

UNIVERSITATEA "ALEXANDRU IOAN CUZA" DIN IAȘI
FACULTATEA DE CHIMIE
ȘCOALA DOCTORALĂ DE CHIMIE

**DERIVAȚI AZA-HETEROCICLICI CU
POTENȚIALĂ ACTIVITATE BIOLOGICĂ ȘI
SISTEME DE ELIBERARE CONTROLATĂ A
ACESTORA**

Rezumatul tezei de doctorat

Conducător științific:

Prof. Dr. Ionel I. Mangalagiu

Doctorand:

Anda Mihaela Olaru

Mulțumiri

La final de activitate în calitate de student-doctorand, doresc să aduc mulțumiri acelor persoane care m-au susținut, ajutat și îndrumat în elaborarea și finalizarea tezei de doctorat.

*Mulțumiri sincere și sentimente de considerație domnului **prof. dr. Ionel I. Mangalagiu** care, în calitate de conducător științific, m-a îndrumat și susținut pe toată perioada studiilor doctorale pentru obținerea rezultatelor științifice și elaborarea prezentei teze.*

*De asemenea, aș dori să adresez mulțumiri speciale doamnelor **conf. dr. Ramona Dănac** și **CS II dr. Luminița Marin** pentru încrederea acordată încă de la începutul formării mele ca cercetător, pentru sprijinul moral și științific, cât și pentru ajutorul acordat pe toată durata elaborării tezei de doctorat. De asemenea, le voi fi mereu recunoscătoare pentru încurajarea permanentă pe partea științifică, precum și pe plan personal.*

*Adresez mulțumiri cordiale doamnei **CS I dr. Mariana Pinteală** pentru suportul moral acordat, precum și pentru posibilitatea oferită de a lucra într-un mediu în care am putut învăța și utiliza noi tehnici experimentale ce m-au ajutat să închei partea de cercetare științifică din cadrul stagiului doctoral.*

*Deosebite mulțumiri colegilor mei din colectivele de **Chimie Organică** de la Universitatea "Alexandru Ioan Cuza", **Policondensare** și **IntelCentru** de la Institutul de Chimie Macromoleculară "Petru Poni", precum și colegilor din alte departamente ale acestor instituții care m-au ajutat în mod direct sau indirect la finalizarea acestei teze.*

*Mulțumiri speciale colegilor mei de laborator: **Monica, Daniela, Cristina, Lăcrămioara, Manuela, Elena** și **Andrei** pentru sprijinul acordat necondiționat, pentru suportul moral și științific, dar și pentru amintirile frumoase care au făcut ca acest drum să fie mai ușor de parcurs.*

*Cu deosebită recunoștință și dragoste, vreau să le mulțumesc în mod special **soțului, părinților** și **surorilor** care au fost alături de mine și cu multă răbdare și afecțiune m-au încurajat și m-au sprijinit din toate punctele de vedere în această perioadă.*

Vă mulțumesc!

Drd. Anda-Mihaela Olaru

Cuprins

CAPITOL I. COMPUȘI MIC MOLECULARI ȘI STRUCTURI SUPRAMOLECULARE CU POTENȚIALE APLICAȚII ÎN DOMENIUL BIOMEDICAL	1
I.1. Compuși mic moleculari cu activitate biologică	1
I.1.1. Terapia cancerului	4
I.1.2. Terapia antituberculoasă (anti TB)	32
I.2. Structuri supramoleculare cu aplicații biologice	37
I.2.1. Generalități	37
I.2.2. Chitosanul – biopolimer utilizat în obținerea de hidrogeluri	38
PARTE PERSONALĂ - Obiective	44
CAPITOL II. COMPUȘI MIC MOLECULARI CU POTENȚIALĂ ACTIVITATE ANTICANCEROASĂ SAU ANTITUBERCULOASĂ	46
II.1. Sinteza și proprietățile unor noi derivați de 1,10-fenantrolină-2,9-disubstituită	46
II.1.1. Sinteza unor noi derivați de 1,10-fenantrolină-2,9-disubstituită	47
II.1.2. Activitatea biologică a derivaților de 1,10-fenantrolină sintetizați	58
II.1.3. Docking molecular pentru compușii 5d , 5d , 6b , 6d și 8e	60
II.1.4. Studii preliminare de determinare a interacțiunii derivaților de 1,10-fenantrolină cu ADN-ul telomeric (G4) și ADN-ul dublu catenar	62
II.2. Sinteza și proprietățile unor noi derivați de izochinolină și ftalazină	67
II.2.1. Sinteza unor noi derivați de izochinolină și ftalazină	67
II.2.2. Activitatea biologică a derivaților de izochinolină și ftalazină	73
II.2.3. Studii preliminare de fluorescență pentru compușii de tipul 10	73
II.3. Sinteza și proprietățile unor noi săruri monocuaternare de 4-(indolizin-7-il)-piridin-1-iu	76
II.3.1. Sinteza compușilor 14a-m	76
II.3.2. Activitatea antituberculoasă a compușilor 14a-m împotriva <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	78

II.3.3. Sinteza compușilor 18a-j	88
II.3.4. Activitatea biologică a compușilor 18a-j	93
CAPITOL III. STRUCTURI SUPRAMOLECULARE CU POTENȚIALE APLICAȚII ÎN TERAPIA CANCERULUI. HIDROGELURI PE BAZĂ DE CHITOSAN ȘI 5-NITROSALICILALDEHIDĂ	97
III.1. Sinteza și caracterizarea hidrogelurilor pe bază de chitosan și 5-nitrosalicilaldehidă	97
III.1.1. Caracterizare structurală	98
III.1.2. Arhitecturarea supramoleculară (XRD și POM) și morfologia (SEM)	101
III.1.3. Capacitatea de umflare a hidrogelurilor	104
III.1.4. Studii reologice	106
III.1.5. Teste de citotoxicitate <i>in vitro</i> pe celule tumorale HeLa	110
III.1.6. Teste de biocompatibilitate <i>in vivo</i>	112
III.2. Sinteza hidrogelurilor pe bază de chitosan, nitrosalicilaldehidă și diclofenac sodic. Caracterizarea și determinarea capacității de eliberare a medicamentului model în mediu ușor bazic	115
III.2.1. Caracterizare structurală	115
III.2.2. Arhitecturarea supramoleculară (XRD și POM) și morfologia (SEM)	117
III.2.3. Eliberarea <i>in vitro</i> a medicamentului model (DCF)	119
III.2.4. Cinetica de eliberare	120
III.2.5. Degradarea enzimatică <i>in vitro</i>	122
III.2.6. Biocompatibilitatea <i>in vivo</i>	124
III.2.7. Eliberarea medicamentului <i>in vivo</i>	126
III.3. Testarea preliminară a capacității hidrogelurilor pe bază de nitrosalicilaldehida și chitosan de a încapsula un compus mic molecular cu activitate anticanceroasă (6b) și de a-l elibera controlat în mediu acid (pH=2)	128
III.3.1. Caracterizare structurală	129
III.3.2. Arhitecturarea supramoleculară (XRD și POM) și morfologia	130

(SEM)

III.3.3. Eliberarea <i>in vitro</i> a medicamentului 6b	132
CAPITOL IV. PARTEA EXPERIMENTALĂ	133
VI.1. Materiale și echipamente	133
IV.2. Procedee generale de obținere	136
IV.2.1. Procedura generală de obținere a derivaților de 1,10-fenantrolină-2,9-disubstituită prin legătură amidică (5a-f și 6a-e)	136
IV.2.2. Procedura generală de obținere a derivaților de 1,10-fenantrolină-2,9-disubstituită cu substituenți conținând ciclul 1,2,3-triazolic-1,4-disubstituit (8a-f)	140
IV.2.3. Procedura de obținere a derivaților de izochinolină și ftalazină (10a-l)	142
IV.2.4. Procedura generală de obținere a sărurilor monocuaternare de 4-(indolizin-7-il)-piridin-1-iu (11a-e și 15a-d)	146
IV.2.5. Procedura generală de obținere a sarurilor monoindolizinelor (13a-e și 17a-d)	146
IV.2.6. Procedura generală de obținere a sărurilor de 4-(indolizin-7-il)-piridin-1-iu (14a-m și 18a-j)	147
IV.2.7. Procedura generală de obținere a compusului model pe bază de glucozamină și nitrosalicilaldehidă (MC)	153
IV.2.8. Procedura generală de obținere a hidrogelurilor A2-A10	154
IV.2.9. Protocolul de obținere a sistemelor de eliberare A2D-A5D și a referințelor A2-A5	154
IV.2.10. Protocolul de obținere a sistemelor de eliberare A2F-A5F	155
IV.3. Protocele de determinare a activităților biologice	156
IV.3.1. Protocol general de testare a activității anticanceroase pe 60 de linii celulare tumorale a unor compuși mic moleculari (protocol NCI)	156
IV.3.2. Protocol general de testare a activității antituberculoase a unor compuși mic moleculari (programul de screening TAACFTB)	157
IV.3.3. Protocol general de testare a citotoxicității <i>in vitro</i> pe celule	166

tumorale HeLa a hidrogelurilor pe bază de chitosan și nitrosalicilaldehidă	
IV.4. Protocoale de determinare a biocompatibilității <i>in vivo</i>	168
IV.4.1. Protocol general de testare a biocompatibilității <i>in vivo</i> pe șobolani a hidrogelurilor pe bază de chitosan și nitrosalicilaldehidă (A2-A4)	168
IV.4.2. Protocol general de determinare a biocompatibilității sistemelor cu medicament și eliberarea medicamentului <i>in vivo</i> pe șobolani (A2F și A3F)	169
IV.5. Protocoale de determinare a degradării enzimaticе și a eliberării <i>in vitro</i>	172
IV.5.1. Protocol de eliberare <i>in vitro</i> pentru sistemele pe bază de chitosan și nitrosalicilaldehidă cu medicament (A2D-A5D)/compus mic molecular (A2F-A5F)	172
IV.5.2. Protocol de testare a degradării enzimaticе <i>in vitro</i> a hidrogelurilor pe bază de chitosan și nitrosalicilaldehidă	173
IV.6. Protocoale de determinare a interacțiunii G-cvadruplex – ligand	174
IV.6.1. Protocol general de docking utilizat pentru compușii derivați de 1,10-fenantrolină	174
IV.6.2. Protocol general de determinare a interacțiunii ADN-ului G-cvadruplex cu liganzii mic moleculari utilizând dicroismul circular	174
IV.6.3. Protocol general de determinare a stabilității ADN-ului G-cvadruplex în prezența liganzilor mic moleculari utilizând metoda CD-punct de topire	175
IV.7. Protocol general de determinare a proprietăților de fluorescență pentru compușii cu structura 10	176
Concluzii	177
Bibliografie	182
Listă de abrevieri	196
Anexa – Articole publicate	198

Introducere

Bolile, de orice natură, reprezintă o anomalie de funcționare a organismului sau a unei părți din corp. Afecțiunile organismului, atât cele patologice cât și cele contagioase pot fi diagnosticate pe baza unor semnale și a unor simptome bine cunoscute. Încă de la începutul istoriei, oamenii au fost afectați de afecțiuni patologice fatale și contagioase, atât virale cât și bacteriene. Două dintre cele mai răspândite boli la nivel mondial sunt cancerul și tuberculoza, acestea remarcându-se prin gradul ridicat de mortalitate pe care îl provoacă. În acest sens în ultimii ani, multe cercetări s-au axat pe dezvoltarea unor noi medicamente și protocoale de tratament în scopul combaterii acestor boli.

Astfel, cercetările personale prezentate în cadrul acestei teze de doctorat au constat în obținerea unor compuși noi, cu schelete heterociclice, în vederea evaluării proprietăților biologice (activitatea anticanceră sau antituberculoasă), dar și a determinării mecanismului de acțiune a compușilor activi. De asemenea, ne-am propus obținerea unor matrici de eliberare pe bază de chitosan și nitrosalicilaldehidă în vederea încapsulării compușilor sintetizați biologic activi, pentru a determina modul de eliberare a acestora.

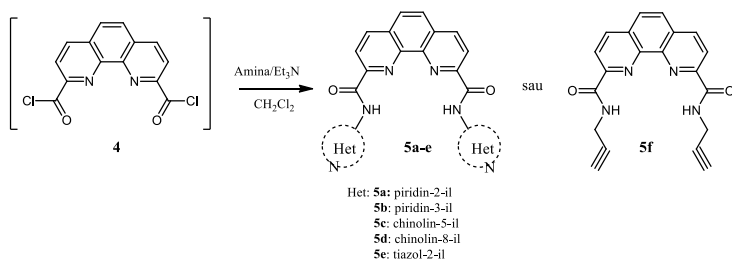
Pe parcursul studiilor doctorale am urmărit atingerea următoarelor obiective principale:

- ✓ Sinteza a două serii de derivați de 1,10-fenantrolină, prima serie constând în derivați de 1,10-fenantrolină-2,9-disubstituiți cu diverși heterocicli prin intermediul legăturilor amidice, iar a doua serie constând în derivați de 1,10-fenantrolină-2,9-disubstituiți cu substituenți care conțin cicluri 1,2,3-triazolice-1,4-disubstituite.
- ✓ Sinteza unor noi derivați de ftalazină și izochinolină obținuți prin intermediul reacțiilor de cicloadiție 3+2 dipolară.
- ✓ Sinteza a două serii de săruri monocuaternare de 4-(indolizin-7-il)-piridin-1-ii.
- ✓ Obținerea unor hidrogeluri pe bază de chitosan și nitrosalicilaldehidă și a sistemelor de eliberare controlată utilizând hidrogelurile obținute ca matrici de încapsulare a compușilor.
- ✓ Caracterizarea structurală a noilor compuși și hidrogeluri utilizând spectroscopia FTIR, RMN, cât și caracterizarea morfologică și supramoleculară a seriilor de hidrogel obținute.
- ✓ De asemenea, unul din obiectivele acestei teze se referă la evaluarea activității biologice (anticanceră și antituberculoasă) a noilor compuși sintetizați, cât și realizarea unor studii privind relația structură-activitate biologică și determinarea mecanismului de acțiune a acestora.
- ✓ În cazul sistemelor de eliberare controlată ne-am propus determinarea modului de eliberare, cât și capacitatea de degradare a matricii și biocompatibilitatea matricii/sistemelor de eliberare.

CAPITOL II. COMPUȘI MIC MOLECULARI CU POTENȚIALĂ ACTIVITATE ANTICANCEROASĂ SAU ANTITUBERCULOASĂ

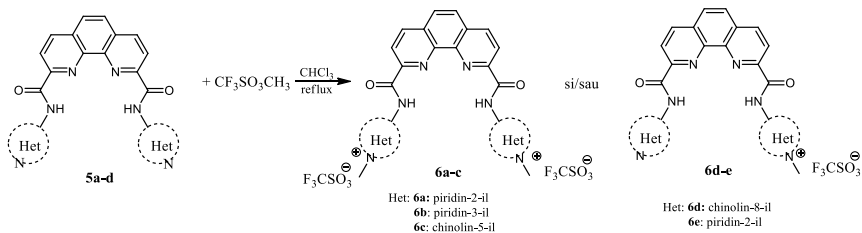
II.1. Sinteza și proprietățile unor noi derivați de 1,10-fenantrolină-2,9-disubstituită

Au fost sintetizați 6 derivați de 1,10-fenantrolină-2,9-disubstituită cu diverse amine, aromatice sau alifaticе, prin intermediul legăturilor amidice (schema II.2).



Schema II.2. Sinteza compușilor derivați de la 1,10-fenantrolină pe bază de legătură amidică **5a-f**

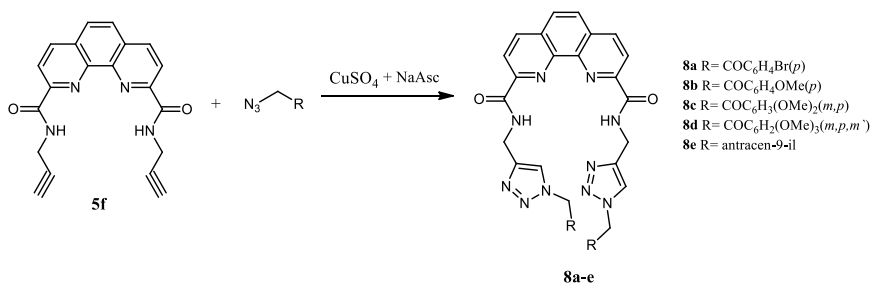
Plecând de la compușii **5a-d** și triflatul de metil, au fost obținuți derivații metilați ai acestor compuși (Schema II.3). Reacțiile au decurs diferit în funcție de substrat. În cazul substraturilor **5b** și **5c** s-au obținut compușii dimetilați doriți **6b**, respectiv **6c** cu randamente foarte bune, în timp ce în cazul substratului **5d** am reușit să obținem doar compusul monometilat **6d**. De asemenea, utilizând compusul **5a**, am obținut atât derivatul dimetilat **6a**, cât și pe cel monometilat **6e**.



Schema II.3. Sinteza compușilor N-metilați **6a-e**

În continuare este prezentată schema de sinteză celei de-a doua serii de derivați cu schelet 1,10-fenantrolinic substituit în pozițiile 2 și 9 cu substituenți conținând 1,2,3-triazoli 1,4-disubstituiți.

În această etapă au fost utilizate diverse azide, obținute conform protocolelor din literatură, și compusul **5f** ca parteneri de reacție într-un sistem catalizat de Cu (I), pentru obținerea compușilor doriți prin intermediul chimiei „click” (schema II.5).



Schema II.5. Sinteza compușilor bistriazolici derivați de 1,10-fenantrolină **8a-e**

Reacția a fost realizată într-un sistem clasic acestui tip de reacție, utilizând sulfat de cupru (II) și ascorbat de sodiu în *t*-butanol/apă la 50 °C, pentru compușii **8a**, **8b** și **8e**, respectiv un sistem de tipul sulfat de cupru (II)/ascorbat de sodiu în DMSO/apă, și 1,10-fenantrolină la 90 °C pentru compușii **8c** și **8d**.

Spectroscopia FTIR și RMN au demonstrat obținerea compușilor propuși prin apariția benzilor, respectiv semnalelor caracteristice în spectrele înregistrate.

În vederea testării activității biologice a noilor compuși, în urma unui proces de selecție, au fost acceptați spre testare 10 compuși: **5a**, **5b**, **5d-f**, **6b**, **6d**, **8a**, **8c** și **8d**. Această testare s-a realizat pe 60 de linii celulare tumorale umane la o singură concentrație de 10 μM, rezultatele testării activității de inhibiție a creșterii acestora fiind raportate în tabelul II.1 (selecție).

Tabel II.1. Rezultatele testării activității de inhibare a creșterii a 60 de linii celulare tumorale (GD)^a pentru compușii **5a**, **5b**, **5d-f**, **6b**, **6d**, **8a**, **8c** și **8d** la o concentrație unică de 10⁻⁵ M (selecție).

Tip de cancer/linie celulară	Compus / Procentul de inhibare a creșterii (GI, %)									
	5a	5b	5d	5e	5f	6b	6d	8a	8c	8d
<i>Leucemie</i>										
RPMI-8226	0	81	90	12	6	38	56	0	3	3
<i>Cancer pulmonar</i>										
A549/ATCC	3	78	58	18	13	100^b (3)	15	7	0	0
HOP-62	8	91	68	17	11	78	17	0	3	10
NCI-H226	4	95	72	19	11	95	12	0	13	0
NCI-H460	0	98	63	23	0	100^b (7)	19	0	0	0
NCI-H522	0	70	51	7	17	100^b (19)	35	16	9	5
<i>Cancer de colon</i>										
HCC-2998	0	97	15	20	0	58	15	0	3	4
HCT-116	9	95	62	7	7	57	13	1	78	8
HT29	0	93	48	22	8	66	12	3	3	0
KM12	2	94	45	20	2	58	0	0	0	0
<i>Cancer al SNC</i>										
SF-295	1	95	35	9	10	94	4	0	0	0
SF-539	5	100^b (7)	5	8	6	62	8	0	6	1
<i>Cancer de piele</i>										
SK-MEL-5	4	74	66	19	13	98	33	0	4	2
UACC-62	2	71	47	12	1	100^b (54)	25	0	9	0
<i>Cancer ovarian</i>										
SK-OV-3	0	52	34	1	6	92	12	25	16	5
<i>Cancer renal</i>										
A498	0	100^b (39)	27	0	0	5	15	0	0	0
RXF 393	0	100^b (50)	0	0	0	67	5	0	1	0
SN12C	0	68	30	1	0	100^b (15)	52	0	2	4
DU-145	0	85	39	0	0	90	5	0	0	0
<i>Cancer de sân</i>										
MDA-MB-468	0	100^b (2)	23	0	11	100^b (16)	35	0	4	0

^a Procentul de inhibare a creșterii (GI %) reprezintă gradul de inhibare a creșterii față de controlul fără medicament și comparativ cu numărul de celule la timpul 0, valoarea raportată fiind pentru testarea la concentrația 10⁻⁵ M.

^b Efect citotoxic; procentul de citotoxicitate este prezentat în paranteze.

Testările pe cele 60 de linii celulare tumorale, au condus în cazul compușilor **5b** și **6b** la cele mai promițătoare rezultate în ceea ce privește capacitatea acestora de a inhiba creșterea celulară. Pentru compusul **5b** au fost obținute valori ale inhibării creșterii celulare tumorale de 100% pe 4 linii celulare în cadrul cancerului SNC, renal și de sân, în timp ce pentru compusul **6b** s-au obținut valori de 100% ale inhibării creșterii celulare tumorale pentru 6 linii celulare în cadrul cancerului pulmonar, de piele, renal și de sân.

Compușii **5a**, **5f** și **8a** nu au prezentat valori semnificative ale procentului de inhibare a creșterii tumorale pe celulele testate, fiind practic inactivi din acest punct de vedere.

În vederea determinării mecanismului de acțiune a compușilor activi, în special a capacității de interacțiune a acestora cu ADN-ul dublu catenar, sau cu ADN-ul G-cvadruplex, au fost realizate atât studii de docking molecular, cât și studii experimentale utilizând dicroismul circular.

Studiile de docking au arătat interacțiuni mai puternice între compus și ADN-ul dublu catenar decât între compus și ADN-ul G-cvadruplex, însă diferențele între energiile de formare a complexelor au fost minime. În schimb, studiile utilizând dicroismul circular și două secvențe de ADN, unul telomeric uman (structură G-cvadruplex) și unul dublu catenar au demonstrat o puternică interacțiune între compușii **5b**, **6b**, **6d** cu ADN-ul G-cvadruplex, față de o interacțiune minimă cu ADN-ul dublu catenar.

Astfel, rezultatele obținute ne-au determinat să investigăm stabilitatea complexelor nou formați între ADN-ul G-cvadruplex și compușii mic moleculari biologic activi. În acest sens, au fost înregistrate profilele de topire ale acestora utilizând dicroismul circular (Figura II.15). Acest studiu a demonstrat o bună stabilizare a structurii G-cvadruplex în cazul compusului **6b**.

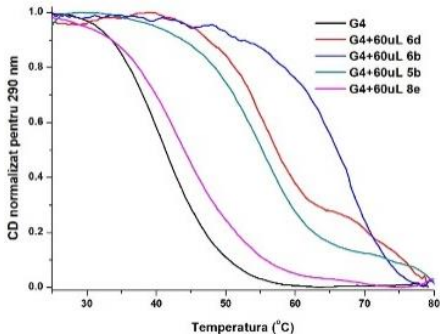


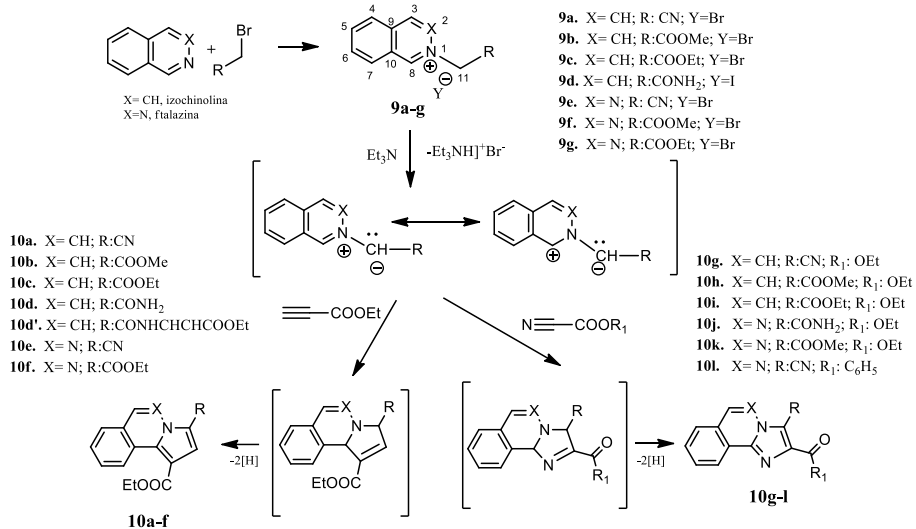
Figura II.15. Profilul curbelor de topire pentru ADN-ul G-cvadruplex și complexii formați

II.2. Sinteza și proprietățile unor noi derivați de izochinolină și ftalazină

Calea de sinteză urmată pentru obținerea celor două serii de derivați de izochinolină, respectiv ftalazină este prezentată în schema II.6.

Primul pas în obținerea compușilor vizați a fost acela de a sintetiza sărurile cuaternare **9a-g** utilizând izochinolina, respectiv ftalazina ca materiale de start. Sărurile **9a-g** au fost tratate cu trietilamină și diverși agenți de ciclizare 3+2 dipolară (propiolat de etil, cianoformiat de etil sau cianură de benzoil), obținându-se într-o primă fază intermediarii neizolabili cu structură dihidropirolică corespunzătoare, care în mediul de reacție suferă un proces de dehidrogenare oxidativă cu formarea cicloaducților complet aromatizați **10a-l**.

Spectroscopia FTIR și RMN au demonstrat obținerea compușilor propuși prin apariția benzilor, respectiv semnalelor caracteristice în spectrele înregistrate.



Schema II.6. Sinteza derivaților de izochinolină și ftalazină **10a-l**

Patru dintre acești derivați au fost testați pe 60 de linii celulare tumorale umane la concentrația de 10 μM. Rezultatele obținute sub forma procentului de inhibare a creșterii celulelor tumorale sunt raportate în tabelul II.3.

Tabel II.3. Activitatea de inhibare asupra creșterii celulelor canceroase umane a compușilor **10b**, **10e**, **10f** și **10h** (selecție)

Tip de cancer/Linie celulară	Compus/Procentul de inhibare GI (%) (10 ⁻⁵ M) ^a			
	10b	10e	10f	10h
<i>Leucemie</i>				
MOLT-4	9	11	7	5
<i>Cancer pulmonar</i>				
HOP-92	12	19	15	0
<i>Cancer al SNC</i>				
SNB-75	13	17	15	21
<i>Cancer de piele</i>				
UACC-257	6	100^b (54)	9	0

^a Procentul de inhibare a creșterii (GI %) reprezintă gradul de inhibare a creșterii față de controlul fără medicament și comparativ cu numărul de celule la timpul 0, valoarea raportată fiind pentru testarea la concentrația 10⁻⁵ M.

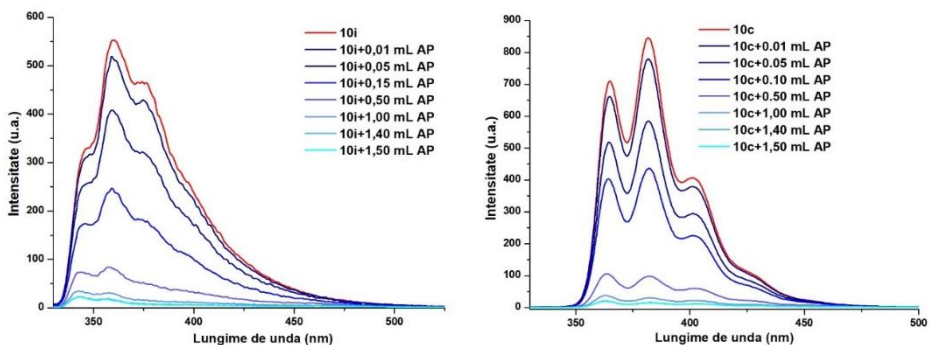
^b Efect citotoxic; procentul de citotoxicitate este prezentat în paranteze.

Rezultatele obținute nu au fost foarte promițătoare, compușii fiind inactivi pe liniile celulare testate. Excepție a făcut compusul **10e** în cazul căruia s-a obținut o valoare a inhibiției creșterii celulare tumorale de 100% pe linia celulară UACC-257 (cancer de piele), pe celelalte linii celulare fiind inactiv.

Ținând cont de importanța fluorescenței în diverse domenii, ne-am gândit să realizăm un studiu de evaluare a fluorescenței atât pentru compușii cu structuri pirolheterociclice **10c** și **10f**, cât și pentru compusul **10i** cu structură imidazoizochonolinică. Studiul a fost realizat în colaborare cu grupul domnului dr. Anton Airinei de la Institutul de Chimie Macromoleculară „Petru Poni” din Iași.

În acest sens au fost înregistrate spectrele de absorbție și emisie (excitare cu lungimea de undă de 324 nm) ale acestora și de asemenea s-a determinat și randamentul cuantic. Pentru compușii **10f** și **10i** s-au obținut randamente cuantice în soluție cu valori apropiate de 15%, valoare scăzută comparativ cu randamentul cuantic în soluție obținut în cazul compusului **10c** care are o valoare de aproximativ 54%.

Pe baza profilelor de fluorescență ale compușilor, ne-am propus utilizarea acidului picric (AP) pentru o determinare preliminară de stingere a fluorescenței (figura II.24).



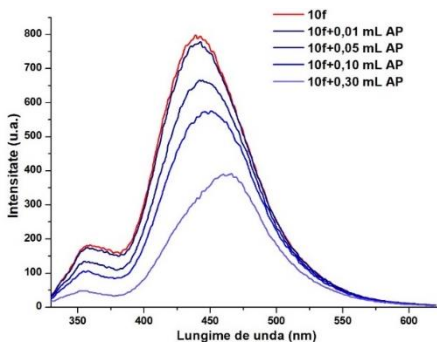
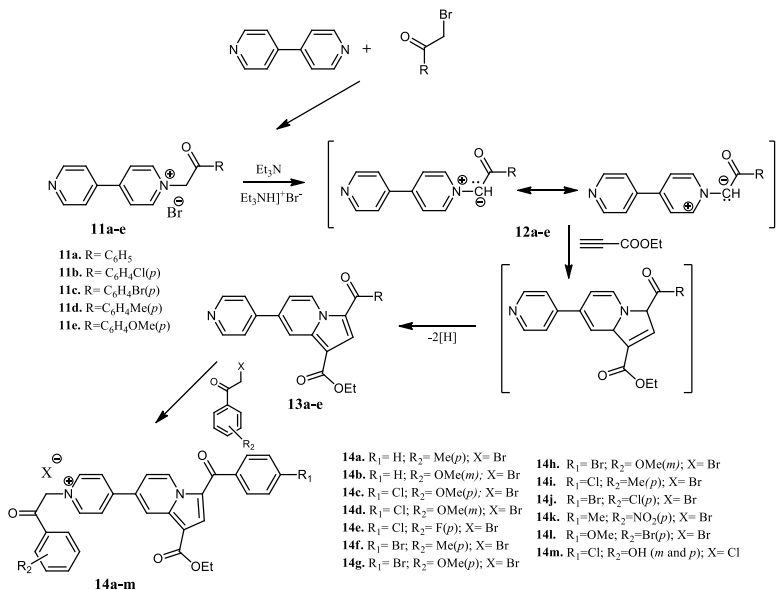


Figura II.24. Spectrele de stingere a fluorescenței utilizând acid picric

II.3. Sinteza și proprietățile unor noi săruri monocuaternare de 4-(indolizin-7-il)-piridin-1-iu

Sinteza noilor derivați de 4,4'-bipiridil s-a efectuat în conformitate cu strategia raportată în grupul nostru, succesiunea de reacții utilizate fiind prezentată în schema II.7. Astfel, sărurile monocuaternare de 4-(indolizin-7-il)-piridin-1-iu **11a-e** au fost utilizate pentru obținerea compușilor monoindoliziniici **13a-e** printr-o reacție de cicloadiție [3+2] dipolară la propiolatul de etil. Cea de a doua alchilare a avut loc folosind diferite 2-halogenoacetofenone. Astfel au fost obținuți compușii **14a-m**. Dintre aceștia, compușii **14a-h** și **14m** sunt noi, în timp ce compușii **14i-l** au fost raportați deja în literatură.



Schema II.7. Calea de sinteză a mono-sărilor cu schelet indolizinic **14a-m**

Spectroscopia FTIR și RMN au demonstrat obținerea compușilor propuși prin apariția benzilor, respectiv semnalelor caracteristice în spectrele înregistrate.

Toți compușii cu structura **14** au fost testați pentru evaluarea activității antimicrobacteriene împotriva *M. Tuberculosis*, în cadrul programului de screening TAACFTB sub coordonarea Institutului Național de Sănătate din SUA, divizia NIAID.

Primul stadiu în testarea *in vitro* a activității antimicrobiene a compușilor **14** împotriva *Mycobacterium tuberculosis* a constat în determinarea concentrației minime inhibitorii (MIC) la care creșterea culturilor a fost complet inhibată, și concentrațiile la care creșterea acestora a fost inhibată în procent de 50%, respectiv 90% (IC₅₀, respectiv IC₉₀). Pentru compusul **14i** au fost obținute cele mai bune valori MIC, IC₅₀ și IC₉₀ dintre toți compușii testați (tabel II.4).

Tabel II.4. Activitatea antimicobacteriană a compușilor **14** împotriva creșterii *M. tuberculosis* H37Rv în condiții aerobe

Compus	MIC (μ M)	IC ₅₀ (μ M)	IC ₉₀ (μ M)	Compus	MIC (μ M)	IC ₅₀ (μ M)	IC ₉₀ (μ M)
14a	14	13	15	14g	50	35	46
14b	>50	39	>50	14h	14	13	14
14c	15	12	14	14i	8	7.2	8.2
14d	15	14	16	14j	>200	>200	>200
14e	>100	>100	>100	14k	>200	200	>200
14f	20	13	19	14l	>200	>200	>200
14g	50	35	46	14m	>100	>100	>100
Rifampicin	0.0065	0.0036	0.0071	Rifampicin	0.0065	0.0036	0.0071

Compușii **14a**, **14c**, **14d**, **14h** și **14i** care au arătat o activitate anti TB promițătoare în primul stadiu de testare, au fost selectați pentru stagiul al doilea de testări incluzând determinarea valorilor MIC, IC₅₀ și IC₉₀ (repetate la concentrația activă cea mai scăzută), determinarea MIC într-un mediu cu o concentrație scăzută de oxigen, determinarea concentrației minime bactericide (MBC), testări ale inhibiției creșterii unor specii bacteriene rezistente la medicamentele împotriva *M. Tuberculosis*, testarea activității TB intracelulare precum și determinarea citotoxicității acestora.

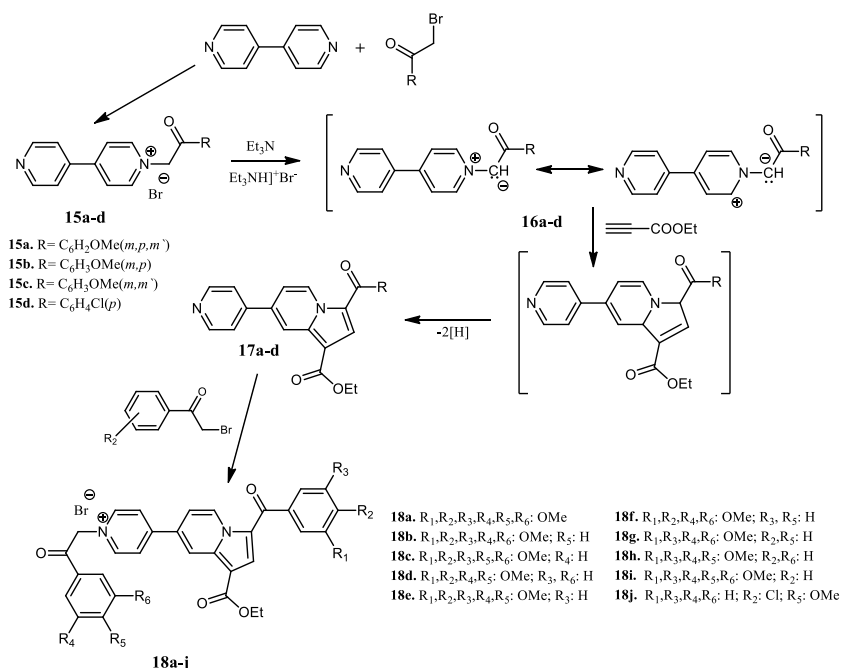
În urma determinării activității bactericide, încurajator a fost faptul că toți cei cinci compuși testați au prezentat acțiune bactericidă împotriva replicării culturilor cu o concentrație minimă bactericidă egală sau mai mică decât concentrația minimă inhibitorie. De asemenea, interesant este faptul că pentru compușii **14a**, **14c**, **14d** și **14i** valoarea MIC în condiții anaerobe a fost mai mică decât valoarea acesteia obținută în condiții aerobe. În același stadiu de testări a fost demonstrat faptul că a fost menținută o bună activitate antimicobacteriană în condiții aerobe a compușilor **14a**, **14c**, **14d** și **14i** împotriva a cinci tulpini *Mtb* rezistente la tratament.

Citotoxicitatea compușilor față de celulele eucariote a fost determinată utilizând linia celulară monocitară umană THP-1, însă dezamăgitor a fost faptul că citotoxicitatea compușilor testați este moderată spre ridicată.

Ținând cont de proprietățile anti TB promițătoare ale compusului **14i**, acesta a fost selectat pentru efectuarea unui studiu complet privind proprietățile farmacologice (determinarea gradului de absorbție, modul de distribuție, metabolizare și excreție precum și studii de toxicitate), însă nici acestea nefiind promițătoare pentru o eventuală utilizare a acestui compus ca medicament. Totuși rezultatele obținute sunt interesante și pot constitui o bază pentru dezvoltarea de noi compuși cu structură analoagă dar cu proprietăți îmbunătățite în acest sens.

Utilizând aceeași strategie de reacție, descrisă anterior, au fost sintetizați și derivații de 4-(indolizin-7-il)-piridin-1-iu **18a-j** (schema II.8).

Spectroscopia FTIR și RMN au demonstrat obținerea compușilor propuși prin apariția benzilor, respectiv semnalelor caracteristice în spectrele înregistrate.



Schema II.8. Sinteza compușilor cu schelet indolizinic **18a-j**

Doar doi compuși (**18a** și **18j**) au fost selectați pentru a fi testați pe cele 60 de linii celulare tumorale umane ale NCI la concentrația unică de 10 μM , rezultatele obținute fiind raportate în tabelul II.15.

Cele mai bune rezultate au fost obținute pentru compusul **18a**, care prezintă acțiune inhibitorie foarte ridicată asupra majorității liniilor celulare testate aparținând leucemiei, cancerului de colon și cancerului de san. Este de remarcat de asemenea și compusul **18j** care prezintă activitate inhibitorie foarte bună împotriva liniilor celulare leucemice și ale cancerului de colon. Datorită acestor rezultate promițătoare, ambii compuși au fost selectați pentru testările din cel de-al doilea stadiu, în care a fost determinată activitatea inhibitorie a celor doi compuși la cinci concentrații diferite.

În cel de-al doilea stadiu, compusul **18j** se face remarcat datorită activității inhibitorii foarte bune împotriva celulelor SR leucemice, cu o valoare GI_{50} de 329 nM, fiind singura linie celulară pentru care s-a obținut o valoare submicromolară.

Tabel II.15. Activitatea de inhibare a creșterii celulare (GI %) ^a pentru compușii **18a** și **18j** la concentrația unică de 10⁻⁵ M testată împotriva a 60 de linii celulare tumorale (selecție).

Tip de cancer/Linie celulara	Compus/Procentul de inhibare GI (%) (10 ⁻⁵ M) ^a	
	18a	18j
<i>Leucemie</i>		
CCRF-CEM	100 ^b (15)	100 ^b (3)
K-562	100 ^b (45)	100 ^b (53)
MOLT-4	100 ^b (9)	89
RPMI-8226	100 ^b (22)	77
SR	100 ^b (16)	100 ^b (27)
<i>Cancer pulmonar</i>		
NCI-H460	100 ^b (10)	97
NCI-H522	100 ^b (22)	30
<i>Cancer de colon</i>		
HCT-116	100 ^b (61)	95
HT29	100 ^b (10)	100 ^b (10)
SW-620	100 ^b (65)	100 ^b (30)
<i>Cancer al sistemul nervos central</i>		
SF-268	100 ^b (15)	22
U251	100 ^b (74)	87
<i>Cancer de piele</i>		
Lox IMVI	100 ^b (44)	88
<i>Cancer ovarian</i>		
OVCAR-4	100 ^b (33)	71
OVCAR-8	93	24
<i>Cancer renal</i>		
786-0	100 ^b (82)	91
<i>Cancer de sân</i>		
MCF7	100 ^b (29)	99
MDA-MB-231/ATCC	100 ^b (23)	30
BT-549	100 ^b (11)	18

^a Procentul de inhibare a creșterii (GI %) reprezintă gradul de inhibare a creșterii față de controlul fără medicament și comparativ cu numărul de celule la timpul 0, valoarea raportată fiind pentru testarea la concentrația 10⁻⁵ M.

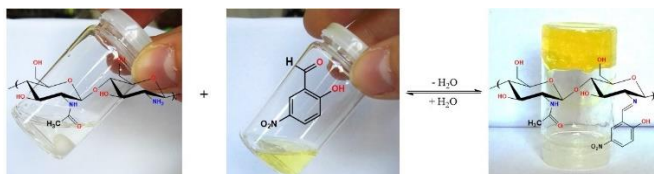
^b Efect citotoxic; procentul de citotoxicitate este prezentat în paranteze.

CAPITOL III. STRUCTURI SUPRAMOLECULARE CU POTENȚIALE APLICAȚII ÎN TERAPIA CANCERULUI. HIDROGELURI PE BAZĂ DE CHITOSAN ȘI 5-NITROSALICILALDEHIDĂ.

O direcție atractivă de bio-aplicare a hidrogelurilor propuse pentru sinteză este reprezentată de terapia locală, un exemplu particular fiind terapia cancerului prin injectarea hidrogelurilor direct în tumoră, limitând astfel efectele secundare. De asemenea, hidrogelurile sunt atractive și în vederea utilizării acestora ca matrici de eliberare a medicamentelor.

Prezentul studiu a fost realizat în colaborare cu grupul doamnei Dr. Luminița Marin de la Institutul de Chimie Macromoleculară „Petru Poni” din Iași.

A fost obținută o serie de hidrogeluri pe bază de chitosan și o monoaldehidă – 5-nitrosalicilaldehidă (NSA) (schema III.1), variind raportul molar de combinare a funcționalităților, amină și respectiv aldehydă, a reactanților. Cu scopul de a verifica demersul sintetic, de a elucida structura chimică a hidrogelurilor obținute, precum și de a înțelege mai bine proprietățile acestora, a fost sintetizat și un compus model micromolecular (MC), prin reacția de condensare acidă dintre 5-nitrosalicilaldehidă și glucozamină, unitatea structurală a chitosanului.



Schema III.1. Sinteza hidrogelurilor

Spectrele FTIR și RMN, atât în cazul compusului model, cât și al hidrogelurilor, au confirmat formarea legăturii iminice. Analiza structurii supramoleculare (DRX și POM) și analiza morfologică (SEM) au evidențiat obținerea unei arhitecturi tridimensionale stratificate, ca urmare a segregării hidrofil/hidrofob, respectiv a unor microstructuri cu aspect de burete poros, cu pori de aproximativ 50 μm interconectați aleator, formând o rețea cu canale deschise.

Capacitatea de umflare a hidrogelurilor a fost evaluată prin determinarea gradului masiv de umflare la echilibru (MES) în trei medii de pH diferit: 7,4; 7; 4. În toate cele trei medii, hidrogelurile au fost complet rehidratate, atingând gradul masiv de umflare la echilibru foarte repede (peste 70% în 5 minute).

Determinarea comportamentului vâscoelastic al hidrogelurilor a fost realizată prin măsurători reologice, demonstrând obținerea stării de gel pentru un raport molar între grupările amină și cele aldehidă de 7.7:1.

Având în vedere că, în literatura de specialitate există studii care raportează activitatea antitumorală a unor imine provenind din nitrosalicilaldehidă, în continuare a fost evaluat potențialul de utilizare a hidrogelurilor obținute în terapia cancerului, prin determinarea citotoxicității acestora prin analiza MTS pe celule HeLa – o linie comună de celule canceroase umane. Studiile au arătat că hidrogelurile inhibă viabilitatea celulelor HeLa în proporție de 60%, după 48 de ore.

În vederea aplicării hidrogelurilor în tratamente locale, cât și ca matrici pentru eliberarea de medicamente, biocompatibilitatea acestora a fost investigată prin măsurarea indicatorilor specifici din sânge, biochimici și imunologici, după administrarea subcutanată a acestora pe șobolani. Analizele efectuate pentru a stabili influența hidrogelurilor asupra sângelui, parametrilor biochimici și imunologici după implantarea lor subcutanată pe șobolani, au demonstrat o bună biocompatibilitate *in vivo*, atât după 24 de ore, cât și după 8 zile.

O continuare a prezentului studiu a fost obținerea unor sisteme de eliberare a unui medicament model – diclofenac. Astfel, a fost obținută o serie de hidrogeluri printr-un proces de gelifiere *in situ* a chitosanului cu 5-nitrosalicilaldehida, în prezența unei cantități constante de diclofenac sodic (**DCF**).

Cu ajutorul spectroscopiei FTIR a fost identificată, atât formarea legăturii iminice, cât și prezența medicamentului în sistemele de eliberare. Investigarea arhitecturării supramoleculare a evidențiat faptul că segregarea hidrofil-hidrofob nu este împiedicată de prezența diclofenacului și mai mult decât atât s-a constatat că acesta a fost dispersat în matricea de hidrogel sub formă de molecule izolate sau cristale

neregulate, bidimensionale, de dimensiuni reduse. Imaginile SEM au demonstrat totodată microstructuri cu aspect de burete pentru sistemele investigate.

Capacitatea hidrogelurilor nitrosalicil-imino-chitosan de a fi utilizate ca matrici pentru terapia locală controlată a fost investigată *in vitro* prin monitorizarea profilului de eliberare (figura III.17) a medicamentului model **DCF** din cele patru sisteme studiate (**A2D-A5D**) în soluție tampon de pH fiziologic (7,4), la temperatura corpului uman 37 °C.

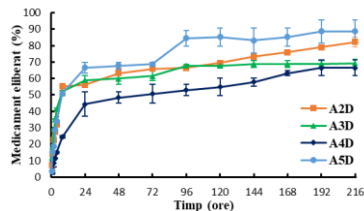


Figura III.17. Procentul de DCF eliberat pe parcursul a 8 zile din sistemele **A2D-A5D**

S-a constatat că viteza de eliberare depinde de gradul de reticulare al probelor studiate; astfel s-a observat o eliberare mai eficientă, atingând un procent de aproape 90% după 8 zile pentru probele **A2D** și **A5D**, și mai puțin eficientă, atingând un maxim de aproximativ 70% în cazul probelor **A3D** și **A4D**.

Pentru a înțelege mecanismul de eliberare, cât și pentru a evidenția cele mai promițătoare sisteme ce vor fi evaluate *in vivo*, s-a efectuat o estimare a cineticii de eliberare a medicamentului prin fitarea rezultatelor obținute cu ajutorul unor modele matematice. În urma aplicării acestor modele se poate concluziona faptul că eliberarea susținută a **DCF** este strâns legată de încapsularea fină a acestuia în pereții matricei sub forma unor cristale submicrometrice și molecule izolate ancorate prin forțe fizice de matrice. Procesul de difuzie în cazul acestor matrici a fost controlat de morfologia de canale microporoase a sistemelor, care a condus medicamentul pe direcția interior-exterior, în condiții optime impuse de gradientul de concentrație.

Biodegradarea enzimatică reprezintă un factor important ce influențează viteza de eliberare a medicamentului *in vivo* prin eroziunea matricei. Din acest motiv, degradarea enzimatică a matricei sistemelor nitrosalicil-imino-chitosan a fost

investigată folosind lizozima deoarece chitosanul se degradează în prezența acestei enzime specifice. În urma acestui studiu s-a demonstrat faptul că hidrogelurile studiate sunt materiale biodegradabile, ce reprezintă un aspect foarte important pentru aplicațiile *in vivo* pentru terapia locală. Ținând cont de datele obținute experimental la testările *in vitro* pentru eliberarea medicamentului și biodegradarea sistemelor, s-a decis utilizarea probelor **A2D** și **A3D** în cadrul experimentelor *in vivo*.

La fel ca în cazul matricilor de hidrogel, au fost realizate experimente de determinarea a biocompatibilității *in vivo* pe șobolani pentru sistemele de eliberare **A2D** și **A3D**, obținându-se rezultate optime pentru parametrii investigați.

Eliberarea medicamentului *in vivo* din probele investigate a fost studiată cu ajutorul modelului de durere somatică utilizând testul retragerii cozii, pe șobolani, obținându-se o eliberare susținută a substanței active și un efect prelungit *in vivo* (figura III.22).

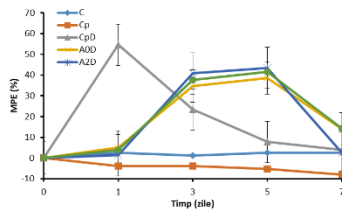
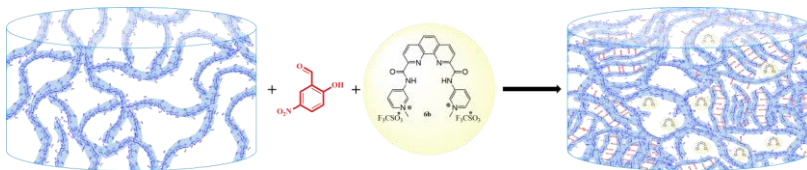


Figura III.22. Influența în timp a efectului maxim posibil în urma implantării peleților pentru valorile latenței în testul de retragere a cozii

Datorită rezultatelor promițătoare obținute la eliberarea unui medicament model din hidrogelurile pe bază de chitosan și nitrosalicilaldehidă, utilizate ca matrice de încapsulare, și pe de altă parte datorită proprietăților anticancerogene intrinseci dovedite de matricea de hidrogel, am considerat oportună investigarea încapsulării compusului **6b** care a prezentat de asemenea proprietăți anticancerogene pe mai multe linii celulare (schema III.3).



Schema III.3. Schema de obținere a sistemelor de eliberare **A2F-A5F**

Caracterizarea acestor sisteme a arătat o încapsulare a compusului similară sistemelor de eliberare **A2D-A5D**. În vederea determinării capacității de eliberare a acestor sisteme, am realizat un experiment de eliberare *in vitro* pentru sistemele **A2F-A5F**. Acest experiment a fost realizat la 37 °C și un pH= 2. Profilul de eliberare este prezentat în figura III.26.

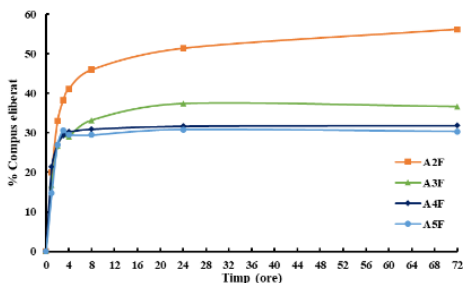


Figura III.26. Profilul de eliberare a compusului **6b** din sistemele **A2F-A5F**

Rezultatele obținute în cazul eliberării compusului **6b** nu au fost la fel de promițătoare ca în cazul medicamentului **DCF**, însă pe viitor vor fi realizate aceleași sisteme de eliberare pentru a vedea influența compoziției mediului de eliberare, cât și a pH-ului. În acest sens, soluția tampon va fi realizată cu ajutorul unei soluții de acid acetic și acetat de sodiu, datorită faptului că testul de determinare a capacității de umflare în mediu acid a hidrogelurilor utilizate ca matrice în acest experiment a fost efectuat utilizând aceste componente, iar matricea de hidrogel a fost stabilă în acest mediu chiar și pentru 3 luni.

Concluzii

✓ În cadrul prezentei teze au fost sintetizate următoarele serii de compuși:

◆ prima serie de compuși se referă la derivați de 1,10-fenantrolină substituiți prin intermediul grupărilor amidice cu diverși heterocicli metilați, și a fost obținută prin reacții de cuplare dintre diclorura acidă a acidului 1,10-fenantrolin-2,9-dicarboxilic și diverse amine (**5a-f**). Compușii **5a-f** au fost în continuare metilați, conducând la obținerea compușilor finali **6a-e**.

◆ cea de-a doua serie se referă la derivați de 1,10-fenantrolină-2,9-disubstituiți cu substituenți care conțin cicluri 1,2,3-triazolice-1,4-disubstituite **8a-f**, și a fost obținută prin utilizarea chimiei "click" în reacția dintre N²,N⁹-di(prop-2-in-1-il)-1,10-fenantrolin-2,9-dicarboxamidă și diverse azide.

◆ cea de a treia serie de compuși este compusă din derivați cu structură pirolo[2,1-a]izochinolinică și pirolo[2,1-a]ftalazinică **10a-f** care au fost obținuți prin intermediul reacțiilor de cicloadiție 3+2 dipolară a ilidelor corespunzătoare sărurilor cuaternare de izochinolinu și ftalaziniu la propiolat de etil;

◆ cea de-a patra serie compusă din derivați cu structură imidazo[2,1-a]izochinolinică și imidazo[2,1-a]ftalazinică **10g-l** a fost sintetizată prin intermediul reacțiilor de cicloadiție 3+2 dipolară a ilidelor corespunzătoare sărurilor cuaternare de izochinolinu și ftalaziniu la cianoformiatul de etil (**10g-k**), respectiv cianură de benzoil în cazul compusului **10l**.

◆ cea de a cincea serie de compuși se referă la derivați cu structură de săruri cuaternare de 4-(indolizin-7-il)piridiniu (**14a-e** și **18a-m**) care au fost obținuți de asemenea prin intermediul reacțiilor de cicloadiție 3+2 dipolară a ilidelor corespunzătoare sărurilor de 4-(piridin-4-il)piridiniu la propiolat de etil cu obținerea intermediarilor **13a-e** și **17a-d**, reacție urmată de alchilarea azotului piridinic folosind diverse 2-halogenoacetofenone.

✓ Toți compușii sintetizați au fost caracterizați din punct de vedere structural utilizând spectroscopia FTIR și RMN.

✓ Compușii **5a**, **5b**, **5d-f**, **6b**, **6d**, **8a**, **8c**, **8e**, **10b**, **10e**, **10f**, **10h**, **18a** și **18j** au fost testați pentru a determina capacitatea acestora de inhibare a creșterii celulelor tumorale, după cum urmează:

◆ În primul stadiu, testarea s-a efectuat pe 60 de linii celulare din diferite tipuri de cancer, la concentrația unică de 10⁻⁵M.

◆ Rezultatele promițătoare privind activitatea de inhibare a creșterii celulelor tumorale a compușilor **5b**, **6b**, **18a** și **18j** au condus la selectarea acestora pentru testarea *in vitro* pe aceleași linii celulare, la 5 concentrații diferite. În acest stadiu, compusul **18j** s-a făcut remarcant datorită activității inhibitorii foarte bune împotriva celulelor SR leucemice, cu o valoare GI₅₀ de 329 nM, fiind singura linie celulară pentru

care s-a obținut o valoare submicromolară. În același timp, acest compus, împreună cu compusul **14a** se remarcă prin valori ale $GI_{50} < 3 \mu\text{M}$ împotriva majorității liniilor celulare testate. Testarea în cea de a doua etapă a compușilor **5b** și **6b** este în curs de efectuare.

✓ A fost efectuat un studiu cuprinzând atât modelare moleculară cât și dicroism circular (CD) și CD-punct de topire, privind capacitatea de legare a compușilor **5b**, **5d**, **6b**, **6d** și **8e** de ADN-ul dublu catenar și cel G-cvadruplex. Studiul a arătat că activitatea biologică înregistrată în cazul compușilor **6b** și **6d** ar putea fi datorată capacității acestora de a stabiliza ADN-ul G-cvadruplex.

✓ Compușii **14a-m** au fost investigați privind activitatea biologică împotriva *Mycobacterium tuberculosis*, după cum urmează:

◆ În primul stadiu de testare a fost determinată concentrația minimă inhibitorie (MIC) a acestora. Compușii care au arătat cele mai bune valori ale MIC (**14a**, **14c**, **14d**, **14h** și **14i**) au fost selectați pentru al doilea stadiu de testări.

◆ Stadiul al doilea de testare antituberculoasă a cuprins determinarea valorilor MIC, IC_{50} și IC_{90} (repetate la concentrația activă cea mai scăzută), determinarea valorii MIC într-un mediu cu o concentrație scăzută de oxigen, determinarea concentrației minime bactericide (MBC), testări ale inhibiției creșterii unor specii bacteriene rezistente la medicamentele împotriva *M. Tuberculosis*, testarea activității TB intracelulare precum și determinarea citotoxicității acestora. În cadrul acestor testări s-a făcut remarcat compusul **14i** care s-a dovedit superior prin valorile cele mai mici de concentrație la care a arătat activitate, acesta fiind selectat pentru stadiul al treilea de testări.

◆ Stadiul al treilea de testare antituberculoasă a constat în efectuarea unui studiu complet privind proprietățile farmacologice (determinarea gradului de absorbție, modul de distribuție, metabolizare și excreție precum și studii de toxicitate) (ADMET) ale compusului **14i**. Caracteristicile farmacologice ale acestuia nu au fost cele așteptate, acesta: prezentând citotoxicitate mărită, fiind un bun inhibitor al activității testosteronului catalizat de CYP3A4, ceea ce denotă un mare potențial de interacțiune medicament-medicament, dar și având o rată foarte mare de eliminare microzomială, ceea ce denotă o eliminare prea rapidă *in vivo*, și deci o durată scurtă de acțiune.

✓ A fost obținută o serie de hidrogeluri pe bază de chitosan și nitrosalicilaldehidă (**A2-A10**), obținute prin iminare, în vederea utilizării ca matrice pentru încapsularea și eliberarea de medicamente.

◆ Seria de hidrogeluri **A2-A10** a fost caracterizată din punct de vedere structural (FTIR și RMN), morfologic și supramolecular (SEM, POM, XRD), confirmând astfel mecanismul de gelifiere. În vederea determinării acestui mecanism a fost sintetizat un compus model, pe bază de glucozamină, unitatea structurală a chitosanului, și nitrosalicilaldehidă. De asemenea, pentru seria de hidrogeluri au fost efectuate teste de

reologie pentru determinarea proprietăților mecanice, acestea confirmând proprietățile de gel ale acestora, cât și o recuperare mecanică de 85%.

◆ De asemenea, au fost efectuate teste de determinare a gradului de umflare, implicit stabilitatea acestora în medii de pH diferit (7.4, 7 respectiv 4), observând stabilitatea acestora pentru 3 luni în toate cele trei medii, cu o ușoară degradare la pH= 7.4.

◆ A fost testată activitatea anticancer a hidrogelurilor utilizând celule HeLa, în urma experimentului obținându-se o valoare a citotoxicității de aproximativ 60%.

◆ Pentru a putea determina posibilitatea de utilizare a hidrogelurilor ca matrici de eliberare de medicament în terapia locală, au fost efectuate teste de biocompatibilitate *in vivo* pe șobolani. Rezultatele obținute au fost promițătoare, parametrii investigați fiind în intervale normale ale valorilor standard, demonstrând astfel biocompatibilitatea hidrogelurilor.

✓ A fost obținută o serie de sisteme de eliberare denumite **A2D-A5D**, utilizând ca matrice hidrogelul pe bază de chitosan și nitrosalicilaldehidă și un medicament model (diclofenac).

◆ Seria a fost caracterizată din punct de vedere structural (FTIR și RMN), morfologic și supramolecular (SEM, POM, XRD), determinând modul de încapsulare a medicamentului.

◆ A fost investigată eliberarea *in vitro* a diclofenacului din sistemele de eliberare **A2D-A5D** la pH= 7.4. În urma acestui experiment, sistemele **A2D** și **A3D** au arătat cele mai bune rate de eliberare a medicamentului, rezultatele fiind fitate pe diferite modele matematice pentru determinarea modului de eliberare.

◆ Determinarea degradării enzimactice *in vitro* a matricilor utilizate a fost realizată în prezență de lizozimă. Rezultatele după 21 de zile, au fost promițătoare, determinând o degradare de 38% pentru proba **A3**.

◆ A fost investigată biocompatibilitatea sistemelor **A2D-A5D** *in vivo* pe șobolani. Sistemele au demonstrat că sunt biocompatibile datorită faptului că parametrii investigați nu au suferit modificări majore față de controlul fără pește.

◆ A fost determinată eliberarea diclofenacului *in vivo* pe șobolani, obținând rezultate promițătoare cu privire la capacitatea matricilor de a elibera controlat medicamentul.

✓ A fost obținută o serie de sisteme de eliberare denumite **A2F-A5F**, utilizând de asemenea, matricea de hidrogel pe bază de chitosan, nitrosalicilaldehidă și compusul mic molecular **6b** cu proprietăți anticancerogene.

◆ Toate sistemele de eliberare obținute au fost caracterizate din punct de vedere structural, morfologic și supramolecular utilizând spectroscopia FTIR, SEM, POM și difracția de raze X.

◆ A fost investigată eliberarea *in vitro* a compusului **6b** din sistemele de eliberare **A2F-A5F** pentru determinarea modului de eliberare la pH= 2. Rezultatele obținute au demonstrat o bună capacitate de eliberare a compusului din sistemul **A2F**, într-un interval de 3 zile menținând o eliberare lentă.

✓ Rezultatele prezentate în cadrul acestei teze de doctorat au făcut până în prezent subiectul a două articole științifice publicate în reviste cotate ISI, și a 12 participări la conferințe științifice naționale și internaționale:

- Anda-Mihaela Olaru, Violeta Vasilache, Ramona Danac, Ionel I. Mangalagiu, "Antimycobacterial activity of nitrogen heterocycles derivatives: 7-(pyridine-4-yl)-indolizine derivatives. Part VII", *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, **32**, (2017), 1291-1298. (IF:4.93)

- Anda-Mihaela Olaru, Luminita Marin, Simona Morariu, Gabriela Pricope, Mariana Pinteala, Liliana Tartau-Mititelu, "Biocompatible chitosan based hydrogels for potential application in local tumour therapy", *Carbohydrate Polymers*, **179**, (2018), 59-70. (IF: 4.811)

- Anda-Mihaela Olaru, Claudia Filip, Mircea Apostu, Ramona Danac, "Synthesis and structure of new compounds with 1,10-phenanthroline and 2,2'-bipyridine skeletons", Conferința științifică "Zilele Universității Alexandru Ioan Cuza", 31 Octombrie - 1 Noiembrie 2014, Iași, România. (poster)

- Anda-Mihaela Olaru, Ramona Danac, Ionel I. Mangalagiu, "Synthesis of new 1,10-phenanthroline derivatives bearing 1,2,3-triazoles and their anticancer evaluation", "International Congress of Young Chemists", 7-11 Octombrie 2015, Cracovia, Polonia. (poster)

- Anda-Mihaela Olaru, Ramona Danac, Aurel Pui, Ionel I. Mangalagiu, "Synthesis of new 1,10-phenanthroline derivatives and their chelating properties", "New Trends in Environmental and Materials Engineering", 21-23 Octombrie 2015, Galați, România. (poster)

- Anda-Mihaela Olaru, Ramona Danac, Ionel Mangalagiu, Catalina I. Ciobanu, "Synthesis and antimycobacterial evaluation of new indolizine derivatives", "Contemporary Trends in the Development of Science: Visions of Young Researchers", 25 Mai 2016, Chișinău, Moldova. (prezentare orală)

- Anda-Mihaela Olaru, Ramona Danac, Ionel Mangalagiu, Catalina I. Ciobanu, "Synthesis and antimycobacterial properties of some new fused 4,4'-bipyridine derivatives", "Conferința Națională de Chimie XXXIV", 4 - 7 Octombrie 2016, Calimănești - Căciulata, Vâlcea, România. (prezentare orală)

- Anda-Mihaela Olaru, Mariana Pinteala, Mihai Barboiu, Luminita Marin, "Synthesis and characterization of new hydrogels based on chitosan and 2-hydroxy-5-

nitrobenzaldehyde", "Conferința Națională de Chimie XXXIV", 4 – 7 Octombrie 2016, Calimănești – Căciulata, Vâlcea, România. (poster)

○ Anda-Mihaela Olaru, Catalina I. Ciobanu, Ionel Mangalagiu, Ramona Danac, "New 4,4'-bipyridine derivatives: synthesis and antimycobacterial activity ", Conferința științifică "Zilele Universității Alexandru Ioan Cuza", 27-29 Octombrie 2016, Iași, România. (prezentare orală)

○ Anda Mihaela Olaru, Andra Bostanaru, Mihai Mares, Mariana Pinteala, Mihai Barboiu, Luminita Marin, "Synthesis and biological properties of a new hydrogels based on chitosan and 2-hydroxy-5- nitrobenzaldehyde", EMN Meeting On Hydrogel Materials 2017, 24 - 28 Aprilie 2017, Amsterdam, Olanda. (poster)

○ Anda-Mihaela Olaru, Ramona Danac, Ionel I. Mangalagiu, "Antimycobacterial activity of some new monoindolizine mono-salt based on 4,4'-bipyridine skeleton", 4^{ème} Colloque Franco-Roumain de Chimie Médicinale, 5-7 Octombrie 2017, Iași, România. (poster)

○ Anda-Mihaela Olaru, Simona Morariu, Gabriela Pricope, Mariana Pinteala, Luminita Marin, "Synthesis and cytotoxicity of of a new hydrogels based on chitosan and 2-hydroxy-5- nitrobenzaldehyde", The Academic Days, XXVI- session of scientific communications – Progress in the science of organic and macromolecular compounds, 5 - 6 Octombrie 2017, Iași, România. (poster)

○ Anda-Mihaela Olaru, Luminita Marin, Simona Morariu, Gabriela Pricope, Mariana Pinteala, Liliana Tartau-Mititelu, "Hydrogels based on chitosan and 5-nitrosalicylaldehyde with potential antitumor activity for local cancer therapy", Zilele Universității "IașiChem2017", 26-27 Octombrie 2017, Iași, România. (prezentare orală)

○ Anda-Mihaela Olaru, Ionel I. Mangalagiu, Ramona Danac, "Synthesis and anticancer activity of some new monoindolizine mono-salt based on 4,4'-bipyridine skeleton", Zilele Universității "IașiChem2017", 26-27 Octombrie 2017, Iași, România. (poster)

Doctorandul mulțumește următoarelor proiecte pentru suportul acordat:

"Prin burse doctorale spre o nouă generație de cercetători de elită", POSDRU/187/1.5/S/155397.

"SupraChem Lab" European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement Nr. 667387 WIDESPREAD 2-2014 pentru suportul financiar.

POSCCE-O 2.2.1, SMIS-CSNR 13984-901, nr. 257/28.09.2010, CERNESIM.

Institutului Național de Sanatate și Institutului Național de Alergii și Boli infecțioase, din SUA, Nr. HHSN272201100012I.

Institutului Național de Cancer (NCI) din SUA.