

UNIVERSITATEA BUCUREȘTI

FACULTATEA DE CHIMIE

REZUMAT - TEZĂ DE DOCTORAT

**STUDII ELECTROCHIMICE ȘI SPECTRALE ALE
REACTIVITĂȚII ÎN PROCESE REDOX A UNOR
MEDICAMENTE ANTITUMORALE CU STRUCTURĂ
ANTRACICLINICĂ**

Doctorand: ȘERBĂNESCU (ANGHELACHE) IULIANA FRANCISCA

Conducător științific: PROF. DR. ELENA VOLANSCHI

Aprilie 2012

CUPRINS

Introducere.....	4
Obiectivele tezei.....	6
Materiale, aparatură și metode.....	7
Contribuții originale – Rezultate și Discutii.....	8
Obiectivul 1. Studiul mecanismului de reducere a medicamentelor antraciclinice.....	8
Doxorubicină.....	8
1. Studii electrochimice - Voltametrie ciclică și voltametrie liniară.....	8
a. Mediu aprotic, dezaerat.....	8
b. Mediu aprotic, aerat.....	9
c. Mediu protic (DMSO + apă), dezaerat.....	9
d. Mediu protic (DMSO + apă), aerat.....	10
e. Mediu apos (TFS/TF), dezaerat.....	11
2. Studii spectrale.....	12
2.1 Spectroscopie de absorbție UV-VIS.....	12
2.2. Spectroscopia de rezonanță electronică de spin.....	13
Epirubicină.....	14
Studii electrochimice - Voltametrie ciclică și voltametrie liniară.....	14
a. Mediu apos (TFS/TF), dezaerat.....	14
b. Mediu apos (TFS/TF), aerat.....	14
Obiectivul 2. Studiul sistemului micelar de transport al medicamentelor - Interacția doxorubicinei și mitoxantronei cu dodecilsulfatul de sodiu (SDS).....	15
Doxorubicină – SDS.....	15
1. Studii electrochimice - Voltametrie ciclică și voltametrie liniară.....	15
2. Studii spectrale.....	15

2.1 Spectroscopie de absorbție UV-VIS.....	15
2.2. Spectroscopia de fluorescență.....	17
Mitoxantronă - Mediu apos (TFS/TF), dezaerat.....	18
Studii electrochimice - Voltametrie ciclică și voltametrie liniară.....	18
Mitoxantronă – SDS.....	19
1. Studii electrochimice - Voltametrie ciclică și voltametrie liniară.....	19
2. Studii spectrale.....	20
Spectroscopie de absorbție UV-VIS.....	20
Obiectivul 3. Interacția medicamentului înglobat în micelă cu materialul genetic (ADN dublu catenar) la pH fiziologic	22
Mitoxantronă -SDS micelar - ADN dublu catenar.....	22
1. Studii electrochimice - Voltametrie ciclică și voltametrie liniară.....	22
2. Studii spectrale - Spectroscopie de absorbție UV-VIS.....	24
Concluzii.....	25
Bibliografie.....	30
Lista lucrărilor publicate.....	31

INTRODUCERE

De la descoperirea lor în anii '60 ai secolului XX, antraciclilinele constituie principala clasă de medicamente anticanceroase utilizate în tratamentul diverselor forme de cancer localizat sau generalizat. Mecanismul lor de acțiune la nivelul celulei tumorale implică interacția cu acizii nucleici, ceea ce induce apoptoza celulei respective, producerea de radicali liberi, precum și efecte secundare ca influențarea acțiunii helicazelor, perturbări ale membranei și activarea reductivă mono- și bielectronică a medicamentului. Aceste specii pot transfera electronul către oxigenul molecular, cu formarea anionului superoxid și a speciilor reactive ale oxigenului (ROS).

Într-un timp relativ scurt s-a observat că aceste medicamente ridică probleme serioase din punct de vedere terapeutic, în sensul că în celulele tumorale se dezvoltă o rezistență la antibiotic, iar în țesuturile sănătoase, o toxicitate (în special la nivelul țesutului cardiac) dependentă de doză.

Mecanismul de transport al acestor medicamente către celula țintă include transportul pasiv (difuzia liberă) prin membrană a medicamentului neionizat. În cazul celulelor care au dezvoltat o rezistență la antibiotice (MDR), problema majoră o ridică transportul activ ATP – dependent al medicamentului împotriva unui gradient de concentrație.

Caracterizarea fizico-chimică a sistemelor de transport al medicamentelor antitumorale atât în condiții *in vitro* cât și *in vivo* reprezintă la ora actuală o direcție de cercetare de importanță majoră în chimia farmaceutică cu un impact medical ridicat în terapia cancerului. Cercetări din ultimii ani arată că eficacitatea tratamentului poate fi substanțial îmbunătățită prin încapsularea substanței active în diverse sisteme de transport, care să asigure transportul către celula țintă, minimalizând degradarea medicamentului și evitând astfel efectele secundare nocive.

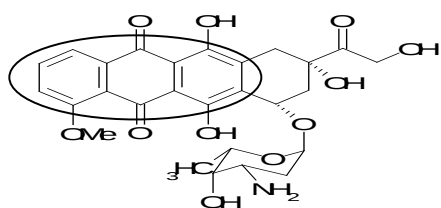
În acest context, utilizarea micelilor oferă o serie de avantaje comparativ cu alte sisteme ca lipozomii și/sau polimerii: micellele pot fi obținute ușor și reproductibil în cantități mari și, datorită structurii lor core-shell și solubilității în apă, diverși liganzi pot fi atașați în stratul superficial extern, optimizând eliberarea controlată a medicamentului și specificitatea efectului farmacologic. De asemenea, micellele de surfactant au fost utilizate ca sisteme model simplificat în studiul interacției medicament - membrană biologică, care induce modificarea proprietăților fizico-chimice ale medicamentului (solubilitate, proprietăți spectrale, electrice și acido-bazice). Evaluarea cantitativă a efectului micelilor asupra proprietăților medicamentului implică

determinarea constantei de legare medicament - micelă, coeficientul de partiție medicament - apă, parametri esențiali în înțelegerea interacției cu membranele biologice sau a corelației structură - reactivitate a medicamentului.

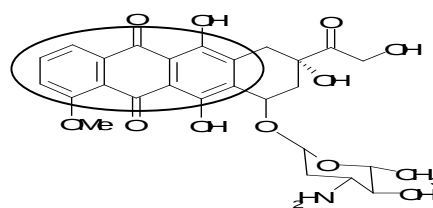
Dacă spectroscopia de absorbție și emisie sunt tehnicile cele mai utilizate în aceste studii în ultimele decenii, metodele electrochimice sunt de dată mult mai recentă. Versatilitatea acestor metode permite simularea diverselor medii biologice și în corelație cu metodele spectrale, prezintă o serie de avantaje în caracterizarea interacțiilor medicament – surfactant în diferite condiții și medii. Este de menționat complementaritatea rezultatelor obținute prin cele două categorii de metode: metodele electrochimice oferă informații despre stoechiometria interacției și coeficienții de difuzie ai speciilor de medicament liber în soluție sau atașat miclei, iar cele spectrale, mult mai sensibile la modificări structurale sau de aciditate în molecula de medicament, permit determinarea coeficienților de absorbție ai diferitelor specii implicate și evidențiază contribuția diferiților parametri structurali la interacție.

Plecând de la aceste premize, teza de față își propune un studiu prin metode electrochimice și spectrale de absorbție, emisie și/sau rezonanță electronică de spin al interacției unor medicamente antitumorale cu structură antraciclinică sau analogi structurali - model cu un surfactant anionic, dodecil sulfat (laurilsulfat) de sodiu - SDS, în absența și în prezența acidului dezoxiribonucleic dublu catenar (ADNdc).

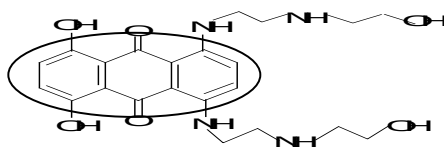
Strategia adoptată se bazează pe investigarea a trei compuși model - doxorubicina, epirubicina (epimerul 4' al doxorubicinei) și mitoxantrona.



doxorubicină



epirubicină



mitoxantronă

Acești compuși au structură antrachinonică comună, diferențele între proprietățile fizice și chimice rezultând din natura diferită a substituenților.

Obiectivele tezei au fost urmărite pe acești compuși – model și ele sunt următoarele:

- ***Studiul mecanismului de reducere a medicamentelor antraciclinice în mediu apos și neapos, în prezența și absența oxigenului*** prin metode electrochimice (voltametrie ciclică și liniară) și spectrale (spectrometrie de absorbție UV-VIS și de rezonanță electronică de spin). În scopul studierii proprietăților cardiotoxice, se vor evidenția și discuta intermediarii radicalici ai medicamentului. Natura solventului în care au fost realizate experimentele, precum și conținutul acestuia în oxigen, constituie modele experimentale simple care mimează condițiile existente *in vivo*, utilizate cu scopul a înțelege și explica mecanismul de acțiune al acestui tip de medicamente antitumorale.

- ***Studiul sistemului micelar de transport al medicamentelor antraciclinice sau analogi structurali***, realizat prin analiza interacției cu un surfactant anionic (laurilsulfat de sodiu - SDS) care formează miclele de tip sferic în soluție apoasă, prin metode electrochimice (voltametrie ciclică și liniară) și spectrale (spectrometrie de absorbție UV-VIS și de fluorescență). S-a ales un surfactant anionic ca partener la interacție deoarece aceste medicamente sunt încărcate pozitiv la pH fiziologic, ceea ce justifică alegerea tamponului fosfat ca solvent în experimentele noastre. Pe de altă parte sunt foarte bine cunoscute proprietățile de micelizare a SDS-ului. Micromediul hidrofob creat în jurul medicamentului înglobat în micelă constituie un model simplu pentru studiul interacției medicament - membrane biologice. Scopul acestui studiu preliminar îl constituie îmbunătățirea modalității de administrare / transport intracelular al medicamentului. De asemenea, aceste rezultate constituie o bază pentru investigarea formulei lipozomale a acestor compuși.

- ***Analiza interacției medicamentului înglobat în micelă cu materialul genetic (ADN dublu catenar) la pH fiziologic***, utilizând metode electrochimice (voltametrie ciclică și liniară) și spectrale (spectrometrie de absorbție UV-VIS). Compararea caracteristicilor sistemelor medicament înglobat în micelă – ADN *versus* medicament – ADN (interacție care a constituit obiectul unor studii anterioare) permite evidențierea diferențelor / avantajelor care apar ca urmare a utilizării miclelor pentru transportul medicamentului.

MATERIALE, APARATURĂ ȘI METODE

Reactivii au fost procurați de la *Sigma* (doxorubicina, epirubicina, mitoxantrona - sub formă de clorhidrați) și folosiți ca atare, fără a fi purificați. Concentrațiile de medicament utilizate sunt între 10^{-2} - 10^{-6} M. Ca electroliți în soluții s-a folosit tetrabutilamoniu tetrafluoroborat, bromura de tetrametilamoniu, tamponul fosfat sau tamponul fosfat salin. În unele situații s-a utilizat dimetilsulfoxidul (DMSO) ca solvent, cu adaos controlat de apă. Pentru studiile în prezența oxigenului, s-a barbotat aer. Pentru îndepărtarea oxigenului din mediu, s-a barbotat un gaz inert. Laurilsulfatul (dodecilsulfatul) de sodiu (SDS) s-a folosit în concentrații de 10^{-4} - 10^{-1} M preparat în apă distilată sau TMAB 0.1M. S-au preparat soluții apoase de ADNdc din timus de vițel. În cazul titrării cu ADN a unui amestec medicament - SDS, acesta a fost preparat în TFS astfel încât concentrația surfactantului să fie mai mare decât concentrația critică micelară în prezența medicamentului și s-a lăsat la incubat 30-40 minute la temperatura camerei, pentru a se asigura formarea micelilor și înglobarea medicamentului în micle.

În cazul *metodelor electrochimice*, celula de electroliză a fost echipată cu trei electrozi. S-au utilizat combinele electrochimice **Voltalab 32** și **Voltalab 40**.

În cazul *spectroelectrochimiei*, domeniul de potențial aplicat a fost între -0.9V și -0.5V, cu o celulă de electroliză echipată cu trei electrozi, iar aparatul - spectrofotometru **C. Zeiss Jena** și **Unicam (Helios 4)**.

Pentru obținerea *spectrelor RES*, s-a folosit spectrometrul **Jeol JES-3B**, celula de electroliză fiind constituită din aceiași trei electrozi menționați anterior la spectroelectrochimie. Simularea spectrelor RES s-a realizat cu programul **WinSim**.

În cazul *spectrometriei de absorbție UV-VIS* s-a folosit aparatul **Unicam (Helios 4)** cuplat cu programul *Vision*. Când s-a realizat titrarea cu SDS sau ADN, agentul de titrare a fost adăugat atât în celula de referință, cât și în celula cu proba de studiat pentru a exista același indice de refracție.

În cazul *spectrometriei de fluorescență*, lărgimea fantei la excitare și emisie a fost de 10nm, iar valoarea raportului semnal/ zgomot a fost întotdeauna între 300 și 400.

În cele ce urmează se prezintă principalele contribuții originale, rezultate experimentale și concluziile obținute. Numerotarea figurilor și a referințelor este cea din teză.

CONTRIBUȚII ORIGINALE - REZULTATE ȘI DISCUȚII

Obiectivul 1. Studiul mecanismului de reducere a medicamentelor antraciclinice [128]

Doxorubicină - 1. Studii electrochimice - Voltametrie ciclică și voltametrie liniară

a. Mediu aprotic (DMSO), dezaerat

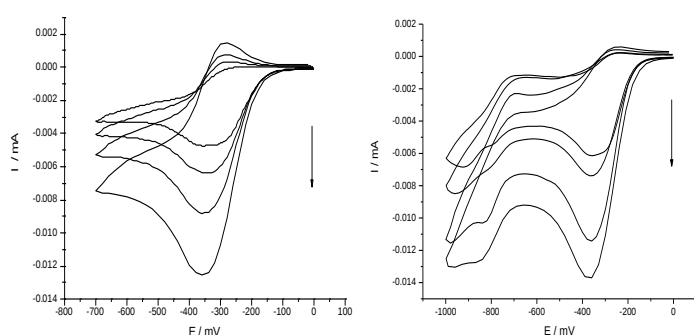


Fig.5 și 11 Voltamograme ciclice – doxorubicină $1.22 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ (DMSO / 0.1 M TBABF_4) ($v = 50, 100, 200, 400$ și/sau 600 mV/s)

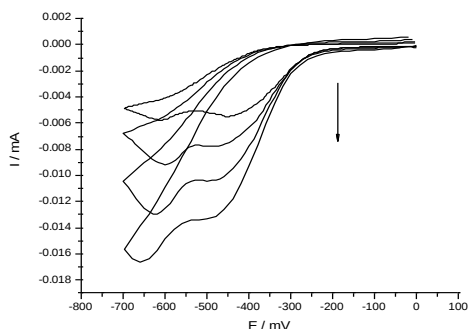
În domeniul de potențial $0/-0.7 \text{ V}$ se observă o singură undă de reducere; extinzând domeniul de potențial până la -1 V se constată apariția celei de-a

doua unde de reducere. Cele două unde corespund unor sisteme EC și se caracterizează prin următoarele valori:

	UNDA I		UNDA II	
	VC	RDE	VC	RDE
$k_f / \text{cm/s}$	$(2.6 \pm 0.1) \cdot 10^{-2}$	$2.3 \cdot 10^{-2}$	$(5.6 \pm 1.8) \cdot 10^{-3}$	$15.6 \cdot 10^{-3}$
$E^{0'} / \text{V}$	-0.315 ± 0.005	-0.330	-0.762 ± 0.027	-0.759
k / s^{-1}	0.16		0.13 ± 0.04	
$D_o / \text{cm}^2/\text{s}$	$5.1 \cdot 10^{-6}$	$4.4 \cdot 10^{-6}$	$1.6 \cdot 10^{-6}$	$17.5 \cdot 10^{-6}$
n / α_n		1.17		0.49

Tabel Valorile parametrilor electrochimici pentru cele două unde

b. Mediu aprotic(DMSO),aerat



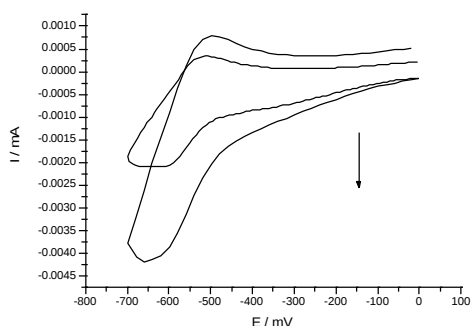
În prezența oxigenului, se remarcă scindarea primei unde și dispariția contrapicului anodic, potențialul deplasându-se spre valori negative comparativ cu soluția neaerată. Pentru prima undă, sistemul se caracterizează prin coeficientul de difuzie $D_o = 3.5 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$.

Fig.16 Voltamograme ciclice - doxorubicină $1.22 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ (DMSO/0.1M TBABF₄) în domeniul -0.7 / 0V ($v = 50, 100, 200, 400 \text{ mV/s}$)

Se constată că potențialul celei de-a doua unde este situat în domeniul reducerii oxigenului molecular în DMSO (-0.73V *versus* SCE [125]). În aceste condiții se poate presupune în acord cu date din literatură [129] formarea unui complex doxorubicină – oxigen molecular, care ar justifica ireversibilitatea procesului și apariția unei noi unde la un potențial mai negativ. Posibilitatea transferului de electroni către oxigenul molecular competiționează cu protonarea anionului radical în etapa chimică, după cum se observă prin scăderea dramatică a raportului I_{pa}/I_{pc} corespunzător primei unde la aerare.

c. Mediu protic (DMSO + apă), dezaerat

Voltamogramele ciclice obținute în DMSO cu adaosuri controlate de apă sunt prezentate în **Fig.18**. Sistemul poate fi caracterizat prin următoarele valori: constanta transferului de



electroni $k_f = (6.3 \pm 0.9) \cdot 10^{-3} \text{ cm/s}$ (mai lent decât în absența apei, $(26 \pm 1) \cdot 10^{-3} \text{ cm/s}$), potențialul formal $E^{0'} = -0.571 \pm 0.006 \text{ V}$, constanta reacției chimice $k = 0.19 \text{ s}^{-1}$ și coeficientul de difuzie $D_o = 3.9 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$.

Fig.18 Voltamograme ciclice - doxorubicină $3.94 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ (DMSO/H₂O 6/1 v/v, 0.1M TBABF₄) în domeniul -0.7 / 0V ($v = 100, 400 \text{ mV/s}$)

Deci, în mediu aprotic cu adaos controlat de apă există un mecanism EC, reacția chimică cea mai probabilă fiind protonarea speciei obținută în urma primului transfer de electroni.

Comparând informațiile obținute în cazul doxorubicinei în mediu aprotic (DMSO) cu mediul protic (DMSO+H₂O 6/1, v/v) se observă că valorile coeficientului de difuzie al speciei oxidate și a constantei de reacție sunt aproximativ egale, ceea ce conduce la presupunerea că în ambele condiții se formează aceeași specie, anume radicalul semichinonic protonat (AH[•]). Deci, cele două medii sunt foarte asemănătoare, semnificativ fiind conținutul în protoni.

d. Mediu protic (DMSO + apă), aerat

La adaos de apă și aer, unda corespunzătoare primului proces se deplasează către valori ale potențialului mai pozitive, comparativ cu sistemul dezaerat.

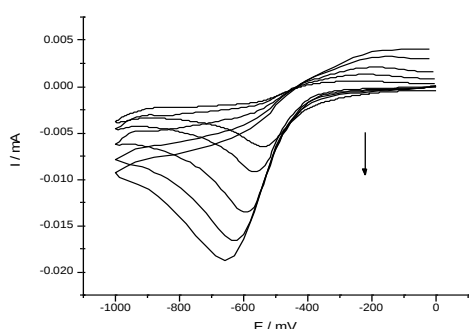


Fig.20 Voltamograme ciclice - doxorubicină $3.94 \cdot 10^{-4}$ M (DMSO/H₂O 6/1 v/v, 0.1M TBABF₄) în domeniul -1/0V ($v = 50, 100, 200, 400, 600$ mV/s)

Sistemul se caracterizează prin potențialul formal $E^0 = -0.391 \pm 0.023$ V, constanta reacției chimice $k = 0.13 \pm 0.06$ s⁻¹ și coeficientul de difuzie $D_0 = 4.5 \cdot 10^{-5}$ cm²/s. Sistemul corespunde unui caz EC.

Existența probabilă a unor complecși cu oxigenul în mediul de reacție poate fi ușor sesizabilă (**Fig.22**).

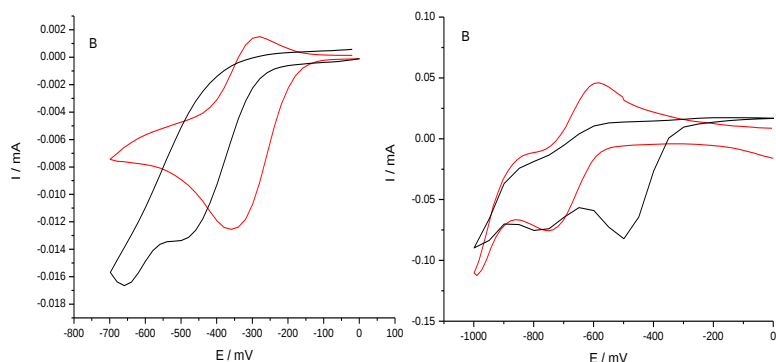


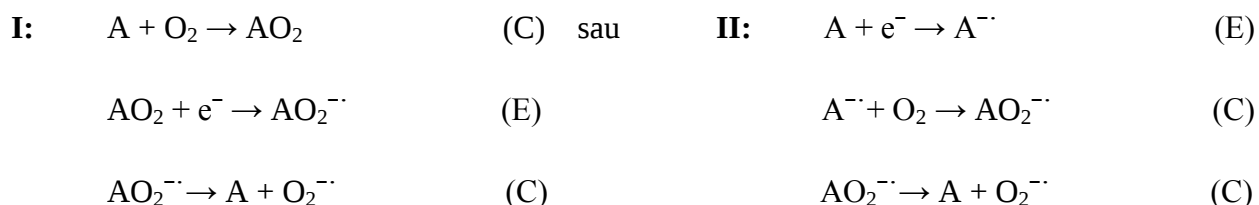
Fig.22 Influența oxigenului dizolvat asupra primei unde de reducere: A - mediu aprotic (DMSO, doxorubicină $1.22 \cdot 10^{-3}$ M, $v=0.4$ V/s), B - mediu protic (TF, doxorubicină 10^{-2} M, $v=0.1$ V/s); roșu - dezaerat, negru - aerat

În mediu aprotic prima undă este scindată, se deplasează către valori mai negative ale potențialului și nu prezintă contrapic anodic, ceea ce indică faptul că anionul radical semichinonic este implicat într-o reacție chimică ireversibilă, care are putea fi sau cu oxigenul molecular sau cu impuritățile protice din solvent. În același timp apare o nouă undă la un potențial mai negativ, în apropierea potențialului de reducere al oxigenului molecular în DMSO.

Această undă poate fi atribuită fie reducerii oxigenului în DMSO, fie reducerii complexului medicament – oxigen singlet ($AO_2^{\cdot\cdot}$) format, conform mecanismelor prezentate în literatură [129]. Absența contrapicului anodic pare să susțină cea de-a doua variantă, deoarece este cunoscută reversibilitatea reducerii oxigenului în DMSO.

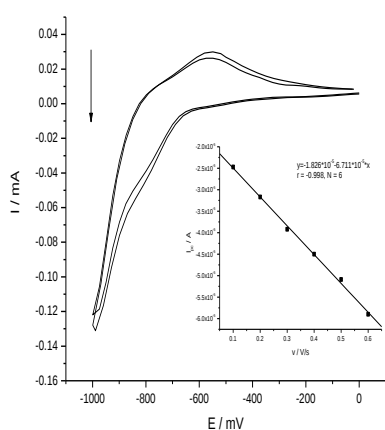
Pe de altă parte, în mediu protic neutru (**Fig.22B**) apare o nouă undă formată la potențiale mai pozitive comparativ cu prima undă de reducere a medicamentului în TF, care este ireversibilă. Această undă ar putea fi atribuită reducerii oxigenului molecular, care are loc la potențiale mai pozitive în mediu protic.

Ținând seama de datele din literatură [129], pot fi propuse două mecanisme:



adică un mecanism de tip CEC (**I**) sau ECC (**II**). Rezultatele noastre electrochimice discutate mai sus arată că fiind mai probabil mecanismul II.

e. Mediu apos (TFS/TF), dezaerat



Se constată că pentru viteze de baleiere mari există o dependență liniară între densitatea de curent și viteza de baleiere, ceea ce sugerează faptul că peste unda de difuzie se suprapune unda de adsorbție.

Fig.24 Voltamograme ciclice în domeniul -1 / 0V ($v = 500, 600\text{mV/s}$); **inset – Fig.25** Dependența curentului de pic catodic de viteza de baleiere - doxorubicină $1 \cdot 10^{-4}\text{M}$ (TFS pH = 7.09)

Astfel, din analiza adsorbției se obține valoarea concentrației superficiale a speciei oxidate, $5.6 \cdot 10^{-10}\text{mol/cm}^2$ adsorbită pe electrodul de platină utilizat. Din dependența Laviron se

pot extrage informații cinetice asupra procesului de la suprafața electrodului, și anume se determină valorile $\alpha = 0.56$ pentru coeficientul de transfer și $k_s = 8.7s^{-1}$ pentru constanta de viteză aparentă a transferului de electroni la suprafața electrodului (determinate din viteza reacției catodice).

În soluție apoasă, doxorubicina prezintă o singură undă de reducere bielectronică, urmată cel mai probabil de o reacție chimică de protonare.

2. Studii spectrale - 2.1 Spectroscopie de absorbție UV-VIS

Spectrele de absorbție UV-VIS au fost înregistrate în urma electrolizei la o valoare a potențialului după prima undă de reducere, la temperatura camerei (**Fig.27**). Se observă o scădere în timp a absorbanței benzilor de la 480 și 500nm, o creștere a absorbanței benzii de la 357nm și apariția altor două benzi la cca 520 și 585nm, cu existența a două puncte izosbestice pe la 420 și 550nm. Se mai observă că valoarea absorbanței de la 480nm scade în timp și aproape dispare complet, iar banda de la 500nm se deplasează ușor batocrom. Se observă, de asemenea, că absorbanta de la 357nm crește la electroliză prelungită, iar banda de la 585nm devine asimetrică,

cu un umăr la 640nm. La oprirea electrolizei și expunerea soluției la aer, benzile de la 520 și 585nm scad și se reface parțial banda de absorbție a compusului inițial (A). Astfel, această bandă a fost atribuită anionului semichinonic (AH^-), iar cea de la 520nm anionului radical ($A^{\cdot-}$).

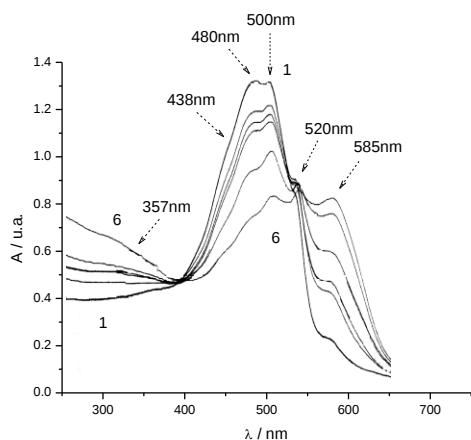
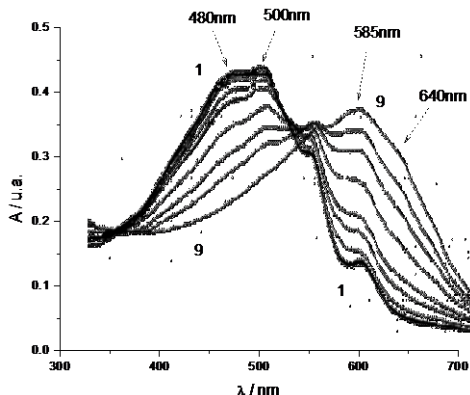


Fig.27 Spectrele de absorbție - doxorubicină $8 \cdot 10^{-5}$ M (DMSO / 0.1M TBABF₄ dezaerat)



La adaosul exogen de bază (hidroxid de tetrabutil amoniu, TBOH) în DMSO (**Fig.8**) se observă un comportament similar, ceea ce permite atribuirea benzii de la 585nm anionului semichinonic (AH^-),

Fig.28 Spectrele de absorbție - doxorubicină (reducere chimică cu terț-butoxid de potasiu)

obținut fie prin protonarea dianionului, fie prin disocierea grupării fenolice din ciclu. Odată cu apariția benzii de la 640nm, procesul devine ireversibil, iar compusul inițial este doar parțial recuperat.

2.2 Spectroscopia de rezonanță electronică de spin (RES)

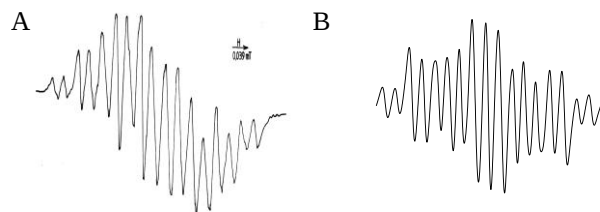
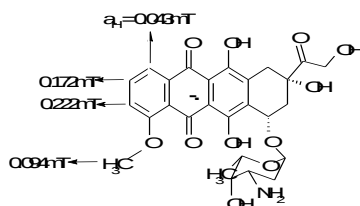
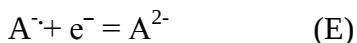
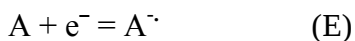


Fig.29 Spectrul RES obținut prin reducerea electrochimică a doxorubicinei $1.22 \cdot 10^{-3} \text{M}$ (DMSO dezaerat) (A) experimental, (B) simulat și atribuirea constantelor de scindare hiperfină



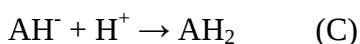
Distribuția constantelor de scindare hiperfină atestă delocalizarea electronului impar pe fragmentul antrachinonic, deci o structură caracteristică de anion radical semichinonic.

În concluzie, coroborând toate datele experimentale spectrale și electrochimice, se poate propune următorul mecanism de reducere pentru doxorubicină în solvenți aprotici dezaerați, care, fiind utilizați ca atare (fără anhidrizare specială) conțin totuși urme de protoni:



În mediu aerat, posibilitatea transferului de electroni către oxigenul molecular competiționează cu protonarea anionului radical în etapa chimică.

În mediu protic are loc încă o etapă de protonare a dianionului



conducând la produsul final de reducere, ceea ce corespunde unui mecanism ECECC.

Epirubicină - Studii electrochimice - Voltametrie ciclică și voltametrie liniară

a. Mediu apos (TFS/TF), dezaerat

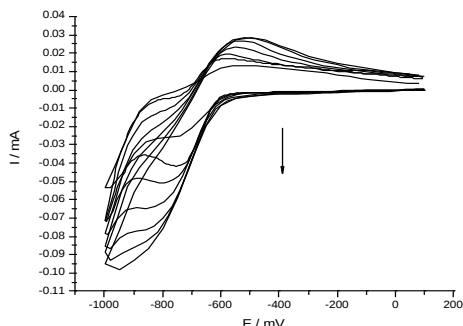


Fig.30 Voltamograme ciclice - epirubicină 0.01M (TF pH=7.0) ($\nu = 50, 100, 200, 400, 600, 800, 1000 \text{ mV/s}$)

Sistemul se caracterizează prin:

	VC	RDE
$k_f / \text{cm/s}$	$1.6 \cdot 10^{-3}$	
$E^{0'}$	-0.685 ± 0.021	-0.691
$D_o / \text{cm}^2/\text{s}$	$0.9 \cdot 10^{-6}$	

b. Mediu apos (TFS/TF), aerat

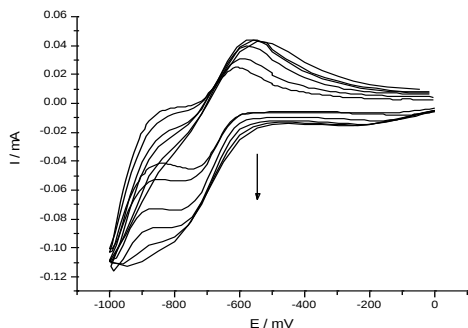
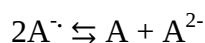
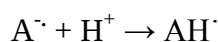
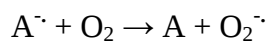


Fig.35 Voltamograme ciclice - epirubicină 0.01M (TF pH=7.0) ($\nu = 50, 100, 200, 400, 600, 800, 1000 \text{ mV/s}$)

Sistemul se caracterizează prin: constanta transferului de electroni $k_f = (1.9 \pm 0.4) \cdot 10^{-3} \text{ cm/s}$, potențialul formal $E^{0'} = -0.664 \pm 0.006 \text{ V}$ și coeficientul de difuzie $D_o = 1.1 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$.

Epirubicina în mediu apos prezintă o reactivitate crescută pentru anionul radical semichinonic ($A^{\cdot-}$), care poate fi implicat în următoarele reacții competitive:

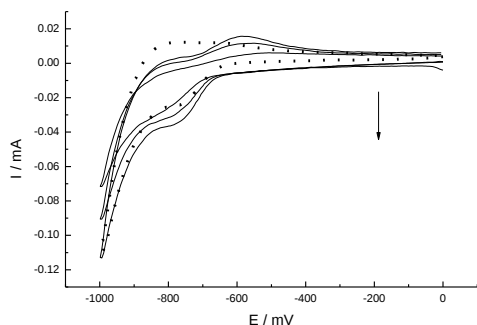


Mai probabil pentru formarea complexului medicament - oxigen molecular pare mecanismul ECC (mecanismul II, pag. 11)

Obiectivul 2. Studiul sistemului micelar de transport al medicamentelor - Interacția doxorubicinei și mitoxantronei cu dodecilsulfatul de sodiu (SDS) [135-137]

Doxorubicină – SDS - 1. Studii electrochimice - Voltametrie ciclică și liniară

În urma adăugării de SDS, s-a studiat doar primul proces de reducere, pe intervalul de potențial -1 / 0V, la diferite viteze de baleiaj (**Fig.37**). Trebuie precizat că doar acest set de



experimente a fost realizat la o tărie ionică mai mare (0.25), restul experimentelor fiind efectuate la o tărie ionică cuprinsă între 0.011 – 0.15.

Fig.37 Voltamograme ciclice - doxorubicină 10⁻⁴M (TMAB 0.1M/TF pH=7.09) în prezența SDS în concentrație de 0.00 (*linie punctată*), 3.8, 9.26 și 10.96mM (v=0.1V/s)

Adiția treptată de surfactant la o soluție apoasă de doxorubicină determină o deplasare a picului catodic către valori mai negative de potențial și apariția contrapicului anodic; în plus se observă că la concentrații mai mari decât CCM, valoarea potențialelor redox devine constantă. Valoarea CCM este de $(1.81 \pm 0.16) \cdot 10^{-3} \text{M}$, fost determinată conform următoarei ecuații [160]:

$$\lg_{\text{CCM}} = -3.65 - 0.57 \cdot \lg[\text{electrolit}]$$

Variația potențialului formal $\Delta E^{0'}$ (20mV) față de valoarea în absența SDS-ului sugerează o interacție slabă între surfactant și medicament. Din variația potențialului cu concentrația de surfactant, se obțin următoarele valori pentru constanta de complexare $K = 295 \text{M}^{-1}$ și pentru numărul de liganzi $p = 1.025$, ceea ce corespunde formării unui complex doxorubicină: micelă 1:1. Din variația curentului cu concentrația de SDS, se obține de asemenea constanta de complexare de $274.13 \pm 104.87 \text{M}^{-1}$.

2. Studii spectrale - 2.1 Spectroscopia de absorbție UV-VIS

În urma titrării cu SDS se observă o scădere a maximelor de absorbție de la 480 și 500nm până la o valoare a concentrației de SDS corespunzătoare CCM, urmată de creșterea acestora, existând deci astfel două procese (**Fig.41A,B**).

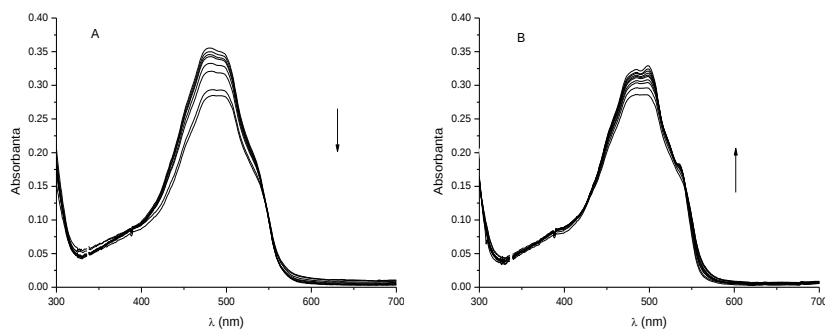


Fig.41 Spectre de absorbție - doxorubicină $1.55 \cdot 10^{-5} \text{M}$ (TF pH=7.09) A - procesul I (domeniu premicelar); B - procesul II (domeniu postmicelar)

Aceste fenomene (proces) sunt mai bine evidențiate

în dependența A_{480} de concentrația de SDS.

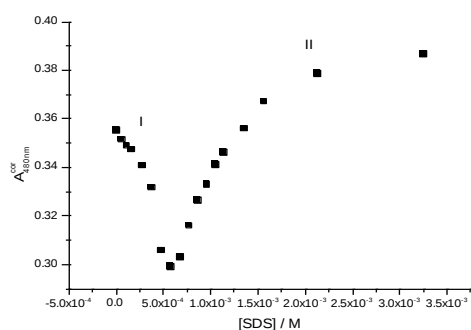


Fig.42 Dependența absorbanței A_{480} de concentrația de SDS adăugat la o soluție de doxorubicină $3.09 \cdot 10^{-5} \text{M}$ (TF pH=7.09)

Valoarea CCM pentru surfactant în prezența doxorubicinei a fost determinată ca fiind de $(7.97 \pm 0.62) \cdot 10^{-4} \text{M}$, corespunzătoare minimului curbei din **Fig.42**.

Fiecare proces a fost analizat separat corespunzător unei interacții 1:1. Prin fittarea dependenței $A = f(\text{SDS})$, pentru procesul I se obțin valorile constantei de interacție $K = (9.66 \pm 0.67) \cdot 10^3 \text{M}^{-1}$ și $\epsilon_b = 8\,755.44 \pm 56.33 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$. Pentru procesul II, rezultatele obținute sunt $K = (1.45 \pm 0.08) \cdot 10^3 \text{M}^{-1}$ și $\epsilon_b = 13\,325.1 \pm 87.78 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$.

Conform datelor din literatură [64], raportul A_{500}/A_{480} oferă informații privind repartizarea medicamentului în soluție și surfactant (**Fig.45**), adică între faza citosolică și faza membranară: valori mici (subunitare) ale raportului A_{500}/A_{480} corespund unui mediu hidrofil al medicamentului – medicamentul în soluție, iar valori mari (supraunitare) - unei înconjurări hidrofobe – medicamentul înglobat în micelă.

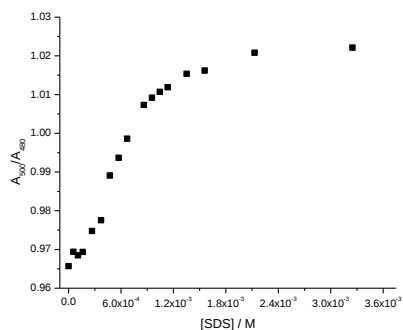


Fig.45 Variația raportului A_{500}/A_{480} funcție de concentrația de SDS adăugat pentru o soluție de doxorubicină $3.1 \cdot 10^{-5} \text{M}$ (TF pH=7.05)

În concluzie, o tărie ionică mare determină scăderea valorii

constantei de interacție, fapt care se poate vedea comparând constanta de interacție pentru procesul II obținută prin metode electrochimice cu cea obținută prin spectroscopie de absorbție.

2.2 Spectroscopia de fluorescență

În urma titrării cu SDS a unei soluții de doxorubicină se observă o scădere a intensității fluorescenței celor două maxime de la 554 și 587nm până la o anumită valoare a concentrației SDS-ului corespunzătoare valorii CCM, urmată de creșterea acestora, existând deci astfel două

procese (Fig.46A,B).

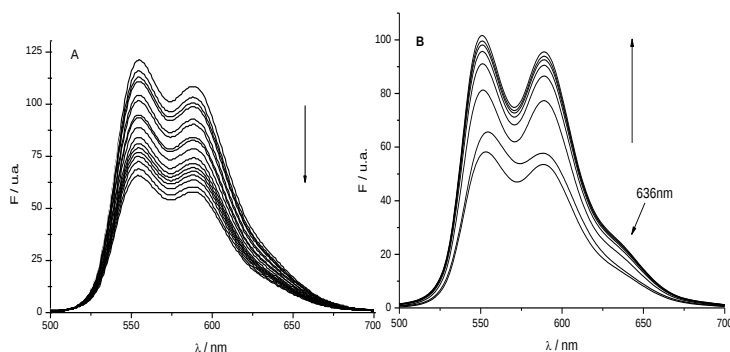


Fig.46 Spectre de fluorescență - doxorubicină $8.4 \cdot 10^{-6} \text{M}$ (TFS pH=7.09) A - procesul I (domeniu premicelar); B - procesul II (domeniu postmicelar)

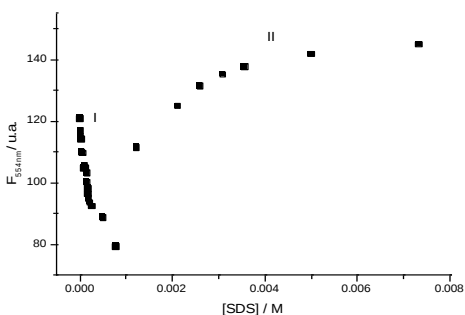


Fig.47 Dependența fluorescenței F_{554} de concentrația de SDS adăugat la o soluție de doxorubicină $8.4 \cdot 10^{-6} \text{M}$ (TFS pH=7.09)

Valoarea CCM pentru surfactant în prezența doxorubicinei a fost determinată ca fiind de $\sim 7 \cdot 10^{-4} \text{M}$.

Pentru procesul I s-a obținut valoarea $K = (5.06 \pm 0.72) \cdot 10^3 \text{M}^{-1}$, iar pentru procesul II, $K = (1.63 \pm 0.17) \cdot 10^3 \text{M}^{-1}$.

Lucrând la o tărie ionică mai mare, s-a observat doar procesul II, pentru care s-a obținut $K = 274.83 \pm 12.5 \text{M}^{-1}$.

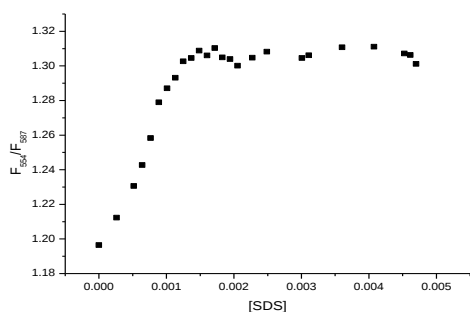


Fig.48 Variația raportului F_{554}/F_{587} pentru o soluție de doxorubicină $4.52 \cdot 10^{-6} \text{M}$ (TF pH=7.45) funcție de concentrația de SDS

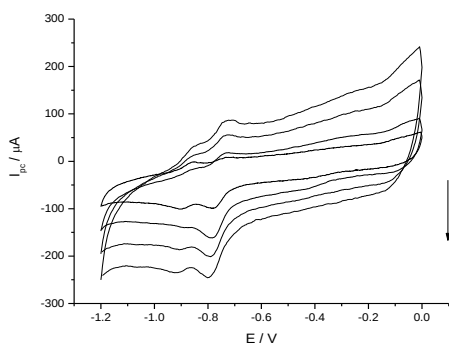
Conform datelor din literatură [64], raportul F_{554}/F_{587}

oferă informații privind repartizarea medicamentului în soluție și surfactant, adică între faza citosolică și faza membranară. Astfel, valori mici ale raportului F_{554}/F_{587} corespund unui mediu hidrofil al medicamentului, iar valori mari ale raportului F_{554}/F_{587} corespund unei înconjurări hidrofobe a medicamentului.

Mitoxantronă - Mediu apos (TFS/TF), dezaerat

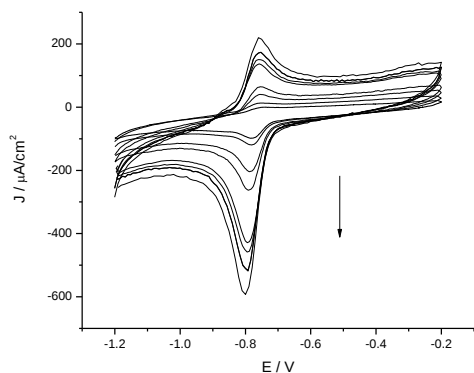
Studii electrochimice - Voltametrie ciclică și voltametrie liniară

Pe intervalul de potențial studiat -1.2 / 0V se observă două unde de reducere. Utilizând carbonul vitros drept electrod de lucru, s-a putut observa chiar și cu ochiul liber, adsorbția medicamentului



pe electrod, un fenomen fizic bine cunoscut și din literatură [88, 93-96]. Interpretarea acestor rezultate este cu atât mai dificilă cu cât peste unda de difuzie se suprapune unda de adsorbție.

Fig.52 Voltamograme ciclice - mitoxantronă $1.62 \cdot 10^{-4}$ M (TF pH=7.4) ($v = 50, 100, 200, 300$ mV/s)



În condiții experimentale favorizând adsorbția, se observă existența unei singure unde de reducere, pe același interval de potențial -1.2 / 0V.

Fig.53 Voltamograme ciclice - mitoxantronă $1.6 \cdot 10^{-4}$ M în TFS pH=7.4 la $v = 50, 100, 200, 300, 600, 700, 800, 900, 1000$ mV/s

Din variația $\Delta E_{p/2}$ funcție de viteza baleiere se estimează numărul de electroni $n = 1.94 \pm 0.26$, în perfectă concordanță cu reducerea bielectronică a chinonei. Din criteriile de adsorbție, se determină concentrația superficială de $(2.4 \pm 0.6) \cdot 10^{-10}$ mol/cm² pentru specia oxidată și $(0.54 \pm 0.08) \cdot 10^{-10}$ mol/cm² pentru specia redusă. Din dependență Laviron, se obțin valorile $\alpha = 0.5 \pm 0.06$ pentru coeficientul de transfer și $k_s =$

$12 \pm 0.19 \text{ s}^{-1}$ pentru constanta de viteză aparentă a transferului de electroni la suprafața electrodului.

În concluzie, mitoxantrona în TFS suferă o singură reducere bielectronică, o parte din medicament adsorbindu-se la suprafața electrodului.

Mitoxantronă – SDS - 1. Studii electrochimice - Voltametrie ciclică și liniară

În urma adăugării SDS-ului la soluția de mitoxantronă, se observă că nu mai există două unde, ci una singură poziționată intermediar pe axa potențialului în raport cu cele două unde înregistrate în absența surfactantului. Se observă, de asemenea, două procese (**Fig.58a,b**):

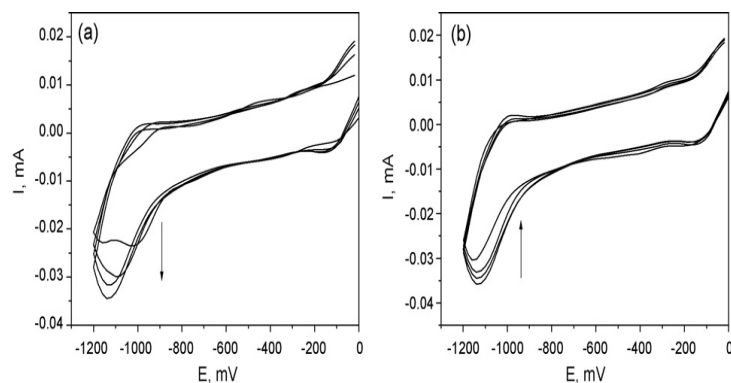


Fig.58 Voltamograme ciclice - mitoxantronă ($1.85 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ /TFS pH=7.4) în prezența unei concentrații crescânde de SDS: a - procesul I (domeniu premicelar), b - procesul II (domeniu postmicelar) la $v = 0.2 \text{ V/s}$

Existența celor două procese este foarte bine pusă în evidență prin reprezentarea grafică a curentului de pic funcție de concentrația de surfactant, ele fiind separate de concentrația de SDS corespunzătoare CCM de $\sim 4 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ (**Fig.59**).

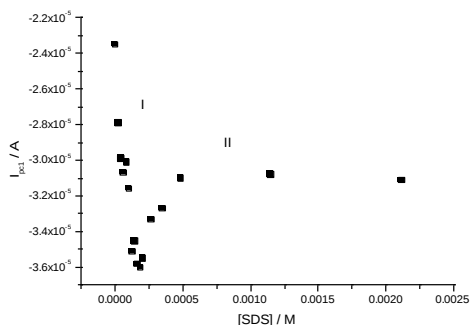


Fig.59 Dependența curentului de pic catodic al unei soluții de mitoxantronă $1.85 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ (TFS pH=7.4) funcție de concentrația de SDS, la $v = 0.4 \text{ V/s}$

Variația potențialului de semiundă $\Delta E^{0'}$ (circa 160 mV) sugerează o interacție destul de puternică între surfactant și medicament și din dependența acestuia de concentrația de surfactant s-au obținut valoarea constantei de complexare $K = 3.25 \cdot 10^8 \text{ M}^{-2}$ și numărul de liganzi $p = 1.85$, ceea ce corespunde formării unui complex medicament : SDS de stoechiometrie 1:2, explicabil prin sarcina +2 a mitoxantronei.

Cele două procese au fost interpretate separat, aproximând o interacție 1:2 pentru primul proces și o interacție 1:1 pentru procesul II. Astfel, se obține valoarea $K = (2.53 \pm 0.54) \cdot 10^8 \text{M}^{-2}$ pentru primul proces și pentru procesul II, $K = (1.83 \pm 1.16) \cdot 10^4 \text{M}^{-1}$ și $D_b = 1 \cdot 10^{-6} \text{cm}^2/\text{s}$ pentru medicamentul încapsulat în micelă, deci o valoare mult mai mică în comparație cu $D_0 = 8.7 \cdot 10^{-5} \text{cm}^2/\text{s}$ în TF în absența SDS-ului.

2. Studii spectrale - Spectroscopia de absorbție UV-VIS

În urma titrării cu SDS, se observă scăderea celor două maxime de absorbție de la 610 și 660nm, până la o concentrație de SDS corespunzătoare CCM de $(8.16 \pm 0.92) \cdot 10^{-4} \text{M}$, valoare peste care absorbanțele încep să crească și se modifică raportul între ele (banda monomerului de la 660nm devine mai intensă decât cea a dimerului de la 610nm).

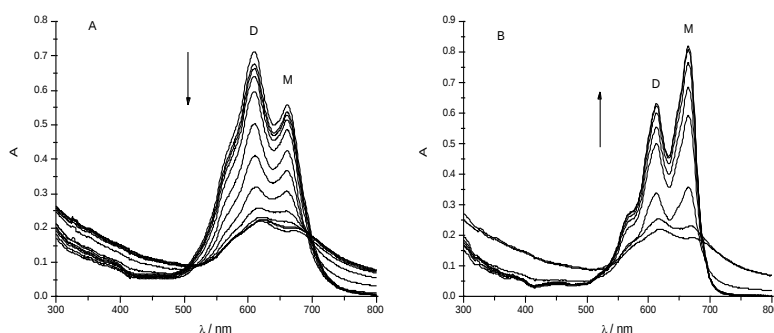
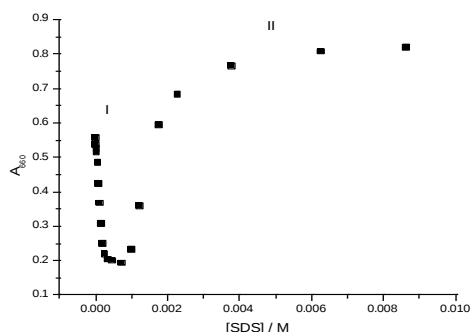


Fig.62 Spectre de absorbție - mitoxantronă $2.86 \cdot 10^{-5} \text{M}$ (TFS pH=7.09) A - procesul I (domeniu premicelar); B - procesul II (domeniu postmicelar)



Existența celor două procese este bine pusă în evidență prin dependența $A=f(\text{SDS})$.

Fig.63 Dependența absorbantei A_{660} de concentrația de SDS adăugat la o soluție de mitoxantronă $2.86 \cdot 10^{-5} \text{M}$ (TFS pH=7.09)

Analiza procesului I pentru o interacție 1:2 a condus la obținerea valorilor $K = (1.47 \pm 0.07) \cdot 10^8 \text{M}^{-2}$ și $\epsilon_b = 7\,427.1 \pm 105.3 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$, iar pentru procesul II pentru o interacție 1:1, $K = (1.45 \pm 0.08) \text{M}^{-1}$ și $\epsilon_b = 36883.23 \pm 215.28 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$.

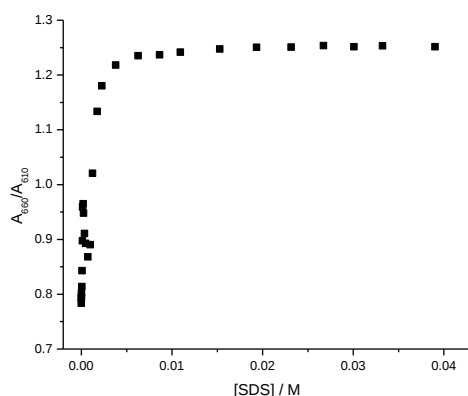
Interacția medicament - micelă mai poate fi caracterizată și prin coeficientul de partiție (k_x), care reprezintă afinitatea substanței solubilizate pentru faza micelară comparativ cu faza apoasă. În **Tabelul 16** sunt trecute valorile coeficienților de partiție obținuți pentru mai multe

soluții de mitoxantronă de concentrații diferite. Se remarcă o dependență foarte strânsă de concentrația de mitoxantronă – valoarea coeficientului de partiție scade cu creșterea concentrației de medicament, ceea ce indică faptul că solubilizarea mitoxantronei în miclele de SDS este un proces competitiv, care devine din ce în ce mai dificil pe măsură ce crește cantitatea de medicament încorporat în micelă.

$c_M^0 \cdot 10^5 / M$	$k_x \cdot 10^{-3}$
4.21	7.85 ± 1
2.86	87.82
1.87	135.73

Tabel 16 Dependența coeficientului de partiție al mitoxantronei între faza micelară și apoasă de concentrația de

Ținând cont de creșterea valorii raportului A_{660}/A_{610} (adică a raportului absorbanțelor de la 660nm corespunzătoare monomerului și a celei de la 610nm corespunzătoare dimerului) de la 0.78 la 1.27 (**Fig.67**) pentru concentrații de SDS mai mari decât CCM, se poate presupune că



disocierea dimerilor mitoxantronei se datorează interacției medicamentului cu miclele de SDS; deci moleculele de mitoxantronă interacționează cu miclele de SDS sub formă monomă.

Fig.67 Variația raportului A_{660}/A_{610} pentru o soluție de mitoxantronă $2.86 \cdot 10^{-5} M$ (TFS pH=7.09) funcție de concentrația de SDS adăugat

Localizarea moleculei de mitoxantronă în micelă poate fi elucidată prin compararea spectrului mitoxantronei în prezența SDS-ului cu spectrele în apă și solvenți organici de diferite polarități. Astfel se poate presupune că o creștere a hidrofobicității mediului induce disocierea dimerilor mitoxantronei (**Fig.67**), medicamentul fiind încapsulat sub formă de monomeri în miclele de SDS. Coeficientul de partiție octanol:apă al mitoxantronei la pH = 7.4 este $\log P = 0.79$, ceea ce indică faptul că mitoxantrona este clar un medicament lipofil [169]. Din moment ce suprafața miclei este un mediu cu proprietăți diferite de cele ale apei (constantă dielectrică mai mică) [170], la concentrații de SDS mai mari de CCM, mitoxantrona este încapsulată în miclele de surfactant sub formă monomă și, cel mai probabil, se găsește la suprafața miclei cu

cromoforul îndreptat către core-ul miclei și ambele catene laterale încărcate pozitiv orientate către grupele sulfat din SDS încărcate negativ, atât interacțiile polare cât și cele electrostatice jucând un rol important în legarea medicamentului la micelă.

În concluzie, din datele electrochimice și spectrale obținute pentru cele două medicamente se remarcă faptul că valoarea CCM obținută de noi în experimente, de ordinul 10^{-4} M, este mai mică decât în apă pură ($8.08 \cdot 10^{-3}$ M) și decât în TF 50mM ($1.99 \cdot 10^{-3}$ M) raportate în literatură [141], datorită bine-cunoscutului efect de scădere a CCM a surfactantului sub influența diferiților ioni și molecule prezente în soluție [142], electroliți și medicament.

De asemenea, în ambele cazuri au fost observate două procese, primul în domeniul premicelar de surfactant corespunzător interacției electrostatice dintre SDS și medicament, iar cel de-al doilea în domeniu postmicelar corespunzător interacției medicament – micelă de SDS.

Obiectivul 3. Analiza interacției medicamentului înglobat în micelă cu materialul genetic (ADN dublu catenar) la pH fiziologic - Mitoxantronă - SDS micelar - ADN dublu catenar

1. Studii electrochimice - Voltametrie

S-a pornit de la o soluție de mitoxantronă cu SDS într-un raport molar corespunzător procesului II pe palier (P/D = 149), astfel încât să se asigure încapsularea medicamentului în miclele, care a fost titrată cu ADN preparat în amestecul mitoxantronă - SDS. Voltamogramele înregistrate au următorul aspect (**Fig.68**).

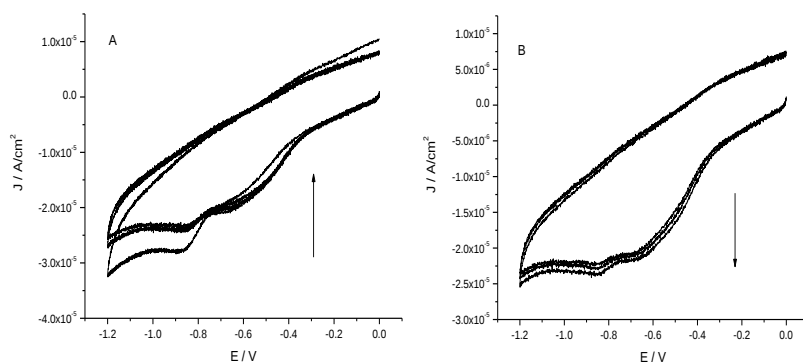


Fig.68 Voltamograme ciclice - mitoxantronă + SDS micelar în raport P/D = 149 (TFS pH=7.4) în prezență de ADNdc: A - procesul I (0 - $6.34 \cdot 10^{-6}$ M/nucleotide ADN), B - procesul II ($1.79 \cdot 10^{-5}$ - $6.52 \cdot 10^{-5}$ M/nucleotide ADN) la $v = 0.1 V/s$

Din **Fig.68A** se observă că inițial unda a doua de la valori ale potențialului mai negative ($\sim -0.85V$) este mai intensă decât umărul (unda întâi) de la $\sim -0.6V$ (pentru 0.00M/nucleotide

ADN), situație similară celei din **Fig.58b** din punct de vedere al compoziției sistemului (mitoxantronă – SDS în raport P/D = 149, adică o valoare a raportului P/D corespunzătoare procesului II pe palier), cu mențiunea că dispare contrapicul anodic, adică dispare reversibilitatea cuplului redox respectiv, ceea ce înseamnă că transferul de electroni este lent. Cel mai probabil această undă corespunde monomerului neutru al mitoxantronei înglobat în micelă, iar unda întâi corespunde mitoxantronei libere în soluție. Prin adăugarea ADN-ului, intensitatea undei a doua scade, iar cea a primei unde crește; alura devine asemănătoare mitoxantronei în TF pH = 7.4 din **Fig.58a**, și cele două unde devin aproape egale (**Fig.68B**). Deci, ADN-ul în concentrații mici scoate mitoxantrona din micelă, fenomen care are loc până la atingerea unui echilibru și voltamograma ciclică rămâne constantă.

Din dependența densității curentului corespunzător primului pic de concentrația de ADN adăugat (**Fig.71**), se observă existența acelorași două procese de scădere (procesul I) și creștere (procesul II), ca și în cazul sistemelor medicament - SDS, dar, în plus, apare un domeniu

intermediar acestora, corespunzător procesului III. Domeniul III este delimitat de valorile CCA și CCM ale SDS-ului.

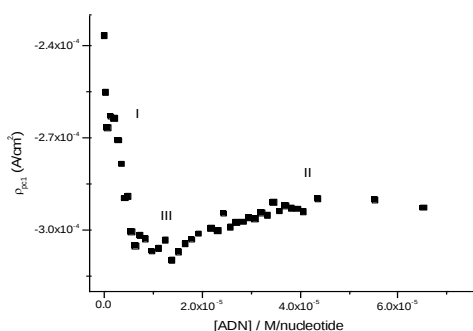


Fig.71 Dependența densității curentului de pic catodic al unei soluții de mitoxantronă + SDS micelar în raport P/D=149 (TFS pH=7.4) funcție de concentrația de ADNdc adăugat la $v=0.1\text{ V/s}$

În cazul nostru, procesele I și II au fost analizate separat pentru o interacție 1:1, iar rezultatele obținute sunt: pentru procesul I $K = (1.73 \pm 0.12) \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ și pentru procesul II, $K = (8.84 \pm 1.31) \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$.

Corespunzător procesului III, se determină contribuția ADN-ului la agregarea micelară, având valoarea de 10.92 kJ/mol, și numărul de agregare al SDS-ului în prezența ADN-ului, care este 90.

În plus, se poate remarca o deplasare a valorii raportului ADN / medicament în prezența micelilor de SDS către valori mai mici comparativ cu absența surfactantului, de la 2.7 [117] la circa 0.07 - 0.15, ceea ce ar putea însemna că administrarea mitoxantronei sub formă de

medicament înglobat în micelă este mult mai eficientă terapeutic decât administrarea medicamentului ca atare.

2. Studii spectrale - Spectroscopie de absorbției UV-VIS

S-a pornit de la o soluție de mitoxantronă $1.85 \cdot 10^{-5} \text{M}$ (TF pH=7.4) cu SDS într-o concentrație mult mai mare decât CCM (P/D = 149), astfel încât să se asigure încapsularea medicamentului în micle. S-a constatat că spectrul soluției mitoxantronă - SDS se modifică în timp, și anume banda monomerului se scindează după circa 1 oră de incubare, devenind stabil, ceea ce este prezentat în **Fig.73A - inset**. Soluția stabilă obținută a fost titrată cu ADN preparat în amestecul mitoxantronă - SDS. Familia de spectre înregistrată pune în evidență existența celor două procese: de scădere și de creștere a absorbanței maximelor de la 613, 649 și 665nm.

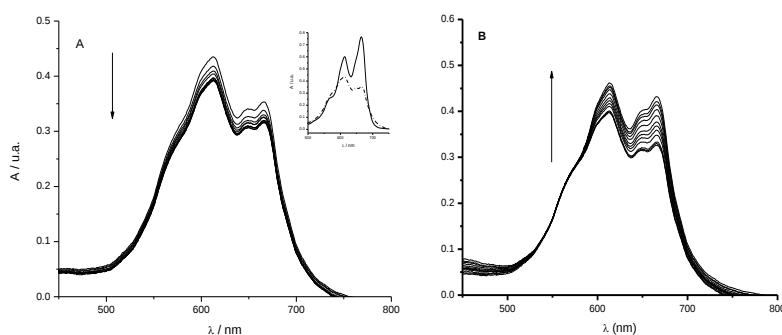
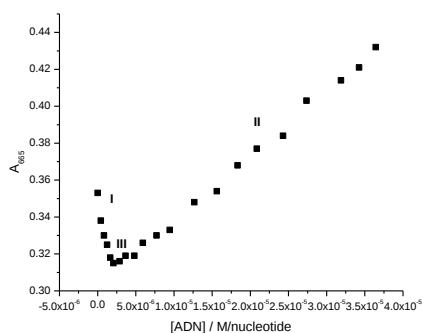


Fig.73 Spectre de absorbție - mitoxantronă + SDS micelar în raport P/D=149 (TF pH = 7.4) A - procesul I (0 - 2.06μM/nucleotide ADN); B - procesul II (2.87 - 36.4μM/nucleotide ADN); **inset** - mitoxantronă + SDS (P/D = 110) *linie continuă* - $t_{\text{incubare}} = 0$, *linie frântă* - $t_{\text{incubare}} > 1 \text{ oră}$

Se mai observă că maximul de la 660nm corespunzător absenței surfactantului se scindează în două – un umăr la 649nm și un maxim la 665nm, ceea ce sugerează existența a două specii de monomer.



În plus, din variația absorbanței cu concentrația de ADN adăugat (**Fig.74**) se observă că cel de-al treilea domeniu, intermediar proceselor I și II, este foarte restrâns.

Fig.74 Dependența absorbanței A_{665} de concentrația de ADN adăugat la o soluție de mitoxantronă + SDS micelar în raport P/D=149 (TF pH=7.4)

Procesele I și II au fost interpretate separat conform unei interacții 1:1, iar rezultatele obținute pentru procesul I sunt $K = (9.54 \pm 1.96) \cdot 10^5 \text{M}^{-1}$ și $\epsilon_b = 16\,148.22 \pm 234.84 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$, iar pentru procesul II, $K = (3.07 \pm 0.47) \cdot 10^4 \text{M}^{-1}$ și $\epsilon_b = 24\,484.58 \pm 605.78 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$.

Corespunzător domeniului III, s-a calculat raportul de interacție surfactant / ADN și s-a obținut valoarea de 70moli SDS : 1mol ADN.

În concluzie, atât prin metodele electrochimice cât și prin cele spectrale, s-au observat trei procese atribuite astfel: procesul I - în prezența biopolimerului, medicamentul iese din micelă și interacționează cu ADN-ul, domeniul III – o zonă de tranziție între cele două procese, în care presupunem că ar avea loc reorganizarea moleculelor de SDS în micle pe suprafața sau în vecinătatea lanțului de ADN și procesul II – începe după cel de-al doilea punct de inflexiune corespunzător CCM al surfactantului, când presupunem că apar miclele "libere".

CONCLUZII

1. Studiul mecanismului de reducere a medicamentelor antraciclince:

Analiza rezultatelor electrochimice în corelare cu cele obținute prin spectroscopie UV-VIS și RES - *in situ* în diverse condiții experimentale a condus la următoarele concluzii:

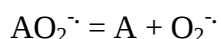
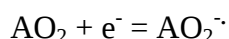
- Pentru **doxorubicină** și epimerul ei, **epirubicina**, în solvenți aprotici dezaerați, reducerea constă în două etape de transfer monoelectronic reversibil, corespunzătoare reducerii ciclului chinonic central la anion radical și dianion. În prezența impurităților protice (prezente în solvenții comerciali, utilizați fără anhidrizare specială, în concentrații de ordinul concentrației substratului) poate avea loc protonarea acestor specii conducând la radicalul liber $\text{AH}^\bullet$, și respectiv AH^- , mecanismul global dedus fiind de tip ECEC.

- Anion radicalul a fost identificat și caracterizat prin spectrometrie RES – *in situ* și atestă o delocalizare a electronului impar pe ciclurile C și D, deci o structură caracteristică de anion radical semichinonic. Distribuția constantelor de scindare hiperfină atestă delocalizarea electronului impar pe fragmentul antrachinonic, deci o structură caracteristică de anion radical semichinonic. Ținând seama că partea aromatică plană ce constituie zona hidrofobă a moleculei este cea care se intercalează între perechile de baze ale ADN-ului, această distribuție de spin ar putea explica acțiunea radicalilor semichinonici asupra ADN-ului.

- Intermediarii diamagnetici (dianionul, A^{2-} și anionul neradical AH^-) au fost identificați prin spectroscopie UV-VIS la reducerea chimică și /sau electrochimică *in-situ*.

- În prezența oxigenului, în soluții aerate, voltamograma ciclică arată că prima undă se scindează și nu mai prezintă contrapic anodic. Analiza conform criteriilor electrochimice indică o reacție chimică ce succede primului transfer de electron, iar compararea potențialului de reducere cu cel al oxigenului molecular în DMSO justifică atribuirea procesului formării unui complex intermolecular medicament - O_2 , ca primă etapă a formării anionului superoxid, în acord cu date din literatură [129].

- În medii protice comportarea redox, similară cu a chinizarinei, este puternic dependentă de compoziția solventului și de pH. În soluții apoase, la $pH \sim 7$, reducerea constă într-un proces bielectronic, conform stoechiometriei globale: $A + 2e + 2H^+ \rightleftharpoons AH_2$. În soluția dezaerată apare cuplul reversibil la -675 mV, iar în prezența oxigenului acesta devine ireversibil și este precedat de o undă ireversibilă mai intensă situată la -490mV [128]. Această comportare sugerează, în concordanță cu date din literatură [129] formarea unui complex medicament - O_2 , redus la un potențial pozitiv în raport cu medicamentul, și care facilitează transferul de electron către oxigenul molecular, generând anionul superoxid conform reacțiilor:



acesta fiind ulterior implicat în prezența apei în generarea speciilor reactive ROS.

2. Studiul interacției medicament - surfactant în vederea utilizării micelilor ca drug-carrier

Mediul micelar este cel mai simplu sistem care mimează structura membranelor biologice.

Interacția **doxorubicinei** cu **surfactantul anionic SDS** a fost studiată prin voltametrie ciclică, spectroscopie de absorbție și de emisie (fluorescență). Rezultatele electrochimice au arătat:

- Deplasarea picului catodic către valori mai negative ale potențialului atestă interacția doxorubicină – SDS. Pentru concentrații mici de SDS (în domeniul premicelar) interacția electrostatică între medicamentul încărcat pozitiv la $pH \sim 7$ și surfactantul anionic conduce la neutralizarea sarcinii medicamentului. La concentrații mai mari decât CCM, în soluție apar

micele, iar interacția medicament – micelă are ca rezultat înglobarea medicamentului în interiorul miclei. O tărie ionică mare, datorată în cazul de față utilizării de TMAB și TF, determină formarea unor micle mai mari și favorizează extragerea medicamentului din apă în interiorul miclei [140].

- Metoda spectrală a adus în plus confirmarea faptului că, pentru procesul I, are loc neutralizarea sarcinii pozitive a medicamentului de către sarcina negativă a surfactantului, cu o stoechiometrie a interacției de 1:1, urmată de dimerizarea medicamentului o dată cu creșterea concentrației de SDS (prin valoarea coeficientului molar de extincție mai mică decât a monomerului, tinzând către cea a dimerului) și a faptului că, pentru procesul II, are loc înglobarea medicamentului în micelă sub formă monomeră (prin valoarea coeficientului molar de extincție mai mare decât a monomerului, datorită mediului hidrofob din interiorul miclei).

- Pentru concentrații de SDS mai mici decât CCM, fenomenul de stingere a intensității fluorescenței poate fi atribuit formării complexelor medicament - SDS formați în principal prin interacție electrostatică și implicând cel mai probabil atomul de azot protonat din restul glucidic, ceea ce ar corespunde unei stoechiometрии a complexului de asociere doxorubicină - SDS de 1:1. Neutralizarea sarcinii pozitive a medicamentului de către anionii surfactantului diminuează forțele de repulsie dintre moleculele de medicament și favorizează dimerizarea medicamentului. Procesul II, caracterizat prin creșterea intensității fluorescenței, tinde către un nivel de saturație a medicamentului la concentrații mari de surfactant și corespunde înglobării moleculelor de doxorubicină în miclele de SDS, cel mai probabil sub formă monomeră.

- Parametrii de legare determinați prin spectroscopie de fluorescență sunt în bun acord cu cei determinați prin spectroscopia de absorbție. În plus, rezultatele obținute la o tărie ionică mai mare (0,25) sunt în foarte bun acord cu rezultatele determinărilor electrochimice, atât din curent cât și din potențial, ceea ce confirmă faptul că tăria ionică a soluției, pe lângă domeniul diferit de concentrații, este cauza discrepanțelor observate între constantele de legare determinate prin diferite metode.

- Întrucât mitoxantrona nu prezintă fluorescență, interacția **mitoxantronei** cu **surfactantul anionic SDS** a fost studiată prin voltametrie ciclică și spectroscopie de absorbție, în domeniul de concentrații de surfactant premicelar și micelar.

În absența SDS-ului, prin studiul electrochimic s-a observat și caracterizat adsorbția fizică mitoxantronei pe suprafața electrodului de carbon vitros.

- Ambele metode au indicat două procese de interacție diferite: domeniul premicelar (corespunzător procesului I) a fost atribuit interacției electrostatice între grupele încărcate pozitiv ale medicamentului și cea negativă a surfactantului, cel mai probabil cu o stoechiometrie 1:2. Domeniul micelar (corespunzător procesului II) a fost atribuit interacției între medicament și miclele de SDS, interacție 1:1 care are ca efect încapsularea (înglobarea) mitoxantronei cel mai probabil sub formă monomeră în micle.

- Valoarea CCM a SDS-ului în condițiile noastre experimentale este de circa $0.75 \cdot 10^{-3} \text{M}$, mai mică decât în soluție apoasă ($8.1 \cdot 10^{-3} \text{M}$) sau în TF 50mM ($1.99 \cdot 10^{-3} \text{M}$), datorită existenței electroliților în soluția de lucru.

- Analiza comparativă a spectrelor de absorbție în diferiți solvenți cu cele în SDS oferă informații despre poziția medicamentului în micelă. Rezultatele obținute au indicat ca fiind cea mai probabilă localizarea medicamentului în stratul superficial al miclei, cu heterociclul orientat spre interior și cele două catene încărcate pozitiv orientate către grupele sulfat negative ale surfactantului, interacția implicând atât forțe electrostatice cât și hidrofobe.

3. Analiza interacției medicamentului înglobat în micelă cu materialul genetic (ADN dublu catenar) la pH fiziologic

Interacția **mitoxantronei** cu **ADN dublu catenar** în prezența **surfactantului anionic SDS** într-o concentrație mai mare decât CCM a fost studiată prin voltametrie ciclică și spectroscopie de absorbție.

- Rezultatele electrochimice au evidențiat următoarele:
 - existența a două unde pe voltamograma ciclică în domeniul $-0,6 - -0,9 \text{ V versus SCE}$;
 - dependența densității curentului corespunzător primului pic de concentrația de ADN adăugat indică existența acelorași două procese de scădere (procesul I) și creștere (procesul II), ca și în cazul sistemelor medicament - SDS, dar, în plus, apare un domeniu intermediar acestora, corespunzător procesului III.

- Procesul I corespunde cel mai probabil interacției mitoxantronă – ADN, adică în prezența biopolimerului, medicamentul iese din micelă și interacționează cu ADN-ul.

- Domeniul III, caracterizat de o regiune mai mult sau mai puțin constantă, este limitat de concentrația critică de agregare (CCA) a surfactantului, care reprezintă momentul în care complexii agregate micelare - medicament devin detectabili, și de un al doilea punct de inflexiune corespunzător CCM a surfactantului, care marchează apariția micelilor "libere" (corespunzător procesului II). El este atribuit saturării polimerului (ADN) în raport cu adsorbția surfactantului pe suprafața sau în vecinătatea acestuia. Deși ADN-ul și SDS-ul sunt molecule încărcate negativ și, în consecință, o apropiere strânsă între ele este interzisă din punct de vedere energetic, la creșterea concentrației de SDS se pare că o asemenea apropiere devine probabilă datorită difuziei SDS-ului. Acest fenomen de excludere a medicamentului din ADN de către micelile de SDS este interesant deoarece se presupune că ADN-ul și micelile de SDS nu interacționează datorită încărcării suprafeței lor cu aceeași sarcină. Explicația probabilă / posibilă ar fi aceea că micromediul hidrofoab creat de SDS-ul micelar induce o perturbare temporară a structurii compacte a ADN-ului dc. [171]

- Valorile constantelor de interacție obținute prin cele două metode sunt în bun acord; de asemenea valoarea numărului de agregare al SDS-ului în prezența ADN-ului. Valoarea obținută concordă cu cea din literatură estimată pentru o soluție de NaCl 0.1M; astfel se constată că mărimea micelilor este aproximativ aceeași în prezența sau în absența polimerului [154].

- S-a observat deplasarea valorii raportului ADN / medicament în prezența micelilor de SDS către valori mai mici comparativ cu absența surfactantului, de la 2.7 [117] la circa 0.07 - 0.15, ceea ce ar putea însemna că administrarea mitoxantronei sub formă de medicament înglobat în micelă este mult mai eficientă terapeutic decât administrarea medicamentului ca atare.

- Ținând cont de datele electrochimice și spectrale obținute pentru sistemele mitoxatronă – SDS și mitoxatronă – SDS micelar – ADN, coroborate cu rezultate anterioare referitoare la comportarea mitoxantronei / chinizarinei în DMSO la adaos de hidroxid de tetrabutilamoniu [120, 134], cel mai probabil în soluție apoasă la pH neutru există un echilibru între mitoxantrona protonată și forma deprotonată.

Ca **perspective**, ținând cont de locul meu de muncă, investigarea proprietăților cardiotoxice ale acestor medicamente poate fi continuată/dezvoltată prin experimente *ex vivo*

(realizate pe celule), *in vitro* (pe linii celulare) și/sau *in vivo* (pe animale de laborator). Acest tip de studii constituie modele experimentale mult mai apropiate de situația reală prin complexitatea sistemului de lucru (existența organelor celulare, a membranelor intracelulare, a ionilor metalici, a biomoleculelor - enzime, acizi nucleici etc). În plus, ele oferă condiții reproductibile intra- și interdeterminări.

O altă posibilitate de a continua cercetările pe această direcție se regăsește în domeniul biosenzorilor, care este în plină dezvoltare în momentul de față, pe baza proprietăților de adsorbție fizică sau chimică a medicamentului pe suprafața electrodului.

BIBLIOGRAFIE

- [64] K.K. Karukstis, E.H.Z. Thompson, J.A. Whiles, R.J. Rosenfeld; *Biophysical Chemistry* **1998**, 73, 249-263
- [88] A.M. Oliveira-Brett, M Vivan, I.R. Fernandes, J.A.P. Piedade; *Talanta* **2002**, 56, 959-970
- [93] A.M. Oliveira-Brett, J.A.P. Piedade, A.M. Chiorcea; *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2002**, 538-539, 267-276
- [94] J.A.P. Piedade, I.R. Fernandes, A.M. Oliveira-Brett; *Bioelectrochemistry* **2002**, 56, 81-83
- [95] A.M. Oliveira-Brett, T.R.A. Macedo, D. Raimundo, M.H. Marques, S.H.P. Serrano; *Analytica Chimica Acta* **1999**, 385, 401-408
- [96] A.M. Oliveira-Brett, T.R.A. Macedo, D. Raimundo, M.H. Marques, S.H.P. Serrano; *Biosensors and Bioelectronics* **1998**, 13, 861-867
- [117] M. Enache, E. Volanschi; *Revue Roumaine de Chimie* **2005**, 50, 2, 131-140
- [120] M. Enache, C. Bendic, E. Volanschi; *Bioelectrochemistry* **2008**, 72, 10-20
- [125] A.J. Bard, L.R. Faulkner; *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications* Second Edition, John Wiley & Sons, Inc. **2001**
- [128] I. Șerbănescu, M. Enache, E. Volanschi; *Analele Universității București - Chimie* **2003**, anul XII, I-II, 267-278

- [129] D. Jeziorek, T. Ossowski, A. Liwo, D. Dyl, M. Nowaka, W. Woznicki; *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1997**, 229-236
- [134] A. Latus, E. Volanschi; *Revue Roumaine de Chimie* **2008**, 53, 12, 1131-1140
- [135] I. Șerbănescu, D. Bulcu, E. Volanschi; *Analele Universitatii Bucuresti – Chimie*, Anul XIV, **2005**, vol. I-II, 369-376
- [136] I. Anghelache, D. Bulcu, M. Enache, E. Volanschi *Journal of Colloid and Surface Chemistry* **2009**, 9, 33-41
- [137] M. Enache, I. Anghelache, E. Volanschi; *International Journal of Pharmaceutics* **2010**, 390, 100–106
- [141] E. Fuguet, C. Rafols, M. Roses, E. Bosch; *Anal. Chim. Acta* **2005**, 548, 95-100
- [142] M. Sarkar, S. Poddar; *Journal of Colloid and Interface Science* **2000**, 221, 181-185
- [154] I. Mandru, M. Olteanu; *Surfactanți – coloizi de asociație* Ed. Ars Docendi, București **2001**
- [160] M.J. Schick. *J. Phys. Chem.* **1964**, 68, 3586
- [169] C.P. Burns, B.N. Haugstad, C.J. Mossman, J.A. North, L.M. Ingraham; *Lipids* **1988**, 23, 393-397
- [170] P. Mukerjee, A. Ray; *J. Phys. Chem.* **1966**, 70, 2144-2149
- [171] R.K. Mitra, S.S. Sinha, S.K. Pal; *J. Fluoresc.* **2008**, 18, 423-432

LISTA LUCRĂRILOR PUBLICATE

A. În cadrul tezei de doctorat

1. “Coupled spectral and electrochemical evaluation of the anticancer drug mitoxantrone-sodium dodecyl sulfate interaction” - Enache M., **Anghelache I.**, Volanschi E.; *Int J Pharm.* **2010** ; 390(2):100-106 (disponibil pe <http://www.sciencedirect.com>)
2. “Spectral studies of the interaction of anticancer drug doxorubicin with anionic surfactant, sodium dodecyl sulfate” - **I. Anghelache**, D. Bulcu, M. Enache, E. Volanschi; *J. Coll. Surf. Chem.* **2009**, 9, 2, 33-41
3. “Functionalization of conductive silicon surfaces with Si-C linked beta-cyclodextrin monolayers. Immobilization of a molecular receptor” - C. Lagrost, J.F. Bergamini, B. Fabre, **I. Șerbănescu**, G. Alcaraz; *Chem. Commun.* **2007**, 1050

4. “Interaction of actinomycin D with anionic surfactant, sodium dodecyl sulphate: spectral and electrochemical investigations” - Enache M, **I. Serbanescu**, D. Bulcu, E. Volanschi; *Revue Roumaine de Chimie* **2007**, 52(8–9), 725–731
5. “Spectro-electrochemical study and molecular orbital modelling of the reductive activation of antitumoral drug – actinomycin D” – E. Volanschi, M. Enache, E. Dinca, **I. Serbanescu**; *Revue Roumaine de Chimie* **2002**, 47 (8-9), 741-750
6. “Electrochemical, spectral and MO investigation of the reductive activation of antitumoral drugs doxorubicin and epirubicin” – **I. Serbanescu**, M. Enache, E. Volanschi; *Analele Universitatii Bucuresti – Chimie*, Anul XII, **2003**, vol. I-II, 267-278

B. Lucrări publicate în domenii conexe

1. “Adjuvant properties of bacterial product CANTASTIM” – **I.F. Anghelache**, I. Caras, A. Salageanu; *Roum Arch Microbiol Immunol.* **2007** Jan-Jun; 66 (1-2):17-21(disponibil pe pubmed <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18928058>)
2. “Systemic inflammatory markers in patients with aortic sclerosis” - Rugina M, Caras I, Jurcut R, Jurcut C, Serbanescu F, Salageanu A, Apetrei E; *Roum Arch Microbiol Immunol.* **2007** Jan-Jun; 66 (1-2):10-6 (disponibil pe pubmed <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18928057>)
3. “Experimental studies on bacterial product CANTASTIM derived from *Pseudomonas aeruginosa*. VII. Activation of immune cells of healthy controls and cancer patients” - Caras I, **Serbanescu IF**, Grigorescu A, Salageanu A; *Roum Arch Microbiol Immunol.* 2005 Jan-Dec; 64(1-4):5-10 (disponibil pe pubmed <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17405308>)