
TEZĂ DE DOCTORAT

Antocianii, compuși fitochimici cu aplicații biomedicale: caracterizare biochimică și acțiune biologică *in vitro*

(REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT)

Doctorand **Mădălina-Lorena NISTOR**

Conducător de doctorat **Prof. Dr. Carmen SOCACIU**



INTRODUCERE

Polifenolii naturali derivați din plante (resveratrol, flavonoide, acizi fenolici și antociani) au atras mult interes în ultimele două decenii, datorită acțiunii lor eficiente în prevenirea și ameliorarea mai multor probleme cronice de sănătate, cum ar fi bolile cardiovasculare, diabetul și boli asociate acestuia precum și mai multe forme de cancer [1]. Direcționând atenția asupra antocianilor, aceștia au devenit obiectul a numeroase studii efectuate pe modele *in vivo* și *in vitro*, utilizați fie ca supliment alimentar zilnic, fie în sinergie cu terapii standard, dând rezultate semnificative.[2, 3].

Antocianii sunt pigmenți naturali responsabili pentru culorile frumoase date de senescența frunzelor care apare toamna. Aceștia se găsesc în cantități semnificative în fructe și legume și au rolul de a proteja țesutul vegetal care este expus în mod direct la lumină [4]. Aceste molecule cu beneficii remarcabile asupra sănătății sunt consumați de către oameni de mii de ani fără probleme datorită răspândirii largi în numeroase alimente comestibile, precum: rădăcini, fructe, legume, sucuri și extracte. Structura lor chimică le permite să exercite acțiune antioxidantă, care a fost asociată în mod direct cu ameliorarea bolilor cronice precum cancer sau diabet [5].

În ultimele două decenii, antocianii au devenit principalul subiect de cercetare al multor articole științifice și, în consecință, numeroase teste *in vitro* au evidențiat acțiuni antiproliferative, antiinflamatorii și proapoptotice. De când au fost descrise efectele benefice ale antocianilor, s-a manifestat tot mai mult interes pentru dezvoltarea de noi terapii bazate pe acești compuși și încercarea de a înțelege mecanismele moleculare ale acestora.

Din nefericire, antocianii sunt foarte sensibili la condițiile de mediu, precum pH, lumină, oxigen și, prin urmare, se degradează foarte ușor [4]. Expunerea antocianilor la condițiile menționate mai sus pot provoca degradarea ireversibilă a formei lor cationice flavilium în compuși incolori [4]. Așadar, un studiu cuprinzător al răspunsului lor fizico-chimic la diverși factori externi, precum și al comportamentului lor biologic atunci când sunt implicați în studii *in vitro* și *in vivo* este obligatoriu pentru o mai bună înțelegere a biodisponibilității lor și pentru a găsi modalități de optimizare a utilizării lor la potențial maxim.

Prin urmare, oamenii de știință sunt într-o cercetare constantă pentru a completa puzzle-ul mare al proprietăților antocianilor cu piesele lipsă precum stabilitatea, absorbția, biodisponibilitatea, bioabsorbția, mecanismele de acțiune și distribuția tisulară. Prin administrarea directă de antociani în celule tumorale de piele, principalele dezavantaje precum stabilitatea și biodisponibilitatea lor scăzute, eliberarea necontrolată, timpul îndelungat de circulație prin sânge, distribuția tisulară neselectivă și doza mare necesară în administrare orală ar putea fi eliminate [6-8]. Este un lucru deja bine cunoscut faptul că antocianii prezintă efecte anticancerigene și foto-

iradierii UVB a unor antociani precum cianidin-3-glucozid și delphinidin, aceasta a fost demonstrată cu succes într-un studiu *in vivo* realizat pe un model de carcinogeneză, mai exact, pe șoareci fără păr SKH-1 hairless [11, 12]. În unele studii *in vitro*, anumiți antociani precum delphinidin și cianidin au arătat acțiune protectoare la linia celulară de keratinocite imortalizate HaCaT [12], precum și la linia celulară normală JB6 P+, în urma expunerii la iradiere UVB [13]. În mod similar, administrarea de extract de antociani obținut din mure a prezentat protecție a keratinocitelor primare împotriva degradărilor oxidative provocate de iradierea UV, prin creșterea exprimării enzimelor antioxidante defensive [14]. Într-un studiu anterior realizat de grupul nostru, antocianii extrași și purificați din afine și fructe de *Aronia* au inhibat proliferarea celulelor de melanom murin B16-B10 și, de asemenea, le-a indus apoptoza [8, 15].

Scopul și obiectivele tezei de doctorat

Principalele ținte ale tezei au fost colecționarea unor informații recente și actualizate legate de caracterizarea generală a antocianilor, descrierea conținutului de antociani din diferite surse naturale (zmeură, duche, *Aronia* și morcov mov), prezentarea efectelor extraordinare pe care le au împotriva proliferării *in vitro* a mai multor linii celulare cancerigene (cancer cervical, cancer ovarian și melanom murin) și să aducă informații noi și valoroase în încercarea de a înțelege mai în profunzime antocianii și modul lor de acțiune, prin stabilirea celui mai eficient solvent de extracție și prin propunerea unui model fluorescent de monitorizare a antocianilor *in-situ*, în tratarea melanomului. Scopurile tezei au fost realizate prin urmărirea următoarelor obiective:

Obiectivul 1: Extracția antocianilor din surse naturale, zmeură, duche, *Aronia* și morcov mov, cu diferiți solvenți de extracție.

Obiectivul 2: Obținerea de extracte de antociani purificate prin metoda extracției de fază solidă (SPE).

Obiectivul 3: Identificarea individuală a antocianilor și măsurarea concentrației acestora prin cromatografie lichidă de înaltă performanță (HPLC) și HPLC cuplată cu spectrometrie de masă (MS).

Obiectivul 4: Stabilirea celei mai bune corelări între tipul de antociani (glicozilați/acilați) și solventul de extracție.

Obiectivul 5: Experimente *in vitro*: determinarea citotoxicității antocianilor asupra liniilor celulare utilizate, prin testele MTT și WST-1.

Obiectivul 6: Creșterea emisiei de fluorescență a antocianilor în soluție prin complexarea lor cu acid difenilboric 2-aminoetil.

Obiectivul 7: Monitorizarea *in-situ* a complexului antociani-acid difenilboric 2-aminoetil în interiorul celulelor de melanom murin.

Structura tezei de doctorat

Lucrarea de față este împărțită în două părți principale. Prima parte, studiul de

antociani. A doua parte, contribuția originală, conține capitolele 2-7, și este dedicată prezentării rezultatelor obținute în urma a trei studii de cercetare originale, axate pe experimente care au în prim-plan antocianii și comportamentul lor în diferite întrebări.

Studiul de literatură

Capitolul 1 descrie informații referitoare la proprietățile fizico-chimice ale antocianilor, comportamentul lor în digestia umană ca fundație pentru posibile terapii și metode de analiză viitoare.

Contribuția originală

Capitolul 4 prezintă activitatea antiproliferativă a extractelor pure de antociani din duche și zmeură, pe liniile de celule canceroase umane HeLa și A2780.

Capitolul 5 se concentrează pe eficiența comparativă a diferiților solvenți (metanol, etanol, acetonă și apă) pentru extracția antocianilor din *Aronia* și morcov mov, pentru păstrarea activității antioxidante.

Capitolul 6 descrie imagistica prin fluorescență în timp real a antocianilor complexați cu acid difenilboric 2-aminoetil pentru urmărirea și monitorizarea lor în interiorul celulelor melanomului B16-F10.

Această teză este rezultatul colaborării dintre Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară, Cluj-Napoca, România, și Universitatea Babeș-Bolyai, Facultatea de Fizică și Facultatea de Chimie și Inginerie Chimică, Cluj-Napoca, România.

Concluzii generale

În **Capitolul 4**, au fost obținute date relevante despre compoziția chimică a antocianilor din două fructe de pădure comune (duche și zmeură). Compușii majori detectați în extractele purificate de antociani au fost: cianidin-3-O-glucozid și cianidin-3-O-rutinozid din duche, și cianidin-3-O-soforozid și cianidin-3-O-soforozid-5-ramnozid din zmeură. Ambele surse au prezentat efecte antiproliferative semnificative asupra liniilor celulare HeLa, canceri de col uterin uman și A2780, cancer ovarian uman. Antocianii au fost extrași din duche și zmeură folosind metanol acidificat și au fost purificați folosind metoda de extracție în fază solidă (SPE), pe coloane Sep-Pak. Conținutul de antociani rămas a fost analizat utilizând cromatografie lichidă de înaltă performanță (HPLC) cuplată cu matrice de fotodiode (PDA) și cu spectrometrie de masă cu ionizare prin pulverizare de electroni (ESI+-MS). Experimentele *in vitro* au fost efectuate pe linii de celule HeLa și A2789 și rata de proliferare celulară a celulelor tratate cu extracte de antociani a fost măsurată folosind testul MTT.

În **Capitolul 5** au fost folosite două matrice diferite de antociani, fructe de *Aronia*, care conțin antociani monoglicozilați, și morcovi mov, care conțin atât antociani acilați, cât și diglicozilați, pentru a stabili solvenții de extracție

corespunzători cu structura chimică a antocianilor. Astfel, s-a demonstrat că antocianii monoglicozilați din *Aronia* preferau metanolul, în timp ce antocianii acilați au avut o extracție mai bună cu etanol. Rezultatele noastre au oferit noi cunoștințe în domeniul extracției antocianilor și al utilizării acestora în industria medicală și alimentară. Frațiile de antociani au fost obținute prin metoda extracției cu solvent și au fost concentrate într-un evaporator rotativ la vid. Conținutul total de antociani a fost determinat prin metoda pH-ului diferențial. Identificarea și cuantificarea antocianilor au fost obținute prin HPLC/PDA/ESI+/MS. Activitatea antioxidantă a extractelor a fost analizată folosind trei teste diferite: ABTS+, CUPRAC și FRAP.

În **Capitolul 6**, acidul difenilboric 2-aminoetil (DPBA), un colorant natural, a fost folosit pentru a forma un complex fluorescent cu antociani glicozilați extrași din fructele de *Aronia*, ca metodă promițătoare de vizualizare a antocianilor din interiorul celulelor tumorale B16-F10 prin fluorescență bazată pe tehnici moderne. În general, DPBA nu a dovedit nici un efect toxic asupra celulelor și nicio fluorescență în absența antocianilor, dar a ajutat la îmbunătățirea fluorescenței emise de antociani, permițând urmărirea lor intracelulară. Aceste cunoștințe noi reprezintă fundamentul pentru o mai bună înțelegere și exploatare a acestor compuși bioactivi. Extractul de antociani de *Aronia* a fost extras folosind metanol acidificat și concentrat utilizând un evaporator rotativ sub vid, iar ulterior purificat prin tehnica SPE, cu cartușe Sep-Pak C18. Antocianii au fost identificați și cuantificați prin HPLC cuplat cu detector DAD și ESI+-MS. Experimentele celulare au fost efectuate pe linia celulară de melanom murin B16-F10 și analiza citotoxicității a fost măsurată cu testul WST-1. Investigația chimică și fluorescență a complexului antociani-DPBA au fost obținute prin spectrometrie de fluorescență în stare de echilibru, analiză prin rezonanță magnetică nucleară și spectrometrie de masă de înaltă rezoluție, imagistică prin microscopie cu fluorescență și analiză de sortare a celulelor activate prin fluorescență (FCM).

Elemente de originalitate

Constatările prezentate în această teză de doctorat ar putea fi considerate o completare importantă la cunoștințele existente în domeniul studiilor antocianilor și implicarea acestora în aplicații medicinale. S-au generat noi date pentru compoziția chimică a zmeurului și a dudului și anume, identificarea diferiților antociani din cele două surse: cianidin-3-O-glucozid, cianidin-3-O-rutinozid (dude), cianidin-3-O-soforozid și cianidin-3-O-soforozid-5-ramnozid (zmeură). Frațiunile purificate de antociani au demonstrat potențial antiproliferativ în HeLa, celulele canceroase de col uterin uman și A2780, liniile celulare de cancer ovarian uman.

Cercetările noastre au oferit, de asemenea, noi cunoștințe în domeniul extracției antocianilor și susțin explorarea și aplicarea ulterioară a acestora în industria alimentară. Au fost alese ca surse de antociani două matrice, *Aronia* (*Aronia melanocarpa*) și morcovii mov (*Daucus carota sp.*) și au fost selectați patru solvenți obișnuiți pentru analiză: acetonă, metanol, etanol și apă. Cel mai bun solvent a fost

Antocianii, compuși fitochimici cu aplicații biomedicale: caracterizare biochimică și acțiune biologică *in vitro* favorizat luând în considerare mai multe criterii: stabilitatea antocianilor, cantitatea identificată, structura chimică și efectul anticancerigen asupra celulelor melanomului

murin B16-F10. Pentru fructe precum *Aronia* cu compoziție exclusivă de antociani glicozilat, metanolul s-a dovedit a fi cea mai bună opțiune de extracție, în timp ce pentru legume precum morcovul mov, cu conținut de antociani acilați, etanolul a fost cea mai potrivită modalitate de extracție și conservare a acestor antioxidanți.

În cele din urmă, această teză a oferit un sprijin suplimentar pentru o strategie promițătoare pentru dezvoltarea de noi metode de monitorizare a antocianilor direct în celulele tumorale, care ar putea fi utilizată într-o terapie de generație următoare a melanomului. Antocianinii extrași și purificați din surse naturale (fructe de *Aronia*), cu fluorescență scăzută sau nulă, au fost complexați cu acid difenilboric 2-aminoetil (DPBA), un colorant ne fluorescent. Rezultatele au arătat o îmbunătățire a semnalului de fluorescență emis, care poate fi detectat cu microscopia cu fluorescență direct în interiorul celulelor melanomului, pentru o mai bună înțelegere și vizualizare a traseului lor intracelular. Rezultatele noastre propun DPBA ca fiind un colorant fluorescent promițător pentru vizualizarea antocianilor în celulele tumorale prin fluorescență bazată pe tehnică modernă.

Perspective de viitor

În urma lucrărilor menționate mai sus și în urma unei analize amănunțite a literaturii de specialitate, în special asupra celor mai recente studii, am ajuns să descoperim marele potențial pe care antocianinii îl pot oferi în tratamentul sau ameliorarea bolilor cronice cu incidență ridicată în populația umană, cu beneficii suplimentare în ceea ce privește efectele secundare mai ușoare față de tratamentele existente în prezent. Cu toate acestea, am descoperit și lacunele și limitele în cunoștințele actuale despre antociani. Cel mai important dintre toate este efortul de a dezvolta tratamente durabile din punct de vedere economic, cu capacitatea de a menține stabilitatea chimică extrem de volatilă a antocianilor și, în consecință, funcția lor benefică. Din acest motiv, am dori să continuăm studiile pe antociani și să includem acești biocompuși în sistemele de transport polimerice de scară nanometrică, drept terapie de livrare țintită pentru melanom, pentru o acțiune mai precisă și mai rapidă și, de asemenea, pentru păstrarea structurii și funcțiilor lor chimice.

Referințe

1. Diaconesa, Z.; Leopold, L.; Rugina, D.; Ayvaz, H.; Socaciu, C., Antiproliferative and antioxidant properties of anthocyanin rich extracts from blueberry and blackcurrant juice. *Int J Mol Sci* **2015**, 16, (2), 2352-65.
2. He, J.; Giusti, M. M., Anthocyanins: natural colorants with health-promoting properties. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* **2010**, 1, 163-87.
3. Li, D. T.; Wang, P. P.; Luo, Y. H.; Zhao, M. Y.; Chen, F., Health benefits of anthocyanins and molecular mechanisms: Update from recent decade. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **2017**, 57, (8), 1729-1741.

4. Castañeda-Ovando, A.; Pacheco-Hernández, M. d. L.; Páez-Hernández, M. E.; Rodríguez, J. A.; Galán-Vidal, C. A., Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry* **2009**, 113, (4), 859-871.
5. Landi, M.; Tattini, M.; Gould, K. S., Multiple functional roles of anthocyanins in plant-environment interactions. *Environ. Exp. Bot.* **2015**, 119, 4-17.
6. Rugina, D.; Diaconeasa, Z.; Coman, C.; Bunea, A.; Socaciu, C.; Pinteau, A., Chokeberry Anthocyanin Extract as Pancreatic beta-Cell Protectors in Two Models of Induced Oxidative Stress. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2015**, 2015, 429075.
7. Coman, C.; Leopold, L. F.; Rugina, O. D.; Barbu-Tudoran, L.; Leopold, N.; Tofana, M.; Socaciu, C., Green synthesis of gold nanoparticles by *Allium sativum* extract and their assessment as SERS substrate. *J. Nanopart. Res.* **2013**, 16, (1).
8. Bunea, A.; Rugina, D.; Sconta, Z.; Pop, R. M.; Pinteau, A.; Socaciu, C.; Tabaran, F.; Grootaert, C.; Struijs, K.; VanCamp, J., Anthocyanin determination in blueberry extracts from various cultivars and their antiproliferative and apoptotic properties in B16-F10 metastatic murine melanoma cells. *Phytochemistry* **2013**, 95, 436-44.
9. Afaq, F.; Zaid, M. A.; Khan, N.; Dreher, M.; Mukhtar, H., Protective effect of pomegranate-derived products on UVB-mediated damage in human reconstituted skin. *Exp. Dermatol.* **2009**, 18, (6), 553-61.
10. Chamcheu, J. C.; Afaq, F.; Syed, D. N.; Siddiqui, I. A.; Adhami, V. M.; Khan, N.; Singh, S.; Boylan, B. T.; Wood, G. S.; Mukhtar, H., Delphinidin, a dietary antioxidant, induces human epidermal keratinocyte differentiation but not apoptosis: studies in submerged and three-dimensional epidermal equivalent models. *Exp. Dermatol.* **2013**, 22, (5), 342-8.
11. Pratheeshkumar, P.; Son, Y. O.; Wang, X.; Divya, S. P.; Joseph, B.; Hitron, J. A.; Wang, L.; Kim, D.; Yin, Y.; Roy, R. V.; Lu, J.; Zhang, Z.; Wang, Y.; Shi, X., Cyanidin-3-glucoside inhibits UVB-induced oxidative damage and inflammation by regulating MAP kinase and NF-kappaB signaling pathways in SKH-1 hairless mice skin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2014**, 280, (1), 127-37.
12. Afaq, F.; Syed, D. N.; Malik, A.; Hadi, N.; Sarfaraz, S.; Kweon, M. H.; Khan, N.; Zaid, M. A.; Mukhtar, H., Delphinidin, an anthocyanidin in pigmented fruits and vegetables, protects human HaCaT keratinocytes and mouse skin against UVB-mediated oxidative stress and apoptosis. *J. Invest. Dermatol.* **2007**, 127, (1), 222-32.
13. Kim, J. E.; Kwon, J. Y.; Seo, S. K.; Son, J. E.; Jung, S. K.; Min, S. Y.; Hwang, M. K.; Heo, Y. S.; Lee, K. W.; Lee, H. J., Cyanidin suppresses ultraviolet B-induced COX-2 expression in epidermal cells by targeting MKK4, MEK1, and Raf-1. *Biochem. Pharmacol.* **2010**, 79, (10), 1473-82.
14. Murapa, P.; Dai, J.; Chung, M.; Mumper, R. J.; D'Orazio, J., Anthocyanin-rich fractions of blackberry extracts reduce UV-induced free radicals and oxidative damage in keratinocytes. *Phytother. Res.* **2012**, 26, (1), 106-12.
15. Nistor, M.; Focsan, M.; Gaina, L.; Cenariu, M.; Pinteau, A.; Socaciu, C.; Rugina, D., Real-time fluorescence imaging of anthocyanins complexed with diphenylboric acid 2-aminoethyl inside B16-F10 melanoma cells. *Phytochemistry* **2021**, 189, 112849.