



Universitatea Babeş-Bolyai
Facultatea de Chimie și Inginerie Chimică
Specializarea Chimie



Alexandrina GUIDEA

REZUMAT TEZĂ

Determinarea și modelarea proprietăților specifice ale aminoacizilor și compușilor înrudiți folosind metode chemometrice avansate

Conducător științific:
Prof. Emerit Costel SÂRBU

CAPITOLUL I—CONSIDERAȚII TEORETICE	7
1. Introducere generală—Aminoacizii	7
1.1. Structura aminoacizilor.....	10
1.2. Chiralitatea aminoacizilor.....	11
1.3. Catena laterală a aminoacizilor	11
1.4. Clasificarea aminoacizilor	12
1.5. Aminoacizi esențiali, condițional esențiali și neesențiali	14
1.6. Proprietățile aminoacizilor.....	16
1.7. Rolul aminoacizilor	20
2. Metode chemometrice	24
2.1. Analiza de regresie	24
2.2. Analiza componentelor principale	25
2.3. Analiza clusterilor	26
2.3.1. Metode de legare (grupare).....	27
2.3.2. Estimarea distanțelor	27
2.4. Analiza discriminantă.....	29
2.4.1. Analiza canonică	31
2.5. Suma diferențelor de clasificare.....	31
2.6. Analize bazate pe teoria mulțimilor nuanțate (fuzzy)	32
3. Obiectivele tezei de doctorat.....	33
CAPITOLUL II—STUDIUL DE LITERATURĂ ȘI DEFINIREA PREMISELOR.....	35
4. Proprietățile specifice ale aminoacizilor.....	35
4.1. Activitatea antioxidantă.....	35
Metode de determinare a activității antioxidante	37

4.2.	Modelarea și predicția lipofilicității aminoacizilor	40
4.2.1	Construirea modelelor QSPR.....	42
4.2.2	Descriptori moleculari	44
CAPITOLUL III—CONTRIBUȚII ORIGINALE		48
5.	Determinarea activității antioxidante și a capacității de chelare a aminoacizilor	48
5.1.	Introducere	48
5.2.	Materiale și metode	49
5.2.1.	Probe.....	49
5.2.2.	Pregătirea probelor	49
5.2.3.	Metode de determinare a activității antioxidante	49
5.2.3.1.	Metoda de stingere a radicalilor 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH radical scavenging capacity assay, DPPH).....	50
5.2.3.2.	Metoda de stingere a radicalilor acidului 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonic) (ABTS radical cation decolorization assay, ABTS).....	51
5.2.3.3.	Metoda de stingere a radicalilor superoxid (Superoxide radical scavenging activity assay, SORS)	52
5.2.3.4.	Metoda de stingere a oxidului nitric (Nitric oxide radical scavenging assay, NO)..	54
5.2.3.5.	Metoda de reducere a ionilor ferici (Fe^{3+}) (Ferric ions reducing antioxidant power, FRAP) 55	
5.2.3.6.	Metoda bazată pe reducerea ionilor cuprici (Cu^{2+}) (Cupric ions reducing antioxidant power assay, CUPRAC).....	57
5.2.3.7.	Metoda bazată pe reducerea ionilor cromat (Cr^{6+}) (Chromium reducing antioxidant capacity assay, CHROMAC).....	59
5.2.3.8.	Metoda bazată pe chelarea ionilor metalici feroși (Fe^{2+}) (Chelating Capacity Assay)	60
5.2.4.	Analize chemometrice	61
5.3.	Rezultate și discuții	62
5.3.1.	Puterea de stingere a radicalilor liberi	66
5.3.2.	Puterea de reducere a radicalilor liberi.....	69
5.3.3.	Capacitatea de chelare a ionilor metalici	72

5.3.4.	Analiza clusterilor și analiza componentelor principale	73
5.3.5.	Rezultatele analizei SRD	80
5.4.	Concluzii	82
6.	Determinarea activității antioxidante și a capacității de chelare a catecolaminelor (aminelor biogene) și medicamentelor cu structură asemănătoare	83
6.1.	Introducere	83
6.2.	Materiale și metode	84
6.2.1	Probe.....	84
6.2.2.	Metode de determinarea a activității antioxidante și de chelare a metalelor	87
6.2.3.	Analize chemometrice	87
6.3.	Rezultate și discuții	87
6.4.	Concluzii.....	97
7.	Modelarea lipofilității aminoacizilor cu ajutorul studiilor QSPR	98
7.1.	Introducere	98
7.2.	Materiale și metode	101
7.2.1.	Structurile aminoacizilor	101
7.2.2.	Descriptori moleculari	101
Descriptori 2D	103	
Descriptori 3D	105	
7.2.3.	Selectarea variabilelor (descriptorilor)	107
7.2.4.	Parametri de calitate	109
7.3.	Rezultate și discuții	111
7.4.	Concluzii.....	126
8.	Clasificarea nuanțată (<i>fuzzy</i>) a solvenților folosiți în determinarea lipofilității prin metode cromatografice. Comparatie cu clasificarea <i>Snyder</i>	127
8.1.	Introducere	127

8.2. Materiale și metode	128
8.2.1. Setul de date.....	128
8.2.2. Metode de clasificare nuanțată folosite	128
8.2.2.1. Clasificarea nuanțată (<i>fuzzy</i>).....	128
Algoritmul c-medii fuzzy de clasificare.....	130
Analiza discriminantă fuzzy (<i>fuzzy linear discriminant analysis, FLDA</i>).....	131
8.3. Rezultate și discuții	132
8.3.1. Clasificarea fuzzy folosind metoda c-medii fuzzy.....	133
8.3.2. Analiza discriminantă fuzzy (FLDA).....	140
8.4. Concluzii.....	144
9. Caracterizarea și clasificarea alimentelor pe baza conținutului de aminoacizi, folosind clasificarea încrucișată (<i>fuzzy</i>)	145
9.1. Introducere.....	145
9.2. Materiale și metode	146
9.2.1. Probe	146
9.2.2. Metode	149
9.3. Rezultate și discuții	149
9.4. Concluzii.....	154
CAPITOLUL IV—CONCLUZII GENERALE	155
BIBLIOGRAFIE.....	159
Anexa 1. Gradele de apartenență ale solvenților pentru fiecare partiție fuzzy obținute aplicând algoritmul c-medii fuzzy.	176
Anexa 2. Gradele de apartenență ale solvenților pentru fiecare partiție fuzzy obținute aplicând algoritmul c-medii fuzzy.	178
Anexa 3. Scorurile canonice corespunzătoare tuturor ROOTs-urilor.....	180
Anexa 4. Lista publicațiilor originale și participarea la conferințe internaționale	182

CUVINTE-CHEIE:

Aminoacizi

Activitate antioxidantă

Indici de lipofilitate

Relațiile cantitative structură-retenție/proprietăți/activitate (QSRR/QSPR/QSAR)

Cromatografia pe strat subțire cu fază inversă (RP-TLC)

Clasificarea nuanțată (*fuzzy*)

Analiza componentelor principale

Analiza cluster

Analiza discriminantă

Suma diferențelor de clasificare

1. Introducere

Aminoacizii (AA) sau acizii aminici sunt compuși organici care conțin în moleculă una sau mai multe grupări amino ($-\text{NH}_2$) alături de una sau mai multe grupări carboxil ($-\text{COOH}$). AA pot fi considerați derivați ai acizilor carboxilici în care unul sau mai mulți atomi de hidrogen sunt substituiți cu grupări NH_2 . Dintre numeroșii AA care se găsesc în natură, doar 20 dintre ei (α -AA) se regăsesc ca elemente de bază ale proteinelor, fiind numiți AA *proteinogenici*. Datorită masei mari (care reprezintă 40–45% din masa corporală), mușchii scheletici sunt cel mai mare rezervor de AA proteinogenici din întregul organism ¹. AA care nu se găsesc în compoziția proteinelor și peptidelor se numesc AA *neproteinogenici*.

Toți α -AA au în comun gruparea $-\text{NH}_2$ și gruparea $-\text{COOH}$ grefate pe un atom de carbon α (C_α) și se deosebesc unul de celălalt prin catena laterală R. Modul, ordinea și numărul AA care alcătuiesc fiecare proteină specifică în parte este scris în codul genetic (ADN și ARN), unde în cadrul genelor se găsesc „instrucțiunile” directe de sinteză a acestora ².

Nici un grup de compuși nu este mai dificil de caracterizat decât AA! Aceștia sunt elemente structurale de bază, care intră în compoziția proteinelor, compuși cu proprietăți biologice remarcabile. Ei funcționează drept precursori pentru sinteza unei game largi de substanțe biologice, precum: hormoni, purine, pirimidine, porfirine, vitamine, zaharuri, cofactori sau amine biogene ^{3,4}. De asemenea, joacă un rol important în semnalizarea celulară, acționează ca regulatori ai expresiei genelor, la fosforilarea proteinelor în cascadă, în transportul nutrienților (hemul din hemoglobină), în metabolismul celular, precum și în răspunsurile imune înnăscute și mediate de celule ⁵.

Relația dintre AA și proteine, precum și a proprietăților lor specifice din cadrul proteinelor, reprezintă forța motrică din spatele cercetărilor acestei teze cu privire la acești compuși fascinanți.

Scopul acestei lucrări este să ofere informații noi și pertinente privind determinarea, caracterizarea și modelarea proprietăților specifice ale aminoacizilor și compușilor înrudiți, precum și evidențierea necesității aplicării metodelor chemometrice avansate privind clasificarea nuanțată a alimentelor pe baza conținutului în aminoacizi. Lucrarea este structurată în două părți, o parte teoretică și o parte experimentală.

Partea teoretică, structurată în patru capitole, tratează aspecte privind metodele chemometrice utilizate pentru caracterizarea și clasificarea AA-lor și compușilor înrudiți, metodele experimentale de determinare a activității antioxidante precum și aspecte privind modelarea și predicția lipofilității acestora. Informațiile prezentate în această parte sunt susținute de zeci de referințe bibliografice din ultimii zece ani.

Partea experimentală cuprinde cinci capitole dedicate determinărilor, prin metode analitice a activității antioxidante a AA-lor și aminelor biogene, modelarea și predicția lipofilității (coeficientul de retenție R_{M0}) a AA-lor, precum și clasificarea solvenților implicați în determinarea cromatografică a lipofilității și clasificarea alimentelor din punct de vedere al conținutului de AA aplicând metode chemometrice avansate bazate pe teoria mulțimilor fuzzy. Rezultatele cercetărilor cuprinse în această parte au fost prezentate și publicate în reviste de mare prestigiu din străinătate și din țară.

CAPITOLUL II—STUDIUL DE LITERATURĂ ȘI DEFINIREA PREMISELOR

2. Proprietățile specifice ale aminoacizilor

2.1. Activitatea antioxidantă

Prođușii de oxidare a AA-lor diferă în funcție de structura AA-ului din care derivă. În urma oxidării, unii AA pot fi hidroxilați, nitrați, nitrozilați și chiar transformați într-un derivat de carbonil prin extracția unui atom de hidrogen din molecula mamă. Aminele biogene derivate din AA-ul tirozină se numesc catecolamine deoarece conțin o grupare catecol sau 3,4-dihidroilfenil. Cele mai abundente catecolamine sunt epinefrina (adrenalina), norepinefrina (noradrenalina) și dopamina. Catecolaminele sunt hormoni eliberați în organism ca răspuns la o serie de stresuri pentru a regla funcțiile fiziologice ale organismului ⁶⁻¹⁰. Pe lângă aceste funcții fiziologice, pot acționa și ca antioxidanți sau prooxidanți ^{11,12}.

Toți acești produși de oxidare induși de radicali au o importanță funcțională ridicată, deoarece contribuie la modularea activității proteice *in vivo*. Mai mult decât atât, unii dintre AA, cum ar fi cei aromatici și acidici, acționează ca biomarkeri ai stresului oxidativ în diferite condiții sau ca indicatori ai eficienței unui tratament (prin creșterea sau descreșterea nivelului lor în sânge) ¹³.

Rolul AA-lor ca ținte ale diferitelor atacuri radicalice, precum și rolul lor în apărarea antioxidantă, au condus la faptul că AA pot fi considerați antioxidanți de sacrificiu (sau primari) având capacitatea de a inhiba radicalii liberi ¹⁴.

Până în momentul actual, în literatura de specialitate nu s-a realizat niciun raport extins privind activitatea antioxidantă a AA-lor proteinogenici liberi. Câteva studii anterioare ¹⁵⁻¹⁷, prezintă activitatea antioxidantă a unor grupuri restrânse de AA și compară activitatea acestora cu antioxidanți de referință precum acidul ascorbic și Trolox. Însă rezultatele obținute se bazează doar pe câteva analize de determinare a activității antioxidante. O evaluare exhaustivă și cuprinzătoare încă nu a fost furnizată pentru a înțelege mai bine comportamentul antioxidant al acestor compuși importanți.

Totodată, studiile recente ^{18,19} au accentuat că o activitate antioxidantă substanțială o au peptidele și nu proteinele. Glutathionul, cel mai important antioxidant endogen al celulei, este o tripeptidă formată din 3 AA—cisteina, fiind și un indicator al nivelului de stres oxidativ exprimat prin raportul dintre glutathionul redus și cel oxidat.

În timp ce proteinele hidrolizate prezintă o activitate antioxidantă importantă, încă nu se poate explica cu exactitate cum AA din compoziția acestora influențează capacitatea lor de a inhiba peroxidarea lipidelor ²⁰. Studiile anterioare ²¹ notează că există câțiva aminoacizi specifici, în principal AA bazici (histidina și lizina) și tirozina, care modulează activitatea antioxidantă a peptidelor. Astfel, înțelegerea relației dintre compoziția în AA a peptidelor și activitatea lor antioxidantă ar putea conduce la dezvoltarea unei noi clase de compuși antioxidanți multifuncționali naturali. Din acest punct de vedere, AA sunt unici în comparație cu alți antioxidanți, deoarece pe lângă efectele pe care le au în organism, pot fi utilizați ca potențiali antioxidanți pentru a inhiba diferite procese de oxidare.

2.2. Modelarea și predicția lipofilității aminoacizilor

Chimia computațională reprezintă la momentul actual o modalitate eficientă și elegantă pentru a sistematiza proprietățile compușilor, dar și pentru dezvoltarea unor strategii de elaborare și sinteză a unor noi structuri pe baza unui design molecular.

Relația cantitativă structură–proprietate chimică (*quantitative structure-property relationship*, QSPR) sau –activitate biologică (*quantitative structure-activity relationship*, QSAR) reprezintă corelația matematică dintre proprietatea moleculară specifică sau activitate biologică și una sau mai multe caracteristici fizico-chimice și/sau structural moleculare, cunoscute sub numele de descriptori.

Studiile QSPR au condus la creșterea eforturilor privind descoperirea medicamentelor într-o mare măsură numai pe baza informațiilor teoretice obținute pentru compușii studiați ^{22–24}. Motivele utilizării pe larg a studiilor QSPR sunt în principal următoarele: (a) de a reduce timpul și costul studiilor de proiectare; (b) de a prezice proprietățile biologice, farmaceutice, fizice și chimice; (c) de a ajuta practicienii prin furnizarea informațiilor valoroase care se găsesc în bazele mari de date despre molecule; (d) de a înțelege mecanismul de acțiune a proprietății de interes. De aceea, studiile QSPR și-au găsit vaste aplicații în științele vieții ²⁵ (biologie, agricultură și medicină) precum și în fizică, chimie și inginerie ²⁶ (chimie organică, chimie fizică, știința materialelor).

În ciuda utilizării pe scară largă, potențialul deplin al modelelor QSPR încă nu a fost atins, eforturile fiind îndreptate spre generarea modelelor cu o performanță predictivă ridicată. Pentru a aduce beneficii, modelele QSPR trebuie să fie simple și ușor de interpretat astfel încât să se poată evidenția ușor caracteristicile cele mai importante.

Un model QSPR robust, fiabil și reproductibil poate fi obținut prin selectarea acelor descriptori care se corelează puternic cu proprietatea de interes și printr-o analiză foarte atentă a datelor de către un personal expert și bine instruit. Nu orice set de descriptori poate conduce la obținerea unor rezultate promițătoare.

Lipofilicitatea (hidrofobicitatea) este o proprietate moleculară fundamentală definită ca logaritmul coeficientului de partiție octanol-apă ($\log P_{OW}$) și care practic reflectă partiția compusului neionizat între două faze, de obicei octanol și apă^{27,28}.

Diferite metode experimentale (cromatografice) au fost aplicate de asemenea și continuă să fie utilizate cu succes pentru a estima caracteristicile fizico-chimice ale compușilor chimici, printre care lipofilicitatea fiind una dintre cele mai importante²⁹.

Modelarea proprietăților specifice (lipofilicitatea și activitatea antioxidantă) ale AA proteinogeni precum și predicția acestor parametri utilizând diferiți descriptori moleculari experimentali și calculați aplicând metode chemometrice avansate vor permite o mai bună înțelegere a relațiilor dintre structura AA-lor și proprietățile fizico-chimice și biochimice ale acestora. Totodată, noile informații furnizate din modelele QSPR vor oferi o caracterizare mai aprofundată (exhaustivă) a AA-lor.

CAPITOLUL III—CONTRIBUȚII ORIGINALE

3. Determinarea activității antioxidante și a capacității de chelare a aminoacizilor

3.1. Introducere

Scopul acestui capitol constă în evaluarea puterii antioxidante a AA proteinogenici și anume de stingere a radicalilor liberi, de reducere a radicalilor liberi și de chelare a metalelor de tranziție. Totodată, compararea rezultatelor obținute utilizând metode chemometrice clasice și avansate precum analiza clusterilor ierarhică (HCA), PCA și SRD.

3.2. Materiale și metode

3.2.1. Probe

Un set de douăzeci de AA proteinogenici au fost folosiți în studiu. Aceștia includ AA esențiali (EAA, **roșu**), AA neesențiali (NEAA, **albastru**) și AA condițional esențiali (CEAA, **verde**): Alanină (**Ala**), Arginină (**Arg**), Asparagină (**Asn**), Acid aspartic (**Asp**), Cisteină (**Cys**), Glutamină (**Gln**), Acid glutamic (**Glu**), Glicină (**Gly**), Histidină (**His**), Isoleucină (**Ile**), Leucină (**Leu**), Lisină (**Lys**), Metionină (**Met**), Fenilalanină (**Phe**), Prolină (**Pro**), Serină (**Ser**), Treonină (**Thr**), Triptofan (**Trp**), Tirozină (**Tyr**) și Valină (**Val**) cu grad analitic înalt (puritate 98–99%) obținuți de la Merck și Sigma (Sigma-Aldrich GmbH, Sternheim, Germania). Toți ceilalți reactivi au fost de puritate spectrală.

3.2.2. Pregătirea probelor

Soluțiile standard de AA au fost preparate în apă ultrapură la concentrația 0.1 M. La acei AA care nu erau sub formă de clorhidrați, a fost adăugată o cantitate stoichiometrică de HCl (2–3 picături). Concentrația finală a fiecărui AA pentru fiecare analiză a fost de 5 mM pentru metodele ABTS, DPPH, SORS, FRAP, CUPRAC și capacitatea de chelare a ionilor metalici feroși; 20 mM pentru metoda NO și 17 mM pentru metoda CHROMAC.

Soluțiile standard de Quercetină, Trolox și EDTA au fost preparate în etanol absolut 95% la concentrația finală de 0.001 M (de 100× decât a AA). Pentru fiecare analiză concentrația finală a fost de: 0.05 mM pentru DPPH, ABTS, SORS, FRAP, CUPRAC și capacitatea de chelare a ionilor metalici feroși, pentru NO—0.2 mM și CHROMAC—0.17 mM.

3.2.3. Metode de determinare a activității antioxidante

Pentru determinarea activității antioxidante s-au folosit 8 metode de analiză grupate în metode de stingere a radicalilor (DPPH, ABTS, SORS și NO), metode de reducere a radicalilor (FRAP, CUPRAC și CHROMAC) și metode de chelare a ionilor metalici.

3.2.4. Analize chemometrice

Pentru realizarea scopului propus, s-au folosit metode chemometrice de analiză multidimensională a datelor, respectiv HCA, PCA și analiza SRD.

3.3. Rezultate și discuții

3.3.1. Puterea de stingere a radicalilor liberi

În **Figura 3.1** se poate observa că unii dintre AA-ii care conțin în principal heteroatomi (Cys, Glu, Asp) sau fragmente aromatice (Tyr, Phe, Trp) în catena laterală, prezintă o capacitate semnificativă de stingere a radicalilor DPPH. Cu excepția Cys și Arg, care au o reactivitate antioxidantă mult mai puternică față de radicalul ABTS în comparație cu DPPH, ceilalți AA investigați se comportă în mod diferit sau la limită.

La aceeași concentrație, printre aminoacizi care au prezentat o capacitate de stingere a radicalilor superoxid de peste 80%, enumeră: Asn, His, Phe, Trp și Tyr. În acest caz, Cys, în comparație cu toți AA-ii, are o activitate semnificativă și nu cea mai ridicată, contrar celor așteptate (**Figura 3.1**).

Potențialul de inhibare a radicalilor NO de către AA este de peste 51%, evidențiindu-se aceiași AA ca și în cazul metodei SORS, alăturându-se și Cys. Cea mai mare activitate a fost obținută pentru Tyr în jur de 58%.

3.3.2. Puterea de reducere a radicalilor liberi

Conform analizei FRAP, Cys (96,72%) și Trp (85,30%) prezintă cea mai mare putere de reducere a radicalilor liberi dintre toți AA-ii investigați.

Cu toate acestea în urma testării potențialului de reducere a puterii radicalilor liberi, cele mai bune rezultate s-au observat pentru Cys (95,77%) în cazul CUPRAC și pentru Arg, Gln, Leu și Trp în cazul CHROMAC, după cum se poate observa în **Figura 3.1**.

Dintre toți AA-ii studiați, doar trei dintre aceștia au prezentat o activitate antioxidantă semnificativă prin toate metodele aplicate: Cys, Trp și Tyr.

5.3.3. Capacitatea de chelare a ionilor metalici

Capacitatea de chelare a ionilor metalici, în special a ionilor feroși, de către AA proteinogenici este una moderată, cu excepția Arg (92,15%), Gly (65,27%), Glu (63,89%), Tyr (66,40%) și Val (68,74%)) așa cum se poate vedea în **Figura 3.1**. Cu toate acestea, Arg și Asn prezintă cea mai mare capacitate de chelare în comparație cu ceilalți AA investigați.

În concluzie, Arg, Asn și Tyr pot fi considerați chelatori ai ionilor metalici și reducători ai stresului oxidativ prin suplimentare.

3.3.4. Analiza clusterilor și analiza componentelor principale

Dendrograma (**Figura 3.1**) a fost obținută prin aplicarea analizei HCA pe matricea de datele corespunzătoare capacității antioxidante și de chelare a AA investigați (folosind matricea de covarianță), unde se pot evidenția două grupuri de metode bine definite. Primul grup cuprinde metodele DPPH, NO, CHROMAC și SORS, inclusiv capacitatea de chelare, iar al doilea grup conține metodele ABTS, CUPRAC și FRAP.

Aceste rezultate sunt bine susținute prin reprezentarea grafică pe intensități de culori (Heat Map) unde pot fi observate simultan atât (di)similaritățile dintre AA, cât și (di)similaritățile dintre metodele aplicate (**Figura 3.2**). Cele mai mari valori apar pentru DPPH și SORS și cele mai mici pentru metodele ABTS și CUPRAC.

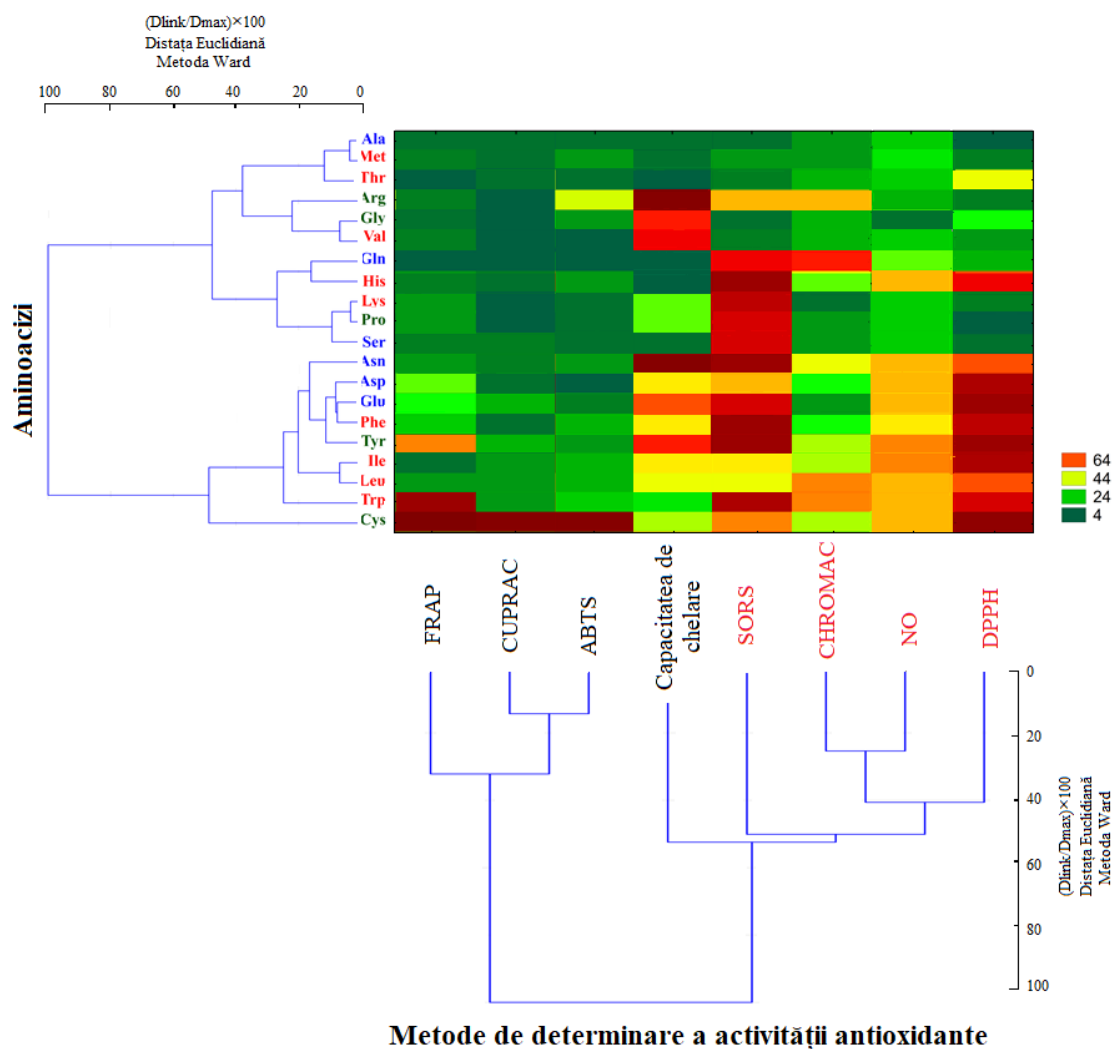


Figura 3.1. Clasificarea simultană a aminoacizilor investigați și a metodelor de determinare a activității antioxidante aplicate în studiu.

Figura 3.1 prezintă asemănările și diferențele dintre AA conform tuturor metodelor aplicate în acest studiu. Astfel, se poate observa că AA-ii formează două grupuri bine definite: grupul AA-ilor cu activitate semnificativă și grupul AA-ilor cu activitate redusă. Cisteina fiind singurul AA care se diferențiază de restul prin activitatea sa antioxidantă (în majoritatea analizelor, Cys apare ca punct extrem).

Prin reprezentarea grafică a *scorurilor* utilizând primele trei componente (**Figura 3.2**), se obține o separare satisfăcătoare a AA-lor în funcție de potențialul antioxidant, unde se poate observa că Cys apare ca punct extrem (îndepărtat).

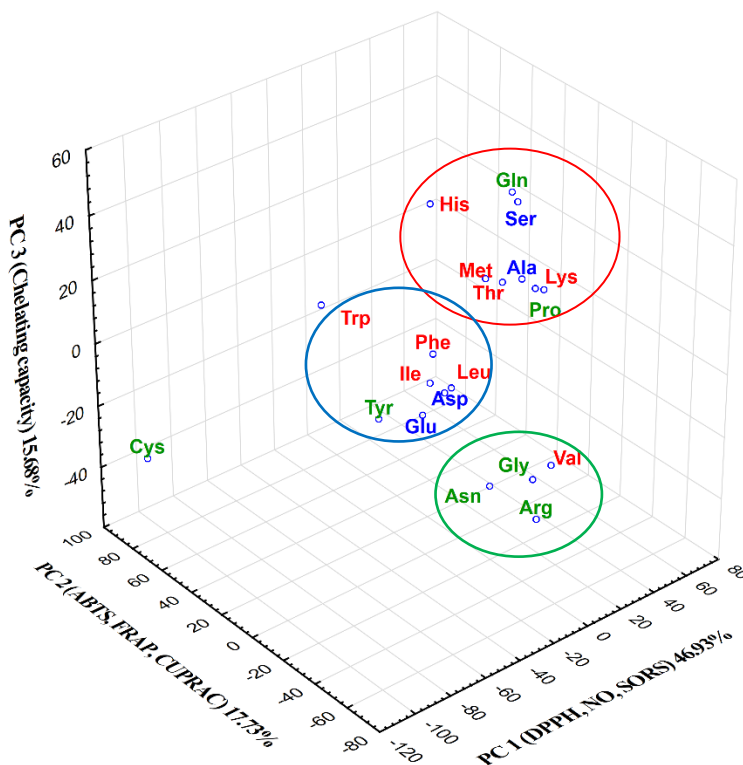


Figura 3.2. Reprezentarea 3D a scorurilor corespunzătoare celor 20 AA proteinogeni investigați, rezultate obținute în urma analizei PCA aplicate pe matricea de covarianță.

Vectorul corespunzător primei componente (PC1) poate fi asociat puterii de stingere a radicalilor—DPPH, NO, SORS, vectorul celei de-a doua componentă (PC2)—puterea de reducere a radicalilor—ABTS, FRAP, CUPRAC și vectorul celei de-a treia componentă (PC3)—capacitate de chelare a ionilor metalici. Se poate observa o separare foarte bună în 3 grupuri bine definite a AA-lor de-a lungul lui PC3—componenta capacității de chelare a ionilor metalici.

5.3.5. Rezultatele analizei SRD

Rezultatele au arătat că metoda cea mai apropiată de „valoarea medie” este metoda DPPH, în timp ce metoda cea mai diferită este metoda ABTS (**Figura 3.3**) După cum se poate observa în figură, metodele care apar cel mai la stânga de curba *Gaussian* sunt cele mai similare cu „valoarea medie”. Astfel, performanțele metodelor aplicate la fel pot fi vizualizate (de la stânga spre dreapta).

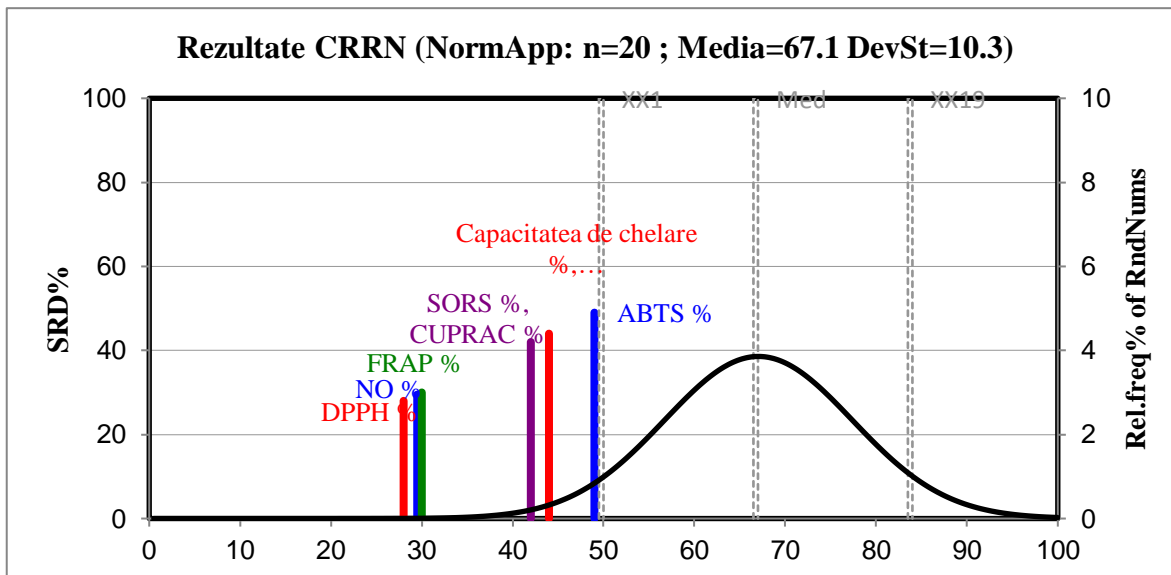


Figura 3.3. Ordonarea SRD-CRRN a metodelor de determinare a activității antioxidante. Media a fost utilizată în calitate „standard de aur” pentru comparare.

4. Determinarea activității antioxidante și a capacității de chelare a catecolaminelor (aminelor biogene) și medicamentelor cu structură asemănătoare

4.1. Introducere

Scopul acestui capitol constă în evaluarea potențialului antioxidant al catecolaminelor și medicamentelor cu structură asemănătoare și anume de captare a radicalilor liberi (DPPH, ABTS, SORS și NO), de reducere a radicalilor liberi (FRAP, CUPRAC și CHROMAC) și de chelare a metalelor de tranziție. Și totodată, interpretarea și compararea rezultatelor obținute aplicând metode chemometrice avansate precum HCA, PCA și SRD.

4.2. Materiale și metode

4.2.1 Probe

AB investigate în acest studiu includ: adrenalina, noradrenalina, dopamina, și medicamente cu structura asemănătoare: metildopa, L-dopa, D-dopa, metaraminol, ritodrina, adrenalona, albuterol, metaproterenol, terbutalina, izoprenalina și metoxamina comercializate de Merck și Sigma (Sigma-Aldrich GmbH, Sternheim, Germania). Toți ceilalți reactivi au fost fie de calitate analitică, fie de cea mai înaltă calitate disponibilă.

Soluțiile stoc ale tuturor compușilor investigați, inclusiv standardele folosite ca martori pozitivi (quercetina și Trolox) au fost preparate în etanol absolut (96%) la concentrația 1 mM. Soluția EDTA a fost preparată în apă la concentrația 1 mM. La medicamentele slab solubile în etanol (adrenalina, D-dopa), s-a adăugat o cantitate stoichiometrică de HCl.

Concentrația finală a compușilor investigați (300 μ L) a fost: 1.67 μ M pentru metodele DPPH, ABTS, SORS, FRAP, CUPRAC și capacitatea de chelare; 20 μ M pentru metoda NO și 16.67 μ M pentru metoda CHROMAC. Aceleași concentrații au fost și pentru soluțiile de antioxidanți de referință. În fiecare metoda s-a folosit un volum de 5 μ L din fiecare probă.

4.2.2. Metode de determinare a activității antioxidante și de chelare a metalelor

Metodele de determinare a activității antioxidante aplicate sunt următoarele: DPPH, ABTS, NO, SORS, CUPRAC, CHROMAC, FRAP și capacitatea de chelare a ionilor feroși.

4.2.3. Analize chemometrice

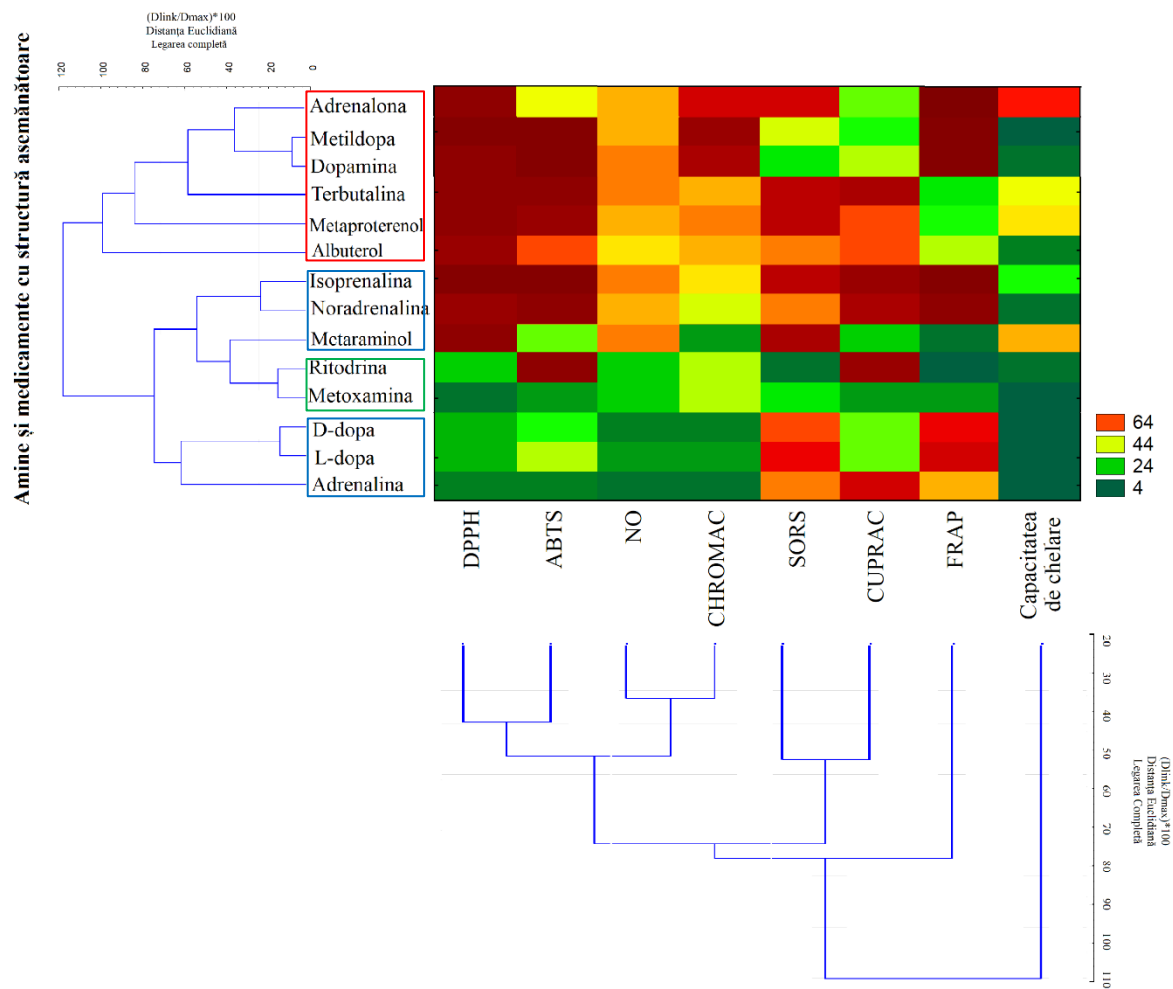
Pentru realizarea scopului propus, s-au folosit metode chemometrice de analiză multidimensională a datelor. Metodele aplicate au fost: analizele HCA, PCA și SRD.

4.3. Rezultate și discuții

Rezultatele obținute în urma aplicării a 8 metode de determinare a activității antioxidante combinate cu metode chemometrice sunt sumarizate grafic în **Figura 4.1**.

În ceea ce privește rezultatele obținute prin metodele de stingere a puterii radicalilor liberi, majoritatea compușilor au prezentat o activitate semnificativă cu excepția unor medicamente (ritodrina, metoxamina, D,L-dopa și adrenalina). Rezultatele privind reducerea puterii radicalilor liberi, se pot identifica câteva grupuri cu valori foarte apropiate: noradrenalină și izoprenalină; dopamina, adrenalona, metildopa; albuterol, metaproterenol, terbutalină; L-dopa și D-dopa; metaraminol și metoxamin având cele mai mici valori în toate cele trei metode. Adrenalina și ritodrina apar din nou destul de diferite. Cea mai mare putere de reducere, conform metodei FRAP, o au: adrenalona (96.02%) metildopa (95.97%), dopamina (94.67%) și izoprenalina (93.72%), și cea mai mică—metaraminolului (5.79%).

Capacitatea de chelare a ionilor Fe^{2+} a compușilor analizați este una scăzută dar semnificativă cu excepția adrenalonei (66,35%), a metaraminolului (55.31%), a metaproterenolului (49.58%) și a terbutalinei (45.64%), care au prezentat o capacitate de chelare puțin peste 50%. Cea mai mică valoare, în acest caz, a fost obținută pentru metildopa (0.28%).



Metode de determinare a activității antioxidante

Figura 4.1. Clasificarea simultană a compușilor investigați și a metodelor de determinare a activității antioxidante aplicate în studiu.

Prin examinarea atentă a **Figurii 4.1** (pe baza intensității culorilor) este foarte interesant de remarcat faptul că majoritatea medicamentelor adrenergice au cea mai mare activitate antioxidantă, cu excepția Metoxaminei, L-dopa și D-dopa (care nu prezintă nici activitate farmacologică). În cazul catecolaminelor, rezultatele obținute pentru noradrenalină sunt mult mai asemănătoare cu dopamina și medicamentele adrenergice, însă destul de diferite de adrenalina.

Rezultatele obținute aplicând PCA pe matricea de date nemodificate (14 probe și 8 metode) indică o reducere semnificativă a numărului de variabile. Primele trei componente preiau 84.33% din variația totală, primele două componente preluând doar 68.18% din variația totală, iar prima—48.80%. Cu toate acestea, prin reprezentarea 3D a scorurilor corespunzătoare primelor trei componente principale indică o separare satisfăcătoare a compușilor în funcție de activitatea lor antioxidantă.

Prin reprezentarea primelor trei componente, vectorul corespunzător primei componente (PC 1) poate fi asociat puterii de captare a radicalilor—DPPH, ABTS și NO, vectorul celei de-a doua componente (PC 2)—puterea de reducere a radicalilor—ABTS, FRAP și CUPRAC și vectorul celei de-a treia componente (PC 3)—capacitate de chelare a ionilor metalici.

Rezultatele analizei SRD au arătat că metoda cea mai apropiată de „valoarea medie” este metoda DPPH, în timp ce metoda cea mai diferită este metoda FRAP (**Figura 4.2**). Trebuie, de asemenea, să remarcăm similitudinea ridicată de grupare a analizelor cu dendrograma obținută aplicând analiza HCA.

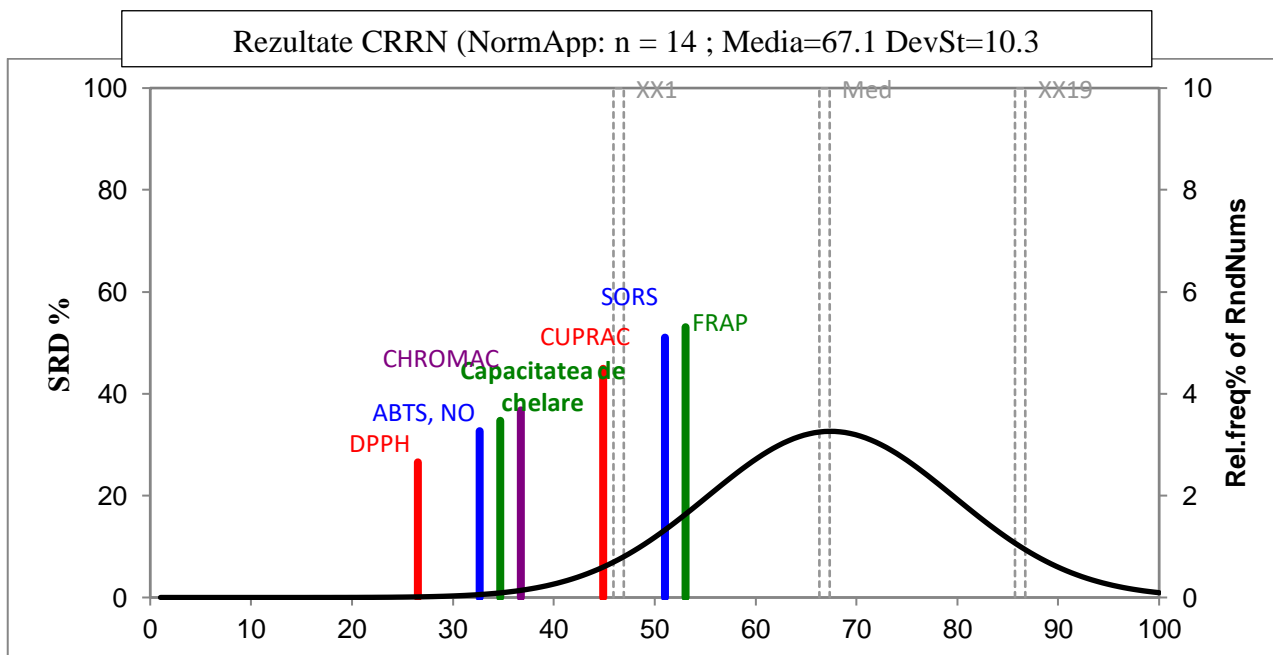


Figura 4.2. Ordonarea SRD-CRRN a metodelor de determinare a activității antioxidante.

Media a fost utilizată în calitate „standard de aur” pentru comparare.

5. Modelarea lipofilicității aminoacizilor cu ajutorul studiilor QSPR

5.1. Introducere

Obiectivul acestui capitol a fost identificarea unor modele matematice de estimare corectă și predicție a lipofilicității unor AA, pornind de la informațiile complexe oferite de structura lor moleculară. Având în vedere că la ora actuală literatura de specialitate abundă cu date experimentale privind lipofilicitatea AA-lor determinată în pâlnie și pe diferite plăci cromatografice, obiectivele majore ale acestui studiu urmăresc crearea unui model “cât mai general” care să poată fi aplicat pentru determinarea lipofilicității unor clase largi de compuși cu structură asemănătoare, precum și identificarea celei mai bune metode de exprimare a lipofilicității, sunt pe deplin justificate.

Modelele de predicție au fost generate prin regresie liniară multiplă (MLR) utilizând metodologia algoritmilor genetici pentru selecția variabilelor inițiale. Cele mai performante modele de predicție au fost selectate în baza unui set larg de parametri statistici de calitate clasici precum și o serie de parametri de calitate fuzzy nou dezvoltati și aplicați, care diferă prin modul de calculare a distanței punctului față de dreapta de regresie (astfel minimizând contribuția reziduurilor sau minimizând diferența dintre \bar{y}_i estimat și y_i măsurat). S-a prezentat o comparație între modelele clasice și cele fuzzy.

5.2. Materiale și metode

5.2.1. Structurile aminoacizilor

Structurile AA-lor luați în studiu au fost reprezentate utilizând programul Chem3D Ultra 8.0 și optimizate utilizând procedura MM+ (Molecular Mechanics Force Field) inclusă în același program. Formulele geometrice optimizate au fost utilizate în programele Dragon plus 5.4 iar structurile SMILES în programul Alchemy (<http://www.tripos.com>) în vederea calculării descriptorilor moleculari.

5.2.2. Metode

În acest studiu, dezvoltarea modelelor de calcul și predicție s-a realizat cu ajutorul programului MobiDigs v.1.0³⁰ folosind metoda regresiei liniare multiple. Selectarea celor mai semnificative variabile (descriptori) s-a realizat utilizând algoritmi genetici³¹, metodologie inclusă în același program.

În acest studiu, dezvoltarea modelelor fuzzy de calcul și predicție s-a realizat cu ajutorul programului *Sadic*.

5.3. Rezultate și discuții

Modelele de regresie liniară multiplă pentru estimarea parametrilor de lipofilicitate ale AA proteinogeni au fost obținute prin selectarea celor mai semnificativi descriptori folosind metodologia algoritmilor genetici (RLM-GA) Deoarece scopul principal al studiilor QSPR rămâne a fi obținerea unui „model general” de predicție care să poată fi aplicat pe o serie mare de aminoacizi, un set de date privind coeficientul de lipofilicitate cromatografică (R_{M0}), obținut într-un studiu experimental anterior³² pentru 16 aminoacizi proteinogeni (Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Glu, Gly, His, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Tyr, Val) au fost utilizați în acest studiu în calitate de set de date de învățare. Deoarece, la acel moment, coeficientul de lipofilicitate R_{M0} nu a fost determinat experimental pentru 4 aminoacizi (Gln, Ile, Thr, Trp) aceștia au fost utilizați în calitate de set de testare și de validare externă a modelelor create.

Începând cu variabilele independente obținute prin calcularea descriptorilor teoretici utilizând softul DRAGON și Alchemy, modelele RLM cele mai semnificative din punct de vedere statistic cu 3, 4 și 5 variabile independente au fost generate utilizând metodologia algoritmilor genetici. Cele mai bune modele au fost selectate în funcție de valorile parametrilor statistici de calitate. Descriptorii, obținuți cu ambele softuri, reținuți în modele sunt prezentați în **Tabelul 5.1**. Modelele cele mai bune obținute utilizând descriptorii cu DRAGON și Alchemy cu cea mai mare putere de predicție împreună cu parametrii statistici de calitate sunt prezentați în **Tabelul 5.2**.

Parametrii statistici ce corespund tuturor modelelor de regresie ilustrează o putere de predicție semnificativă de la mare spre moderată din punct de vedere statistic. Totodată, se poate observa că cele mai puternice modele sunt acelea ce conțin 5 sau 4 descriptori moleculari.

Analizând datele din **Tabelul 5.2** se poate observa că un R^2 de peste 89% s-a obținut pentru modelele Alchemy iar pentru modelele ce conțin descriptorii Dragon de peste 99%.

Printr-o examinare mult mai atentă, se poate observa că descriptorii care se corelează cel mai puternic cu coeficientul de lipofilicitate cromatografică (R_{M0}) în cazul setului Alchemy sunt: polarizabilitatea moleculară (Polar) și specifică (Sp.Pol), suma valorilor absolute ale sarcinilor de pe atomii de azot și oxigen din moleculă (ABSQ_{ON}), volumul și indicele Wiener (WienI).

Tabel 5.1. Descriptori teroretici reținuți în modelele RLM-GA și calculați cu softurile Alchemy²⁰⁰⁰ și Dragon Plus 5.4.

AA	Date*	Descriptori																
		ALCHEMY							DRAGON									
	R _{M0}	Volume	ABSQon	MaxQ ⁻	Polar	Sp.Pol	θ_{χ^v}	WienI	MATS3p	MATS3v	DP11	DP12	RDF070e	Mor12u	Ap	HATS2u	SP13	H1p
Ala	-1.14	164.62	1.92	-0.35	17.49	0.11	6.73	247.00	-0.27	-0.34	0.02	0.01	0.00	-0.55	2.66	0.61	0.002	0.40
Arg	-0.60	165.16	1.92	-0.36	17.87	0.11	6.71	247.00	-0.06	-0.06	6.73	6.42	5.70	-1.43	11.46	0.32	6.06	0.51
Asn	-1.19	114.90	1.66	-0.42	11.88	0.10	4.70	96.00	-0.31	-0.32	1.50	0.95	0.25	-1.01	4.76	0.43	0.66	0.43
Asp	-1.26	112.39	1.57	-0.33	11.04	0.10	4.57	96.00	-0.36	-0.38	1.42	0.89	0.00	-0.82	4.22	0.42	0.60	0.42
Cys	-0.90	101.85	0.94	-0.33	11.48	0.11	4.56	46.00	0.01	-0.04	0.43	0.19	0.00	-0.52	3.69	0.55	0.10	0.56
Gln	-	132.91	1.66	-0.42	13.71	0.10	5.41	136.00	-0.21	-0.23	3.30	2.73	1.42	-1.03	5.74	0.39	2.28	0.47
Glu	-1.18	129.38	1.57	-0.33	12.87	0.10	5.28	136.00	-0.16	-0.18	3.38	2.81	1.92	-1.20	6.39	0.39	2.37	0.46
Gly	-1.07	68.43	0.95	-0.33	6.64	0.10	2.64	18.00	0.34	0.23	0.01	0.004	0.00	-0.34	1.45	0.77	0.001	0.24
His	-0.59	137.90	1.53	-0.33	15.43	0.11	5.82	165.00	-0.01	-0.01	2.74	2.11	3.22	-1.06	7.31	0.42	1.65	0.68
Ile	-	135.50	0.94	-0.33	13.86	0.10	5.80	92.00	0.14	0.11	1.50	0.98	2.46	-0.77	6.61	0.41	0.72	0.55
Leu	-0.47	135.82	0.94	-0.33	13.86	0.10	5.79	96.00	0.19	0.15	0.90	0.47	1.61	-1.09	6.46	0.45	0.24	0.65
Lys	-0.93	148.91	1.27	-0.33	15.21	0.10	5.92	143.00	0.08	0.06	5.10	4.69	3.21	-1.15	8.26	0.37	4.29	0.48
Met	-0.55	137.48	0.94	-0.33	15.02	0.11	6.15	102.00	0.24	0.19	3.79	3.27	3.52	-0.52	7.25	0.51	2.83	0.56
Phe	-0.02	157.90	0.94	-0.33	18.14	0.11	6.60	212.00	0.33	0.30	3.96	3.40	4.33	-1.04	10.37	0.36	2.94	0.86
Pro	-0.90	108.70	0.93	-0.33	11.24	0.10	4.55	62.00	0.21	0.15	0.28	0.11	0.00	-0.97	4.06	0.55	0.05	0.53
Ser	-1.21	93.57	1.33	-0.39	9.12	0.10	3.66	46.00	-0.40	-0.46	0.23	0.09	0.00	-0.68	2.98	0.54	0.04	0.39
Thr	-	110.39	1.33	-0.39	10.83	0.10	4.54	65.00	-0.15	-0.19	0.27	0.11	0.00	-0.56	4.14	0.45	0.06	0.48
Trp	-	186.60	1.22	-0.33	22.32	0.12	8.10	396.00	0.19	0.18	5.87	5.48	6.88	-1.01	16.43	0.33	5.26	0.89
Tyr	-0.44	165.64	1.34	-0.39	18.78	0.11	6.97	268.00	0.11	0.08	5.39	4.99	4.14	-1.20	10.69	0.33	4.63	0.73
Val	-0.68	118.81	0.94	-0.33	12.02	0.10	5.09	65.00	0.01	-0.01	0.30	0.12	0.00	-0.74	5.15	0.46	0.07	0.51

* date R_{M0} experimentale obținute pe plăci cromatografice HPTLC RP-18W preluate din ³²

Tabel 5.2. Modelele de regresie liniară multiplă obținute pentru predicția coeficientului de retenție (R_{M0}) aplicând metodologia algoritmilor genetici pe descriptorii Alchemy și Dragon.

ID	Dimensiune	Model	R ² %	F	s	RSS	SDEC	Q ² %	PRESS	SDEP
ALCHEMY										
A	5	$*R_{M0} = 14.01 - 0.14 \cdot \text{Volume} + 1.68 \cdot \text{MaxQ}^- + 1.54 \cdot \text{Polar} - 155.52 \cdot \text{Sp.Pol} - 0.008 \cdot \text{WienI}$ $**R_{M0} = -11.08 \cdot \text{Volume} + 0.15 \cdot \text{MaxQ}^- + 15.01 \cdot \text{Polar} - 2.61 \cdot \text{Sp.Pol} - 1.691 \cdot \text{WienI}$	89.19	16.51	0.143	0.206	0.113	76.37	0.450	0.168
B	4	$*R_{M0} = 13.38 - 0.14 \cdot \text{Volume} + 1.56 \cdot \text{Polar} - 156.11 \cdot \text{Sp.Pol} - 0.008 \cdot \text{WienI}$ $**R_{M0} = -11.06 \cdot \text{Volume} + 15.14 \cdot \text{Polar} - 2.62 \cdot \text{Sp.Pol} - 1.86 \cdot \text{WienI}$	87.33	18.95	0.148	0.242	0.123	73.03	0.514	0.179
C	3	$*R_{M0} = -0.97 - 0.68 \cdot \text{ABSQ}_{ON} + 0.18 \cdot \text{Polar} - 0.28 \cdot \chi^V$ $**R_{M0} = -0.70 \cdot \text{ABSQ}_{ON} + 1.79 \cdot \text{Polar} - 0.94 \cdot \chi^V$	83.45	20.16	0.162	0.315	0.140	71.50	0.543	0.184
D	2	$*R_{M0} = -1.17 - 0.66 \cdot \text{ABSQ}_{ON} + 0.09 \cdot \text{Polar}$ $**R_{M0} = -0.68 \cdot \text{ABSQ}_{ON} + 0.86 \cdot \text{Polar}$	80.95	27.62	0.167	0.363	0.151	68.96	0.591	0.192
DRAGON										
E	5	$*R_{M0} = -1.36 + 0.36 \cdot \text{MATS3p} - 0.22 \cdot \text{DP11} + 0.09 \cdot \text{RDF070e} + 0.37 \cdot \text{Mor12u} + 0.20 \cdot \text{Ap}$ $**R_{M0} = 0.24 \cdot \text{MATS3p} - 1.37 \cdot \text{DP11} + 0.50 \cdot \text{RDF070e} + 0.32 \cdot \text{Mor12u} + 1.69 \cdot \text{Ap}$	99.83	1172.90	0.018	0.003	0.014	99.54	0.009	0.023
F	4	$*R_{M0} = -3.05 - 0.22 \cdot \text{DP12} + 0.31 \cdot \text{Mor12u} + 0.32 \cdot \text{Ap} + 2.07 \cdot \text{HATS2u}$ $**R_{M0} = -1.33 \cdot \text{DP12} + 0.27 \cdot \text{Mor12u} + 2.73 \cdot \text{Ap} + 0.69 \cdot \text{HATS2u}$	99.06	290.00	0.040	0.018	0.034	98.17	0.035	0.047
G	3	$*R_{M0} = -3.32 - 0.24 \cdot \text{SP13} + 0.32 \cdot \text{Ap} + 2.85 \cdot \text{HATS2u}$ $**R_{M0} = -1.30 \cdot \text{SP13} + 2.71 \cdot \text{Ap} + 0.95 \cdot \text{HATS2u}$	97.51	156.50	0.063	0.047	0.055	95.56	0.085	0.073
H	2	$*R_{M0} = -1.64 + 0.61 \cdot \text{MATS3v} + 1.61 \cdot \text{H1p}$ $**R_{M0} = 0.40 \cdot \text{MATS3v} + 0.68 \cdot \text{H1p}$	88.45	49.80	0.130	0.220	0.117	84.97	0.286	0.134

*—coeficienți standardizați

**—coeficienți nestandardizați

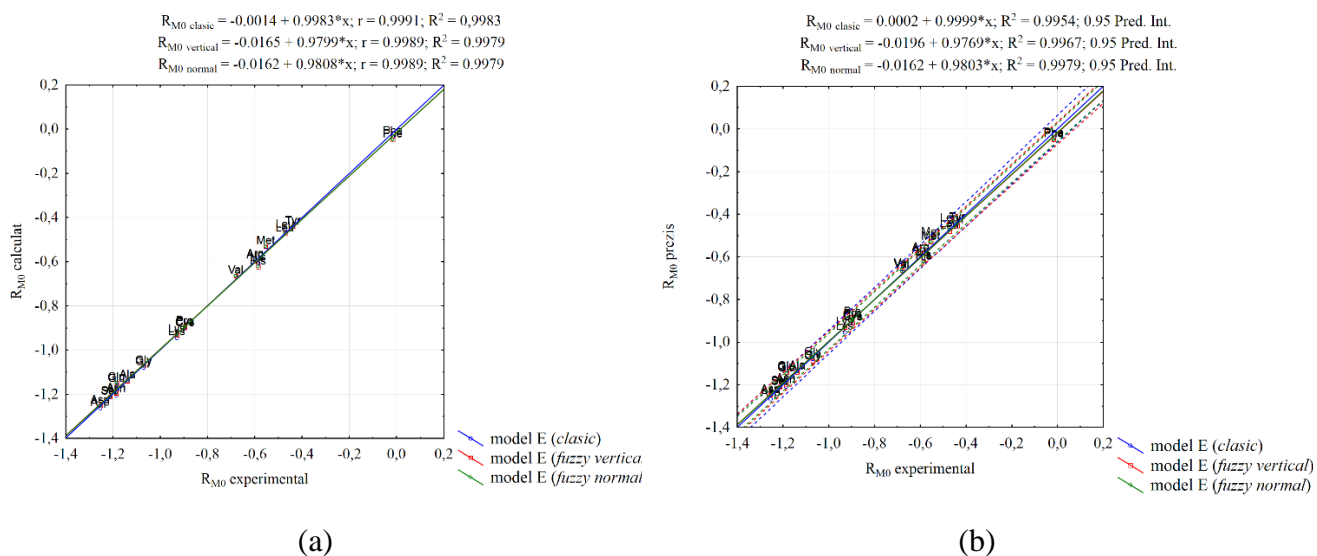
Tabel 5.3. Coeficienți de regresie și parametri de calitate fuzzy obținuți pentru predicția R_{M0} pe descriptorii Dragon și Alchemy aplicând RLM-GA.

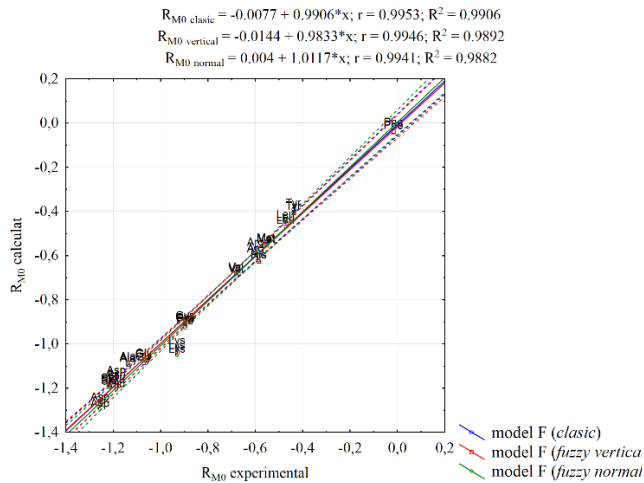
ID	Dimensiune	Tip	Model	QC ₁	QC ₃	QC ₅	QC ₆	NQC ₅	NQC ₆
ALCHEMY									
A	5	Clasic	$R_{M0} = 14.01 - 0.14 \cdot \text{Volume} + 1.68 \cdot \text{MaxQ}^- + 1.54 \cdot \text{Polar} - 155.52 \cdot \text{Sp.Pol} - 0.008 \cdot \text{WienI}$	0.643	0.212	1.747	5.216	0.437	0.326
		Vertical	$R_{M0} = 14.45 - 0.14 \cdot \text{Volume} + 1.84 \cdot \text{MaxQ}^- + 1.59 \cdot \text{Polar} - 163.10 \cdot \text{Sp.Pol} - 0.01 \cdot \text{WienI}$	1.038	0.245	1.691	6.466	0.423	0.404
		Normal	$R_{M0} = 20.02 - 0.19 \cdot \text{Volume} + 1.08 \cdot \text{MaxQ}^- + 2.14 \cdot \text{Polar} - 223.29 \cdot \text{Sp.Pol} - 0.01 \cdot \text{WienI}$	1.883	0.203	1.275	6.314	0.319	0.395
B	4	Clasic	$R_{M0} = 13.38 - 0.14 \cdot \text{Volume} + 1.56 \cdot \text{Polar} - 156.11 \cdot \text{Sp.Pol} - 0.008 \cdot \text{WienI}$	0.690	0.224	1.828	4.716	0.457	0.295
		Vertical	$R_{M0} = 17.62 - 0.18 \cdot \text{Volume} + 1.96 \cdot \text{Polar} - 201.66 \cdot \text{Sp.Pol} - 0.012 \cdot \text{WienI}$	1.178	0.269	1.839	5.909	0.460	0.369
		Normal	$R_{M0} = 25.10 - 0.22 \cdot \text{Volume} + 2.47 \cdot \text{Polar} - 280.90 \cdot \text{Sp.Pol} - 0.014 \cdot \text{WienI}$	1.070	0.231	1.671	5.793	0.418	0.362
C	3	Clasic	$R_{M0} = -0.97 - 0.68 \cdot \text{ABSQ}_{ON} + 0.18 \cdot \text{Polar} - 0.28 \cdot \chi^v$	0.344	0.229	2.151	4.912	0.538	0.307
		Vertical	$R_{M0} = -0.89 - 0.70 \cdot \text{ABSQ}_{on} + 0.23 \cdot \text{Polar} - 0.40 \cdot \chi^v$	0.356	0.233	2.563	4.385	0.641	0.274
		Normal	$R_{M0} = -0.87 - 0.71 \cdot \text{ABSQ}_{on} + 0.23 \cdot \text{Polar} - 0.41 \cdot \chi^v$	0.233	0.183	2.090	5.160	0.523	0.322
D	2	Clasic	$R_{M0} = -1.17 - 0.66 \cdot \text{ABSQ}_{ON} + 0.09 \cdot \text{Polar}$	0.339	0.24	2.093	4.851	0.523	0.303
		Vertical	$R_{M0} = -0.80 - 0.83 \cdot \text{ABSQ}_{ON} + 0.08 \cdot \text{Polar}$	0.353	0.241	2.297	4.679	0.574	0.292
		Normal	$R_{M0} = -1.64 + 0.76 \cdot \text{ABSQ}_{ON} + 1.61 \cdot \text{Polar}$	0.324	0.225	1.557	5.588	0.389	0.349
DRAGON									
E	5	Clasic	$R_{M0} = -1.36 + 0.36 \cdot \text{MATS3p} - 0.22 \cdot \text{DP11} + 0.09 \cdot \text{RDF070e} + 0.37 \cdot \text{Mor12u} + 0.20 \cdot \text{Ap}$	0.163	0.03	2.152	4.73	0.538	0.296
		Vertical	$R_{M0} = -1.36 + 0.37 \cdot \text{MATS3p} - 0.21 \cdot \text{DP11} + 0.08 \cdot \text{RDF070e} + 0.38 \cdot \text{Mor12u} + 0.20 \cdot \text{Ap}$	0.174	0.026	1.871	4.975	0.468	0.311
		Normal	$R_{M0} = -1.36 + 0.37 \cdot \text{MATS3p} - 0.21 \cdot \text{DP11} + 0.08 \cdot \text{RDF070e} + 0.38 \cdot \text{Mor12u} + 0.20 \cdot \text{Ap}$	0.168	0.021	1.785	6.433	0.446	0.402
F	4	Clasic	$R_{M0} = -3.05 - 0.22 \cdot \text{DP12} + 0.31 \cdot \text{Mor12u} + 0.32 \cdot \text{Ap} + 2.07 \cdot \text{HATS2u}$	0.185	0.059	1.619	4.846	0.405	0.303
		Vertical	$R_{M0} = -3.07 - 0.23 \cdot \text{DP12} + 0.32 \cdot \text{Mor12u} + 0.33 \cdot \text{Ap} + 2.10 \cdot \text{HATS2u}$	0.191	0.06	1.852	4.98	0.463	0.311
		Normal	$R_{M0} = -3.24 - 0.25 \cdot \text{DP12} + 0.30 \cdot \text{Mor12u} + 0.34 \cdot \text{Ap} + 2.30 \cdot \text{HATS2u}$	0.082	0.048	1.282	5.959	0.321	0.372
G	3	Clasic	$R_{M0} = -3.32 - 0.24 \cdot \text{SP13} + 0.32 \cdot \text{Ap} + 2.85 \cdot \text{HATS2u}$	0.229	0.092	2.599	4.451	0.65	0.278
		Vertical	$R_{M0} = -3.40 - 0.19 \cdot \text{SP13} + 0.29 \cdot \text{Ap} + 2.47 \cdot \text{HATS2u}$	0.257	0.109	2.311	4.608	0.578	0.288
		Normal	$R_{M0} = -4.37 - 0.26 \cdot \text{SP13} + 0.36 \cdot \text{Ap} + 3.82 \cdot \text{HATS2u}$	0.144	0.102	1.873	5.735	0.468	0.358
H	2	Clasic	$R_{M0} = -1.64 + 0.61 \cdot \text{MATS3v} + 1.61 \cdot \text{H1p}$	0.274	0.167	1.905	4.695	0.476	0.293
		Vertical	$R_{M0} = -1.63 + 0.76 \cdot \text{MATS3v} + 1.59 \cdot \text{H1p}$	0.25	0.163	1.888	4.940	0.472	0.309
		Normal	$R_{M0} = -1.65 + 0.76 \cdot \text{MATS3v} + 1.616 \cdot \text{H1p}$	0.184	0.153	1.782	5.435	0.446	0.340

Cei mai semnificativi descriptori calculați cu softul Dragon sunt descriptorii distribuție radială (RDF), indicii de autocorelare și descriptori geometrici legați în principal de polarizabilitatea atomică (MATS3p, Ap, H1p), volumul atomic van der Waals (MATS3v), electronegativitatea atomică Sanderson (RDF070e) și profilurile Randice moleculare (DP11, DP12).

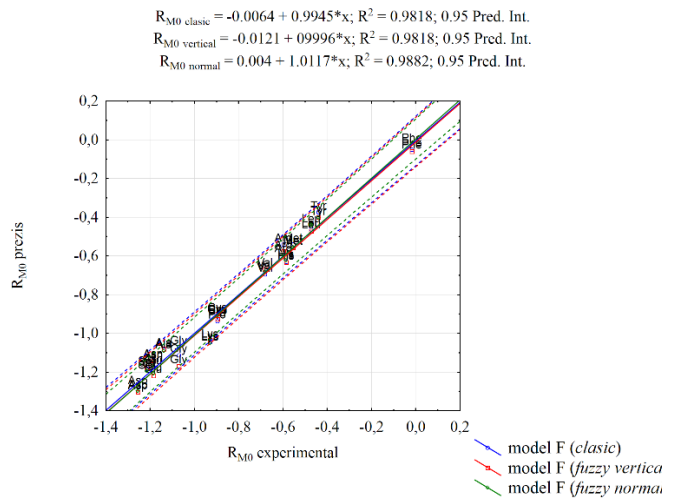
Pentru a examina capacitatea modelelor obținute de a prezice coeficientul de lipofilitate cromatografică, valorile R_{M0} calculate, cât și prezise în procesul de validare au fost comparate cu cele experimentale. S-au găsit valori de corelație bune pentru setul de date de învățare (16 aminoacizi) și setul de învățare și testare (20 aminoacizi) în cazul modelelor care utilizează descriptori Dragon (**Figura 5.1**) și descriptori Alchemy (**Figura 5.2**). Pe baza coeficienților de calitate clasici, cel mai bun model care poate prezice lipofilitatea cu o putere de 99.83% și care explică 99.83% din varianța totală, s-a obținut pentru modelele ce conține descriptorii Dragon și o putere de 76.37% în cazul modelelor ce conțin descriptorii Alchemy.

O comparație între modelele clasice și cele fuzzy poate fi vizualizată în **Figura 5.3** și **Tabelul 5.4** unde sunt sumarizați toți coeficienții de calitate clasici pentru fiecare model fuzzy în parte. Se poate observa că modelele fuzzy prezintă o îmbunătățire semnificativă din punct de vedere a puterii de predicție, atât pentru modelele ce conțin descriptorii Alchemy cât și Dragon.



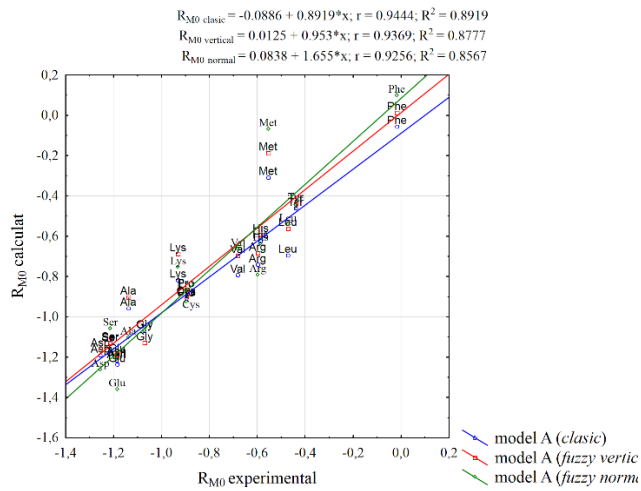


(c)

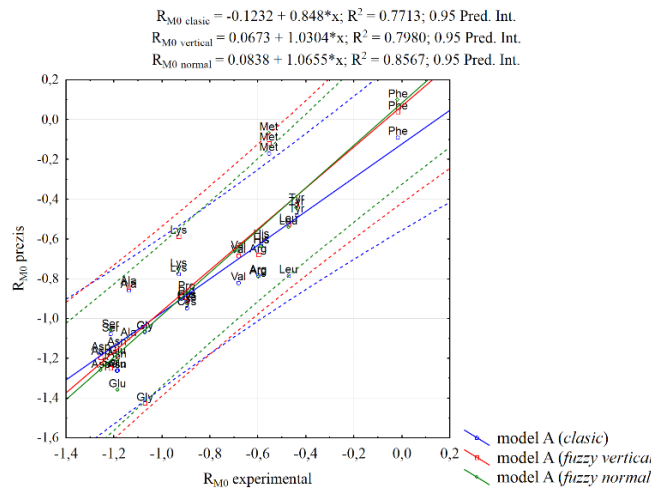


(d)

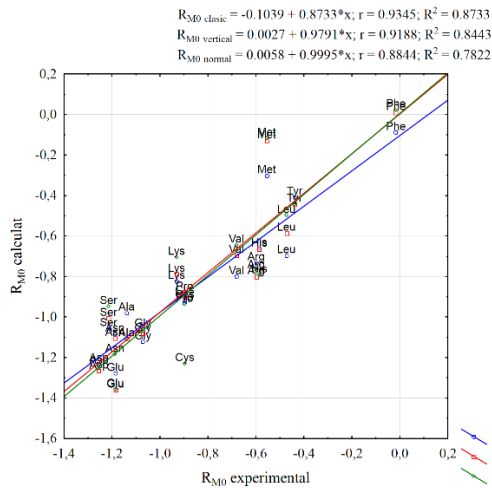
Figura 5.1. Corelațiile dintre valorile R_{M0} experimentale și calculate (a,c) și prezise (b,d) pentru modelele E (a,b) și F (c,d) ce conțin descriptorii Dragon.



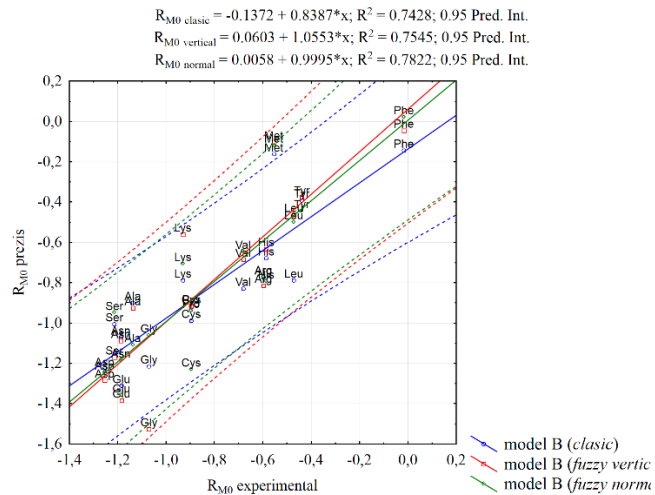
(a)



(b)



(c)



(d)

Figura 5.2. Corelațiile dintre valorile R_{M0} experimentale și calculate (a,c) și prezise (b,d) pentru modelele A (a,b) și B (c,d) ce conțin descriptorii Alchemy.

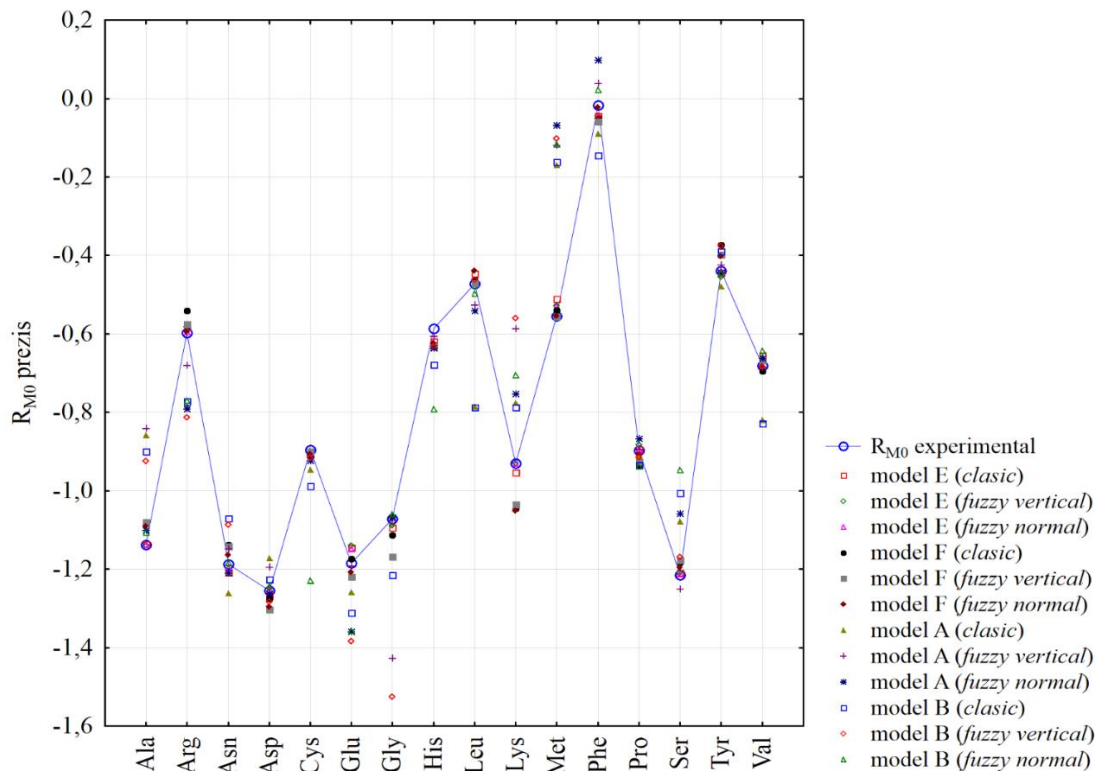


Figura 5.3. Valorile R_{M0} prezise pentru cele mai bune modele în procesul de validare externă.

Tabel 5.4. Comparația dintre modelele RLM-GA clasice și noile modele fuzzy RLM-GA dezvoltate utilizând descriptorii Dragon și Alchemy

ID	Dimensiune	Tip	Model	R ² %	F	s	RSS	SDEC	Q ² %	PRESS	SDEP
ALCHEMY											
A	5	Clasic	$R_{M0} = 14.01 - 0.14 \cdot \text{Volume} + 1.68 \cdot \text{MaxQ}^- + 1.54 \cdot \text{Polar} - 155.52 \cdot \text{Sp.Pol} - 0.008 \cdot \text{WienI}$	89.19	16.51	0.143	0.206	0.113	76.37	0.450	0.168
		Vertical	$R_{M0} = 14.45 - 0.14 \cdot \text{Volume} + 1.84 \cdot \text{MaxQ}^- + 1.59 \cdot \text{Polar} - 163.10 \cdot \text{Sp.Pol} - 0.01 \cdot \text{WienI}$	84.94	14.028	0.169	0.287	0.134	71.53	0.543	0.184
		Normal	$R_{M0} = 20.02 - 0.19 \cdot \text{Volume} + 1.08 \cdot \text{MaxQ}^- + 2.14 \cdot \text{Polar} - 223.29 \cdot \text{Sp.Pol} - 0.01 \cdot \text{WienI}$	79.83	13.212	0.196	0.384	0.155	79.83	0.384	0.155
B	4	Clasic	$R_{M0} = 13.38 - 0.14 \cdot \text{Volume} + 1.56 \cdot \text{Polar} - 156.11 \cdot \text{Sp.Pol} - 0.008 \cdot \text{WienI}$	87.33	18.95	0.148	0.242	0.123	73.03	0.514	0.179
		Vertical	$R_{M0} = 17.62 - 0.18 \cdot \text{Volume} + 1.96 \cdot \text{Polar} - 201.66 \cdot \text{Sp.Pol} - 0.012 \cdot \text{WienI}$	81.94	17.69	0.177	0.344	0.147	63.28	0.699	0.209
		Normal	$R_{M0} = 25.10 - 0.22 \cdot \text{Volume} + 2.47 \cdot \text{Polar} - 280.90 \cdot \text{Sp.Pol} - 0.014 \cdot \text{WienI}$	72.14	12.612	0.220	0.531	0.182	72.14	0.531	0.182
C	3	Clasic	$R_{M0} = -0.97 - 0.68 \cdot \text{ABSQ}_{ON} + 0.18 \cdot \text{Polar} - 0.28 \cdot \chi^v$	83.45	20.16	0.162	0.315	0.140	71.50	0.543	0.184
		Vertical	$R_{M0} = -0.89 - 0.70 \cdot \text{ABSQ}_{on} + 0.23 \cdot \text{Polar} - 0.40 \cdot \chi^v$	82.79	20.776	0.165	0.328	0.144	71.72	0.540	0.184
		Normal	$R_{M0} = -0.87 - 0.71 \cdot \text{ABSQ}_{on} + 0.23 \cdot \text{Polar} - 0.41 \cdot \chi^v$	82.77	20.981	0.165	0.328	0.143	82.77	0.328	0.143
D	2	Clasic	$R_{M0} = -1.17 - 0.66 \cdot \text{ABSQ}_{ON} + 0.09 \cdot \text{Polar}$	80.95	27.62	0.167	0.363	0.151	68.96	0.591	0.192
		Vertical	$R_{M0} = -0.80 - 0.83 \cdot \text{ABSQ}_{ON} + 0.08 \cdot \text{Polar}$	74.44	21.635	0.194	0.487	0.174	68.02	0.609	0.195
		Normal	$R_{M0} = -1.64 + 0.76 \cdot \text{ABSQ}_{ON} + 1.61 \cdot \text{Polar}$	72.09	23.289	0.202	0.532	0.182	72.09	0.532	0.182
DRAGON											
E	5	Clasic	$R_{M0} = -1.36 + 0.36 \cdot \text{MATS3p} - 0.22 \cdot \text{DP11} + 0.09 \cdot \text{RDF070e} + 0.37 \cdot \text{Mor12u} + 0.20 \cdot \text{Ap}$	99.83	1172.9	0.018	0.003	0.014	99.54	0.009	0.023
		Vertical	$R_{M0} = -1.36 + 0.37 \cdot \text{MATS3p} - 0.21 \cdot \text{DP11} + 0.08 \cdot \text{RDF070e} + 0.38 \cdot \text{Mor12u} + 0.20 \cdot \text{Ap}$	99.76	794.34	0.021	0.005	0.017	99.63	0.007	0.021
		Normal	$R_{M0} = -1.36 + 0.37 \cdot \text{MATS3p} - 0.21 \cdot \text{DP11} + 0.08 \cdot \text{RDF070e} + 0.38 \cdot \text{Mor12u} + 0.20 \cdot \text{Ap}$	99.76	797.86	0.021	0.005	0.017	99.76	0.005	0.017
F	4	Clasic	$R_{M0} = -3.05 - 0.22 \cdot \text{DP12} + 0.31 \cdot \text{Mor12u} + 0.32 \cdot \text{Ap} + 2.07 \cdot \text{HATS2u}$	99.06	290.00	0.040	0.018	0.034	98.17	0.035	0.047
		Vertical	$R_{M0} = -3.07 - 0.23 \cdot \text{DP12} + 0.32 \cdot \text{Mor12u} + 0.33 \cdot \text{Ap} + 2.10 \cdot \text{HATS2u}$	98.92	248.03	0.043	0.021	0.036	98.03	0.038	0.048
		Normal	$R_{M0} = -3.24 - 0.25 \cdot \text{DP12} + 0.30 \cdot \text{Mor12u} + 0.34 \cdot \text{Ap} + 2.30 \cdot \text{HATS2u}$	98.74	225.38	0.047	0.024	0.039	98.74	0.024	0.039
G	3	Clasic	$R_{M0} = -3.32 - 0.24 \cdot \text{SP13} + 0.32 \cdot \text{Ap} + 2.85 \cdot \text{HATS2u}$	97.51	156.50	0.063	0.047	0.055	95.56	0.085	0.073
		Vertical	$R_{M0} = -3.40 - 0.19 \cdot \text{SP13} + 0.29 \cdot \text{Ap} + 2.47 \cdot \text{HATS2u}$	96.25	95.009	0.077	0.072	0.067	93.79	0.118	0.086
		Normal	$R_{M0} = -4.37 - 0.26 \cdot \text{SP13} + 0.36 \cdot \text{Ap} + 3.82 \cdot \text{HATS2u}$	94.44	78.309	0.094	0.106	0.081	94.44	0.106	0.081
H	2	Clasic	$R_{M0} = -1.64 + 0.61 \cdot \text{MATS3v} + 1.61 \cdot \text{H1p}$	88.45	49.80	0.130	0.220	0.117	84.97	0.286	0.134
		Vertical	$R_{M0} = -1.63 + 0.76 \cdot \text{MATS3v} + 1.59 \cdot \text{H1p}$	87.54	53.144	0.135	0.236	0.122	85.92	0.268	0.129
		Normal	$R_{M0} = -1.65 + 0.76 \cdot \text{MATS3v} + 1.616 \cdot \text{H1p}$	87.41	53.754	0.136	0.240	0.122	87.41	0.240	0.122

6. Clasificarea nuanțată (*fuzzy*) a solvenților folosiți în determinarea lipofilicității prin metode cromatografice. Comparatie cu clasificarea *Snyder*.

6.1. Introducere

Scopul acestui capitol urmărește descrierea și aplicarea unei noi metodologii pe baza teoriei mulțimilor nuanțate pentru caracterizarea și clasificarea solvenților, îmbunătățind în acest fel clasificarea propusă de Snyder. Abordările de grupare și clasificare propuse au fost obținute în mod iterativ prin aplicarea metodei de clasificare *c-medii fuzzy* (*c-means fuzzy clustering*) și analizei discriminante fuzzy robuste. Rezultatele obținute au permis concluzii mai relevante și o mai bună caracterizare a solvenților folosind gradul lor de apartenență la fiecare partiție fuzzy și rezolvând în acest fel problema unor solvenți care nu erau corespunzător clasificați în abordarea lui Snyder.

Eficiența clasificării în cazul analizei discriminante robuste fuzzy a fost apreciată prin rata corectă de clasificare a datelor originale și prin valorile coeficienților de calitate obținuți aplicând validarea încrucișată „lasă una afară” (*leave-one-out*, LOO).

6.2. Materiale și metode

6.2.1. Setul de date

Valorile caracteristicilor fizico-chimice pentru cei 72 de solvenți considerați au fost preluate din clasificarea cea mai pe larg citată în cromatografie—*așa-numitul triunghi al lui Snyder*³³. Pentru această clasificare, Snyder a considerat diferite interacțiuni polare ca acceptor de protoni (x_e), donatori de protoni (x_d), dipol (x_n), *tăria cromatografică* (P') derivată din coeficientul de partiție gaz-lichid raportat de Rohrschneider³⁴, incluzând și similitudinile față de toluen (x_t) și metiletil-cetonă (x_m). Ceilalți indici sunt pentru soluțiile de testare: etanol (e), dioxan (d) și nitrometan (n). Valorile lui x măsoară interacțiunea cu substanțele testate clasificate ca substanțe cu proprietăți acide (etanol), bazice (dioxan) și dipolare (nitrometan) și care îndeplinesc următoarea condiție: $x_e + x_d + x_n = 1$.

Astfel, solvenții au fost repartizați în opt grupuri în funcție de selectivitatea lor. Solvenții incluși în același grup (regiune) al triunghiului prezintă o selectivitate similară, în timp ce în alte grupuri—selectivitatea este diferită, chiar dacă *tăria* lor este similară.

6.2.2. Metode de clasificare nuanțată folosite

Pentru realizarea scopului propus, s-au folosit metode chemometrice de analiză multidimensională a datelor. Metodele de clasificare aplicate au fost: metoda c-medii fuzzy și analiza LDA fuzzy.

Toate graficele și analizele chemometrice prezentate au fost efectuate utilizând Statistica 8.1 (StatSoft, Tulsa, SUA) și programul *Sadic*.

6.3. Rezultate și discuții

În cele ce urmează, am încercat să reluăm procedura lui Snyder, a cărei clasificare s-a bazat pe proprietățile fizico-chimice ale solvenților (selectivitate și polaritate).

Algoritmii de clasificare fuzzy, au fost aplicați cu scopul de a obține o structură nuanțată, mult mai naturală, de clasificare a celor 72 de solvenți utilizați în studiu.

6.3.1. Clasificarea fuzzy folosind metoda c-medii fuzzy

Analiza FCM produce 8 partiții fuzzy (grupuri), fiecare dintre ele fiind reprezentate de un prototip. Pentru a compara partițiile (grupurile), precum și (di)similaritățile între solvenți, trebuie analizate atât caracteristicile prototipurilor (**A1–A8**) obținute prin aplicarea algoritmului FCM, precum și valorile DOMs ale solvenților corespunzătoare tuturor partițiilor fuzzy.

Partiția fuzzy **A1**, are o tărie cromatografică ($P' = 4.71$), o medie proton acceptor (\tilde{x}_e) și o capacitate donar de proton ($\tilde{x}_d = 0.23$) moderată, însă o dipolaritate mare ($\tilde{x}_n = 0.41$). Această partiție include toți solvenții din grupa a VIa de clasificare conform triunghiului lui Snyder, cu excepția morfolinei și butirrolactonei care sunt atribuite partiției A4 cu un grad de apartenență foarte mare (0.9841) pentru morfolină și moderat (0.7732) pentru butirrolactonă. La această partiție, au fost atribuiți adițional trei solvenți din grupa III (2-picolina, 2,6-lutidina, quinolina) cu grade de apartenență moderate și nitrobenzenul din grupa a VII a lui Snyder cu un grad de apartenență mic (0.5656).

Partiția fuzzy **A2**, cu valori relativ mari pentru tăria cromatografică P' (7.09), \tilde{x}_e (0.39) și \tilde{x}_n (0.35), conține diferiți solvenți printre care dimetil sulfoxidul (grupa III), etilenglicolul (grupa IV) și m-crezolul (grupa VIII) cu grade de apartenență destul de mari $0.9679 > 0.8757 > 0.8324$.

Partiția fuzzy **A3** include majoritatea solvenților din grupa I (eteri alifatici și trietilamina) și grupa VII (benzenul și derivații acestuia) conform clasificării lui Snyder. Aceștia prezintă o tărie cromatografică mică ($P' = 2.48$) și o dipolaritate mare ($\tilde{x}_n = 0.42$).

Partiția fuzzy **A4** are o tărie cromatografică ridicată ($P' = 6.25$), capacitate proton acceptor ($\tilde{x}_e = 0.37$) și dipolaritate ($\tilde{x}_n = 0.38$) la fel mari, însă o capacitate moderată de proton donor ($\tilde{x}_d = 0.25$). Această partiție conține solvenții din grupa a III (dimetildormamida, N,N-dimetil acetamida, metilformamida, tetrametilureea) dar și anilina (VIb), nitrometanul (VII), acidul acetic (IV) cu diferite grade de apartenență: $0.9530 > 0.7272 > 0.7259$.

Partiția fuzzy **A5** prezintă o tărie cromatografică slabă ($P' = 3.99$) dar cu o capacitate mare proton acceptor ($\tilde{x}_e = 0.47$). Această partiție include majoritatea alcoolilor alifatici (grupa II conform clasificării Snyder) cu grade de apartenență ridicate dar mai conține și tetrahidrofuranul (grupa III) cu un grad de apartenență $DOM = 0.8888$ și cloroformul (grupa VIII) cu un grad de apartenență moderat $DOM = 0.6346$.

Partiția fuzzy **A7** prezintă o tărie cromatografică medie ($P' = 5.43$) și valori mari ale capacității proton acceptor ($\tilde{x}_e = 0.38$) și dipolaritate ($\tilde{x}_n = 0.37$). Această partiție include solvenții din grupa III conform clasificării Snyder cu grade de apartenență ridicate (oxietilat de nonilfenol, 2-metoxietanol, piridina, trietilenglicol) precum și alcoolul de benzil (IV), nitroetanul (VII), acetonitrilul (VIb), metanolul (II), acetona (VIa) cu următoarele grade de apartenență: $0.6972 > 0.6814 > 0.5008 > 0.4954 > 0.4942$.

Partiția fuzzy **A8** are cea mai mare tărie cromatografică ($P' = 9.44$) și similitudine cu metiletilcetona ($\tilde{x}_m = 0.35$), însă o valoare mică a dipolarității ($\tilde{x}_n = 0.28$). De asemenea, foarte interesant, că valorile capacității de proton acceptor ($\tilde{x}_e = 0.35$) și proton donor ($\tilde{x}_d = 0.36$) sunt practic egale. Această partiție include solvenții din grupa VIII, cu excepția formamidei care este atribuită clasei ce conține apa, cu un grad de apartenență foarte ridicat (0.9866). Cloroformul care făcea parte din grupa VIII conform clasificării lui Snyder, în acest caz este atribuit partiției **A5** (grupul alcoolilor).

6.3.2. Analiza discriminantă fuzzy (FLDA)

Aplicarea analizei FLDA a condus la discriminarea solvenților investigați în opt clase în acord cu clasificarea lui Snyder, însă cu grade de apartenență foarte variate și relativ mici, de la 0.2251 pentru

formamidă la 0.9110 pentru *terț*-pentanol (**Tabel 6.2**). Rezultatele indică o separare foarte bună a solvenților investigați în toate cele opt clase în acord cu rata de clasificare corectă (**Tabel 6.3**): cele mai mari valori (100%) s-au obținut pentru majoritatea claselor, în special clasele II, IV, V și VI, iar cele mai mici valori (66.67%) pentru solvenții din clasa I.

Tabel 6.3. Matricea de clasificare a solvenților obținută folosind analiza discriminantă fuzzy pentru cele opt clase conform clasificării lui Snyder.

Clasa	Total	Matricea de clasificare								Matricea de clasificare (%)							
		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
I	6	4	0	2	0	0	0	0	0	66.67	0	33.33	0	0	0	0	0
II	8	0	8	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0
III	15	0	0	13	0	0	0	0	0	0	0	86.67	0	0	6.67	6.67	0
IV	4	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0
V	2	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0
VI	18	0	0	0	0	0	18	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0
VII	14	0	0	0	0	0	2	12	0	0	0	0	0	0	14.29	85.71	0
VIII	5	0	0	0	0	0	0	1	4	0	0	0	0	0	0	20.00	80.00

În cazul grupei I, doi solvenți hexametil fosforamida și tetrametil guanidina, au fost atribuite grupului III din cauza gradelor de apartenență mici: 0.3563 și 0.4524. Pe de altă parte, doi solvenți din grupa III, tetrahidrofuranul și oxietilatul de nonilfenol, au fost atribuiți după cum urmează: tetrahidrofuranul grupei VI (DOM = 0.3933) și oxietilatul de nonilfenol grupei VII (DOM = 0.2265). Doi solvenți care au fost atribuiți conform clasificării lui Snyder în grupul VII, în urma analizei au fost mutați în grupul VI: nitrometan (DOM = 0.4171) și nitroetanul (DOM = 0.4223). În cazul grupei VIII, este la fel interesant faptul că, cloroformul care a fost inclus de către Snyder în acest grup, în urma analizei a fost mutat în grupul VII (DOM = 0.2693).

Eficacitatea analizei FLDA este susținută de reprezentarea grafică a scorurilor canonice corespunzătoare primelor două direcții (ROOT1–ROOT2) (**Figura 6.2**).

Tabel 6.2. Rezultatele obținute pentru cele 8 clase predefinite aplicând analiza discriminantă fuzzy.

Clase	Parametrii centrelor clasei						Solvenți (prezențați în ordine descrescătoare)	Numele solvenților (clasa din care faceau parte conform lui Snyder)	DOMs
	P'	\tilde{x}_e	\tilde{x}_d	\tilde{x}_n	\tilde{x}_t	\tilde{x}_m			
I	2.4740	0.5003	0.1438	0.3557	0.0816	0.1785	23 22 41 24	Di-iso-propiletlenă (I) Dietileter (I) Trietilamină (I) Di-n-butileter (I)	0.7878 0.7764 0.5212 0.4742
II	4.0083	0.5481	0.1927	0.2656	0.0531	0.2118	47 3 7 4 5 2	terț-Pentanol (II) 1-Propanol (II) 1-Octanol (II) 2-Propanol (II) 1-Butanol (II) Etanol (II)	0.9110 0.9064 0.8361 0.7903 0.7852 0.5646
III	5.6099	0.4124	0.2191	0.3692	0.1234	0.2353	43 61 44 52 71 39 48 57 38 50 37 55 65	Piridină (III) Metilformamidă (III) Quinolină (III) 2-Picolină (III) Trietilenglicol Tetrametiluree (III) 2-Metoxietanol (III) N,N-dimetil acetamidă (III) N-Metilpirolidină (III) 2,6-lutidină (III) Dimetilformamidă (III) Tetrametil guanidină (I) Dimetil sulfoxid (III)	0.9063 0.8295 0.6801 0.6651 0.5697 0.5676 0.5652 0.5462 0.4867 0.4851 0.4754 0.4524 0.4459
IV	6.2920	0.4046	0.3013	0.2938	0.1084	0.2752	9 30 8	Benzil alcool (IV) Acid acetic (IV) Etileneglicol (IV)	0.8592 0.7619 0.6645
V	3.3000	0.2950	0.1950	0.5100	0.2000	0.2100	49	Clorură de metilen (V)	0.4132

VI	5.3804	0.3389	0.2507	0.4112	0.1432	0.2413	62 33 35 27 21 68 32 36 20 31 58 69 54 67 64 19 18	Ciano morfolină (VI) Acetofenonă (VI) Carbonat de propilen (VI) Dioxan (VI) Acetonitril (VI) <i>tris</i> -cianoetoxipropan (VI) Ciclohexanonă (VI) Butirolactonă (VI) Benzonitril (VI) Acetonă (VI) Tricrezilfosfat (VI) Oxidipropionitril (VI) <i>bis</i> -(2-etoxi etil) eter (VI) Tetrahidrotiofenă (VI) Formil morfolină (VI) Nitroetan (VII) Nitrometan (VII)	0.7833 0.7346 0.7136 0.7112 0.6543 0.6260 0.6201 0.6035 0.5813 0.5531 0.5489 0.5456 0.5267 0.5232 0.4554 0.4223 0.4171
VII	3.2526	0.2573	0.3072	0.4354	0.1554	0.3142	45 13 16 12 14 51 28 26 15 17 25	Fluorobenzen (VII) Clorobenzen (VII) <i>p</i> -Xilen (VII) Benzen (VII) Bromobenzen (VII) Etoxibenzen (VII) Anisol (VII) Difenileter (VII) Iodobenzen (VII) Nitrobenzen (VII) Dibenzileter (VII)	0.8783 0.8110 0.8108 0.8028 0.7974 0.7696 0.7525 0.7058 0.6423 0.5931 0.4128
VIII	8.5477	0.3486	0.3768	0.2727	0.0772	0.3617	63 66 72 56	Dodecafluoroheptanol (VIII) Tetrafluoropropanol (VIII) Apa (VIII) <i>m</i> -Crezol (VIII)	0.8983 0.7597 0.6239 0.5920

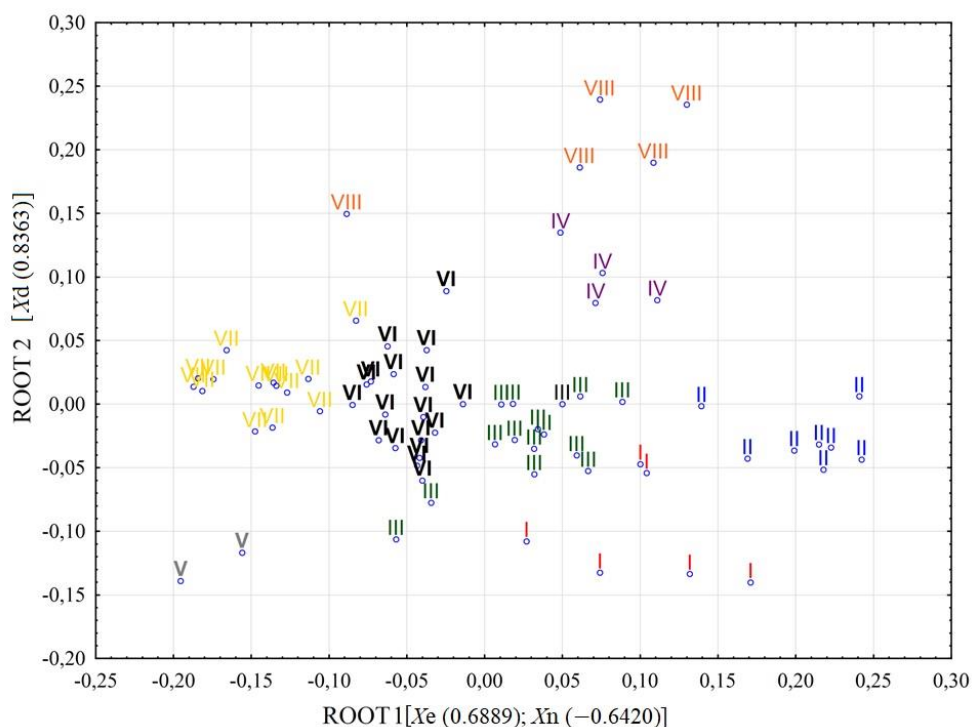


Figura 6.2. Reprezentarea grafică a scorurilor canonice corespunzătoare lui ROOT1 și ROOT2.

Totodată, rezultatele matricii de clasificare utilizând procedura validarea încrucișată *leave-one-out* (**Tabel 6.4**), a arătat o corectitudine ridicată a ratei de clasificare în acord cu rezultatele clasificării datelor inițiale.

Tabel 6.4. Matricea de clasificare a solvenților obținută aplicând procedura de validare încrucișată *LOO*.

Clasa	Total	Matricea de clasificare								Matricea de clasificare (%)							
		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
I	6	4	0	2	0	0	0	0	0	66.67	0	33.33	0	0	0	0	0
II	8	0	8	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0
III	15	0	0	13	0	0	0	0	0	0	0	86.67	0	0	6.67	6.67	0
IV	4	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	75.00	0	0	0	25.00
V	2	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0
VI	18	0	0	0	0	0	17	0	0	0	0	0	5.56	0	94.44	0	0
VII	14	0	0	0	0	0	2	12	0	0	0	0	0	0	14.29	85.71	0
VIII	5	0	0	0	0	0	0	1	4	0	0	0	0	0	0	20.00	80.00

7. Caracterizarea și clasificarea alimentelor pe baza conținutului de aminoacizi, folosind clasificarea încrucișată (fuzzy)

7.1. Introducere

Scopul acestui studiu a fost de a caracteriza și clasifica cele mai importante și consumate alimente în funcție de profilul lor în AA, în special în funcție de conținutul lor de EAA, utilizând tehnici de analiză multidimensională avansate.

7.2. Materiale și metode

7.2.1. Probe

Datele analizate în acest studiu cuprind 100 de probe (alimente) caracterizate prin conținutul celor mai importanți AA, colectate din diverse surse din literatura de specialitate³⁵⁻⁴³.

Alimentele investigate fac parte din clasele: lapte, ouă, carne, fructe, legume, nuci, semințe, miere și vin și cuprind informații referitoare la conținutul în AA.

AA analizați prin diferite metode analitice (RP-HPLC, IEC, GC) pentru toate alimentele considerate au fost următorii: alanina (**Ala**), arginina (**Arg**), acid aspartic (**Asp**), cisteina (**Cys**), acid glutamic (**Glu**), glicina (**Gly**), histidina (**His**), isoleucina (**Ile**), leucina (**Leu**), lizina (**Lys**), metionina (**Met**), fenilalanina (**Phe**), prolina (**Pro**), serina (**Ser**), treonina (**Thr**), triptofan (**Trp**), tirozina (**Tyr**), valina (**Val**), iar conținutul lor a fost exprimat în % de masă (g/100 g probă), rezultând o matrice de dimensiunile 100 × 18.

7.2.2. Metode

Pentru realizarea scopului propus, s-a folosit analiza HCA clasică și metoda fuzzy c-medii ierarhică diviziv-încrucișată.

7.3. Rezultate și discuții

Datele colectate privind conținutul în AA a celor mai consumate alimente este prezentat în **Figura 7.1**. După cum se poate observa, cei mai abundenți AA sunt **Pro**, **Glu** și **Asp**. Cu excepția celor trei AA, majoritatea alimentele au un conținut de AA care variază între 0–10%.

Considerând dendrograma obținută (**Figura 7.2**), aplicând analiza clusterilor (modul de legare cel mai îndepărtat vecin și distanța Euclidiană ca măsură a similarității) un aspect foarte important se poate observa, și anume faptul că deosebirea dintre alimente crește de la dreapta spre stânga (creștere exponențială), cu excepția grupului format din pești care se aseamănă între ei foarte mult, dar se deosebesc de asemenea vădit de celelalte alimente.

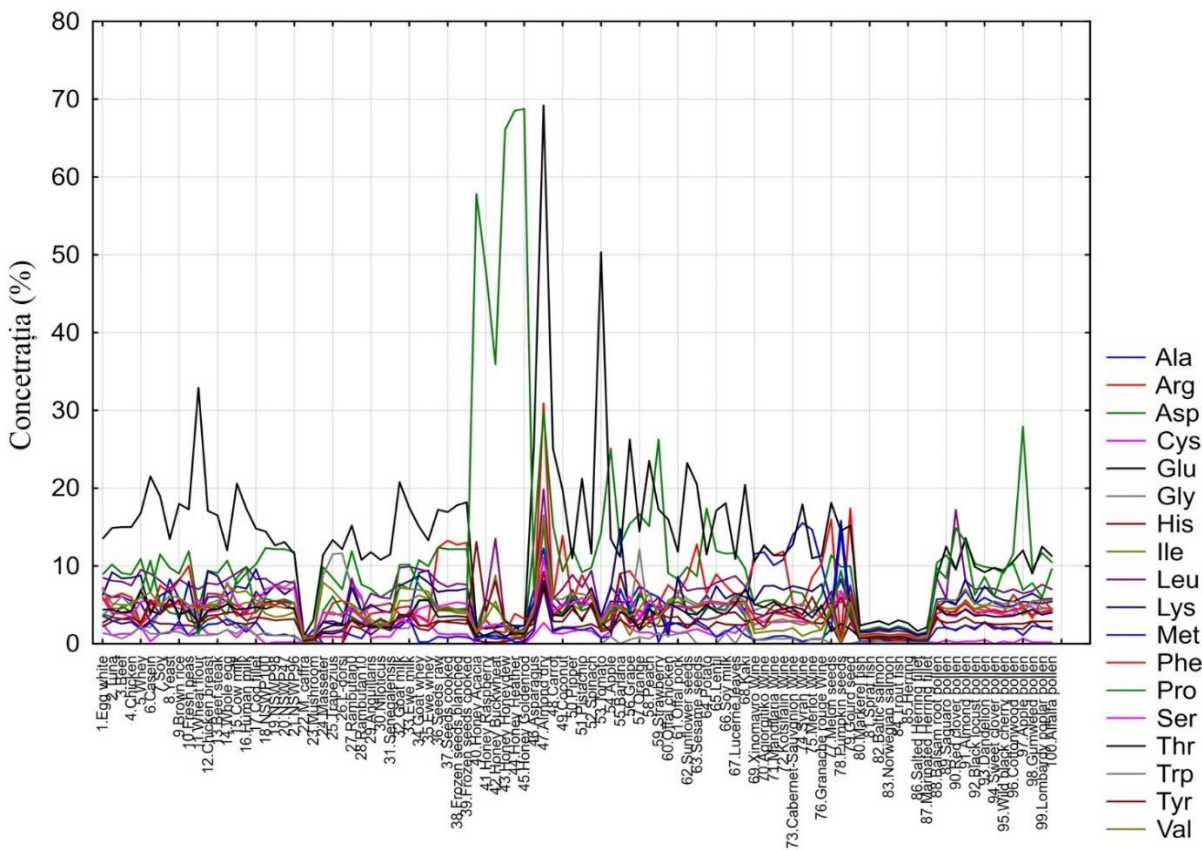


Figura 7.1. Profilul probelor de alimente din punct de vedere al conținutului de aminoacizi.

Pentru compararea partițiilor obținute aplicând metoda fuzzy menționată, s-au analizat similaritățile și diferențele dintre alimente, gradele de apartenență DOMs corespunzătoare tuturor partițiilor fuzzy atât pentru probe cât și caracteristici (concentrația AA). Rezultatele obținute aplicând metoda clusterilor asociativi ierarhici-divizivi sunt prezentate în **Tabelul 7.1**. Printr-o analiză riguroasă a partițiilor fuzzy de la fiecare nivel (istoria partițiilor) în paralel cu valorile concentrațiilor AA în alimente, se pot face următoarele remarci. La primul nivel de partiție (100 probe) s-au separat în 2 partiții fuzzy **A1** și **A2**. Valorile DOMs ale alimentelor din partiția **A1** sunt în intervalul 0.029–0.945 sau 2.90–94.50 % și între 0.962–0.994 (99.62–99.40 %) în cazul partiției fuzzy **A2**. Cele mai multe alimente au fost atribuite partiției fuzzy **A1**.

Tabel 7.1. Partițiile fuzzy asociate finale.

Nivelul de partiție fuzzy	Partiția fuzzy divizivă	Probe de alimente	Intervalul DOMs	Variabilele Asociate (cantitatea de AA, %)	Intervalul DOMs
0	A	1,..., 100 Diferite alimente		1,..., 18	
Partițiile finale					
1	A111111	57, 47	0.501; 0.029	Gly	0.821
2	A111112	20, 19, 21, 18 (7.05, 7.36, 7.07, 7.09)	0.918–0.590	Ser (cea mai mare)	0.669
3	A11112	35, 34 (Val: 6.9, 6.7; Ala: 9.1, 9.4)	0.881;0.704	Val, Ala	0.722; 0.446
4	A11121	14, 52, 67, 50, 61, 1, 68	0.764–0.408	Thr	0.709
5	A11122	64, 9, 91, 8, 88 (Phe: 5.1, 5.7, 5.2, 4.7, 5.3)	0.585–0.260	Phe; Ile (mare)	0.854; 0.792
6	A1121	49, 37, 77, 36, 38, 63, 39, 79, 72, 71, 10, 51, 62	0.901–0.389	Arg (cea mai mare) ~ 12	0.624
7	A11221	2, 3, 4, 12, 13, 17, 5, 93, 65, 73, 78, 55	0.945–0.269	Lys	0.753
8	A11222	16, 15, 32, 33, 90, 7, 66, 27, 6	0.739–0.262	Leu	0.510

9	A121	46, 95, 92, 89, 59, 54, 48, 42, 97, 94, 76, 69, 96, 74, 41, 99, 100, 45, 25, 11, 70, 43, 44, 53, 30, 26, 29, 98, 31, 28, 24	0.892–0.363	His; Met Tyr	0.867; 0.792 0.486
10	A1221	40, 75	0.501; 0.363	Trp	0.803
11	A1222	56, 58, 60	0.738–0.628	Cys	0.877
12	A2	82, 84, 81, 85, 83, 80, 23, 87, 86, 22	0.994–0.962	Asp, Glu (mică), Pro (mică)	0.990; 0.879 0.754

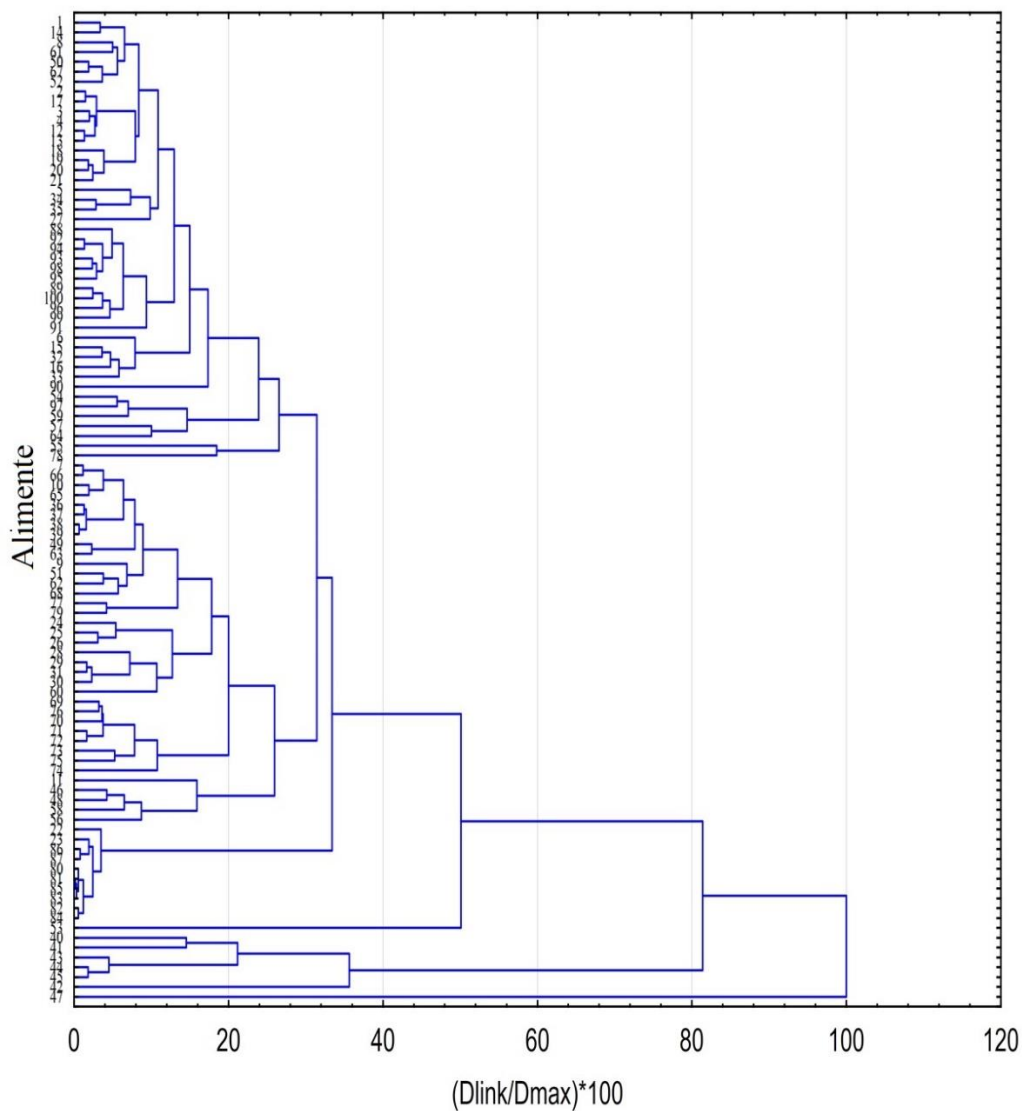


Figura 7.2. Dendrograma corespunzătoare celor 100 probe de alimente (18 aminoacizi).

CAPITOLUL IV—CONCLUZII GENERALE

- Aplicând diverse metode de analiză experimentale și chemometrice avansate, s-a reușit cu succes caracterizarea și clasificarea aminoacizilor și compușilor înrudiți în funcție de proprietățile lor specifice (lipofilicitate și activitatea antioxidantă).
- AA proteinogeni au fost testați prin diferite metode de analiză a activității antioxidante utilizând mai multe tipuri de radicali liberi (prezenți atât *in vivo* și cât și *in vitro*). Rezultatele studiului au confirmat că unii AA proteinogeni au o activitate semnificativă de stingere a radicalilor liberi prin majoritatea metodelor aplicate și susțin dezvoltarea unei noi clase de antioxidanți multifuncționali și naturali. Printre aminoacizii cu activitate sporită se enumeră Cys, Trp, Tyr, Arg și Asn.
- Analiza PCA și CA a demonstrat că metodele de activitate bazate pe mecanisme similare sunt strâns legate între ele. În baza rezultatelor SRD, metodele care discriminează cel mai bine AA sunt cele bazate pe puterea de captare a radicalilor DPPH și NO.
- Catecolaminele și medicamentele asemănătoare, conform rezultatelor obținute, au o activitate semnificativă de stingere și reducere a puterii radicalilor liberi și susțin dezvoltarea unei noi clase de antioxidanți multifuncționali.
- Conform rezultatelor experimentale și chemometrice, majoritatea medicamentelor prezintă activitate antioxidantă mare în majoritatea analizelor, cu excepția metoxaminei, L-dopa și D-dopa (care nu prezintă nici proprietăți farmacologice). Totodată, compușii investigați au evidențiat o capacitate redusă de chelare a ionilor feroși.
- Cele mai bune modele, validate intern prin procedura „scoate unul afară” au demonstrat că este nevoie de un număr mic de descriptori moleculari pentru a obține modele de predicție semnificative din punct de vedere statistic.
- Modelele derivate din descriptorii Dragon au prezentat o putere de predicție mai mare în comparație cu cele derivate din descriptorii Alchemy, deoarece descriu mult mai bine aspectele 3D ale AA-lor—aspecte importante pentru caracterul lipofil al compusului.
- Descriptorii selectați în ecuațiile celor mai performante modele de predicție a lipofilității compușilor, vizează atât aspecte bi- și tri-dimensionale ale structurii moleculare, cât și aspecte

privind topologia, conformația, indicii de conectivitate și respectiv unele proprietăți moleculare ale compușilor. Cele mai performante modele de predicție au arătat că polarizabilitatea atomică, electronegativitatea atomică Sanderson și volumele atomice van der Waals ale moleculelor reprezintă proprietăți de bază care definesc lipofilitatea AA-lor.

- Modelele fuzzy în comparație cu cele clasice, au demonstrat o putere de predicție mult mai ridicată atât pentru modelele ce conțin descriptorii Dragon cât și Alchemy, prezentând o aplicabilitate mult mai bună și eficiență pentru predicția proprietății moleculare de mare interes în chimia medicamentelor, toxicologie și ecologie.
- Prin aplicarea algoritmilor de grupare și clasificare fuzzy robusți s-a reușit găsirea unor grupuri mai specifice și o caracterizare mai bună a solvenților folosind gradul de apartenență pentru fiecare partiție fuzzy și rezolvând în acest fel problema unor solvenți care nu au fost bine clasificați conform triunghiului lui Snyder.
- Totodată, s-a reușit evidențierea mai eficientă a caracteristicilor specifice fiecărei clase de solvenți, prin prisma parametrilor prototipurilor și centrii claselor. Astfel, prin aplicarea algoritmilor fuzzy, se pot selecta mult mai ușor și corect solvenții sau amestecul de solvenți potriviți pentru analiza cromatografică dorită.
- Prin aplicarea algoritmilor c-medii fuzzy încrucișați s-a reușit clasificarea alimentelor din punct de vedere a conținutului de AA, în special a conținutului de EAA. Cu ajutorul parametrilor prototipurilor și centrii claselor s-a scos în evidență mult mai eficient și bine caracteristicile specifice ale fiecărei clase de alimente, iar gradele de apartenență au permis o comparație mult mai rațională a (di)similarităților dintre alimente în acord cu conținutul lor de AA.
- Tehnicile de analiză multidimensională a datelor aplicate în acest studiu s-au dovedit, încă o dată, a fi extrem de utile pentru studierea asemănărilor și deosebirilor dintre alimente, pe de o parte, și AA pe de alta parte, precum și stabilirea AA caracteristicii fiecărei clase de alimente.

Bibliografie selectivă

- (1) Davis, T. A.; Fiorotto, M. L. Regulation of Muscle Growth in Neonates. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, **2009**, *12* (1), 78–85. <https://doi.org/10.1097/MCO.0b013e32831cef9f>.
- (2) Hardy, P. M. The Protein Amino Acids. In *Chemistry and Biochemistry of the Amino Acids*; Springer: Netherlands, 1985; pp 6–24. https://doi.org/10.1007/978-94-009-4832-7_2.
- (3) Wu, G. *Amino Acids: Biochemistry and Nutrition*. CRC Press: New York, 2010.
- (4) Li, P.; Yin, Y. L.; Li, D.; Kim, W. S.; Wu, G. Amino Acids and Immune Function. *Br. J. Nutr.* **2007**, *98* (2), 237–252. <https://doi.org/10.1017/S000711450769936X>.
- (5) Amit, Kessel; Nir, B.-T. Introduction to Proteins: Structure, Function, and Motion. In *CRC Press*; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2018; p 932.
- (6) Harold E. Himwich; Williamina A. Himwich. *Biogenic Amines*; Elsevier: Amsterdam, 1964; Vol. 8.
- (7) Nagatsu, T.; Nabeshima, T.; McCarty, R.; Goldstein, D.S. *Catecholamine Research: From Molecular Insights to Clinical Medicine*; Kluwer Academic/Plenum Publisher: New York, 2002. <https://doi.org/10.1007/978-1-4757-3538-3>.
- (8) Seiji, S.; Ikuo, H.; Nobumasa, K. *Transmitters and Modulators in Health and Disease: New Frontiers in Neuroscience*; Springer: Tokyo, Japan, 2009.
- (9) Medina, M. Á.; Urdiales, J. L.; Rodríguez-Caso, C.; Ramírez, F. J.; Sánchez-Jiménez, F. Biogenic Amines and Polyamines: Similar Biochemistry for Different Physiological Missions and Biomedical Applications. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **2003**, *38* (1), 23–59. <https://doi.org/10.1080/713609209>.
- (10) Mans, B. J.; Ribeiro, J. M. C.; Andersen, J. F. Structure, Function, and Evolution of Biogenic Amine-Binding Proteins in Soft Ticks. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283* (27), 18721–18733. <https://doi.org/10.1074/jbc.M800188200>.
- (11) Miura, T.; Muraoka, S.; Ogiso, T. Antioxidant Activity of Adrenergic Agents Derived from Catechol. *Biochem. Pharmacol.* **1998**, *55* (12), 2001–2006. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(98\)00075-6](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(98)00075-6).
- (12) Kawashima, T.; Ohkubo, K.; Fukuzumi, S. Radical Scavenging Reactivity of Catecholamine Neurotransmitters and the Inhibition Effect for DNA Cleavage. *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114* (1), 675–680. <https://doi.org/10.1021/jp909314t>.
- (13) Sitole, L. J.; Tugizimana, F.; Meyer, D. Multi-Platform Metabonomics Unravel Amino Acids as Markers of HIV/Combination Antiretroviral Therapy-Induced Oxidative Stress. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2019**, *176*, 112796. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.112796>.
- (14) Bourdon, E.; Blache, D. The Importance of Proteins in Defense against Oxidation. *Antioxidants Redox Signal.* **2001**, *3* (2), 293–311. <https://doi.org/10.1089/152308601300185241>.
- (15) Kim, J. H.; Jang, H. J.; Cho, W. Y.; Yeon, S. J.; Lee, C. H. In Vitro Antioxidant Actions of Sulfur-Containing Amino Acids. *Arab. J. Chem.* **2018**, *13* (1), 1678–1684. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2017.12.036>.
- (16) Atmaca, G. Antioxidant Effects of Sulfur-Containing Amino Acids. *Yonsei Med. J.* **2004**, *45* (5), 776. <https://doi.org/10.3349/ymj.2004.45.5.776>.

- (17) Meucci, E.; Mele, M. C. Amino Acids and Plasma Antioxidant Capacity. *Amino Acids* **1997**, *12* (3–4), 373–377. <https://doi.org/10.1007/BF01373017>.
- (18) Sila, A.; Bougatef, A. Antioxidant Peptides from Marine By-Products: Isolation, Identification and Application in Food Systems. A Review. *J. Funct. Foods* **2016**, *21*, 10–26. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.11.007>.
- (19) Yang, X.-R.; Qiu, Y.-T.; Zhao, Y.-Q.; Chi, C.-F.; Wang, B. Purification and Characterization of Antioxidant Peptides Derived from Protein Hydrolysate of the Marine Bivalve Mollusk *Tergillarca Granosa*. *Mar. Drugs* **2019**, *17* (5), 251. <https://doi.org/10.3390/md17050251>.
- (20) Guo, H.; Ekusa, A.; Iwai, K.; Yonekura, M.; Takahata, Y.; Morimatsu, F. Royal Jelly Peptides Inhibit Lipid Peroxidation In Vitro and In Vivo. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*. **2008**, *54* (3), 191–195. <https://doi.org/10.3177/jnsv.54.191>.
- (21) Dash, P.; Ghosh, G. Amino Acid Composition, Antioxidant and Functional Properties of Protein Hydrolysates from Cucurbitaceae Seeds. *J. Food Sci. Technol.* **2017**, *54* (13), 4162–4172. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2855-6>.
- (22) Chanin Nantasenamat; Chartchalerm Isarankura-Na-Ayudhya; Thanakorn Naenna; Virapong Prachayasittikul; Virapong Prachayasittikul. A Practical Overview of Quantitative Structure-Activity Relationship. *EXCLI J.* **2009**, *8*, 74–88.
- (23) Nantasenamat, C.; Isarankura-Na-Ayudhya, C.; Prachayasittikul, V. Advances in Computational Methods to Predict the Biological Activity of Compounds. *Expert Opin. Drug Discov.* **2010**, *5* (7), 633–654. <https://doi.org/10.1517/17460441.2010.492827>.
- (24) Cherkasov, A.; Muratov, E. N.; Fourches, D.; Varnek, A.; Baskin, I. I.; Cronin, M.; Dearden, J.; Gramatica, P.; Martin, Y. C.; Todeschini, R.; Consonni, V.; *et. al.* A. QSAR Modeling: Where Have You Been? Where Are You Going To? *J. Med. Chem.* **2014**, *57* (12), 4977–5010. <https://doi.org/10.1021/jm4004285>.
- (25) Prachayasittikul, V.; Pingaew, R.; Anuwongcharoen, N.; Worachartcheewan, A.; Nantasenamat, C.; Prachayasittikul, S.; Ruchirawat, S.; Prachayasittikul, V. Discovery of Novel 1,2,3-Triazole Derivatives as Anticancer Agents Using QSAR and in Silico Structural Modification. *Springerplus* **2015**, *4* (1), 571. <https://doi.org/10.1186/s40064-015-1352-5>.
- (26) Katritzky, A.; Ramsden, C.; Joule, J.; Zhdankin, V. *Handbook of Heterocyclic Chemistry*, 3rd edition.; Elsevier: Amsterdam, 2010.
- (27) Leo, A.; Hansch, C.; Elkins, D. Partition Coefficients and Their Uses. *Chem. Rev.* **1971**, *71* (6), 525–616. <https://doi.org/10.1021/cr60274a001>.
- (28) James M. Sangster. *Octanol-Water Partition Coefficients: Fundamentals and Physical Chemistry*; Wiley, 1997.
- (29) Van de Waterbeemd, H.; Kansy, M.; Wagner, B.; Fischer, H. Lipophilicity Measurement by High-Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC). In *Lipophilicity in drug action and toxicology*; Pilska, V.; Testa, B.; Van de Waterbeemd, H. Eds.; VCH: Weinheim, 1996. <https://doi.org/10.1002/9783527614998>.
- (30) Todeschini, R.; Consonni, V.; Mauri, A.; Pavan, M. MobyDigs: Software for Regression and Classification Models by Genetic Algorithms. In *Data Handling in Science and Technology*; Elsevier, **2003**; Vol. 23, pp 141–167.

[https://doi.org/10.1016/S0922-3487\(03\)23005-7](https://doi.org/10.1016/S0922-3487(03)23005-7).

- (31) Mercader, A. G.; Duchowicz, P. R.; Fernández, F. M.; Castro, E. A. Modified and Enhanced Replacement Method for the Selection of Molecular Descriptors in QSAR and QSPR Theories. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2008**, *92* (2), 138–144. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2008.02.005>.
- (32) Casoni, D.; Sârbu, C. Comparative Study of Different Oils and Fats Impregnated Thin-Layer Chromatographic Layers for Amino Acids Lipophilicity Estimation. *Stud. UBB Chem.* **2011**, *LVI* (1), 45–61.
- (33) Snyder, L. R. Classification of the Solvent Properties of Common Liquids. *J. Chromatogr. Sci.* **1978**, *16* (6), 223–234. <https://doi.org/10.1093/chromsci/16.6.223>.
- (34) Rohrschneider, L. Solvent Characterization by Gas-Liquid Partition Coefficients of Selected Solutes. *Anal. Chem.* **1973**, *45* (7), 1241–1247. <https://doi.org/10.1021/ac60329a023>.
- (35) Amino Acid Content of Food and Biological Data on Proteins <http://www.fao.org/3/AC854T/AC854T03.htm#ch1.I> (acesat în 5 Februarie 2021)
- (36) Mehdizadeh, S.; Lasekan, O.; Muhammad, K.; Baharin, B. Variability in The Fermentation Index, Polyphenols and Amino Acids of Seeds of Rambutan (*Nephelium Lappaceum* L.) during Fermentation. *J. Food Compos. Anal.* **2015**, *37*, 128–135
- (37) Adeyeye, E.I. Amino acid composition of three species of Nigerian fish: *Clarias anguillaris*, *Oreochromis niloticus* and *Cynoglossus senegalensis*. *Food Chem.* **2009**, *113*, 43–46
- (38) Hejtmankova, A.; Pivec, V.; Trnkova, E.; Dragounova, H. Differences in The Composition of Total and Whey Proteins in Goat and Ewe Milk and Their Changes Throughout The Lactation Period. *Czech. J. Anim. Sci.* **2012**, *57*, 323–331
- (39) Lisiewska, Z.; Kmiecik, W.; Slupski, J. Content Of Amino Acids in Raw and Frozen Broad Beans (*Vicia Faba* Var. Major) Seeds At Milk Maturity Stage, Depending On The Processing Method. *Food Chem.* **2007**, *105*, 1468–1473.
- (40) Janiszewska, K.; Aniolowska, M.; Nowakowski, P. Free Amino Acids Content of Honeys from Poland. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* **2012**, *62*, 85–89.
- (41) Bouloumpasi, E.; Soufleros, E.H.; Tsarchopoulos, C.; Biliaderis, C.G. Primary amino acid composition and its use in discrimination of Greek red wines with regard to variety and cultivation region. *Vitis*, **2002**, *41* (4), 195–200
- (42) Adeyemi, F.O.; Adedirán, G.O. Amino Acid and Mineral Compositions and Functional Properties of Some Oilseeds. *J. Agric. Food Chem.* **1994**, *42*, 878–881.
- (43) Mccaughey, WF; Gilliam, M; Standifer. Amino acids and protein adequacy for honey bees of pollens from desert plants and other floral sources. *Apidologie*, **1980**, *11*(1), 75–86