

Raport științific

Etapa I. Dezvoltarea, caracterizarea și evaluarea capacității antioxidante a unui nou produs pe bază de extract gemoterapic de *Corylus avellana* îmbogățit cu nanocomplexe de crisină/ciclodextrine (CAG-CHR/Cyclo). Evaluarea biocompatibilității in vitro.

Rezumatul etapei:

În etapa I s-a realizat dezvoltarea, caracterizarea și evaluarea capacității antioxidante a unui nou produs pe bază de extract gemoterapic de *Corylus avellana* (CAG) îmbogățit cu nanocomplexe de crisină/ciclodextrine (CAG-CHR/RAMEB și CAG-CHR/HPBCD) precum și evaluarea biocompatibilității in vitro. Caracterizarea chimică a dovedit că CAG este bogat în poliflavonoizi, în special hiperozidă și izocvercitrină, dar și luteolin-7-O-glucozidă, crizină, cvercetină și acid galic și de asemenea are proprietăți importante antioxidante. Crisina a fost formulată cu două β-ciclodextrine diferite pentru a forma complexe de incluziune cu hidroxipropil- (HPBCD) și randomy metilat (RAMEB) β-ciclodextrine la raporturi molare 1: 1. Complexele au fost testate pentru solubilizare în apă. Ameliorarea eficienței a solubilității crisinei a fost detectată în ambele complexe, dar complexul RAMEB a prezentat o solubilizare mai bună a crisinei decât complexul HPBCD. Extractul de gemoterapic de *Coryllus avelana* a fost amestecat atât cu complexe RAMEB-, cât și cu HPBCD-crisină și a fost supus liofilizării. S-au testat diferite rapoarte de extract-complex pentru stabilizarea amestecului prin liofilizare și caracterizate prin analiza cromatografică. Analiza biocompatibilității complexelor CHR/RAMEB, CHR/HPBCD, CAG-CHR/RAMEB, CAG-CHR/HPBCD, s-a realizat pe culturi de celule hepatice stelate umane din linia celulară LX2. Rezultatele testelor MTT, LDH și LIVE/DEAD au demonstrat biocompatibilitatea in vitro a complexelor CAG-CHR/Cyclo în concentrații mai mici de 100 μM.

Activitatea I.1. Obținerea și caracterizarea extractului gemoterapic de *Coryllus avelana*

I.1.1. Prepararea maceratului glicerinic. Mugurii de Alun, *Corylus avellana* L. au fost recoltați, în februarie 2019 și 2020, din flora spontană, pădurea Baciului, Jud. Cluj. Recoltarea s-a realizat conform certificării EcoInspect Ro-008, respectând regulile de bună practică de colectare și biodiversitatea zonei. Masa de plantă recoltată a fost conservată în amestec glicerină – alcool etilic 96 % vol. (1:1). Mugurii au fost identificați de către expertul de la laboratoarele de Controlul Calității de la PlantExtrakt. Extractul din muguri de Alun s-a obținut conform Farmacopeei Franceze respectiv Farmacopeei Europene, monografia 2.1.3, folosind ca și solvent amestec de glicerină – alcool etilic 96 % vol. (1:1). Planta s-a prelucrat în stare proaspătă, conservată în amestec de solvent. Raportul de extracție este 1:20 partea uscată din plantă – solvent. Cantitatea de solvent adăugat s-a calculat conform umidității plantei (tabel 1). Extracția s-a realizat la rece, prin macerare, timp de 20 zile, cu agitări zilnice 2 x 10 minute. După 20 zile de agitare lichidul s-a decantat de pe masa de plantă, iar planta s-a supus presării la 350-400 atm, lichidul presat fiind amestecat cu lichidul decantat. Soluția extractivă astfel obținută este extractul gemoterapic din muguri de Alun (CAG).

I.1.2.Evaluarea profilului fitochimic al extractului

I.1.2.1. Screening inițial prin cromatografie pe strat subțire (CSS). Evaluarea inițială s-a realizat prin CSS, metodă prin care se poate evalua ce clase de compuși activi se regăsesc în extracte.

Condițiile experimentale:

- Placă: silicagel cu indicator de fluorescență la 254 nm (merck, Germania).
- Eluent: pe primele 100 mm dezvoltare cu acetat de etil – metanol – apă (77:15:8, v/v), urmat de uscarea plăcii în aer cald și redevelopare pe 150 mm cu toluen – acetat de etil (93:7, v/v).
- Proba: 1 ml extract diluat la 10 ml cu metanol 1 % se trece peste coloană de extracție SPE cu silicagel C18 (Merck, Germania). Se repetă extracția cu încă 2 serii a câte 1 ml de extract diluat la 10 ml. Componentele reținute se eluează cu 5 ml metanol acidulat cu acid clorhidric la pH = 3-4. Solventul se evaporă sub vid și reziduul se reia cu 1 ml metanol. Se aplică 30 μl, sub formă de bandă de 20 mm.
- Etaloane: acid p-cumaric, miricetina, cvercetina, hiperozida, acid cafeic, acid clorogenic, soluții 0,5-1 mg/ml în metanol. Se aplică câte 10 μl, din fiecare etalon, sub formă de bandă de 20 mm.
- Vizualizare:
 - o În lumină UV la 254 nm, observând stingerea fluorescenței.
 - o În fluorescență la 365 nm.
 - o După pulverizare cu:
 - Reactiv Neu-PEG, în fluorescență la 365 nm.
 - Reactiv anisaldehydă, încălzire 10 min la 105-110°C, în lumină vizibilă.
 - Reactiv Dragendorff, în lumină vizibilă.

În urma screeningului CSS am putut stabili că CAG conține polifenoli, în special din clasa flavonoidelor (fig.1-3) și puține componente lipofile (fig.4), respectiv nu conține alcaloizi (fig.5), ceea ce subliniază siguranța în administrare a acestui extract. Pe baza acestei analize se poate identifica în CAG hiperozida și quercetina din clasa flavonoidelor.

I.1.2.2. Dozarea spectrofotometrică a flavonoidelor totale și a polifenolilor totali

Dozarea spectrofotometrică a flavonoidelor se bazează pe reacția de complexare a ionului aluminiu de către grupările cu oxigen din molecula flavonoidelor, complex care se colorează în galben. Metoda este adaptată din Farmacopeea Română ed. X.

Condițiile experimentale sunt:

Aparat: spectrofotometru Cintra 101, GBC Australia.

Probele: câte 1 ml CAG s-a amestecat cu 5 ml acetat de sodiu 10 % și 3 ml clorură de aluminiu 2,5 %, apoi se completează la 25 ml cu metanol.

Etaloane: câte 1 ml din soluții metanolice de cvercetină având concentrațiile de 2,24; 6,72; 11,20; 15,68 respectiv 22,40 $\mu\text{g/ml}$ se amestecă cu 5 ml acetat de sodiu 10 % și 3 ml clorură de aluminiu 2,5 %, apoi se completează la 25 ml cu metanol.

Blank probe: câte 1 ml CAG s-a amestecat cu 8 ml apă purificată, apoi se completează la 25 ml cu metanol.

Blank etaloane: 8 ml apă purificată adusă la 25 ml cu metanol.

Lungimea de undă: 430 nm, citire după 30 min repaus.

Dozarea spectrofotometrică a polifenolilor se bazează pe realizarea unui complex albastru între grupările fenolice și reactivul fosfowolframic în mediu alcalin. Metoda este adaptată din Farmacopeea Română ed. IX.

Condițiile experimentale sunt:

Aparat: spectrofotometru Cintra 101, GBC Australia.

Probele: câte 0,1 ml CAG s-a amestecat cu 0,5 ml reactiv fosfowolframic, apoi se completează la 25 ml cu carbonat de sodiu 15 %.

Etaloane: câte 0,1 ml din soluții metanolice de acid cafeic având concentrațiile de 12, 20, 28 respectiv 40 $\mu\text{g/ml}$ se amestecă cu 0,5 ml reactiv fosfowolframic, apoi se completează la 25 ml cu carbonat de sodiu 15 %.

Blank probe: câte 0,1 ml CAG se completează la 25 ml cu carbonat de sodiu 15 %.

Blank etaloane: apă purificată.

Lungimea de undă: 715 nm, citire după 2 min repaus.

Fiecare probă s-a prelucrat de 3 ori și s-au realizat pe fiecare probă câte 3 citiri. Rezultatele sunt media aritmetică a determinărilor individuale.

În figurile 6-7 se prezintă curbele de calibrare în cvercetină respectiv acid cafeic, iar în tabelul 2 rezultatele analizelor cantitative spectrale.

Se observă un conținut ridicat de polifenoli din care 5,3 – 7,3 % reprezintă flavonoide. Polifenolii totali sunt în concentrație mai mare în stadiu de evoluție mai timpurie a mugurilor și scade în timpul dezvoltării acestora, iar conținutul de flavonoide evoluează invers fiind mai mic la începutul dezvoltării mugurelui și crește odată cu dezvoltarea acestuia.

Conținutul de polifenoli totali se poate stabili la min. 6 mg/ml, iar cel de flavonoide totale la min. 0,4 mg/ml. În funcție de acest conținut se poate stabili ca perioadă optimă de recoltare a mugurilor începând de la mijlocul lunii februarie, când mugurii sunt mai dezvoltați.

1.1.2.3. Analiza cromatografică pe coloană

Analiza cromatografică pe coloană, HPLC s-a realizat pentru a identifica mai în detaliu polifenolii conținuți de CAG, atât calitativ cât și cantitativ.

Condiții experimentale:

- Aparat: Sistem HPLC Nexera-I, Shimadzu, Japonia cu pompă cuaternară și autosampler.
- Coloană: silicagel-C18 column, Fortis C18, 150 x 2.1 mm x 3 μ m cu precoloană de 5 mm.
- Temperatura coloanei: 25⁰C.
- Faza mobilă: gradient de eluție conform tabel 3.
- Debit: 0.5 ml/min.
- Volum de injectare: 10 μ l.
- Detector: spectrofotometru UV-Vis cu arie de diode (DAD).

Din fiecare extract s-a realizat o diluție 1 la 10 cu metanol. Detectarea s-a realizat la 254 nm și 326 nm pentru acizii fenolici respectiv la 360 nm pentru flavonoide.

Ca și etaloane s-au folosit soluții 0,1-0,2 μ g/ml în metanol din: acid galic, acid elagic, acid cafeic, acid clorogenic, acid ferulic, acid p-cumaric, acid rozmarinic, acid cicoric (acizi fenolici) respectiv luteolin-7-O-glucozid, luteolin, cvercetină, cvercitrină, rutozidă, hiperozidă, izocvercitrină, miricetină, apigenină, crizină, kampferol (flavonoide).

S-au putut identifica și doza pe baza timpilor de retenție și a maximelor de absorbție specifice din spectrele UV-Vis următorii polifenoli: acidul galic, crizina, hiperozida, izocvercitrina, luteolina, luteolin-7-O-glucozida, cvercetina și rutozida.

Din datele prezentate se poate observa că CAG conține cantități mai mari de hiperozidă și izocvercitrină, este de asemenea relativ bogat în luteolin-7-O-glucozidă, crizină, cvercetină și acid galic. Variațiile de conținut sunt relativ mici de la un an la altul.

I.1.2.4. Analiza gaz-cromatografică

Screeningul CSS inițial a evidențiat și posibile componente lipofile în CAG. Analiza gaz-cromatografică cuplată cu spectrometria de masă a urmărit determinarea acestor componente.

Condiții experimentale:

- Aparat: sistem gaz-cromatograf Dani Master, Italia.
- Coloană: SH-Rxi-5ms de 30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m.
- Gaz purtător: azot.
- Debit: ml/min.
- Gradient de temperatură conform tabel 5.
- Identificare: spectrometru de masă, EIS MS, operat de la mase moleculare de la 50 până la 600d altoni și sursa de ioni operat la 200⁰C.
- Bază de date de spectre: NIST MS 2.2.
- Volum injectat: 5 μ l din extracte diluate 1 la 10 cu metanol.

În urma analizei s-au identificat acizi grași liberi dintre care cu o precizie de peste 80 % s-a putut identifica acidul 9-octadecenoic.

Activitatea I.2. Obținerea și caracterizarea nanocomplexelor de crisina/ciclodextrine

I.2.1. Prepararea complexelor crisină-ciclodextrine. Crisina a fost formulată cu două β-ciclodextrine diferite pentru a forma complexe de incluziune cu hidroxipropil- (HPBCD) și randomy metilat (RAMEB) β-ciclodextrine la raporturi molare 1: 1.

I.2.2. Testul de solubilitate. Complexele au fost testate pentru solubilizare în apă. Complexele au fost dizolvate în apă timp de 24 de ore și spectrele de absorbție au fost înregistrate cu spectrofotometru UV. Ameliorarea eficientă a solubilității crisinei a fost detectată în ambii complexe, în timp ce complexul RAMEB a prezentat o solubilizare mai bună a crisinei decât complexul HPBCD (fig. 21)

I.2.3. Testul de solubilitate de fază a fost efectuat prin adăugarea unei cantități excesive cunoscute de pulbere de crisină. Au fost realizate concentrații crescătoare de crisină în ciclodextrine RAMEB/HPBCD (5-80 mM). Tuburile au fost vortexate timp de 30 de secunde pentru a obține dispersii bine amestecate (temperatura camerei, întuneric). După 72 de ore, fiecare probă a fost centrifugată la 15.000 rpm timp de 10 minute.

Probele au fost preluate din supernatantul clar, iar conținutul de crisină al probelor a fost analizat prin spectrofotometrie (Shimadzu UV-1900). Profilurile de solubilitate de fază ale crisinei au fost realizate de trasând solubilitatea crisinei față de concentrația ciclodextrinelor. Constanta de stabilitate (K_s) ale complexelor crisină-CD au fost calculate din diagrame de solubilitate de fază conform următoarei ecuații:

$$K_s = \frac{\text{slope}}{S_0(1 - \text{slope})}$$

S_0 — Solubilitatea crisinei în apă

Eficiența complexării (CE) și raportul molar medicament:ciclodextrina (D: CD) au fost calculate după cum urmează:

$$CE = \frac{\text{slope}}{(1 - \text{slope})}$$

$$D : CD = 1 : \left(1 + \frac{1}{CE}\right)$$

Figura 22 prezintă profilurile de solubilitate ale crisinei în prezența RAMEB și HPBCD. Datorită solubilității limitate în apă a CD, cea mai mare concentrație aplicată a fost de 8 mM. Fiecare derivat de ciclodextrină a reușit să îmbunătățească solubilitatea în apă a crisinei în complexe de ciclodextrină, în mod dependent de concentrație.

I.2.4. Microscopie electronică scanning (SEM)

Morfologia particulelor solide de ciclodextrine, crisină și complexe crisină-ciclodextrină a fost investigată prin SEM (Hitachi S-4300 CFE).

Morfologia crisinei pure și a complexelor de crisină-ciclodextrine au fost examinate prin SEM (Figura 23). Crisina brută a prezentat particule agregate cu diferite forme și cu un spectru larg al dimensiunii particulelor. Particulele HPBCD au prezentat o formă sferică, în timp ce imaginile RAMEB au arătat că majoritatea particulelor sferice au fost sparte. Complexele crisina-HPBCD sau crisină-RAMEB au prezentat o morfologie complet diferită. După procesul de complexare, particulele originale de ciclodextrină și crisină au fost neidentificabile; cu toate acestea, agregatele care conțin particule amorfe mai mici au dezvăluit interacțiunea dintre crisină și ciclodextrine. Noua structură formată contribuie la o solubilitate mai mare și la biodisponibilitatea îmbunătățită a crisinei.

Activitatea I.3. Obținerea și caracterizarea CAG-CHR/Cyclo

Extractul de gemmoterapic de *Coryllus avelana* a fost amestecat atât cu complexe RAMEB-, cât și cu HPBCD-crisină și a fost supus liofilizării. S-au testat diferite rapoarte de extract-complex pentru stabilizarea amestecului prin liofilizare. Cantitatea exces de ciclodextrină a fost, de asemenea, testată pentru stabilizare.

Analiza cromatografică

Analiza cromatografică pe coloană, HPLC s-a realizat pentru a identifica mai în detaliu polifenolii conținuți în produsul final, atât calitativ cât și cantitativ (Sistem HPLC Nexera-I, Shimadzu, Japonia cu pompă cuaternară și autosampler) (fig.24-27).

Activitatea I.4 Analiza biocompatibilității in vitro

În cadrul **activității I.4, P (UB)** a realizat investigarea biocompatibilității *in vitro* a complexelor CAG-CHR/Cyclo sintetizate. S-a evaluat biocompatibilitatea complexelor CHR/RAMEB, CHR/HPBCD, CAG-CHR/RAMEB, CAG-CHR/HPBCD pe culturi de celule hepatice stelate umane din linia celulară LX2. După însămânțare, celulele au fost expuse timp de 24 h la mediu cu diferite concentrații de complexe (10, 50, 100 μ M). În urma expunerii la complexe, s-a evaluat nivelul viabilității celulare la nivel cantitativ prin testul MTT și la nivel calitativ prin Live/Dead. De asemenea, nivelul citotoxicității induse de complexe, a fost evaluat cantitativ prin testul LDH.

În urma realizării testului MTT, s-a obținut un profil descrescător al viabilității celulare care scade odată cu creșterea concentrației complexelor (Fig. 28). În prezența a 10 μ M complexe, viabilitatea celulară nu este scăzută statistic semnificativ față de control. Între complexe diferite testate în această concentrație, nu se observă diferențe semnificative între nivelurile viabilității. 50 μ M din complexe CHR/Cyclo, reduc viabilitatea celulară mai mult față de complexele CAG-CHR/Cyclo, ceea ce sugerează efectul benefic al CAG la nivelul complexului. Dar, niciunul dintre complexe în concentrația de 50 μ M, nu reduc statistic semnificativ nivelurile viabilității celulare. În prezență de 100 μ M de complexe, viabilitatea celulară este statistic semnificativ redusă față de control ($p < 0.05$). Complexele CAG-CHR/Cyclo au menținut un nivel al viabilității celulare mai ridicat față de complexele CHR/Cyclo în toate concentrațiile, și mai ales la 100 μ M. Acest lucru indică influența pozitivă a CAG asupra biocompatibilității complexelor.

Rezultatele testului MTT au fost confirmate și prin testul LDH care indică citotoxicitatea indusă de complexe asupra celulelor hepatice stelate (Fig. 29). Complexele în concentrația 10 μM nu au indus niveluri mai ridicate de citotoxicitate față de control. De asemenea, nici 50 și 100 μM din complexe CAG-CHR/Cyclo nu au afectat celulele în mod statistic semnificativ. Spre deosebire, CHR/Cyclo în concentrația de 50 μM au indus niveluri mai ridicate ale citotoxicității, iar 100 μM a indus niveluri statistic semnificativ crescute ($p < 0.05$) față de control. Acest lucru indică superioritatea complexelor îmbogățite cu CAG în a avea un efect benefic asupra celulelor, față de complexe fără CAG.

În urma realizării testului Live/Dead, au fost obținute imaginile de microscopie de fluorescență prezentate în Fig. 30. Pentru toate complexe testate, se observă o reducere a numărului celulelor vii pe măsură ce concentrația este crescută (10-100 μM). Totuși, complexe CAG-CHR/Cyclo prezintă mai multe celule vii față de CHR/Cyclo, în toate concentrațiile testate. În mod deosebit pentru CAG-CHR/HPBCD 100 μM se observă cele mai multe celule vii comparat cu toate celelalte complexe testate în concentrația de 100 μM . În concentrația de 100 μM , complexe afectează și fenotipul celulelor mai mult, acestea fiind mai rotunde și formează agregate, ceea ce sugerează utilizarea complexelor în concentrații $< 100 \mu\text{M}$.

Așadar, pe baza rezultatelor testelor MTT, LDH și LIVE/DEAD, complexe CAG-CHR/Cyclo s-au dovedit a fi biocompatibile în concentrații mai mici de 100 μM .

Activitatea I.5. Analiza capacitatii antioxidante in vitro (I)

I.5.1. Evaluarea efectului antioxidant

Efectul antioxidant este probabil datorat conținutului bogat în polifenoli de tipul flavonoide, acizi fenolici, taninuri.

Efectul antioxidant al acestor extracte s-a evidențiat prin mai multe metode spectrale: DPPH calculând IC_{50} , FRAP și CUPRAC, folosind metodele standard.

Se observă un potențial antioxidant mai mare la extractele cu un conținut mai mare de polifenoli totali la determinarea DPPH, metodă care evaluează un potențial antioxidant total. Potențialul antioxidant relativ la ionii feros și cupros arată un potențial sensibil mai mare la extractele cu un conținut mai ridicat de flavonoide.

Se poate concluziona că produsul analizat potențial antioxidant semnificativ, corelabil cu conținutul de polifenoli.

I.5.2. Evaluarea efectului anti-ureazic

Ureaza este o enzimă care scindează ureea și este corelat cu virilitatea anumitor bacterii ureazo-dependente.

Efectul anti-ureazic s-a determinat prin metoda standard, spectrofotometric.

Se poate observa că extractele au un efect inhibitor mediu asupra ureazei și relativ similar de la o perioadă de dezvoltare la alta respectiv de la un an la altul.

Activitatea 1.6. Diseminare

Articole ISI:

Ferenc Fenyvesi, Thi Le Phuong Nguyen, Ádám Haimho, Ágnes Rusznyák, Gábor Vasvári, Ildikó Bácskay, Miklós Vecsernyés, Simona-Rebeca Ignat, Sorina Dinescu, Marieta Costache, Alina Ciceu, Anca Hermenean, Judit Váradi. 2020. Cyclodextrin Complexation Improves the Solubility and Caco-2 Permeability of Chrysin, *Materials*, 13, 3618; doi:10.3390/ma13163618

Ignat, S.R.; Dinescu, S.; Váradi, J.; Fenyvesi, F.; Nguyen, T.L.P.; Ciceu, A.; Hermenean, A.; Costache, M. Complexation with Random Methyl- β -Cyclodextrin and (2-Hydroxypropyl)- β -Cyclodextrin Promotes Chrysin Effect and Potential for Liver Fibrosis Therapy. *Materials* 2020, 13, 5003. DOI: 10.3390/ma13215003

03.12.2020

Director proiect,

Prof.dr. Anca Hermenean

