

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
“VICTOR BABEȘ” DIN TIMIȘOARA  
FACULTATEA DE FARMACIE  
Departamentul I**

**CÎRCIOBAN V. H. DENISA-LAURA**



# **REZUMAT**

**SCREENING BIOLOGIC ȘI FIZICO-CHIMIC  
COMPLEX AL UNOR DERIVAȚI CU STRUCTURĂ  
SESQUITERPENICĂ**

Conducător științific  
**Prof. Univ. Dr. Farm.  
DEHELEAN CRISTINA ADRIANA, Dr. Habil.**

**Timișoara  
2019**

## CUPRINS

|  |       |
|--|-------|
| Lista lucrărilor științifice   | VI    |
| Abrevieri și simboluri   | VIII  |
| Index-ul figurilor   | XI    |
| Index-ul tabelelor   | XV    |
| Mulțumiri  | XVII  |
| <b>INTRODUCERE</b>   | XVIII |
| <br><b>PARTEA GENERALĂ</b>   | <br>1 |
| <b>1. COMPUȘI CU STRUCTURĂ SESQUITERPENICĂ</b>                       | 1     |
| <b>1.1. Artemisinină</b>   | 1     |
| 1.1.1. <i>Artemisia annua</i> L.                                     | 1     |
| 1.1.1.1. Caracterizare botanică                                      | 1     |
| 1.1.1.2. Compoziție chimică  | 2     |
| 1.1.1.3. Metode de extracție și izolare a artemisininei              | 3     |
| 1.1.1.4. Efecte terapeutice  | 5     |
| 1.1.2. Istoric   | 6     |
| 1.1.3. Profilul fizico-chimic al artemisininei                       | 8     |
| 1.1.4. Aplicații terapeutice în oncologie                            | 10    |
| <b>1.2. Artemeter</b>  | 14    |
| 1.2.1. Proprietăți fizico-chimice                                    | 14    |
| 1.2.2. Aplicații terapeutice în oncologie                            | 15    |
| <b>1.3. Artesunat</b>  | 17    |
| 1.3.1. Proprietăți fizico-chimice                                    | 17    |
| 1.3.2. Aplicații terapeutice în oncologie                            | 17    |
| <b>1.4. Dihidroartemisinină (artenimol)</b>                          | 20    |
| 1.4.1. Proprietăți fizico-chimice                                    | 20    |
| 1.4.2. Aplicații terapeutice în oncologie                            | 21    |
| <b>1.5. Profil farmacocinetic</b>                                    | 24    |
| <b>1.6. Profil toxicologic</b>                                       | 25    |
| 1.6.1. Neurotoxicitate   | 25    |
| 1.6.2. Embriotoxicitate  | 26    |
| 1.6.3. Hematotoxicitate și imunotoxicitate                           | 26    |
| 1.6.4. Cardiotoxicitate  | 27    |
| 1.6.5. Reacții alergice  | 27    |
| <b>1.7. Mecanism de acțiune ca agent anti-canceros</b>               | 27    |
| 1.7.1. Rolul fierului  | 27    |
| 1.7.2. Stresul oxidativ  | 28    |
| 1.7.3. Deteriorarea ADN-ului și interferența în căile de semnalizare | 28    |
| 1.7.3.1. Efectul antiproliferativ                                    | 28    |
| 1.7.3.2. Efectul proapoptotic  | 29    |
| 1.7.3.3. Efectul antimetastatic                                      | 29    |

|   |    |
|---|----|
| 1.7.3.4. Efectul antangiogenic                                    | 30 |
| <b>2. METODE DE SOLUBILIZARE</b>                                  | 30 |
| 2.1. Complecși de incluziune cu ciclodextrine                     | 30 |
| 2.2. Nanolipozomi   | 34 |
| <b>PARTEA SPECIFICĂ</b>   | 36 |
| <b>3. SECȚIUNEA EXPERIMENTALĂ</b>                                 | 36 |
| <b>3.1. Materiale</b>   | 36 |
| 3.1.1. Reactivi   | 36 |
| 3.1.2. Culturi celulare   | 37 |
| <b>3.2. Metode de preparare</b>                                   | 37 |
| 3.2.1. Complecși de incluziune cu ciclodextrine                   | 37 |
| 3.2.2. Nanolipozomi   | 38 |
| <b>3.3. Metode de analiză fizico-chimice</b>                      | 39 |
| 3.3.1. Analiza termică  | 39 |
| 3.3.2. Spectroscopia în infraroșu cu transformată Fourier (FTIR)  | 40 |
| 3.3.3. Studiul cinetic  | 40 |
| 3.3.3.1. Metoda Friedman (Fr)                                     | 40 |
| 3.3.3.2. Metoda Flynn-Wall-Ozawa (FWO)                            | 41 |
| 3.3.3.3. Metoda Kissinger-Akahira-Sunose (KAS)                    | 41 |
| 3.3.3.4. Metoda Cinetică Non-Parametrică (NPK)                    | 41 |
| 3.3.4. Modelare moleculară  | 42 |
| 3.3.5. Determinarea dimensiunii particulelor                      | 42 |
| <b>3.4. Evaluarea activității biologice</b>                       | 43 |
| 3.4.1. Metoda viabilității celulare                               | 43 |
| 3.4.2. Metoda activității antioxidante                            | 44 |
| 3.4.3. Metoda <i>in vivo</i> a membranei corioalantoice (HET-CAM) | 45 |
| <b>4. REZULTATELE CERCETĂRII</b>                                  | 47 |
| <b>4.1. Contribuții privind profilul fizico-chimic</b>            | 47 |
| 4.1.1. Artemisinină   | 47 |
| 4.1.1.1. Analiza termică  | 47 |
| 4.1.1.2. Spectroscopia ATR-FTIR                                   | 48 |
| 4.1.1.3. Studiul cinetic  | 49 |
| 4.1.2. Artemeter  | 52 |
| 4.1.2.1. Analiza termică  | 52 |
| 4.1.2.2. Spectroscopia ATR-FTIR                                   | 53 |
| 4.1.2.3. Studiul cinetic  | 54 |
| 4.1.3. Artesunat  | 57 |
| 4.1.3.1. Analiza termică  | 57 |
| 4.1.3.2. Spectroscopia ATR-FTIR                                   | 58 |
| 4.1.3.3. Studiul cinetic  | 59 |
| 4.1.4. Dihidroartemisinină  | 62 |
| 4.1.4.1. Analiza termică  | 62 |
| 4.1.4.2. Spectroscopia ATR-FTIR                                   | 64 |
| 4.1.4.3. Studiul cinetic  | 65 |
| 4.1.5. Complecși de incluziune cu artemisinină                    | 68 |

|   |     |
|---|-----|
| 4.1.5.1. Analiza termică  | 68  |
| 4.1.5.2. Spectroscopia ATR-FTIR                                   | 72  |
| 4.1.5.3. Modelare moleculară                                      | 77  |
| 4.1.6. Complecși de incluziune cu artesunat                       | 79  |
| 4.1.6.1. Analiza termică  | 79  |
| 4.1.6.2. Spectroscopia ATR-FTIR                                   | 82  |
| 4.1.6.3. Modelare moleculară                                      | 86  |
| 4.1.7. Nanolipozomi   | 88  |
| 4.1.7.1. Analiza termică pentru compușii puri                     | 88  |
| 4.1.7.2. Rezultatele spectroscopiei ATR-FTIR pentru compușii puri | 89  |
| 4.1.7.3. Analiza termică pentru nanolipozomi                      | 90  |
| 4.1.7.4. Rezultatele spectroscopiei ATR-FTIR pentru nanolipozomi  | 92  |
| 4.1.7.5. Determinarea dimensiunii particulelor                    | 94  |
| <b>4.2. Contribuții privind profilul biologic</b>                 | 95  |
| 4.2.1. Metoda viabilității celulare                               | 95  |
| 4.2.1.1. Complecși de incluziune cu artemisinină                  | 95  |
| 4.2.1.2. Complecși de incluziune cu artesunat                     | 101 |
| 4.2.1.3. Nanolipozomi cu artemisinină                             | 105 |
| 4.2.1.4. Nanolipozomi cu artesunat                                | 109 |
| 4.2.1.5. Evaluarea morfologiei celulare                           | 112 |
| 4.2.2. Metoda activității antioxidante                            | 113 |
| 4.2.3. Metoda <i>in vivo</i> a membranei corioalantoice (HET-CAM) | 114 |
| <b>CONCLUZII ȘI CONTRIBUȚII ORIGINALE</b>                         | 116 |
| <b>BIBLIOGRAFIE</b>   | 121 |
| <b>ANEXE</b>  | 140 |
| ANEXA I   | 140 |
| ANEXA II – Lucrări științifice                                    | 148 |

**CUVINTE CHEIE:** artemisinină, artesunat, artemeter, dihidroartemisinină, complecși de incluziune, ciclodextrine, nanolipozomi, analiză termică, spectroscopie în infraroșu, analiză cinetică, modelare moleculară, activitate biologică, melanom, adenocarcinom mamar, activitate antioxidantă, MTT, Alamar blue, HET-CAM.

## INTRODUCERE

În ciuda progreselor medicale și tehnologice, cancerul reprezintă în continuare una dintre cauzele majore de deces la nivel mondial. Una dintre principalele probleme asociate cu tratamentele consacrate implementate în cadrul schemelor terapeutice anticanceroase (chimioterapie, radioterapie sau proceduri chirurgicale) este reprezentată de severitatea efectelor adverse. Acestea pot afecta atât complianța pacienților la tratament cât și calitatea vieții acestora. Ca urmare a acestor considerente, una dintre direcțiile de cercetare actuale se îndreaptă spre screeningul substanțelor naturale care prezintă un nivel redus al toxicității și o eficacitate terapeutică ridicată.

Derivații sesquiterpenici prezintă o importanță deosebită, fiind studiați în prezent, la nivel mondial, de către cercetătorii din domeniul medico-farmaceutic. Structura de bază a sesquiterpenoid-lactonelor poate fi considerată a fi cea a artemisininei, un compus-cheie izolat din *Artemisia annua* L. care a fost folosită încă din cele mai vechi timpuri pentru proprietățile sale terapeutice în tratamentul malariei. *Artemisia annua* L. este o plantă originară din Asia și Europa de Est, dar care se cultivă în prezent în diferite țări europene și americane. Încă de la sfârșitul secolului XX, cercetătorii au demonstrat că artemisinină și derivații săi de semisinteză (artemeter, artesunat și dihidroartemisinină) prezintă proprietăți antiproliferative, proapoptotice și anti-tumorale. Activitatea biologică a fost corelată cu prezența punții endoperoxidice în cadrul arhitecturii moleculare a compușilor din această clasă și se bazează pe acțiunea acestora asupra celulelor neoplazice care prezintă proliferare rapidă și au conținut ridicat de ioni de fier (II). Începând cu 1990, cercetătorii din întreaga lume au studiat și prezentat efectele citotoxice ale compușilor sesquiterpenici asupra unui număr semnificativ de linii celulare canceroase.

Artemisinină și derivații săi au prezentat, alături de eficacitatea dorită pe diferite linii celulare canceroase, niveluri reduse de toxicitate și o tolerabilitate bună la administrarea *in vivo*, în studii realizate pe subiecți umani și pe modele animale. Din păcate, solubilitatea redusă a acestora în mediul apos ridică o serie de probleme în ceea ce privește biodisponibilitatea și implicit farmacodinamia.

Astfel, prezenta teză este focalizată pe studiul artemisininei (ART) și al principalilor derivați de semisinteză ai acesteia (artemeter – ARTM, artesunat – ATS și dihidroartemisinină – DHA) care păstrează elementele structurale ale compusului "părinte", dar au profiluri fizico-chimice și biologice diferite, precum și pe dezvoltarea de noi formulări care îmbunătățesc beneficiile compușilor, diminuând în același timp dezavantajele.

## SCOPUL CERCETĂRII

Principalele obiective științifice stabilite pentru prezenta teză de doctorat sunt bazate pe informațiile anterior prezentate și cuprind:

- Screening-ul orientat spre țintele terapeutice pentru compușii biologic activi cu structură sesquiterpenică;

- Caracterizarea fizico-chimică completă a moleculelor bioactive, inclusiv determinarea stabilității termice, analiza FTIR, determinarea tripletei cinetice și stabilirea mecanismului de descompunere prin corelarea cu structura chimică;
- Evaluarea *in vitro* a activității biologice prin estimarea efectului citotoxic asupra liniilor de celule umane sănătoase și patologice;
- Evaluarea activității antioxidante și determinarea *in vivo* a potențialului iritant pentru compușii sesquiterpenici;
- Obținerea unor noi formulări cu scopul de a îmbunătăți solubilitatea substanțelor active prin formarea unor aducte supramoleculare de tip complecși de incluziune și, respectiv, nanolipozomi;
- Caracterizarea fizico-chimică a formulărilor preparate;
- Evaluarea *in vitro* a activității biologice pentru noile formulări.

### **CONTRIBUȚII PRIVIND PROFILUL FIZICO-CHIMIC ȘI BIOLOGIC AL DERIVAȚILOR SESQUITERPENLACTONICI**

Pentru fiecare dintre cele patru substanțe active cu schelet sesquiterpenic (ART, ARTM, ATS și DHA) s-a realizat un profil fizico-chimic complet care să aducă informații suplimentare față de datele raportate anterior în literatura de specialitate. Astfel, fiecare substanță a fost investigată prin analiză termică (TG/DTG/HF) utilizând cinci viteze de încălzire diferite  $\beta = 5, 7, 10, 12$  și  $15 \text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ , respectiv prin spectroscopie FTIR și o evaluare obiectivă a mecanismului de descompunere termică. În cadrul acestuia s-au folosit conceptele actuale cu care operează cinetica în mediu eterogen, așa cum au fost recomandate de comitetul internațional ICTAC prin protocolul ICTAC 2000, fiind utilizate trei metode izoconversionale (o metodă diferențială Friedman, precum și două metode integrale, Flynn-Wall-Ozawa și Kissinger-Akahira-Sunose), respectiv metoda cinetică non-parametrică (NPK).

Stabilitatea termică și procesele de descompunere care au loc atunci când substanțele sunt supuse unor procese de încălzire controlată au fost determinate prin analiză termică și cinetică. Conform curbelor termoanalitice obținute, ART s-a dovedit a fi stabilă până la  $156\text{-}175 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , ARTM până la  $93\text{-}112 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , ATS până la  $142\text{-}152 \text{ }^{\circ}\text{C}$  și DHA până la  $132\text{-}138 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . Deoarece începutul procesului de descompunere poate prezenta mici variații în ceea ce privește temperatura de debut în funcție de viteza de încălzire aleasă, temperatura până la care compușii sunt stabili este exprimată sub forma unui interval.

În ciuda faptului că în unele cazuri curba TG sugerează o singură pierdere de masă în timpul descompunerii, peak-urile observate pe curbele DTG și HF indică faptul că termooxidarea compușilor are loc în mai multe etape. Pentru ART, ARTM și ATS peak-ul endoterm, vizibil pe curbele HF care marchează procesul de topire, apare la temperaturi similare cu cele prezentate în literatura de specialitate pentru fiecare substanță în parte. În cazul DHA însă, absența peak-ului care marchează topirea este cel mai probabil o consecință a temperaturii scăzute la care începe descompunerea, determinând suprapunerea celor două tipuri de procese (Fig.1).

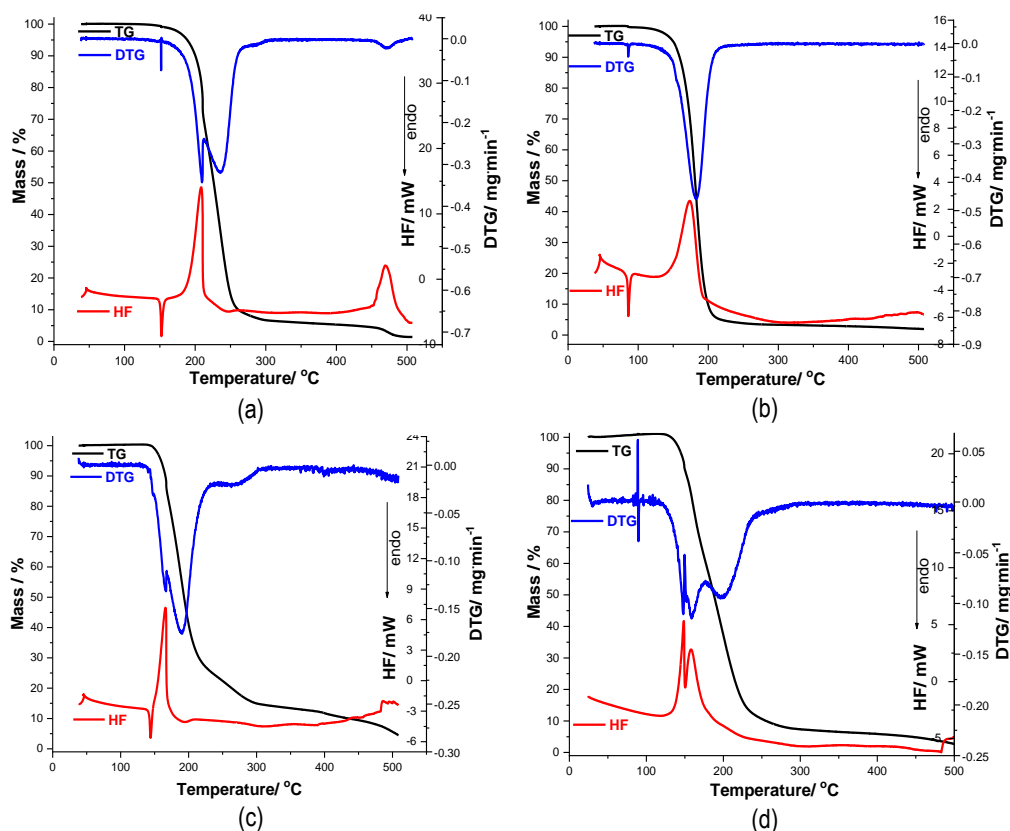


Figura 1. Datele termoanalitice (TG/DTG/HF) determinate în atmosferă de aer sintetic la  $\beta = 5^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  pentru ART (a), ARTM (b), ATS (c) și DHA (d)

Analiza FTIR a confirmat identitatea și puritatea fiecărui compus, datele obținute fiind în concordanță cu cele regăsite în literatura de specialitate.

Analiza cinetică a relevat faptul că descompunerea care se produce sub stres termic este o consecință a existenței a două procese diferite pentru toți compușii testați, cu o diferență în ceea ce privește natura transformării. În cazul ARTM și ATS, ambele procese de descompunere sunt reprezentate de degradări chimice, iar pentru ART principalul proces de descompunere este corelat cu o degradare chimică, în timp ce al doilea presupune atât o degradare chimică cât și o transformare fizică. În cazul DHA, ambele procese sunt consecința atât a transformărilor chimice, cât și a celor fizice (Tabelul 1).

Tabelul 1. Rezultatele obținute utilizând metoda NPK pentru ART, ARTM, ATS și DHA

| Compus | Proces | $\lambda$<br>/% | $A$<br>/s <sup>-1</sup> | $E_a$<br>/kJ·mol <sup>-1</sup> | $n$ | $m$ | Ecuția<br>Șesták-<br>Berggren | $R^2$  | $\bar{E}_a$<br>/kJ·mol <sup>-1</sup> |
|--------|--------|-----------------|-------------------------|--------------------------------|-----|-----|-------------------------------|--------|--------------------------------------|
| ART    | 1      | 94.7            | $3.65 \cdot 10^6$       | $60.9 \pm 2.3$                 | 1/3 | 0   | $(1-\alpha)^{1/3}$            | 0.996  | $61.3 \pm 2.4$                       |
|        | 2      | 5.2             | $3.75 \cdot 10^6$       | $70.0 \pm 3.8$                 | 1   | 1   | $(1-\alpha)\alpha$            | 0.994  |                                      |
| ARTM   | 1      | 78.0            | $8.22 \cdot 10^9$       | $84.3 \pm 5.4$                 | 2/3 | 0   | $(1-\alpha)^{2/3}$            | 0.9994 | $92.5 \pm 6.18$                      |
|        | 2      | 20.7            | $4.28 \cdot 10^{15}$    | $128.8 \pm 0.8$                | 1   | 0   | $(1-\alpha)^1$                | 0.999  |                                      |

|     |   |      |                   |                |     |   |                                 |       |                |
|-----|---|------|-------------------|----------------|-----|---|---------------------------------|-------|----------------|
| ATS | 1 | 85.4 | $1.36 \cdot 10^9$ | $77.6 \pm 2.9$ | 1/3 | 0 | $(1-\alpha)^{1/3}$              | 0.996 | $77.6 \pm 3.3$ |
|     | 2 | 14.6 | $1.37 \cdot 10^8$ | $77.2 \pm 0.4$ | 1/3 | 0 | $(1-\alpha)^{1/3}$              | 0.991 |                |
| DHA | 1 | 69.8 | $1.96 \cdot 10^6$ | $54.4 \pm 4.7$ | 4/3 | 1 | $(1-\alpha)^{1/3} \cdot \alpha$ | 0.990 | $58.0 \pm 5.5$ |
|     | 2 | 30.2 | $9.78 \cdot 10^5$ | $66.2 \pm 7.4$ | 4/5 | 1 | $(1-\alpha)^{4/5} \cdot \alpha$ | 0.993 |                |

Activitatea biologică *in vitro* a ART și ATS a fost evaluată pe două tipuri de cancer, respectiv melanomul și adenocarcinomul mamar. Rezultatele obținute au fost dependente de doză și de timp, cele mai bune valori fiind obținute după o perioadă de stimulare de 72 ore la cea mai mare concentrație testată, și anume 25  $\mu\text{M}$ . În aceste condiții, ART s-a dovedit a avea un efect considerabil de inhibiție a creșterii liniei celulare de melanom uman A375 ( $\approx 65\%$ ), afectând într-o măsură mai redusă linia celulară sănătoasă (HaCaT) ( $\approx 83\%$ ). ATS însă, în ciuda unui efect citotoxic semnificativ manifestat asupra liniei celulare patologice ( $\approx 77\%$ ), a determinat un efect toxic foarte intens asupra keratinocitelor sănătoase (48%). În ceea ce privește efectul citotoxic al ART asupra cancerului de sân, rezultatele au arătat un efect ușor mai intens asupra liniei celulare MCF7 cu receptori pentru estrogen ( $\approx 80\%$ ), decât asupra liniei celulare MDA-MB-231 (fără receptori pentru estrogen,  $\approx 89\%$ ). Efectul toxic asupra celulelor sănătoase (MCF10A) a fost relativ scăzut (inhibiția creșterii fiind de  $\approx 93\%$ ). O diferență mai evidentă între cele două linii celulare maligne testate a fost observată pentru ATS, procentul de inhibiție a creșterii fiind  $\approx 45\%$  pentru MCF7 și  $\approx 75\%$  pentru MDA-MB-231. Cu toate acestea, un efect toxic destul de important s-a manifestat pentru ATS, procentul de inhibiție a creșterii celulare ajungând la  $\approx 53\%$ .

Pentru ART și ATS a fost evaluată activitatea antioxidantă folosind testul DPPH, aceasta dovedindu-se a fi în jur de 10% și, respectiv, 13%, atunci când rezultatele au fost comparate cu cele determinate pentru acidul ascorbic. Potențialul iritant al ART a fost determinat folosind testul membranei corioalantoice (HET-CAM) a embrionului din ouă de găină, concentrația maximă testată de 100  $\mu\text{M}$  determinând un efect iritant slab și o scădere a viabilității specimenului după 24 de ore, pe când cea de 50  $\mu\text{M}$  nu a afectat nici procesul de angiogeneză, nici viabilitatea specimenului și nu a determinat un efect iritant (Fig. 2).

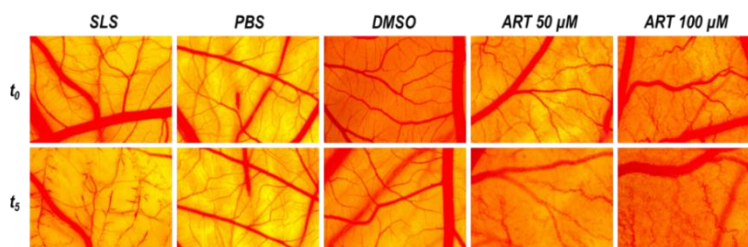


Figura 2. Potențialul iritant al ART (50  $\mu\text{M}$  și 100  $\mu\text{M}$ ) determinat utilizând metoda HET-CAM. Rezultatele sunt prezentate ca imagini prelevate microscopic înainte de aplicarea probei ( $t_0$ ) și la 5 min după aceasta ( $t_5$ ), fiind comparate cu probele control (SLS – laurilsulfat de sodiu, PBS – soluție tampon fosfat, DMSO – dimetilsulfoxid).



## CONTRIBUȚII PRIVIND PROFILUL FIZICO-CHIMIC ȘI BIOLOGIC AL COMPLECȘILOR DE INCLUZIUNE ȘI NANOLIPOZOMILOR CU DERIVAȚI SESQUITERPENLACTONICI

Având în vedere solubilitatea apoasă redusă a derivaților sesquiterpenici, studiul acestora a continuat cu scopul de a obține formulări noi. S-a dorit să se asigure astfel, o solubilitate crescută și, eventual, îmbunătățirea efectului citotoxic pe celulele maligne cu reducerea toxicității asupra celulelor sănătoase. Astfel, au fost preparate două tipuri de formulări, complecși de incluziune cu ciclodextrine și nanolipozomi.

Ca substanțe active, ART și ATS au fost selectate pentru ambele tipuri de formulări datorită solubilității lor reduse și a numeroaselor aplicații terapeutice indicate în literatura de specialitate. Complecșii de incluziune au fost preparați folosind opt ciclodextrine diferite, iar cele două serii obținute, CPX 1a-8a conținând ART și CPX 1b-8b conținând ATS au fost evaluate prin analiză termică, spectroscopie FTIR și modelare moleculară pentru a valida formarea fiecărui sistem gazdă-oaspete. Analiza FTIR și modelarea moleculară (Fig. 3) au confirmat formarea tuturor complecșilor, dar pentru testările biologice ulterioare au fost selectați cei care au prezentat cele mai favorabile caracteristici fizico-chimice (CPX 6a-8a și CPX 6b-8b).

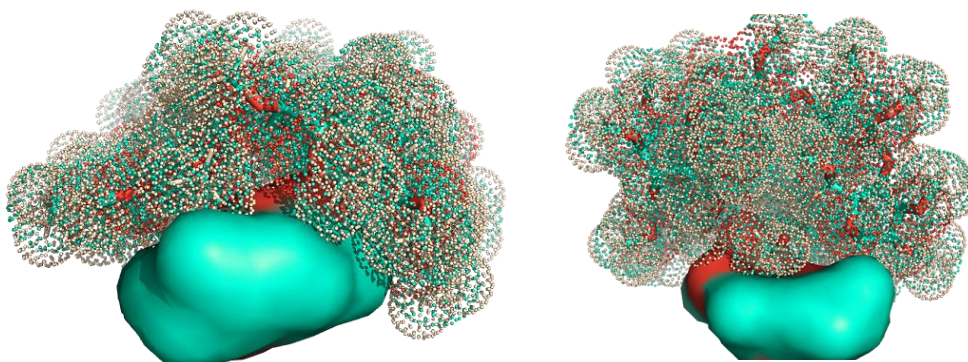


Figura 3. Reprezentarea 3D a interacțiunilor dintre ART (suprafață solidă) și heptakis(2,3,6-tri-O-metil)- $\beta$ -ciclodextrină (suprafață punctată)-(a) și, respectiv, ATS și aceeași ciclodextrină-(b)

Nanolipozomii preparați cu ART sau ATS, cu sau fără polietilenglicol, au fost supuși analizei termice. Rezultatele au confirmat formarea sistemelor dorite, aspect relevant de dispariția peak-urilor caracteristice compușilor puri de pe curbele termoanalitice. De asemenea, pierderea totală de masă determinată experimental a fost mai mică decât cea ipotetică calculată pentru un amestec în care ar avea loc doar interacțiuni fizice. O diferență semnificativă a fost evidențiată între nanolipozomii PEG-ilați și cei ne-PEG-ilați, primul tip prezentând o temperatură de debut a descompunerii mai mare și, ca atare, o stabilitate termică îmbunătățită. Deplasările benzilor spectrale FTIR caracteristice alături de scăderea intensităților peak-urilor au dovedit, de asemenea, formarea nanolipozomilor (Fig. 4).

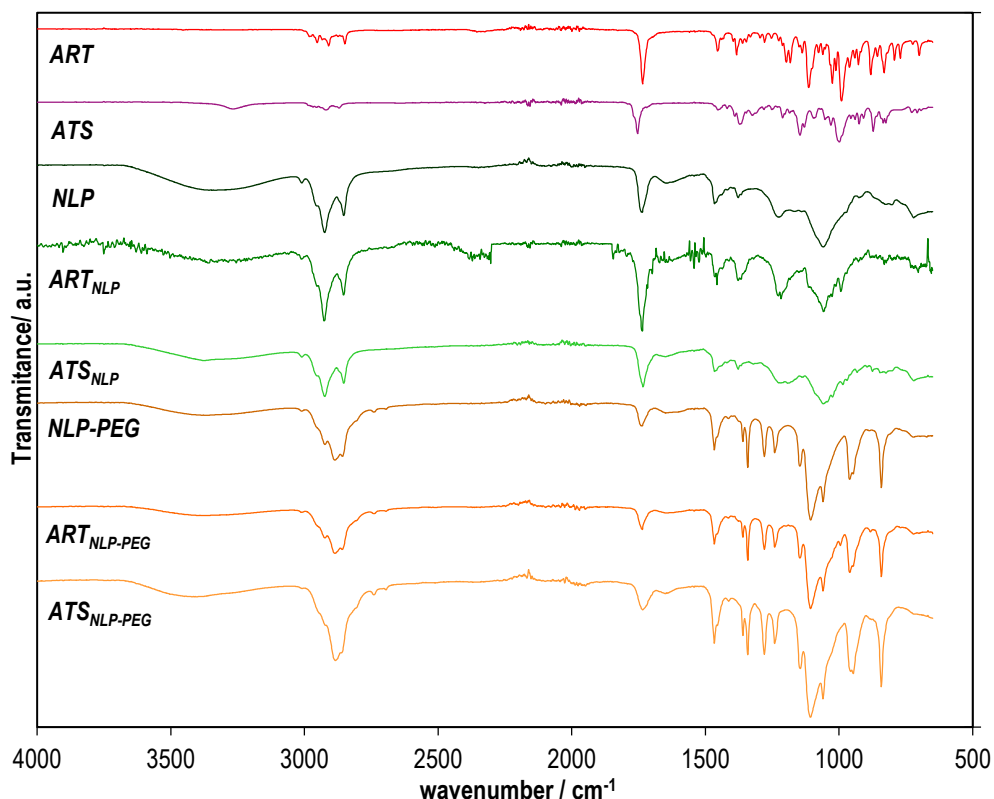


Figura 4. Spectrele ATR-FTIR obținute pentru ART, ATS, nanolipozomii fără și cu substanță activă

Măsurătorile de potențial Zeta și dimensiuni ale particulelor au arătat că imediat după preparare, nanolipozomii prezintă o stabilitate bună, fiecare tip conținând populații de dimensiuni omogene cu valori cuprinse între 136 nm și 267 nm în funcție de compoziția nanolipozomului. Stabilitatea a scăzut totuși în timp și mărimea particulelor a crescut, determinând astfel necesitatea efectuării evaluării activității biologice imediat după preparare.

Evaluările biologice *in vitro* realizate pentru complexii de incluziune care conțin ART au indicat că dintre cei trei complexi testați, cel mai bun potențial inhibitor al creșterii celulare îl are CPX 8a pe linia celulară A375 ( $\approx 66\%$ ), la cea mai mare concentrație testată, și anume 25  $\mu\text{M}$ . Efectul său toxic asupra liniei celulare HaCaT determină o inhibiție a creșterii de  $\approx 80\%$ . Rezultatele sunt similare cu cele obținute pentru ART pură, iar îmbunătățirea solubilității obținute prin complexare face din acest compus o alegere potrivită pentru teste suplimentare. Pentru liniile celulare mamare testate, complexarea nu a determinat o modificare semnificativă a toxicității asupra celulelor sănătoase (inhibiția creșterii  $> 90\%$ ), dar activitatea citotoxică pe liniile celulare patologice a variat în funcție de ciclodextrina utilizată la complexare. Cele mai bune rezultate, în care inhibarea creșterii a fost similară cu cea pentru ART, au fost

observate pentru CPX 8a pe MCF7 ( $\approx 80\%$ ) și pentru CPX 6a pe MDA-MB-231 ( $\approx 88\%$ ).

În cazul complexșilor de incluziune formați cu ATS, determinările *in vitro* realizate la cea mai mare concentrație testată au arătat că, deși complexarea a scăzut toxicitatea ATS asupra keratinocitelor sănătoase, efectul citotoxic manifestat de ATS pe linia celulară A375 a fost diminuat de prezența ciclodextrinelor. Rezultatele obținute pentru CPX 6b-8b pe cele două linii celulare de adenocarcinom mamar au arătat diferențe semnificative. În timp ce CPX 6b și 8b au determinat inhibarea creșterii liniei celulare MCF7 ( $\approx 51\%$  și respectiv  $\approx 57\%$ ), celulele MDA-MB-231 nu au fost afectate de nici unul dintre complexii testați. În toate cazurile efectul observat a fost unul de stimulare a creșterii celulare și nu de inhibiție cum este de dorit. Deși complexarea a scăzut într-o oarecare măsură activitatea citotoxică a ATS pe linia celulară MCF7, reducerea toxicității pe celulele MCF10A sănătoase a fost extrem de relevantă, de la o inhibare a creșterii de  $\approx 53\%$  pentru ATS pur la  $\approx 61\%$  pentru CPX 6b și  $\approx 71\%$  pentru CPX 8b. Aceste date sugerează că, în cazul ATS, complexarea nu a determinat doar creșterea solubilității, ci și diminuarea efectului toxic pe celulele epiteliale mamare (Fig. 5).

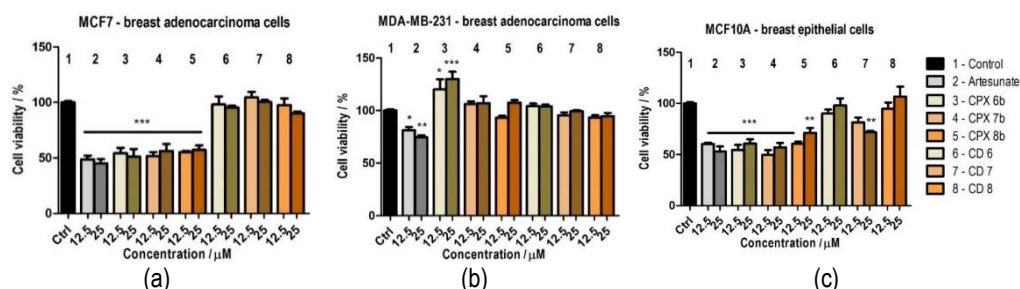


Figura 5. Evaluarea *in vitro* a citotoxicității pentru ATS, CD<sub>6-8</sub> și CPX 6b-8b pe (a) - MCF7 – linie celulară umană de adenocarcinom mamar (cu receptor de estrogen), (b) - MDA-MB-231 - linie celulară umană de adenocarcinom mamar (fără receptor de estrogen) și (c) - MCF10A – celule epiteliale mamare umane la 72 h post-stimulare (\*p < 0.05; \*\*p < 0.01; \*\*\*p < 0.001 vs. control calculate utilizând metoda One-way ANOVA urmată de post-testul Dunnett)

Evaluările *in vitro* efectuate pentru nanolipozomii preparați s-au realizat folosind metoda Alamar blue. Pentru determinarea activității biologice a noilor formulări preparate s-au utilizat liniile celulare de piele (A375 și HaCaT), alături de liniile celulare de sân (MCF7 și MCF10A). Pentru a certifica lipsa toxicității nanolipozomilor fără substanță activă, atât NLP, cât și NLP-PEG au fost testați pe liniile celulare de piele și sân, maligne și sănătoase. Nu au fost observate modificări semnificative în ceea ce privește viabilitatea celulară. Toate rezultatele obținute atunci când celulele au fost stimulate cu substanțele active, ca atare sau încorporate în nanolipozomi, au fost dependente de timp și de doză, rezultatele cele mai pertinente fiind obținute după o perioadă de stimulare de 72 ore, cu formulările care au conținut cea mai mare concentrație testată, 25  $\mu\text{M}$ .

ART<sub>NLP</sub> a scăzut viabilitatea celulelor A375 ( $\approx 87\%$ ) într-o manieră mai intensă decât pe cea a celulelor MCF7 ( $\approx 91\%$ ). Adăugarea de PEG la formulare a determinat o creștere a viabilității ambelor linii celulare maligne ( $\approx 89\%$ , respectiv  $\approx 94\%$ ). Din păcate, ambele formulări au diminuat efectul citotoxic al ART asupra liniei celulare testate. Cu toate acestea, atât ART<sub>NLP</sub>, cât și ART<sub>NLP-PEG</sub> au diminuat efectul toxic al ART asupra celulelor epiteliale mamare sănătoase.

Nanolipozomii cu ATS au determinat o scădere a viabilității celulare mai intensă decât cea observată pentru formulările corespunzătoare conținând ART. Atât ATS<sub>NLP</sub>, cât și ATS<sub>NLP-PEG</sub> au determinat scăderea viabilității celulare ( $\approx 59\%$ , respectiv  $\approx 65\%$ ) comparativ cu ATS ( $\approx 71\%$ ) pe linia celulară A375, dar au și crescut toxicitatea asupra celulelor HaCaT. Pe de altă parte, atunci când au fost utilizate pentru a stimula liniile celulare de sân, ambele formulări au mărit viabilitatea celulară a liniei celulare MCF7, reducând-o în același timp pe cea corespunzătoare liniei celulare MCF10A (Fig. 6).

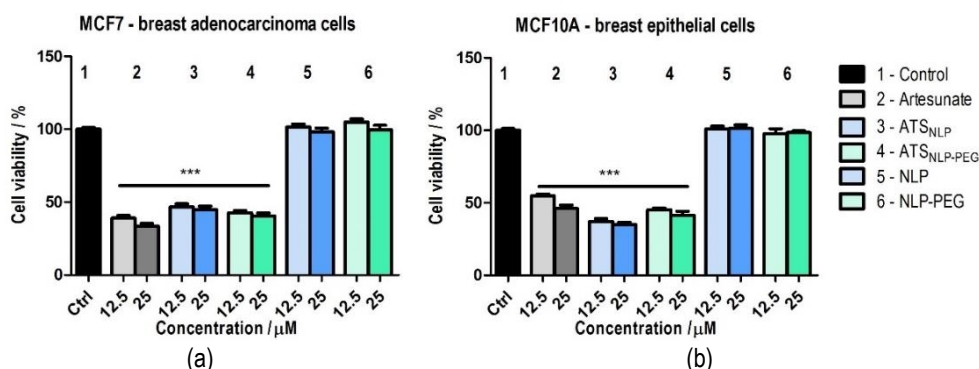


Figura 6. Evaluarea *in vitro* a citotoxicității pentru ATS, nanolipozomi fără și cu substanță activă pe (a) - MCF7 – linie celulară umană de adenocarcinom mamar (cu receptor de estrogen), (b) - MCF10A – celule epiteliale mamare umane la 72 h post-stimulare (\*p < 0.05; \*\*p < 0.01; \*\*\*p < 0.001 vs. control calculate utilizând metoda One-way ANOVA urmată de post-testul Dunnett)

Evaluarea morfologiei celulare pentru liniile celulare stimulate fie cu substanțele pure ART și ATS, fie cu nanolipozomii cu și fără PEG preparați cu acestea, au condus la câteva concluzii preliminare. În primul rând, nici unul dintre nanolipozomii fără substanță activă nu a afectat morfologia celulelor testate, rezultatul fiind cel așteptat conform datelor din literatură și având în vedere caracteristicile componentelor formulărilor. În al doilea rând, ATS, atât ca și compus pur, cât și încorporat în NLP sau NLP-PEG, a determinat modificări mai intense asupra morfologiei celulare comparativ cu ART și formulările sale ca nanolipozomi. În al treilea rând, în ciuda efectului citotoxic intens manifestat de ATS și formulările sale asupra celulelor maligne, aceștia au produs, de asemenea, modificări morfologice pe liniile celulare sănătoase. ART și formulările sale, deși mai puțin eficiente pe liniile de celule canceroase, au determinat un efect citotoxic mai redus asupra celulelor sănătoase.

În ceea ce privește evaluarea activității antioxidante pentru complexii de incluziune a căror activitate biologică a fost testată pe linii celulare, rezultatele au arătat că, în timp ce toți cei trei complexi care conțin ART (CPX6a-8a) au manifestat o activitate antioxidantă superioară celei observate pentru compusul pur (Fig. 7), doar CPX 6b a îmbunătățit AOA a ATS.

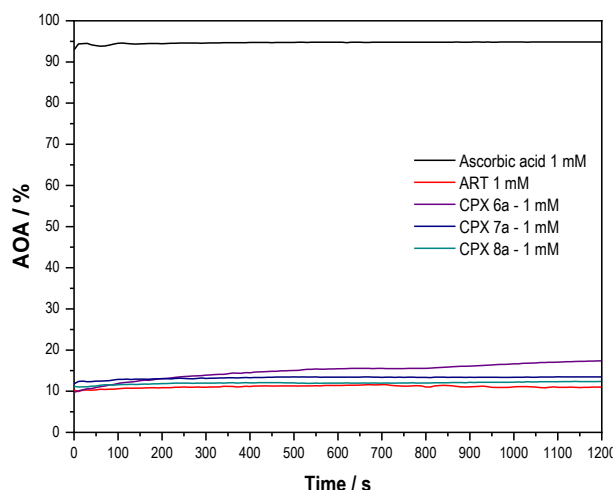


Figura 7. Evaluarea activității antioxidante folosind metoda DPPH pentru ART și CPX 6a-8a

## CONCLUZII

În cadrul prezentului studiu au fost atinse toate obiectivele științifice vizate inițial și au fost dezvoltate mai multe direcții de cercetare. O viitoare evaluare *in vivo* poate fi în măsură să ofere o imagine de ansamblu asupra efectului biologic determinat de noile formulări. De asemenea, o evaluare a complexării artemeterului și dihidroartemisininei cu diverse ciclodextrine, precum și studiul compatibilității substanțelor active cu diverși excipienți utilizați frecvent în formulările farmaceutice pot reprezenta direcții de cercetare adiționale.

În concluzie, prezenta teză aduce o serie de completări semnificative la profilurile fizico-chimice ale artemisininei, artemeterului, artesunatului și dihidroartemisininei. Alături de studiile fizico-chimice, au fost efectuate și o serie de evaluări privind citotoxicitatea biologică *in vitro* a ART și ATS. Utilizând cele două substanțe active anterior menționate, au fost preparate și evaluate două noi tipuri de formulări (complexi de incluziune gazdă-oaspete cu ciclodextrine și nanolipozomi – cu și fără polietilen glicol).

Conform rezultatelor experimentale se poate afirma că ART prezintă cea mai mare stabilitate termică și un efect citotoxic moderat dozo-dependent, manifestat în special pe liniile celulare A375 și MCF7. Compusul prezintă în același timp și un efect toxic scăzut pe liniile celulare sănătoase testate (HaCaT și MCF10A). Dintre cele două tipuri de structuri supramoleculare preparate cu ART, complexul de incluziune CPX 8a care conține ART și heptakis (2,3,6-tri-O-metil)- $\beta$ -ciclodextrină s-a demonstrat a fi un candidat promițător pentru evaluări

ulterioare. Activitatea antioxidantă a ART a fost îmbunătățită în timpul complexării, iar compusul pur nu a produs efecte iritante *in vivo* atunci când a fost testat utilizând concentrațiile folosite la evaluarea citotoxicității *in vitro*.

Studiul a evidențiat o stabilitate termică relativ ridicată și pentru ATS, acesta prezentând un efect citotoxic remarcabil pe liniile celulare testate chiar și la concentrații scăzute. Astfel, ATS s-a dovedit a fi extrem de eficient pe linia celulară MCF7 și moderat citotoxic pe linia celulară de melanom A375. Complexarea ATS cu ciclodextrinele testate a dus la obținerea unor complecși de incluziune care și-au menținut aproximativ constant efectul citotoxic asupra liniei celulare MCF7, reducând în același timp activitatea toxică asupra celulelor sănătoase MCF10A. Nanoformulările preparate cu ATS au determinat o creștere a nivelului de citotoxicitate asupra celulelor A375, dar nu au redus efectul toxic al compusului pur asupra keratinocitelor sănătoase. Rezultatele au indicat că, în comparație cu compusul sesquiterpenic „părinte” ART, proprietățile biologice ale derivatului ATS sunt superioare. Datele obținute în prezentul studiu susțin așadar evaluări suplimentare ale formulărilor supramoleculare cu ART, ATS și derivați sesquiterpenici similari în vederea dezvoltării unor potențiali agenți anticanceroși.

În concluzie, prezenta teză aduce o contribuție importantă la datele necesare în etapele de preformulare ale medicamentului, formulările supramoleculare preparate putând deschide noi căi și perspective pentru dezvoltarea unor alternative terapeutice în tratamentul clinic al bolii neoplazice.