To whom it may concern

Report on the PhD Thesis

"Development and validation of the technological scheme for preparation a gel of plant origin", written by Dariya Kassymova from the Al-Farabi Kazakh National University, under the supervision of Prof. Dr. Zhusupova Galiya Eventaevna

The PhD thesis elaborated by the candidate Dariya Kassymova has two main objectives. The first objective is to conduct a pharmacognostic study of the chemical composition of the roots and aerial parts (AP) of *Limonium gmelinii* by comparing three different exctraction methods: classical maceration (CM), ultrasonic extraction (USE) and supercritical fluid extraction (SFE). Following this, the study examines their immunomodulatory and antinfiammatory properties. The second objective is the development and validation of a technological scheme for preparing optimal gel compositions based on substances from the roots and APs of this plant. The proposed approach and the topics investigated demonstrate complete originality, providing an in-depth overview of the current state of the art, which serves not only as an introduction to the topics but also as the foundation upon which to achieve the objectives mentioned previously. It merges knowledge from advanced methodologies with relevant examples for the investigated topics. These strategies merged to achieve the objectives of the present PhD thesis, highlighting the industrial significance of *L. gmelinii* in Kazakhstan and the resource availability for its processing.

The methodologies employed in this research are robust and varied. Indeed, the study aims at optimizing CM, USE, SFE in order to determine the most efficient process in terms of yield, tannin content, and total polyphenols content. In this regard, USE proved to be the most effective method offering a high yield and significant quantities of active substances. Thus, the chemical composition of the extracts obtained was analyzed using various analytical techniques, including LC-QToF-MS and High-Performance Liquid Chromatography (HPLC). These analyses identified a total of 62 compounds in the extracts from CM and USE methods. Root extracts were rich in sulfated derivatives of phenolic acids and flavonoids, whereas the extracts from the aerial parts contained higher amounts of flavonoids, along with unique compounds such as lignanamides and *N*-transferuloyltyramine. The extracts were tested for their antimicrobial activity against both a Gram-negative and Gram-positive bacteria (i.e.,

Escherichia coli and *Staphylococcus epidermidis*, respectively) and evaluated by the inhibition zone assay in agar plates. They resulted inactive against *E. coli*, while they showed significant antibacterial activity against *S. epidermidis*, likely due to the presence of polyphenols in them rather than polysaccharides. Furthermore, she developed pharmaceutical gels with extracts from roots and APs of plants of *L. gmelinii* and these were validate for their stability, meeting the standards of the State pharmacopoeia of Kazakhstan. Additionally, the gel showed comparable efficacy to 1.0% Diclofenac gel, with formulations from the aerial parts displaying higher activity than those from the roots.

General conclusions

I had the pleasure of mentoring Dariya Kassymova during her visiting period at the Department of Chemistry and Technology of Drugs at the Faculty of Pharmacy and Medicine, Sapienza University of Rome. With her extensive research experience and professional qualifications, Dariya proved to be a diligent and capable researcher under my guidance. It is worth noting that the PhD research of Dariya makes a significant contribution to the field of pharmaceutical sciences, particularly in the development of plant-based medicinal gels. The thesis is of high quality, demonstrating her capability in conducting independent and rigorous research. Based on the notable achievements demonstrated within the scope of her research, it is my professional opinion that Dariya Kassymova is a top-tier PhD investigator deserving of the degree.

Rome, 24/05/2024

Bruno Botta

Bruno Botta
Professor of Organic Chemistry
Rector of Unitelma Sapienza, Università degli Studi di Roma
Piazza Sassari, 4 - 00161 Rome, Italy
Phone (+39) 06 99 58 01 11
email: bruno.botta@uniroma1.it, rettore@unitelmasapienza.it

Всем заинтересованным лицам

Рецензия
на докторскую диссертацию

"Разработка и валидация технологической схемы приготовления геля растительного происхождения", подготовленную Дарией Касымовой из Казахского национального университета им. Аль-Фараби под руководством профессора, д.т.н. Жусуповой Галии Эвентаевны

Докторская диссертация, подготовленная соискателем Дарией Касымовой, рассматривает две основные цели. Первая цель - проведение фармакогностического исследования химического состава корней и надземных частей (НЧ) *Limonium gmelinii* путем сравнения трех различных методов экстракции: классической мацерации (КМ), ультразвуковой экстракции (УЗЭ) и сверхкритической флюидной экстракции (СФЭ). После чего изучаются их иммуномодулирующие и противовоспалительные свойства. Вторая цель - разработка и валидация технологической схемы приготовления оптимальных гелевых композиций на основе веществ из корней и НЧ данного растения. Предлагаемый подход и исследуемые темы демонстрируют полную оригинальность, предоставляя глубокий обзор современного состояния дел, который служит не только введением в тему, но и фундаментом для достижения поставленных целей. Данная работа объединяет знания из передовых методологий с соответствующими примерами по исследуемым темам. Объединение данных стратегий позволило достичь целей настоящей докторской диссертации, подчеркнув промышленную значимость *L. gmelinii* в Казахстане и доступность ресурсов для ее переработки.

Методики, использованные в данном исследовании, надежны и разнообразны. Действительно, цель исследования - оптимизировать КМ, УЗЭ, СФЭ для определения наиболее эффективного процесса касательно полезной продуктивности, содержания дубильных веществ и общего содержания полифенолов. В этом отношении УЗЭ оказался наиболее эффективным методом, обеспечивающим высокую производительность и значительное количество активных веществ. Таким образом, химический состав полученных экстрактов был проанализирован с помощью различных аналитических методов, включая LC-QToF-MS и высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ). В результате проведенных анализов в экстрактах, полученных методами КМ и УЗЭ, было обнаружено в общей сложности 62 соединения. Экстракты корней были богаты сульфатированными производными фенольных кислот и флавоноидов, в то время как экстракты из нижних частей содержали большее количество флавоноидов, а также уникальные соединения, такие как лигнанамиды и *N-трансферулоилтирамин*. Экстракты были протестированы на антимикробную активность против грамотрицательных и грамположительных бактерий (т.е, *Escherichia coli* и *Staphylococcus epidermidis*, соответственно) и оценивались по зоне ингибирования в агаровых пластинах. Они оказались неактивны в отношении *coli*, но проявили значительную антибактериальную активность в отношении *S. epidermidis, что*, вероятно, связано с наличием в них полифенолов, а не полисахаридов. Кроме того, она разработала фармацевтические гели с экстрактами корней и НЧ растений *L. gmelinii*, которые были проверены на стабильность и соответствовали стандартам Государственной фармакопеи Казахстана. Кроме того,

гель показал сопоставимую эффективность с 1,0% гелем диклофенака, при этом препараты, полученные из воздушных частей, показали более высокую активность, чем препараты, полученные из корней.

Общие выводы

Мне была предоставлена возможность быть наставником Дарии Касымовой во время ее пребывания на кафедре химии и технологии лекарственных средств на факультете фармации и медицины Римского университета Ла Сапиенца. Имея большой опыт научной работы и профессиональную квалификацию, Дария проявила себя как старательный и способный исследователь во время стажировки. Стоит отметить, что докторское исследование Дарии вносит значительный вклад в область фармацевтики, в частности в разработку лекарственных гелей на растительной основе. Диссертация отличается высоким качеством, демонстрируя ее способность проводить независимые и тщательные исследования. Основываясь на заметных достижениях, продемонстрированных в рамках ее исследования, я считаю, что Дария Касымова является высококвалифицированным исследователем, заслуживающим присуждения степени PhD.

Рим, 24/05/2024

/подпись/

Бруно Ботта
Профессор органической химии
Ректор Римского университета Ла Сапиенца
Piazza Sassari, 4 - 00161 Рим, Италия
Телефон (+39) 06 99 58 01 11
e-mail: bruno.botta@uniroma1.it, rettore@uniclamsapienza.it