

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE**  
**“VICTOR BABEȘ” DIN TIMISOARA**  
**FACULTATEA DE FARMACIE**  
**Departamentul II**

**MILAN G. ANDREEA-MARIA**



# **REZUMAT**

**SINTEZA ȘI EVALUAREA BIOLOGICĂ A ESTERILOR GRAȘI AI  
ACIDULUI BETULINIC ȘI A FORMULĂRILOR LIPOZOMALE AI  
ACESTORA**

**Conducător de doctorat:**  
**PROF. UNIV. DR. ȘOICA CODRUȚA**

**Timișoara**  
**2024**

## CUPRINS

1. INTRODUCERE .....	3
2. OBIECTIVELE LUCRĂRII .....	5
3. REZULTATE .....	6
3.1. SINTEZA, EVALUAREA FIZICO-CHIMICĂ ȘI IN SILICO A ESTERILOR GRAȘI AI ACIDULUI BETULINIC ȘI FORMULĂRILOR LIPOZOMALE AI ACESTORA .....	6
3.2. EVALUAREA BIOLOGICĂ ANTI-MELANOM A ESTERILOR GRAȘI AI ACIDULUI BETULINIC ȘI FORMULĂRILOR LIPOZOMALE AI ACESTORA.....	8
3.3. EVALUAREA BIOLOGICĂ A ESTERILOR GRAȘI A ACIDULUI BETULINIC ȘI A FORMULĂRILOR LIPOZOMALE AI ACESTORA ÎMPOTRIVA CANCERULUI DE SÂN, COLON ȘI PLĂMÂN .....	10
4. CONCLUZII .....	11

## 1. INTRODUCERE

De-a lungul istoriei, numeroși compuși naturali au fost utilizați ca tratament pentru diverse boli, inclusiv boli infecțioase și diferite tipuri de cancer. Datorită versatilității chimice a acestora, derivații de origine naturală oferă numeroase avantaje comparativ cu analogii lor sintetici. Cancerul, în toate tipurile și manifestările, reprezintă una dintre cele mai frecvente cauze de mortalitate din toată lumea. În ciuda existenței numeroaselor tipuri de medicamente antineoplazice pe piață, mulți cercetători au dorit să descopere noi compuși anticanceroși de origine naturală ce pot fi utilizați în terapie, fără să cauzeze efecte adverse greu de tolerat de către pacient.

Triterpenele pentaciclice sunt metaboliți secundari, des întâlniți în natură și pot fi clasificați în funcție de structura lor de bază în derivați de tip lupan, oleanan și ursan (Figura 1).

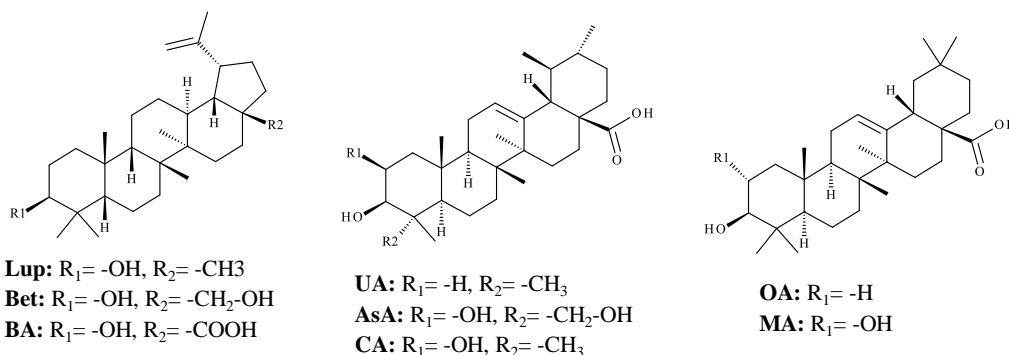


Figura 1. Clasificarea triterpenelor pentaciclice în funcție de scheletul de bază : Lup (lupeol), Bet (betulină), BA (acid betulinic), UA (acid ursolic), AsA (acid asiatic), CA (acid corosolic), OA (acid oleanolic), MA (acid măslinic).

Acidul betulinic ( $3\beta$ , acid hidroxi-lup-20(29)-en-28-oic) (BA) este o triterpenă pentaciclică de tip lupan, distribuită pe scară largă în multe specii de plante, găsindu-se mai ales în scoarța de mesteacăn. Din punct de vedere farmacologic, acidul betulinic exercită o multitudine de efecte biologice, fiind un puternic agent anticancerigen, antiviral, antifungic, cardioprotector, renoprotector și neuroprotector.

În ciuda potențialului său farmacologic extraordinar, efectele sale sunt împiedicate de biodisponibilitatea sa scăzută. Au fost implementate numeroase strategii pentru a rezolva problema biodisponibilității, strategiile principale fiind: derivatizările chimice, complexarea cu ciclodextrine și incluziunea în diferite tipuri de nanoformulări. Printre numeroasele tipuri de derivatizări chimice, esterificarea cu acizi grași a devenit o abordare interesantă pentru dezvoltarea compușilor cu proprietăți farmacologice mult îmbunătățite. Chiar dacă acizii grași s-au dovedit a fi agenți antivirali, antifungici și anticanceroși puternici, structurile lor extrem de lipofile le scad efectele biologice. Prin urmare, pentru a rezolva acest dezavantaj, se poate folosi strategia de includere a acestor derivați în formulări lipozomale.

Lipozomii (Figura 2) au fost dezvoltați pe scară largă în ultimele decenii datorită numeroaselor avantaje, cum ar fi proprietatea lor de a încorpora cantități mici de compuși activi, capacitatea de a încorpora numeroși compuși foarte lipofili și de a le livra substanțele active la ținta dorită. Cu toate acestea, principalul dezavantaj al utilizării lipozomilor convenționali constă în interacțiunile acestora cu sistemul fagocitar mononuclear, ce duc la eliminarea compusului activ în plasmă.

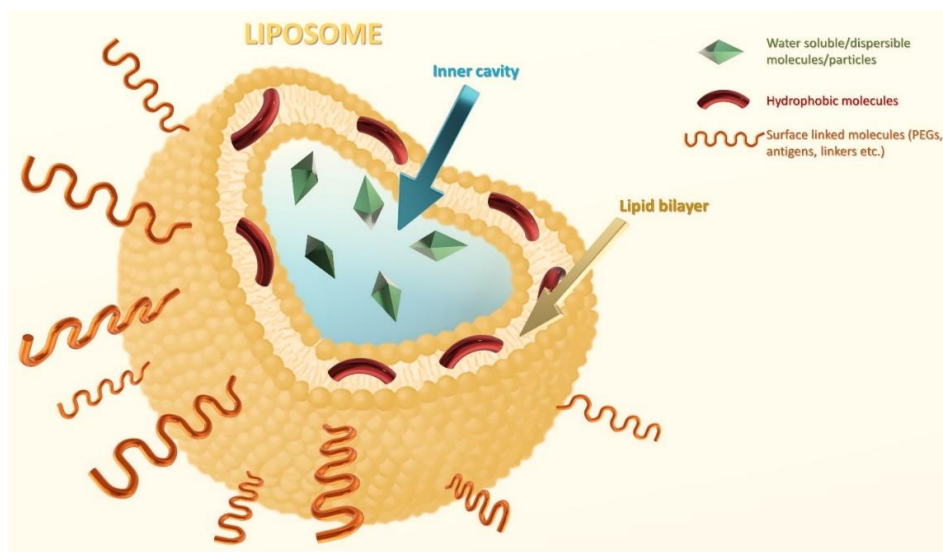


Figura 2. Reprezentarea schematică a unui lipozom

Acest dezavantaj poate fi eliminat prin modificarea suprafețelor lipozomilor convenționali, adăugând polimeri naturali, cum ar fi polietilenglicolul (PEG). Astfel de modificări ale suprafeței conduc la o stabilitate mult îmbunătățită și îi ajută să evite sistemul fagocitar mononuclear, fără a induce niciun răspuns inflamator.

## 2. OBIECTIVELE LUCRĂRII

Scopul acestei teze a constat în sinteza și evaluarea fizico-chimică a esterilor grași ai acidului betulinic și a lipozomilor acestora cu suprafață modificată, precum și evaluarea lor *in silico*, *in ovo* și *in vitro* împotriva melanomului, adenocarcinomului mamar, adenocarcinomului de colon și cancerului de plămân.

Prima parte a tezei oferă informații din literatura de specialitate recentă despre triterpenele pentaciclice, profilul farmacocinetic și farmacodinamic al acidului betulinic și diferitele tipuri de formulări lipozomale.

Contribuția personală a constat în sinteza esterilor grași ai acidului betulinic obținuți prin reacția cu acidul butiric, stearic și palmitic și încorporarea acestora în lipozomi cu suprafață modificată. Identitatea esterilor grași noi sintetizați a fost determinată utilizând analiza FTIR și RMN. Ulterior, esterii grași au fost încorporați în lipozomi cu suprafață modificată cu PEG, lipozomii fiind caracterizați fizico-chimic din punct de vedere al stabilității, mărimii și eficacității încorporării compusului activ. De asemenea, a fost efectuat un studiu *in silico* pentru a determina afinitatea teoretică de legare a esterilor grași de proteinele anti-apoptotice Bcl-2, Bcl-XL și NF-κB pentru a specula posibile rezultate ce vor fi obținute în analizele *in vitro*.

Următorul pas a fost evaluarea *in vitro* a esterilor grași ai acidului betulinic și a formulărilor lor lipozomale asupra keratinocitelor umane HaCaT, celulelor de melanom uman A375, celulelor de adenocarcinom de sân MCF-7, celulelor de adenocarcinom de colon HT-29 și celulelor canceroase pulmonare NCI-H460. A fost evaluat potențialul anticanceros al fiecărui ester gras în comparație cu compusul părinte. De asemenea, am propus un mecanism molecular responsabil pentru efectele lor citotoxice prin determinarea expresiei relative a genelor pro-apoptotice și anti-apoptotice și efectului lor modulator asupra activității caspazei.

În cele din urmă, a fost efectuat un test *in ovo* pentru a evalua potențialul iritativ al esterilor grași și al lipozomilor acestora, față de compusul părinte, pentru a determina dacă acești derivați ar fi potriviți pentru aplicările locale și pe mucoase.

### 3. REZULTATE

#### 3.1. SINTEZA, EVALUAREA FIZICO-CHIMICĂ ȘI *IN SILICO* A ESTERILOR GRAȘI AI ACIDULUI BETULINIC ȘI FORMULĂRILOR LIPOZOMALE AI ACESTORA

Toți cei trei esteri ai acidului betulinic au fost obținuți cu randamente mari (>65%), condițiile de reacție pentru obținerea esterilor grași fiind prezentate în figura 3.

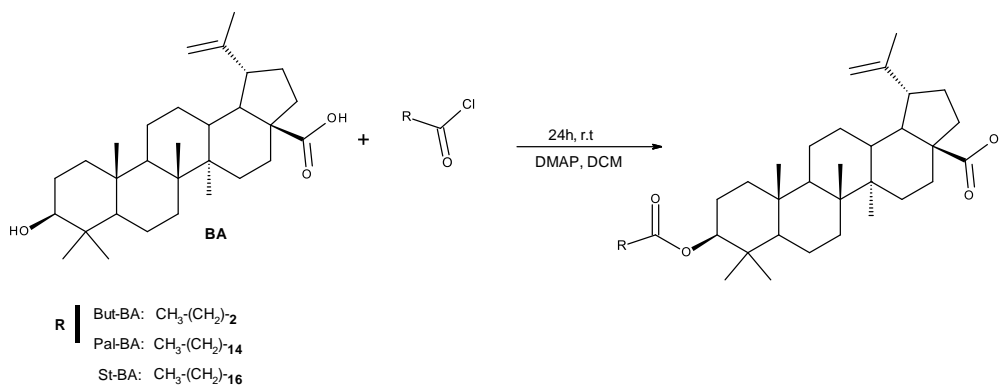


Figura 3. Schema de sinteză a esterilor grași ai acidului betulinic; BA: acid betulinic, But-BA: 3-O-butil-acid betulinic, Pal-BA: 3-O-palmitoil-acid betulinic, St-BA: 3-O-stearoil-acid betulinic, DCM: diclormetan, DMAP: 4-dimetilaminopiridină

Identitatea celor trei esteri formați a fost validată prin spectroscopie FTIR (Figura 4) și, ulterior confirmată prin utilizarea analizei RMN.

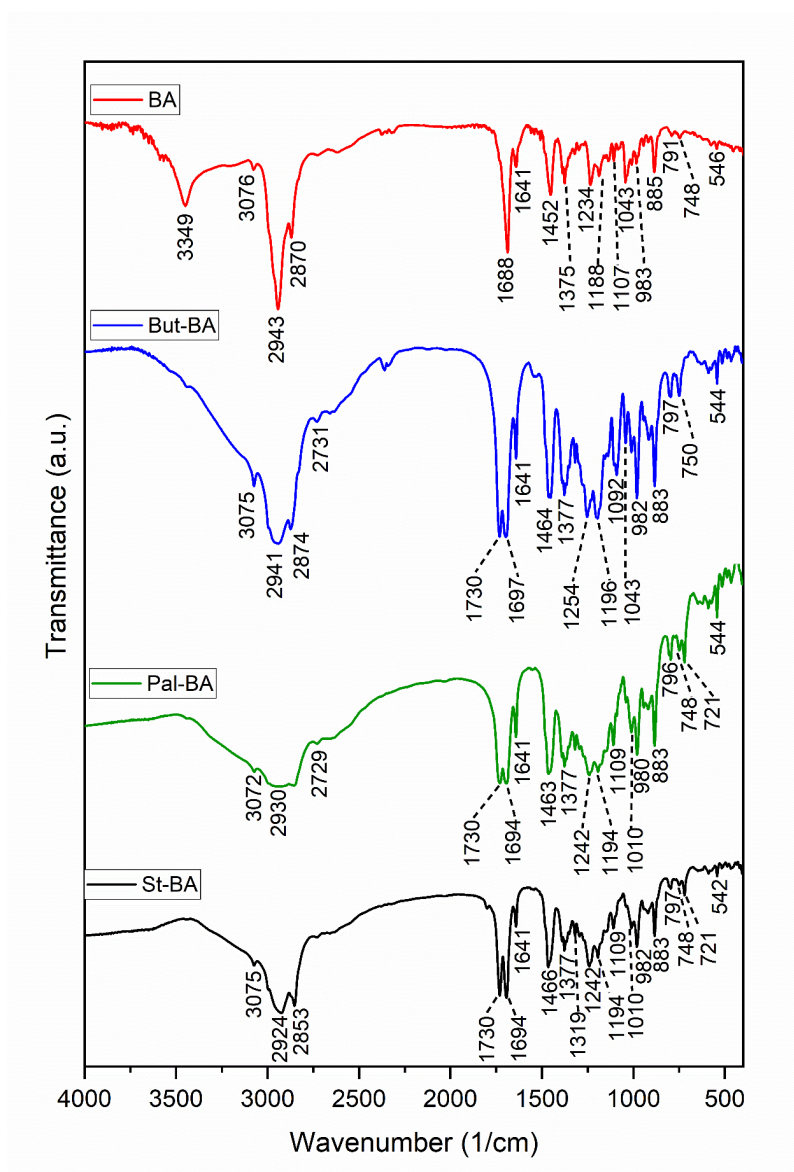


Figura 4. Spectrele FTIR ale BA, But-BA, Pal-BA și St-BA

Pentru obținerea lipozomilor goi și lipozomilor ce conțin esterii grași ai acidului betulinic am utilizat tehnica de hidratare a filmului lipidic. La analizarea lipozomilor obținuți s-au folosit microscopia electronică cu transmisie (TEM), microscopia electronică cu scanare (SEM) și dispersia dinamică a luminii (DLS). Analizele SEM și TEM au demonstrat că lipozomii sunt stabili și se prezintă sub formă sferică. Măsurătorile DLS au fost efectuate zilnic timp de o săptămână, demonstrând că nu au avut loc modificări semnificative ale valorilor indicelui de dispersie și ale mărimii hidrodinamice, formulările dovedindu-se stabile în perioada testată.

Datorită faptului că anumite modificări chimice conduc la o afinitate crescută pentru țintele proteice anti-apoptotice, am efectuat un studiu de andocare moleculară bidirecțională folosind două funcții distincte (Vina și Glide) pentru a determina efectul modulator al esterilor

grași ai BA asupra proteinelor anti-apoptotice Bcl-2, Bcl-XL și NF-κB. Scorurile obținute sunt prezentate în Tabelul 1, dezvăluind că atât pentru proteinele anti-apoptotice, cât și pentru scorurile de andocare, cele mai promițătoare rezultate au fost generate pentru acizii grași cu catenă laterală lungă, în acest caz Pal-BA, în comparație cu compusul părinte, BA, sau But-BA.

Tabelul 1. Scorurile de docare ale BA, But-BA, Pal-BA și St-BA asupra Bcl-2 și Bcl-XL folosind programele de andocare Vina și Glide

Ligand	Bcl-2 (PDB ID: 4LVT)		Bcl-XL (PDB ID: 2YXJ)		NF-κB (PDB ID: 1NFK)	
	Scor de andocare Vina	Scor de andocare Glide	Scor de andocare Vina	Scor de andocare Glide	Scor de andocare Vina	Scor de andocare Glide
<b>BA</b>	-7,7	-4,3	-8,5	-4,9	-8	-3.3
<b>But-BA</b>	-7,8	-3,8	-8,4	-3,9	-7.6	-4.1
<b>Pal-BA</b>	-8,5	-6,4	-9,1	-6,5	-6	-5.1
<b>St-BA</b>	-7,6	-6,1	-8,7	-6,7	-5.1	-4.7

### 3.2. EVALUAREA BIOLOGICĂ ANTI-MELANOM A ESTERILOR GRAȘI AI ACIDULUI BETULINIC ȘI FORMULĂRILOR LIPOZOMALE AI ACESTORA

Cel de-al doilea studiu s-a concentrat pe evaluarea biologică *in vitro* a esterilor grași ai BA nou obținuți și a formulărilor lor lipozomale, studiu ce a fost efectuat pe keratinocite umane HaCaT și celule de melanom uman A375. Testele biologice efectuate au evaluat efectele compușilor sintetizați asupra viabilității și morfologiei celulare, potențialul lor anti-migrator, precum și efectul lor asupra expresiei genice ale proteinei anti-apoptotice Bcl-2 și a proteinei pro-apoptotice BAX. Rezultatele viabilității celulare au indicat proprietăți citotoxice selective asupra celulelor de melanom. Atât esterii grași, cât și formulările lor lipozomale au fost capabile să inhibe proliferarea celulelor A375 într-o manieră dependentă de timp și doză, fără a afecta viabilitatea celulelor HaCaT, într-o manieră semnificativă (Tabelul 2).

Tabelul 2. Valorile IC<sub>50</sub> (μM) calculate la 48h după tratarea celulelor HaCaT și A375 cu 5-FU, BA, BA-Lip, Pal-BA, Pal-BA-Lip, St-BA, St-BA-Lip, But-BA și But-BA-Lip

Compuși	HaCaT	A375
5-FU	40.14 ± 1.2	22.61 ± 0.82
BA	>100	65.9 ± 1.07
BA-Lip	>100	59.01 ± 0.45
Pal-BA	>100	85.58 ± 1.32
Pal-BA-Lip	>100	67.59 ± 0.33

St-BA	>100	75.75 ± 0.75
St-BA-Lip	>100	60.11 ± 1.56
But-BA	>100	60.77 ± 0.29
But-BA-Lip	>100	50.71 ± 0.67

S-a observat că toți lipozomii au exercitat efecte citotoxice mai potente comparativ cu esterii grași neîncorporați, But-BA-Lip demonstrând cele mai puternice efecte citotoxice împotriva celulelor de melanom A375.

Mai mult, efectele pro-apoptotice ale compușilor noi sintetizați au fost dezvăluite prin colorarea cu reactivul Hoechst și colorarea cu beta-actină. Au fost observate semne distinctive apoptotice, cum ar fi condensarea nucleară și fragmentările nucleare atât după tratarea celulelor de melanom A375 cu esterii grași ai BA, cât și cu lipozomii acestora. De asemenea, nu au fost remarcate semne specifice apoptozei după tratarea celulelor necanceroase HaCaT cu compușii testați. Aceste rezultate pot fi coroborate cu testul anti-migrator Scratch, ce a dovedit că esterii grași și lipozomii acestora au inhibat migrarea celulelor canceroase, neafectând în mod semnificativ migrarea keratinocitelor. Efectul pro-apoptotic al acestor derivați a fost confirmat prin evaluarea expresiilor genice ale proteinelor BAX și Bcl-2 (Figura 5). Rezultatele au arătat că toți compușii au stimulat expresia genei pro-apoptotice BAX și au inhibat expresia genei anti-apoptotice Bcl-2.

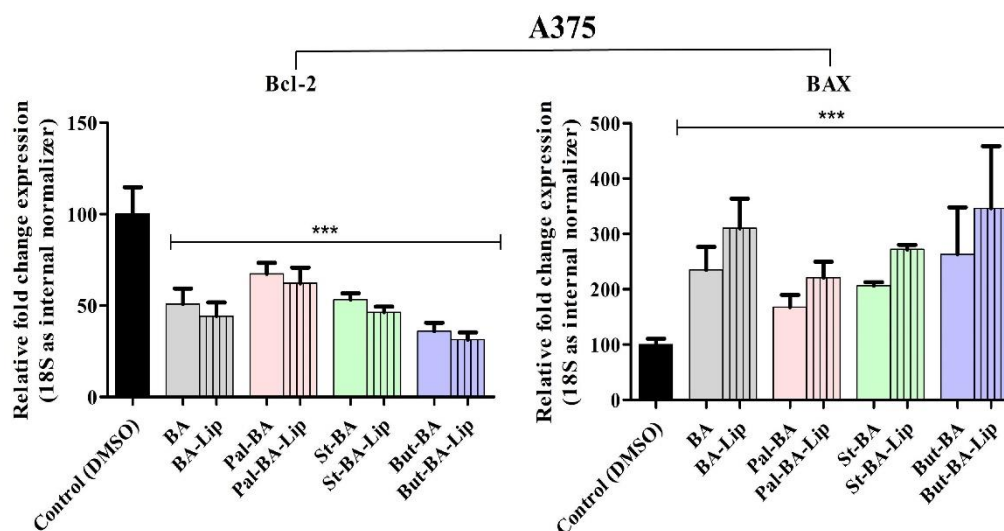


Figura 5. Schimbarea relativă a expresiei pliului ARNm Bcl-2 și BAX la celulele A375 după tratamentul cu BA, BA-Lip, Pal-BA, St-BA, But-BA, Pal-BA-Lip, St-BA-Lip și But-BA-Lip (10  $\mu$ M). Expresiile au fost normalizate la 18S și controlul a fost DMSO. Datele reprezintă valori medii și abateri standard ale a trei experimente independente. \*\*\*  $p < 0,001$ , reprezintă diferențe semnificative statistic față de celulele stimulate cu DMSO.

### 3.3. EVALUAREA BIOLOGICĂ A ESTERILOR GRAȘI A ACIDULUI BETULINIC ȘI A FORMULĂRILOR LIPOZOMALE AI ACESTORA ÎMPOTRIVA CANCERULUI DE SÂN, COLON ȘI PLĂMÂN

Luând în considerare rezultatele promițătoare asupra celulelor de melanom obținute după tratarea celulelor cu esterii grași ai BA și cu formulările lor lipozomale, al treilea studiu s-a concentrat pe explorarea potențialului lor anticanceros împotriva adenocarcinomului de sân uman MCF-7, adenocarcinomului colorectal uman HT-29 și adenocarcinomului pulmonar NCI-H460. Testele biologice efectuate în acest studiu s-au concentrat pe efectele compușilor asupra viabilității celulare, morfologiei celulelor, efectul lor asupra activării caspazei-3/-7 și, de asemenea, potențialul lor iritant asupra membranei corioalantoide. Evaluarea viabilității a arătat că asupra tuturor celulelor canceroase testate, atât esterii grași, cât și lipozomii lor au exercitat efecte citotoxice într-o manieră dependentă de timp și de doză. Mai mult, s-a observat că lipozomii au dovedit efecte anticanceroase mai potente comparativ cu esterii grași neîncorporați (Tabelul 3).

Tabelul 3. Valorile  $IC_{50}$  ( $\mu M$ ) calculate la 48h după tratarea celulelor MCF-7, HT-29 și NCI-H460 cu 5-FU, BA, BA-Lip, Pal-BA, Pal-BA-Lip, St-BA, St-BA-Lip, But-BA și But-BA-Lip

Compuși	MCF-7	HT-29	NCI-H460
<b>5-FU</b>	30.79 $\pm$ 0.34	82.53 $\pm$ 0.77	62.89 $\pm$ 0.28
<b>BA</b>	54.97 $\pm$ 0.87	91.16 $\pm$ 0.93	39.48 $\pm$ 0.74
<b>BA-Lip</b>	54.89 $\pm$ 0.26	59.04 $\pm$ 1.44	35.42 $\pm$ 0.91
<b>Pal-BA</b>	>100	>100	52.37 $\pm$ 0.35
<b>Pal-BA-Lip</b>	>100	70.06 $\pm$ 0.54	41.72 $\pm$ 0.94
<b>St-BA</b>	>100	>100	61.17 $\pm$ 1.48
<b>St-BA-Lip</b>	>100	>100	43.35 $\pm$ 1.06
<b>But-BA</b>	63.17 $\pm$ 0.28	77.72 $\pm$ 0.63	50.26 $\pm$ 0.53
<b>But-BA-Lip</b>	48.88 $\pm$ 1.32	30.57 $\pm$ 1.02	30.74 $\pm$ 1.16

Evaluarea morfologică a celulelor tratate cu esterii grași ai BA și lipozomilor acestora a evidențiat semne distinctive apoptotice specifice după colorarea cu F-actină și reactivul Hoechst. Citoscheletele au apărut dezorganizate, în timp ce nucleeele au suferit modificări specifice apoptotozei, cum ar fi fragmentările și condensarea cromatinei. Reactivul de detecție CellEvent pentru caspaza-3/-7 a fost utilizat pentru a determina dacă tratarea celulelor canceroase cu derivații acidului betulinic a reușit să moduleze activitatea caspazei; rezultatele au arătat că toți compușii au activat caspaza, prezentându-se ca puncte verzi ce se suprapuneau peste celulele apoptotice evidențiate prin colorarea cu reactivul Hoechst.

De asemenea, potențialul iritant al esterilor grași ai BA și al lipozomilor lor a fost testat folosind testul HET-CAM (Figura 6). Rezultatele au indicat că atât esterii grași ai BA, cât și lipozomii pot fi considerați biocompatibili pentru aplicări locale și pe mucoase. Nu a fost înregistrat niciun semn de toxicitate asupra membranei corioalantoice, mai precis nu s-a observat liza vasculară, hemoragii sau semne de coagulare.

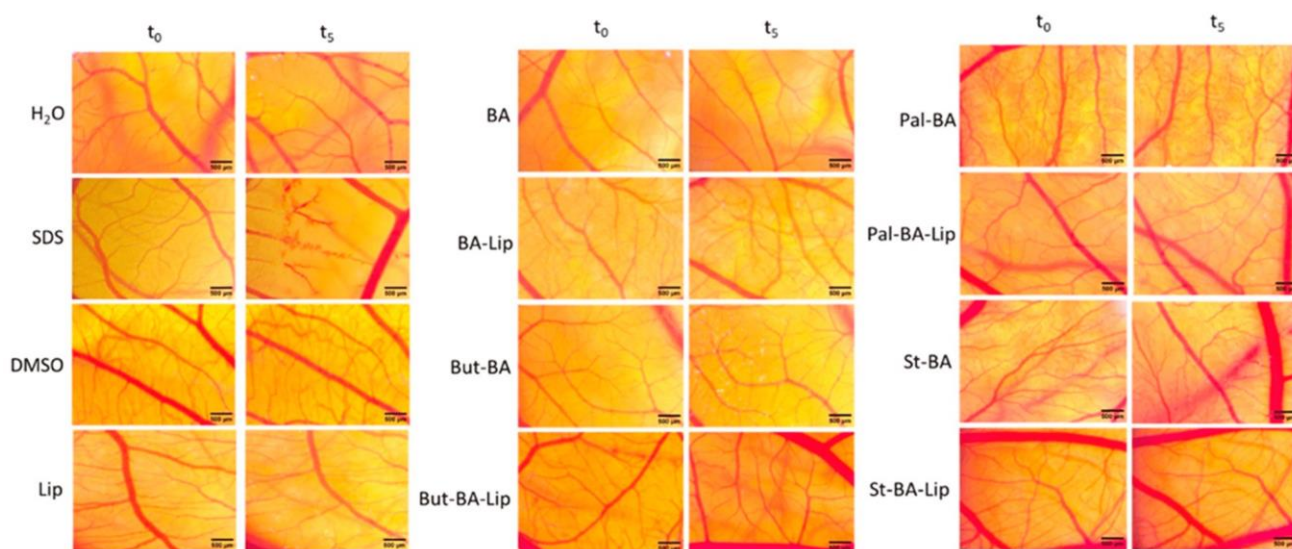


Figura 6. Testul de iritare bazat pe tehnica HET-CAM. Imaginile membranei corioalantoice au fost efectuate înainte de stimulare (T0), 300s (T5) după stimularea cu 600  $\mu$ L BA, BA-Lip, But-BA, But-BA-Lip, Pal-BA, Pal-BA-Lip, St-BA, St-BA-Lip (100  $\mu$ M), apă distilată ca și control negativ și dodecilsulfat de sodiu (SDS) 0,5% ca și control pozitiv. Scala a fost setată la 500  $\mu$ m.

#### 4. CONCLUZII

Putem concluziona că esterificarea acidului betulinic cu acidul butiric, stearic și palmitic reprezintă o abordare promițătoare în descoperirea derivaților BA ce prezintă efecte anticancerigene îmbunătățite, putând fi utilizați și *in vivo* datorită absenței efectelor toxice asupra keratinocitelor și asupra membranei corioalantoice. De asemenea, potențialul pro-apoptotic al acestor derivați poate fi îmbunătățit prin încorporarea lor în lipozomii cu suprafață modificată cu PEG.

Aceste rezultate contribuie la îmbunătățirea literaturii de specialitate deficitară în ceea ce privește derivatizările acidului betulinic cu acizi grași și, de asemenea, ajută la elucidarea mecanismelor moleculare responsabile de efectele lor pro-apoptice împotriva celulelor canceroase. Aceste studii pot reprezenta o punte de lansare pentru dezvoltarea derivaților BA cu efecte anticanceroase potente, ce ar putea fi utilizați în studii clinice ulterioare.