



**ULBS**

Universitatea "Lucian Blaga" din Sibiu

# **HABILITATION THESIS**

**Development of high-value bioactive products for  
industrial applications and in lifesciences area,  
with emphasis on natural compounds**

***SIMONA OANCEA***

**May 2014**

## (a) ABSTRACT

The Habilitation Thesis “Development of high-value bioactive products for industrial applications and in lifesciences area, with emphasis on natural compounds” describes my scientific, academic and professional achievements for the period after PhD degree (1999), and the career evolution and development plans.

The first section of the thesis details the scientific, academic and professional achievements, describing significant results and citing the original scientific papers published in the field. The thesis mainly refers to the identification and quantification of compounds with various biological activities, but beyond this it has an interdisciplinary feature, being directed towards the design of valuable products of synthetic or natural origin for industrial applications in the food, pharmaceutical or textile areas, the optimization of extractive technologies of bioactive compounds, and the study of influence of environmental and processing conditions on the level of natural compounds (polyphenols, anthocyanins) in their native matrix.

The thesis advances fundamental and specific strategies of isolation or synthesis of bioactives, structural characterization of these compounds in particular of synthetic peptides, fingerprint profiling of individual anthocyanins for detection of source origin in various products, and evaluation of several biological activities (antimicrobial, haemolytic, membrane properties, antioxidant) of the new synthetic compounds or natural extracts.

The chemical synthesis of the new peptides was performed by the "step by step" strategy, followed by purification and determination of their chemical structure and conformation by modern techniques (IR, FT-IR, <sup>1</sup>H -NMR, ESR). Pure peptides were tested *in vitro* for biological activities (antibacterial, antifungal, haemolytic, membrane-modifying properties). Based on conformational studies, structure-activity relationship has been established for a wide range of new analogues of peptaibols, which are peptides of fungal origin known for their membrane-modifying properties. Design of new analogues based mainly on valorisation of C<sup>α</sup>-tetrasubstituted α-amino acids, may help to develop strong antimicrobial peptide agents with potential applications in pharmaceutical and textile industry. Research activities in this field have been performed in the framework of my postdoctoral studies at the University of Padova, Italy and in the framework of a Joint Research Project Romania-Italy in progress, of which I am the Romanian Coordinator.

As current preferences of people moved toward natural alternatives and products, I directed part of my research activities to the study of natural bioactive compounds derived from plants, in particular anthocyanins. These bioactives proved their beneficial effects on human health. Studies proving the originality and relevance in an interdisciplinary perspective have been done, such as optimization of extractive technologies (conventional and non-conventional), quantitative analysis of total anthocyanins extracted from different food plants in relation to species, agricultural practices and environmental factors, application of direct-infusion electrospray ionization ion trap tandem mass spectrometry (ESI-IT-MS/MS) without previous HPLC-DAD analysis to identify individual anthocyanins directly from the crude extracts (potential tool to rapidly differentiate species-specific anthocyanins), evaluation of antioxidant and antimicrobial properties of prepared crude extracts, pH and thermal stability studies of anthocyanin extracts during storage, effects of cold storage and processings by oven- and infrared drying methods on the level of total anthocyanins. The obtained results may be of interest for food manufacturers, as any processing method may influence the content and composition in these biomolecules and consequently their health benefits. Due to the current trends facing the replacement of synthetic additives with natural ones including antioxidants in edible oils, and considering the pharmacological potential of anthocyanins, research studies have been performed and good results have been obtained regarding the potential of anthocyanin extracts from various anthocyanin-rich food plants to stabilize polyunsaturated oils in reverse micelle system. Based on the coloring properties of anthocyanins, the potential application of such natural extracts in eco-dyeing technologies of textile supports was also evaluated. The investigation demonstrated that anthocyanin extracts can be effective as natural dyes to be applied on natural fibers grafted with  $\beta$ -cyclodextrin, which acts as a functionalization agent of the textile substrate. Natural dyes not only contribute to the quality of the traditional textile materials, but also involves the use of methods with low impact on environment. From another research in the framework of a Joint Research Project Italy-Romania, we have obtained new cellulosic materials (cotton) functionalized with dendrimers and lipophilic synthetic antimicrobial peptides, materials which showed good protective properties against the strain *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Concerning the professional achievements after the PhD degree, I published as main author or co-author 10 books and 8 chapters in books to recognized national and international publishing houses, 41 original articles in ISI quoted journals numerous of which with relevant

impact factor and ISI Proceedings <http://www.researcherid.com/rid/D-4541-2013>, over 35 articles in BDI indexed journals, and over 80 papers presented at national and international scientific events in the field. A high number of citations – over 200 according to Web of Knowledge – demonstrates the international visibility, the great impact and interest of other researchers worldwide on the realized research. Organizational skills and teamwork abilities have been enhanced through participation in 14 national and international research projects, of which 7 as project director/coordinator which demonstrates the acquired scientific independence. My professional experience has been also enhanced through other activities, such as invited seminars abroad at the University of Padova, Italy, research projects' evaluation for national research project proposals, peer-reviewer for scientific journals indexed ISI or International Databases, member of Editorial Advisory Board of Acta Univ. Cib. Food Technology journal, and chairman at the international conference PT-CONF.

The second section of the thesis describes the plan of career evolution and development set for short and medium term, focusing on three main directions of my career development: (i) educational activities; (ii) research activities consisting in continuation of the implementation of the two research projects in progress of which I am project director and initiation of new research project proposals; (iii) dissemination of the research and educational results. I will continue my research activities in a multi- and interdisciplinary approach (biochemistry knowledges correlated with knowledge in biology, health care, pharmacological sciences, engineering, horticultural sciences, food processing) taking also into consideration the manufacturers and consumers' demands (transdisciplinary approach). I continue to adapt methodologies regarding the bioactivity assessments to various matrices (food products and supplements, functionalized textiles, cosmetics, etc.). Nowadays, humans are subjected to an extremely wide range of stress factors, so that a higher intake of biologically active compounds is required. In this framework, I will conduct my research activities on development of valuable natural products for a modern phytotherapeutic strategy and probably the design of new agonistic compounds based on the identified bioactive substances. I will focus on the correlation between research and educational activities, collaboration with industry, promotion of innovation in applied research and educational methodologies and on the student needs and expectations regarding the receive of knowledge correlated to the market requirements.

The third section of the thesis presents the bibliographical references associated to the content, in alphabetical order.

## (a) REZUMAT

Teza de abilitare intitulată "Dezvoltarea unor produși bioactivi de valoare cu aplicații industriale și în științele vieții, cu precădere a unor compuși naturali" descrie realizările mele științifice, academice și profesionale obținute ulterior conferirii titlului de Doctor în chimie (1999), precum și planurile de evoluție și dezvoltare a propriei cariere.

În prima secțiune a tezei se prezintă detalii privind realizările științifice, academice și profesionale, descriindu-se contribuțiile semnificative aduse în domeniu prin trimiterea la lucrările științifice originale publicate. Teza se referă în principal la identificarea și cuantificarea compușilor cu diverse activități biologice, dar dincolo de acest lucru ea are o caracteristică interdisciplinară, fiind direcționată spre proiectarea de produse valoroase de origine sintetică sau naturală pentru aplicații industriale în domeniul alimentar, farmaceutic sau textil, optimizarea tehnologiilor de extracție a compușilor bioactivi vizați, precum și studiul influenței condițiilor de mediu și de procesare asupra conținutului de compuși naturali (polifenoli, antociani) în matricea lor nativă.

Teza avansează strategii fundamentale și specifice de izolare sau de sinteză chimică a compușilor bioactivi, caracterizarea structurală a acestor compuși în special a peptidelor bioactive sintetice, studii de amprentare a antocianilor individuali pentru detectarea sursei de proveniență a lor în diferite produse alimentare și evaluarea activității biologice a noilor compuși sintetici sau extractelor naturale.

Sinteza chimică a unor noi peptide a fost realizată prin strategia "pas cu pas" urmată de purificarea și determinarea structurii lor chimice, precum și a conformației prin tehnici moderne (IR, FT-IR,  $^1\text{H}$ -RMN, RES). Peptidele pure au fost testate *in vitro* pentru activitatea biologică (antibacteriană, antifungică, hemolitică, modificarea membranelor biologice). Pe baza studiilor conformaționale a fost stabilită relația structură-activitate pentru o gamă largă de noi analogi peptaibolici – peptide fungice cunoscute pentru proprietățile lor de modificare a membranelor biologice. Design-ul unor noi analogi bazat în principal pe valorificarea  $\alpha$ -aminoacizilor  $\text{C}^\alpha$ -tetrasubstituiți ar putea ajuta la dezvoltarea unor agenți antimicrobieni cu aplicații potențiale în industria farmaceutică și textilă. Activitățile de cercetare în acest domeniu au fost efectuate în cadrul studiilor mele post-doctorale la Universitatea din Padova, Italia și în cadrul unui proiect de cercetare bilaterală PC7 România - Italia în desfășurare, pe care îl coordonez.

Deoarece preferințele actuale se îndreaptă tot mai mult spre găsirea unor alternative și produse naturale, o parte din activitățile mele de cercetare s-au direcționat către studii compușilor naturali bioactivi din plante, în special antociani. Aceste molecule bioactive și-au dovedit efectele lor benefice asupra sănătății umane prin numeroase studii *in vitro*, *in vivo* și epidemiologice. În acest sens, am realizat studii care probează originalitatea și relevanța într-o perspectivă interdisciplinară, precum ar fi optimizarea tehnologiilor extractive (convenționale și neconvenționale), analiza cantitativă a antocianilor extrași din diferite plante alimentare în funcție de specie, practici agricole și factori de mediu, aplicarea tehnicii spectrometriei de masă ESI-IT-MS/MS fără o analiză prealabilă HPLC-DAD pentru a identifica profilul antocianic din extractele brute (ca metodă rapidă de diferențiere specio-specifică a antocianilor), evaluarea activității antioxidante și antimicrobiene a extractelor brute, studii de stabilitate la pH și termică a extractelor antocianice în timpul depozitării, studii de influență a congelării și uscării (cu aer cald și cu IR) materiei vegetale asupra conținutului total de antociani. Rezultatele obținute pot fi de interes pentru procesatorii din industria alimentară, dat fiind faptul că orice tratament aplicat poate modifica conținutul și compoziția produselor și indirect beneficiile compușilor bioactivi asupra sănătății umane. Având în vedere tendințele actuale de înlocuire a aditivilor sintetici cu cei naturali și luând în considerare potențialul farmacologic dat de antociani, am inițiat cercetări obținând rezultate foarte bune privind capacitatea extractelor brute antocianice de a stabili lipidele polinesaturate. Ținând seama de proprietățile specifice de colorare ale antocianilor am inițiat și studii de colaborare privind aplicarea acestor extracte naturale în tehnologiile ecologice de vopsiri textile. Rezultatele cercetărilor au demonstrat că extractele antocianice pot fi folosite cu eficiență drept pigmenți naturali pentru vopsirea unor fibre naturale funcționalizate cu  $\beta$ -ciclodextrină. Aceste tehnologii ecologice contribuie nu numai la îmbunătățirea calității materialelor textile tradiționale, dar și la utilizarea unor metode de vopsire cu impact scăzut asupra mediului. Dintr-o altă cercetare efectuată în cadrul proiectului de cercetare bilateral Italia-România aflat în desfășurare s-a reușit crearea unor noi materiale celulozice (bumbac) funcționalizate cu peptide antimicrobiene (dendrimeri și lipofilice) active față de *Staphylococcus aureus*.

În ceea ce privește realizările mele profesionale ulterioare conferirii titlului de doctor, am publicat în calitate de autor principal și co-autor, un număr de 10 cărți, 8 capitole în cărți la edituri naționale și internaționale recunoscute, 41 articole originale în reviste cotate ISI unele cu factor de impact relevant și ISI Proceedings <http://www.researcherid.com/rid/D->

[4541-2013](#), peste 35 articole în reviste indexate BDI și peste 80 lucrări prezentate la manifestări științifice naționale și internaționale în domeniu. Numărul mare de citări - peste 200 conform Web of Knowledge - dovedesc vizibilitatea internațională a contribuțiilor științifice, impactul mare și interesul altor cercetători din întreaga lume cu privire la cercetările realizate. Abilitățile de organizare și lucru în echipă au fost îmbunătățite prin participarea mea în 14 proiecte de cercetare naționale și internaționale, dintre care 7 în calitate de director/coordonator de proiect care demonstrează independența științifică dobândită. Experiența mea profesională a fost îmbunătățită și prin alte activități, cum ar fi: lector invitat pentru susținerea unor seminarii la Universitatea din Padova, Italia; evaluarea propunerilor de proiecte naționale de cercetare în calitate de expert evaluator; recenzor al articolelor din reviste științifice cotate ISI sau indexate BDI, membru al Comitetului Editorial al revistei *Acta Univ. Cib. Food Technology*; chairman la Conferința Internațională PT- Conf.

A doua secțiune a tezei descrie planurile de evoluție și dezvoltare a propriei cariere stabilite pe termen scurt și mediu, care se concentrează pe trei direcții principale: (i) activități educaționale; (ii) activități de cercetare constând în continuarea implementării celor două proiecte de cercetare în desfășurare, al căror director/coordonator sunt, precum și inițierea de noi propuneri de proiecte de cercetare; (iii) diseminarea rezultatelor activităților de cercetare și educaționale. Îmi propun să continui activitățile mele de cercetare într-o abordare multi- și interdisciplinară (științe chimice corelate cu domenii precum biologie, sănătate, științe farmacologice, inginerie, științe horticole, științe alimentare, luând în considerare și necesitățile producătorilor și consumatorilor -abordare transdisciplinară). Voi continua să adaptez metodologiile de evaluare a bioactivității pentru alte diferite materii (produse și suplimente alimentare, textile funcționalizate, cosmetice). Actual populația este supusă continuu factorilor de stres, astfel încât este necesar un aport crescut de compuși bioactivi. În acest context, activitățile mele de cercetare se vor direcționa spre dezvoltarea de produse naturale valoroase pentru o strategie fitoterapeutică modernă și pentru proiectarea de noi compuși cu efect agonist, bazată pe substanțele bioactive identificate. De asemenea, voi pune accent pe corelația activităților de cercetare științifică cu cele educaționale, colaborarea cu parteneri industriali, promovarea inovării în cercetarea aplicată și în metodologiile educaționale, studiul nevoilor și așteptărilor manifestate de studenți cu privire la cunoștințele și abilitățile dobândite în strânsă legătură cu cerințele pieței.

A treia secțiune a tezei prezintă referințele bibliografice asociate cu conținutul acesteia și prezentate în ordine alfabetică.