M. Szelagiewicz, C. Marcolli, S. Cianferani, A. P. Hard, A. Vit, A. Burkhard, M. Von Raumer, U. C. Hofmeier, A. Zilian, E. Francotte, R. Schenker, *J. Therm. Anal. Cal.* 1999; **57**: 23-43.
16. L. Kalantzi, C. Reppas, J. B. Dressman, G. L. Amidon, H. E. Junginger, K. K. Midha, V. P. Shah, S.A. Stavchansky, D. M. Barends, *J. Pharm. Sci.* 2006; **95**: 4-14.
17. F. P. A. Fabbiani, D. R. Allan, W. I. F. David, S. S. Moggach, S. Parsons, C. R. Pulham, *Cryst. Eng. Comm.* 2004; **6**: 504.
18. G. Nichols, C. S. Frampton, *J. Pharm. Sci.* 1998; **87**: 684-693.
19. P. Verwer, F. J. J. Leusen, *Revs. Comp. Chem.* 1998; **12**: 327-365.
20. P. Espeau, R. Céolin, J. L. Tamarit, M. A. Perrin, J. P. Gauchi, F. Leveiller, *J. Pharm. Sci.* 2005; **94**: 524-539
21. A. J. Florence, N. Shankland, K. Shankland, W. I. F. David, E. Pidcock, X. Xu, A. Johnston, A. R. Kennedy, P. J. Cox, J. S. O. Evans, G. Steele, S. D. Cosgrove, C. S. Frampton, *J. Appl. Cryst.* 2005; **38**: 249-259.
22. F. Giordano, A. Rossi, R. Bettini, A. Savioli, A. Gazzaniga, C. Novák, *J. Therm. Anal. Cal.* 2002; **68**: 575-590.
23. H. A. Garekani, J. L. Ford, M. H. Rubinstein, A. R. Rajabi-Siahboomi, *Int. J. Pharm.* 2000; **208**: 87-99.
24. K. V. R. Prasad, R. I. Ristic, D. B. Sheen, J. N. Sherwood, *Int. J. Pharm.* 2002; **238**: 29-41.
25. M. A. Mikhailenko, *J. Cryst. Growth* 2004; **265**: 616-618.
26. P. A. McGregor, D. R. Allan, S. Parson, C. R. Pulham, *J. Pharm. Sci.* 2002; **91**: 1308-1311.

27. I. G. Bine, P. Vassileva-Boyadjieva, Y. I. Binev, *J. Mol. Struct.* 1998; **447**: 235-246.
28. M. L. Ramos, J. F. Tyson, D. L. Curran, *Anal. Chim. Acta* 1998; **364**: 107-116.
29. P. Merckle, K. A. Kovar, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1998; **17**: 365-374.
30. A. Eustaquio, M. Blanco, R. D. Jee, A. C. Moffat, *Anal. Chim. Acta* 1999; **383**: 283-290.
31. S. Y. Lin, S. L. Wang, Y. D. Cheng, *J. Phys. Chem. Solids* 2001; **61**: 1889-1893.
32. H. A. Moynihan, I. P. O'Hare, *Int. J. Pharm.* 2002; **247**: 179-185.
33. R. Szostak, S. Mazurek, *Analyst*, 2002; **127**: 144-148.
34. **L. M. Andronie**, S. Canta, O. Cozar, I. Domsa Proceeding of the Physics Conference, Timisoara 28-29 (M. Bunoiu, I. Malaescu Eds.) p.191-196 (ISBN 978-0-7354-0668-1, ISSN 0094-234X) American Institute of Physics, Melville, New-York, 2009.
35. N. Peica, S. Cîntă Pînzaru, T. Frosch, M. Schmitt, J. Popp, G. Bringmann, W. Kiefer, Proceedings "3rd International Conference on Materials for Advanced Technologies" (ICMAT), International Union of Materials Research Societies, "9th International Conference on Advanced Materials" (IUMRS-ICAM), Singapore, Singapore, Book of abstracts, (2005) July, 3-8.
36. M. L. Peterson, S. L. Morissette, C. McNulty, A. Goldsweig, P. Shaw, M. LeQuesne, J. Monagle, N. Encina, J. Marchionna, A. Johnson, J. Gonzalez-Zugasti, A. V. Lemmo, S. J. Ellis, M. J. Clima, J. Ö. Almarsson, *J. Am. Chem. Soc.*, 2002; **124** :10958-10959.
37. M. Szelagiewicz, C. Marcolli, S. Cianferani, A. P. Hard, A. Vit, A. Burkhard, M. Von Raumer, U. C. Hofmeier, A. Zilian, E. Francotte, R. Schenker, *J. Therm. Anal. Cal.*, 1990; **57** :23-43.
38. G. G. Mohamed, N. E. A. El-Gamel, F. Teixidor, *Polyhedron*, 2001; **20**: 2689-2696.
39. S. L. Wang, S. Y. Lin, Y. S. Wei, *Chem. Pharm. Bull.*, 2002; **50**:153-156.
40. S. Romero, P. Bustamante, B. Escalera, M. Cirri, P. Mura, *J. Therm. Anal. Cal.*, **77** (2004) 541-554.
41. B. B. Ivanova, *J. Mol. Struct.*, 2002; **738**: 233-238.
42. H. A. Moynihan, I. P. O'Hare, *Int. J. Pharm.*, 2002; **247**: 179-185.
43. M. F. Mrozek, S. A. Wasileski, M. J. Weaver, *J. Am. Chem. Soc.* 2001; **123**: 12817.
44. F. C. Thorley, K. J. Baldwin, D. C. Lee, D. N. Batchelder, *J. Raman Spectrosc.* 2006; **37**: 335-341.
45. J. S. Day, H. G. M. Edwards, S. A. Dobrowski, A. M. Voice, *Spectrochim. Acta A* 2004; **60**: 563-568.
46. A. P. Terzyk, G. Rychlicki, S. Biniak, J. P. Łukaszewicz, *J. Colloid Interface Sci.* 2003; **257**: 13-30.
47. A. P. Terzyk *Colloids and Surfaces A*, 2001; **177**: 23-45.
48. A. Szép, P. Fekete, J. Virgula, Z. Budavári, G. Marosi, *Proceeding of the 8th Polymers for Advanced Technologies International Symposium*, Budapest, Hungary, 13-16 September 2005.
49. F. Clarke, A. Whitley, S. Mamedov, F. Adar, N. Lewis, E. Lee, *Spectroscopy-Solutions for Materials Analysis*, June 2005 AN ADVANSTAR PUBLICATION, Printed in U.S.A.
50. B. M. Murphy, S. W. Prescott, I. Larson, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2005; **38**: 186-190.
51. H. Vogel, J. K. Wright, F. Jähmig, *The EMBO Journal*, 1985; **4**: 3625-3631.
52. P. M. Fechner, S. Wartewig, M. Fütting, A. Heilmann, R. H. H. Neubert, P. Kleinebudde, *AAPS Pharm. Sci.*, 2003; **5**: 1-13.

53. S. J. Eichhorn, R. J. Young, *Cellulose*, 2001; **8**: 197-207.
54. U. P. Agarwal, *Appita*, 2005: 377-384.
55. R. H. Bisby, S. A. Johnson, S. M. Tavender, A. W. Parker, *Science-Lasers for Science Facility Programme*, CLF Annual Report 1996/1997.
56. B. M. Murphy, S. W. Prescott, I. Larson, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2005; **38**: 186-190.
57. H. Vogel, J. K. Wright, F. Jinig, *The EMBO Journal* 1985; **4**: 3625-3631.
58. P. M. Fechner, S. Wartewig, A. Heilmann, R. H. H. Neubert, P. Kleinebudde, *AAPS Pharm. Sci.* 2003; **5**: 1.
59. S. J. Eichhorn, R. J. Young, *Cellulose* 2001; **8**: 197-207.
60. U.P. Agarwal, *Appita* 2005; **2005**: 377-384.
61. A. Wang A, Freeman J, Kuebler KE. *Lunar and Planetary Science* 2002; XXXIII: 1374.
62. A. P. Terzyk, *J. Colloid Interface Sci.* 2004; **272**: 59-75.
63. J. E. M. Diniz, R. S. Borges, C. N. Alves, *Theochem* 2004; **673**: 93-97.
64. **L. M. Andronie**, S. Canta, N. Peica, N. Leopold, O. Cozar, *Studia Universitatis Babeş-Bolyai, Physica 2*, LIV, 2009, p. 51-59.
65. J. A. Creighton, *Spectroscopy of Surface*, R. J. H. Clark, R. E. Hester (Eds.), Wiley, New York, 1988, pp. 37.
66. M. Moskovits; J. S. Suh, *J. Am. Chem. Soc.*, 1986; **108**: 4711.
67. S. Canta, **L. M. Andronie**, M. Baia, O. Cozar, Proc. 4-th International Conference: on Advanced Vibrational Spectroscopy (ICAVS), Corfu, Greece, 2007: 278.
68. P. C. Lee, D. Meisel, *J. Phys. Chem.* 1982; **86**: 3391.
69. M. Diem, S. Boydston-White, L. Chiriboga, *Appl. Spectrosc.*, 1999; **53**: 148-161.
70. X.Y. Wang, J. M. Garibaldi, B. Bird, M. W. George, *Applied Intelligence*, 2007; **27**: 237-248.
71. S. B. Akkas, M. Severcan, O. Yilmaz, F. Severcan, *Effects Food Chemistry*, 2007; **105**: 1281-1288.
72. S. Camta Painzaru, **L. M. Andronie**, N. Peica, O. Cozar, W. Kiefer. *Proceedings of the XX International Conference on Raman Spectroscopy (ICORS)*. Yokohama, Japan, 2006; 383. Chan JW, Taylor DS, Zwerdling T., Lane SM, Ihara K, Huser T. *Biophys.J.* 2006; 648.
73. L. P. Choo-Smith, H. G. M. Edwards, F. Heule, H. Barr, *Biopolym (Biospectrosc)* 2002; 648.
74. **L. M. Andronie**, S. C. Pinzaru, I. Kostova, O. Cozar, *Proc. of the XXII International Conference on Raman Spectroscopy (ICORS) Boston, USA*, 2010, 1045-1046.
75. De Gelder J, De Gussem K, Vandenabeele P, Moens L. *J. Raman Spectrosc.* 2007; **38**: 1133.
76. J. A. Creighton, *Spectroscopy of Surfaces.*, Chapter. 2, R. J. H. Clark, R. E. Hester (eds). John Wiley & Sons: Chichester, 1988; 37.
77. S. Cîntă, **L. M. Andronie**, I. Domsa, O. Cozar, S. Astilean, *Journal of Raman Spectroscopy*, 2008; **39**: 331-334.
78. K. Chen, Y. Qin, F. Zheng, M. Sun, D. Shi, *Opt. Lett.* 2006; **31**: 2015-2017.
79. A. Molckovsky, L.-M. Wong, K. Song, M. G. Shim, N. E. Marcon, B. C. Wilson, *Gastrointestinal Endoscopy*, 2003; V57 (3): 396-402.
80. E. Widjaja, W. Zheng, Z. Huang, *Int. J. Oncol.* 2008; **32**: 653-662.
81. T. C. Bakker Schut, M. J. Witjes, H. J. Sterenborg, O. C. Speelman, J. L. Roodenburg, E. T. Marple, H. A. Bruining, G. J. Puppels, *Anal Chem*, 2000; **72** : 6010-6018.

82. M. A. Short, H. Lui, D. McLean, H. Zeng, A. Alajlan, X. K. Chen, *J. Biomed. Optics* 2006; 11(3): 34004-34013.
83. European Guidelines for Quality Assurance in Colorectal Cancer Screening and Diagnosis, First Edition., (Eds) N. Segnan J. Patnick L. von Karsa, Brussels, Publications Office of the European Union, 2010, 191-232. doi:10.2772/15379, http://www.uegf.org/eu_affairs/eu_news/CRC_guidelines_publication%20EU_2011.pdf.
84. C. Scalfi-Happ, M. Udart, C. Hauser, A. Ruck, *Med. Laser Appl.* 2011; **26**: 152-157.
85. P. O. Andrade, R. A. Bitar, K. Yassoyama, H. Martinho, A. M. E. Santo, P. M. Bruni, A. A. Martin, *Anal. Bioanal. Chem.* 2007; **387**: 1647.
86. S. Pînzaru, **L. M. Andronie**, I. Domsa, O. Cozar, S. Astilean, *J. Raman Spectrosc.* 2008; **39**: 331–334.
87. A. Tuer, D. Tokarz, N. Prent, R. Cisek, J. Alami, D. J. Dumont, L. Bakueva, . Rowlands V. Barzda, *J. Biomed. Opt* 2010; **15**: 026018.
88. E. O Faola'ín, M. B. Hunter, J. M. Byrne, P. Kelehan, M. McNamara, H. J. Byrne, F. M. Lyng, *Vib. Spec.* 2005; **38**: 121–127.

Mulțumiri,

Mulțumesc tuturor celor care m-au susținut și m-au încurajat în realizarea tezei de doctorat atât de importantă pentru mine și viitorul meu.

Alese mulțumiri conducătorului științific al acestei teze de doctorat, domnul Prof. Univ. Dr. Onuc Cozar pentru sprijinul permanent pe care mi l-a acordat în toată această perioadă de studiu.

Mulțumiri speciale doamnei Conf. Dr. Simona Cântă-Pânzaru pentru contribuția la formarea mea profesională, sprijinul moral, colaborarea fructuoasă, îndrumarea și ajutorul acordat pe parcursul întregii perioade de cercetare și elaborare a tezei de doctorat.

Mulțumesc întregului colectiv din cadrul Universității Babeș-Bolyai, Facultatea de Fizică, departamentul *Spectroscopie Moleculară și Teoretică*: Prof. Dr. Vasile Chiș, Prof. Dr. Leontin David, Prof. Dr. Simion Aștilean și colegilor care mi-au oferit sprijinul și prietenia lor.

Mulțumiri speciale Prof. Dr. Wolfgang Kifer pentru colaborare și facilitarea accesul la laboratoarele de cercetare din cadrul *Institut für Physikalische Chemie der Universität Würzburg, Germania*, și celor cu care am colaborat pe parcursul acestor ani la editarea și elaborarea publicațiilor: Dr. Niculina Peica (Institut für Festkörperphysik, Technische Universität Berlin, Germany), Conf. Dr. Nicolae Leopold (Fac. de Fizica, Univ. Babeș-Bolyai, Cluj-Napoca, Romania), Dr. Ioan Domsa (Spitalul Universitar CFR, Dep. Anatomie Patologică, Cluj-Napoca, România), Prof. Dr. I. Kostova (Department of Chemistry, Faculty of Pharmacy, Medical University, Sofia, Bulgaria).

Nu în ultimul rând, datorez mulțumiri familiei mele, mamei și tatălui meu, pentru atenția, suportul, încurajarea și dragostea oferită.

Dedic această lucrare fetelor mele dragi Ștefania și Teodora, care au înțeles importanța și scopul acestei lucrări în viața mea, și care îmi oferă dragostea lor necondiționată.