

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
"VICTOR BABEȘ" TIMIȘOARA
FACULTATEA DE MEDICINĂ GENERALĂ
DEPARTAMENTUL IV BIOCHIMIE ȘI FARMACOLOGIE

MARIUS DANIEL PREDA



TEZĂ DE DOCTORAT

EXTRACTE SELECTIVE DIN SCOARȚĂ
DE MESTEACĂN ȘI TESTAREA LOR
EXPERIMENTALĂ ANTIPROLIFERATIVĂ
ȘI PRIN METODE NEINVAZIVE

Conducător Științific
PROF. UNIV. DR. EUGEN ȘIȘU

REZUMAT

Timișoara
2018

CUPRINS

PARTEA GENERALĂ.....	1
I. ANALIZA DESCRIPTIVĂ A CUNOAȘTERII ÎN DOMENIU	1
I.1 Plantele medicinale – alternativa teraputicelor de sinteză.....	1
I.2 Mesteacănul	3
I.2.1 Generalități – Introducere. Descrierea speciei	3
I.2.2 Descrierea substanței (substanțelor) pe bază de plante, a preparatelor din plante sau a combinațiilor acestora. Compoziție chimică	4
I.2.2.1 Substanțe din plante	4
I.2.2.2 Preparate din plante medicinale.....	5
I.2.4.3 Compoziția chimică.....	5
I.2.3 Activitatea biologică a extractelor și compușilor biologic activi majoritari din scoarța de mesteacăn	6
I.2.3.1 Activitatea anticancerigenă	7
I.2.3.2 Activitatea antiinflamatorie	7
I.2.3.3 Activitatea în artrită și reumatism	9
I.2.3.4 Activitatea antimicrobiană și antivirală	10
I.2.3.5 Utilizări dermatologice	11
I.2.3.6 Unele triterpenoide biologic active din specia Betula	12
I.2.3.6.1 Betulinolul și acidul betulinic	12
I.2.3.6.2 Acidul papiriferic	13
I.2.3.7 Toxicitatea	13
I.3 Formulări destinate protejării extractelor de plante medicinale și principiilor active din compoziția acestora	14
I.3.1 Emulsiile	14
I.3.2 Nanoemulsiile. Utilizarea în afecțiunile pielii și aplicarea topică	15
I.3.2.1 Introducere	15
I.3.2.2 Proprietățile și avantajele nanoemulsiilor	18
I.3.2.3 Prepararea nanoemulsiilor.....	19
I.3.2.4 Considerații de bază în prepararea de nanoemulsii pentru aplicare pe cale dermică și transdermică.....	22
I.3.2.4.1 Anatomia pielii	22
I.3.2.4.2 Rolul căii dermice/transdermice în transportul medicamentelor	23
I.3.2.4.3 Rolul emulgatorilor în prepararea de nanoemulsii destinate aplicațiilor dermice și transdermice.....	25
I.3.2.4.4 Modul de transport al nanoemulsiilor prin cale dermică și transdermică.....	27
I.3.2.4.5 Progresele recente în abordările dermice și transdermale de administrare a medicamentului prin nanoemulsie	30
I.3.2.4.6 Aplicații dermice și transdermice de administrare a medicamentului sub formă de nanoemulsie.....	31
I.3.3 Microemulsiile. Utilizarea în afecțiunile pielii și aplicarea topică	33

PARTEA SPECIALĂ.....	35
II.1 Obținerea extractelor brute din scoarță de mesteacăn și standardizate în betulinol. prepararea formulărilor cu extracte și betulinol.....	35
II.1.1 Introducere	35
II.1.2 Materiale și metode	37
II.1.2.1 Prepararea extractului	37
II.1.2.2 Purificarea extractului	38
II.1.2.3 Prepararea nanoemulsiilor.....	40
II.1.2.4 Prepararea microemulsiilor	40
II.1.2.5 Prepararea microstructurilor poliuretanice	41
II.1.2.6 Metode de caracterizare a formulărilor obținute	41
II.1.3 Rezultate și discuții.....	42
II.2 Screening <i>in vitro</i> pe celule normale și tumorale ale extractelor din scoarță de mesteacăn și formulărilor pe bază de extracte din scoarță de mesteacăn.....	57
II.2.1 Introducere	57
II.2.2 Materiale și metode	59
II.2.2.1 Reactivi și celule	59
II.2.2.2 Cultivarea liniilor celulare	60
II.2.2.3 Viabilitatea celulară.....	63
II.2.2.4 Apoptoza celulară	63
II.2.3 Rezultate și discuții.....	63
II.2.3.1 Morfologia celulară	63
II.2.3.2 Viabilitatea celulară.....	71
II.2.3.3 Apoptoza celulară	83
II.3 Activitatea extractelor din scoarță de mesteacăn și formulărilor cu extracte din scoarță de mesteacăn asupra parametrilor fiziologici ai pielii	85
II.3.1 Introducere în tehnicile de evaluare a parametrilor fiziologici ai pielii prin metode neinvazive.....	85
II.3.2 Comportamentul parametrilor fiziologici ai pielii în prezența extractelor din scoarță de mesteacăn și formulărilor pe bază de extracte din scoarță de mesteacăn și betulinol	88
II.3.2.1 Materiale și metode	89
II.3.2.1.1 Materiale.....	89
II.3.2.1.2 Aparate	90
II.3.2.1.3 Metode	90
II.3.2.1.4 Analiza statistică	92
II.3.2.2 Rezultate și discuții	93
II.3.2.2.1 Cuantificarea pierderii de apă transepidermice (TEWL).....	93
II.3.2.2.2 Cuantificarea hidratării pielii	96
II.3.2.2.3 Cuantificarea eritemului	98
II.3.2.2.4 Cuantificarea melaninei	101

II.3.2.2.5 Cuantificarea elasticității pielii	103
II.3.2.2.6 Cuantificarea conținutului de sebum	105
CONCLUZII	110
BIBLIOGRAFIA	114

TEZA DE DOCTORAT
Extrakte selective din scoarță
de mesteacăn și testarea lor experimentală
antiproliferativă
și prin metode neinvazive

Rezumat

Plantele au fost folosite de-a lungul istoriei pentru proprietățile lor medicinale. Utilizarea plantelor pentru a trata diferite afecțiuni a apărut încă din epoca egiptenilor (1500 înainte de Hristos), când cepele au fost folosite pentru tratamentul rănilor inflamate. O varietate de sisteme medicinale antice din India, Asia și Africa demonstrează, de asemenea, utilizarea imensă și larg răspândită a plantelor pentru proprietățile lor medicinale. Medicina tradițională pe bază de plante a jucat un rol esențial în tratamentul cancerului de-a lungul istoriei, deși doar din anii 1950 medicina modernă și-a îndreptat atenția asupra plantelor cu activitate anticanceră. S-au descoperit compuși anticancerogeni din plante, cum ar fi alcaloizii vinca și podofilotoxine în această perioadă. Datorită succesului în găsirea în trecut a unor compuși anticancerigeni semnificativi în plante, Institutul Național al Cancerului din Statele Unite (NCI) a început un program în 1960, în care plantele au fost colectate din întreaga lume și testate pentru posibile activități anticancerogene. Compușii anticancerogeni, incluzând taxanii și camptotecinele, au fost descoperiți prin acest program și sunt încă utilizați astăzi pentru tratamentul unor diferite tipuri de cancer.

Cancerul este o modificare moleculară a ADN-ului uman care duce la modificarea funcțiilor biochimice și fiziologice ale corpului. Aceasta este a doua cauză principală de mortalitate și este responsabilă pentru 1 din 6 decese la nivel global. Cancerul de piele a evoluat ca cea mai frecventă boală malignă constatând 4,5% din toate cazurile noi de cancer, cu o creștere medie de aproximativ un milion de cazuri noi anual. Această prevalență este mai mare decât în cazul oricărui alt tip de cancer. Această creștere alarmantă și îngrozitoare a ratei mortalității datorată diferitelor tipuri de cancer de piele a provocat urmărirea unor agenți anticancerigeni eficienți cu efecte secundare mai mici pentru a combate această boală, deoarece obiectivul final al terapiei anticancerogene este găsirea de agenți chimioterapeutici selectivi careucid sau

fac ca celulele tumorale maligne să devină benigne, fără efect asupra celulelor normale. Agenții chimioterapeutici utilizați în prezent în oncologie sunt, din păcate, toxici pentru celulele normale. Astfel, compușii noi, eficienți și netoxici izolați din surse naturale, cum ar fi fitochimicalele cu activități anticanceroase, au nevoie de o atenție sporită.

Un sistem ideal de livrare a medicamentelor îndeplinește obiectivul de maximizare a efectului terapeutic, reducând în același timp toxicitatea. Odată cu progresul în timp și progresele în domeniul științei și al tehnologiei, formele de dozare au evoluat de la amestecuri simple și pastile la sisteme foarte sofisticate, cunoscute ca sisteme noi de eliberare a medicamentelor. Unul dintre exemplele unui nou sistem de administrare a medicamentelor sunt nanoemulsiile. Nanoemulsia este definită ca o dispersie limpede izotopică, termodinamic stabilă, a două lichide nemiscibile, cum ar fi uleiul și apa, stabilizate de un film interfacial al moleculei de surfactant. Nanoemulsia este o emulsie cu o dimensiune uniformă și extrem de mică a picăturilor în intervalul 20-200 nm. Nanoemulsiile nu se formează spontan; pentru a rupe picăturile mai mari în cele mai mici, trebuie aplicată forfecare exterioară. Primele nanoemulsii au fost preparate în anii 1940, pot fi de trei tipuri, adică ulei-în-apă (U / A), apă în ulei (A / U) și bi-continuă.

Betulinolul este o triterpenă pentaciclică de tip lupan: lup-20 (29) -en-3 β , 28-diol (CAS nr. 47398-3). Apare în mai multe specii de plante, mai ales în multe specii de mesteacăn, unde se găsește în cantități mari în scoarța exterioară. Cantitatea de betulinol poate fi de până la 20-30% (sau chiar aproape 45%) din greutatea părții exterioare a scoarței, în funcție de speciile de arbori și localizarea sa regională. O cantitate mai mică de betulinol poate fi găsită și în învelișul exterior al rădăcinii și în frunzele de mesteacăn.

Obținerea extractelor din scoarță de mesteacăn și a formulărilor pe bază de extracte din scoarță de mesteacăn

A fost dezvoltată o metodă chimică relativ simplă, ecologică, pentru izolarea betulinolului din scoarța de mesteacăn și purificarea ulterioară pentru a obține betulinol de înaltă puritate (mai mare de 99%). Etanolul, apa și clorura de calciu sunt compuși inofensivi. Doi solvenți - benzen și cloroform - sunt nedoriți din punct de vedere ecologic, dar ambii sunt aproape 100% reciclați prin distilare și pot fi utilizați în mod repetat pentru purificarea ulterioară a betulinolului. Hidroxidul de sodiu și acidul clorhidric sunt utilizați în cantități relativ mici și practic în raport stoechiometric și, prin urmare, nu sunt periculoși pentru mediu. Deșeurile solide din scoarță după extracție sunt destul de inofensive pentru mediu și pot fi folosite și ca o sursă relativ pură de suberine.

Două dintre produsele secundare reprezintă o sursă potențial prețioasă de acid betulinic (fracțiunea F1) și lupeol (fracțiunea F2). Luând toate acestea în considerare se poate spune despre metoda aleasă că este de tip "verde". Eficiența totală a procesului de purificare în cazul nostru (rezultat: mici cristale din fracțiunea BBE5) a fost de aproximativ 20% din greutatea inițială a extractului uscat BBE0. Această eficiență "totală" a fost calculată ca un multiplu al eficienței etapelor particulare de purificare. Eficiența reală în ceea ce privește conținutul de betulinol în fracțiunea B0 este ceva mai mare. Cu toate acestea, betulinolul din toate "deșeurile" și produsele secundare poate fi refolosit în următorul proces de purificare ca aditiv la extractul inițial sau la soluții de faze ulterioare de purificare. Teoretic, într-un proces (semi) industrial și continuu, eficiența ar putea ajunge în mod substanțial la peste 90% din conținutul de betulinol din extractul uscat, dacă nu sunt luate în considerare pierderile de la filtrare sau de pe suprafețele vaselor.

S-au obținut extracte brute și purificate care au fost caracterizate prin metode fizico-chimice uzuale (punct de topire, spectrofotometrie UV-Vis, spectrometrie FTIR, analiză cromatografică). Extractele obținute au fost incluse în formulări de tipul nanoemulsiilor, microemulsiilor și microstructurilor poliuretaneice. Nanoemulsiile sunt o alegere populară ca sistem de administrare datorită eficacității lor în încapsularea medicamentului terapeutic hidrofob în faza de ulei. Microemulsiile sunt amestecuri clare, stabile, izotropice de ulei, apă și agent tensioactiv, frecvent în combinație cu un cosurfactant. Aceste sisteme sunt în prezent de interes pentru știința farmaceutică din cauza potențialului lor considerabil de a acționa ca vehicule de eliberare a medicamentelor prin încorporarea unei game largi de molecule de medicament. Toate formulările obținute s-au caracterizat din punct de vedere al formării, stabilității și eficienței de încapsulare iar rezultatele au fost pozitive și în concordanță cu datele din literatura de specialitate. Termogramele DSC pentru probele analizate au arătat o bună stabilitate termică, deoarece prezintă mici modificări ale fluxului de căldură, care au fost asociate cu pierderea apei din sistem și cu transferul redus de căldură al sistemului.

Studii *in vitro* pe linii celulare sănătoase și pe linii celulare tumorale

În lucrarea de față s-a evaluat citotoxicitatea prin metode *in vitro*, exercitată de extractul brut obținut din scoarță de mesteacăn și alte trei tipuri de extracte derivate din acesta (până la purificarea finală în betulinol). În plus, au fost testate și trei tipuri de formulări ale acestor extracte de tipul nanoemulsie, microemulsie și microstructuri poliuretaneice. Liniile celulare utilizate au fost atât linii sănătoase (keratinocite și fibroblaste umane, celule epidermice de

șoarece) cât și linii tumorale (melanom uman și murin, carcinom epidermoid și adenocarcinom mamar).

Morfologia celulară analizată în cazul stimulării cu extracte a scos în evidență următoarele:

- în prezența compușilor de testat, la concentrații scăzute, forma keratinocitelor umane a rămas bine definită, a fost alungită, iar celulele au fost atașate la placa de cultură; în prezența concentrațiilor mari de extracte, celulele și-au schimbat drastic aspectul morfologic, devenind rotunde și unele dintre ele plutitoare, în special cele testate cu extractul brut și microemulsia cu acesta, observându-se în aceste cazuri și contracția celulelor care ar putea fi considerată un semn al apoptozei timpurii;
- fenomene asemănătoare au putut fi observate și în cazul fibroblastelor care au fost stimulate cu concentrații mari de extracte și formulări (între 25-50 $\mu\text{g/ml}$) în special în cazul microemulsiilor unde au fost prezente diferite grade de contracție a celulelor;
- celulele murinice epidermice au arătat o bună confluență și compușii de testat nu au perturbat forma celulelor la concentrații mai mici de 25 μg , în timp ce după aplicarea concentrațiilor ridicate, celulele stimulate cu compuși de testat păreau afectate dar s-au observat doar modificări minore în cazul utilizării extractelor și modificări ceva mai pronunțate în cazul microemulsiilor cu extracte;
- o scădere semnificativă a confluenței celulelor de melanom uman a fost înregistrată la stimularea cu extractele ca atare, în special în cazul extractului standardizat în betulinol, când s-au observat unele celule detașate și plutitoare, celulele au devenit rotunde și au început să se detașeze, indicând procesul de apoptoză;
- modificările în forma celulelor melanomului murin au fost observate, de asemenea, după stimularea cu compuși de testat sub formă de microemulsii dar, pe de altă parte, celulele stimulate cu compuși de testat sub formă de microstructuri poliuretaneice au evidențiat o creștere a confluenței și modificări minore în morfologia celulelor.

În cazul evaluării viabilității celulare s-au constatat următoarele :

- stimularea keratinocitelor cu concentrații crescute ale compușilor de testat (peste 25 μg) a determinat o reducere semnificativă a viabilității celulelor (~67% BBE0 și ~61% BBE5, ~48% BBE0_NE, ~32% BBE0_ME, ~52% BBE1_ME, ~62% BBE5_ME), în comparație cu celulele stimulate cu concentrații mai mici (situate între 1-25 μg) ;
- stimularea fibroblastelor umane timp de 24 ore cu extractele ca atare a condus la o ușoară scădere a viabilității într-o manieră dependentă de doză,

cele mai pronunțate efecte fiind observate în cazul utilizării unei concentrații de 50 μg (~87% BBE0, ~84% BBE1, ~90% BBE2 și ~80% BBE5), nanoemulsiile cu extracte au prezentate efecte asupra viabilității celulelor ceva mai pronunțate decât extractele neformulate (~80% BBE0_NE, ~72% BBE1_NE, ~88% BBE2_NE și ~82% BBE5_NE), microemulsiile cu extracte au prezentate cele mai pronunțate efecte asupra viabilității celulelor (~48% BBE0_ME, ~70% BBE1_ME, ~38% BBE2_ME și ~50% BBE5_ME) iar structurile poliuretanică nu au avut efecte negative semnificative asupra viabilității celulelor ci comparabile cu cele exercitate de extractele ca atare;

- pe celulele epidermice murinice în cazul utilizării concentrațiilor mai scăzute se poate observa un ușor efect stimulator, în special în cazul extractelor brute și standardizate, dar și în cazul structurilor poliuretanică care conțin aceste tipuri de extracte;

- pe celulele de melanom uman extractul brut și extractul standardizat în betulinol au indus o scădere semnificativă a procentului de celule vii la concentrațiile cele mai ridicate testate - la 25 μg / ml viabilitatea a fost de ~30%, în timp ce la 50 μg / ml viabilitatea a fost de ~15%;

- pe celulele de melanom murin dintre toate cele patru extracte testate, extractul standardizat în betulinol, BBE5 s-a dovedit a fi cel mai activ, microstructurile poliuretanică nu au exercitat efecte citotoxice semnificative comparative cu extractele ca atare, doar în cazul BBE5_PU scăderea viabilității a fost mai mare comparativ cu formulările celorlalte trei tipuri de extracte, nanoemulsiile au indus o ușoară scădere a viabilității iar microemulsiile o scădere ceva mai pronunțată;

- pe celulele de carcinom epidermoid datele obținute au arătat că extractele BBE0, BBE1 și BBE2 au avut efecte stimulative asupra celulelor, în timp ce extractul standardizat în betulinol, BBE5 a indus o ușoară scădere a viabilității celulare;

- în cazul adecarcinomului mamar, pe ambele tipuri de celule utilizate s-au putut observa efecte stimulative, în special pe celulele MDA-MB-231, în cazul acestor celule viabilitatea a fost semnificativ crescută la stimularea cu BBE5, după cum urmează: la 5 μg / ml viabilitate ~ 128%, la 10 μg / ml viabilitate ~ 140%, la 25 μg / ml viabilitate ~ 141% și la 50 μg / ml viabilitate ~ 150%.

Rapoartele de apoptoză induse de compușii de testat în celulele canceroase de melanom uman și murin fost evaluate cantitativ prin citometrie în flux, și s-a constatat că extractele induc apoptoza, într-o manieră semnificativă dependentă de doză. Cel mai mare raport de apoptoză în cazul celulelor de melanom uman, 81.9% a fost obținut după 24 de ore de tratament la o concentrație de 10 μg a BBE5 iar în cazul celulelor de melanom murin 31.1%

după tratamentul cu BBE0_ME. Datele obținute sunt în concordanță cu cele prezentate în urma evaluării viabilității celulare.

Studii *in vivo* – măsurători ale parametrilor fiziologici ai pielii prin metode neinvazive

Datorită complexității structurii și funcției pielii, un singur parametru nu este suficient pentru a descrie în întregime proprietățile fiziologice ale pielii. Astfel, o abordare multi-parametrică s-a dovedit a fi cea mai utilă și s-au realizat măsurători ale parametrilor pielii prin metode neinvazive.

Pierderea de apă a fost monitorizată constant pe parcursul perioadei de studiu atât pentru extractele descrise cât și pentru formulările acestora. S-a constatat că a existat o scădere a acestui parametru după aplicarea extractului brut, BBE0 dar și după aplicarea formulărilor acestuia, în special tipul de microstructuri poliuretane.

În cazul formulărilor experimentale cu conținut de substanțe active a existat o creștere continuă a conținutului de umiditate pe parcursul perioadei de studiu și toate cele trei tipuri de formulări prezintă o îmbunătățire a nivelului de umiditate a pielii, indicând faptul că acestea pot fi utilizate în studii detaliate legate de tratarea tulburărilor de uscăciune a pielii.

Aplicarea topică a extractelor și formulărilor a determinat scăderi ne semnificative ale eritemului. Conținutul de melanină din piele, exprimat în procente de schimbare față de punctul de început inițial ($t = 0$), a fost mărit la aplicarea formulărilor cu extractele BBE1 și BBE2 și a formulărilor control pe durata studiului, în special în săptămânile a treia, a patra, a șasea și a opta, și scăzut în aceeași perioadă, la aplicarea formulărilor cu conținut de principii active (betulinol).

Modificarea procentuală a elasticității pielii a fost scăzută la utilizarea extractelor simple pe parcursul perioadei de studiu, în special în ultimele zile, în timp ce acest efect a fost inversat din a 2-a săptămână în cazul formulărilor.