**AVIZAT**

Secția AȘM _____

Coordonatorul secției

_____ 2021

**APROBAT**

Agenția Națională pentru Cercetare și Dezvoltare

Director general

Olga TAGADIUC _____

_____ 2021

L.Ș.

# RAPORT FINAL

## privind executarea proiectului bi/multilateral

**19.80013.80.07.08A/BL**

**„Obținerea și cercetarea farmaceutică a derivaților de propiltiodiazolochinazolinonă cu proprietăți biofarmaceutice optimizate"**

**2019-2020**

**24 luni**

Direcția Strategică — Sănătate și Biomedicină (16.04, 18.04)

Conducătorul proiectului — Vladimir VALICA _____

Directorul organizației — Emil CEBAN _____

Consiliul științific/Senat — Emil CEBAN _____

**L.Ș.**

**Chișinău 2020**

1. Scopul general al proiectului conform formularului de aplicare

| |
|---|
| Descoperirea de noi molecule cu mecanism de acțiune diferit față de cele cunoscute, dezvoltarea de noi reprezentanți ai unor clase de antimicobacteriene derivați de propiltiodiazolochinazolin-onă cu proprietăți biofarmaceutice optimizate. |

2. Obiectivele proiectului conform formularului de aplicare

| |
|---|
| 1. Sinteza derivaților de propiltiodiazolochinazolin-onă cu proprietăți biofarmaceutice optimizate (săruri, derivați halogenați);<br>2. Studii microbiologice și cercetarea activității antimicobacteriene a substanțelor sintetizate;<br>3. Studii de toxicitate acută și cronică a compușilor obținuți prin sinteză;<br>4. Evaluarea disponibilității farmaceutice a substanțelor și selectarea compușilor optimi;<br>5. Studiul proprietăților fizico-chimice ale compușilor selectați și elaborarea metodelor de analiză și standardizare. |

3. Acțiunile planificate pentru realizarea scopului și obiectivelor proiectului

| |
|---|
| 1. Sinteza a 3 derivaţi de propiltiodiazolochinazolinonă: MF-001 (MF-001); Sulfat de MF-001 (MF-001-$H_2SO_4$); complexul MF-001ului cu ciclodextrine (β-CD-MF-001)<br>2. Studii microbiologice și cercetarea activității antimicobacteriene a substanțelor sintetizate;<br>3. Cercetarea activității antibacteriene a compusului MF-001<br>4. Studii de toxicitate acută a compușilor obținuti prin sinteză pe soareci.<br>5. Studii de toxicitate subacută a compusului MF-001.<br>6. Studiul proprietăților fizico-chimice ale compușilor selectați.<br>7. Elaborarea metodelor de analiză pentru substanțele active.<br>8. Elaboraraea metodelor de standardizare pentru substanța MF-001.<br>9. Studii de stabilitate pentru substanța MF-001. Elaborarea DAN. |

4. Acțiunile realizate pentru atingerea scopului și obiectivelor proiectului

| |
|---|
| 1. Au fost sintetizați 3 derivaţi de propiltiodiazolochinazolinonă: MF-001 (MF-001); Sulfat de MF-001 (MF-001-$H_2SO_4$); complexul MF-001ului cu ciclodextrine (β-CD-MF-001);<br>2. S-au efectuat studii microbiologice și s-a cercetat activitatea antimicobacteriană a substanțelor sintetizate;<br>3. S-a cercetat activitatea antibacteriană a compusului MF-001;<br>4. S-au efectuat studii de toxicitate acută a compușilor obținuti prin sinteză pe soareci.<br>5. S-au efectuat studii de toxicitate subacută a compusului MF-001.<br>6. Au fost evaluate proprietățile fizico-chimice ale compușilor selectați.<br>7. S-au elaborat metode de analiză pentru substanțele active.<br>8. S-au elaborat metode de standardizare pentru substanța MF-001.<br>9. S-a cercetat stabilitatea pentru substanța MF-001 și a fost elaborat proiectul de monografie farmacopeică pentru substanța MF-001. |

5. Rezultatele obținute

| |
|---|
| I. **ELABORAREA SARCINII TEHNICE** |

Elaborarea sarcinii tehnice a proiectului s-a efectuat pentru fiecare echipă separate, apoi prin coordonarea activităților echipelor. Au fost stipulate principalele obiective: domeniul de aplicare, scopul şi conţinutul lucrărilor, rezultatele scontate, metodele şi mijloacele de realizare a proiectului etc.

Au fost organizate întruniri de lucru ale echipei de cercetare (05.03.19 și 21.03.19); s-a organizat o teleconferință organizatorică cu echipa din Belarus (28.03.19). Au fost trasate şi definitivate principalele obiective de realizare a proiectului şi a rezultatelor scontate.

## II. SINTEZA DERIVAŢILOR DE PROPILTIODIAZOLOCHINAZOLINONĂ

Actualmente, există o necesitate critică în elaborarea medicamentelor ieftine pentru tratamentul unor astfel de boli ca tuberculoza, având în vedere utilizarea acestora în țările în dezvoltare de către populația cu nivelul redus de venituri. Mai mult ca atât, situația se agravează prin dezvoltarea rezistenței bacteriene față de antibioticele contemporane care impune crearea medicamentelor noi sau modificarea celor existente cu scopul de a combate rezistența microorganismelor patogene. Ca exemplu, astăzi se cunosc mai multe tulpini de *Mycobacterium tuberculosis* rezistente față de unul sau mai multe medicamente antituberculoase.

Mai multe medicamente antituberculoase sunt reprezentate de compușii heterociclici. Clasa această reprezintă o bază pentru investigațiile noastre care includ și studiul chinazolinonelor cu o varietate mare de activități biologice. Printre avantajele mercapto-tiadiazolochinazolinonelor se numără accesibilitatea precursorilor lor – derivaților acidului 2-aminobenzoic. Pentru ultimii se cunosc atât avantajele practice, cât și dezavantajul principal – toxicitatea crescută a unor derivați care limitează utilizarea acestora în medicină. În lucrarea prezentă s-a pus accentul pe sinteza 2- -5*H*-[1,3,4]tiadiazolo[2,3-b]chinazolin-5-onelor pe baza materiei prime disponibile – acidul antranilic **1a** (fig.1). Astfel, hidrazonoliza esterului metilic al acidului 2-aminobenzoic **1b** cu hidratul de hidrazină rezultă în formarea hidrazidei corespunzătoare **2**, din care, în reacția cu disulfură de tetrametiltiuram în DMFA, se obține 2-mercapto-5H-[1,3,4]tiadiazolo[2,3-b]chinazolin-5-ona **3a**.

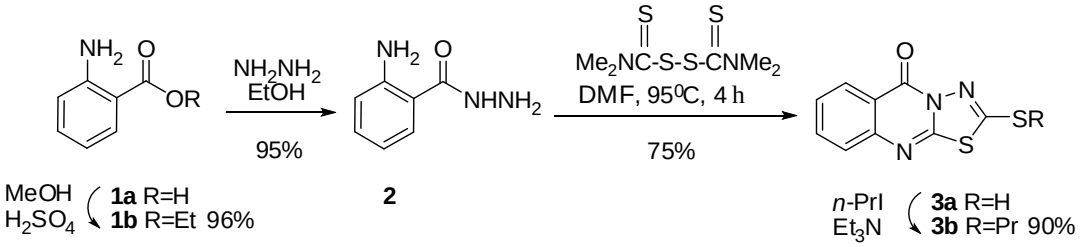



Fig. 1. Schema de sinteză a 2-mercapto-5*H*-[1,3,4]tiadiazolo[2,3-b]chinazolin-5-onei.

Interacțiunea tiolului **3a** cu iodură de propil în acetonă în prezența $Et_3N$ la temperatura camerei rezultă în tioeterul **3b**. A fost depistat că prelucrarea soluției propil-tiadiazolo[2,3-b]chinazolin-5-onei **3b** în benzen cu acidul sulfuric duce la formarea substanței cristaline **4**, structura și compoziția căreea au fost confirmate prin metodele fizico-chimice de analiză.

Se cunoaște că în mediul apos ciclodextrinele formează compușii complecși, așa numiți clatrați, cu compușii lipofili, în care are loc substituirea moleculelor de apă din cavitatea hidrofobă a ciclodextrinelor prin incluziunea totală sau parțială a moleculei-oaspete. În cadrul procesului de formare a clatraților nu are loc formarea legăturilor covalente, așadar moleculele compusului inclus în cavitatea hidrofobă a ciclodextrinei se află într-un echilibru dinamic cu moleculele compusului și ciclodextrinei libere.

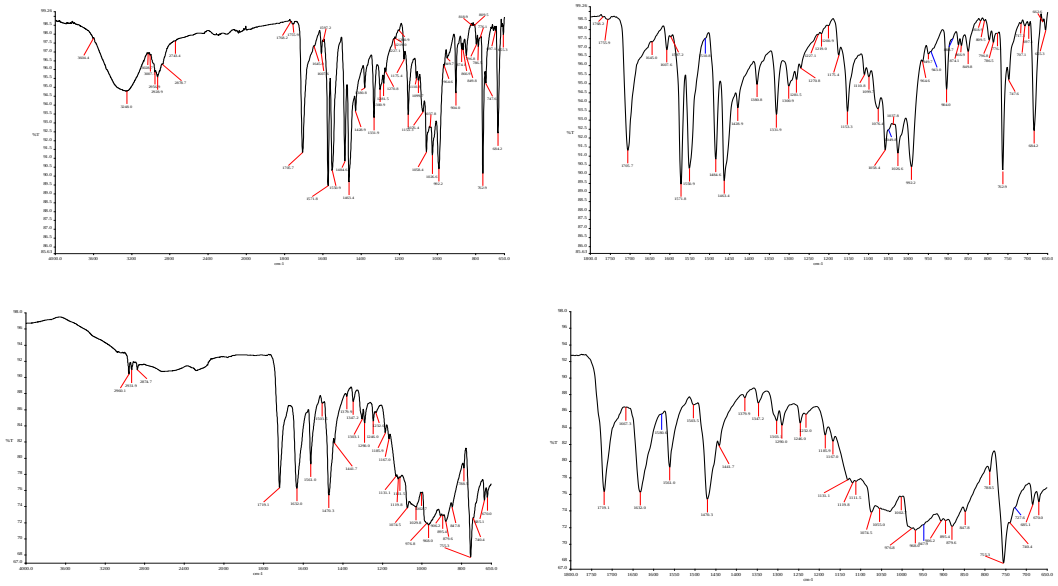


Fig. 2. Spectrele în IR ale substanțelor sintetizate

Cu scopul creșterii permeabilității propil-tiadiazolo[2,3-b]chinazolin-5-onei **3b** din microparticulele sistemelor complexe cu participarea β-ciclodextrinei a fost pregătit un sistem binar format din β-ciclodextrina și eterul **3b** în raport echimolar și în prezența unui volum necesar de apă.

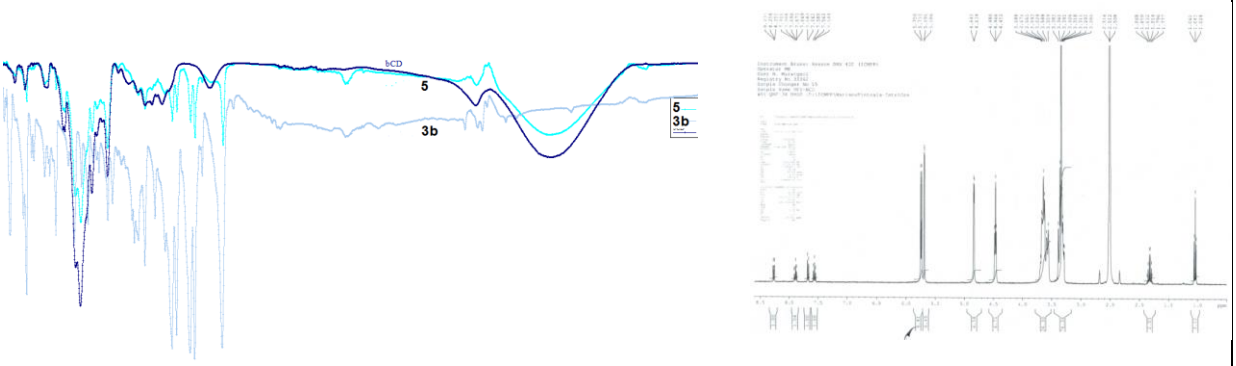



Fig. 3. Spectrele IR și $^{1}$H NMR ale amestecului binar al propil-tiadiazolo[2,3-b]chinazolin-5-onei cu ciclodextrina

Astfel, produsul **5** a fost obținut prin uscarea prin liofilizare a sistemului binar și structura lui a fost confirmată prin metoda de spectrometrie IR și $^{1}$H NMR în timp ce dimensiunile particulelor au fost confirmate prin metoda SEM.

## III. STUDII MICROBIOLOGICE ȘI CERCETAREA ACTIVITĂȚII ANTIMICOBACTERIENE A SUBSTANȚELOR SINTETIZATE

### 3.1. Determinarea activitatii antimicrobiene prin metode cantitative si calitative

Inițial s-au evaluat proprietățile antibacteriene pentru compusul de bază - propil-tiadiazolo[2,3-b]chinazolin-5-onă prin metoda difuzimetrică adaptată și metoda microdiluților. Totodată s-a evaluat influența propil-tiadiazolo[2,3-b]chinazolin-5-onei asupra capacității de aderență la substrat inert a unor tulpini microbiene. Influența asupra capacității de aderență la

substrat inert s-a cuantificat după efectuarea protocolului analizei cantitative a efectului antimicrobian, prin metoda microtitrării, evaluându-se biomasa aderată, după fixare cu metanol şi colorare cu cristal violet.

Evaluarea calitativă a activității antimicrobiene a relevat creștere microbiană pentru toate tulpinile studiate la nivelul striului de cultură trasat pe mediul solid, ceea ce poate fi corelat cu absența difuziei substanței de testat în mediul de cultură, care nu permite realizarea unui gradient de concentrație al acesteia în mediu și să determine aprecierea activității antimicrobiene prin metoda difuzimetrică.

Studiul de față a permis aprecierea spectrului activității antimicrobiene a derivatului de propiltiodiazolochinazolinonă prin evaluare cantitativă. Solventul utilizat pentru solubilizare, DMSO, nu a manifestat activitate antimicrobiană asupra tulpinilor studiate, la concentrații comparabile cu cele din amestecurile derivat de 5-aril-2-tio-1,3,4-oxadiazol : DMSO. Valorile CMI pentru tulpinile studiate se încadrează în intervalul 640-20µg/mL, cele mai sensibile fiind tulpina fungică (*C. albicans* ATCC 10231) și tulpina *E. faecalis* ATCC 29212. Substanța studiată prezintă activitate antimicrobiană maximă asupra tulpinilor Gram-pozitive și a celei fungice (fig. 4).

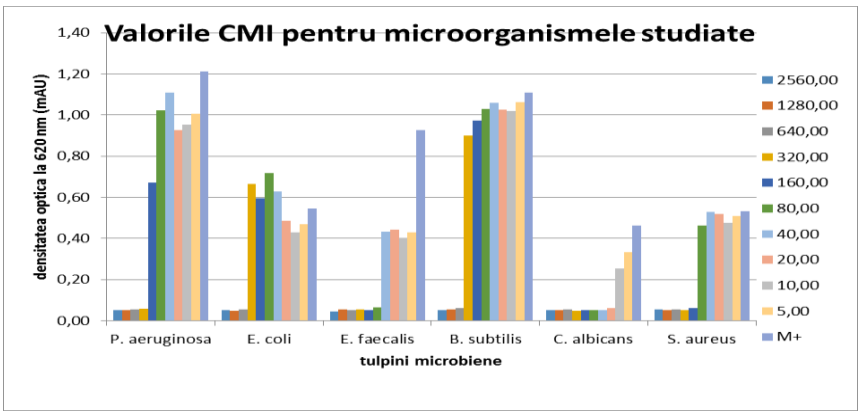



Fig. 4. Valorile CMI pentru microorganismele studiate.

La concentrații CMI/2 a fost inhibată capacitatea de aderență la substratul inert reprezentat de placa cu 96 de godeuri, pentru toate tulpinile studiate.

### 3.2. Determinarea acțiunii antimicobacteriene a substanțelor cercetate.

În calitate de materie pentru testare au fost utilizați trei compuși sintetici din grupul propiltiodiazolochinazolinonei: MF-001 (MF-001); Sulfat de MF-001 (MF-001-H2SO4); complexul MF-001ului cu ciclodextrine (β-CD-MF-001). Testarea preparatelor s-a efectuat pe sistemul BACTEC MGIT 960, utilizând tulpina de referință *M. tuberculosis H37Rv*. Rezultatele studiului au avut la bază stabilirea *in vitro* a capacității de inhibiție și multiplicare a creșterii a tulpinii de referință prin determinarea concentrației minime inhibitoare (CMI) a substanțelor studiate. Evaluarea rezultatelor testării preparatelor s-a efectuat utilizând modulul TBeXiST al aplicației EpiCenter. Procedura de apreciere a activității antimicobacteriene *in vitro* a compușilor sintetici din grupul propiltiodiazolochinazolinonei a fost ajustată în corespundere cu recomandările producătorului pentru Testarea sensibilității *M. tuberculosis* față de preparatele antituberculoase (TSA) în mediu lichid 7H9 în sistemul BACTEC MGIT 960.

Etapa inițială a inclus testarea substanțelor MF-001; MF-001-H2SO4 și β-CD-MF-001

la concentrațiile 10 µg/ml, 50 µg/ml și 100 µg/ml, utilizând tuburile cu mediu lichid mediu lichid 7H9 și sistemul MGIT (Mycobacteria Growth Indicator Tube). Incubarea la temperatura 37˚C în sistemul BACTEC MGIT 960 s-a făcut conform protocolului de 28 de zile pentru testarea Mycobacterium tuberculosis.

În dependență de rezultatele TSA, au fost stabilite concentrațiile pentru etapa a doua de testare, după cum urmează (*Tabelul 1*).

Tabelul 1. Stabilirea concentrațiilor de lucru a compușilor sintetici din grupul propiltiodiazolochinazolinonei.

| Denumire preparat | Concentrația finală a preparatului în tubul MGIT (µg/ml) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| MF-001 | 10 | 50 | 100 | 0,5 | 1,0 | 5,0 |
| MF-001-H2SO4 | 10 | 50 | 100 | 10 | 15 | 20 |
| β-CD-MF-001 | 10 | 50 | 100 | 10 | 15 | 20 |

Rezultatele cercetărilor efectuate au evidențiat acțiunea antimicobacteriană a preparatului MF-001 pe tulpina de referință M. *tuberculosis H37Rv* la concentrațiile de 10 µg/ml, 50 µg/ml și 100 µg/ml. La utilizarea concentrațiilor 0,5 µg/ml, 1,0 µg/ml și 5,0 µg/ml, compusul sintetic MF-001 nu a manifestat efect tuberculocid.

Studierea microbiologică a preparatului de sinteză MF-001-$H_2SO_4$ a evidențiat proprietăți antimicobacteriene asupra tulpinii *M. tuberculosis H37Rv* la concentrațiile de 50 µg/ml și 100 µg/ml. Testarea ulterioară la concentrațiile 10 µg/ml 15 µg/ml și 20 µg/ml, compusul sintetic MF-001- $H_2SO_4$ nu a manifestat efect tuberculocid.

Compusul β-CD-MF-001 a manifestat proprietăți antimicobacteriene asupra tulpinii *M. tuberculosis H37Rv* la concentrațiile de 50 µg/ml și 100 µg/ml, iar la concentrațiile de 10 µg/ml 15 µg/ml și 20 µg/ml s-a evidențiat creșterea tulpinii testate pe tubul MGIT, ceea ce demonstrează lipsa acțiunii antimicobacteriene.

Activitatea compușilor sintetici din grupul propiltiodiazolochinazolinonei poate fi vizualizată în tabelul 2.

Tabelul 2. Activitatea compușilor sintetici din grupul propiltiodiazolochinazolinonei la diferite concentrații

| Denumire preparat | Concentrația finală a preparatului în tubul MGIT (µg/ml) – testarea primară | | | Concentrația finală a preparatului în tubul MGIT (µg/ml) – testarea secundară | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | **100** | **50** | **10** | **10** | **15** | **20** | **5,0** | **1,0** | **0,5** |
| MF-001 | - | - | - | n/a | n/a | n/a | + | + | + |
| MF-001- $H_2SO_4$ | - | - | + | + | + | + | n/a | n/a | n/a |
| β-CD-MF-001 | - | - | + | + | + | + | n/a | n/a | n/a |

[+/-] – prezență/absență creștere; n/a – nu se aplică

Rezultatele testării *in vitro* a compușilor sintetici din grupul propiltiodiazolochinazolinonei pe tulpina de referință *M. tuberculosis H37Rv* au demonstrat activități antimicobacteriene a tuturor preparatelor. Pentru compusul MF-001 a fost determinată activitate antituberculoasă la concentrația minimă de 10 µg/ml. Substanțele MF-001- $H_2SO_4$ și β-CD-MF-001 au manifestat activitate antituberculoasă la concentrația minimă de 50 µg/ml.

Studierea activității antituberculoase a celor trei derivați de propiltiadiazoloquinazolină s-a efectuat și pe medii de cultură solide, în raport cu izoniazida, etambutol și rifampicina.

Soluțiile au fost diluate până la concentrațiile finale 6,25 mg/ml, 12,5 mg/ml, 25,0 mg/ml, 50,0 mg/ml, 100,0 mg/ml, 200,0 mg/ml și s-a determinat activitatea antituberculoasa în raport cu testul - Micobacterium terrae ATCC 15755. Studiul activității antituberculozice a compușilor sintetizați a fost efectuat pe tulpina *Micobacterium terrae* ATCC 15755, care nu este patogenă și este recomandată pentru utilizare ca model pentru determinarea activității antituberculoase. Pentru a evalua proprietățile antituberculoase ale compușilor, s-a determinat concentrația minimă inhibitoare a MIC (μg / ml), care corespunde concentrației analitului și la care nu s-a observat creșterea micobacteriilor în cutia Petri. Au fost utilizate ca standarde substante medicamentoase antituberculoase bine cunoscute: *izoniazidă, rifampicină și etambutol.*

Tabelul 3 - Proprietăți antituberculoase ale compușilor sintetizați

| Compusul studiat | Rezultate, MIC, μg / ml 17.03.20 – 03.04.20 | Rezultate, MIC, μg / ml 03.06.20 – 30.06.20 | Rezultate, MIC, μg / ml 24.07.20 – 19.08.20 |
|---|---|---|---|
| MF-001 | 100 μg / ml (+) - creștere ușoară | > 200 μg / ml (+++) - creștere puternică | 200 μg / ml (nici o creștere) |
| MF-001-$H_2SO_4$ | 100 μg / ml (+) - creștere ușoară | 100 μg / ml (++) - creștere slabă | 200 μg / ml (nici o creștere) |
| β-CD-MF-001 | 100 μg / ml (+) - creștere ușoară | 200 μg / ml (++) - creștere slabă | 200 μg / ml (nici o creștere) |
| Rifampicina | - | 100 μg / ml (+) - creștere ușoară | 200 μg / ml (nici o creștere) |
| Izoniazida | - | 25 μg / ml (+) - creștere ușoară | 100 μg / ml (nici o creștere) |
| Etambutol | - | 12,5 μg / ml (++) - creștere slabă | 50 μg / ml (nici o creștere) |

După efectuarea acestor studii se constată, că 2-mercapto-5H- [1,3,4] tiadiazolo [2,3-b] chinazolin-5-ona în intervalul de concentrație de 25-200 μg / ml nu suprimă creșterea microorganismelor cu 100%, prin urmare, MIC = 200 μg / ml (care este confirmat de 4 experimente din 5). Sulfatul de 2-mercapto-5H- [1,3,4] - tiadiazolo- [2,3-b] chinazolin-5-ona a manifestat MIC = 200 μg / ml. Complexul de 2-mercapto-5H- [1,3,4] tiadiazolo [2,3-b] chinazolin-5-ona cu beta-ciclodextrină a manifestat MIC = 200 μg / ml.

## IV. STUDII DE TOXICITATE ACUTĂ A COMPUȘILOR OBȚINUTI PRIN SINTEZĂ.

### 4.1. Determinarea toxicității acute a propiltiodiazolochinazolinonei.

S-a efectuat cercetarea toxicității acute a propiltiodiazolochinazolinonei pe rozătoare mici pentru doze de 2000 și 5000 mcg/ml și stabilirea pragului de toxicitate. Determinarea toxicităţii acute a compusului MF-001ului s-a efectuat- conform ghidului european OECD 423 prin administrarea MF-001ului în suspensie 20% (pentru doza de 2000 mg/kg) şi 50% (pentru doza de 5000 mg/kg), s-a realizat în condiţii de post alimentar. Procedurile au fost efectuate conform normelor de bioetică prezentate în Directiva 2010/63/EU din 22 septembrie 2010 și în baza Avizului pozitiv al Comitetului de Etică din cadrul USMF ”Nicolae Testemițanu”, N 116 (Proces verbal n.88 din 21.06.2017). La sfârşitul experimentului, animalele au fost sacrificate şi s-au recoltat probe de sânge pe care s-au efectuat examene hematologice şi

biochimice.

După administrarea MF-001ului animalele au fost observate timp de 4 ore, apoi zilnic timp de 14 zile; s-au urmărit semnele de toxicitate: modificări patologice pe tegumente sau / şi mucoase; modificări ale aspectului exterior; afectări patologice la nivelul altor aparatelor şi sistemelor; modificări de comportament alimentar, sexual;

Rezultatele experimentale au evidenţiat următoarele aspecte: nu a apărut efect letal la nici una dintre dozele testate experimental: 2000 – 5000 mg/kg corp, p.o.; pentru toate loturile modificările greutăţii corporale au fost reduse şi nesemnificative statistic faţă de lotul martor; nu s-au înregistrat modificări ale aspectului exterior / comportamentului motor al animalelor din loturile de cercetare.

Deoarece în urma determinării toxicităţii acute nu s-a înregistrat letalitate la doza de 5000 mg/kg (nu s-a atins $DL_{50}$ 25%), s-a considerat că în conformitate cu ghidul OECD 423 privind determinarea toxicităţii acute a compusului DIOX (administrare p.o), în doză unică, MF-001ul s-a încadrat în categoria 5: DL50 > 5000 mg/kg, p.o. ); [conform datelor prezentate în Global Harmonised System (GHS) - ENV/JM/MONO(2001)6, 2001].

**4.2. Determinarea impactului compusului propiltiodiazolochinazolinonă asupra metabolismului glucidic și lipidic.**

Studiul experimental s-a efectuat pe animale de laborator (şobolani). Scopul principal al cercetărilor întreprinse a fost de a identifica eventualele consecinţe negative și pozitive ale substanței. Am urmărit apariţia unui sindrom metabolic şi a efectelor adverse la nivel hepatic, deoarece ficatul este implicat în metabolizarea substanţelor, şi la nivel renal, pentru că rinichiul este organ de epurare al organismului. Astfel, obiectivele lucrării au fost: urmărirea modificării metabolismului glucidic şi a metabolismului lipidic prin administrarea substanţei testate; apariţia modificărilor în concentraţia serică şi salivară a leptinei induse medicamentos; explorarea funcţională a ficatului şi rinichilor prin determinarea transaminazelor, respectiv a ureei serice şi a creatininei serice în condiţiile tratamentului cu MF-001; eventualele modificări morfologice ale ficatului şi rinichiului în urma terapiei cu antibacteriane luate în studiu.

Testările s-au efectuat prin metode biochimice: Metoda pentru determinarea glicemiei ; Metoda pentru dozarea colesterolului total; Metoda pentru dozarea trigliceridelor.

Rezultatele examenului biochimic au arătat: *metabolism glucidic*: In cazul glicemiei se observa o scadere nesemnificativa a valorilor din lotul tratat cu MF-001 fata de lotul martor; *metabolism lipidic*: colesterolemia si valorile HDL-colesterol, LDL-colesterol si transaminazele serice nu au prezentat modificari semnificative comparativ cu martorii; *creatinină şi acid uric*: în cazul valorilor creatininei serice se observa o usoara crestere fata de martor; în cazul acidului uric se observa o diminuare slaba a valorii fata de martor; *enzime hepatice*: enzimele hepatice nu au prezentat modificari semnificative comparativ cu martorii.

**4.3. Examenul anatomo patologic al organelor interne ale animalelor de laborator sacrificate.**

Fragmentele prelevate au fost prelucrate pentru examinare în microscopia optică prin tehnica includerii la parafină urmată de efectuarea unor secţiuni seriate, parcurgând următoarele etape: deshidratare, clarificare, parafinare, includere propriu-zisă în parafină, secţionarea blocului, montarea lamelelor. Coloraţia hematoxilină-eozină este cea mai utilizată coloraţie histologică. Se foloseşte un colorant bazic, nuclear reprezentat de hematoxilină sau

hemalaun (format din hemateină şi alaun de potasiu) şi un colorant acid, citoplasmatic, reprezentat de eozină.

Tehnici de imunohistochimie: Pentru studiul imonohistochimic au fost utilizate fragmente tisulare imersate pentru 24 ore în soluţia de fixare, incluse în parafină şi secţionate în secţiuni cu grosimea de 4 microni la microtomul Microm HN 325. Secţiunile au fost etalate pe lame aderente de tip K8020 şi au fost procesate în patru sesiuni distincte pentru uniformizarea condiţiilor de lucru. După deparafinare şi hidratare, secţiunile au fost tratate prin tehnica HIER cu citrat de sodiu la 97°C, timp de 20 de minute, urmată de blocarea peroxidazei endogene (cu soluţie Peroxidase Block, Novocastra UK). Secţiunile au fost incubate peste noapte la rece cu anticorpul primar iar ulterior cu anticorpul secundar timp de 30 de minute la temperatura camerei. Conform instrucţiunilor, reacţiile au fost developate cu 3.3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB Chromogen, Novocastra UK), timp de 5 minute. Contracolorarea a fost realizată cu hematoxilină Mayer. Concomitent au fost efectuate controalele pozitive şi negative. Pentru scanarea şi preluarea imaginilor s-a folosit sistemul Zeiss Observer Z1 Tissue Gnostics 9 Tissue Faks.

*Examen anatomo patologic: p*entru realizarea examenului histopatologic, au fost recoltate fragmente de organe fixate ulterior în soluţie 10% formaldehidă. Secţiunile histologice au fost colorate prin metoda hematoxilină-eozină. A fost efectuat pe probe de ficat, rinichi si encefal de la soarecii tratati cu MF-001. Se observa in cazul ficatului o discreta staza focala, in cazul rinichiului o staza glomerulara, in cazul encefalului noduli gliali si usoara formare a mansoanelor perivasculare.

**4.4. Testarea fitobiologică a propiltiodiazolochinazolinonei.**

Testarea fitobiologica a noilor compuşi sintetizaţi evaluează anumite aspecte legate de citogenitatea şi citotoxicitatea eventuala a produselor realizate. Testarea acţiunii soluţiilor DMSO și PEG obţinute din compusul sintetizat, asupra alungirii radiculare şi asupra filmului micotic s-a realizat prin metoda fitobiologică-testul Triticum a prof. dr. Grigore Constantinescu. Evaluarea creşterii în lungime a fost efectuată utilizând tehnica măsurătorilor liniare din momentul iniţial al tratamentului, la intervale de 24 de ore , pe parcursul a 5 zile consecutive, această perioadă reprezentând faza cea mai activă de creştere. S-au făcut observaţii asupra modificărilor morfologice (aspectul şi lungimea epicolitului, aspectul şi lungimea radicelelor).

*Material biologic*: radacini embrionare de *Triticum vulgare* Mill, *Gramineae*, provenit din cultura ecologica. Determinarea influentei noului compus sintetizat – MF-001, asupra alungirii radiculare si asupra filmului mitotic al celulei vegetale s-a realizat prin: metoda profesorului D.Gr. Constantinescu (metoda fitobiologica – testul *Triticum*).

S-au efectuat probe in DMSO, in PEG 300 si doi martori in DMSO, respectiv PEG 300 si apa distilata.

Testarea fitobiologica. Examen microscopic (obiectiv 40x; 100x). S-au evidentiat probele care contin solventul DMSO si PEG 300. Acestea au prezentat aspect cetos, neclar, celule in interfaze cu aspect de precipitare al nucleolilor (nucleoli mari, cu forme modificate). La probele continand MF-001 in concentratii succesive $10^{-1}$ – $10^{-8}$ folosind ca solvent PEG 300 si apa distilata in cantitati crescande fata de PEG 300 s-a observat cu cat concentratia compusului este mai mica si cantitatea de apa este mai mare, telofaza este mai frecventa decat la probele precedente, inhibarea de cineze, nucleoli vizibili chiar cu hipertrofie. In probele

MF-001ului in PEG 300 si apa, de concentratie $10^{-8}$ s-au observat toate fazele diviziunii (anafaza, metafaza, telofaza, tropofaza – nucleii fiind turtiți), nucleoli hipertrofiati. Se observa inhibitia dezvoltarii radiculare datorata pe de o parte compusului MF-001, dar si solventului.

Preparate microscopice studiate la 24 ore de la introducerea cariopselor de *Triticum vulgare*, radacinile embrionare au fost sectionate la 5 mm distanta de varf si colorate cu orceina acetica diluata conform procedeului *La Cour* redau modificările filmului mitotic induse de MF-001.

**4.5. Studii de toxicitate acută a celor trei compuși obținuti prin sinteză (a doua partidă de sinteză).**

Testarea toxicității acute a celor trei compuși (MF-001, MF-001- $H_2SO_4$ și β-CD-MF-001 s-a realizat pentru doze de 100, 300, 500, 1000, 2000 mcg/ml și stabilirea pragului de toxicitate.

Toxicitatea acută (TA) a fost determinată prin metoda dozelor fixe cu stabilirea clasei toxice acute conform TG 423: *Acute Toxic Class Method,* recomandată de Organizația Economică pentru Cooperare și Dezvoltare (OECD), și după metoda *Kerber* [33, 80, 90].

Substanțele studiate și de referință au fost administrate şoriceilor enteral prin gavaj şi intraperitoneal. Cantitatea de lichid administrată a fost calculată în funcție de masa individuală a animalelor de laborator cântărite înainte de experiment (0,3 ml/g).

Pentru stabilirea TA, produsul a fost inițial administrat şoriceilor enteral prin gavaj și intraperitoneal în doze-teste de 100, 300, 500, 1000, 2000 mg/kg. Doze mai mari de 2000 mg/kg nu au fost folosite din cauza necesității unui volum mai mare de soluție fiziologică, fapt ce nu corespundea recomandărilor metodice. Intraperitoneal la șobolani au fost administrată în doze-teste de 100, 300, 1000, 2000 mg/kg.

*Rezultatele administrării enterale.* Pe parcursul studiului nu s-au constatat modificări în comportamentul şi activitatea motorie spontană a animalelor din lotul de control. Animalele erau în mişcare activă, întrebuinţau hrană şi apă. Starea mucoaselor şi a învelişului cutanat era în normă, fără schimbări patologice. Culoarea urinei era galben-deschis. Blana animalelor avea un aspect îngrijit, lucios, fără focare de alopecie. Dinţii păstraţi. Mucoasele vizibile erau palide, lucioase, netede. La palpare, glandele mamare ale femelelor – fără induraţii şi fără eliminări. Organele genitale la masculi – normal exprimate. Deformări sau edeme ale extremităţilor nu s-au remarcat.

Monitorizarea procesului de alimentare şi adăpare nu a evidenţiat modificări statistic semnificative între loturile cercetate şi cel de control. În a doua zi a studiului s-a remarcat o oarecare pierdere a greutăţii corporale la animalele din toate loturile.

La administrarea substanței de referință în doză de 100 mg/kg cu supraveghere timp de 14 zile nu s-au constatat modificări în comportamentul animalelor şi nici decesul lor.

Administrarea produselor în doze de 300, 500, 1000, 2000 mg/kg s-a caracterizat printr-o perioadă de hipodinamie şi reducere a reacţiei la stimulii exogeni. Majoritatea animalelor au revenit la starea inițială pe parcursul primelor 4 ore (300 mg/kg) și 24 ore (pentru 1000, 2000 mg). $LD_{50}$ conform metodei TG 423: *Acute Toxic Class Method* a fost estimată la ≥ 2500 mg/kg inofensivă, clasa de toxicitate 5 (tab. 4).

Tabelul 4. Determinarea clasei de toxicitate a MF-001, MF-001- $H_2SO_4$ și β-CD-MF-001 conform TG 423: Acute Toxic Class Method (OECD) pentru administrarea enterală

| ***Denumirea*** | ***Clasa de toxicitate*** | ***DL50/LD50 estimat mg/kg*** |
|---|---|---|
| β-CD-MF-001 | 5 | >2000 – 5000= 2500 mg/kg |

| | | |
|---|---|---|
| MF-001 | 5 | > 5000 mg/kg |
| MF-001-$H_2SO_4$ | 5 | >2000 – 5000= 2500 mg/kg |

In urma investigațiilor efectuate, s-a constatat că substanțele posedă toxicitate redusă: clasa de toxicitate 5 și $LD_{50}$ estimat>2500 mg/kg (MF-Complex și MF-001-H2SO4) si >5000 mg/kg pentru produsul MF-001.

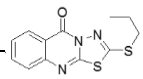
## V. STUDIUL PROPRIETĂȚILOR FIZICO-CHIMICE ALE COMPUȘILOR SELECTAȚI.

### 5.1. Determinarea lipofiliei moleculei de propiltiodiazolochinazolinonă

***Calcularea logP în baza structurii chimice***

Coeficientul de partiție octanol-apă este o proprietate fizică utilizată pe scară largă pentru a descrie lipofilia pentru un produs chimic sau proprietăți hidrofobe. Este raportul dintre concentrația unei substanțe chimice în faza de octanol-apă al unui sistem bifazic. Log P este un parametru important în numeroase relații cantitative structură-activitate (QSAR), care au fost dezvoltate pentru științele farmaceutice, biochimice și toxicologice. Studiile au aratat că log P este util pentru corelarea unui medicament, pentru procese chimice, de transport, și interacțiunile sale moleculare cu receptori, precum și modificările sale observate cu structurile biologice, biochimice, sau efecte toxice. Datorită utilizării sale în creștere în aceste și alte corelații relevante din mediul înconjurător, log P este considerată o proprietate, necesară în evaluarea chimică.

Tabelul 5.Valorile lipofilicității pentru fragmentele structurale ale propiltiodiazolochinazolinonei

| **2-(propiltio)-5h-[1,3,4]-tiadiazol[2,3-b]quinazolin-5-onă** *(*MF-001*)* |  |
|---|---|
| $CH_3$ | 0.5473 |
| $CH_2$ (x 2) | 0.9822 |
| S | -0.4045 |
| S | 1.2000 |
| C | 0.2940 |
| -N=C (x 2) | -0.0020 |
| ─N= | -1.8323 |
| C=O | -0.7121 |
| $C_6H_5$ | 1.7640 |
| **Log P** | 1.8366 |

Produse chimice noi sau în dezvoltare, de multe ori nu au valori măsurate. Din moment ce partea experimentală de măsurare poate fi dificilă, consumatoare de timp, și / sau scumpă, se obișnuiește să se estimeze log P, în special la nivel de screening. În industria farmaceutică, un număr mare de molecule candidate necesită o analiză la nivelul de screening, înainte ce un nou medicament ajunge în utilizare. Determinarea analitică este mult mai ușoară, mai rapidă, și mai ieftină decât măsurările experimentale. În literatura de specialitate sunt multe metode de estimare a log P, cele mai frecvente sunt, în care o structură este împărțită în fragmente (atom sau grupări funcționale mai mari) și valorile fiecărui grup se sumează (uneori cu factori de corecție structurali) pentru a obține determinarea log P.

LogP pentru o moleculă poate fi calculat ca o sumă fragmentelor sau a atomilor cu folosirea corecțiilor diferite.

$$\log P = \Sigma \text{ fragmente } + \Sigma \text{ corecţii}$$

**LogP** a fost calculat prin atribuirea pentru fiecare grupă funcțională a valorilor de lipofilie și însumarea acestora. Rezultatele calculelor respective sunt redate în tab. 5. S-a obținut valoarea lipofiliei 1,8366, valoare acceptabilă în conformitate cu regulile lui Lipinski (logP < 5).

***Determinarea experimentală a logP prin metoda spectrofotometrică***

Lipofilia compușilor cu proprietăți bazice sau acide este de asemenea o funcție a pH-ului. Schimbarea gradului de ionizare a substanței (mărire) duce la modificări lipofilicitații (scădere) deoarece, molecule polare, încărcate sunt slab solubili în solvenți polari și slab non-polare. Pentru a determina concentrația în fazele apoasă și organică poate fi utilizată orice metodă adecvată. De exemplu, titrimetrică, metode de ponderare de analiză cantitativă, prin HPLC. A fost utilizată metoda spectrofotometrică, care are o serie de avantaje față de metodele de mai sus. Deoarece coeficientul de absorbție (A – absorbanța) la aceeași lungime de undă de un compus în solvenți polari practic este identică, nu este necesar să se determine concentrația de pe curba de calibrare. Prin urmare, raportul dintre concentrațiile de substanțe din faza organică a concentrației în apă este egală cu valorile raportului $A_{org.}/A_{aq.}$ Și lipofilicitatea (P) este egală cu lg $A_{org.}/A_{aq.} = C_{org.}/C_{aq}$

*Modul de lucru*: 1. Pentru a determina absorbția maximă se ia spectru UV al compusului în apă sau soluție octanol în intervalul de la 400 pentru a 220 nm. Fiind dat, că determinarea spectrofotometrică are o sensibilitate ridicată, este necesar de lucrat cu concentrații scăzute de substanțe. Se prepară o soluție a substanței de testat într-octanol la o concentrație astfel încât densitatea optică să fie în intervalul 1,5-1,8 optic UE. În Balonul se adaugă aproximativ 25 ml de 0.0001 g de substanță și se dizolvă în 10 ml octanol. Aproximativ 3 ml din această soluție se adăugă în cuvă și se fac determinările in intervalul spectrului UV la 400 la 220nm la o viteză medie de scanare și măsurare trepte de 1 nm. În calitate de soluție de referință se utilizează octanol-1 pur. În cazul în care valoarea A este mai mare de 2 unități este necesar de diluat cu o soluție de octanol -1 (se înregistrează cantitatea exactă de soluție adăugată!) și se determină din nou spectrul UV a soluției. Se marchează lungimea de undă la care absorbția A este maximă. Dacă sunt mai multe spectre de absorbție, se alege pe cel care are mai mare valoarea A. Pentru a reduce influența solventului pe spectrul de absorbție a UV se încearcă să lucreze la lungimi de undă mai lungi. Dupa ajustarea valorii A la 1-1,5 se adaugă apă în volum egal cu volumul de octanol soluției de analizat. Soluția se toarnă într-o pâlnie de separare și se agită ușor. Stratul superior se transferă într-un pahar uscat care se usucă cu sulfat de sodiu anhidru. Se determină A pentru soluția uscată de octanol. Spectrul de absorbție al substanței în octanol este prezentat în fig. 5.

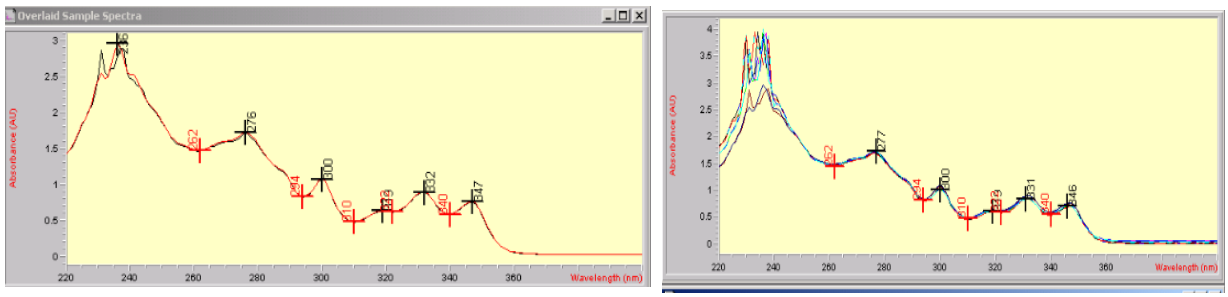



Fig. 5. Spectrul de absorbție al substanței în octanol și a soluției octanolice diluate cu apă

Se observă, că la diluarea cu apă a soluției octanolice valorile absorbanțelor în maximele de absorbție nu variază esențial.

Calculul lipofilei se efectuează prin formula: P= lg($A_{f.}$)/($A_{in}$-$A_{f.}$),

unde $A_{f.}$ - valoarea absorbanței soluției de etanol după agitarea cu apă. $A_{in}$ - absorbanța soluției inițiale înainte de agitare cu apă.

Tabelul 6. Valorile absorbanțelor pentru soluția octanolică și după diluția cu apă

| Denumirea probei | Lungimea de undă (nm) | Abs(AV) |
|---|---|---|
| Substața + Octanol+apa | 300 | 0,99915 |
| | 332 | 0,82491 |
| | 347 | 0,69532 |
| Denumirea probei | Lungimea de undă (nm) | Abs(AV) |
| Substața + Octanol | 300 | 1,01500 |
| | 332 | 0,82305 |
| | 347 | 0,6808 |

$$P= \log \frac{0,99915}{1,01500-0,9915} = 1,799$$

În urma determinării experimentale a log P prin metoda spectrofotometrică a fost obținută valoarea de 1,799, care este foarte apropiată de cea calculată teoretic după însumarea lipofiliei fragmentelor structurale.

***Determinarea experimentală a logP prin metoda CSS***

Datorită potenţialului biologic al compuşilor cu funcţiune tiazolică, exprimat prin proprietăţi antimicrobiene, antitumorale, antiinflamatoare se impune o atenţie specială acordată studiului proprietăţilor fizico-chimice care sunt corelate în mod direct cu activitatea biologică. În acest sens, tema acestui studiu constă în studiul lipofilicităţii compuşilor de tip p-toluensulfonil-hidrazino-tiazolic. Metodele utilizate în acest scop sunt cromatografia de lichide pe strat subţire. Urmându-se planul experimental prezentat, după ce compuşii consideraţi în studiu au fost separaţi prin metoda cromatografice, s-au notat factorii de retenţie (Rf) şi timpii de retenţie ($t_R$).

Cromatografia pe strat subțire este o metodă de separare și de identificare a substanțelor medicametoase. Pentru punerea în evidență și cuantificarea impurităților în MF-001ului a fost dezvoltată tehnica de lucru cu utilizarea cromatografiei pe strat subțire pe plăci standard *Silufol UV 254* și pe plăci de sticlă cu silicagel. Prezența impurităților specifice în substanțele medicamentoase *substanța cercetată* se datorează atât produșilor inițiali și intermediari de sinteză , precum și fenomenului de degradare a substanțelor.

La stabilirea compoziției amestecului de developare pentru MF-001 s-au luat în considerație tipul de interacțiune dintre moleculele analiților și developant. Acest tip de interacțiune trebuie să domine în faza mobilă și să fie complimentar cu tipurile de interacțiune, care controlează timpul de retenție în faza staționară. În calitate de fază staționară a fost utilizat silicagelul cu fază reversibilă. Substanța analizată posedă în moleculă centre polare, activarea cărora s-a realizat prin selectarea unor solvenți polari, care au capacitatea să producă aceste interacțiuni. Apariția interacțiunilor polare dintre analiții și solvenții sistemului cromatografic au dus la stabilizarea echilibrelor de transfer a maselor a analiților dintre faza mobilă și staționară. Preventiv s-au cercetat condițiile optimale de cromatografiere: sisteme de

solvenți sau sisteme de developare; soluții de reagenți pentru revelare.

Pe parcursul elaborării tehnicii CSS au fost precăutate sisteme de developare cu caracter acid, neutru şi bazic, de diversă polaritate. La utilizarea sistemelor de developare cu o polaritate redusă, mobilitatea substanțelor a fost mică, iar spoturile slab pronunțate și conturate (tabelul 7).

Tabelul 7. Sisteme de solvenți cercetate pentru mobilitatea cromatografică

| Sisteme de solvenți | Rf sol. Stand. 0,1% în cloroform | Rf sol. Stand. 0,1% în cloroform | Caracteristici |
|---|---|---|---|
| Metanol : H2O (9:1) | 0,8795 | 0,883 | Spot neregulat |
| **Hexan 9:1 Etilacetat** | **0,46192** | **0,465** | Spot bine conturat |
| Hexan 8:2 Etilacetat | 0,7896 | 0,794 | Spot împrăștiat |
| Cloroform-Acetonă-Toluen 2:2:6 | 0,9622 | 0,953 | Viteză excesivă de migrare |
| Cloroform-Acetonă-Toluen 3:1:6 | 0,9392 | 0,930 | Spot neregulat |
| Cloroform 3:7 Metanol | 0,9269 | 0,958 | Viteză excesivă de migrare |
| Cloroform 9:1 Metanol | 0,99 | 0,990 | Viteză excesivă de migrare |
| Metanol-Cloroform-Eter 4:3:3 | 0,889 | 0,875 | Spot neregulat |
| Metanol-Cloroform-Eter 3:3:4 | 0,9423 | 0,931 | Viteză excesivă de migrare |

A fost selectată sistema Hexan-etilacetat în raport 8:2, unde substanța manifesta valoare optimală a Rf-ului. Pe cromatograma soluției probă se observă urme de impurități în raport cu standardul (fig. 6). Sistemul de solvenți Hexan-etilacetat în raport 9:1 este unul plauzibil atât pentru separare, cât și pentru identificarea *substanței* în raport cu spotul obținut din soluțiile de referință.

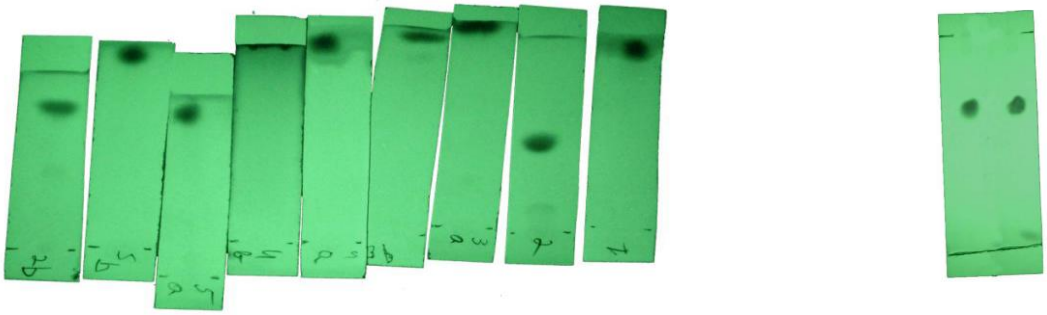


Fig. 6. Cromatogramele substanței în diferite sisteme de developare și în sistemul Hexan-etilacetat în raport 8:2

Cromatograma a fost privită în lumină UV cu lungimea de undă 254 nm.

Activitatea biologică a unui compus este controlată de mai mulţi factori, cel mai important dintre ei fiind lipofilicitatea. Dintre tehnicile de determinare experimentală a lipofilicităţii, metodele cromatografice sunt considerate ca având un grad ridicat de siguranţă, iar rezultatele obţinute sunt reproductibile şi precise. Cei mai cunoscuţi indici de lipofilicitate, deteminaţi prin această metodă, au la bază valorile factorilor de retenţie ($R_F$) şi pot fi calculaţi pornind de la formula:

$$R_M = \log\left(\frac{1}{R_F} - 1\right)$$

În care: $R_F$ reprezintă factorul de retenţie calculat pe baza distanţei de migrare a compusului/ distanţa de migrare a frontului solventului. Pentru a evita dificultăţile practice care apar la determinarea directă a coeficientului de partiţie octanol-apă, la ora actuală, cel mai frecvent se utilizează valorile cromatografice $R_M$.

Estimarea lipofilicităţii compuşilor cu ajutorul cromatografiei pe strat subţire se bazează în principal pe relaţia liniară care se stabileşte între valorile $R_M$ şi concentraţia modificatorului organic din faza mobilă. În practică, din această ecuaţie liniară se poate calcula o valoare extrapolată ($R_{M0}$) pentru 0% solvent organic în faza mobilă, chiar şi pentru compuşii mai lipofili, pentru care măsurătorile la concentraţie scăzută de modificator organic în faza mobilă nu sunt posibile. Relaţia liniară $R_M = R_{M0} + bC$ este descrisă de ecuaţia:

În care: $R_{M0}$ este valoarea $R_M$ extrapolată la apa pură ca fază mobilă.

S-a realizat determinarea parametrilor de lipofilicitate utilizând cromatografia pe strat subţire de sorbent (CSS) pentru MF-001 din grupul tiodiazolilor cu acțiune antimicobacteriană.

S-a utilizat substanța MF-001, plăci cromatografice standard *Silufol UV 254* și plăci de sticlă cu silicagel, methanol, hexan, etilacetat, chloroform, acetonă, toluen, eter, micro-siringă, cameră cromatografică, lampă UV cu lungimea de undă 254 nm.

Estimarea lipofilicităţii compuşilor cu ajutorul cromatografiei pe strat subţire se bazează pe relaţia liniară care se stabileşte între valorile $R_M$ şi concentraţia modificatorului organic din faza mobilă. Au fost obținute următoarele valori ale $R_M$, calculate în baza valorilor $R_f$ pentru diferite sisteme de solvent: metanol:$H_2O$ (9:1) –-0,86324; hexan:etilacetat (9:1) – +1,15053 ; cloroform-acetonă-toluen (2:2:6) – -1,40577; cloroform:metanol (3:7) – -1,10311; metanol-cloroform-eter (4:3:3) – -0,90375.

Cromatografia pe strat subţire s-a dovedit a fi o tehnică potrivită pentru estimarea lipofilicităţii. Parametrii experimentali de lipofilicitate determinaţi au dus la elaborarea unor modele de predicţie a lipofilicităţii substanței cercetate pe baza informaţiilor complexe oferite de structura moleculară a compusului.

## 5.2. Evaluarea unor proprietăți fizico-chimice pentru compușii cercetați

*Substanţe testate.* În calitate de materie pentru testare au fost utilizați trei compuși sintetici din grupul propiltiodiazolochinazolinonei, obținuțiîn cadrul Laboratorului de Sinteză Organică și Biofarmaceutice de la Institutul de Chimie din Republica Moldova: MF-001 (MF-001); Sulfat de MF-001 (MF-001-$H_2SO_4$); complexul MF-001ului cu ciclodextrine (β-CD-MF-001); în calitate de standard de referință s-a utilizat 2-(propylthio)5H-[1,3,4]thiadiasolo-[2,3-b] quinasolin-5-one substanță, purificat prin recristalizare în Laboratorul de Analiză, Standardizare și Controlul Medicamentelor (LASCM) al Centrului Științific al Medicamentului din cadrul USMF ”Nicolae Testemițanu” (concentrația 99.98%).

*Comportamentul la topire/Punct de topire*. Determinarea punctului de topire s-a realizat în cadrul LASCM la dispozitivul A.KRÜSS KPS Meting-Point Meter KPS II, pentru fiecare substanță în trei repetări, în conformitate cu prevederile Farmacopeei Europene (Ph. Eur.) 10,0. Comportamentul MF-001 și β-CD-MF-001 la topire s-a studiat și prin metoda termică de analiză – calorimetrie cu scanare diferențială (DSC), cu utilizarea dispozitivului

Mettler Toledo STARe Thermal Analysis system, version 6.0 (Schwerzenbach, Switzerland). Câte circa 2-5 mg de substanțe au fost examinate între 25-300 ° C în flux de argon (10 l/h). Viteza de încălzire a fost de 5 ° C/min.

*Analiza spectrală în IR.* Pentru caracterizarea complexului binar βCD+MF-001 spectrele FT-IR au fost înregistrate la spectrofotometrul în infraroșu cu transformare Fourier: SPECTRUM 100 (PERKIN ELMER, SUA) prin reflexie total atenuată în cadrul Institutului de Chimie. Amestecurile binare s-au preparat prin cântărirea cantităţilor corespunzătoare de substanţe medicamentoase şi omogenizarea în mojar de agat timp de 20 minute. Spectul FTIR al MF-001 s-a comparat cu spectrul amestecului binar βCD+MF-001(1:1) și βCD+1MF-001+$H_2O$(1:1:18). Toate spectrele FTIR au fost înregistrate în intervalul 4000 și 400 $cm^{-1}$ .

*Solubilitate.* Determinarea solubilității at the department of pharmaceutical technology of the educational institution "Belarusian State Medical University" (BSMU). Testările s-au efectuat la temperaturi de $20^0$C și $37^0$C; solvenții utilizați: apă purificată, alcool etilic, dimetilsulfoxid (DMSO), hexan, cloroform, soluție de hidroxid de sodiu 0,1 M, soluție de acid clorhidric 0,1 M. Medii de dizolvare utilizate: soluție tampon de acid clorhidric 0,1 M, cu pH=1,2, soluție tampon fosfat cu pH=4,5, soluție tampon fosfat cu pH=6,8. Determinările s-au efectuat cu utilizarea dispozitivului Dissolution tester ERWEKA DT 800; volumul mediului de dizolvare 250, 500 și 900 ml; temperatura mediului de dizolvare 37±0,5°C; viteza de rotație 50 rot/min; interval de prelevare a probelor: 15, 30, 45, 60, 90, 120 minute; număr de mostre testate în fiecare mediu de dizolvare: 6. Evaluarea cantitativă a substanțelor s-a realizat spectrophotometric, la spectrofotometrul Sagu 50, utilizând soluțiile tampon cu diferite valori de pH în calitate de soluții de comparare.

Solubilitatea substanțelor a fost determinată în conformitate cu Farmacopea Republicii Belarus. Procedura de dizolvare: Se agită energic timp de 1 min și se menține la temperatura de testare timp de 15 min. Determinarea solubilității în cadrul LACSM s-a efectuat în conformitate cu Farmacopea Republicii Belarus după tehnica descrisă mai sus în următorii solvenți: ulei de floarea soarelui, polietilenglicol (PEG) 400, polipropilen, polisorbat 20. S-a determinat capacitatea PEG-ului de a solubiliza substanțele din suspensii. Suspensiile s-au preparat prin agitarea a câte 0,01 g de substanțe în 4 ml de apă într-o eprubetă gradată. PEG-ul s-a adăugat cu picătura până la dublarea volumului (8 ml).

*Pierderi la uscare.* Determinarea umidității s-a efectuat prin metoda de uscare, în conformitate cu rigorile Ph. Eur. 10 [14]. Cantitățile exacte de substanțe s-au uscat până la masă constantă în dulap de uscare model 2B-151. Pierderile la uscare au fost calculate în %.

*Higroscopicitatea.* Masele exacte de substanțe s-au plasat în fiole din plastic, şi s-au plasat pentru 6 de ore într-un exicator la fundul căruia s-a turnat apă. Exicatorul a fost închis ermetic cu capac pentru a exclude pătrunderea apei din exterior. Fiolele au fost cântărite la fiecare 2 ore de depozitare. Cantitatea de apă absorbită a fost exprimată în %.

**Rezultate obținute**

*Comportamentul la topire/Punct de topire.*

Criteriul cel mai simplu de apreciere a purităţii unei substanţe organice solide este punctul de topire. Punctul de topire se defineşte ca temperatura la care substanţa solidă se află în echilibru cu topitura ei. Substanţele pure au temperatura de topire fixă, determinarea ei exactă (cca 0,01°C) fiind posibilă numai prin trasarea curbelor de topire. Impurităţile, chiar şi în cantităţi foarte mici, coboară temperatura de topire şi lărgesc intervalul de topire (1°C). Acest fenomen se foloseşte la determinarea identităţii a două substanţe cu aceeaşi temperatură

de topire.

Punctul de topire a fost determinat pentru toate trei substanțe testate, în conformitate cu rigorile Ph. Eur. 10 [15]. În urma determinării s-au constat valori apropiate ale intervalelor de topire pentru MF-001 și β-CD-MF-001. β-CD-MF-001se topește cu carbonizare, iar MF-001-$H_2SO_4$ la topire suferă modificări structurale (valoarea punctului de topire nu este stabilă). Rezultatele determinărilor sunt redate în tabelul 8.

Tabelul 8. Rezultatele determinării valorilor punctelor și intervalelor de topire

| Substanţa testată | Temperatura de topire $^0$C | | |
|---|---|---|---|
| | Determinarea 1 | Determinarea 2 | Valoarea medie |
| MF-001 | 116.2 | 116.4 | 116.3 |
| MF-001-$H_2SO_4$ | 146.2 | 144.1 | 145.1 |
| β-CD-MF-001 | 114.4 | 113.9 | 114.15 |
| | cu carbonizare | cu carbonizare | cu carbonizare |

Pentru stabilirea gradului de captare a substanței MF-001 de către ciclodextrine și formarea complexului β-CD-Mf-001 s-a înregistrat curba DSC a substanței pure și a amestecului binar 1:1. Se cunoaște, că când molecula „oaspete" este captată în cavitatea ciclodextrinei, punctul de topire, fierbere sau sublimare al acesteia de obicei este deplasat la o alta temperatură, în intervalul în care ciclodextrina se descompune. Astfel, pentru un raport molar 1:1, în curbele DSC pot fi observate anumite peak-uri endoterme sau exoterme ceea ce înseamnă că metoda amestecului fizic nu furnizează o încapsulare completă a amestecului binar în cavitatea ciclodextrinei (fig. 7).

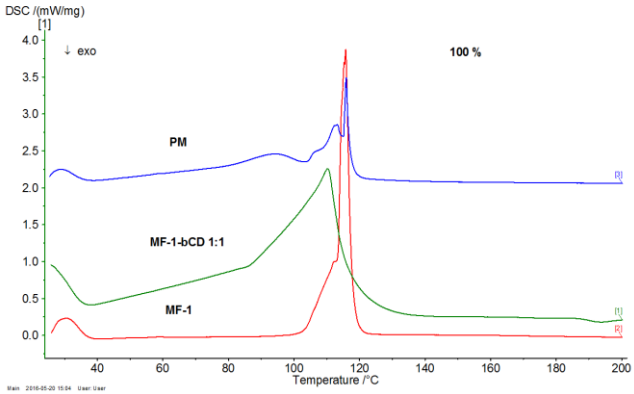



**Fig. 7.** Termograma DSC a substanței MF-001 și a complexului β-CD-MF-001

Pe termogramă se atestă schimbări foarte fine a temperaturii de topire a sistemului binar la valori mai mici, și scăderi ale entalpiilor de topire odată cu scăderea cantității de substanță. Acest fenomen poate fi un indiciu al dispersiei cristalelor de moleculă în matricea de β-CD, și formarea de cristale foarte energice ale MF-001. Totodată, substanța păstrează un anumit nivel de cristalinitate în produsul fărîmițat.

*Analiza spectrală în IR.*

Spectroscopia IR este o metodă optică spectrală modernă, care este utilizată pentru identificarea structurilor moleculare ale substanţelor medicamentoase în baza spectrelor, care rezultă din interacţiunea luminii infraroșie cu unele grupări funcţionale, legături şi unităţi structurale. Interpretarea spectrelor IR ale substanțelor testate reprezintă un mijloc deosebit de important la identificarea structurii chimice în baza tabelelor, ce conţin valorile frecvenţilor de vibraţie caracteristice grupelor funcţionale. În special, un interes sporit în acest aspect se atestă pentru moleculele de MF-001 și a complexului β-CD-MF-001, deoarece pe spectre se

pot urmări deplasările de valență care caracterizează legăturile de formare a complexului.

După cum se poate observa din fig. 8 și 9, spectrul de sistem este în principal suma spectrelor componentelor sale. In orice caz, unele dintre benzile de absorbție ale compușilor individuali pot să dispară pe spectrul sistemului. Aceasta este, de exemplu, banda de la 756 cm-1 în spectrul β-CD, care corespunde vibratiilor δCCO +δCCH. Spectrul FT-IR înregistrat pentru sistemul binar MF-001+βCD prezintă deplasări ale benzilor de absorbție caracteristice ale constituenților. Astfel, banda de absorbție caracteristică grupării funcționale –OH, observată în spectrul complexului, este deplasată la o frecvență mai mică. Pe de altă parte, pentru vibrațiile de deformare ale legăturilor C-H din structura βCD (1407, 1335, 1296, 1251 cm-1 ) se poate observa o deplasare la numere de undă mai mari (tabelul 9).

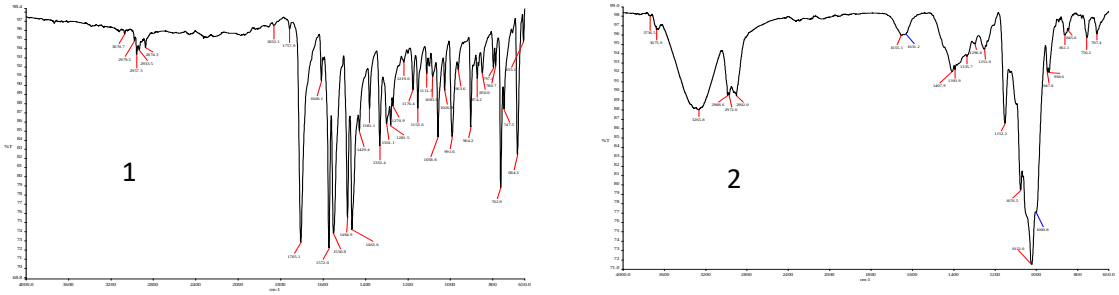



**Fig.8.** Spectrele FT-IR ale MF-001 (1) și β-CD (2)

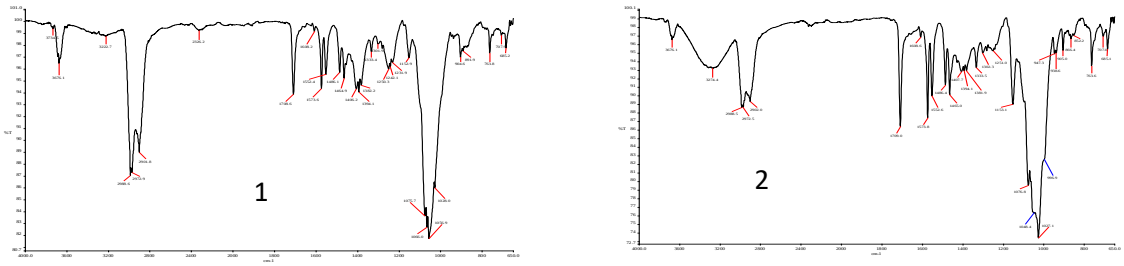



**Fig. 9.** Spectrele FT-IR ale βCD+MF-001(1:1) (1) și βCD+1MF-001+$H_2O$ (1:1:18) (2)

Tabelul 9. Mărimile caracteristicelor optice ale benzilor electronice de absorbţie

| Grupare | Tipul vibrației | Domeni ul de absorbție | Forma benzilor de absorbție |
|---|---|---|---|
| -C-S- | ν C-S | 683,9 | Benzi medii înguste |
| $-CH_2-$ | Scissoring βs | 1463,4 | Benzi medii înguste |
| -C=O | νas –C=O | 1704,9 | Benzi de intensitate înaltă |
| -C=N- | ν -C=N | 1608,3 | Benzi de intensitate înaltă |
| $C_6H_5$ | ν -CH | 1484,7 &3070,6 | Benzi de intensitate diferită |
| $CH_3$ | ν -CH | 1332,6 | Benzi de intensitate medie |

*Solubilitate.*

Pentru caracterizarea completă a gradului de solubilizare a substanțelor testate s-au făcut cercetări cu utilizarea solvenților polari, organici, polimerici, grași. Aceste studii sunt deosebit de importante pentru prognozarea biodisponibilității, dar și pentru etapa de preformulare a unei eventuale forme farmaceutice. Rezultatele determinărilor sunt reprezentate în tabelele 3 și 4.

Tabelul 10. Rezultatele determinării solubilității în cadrul BSMU

| Solvent | MF-001 | MF-001-$H_2SO_4$ | β-CD-MF-001 |
|---|---|---|---|
| Apă purificată | Practic insolubil | Practic insolubil | Practic insolubil |
| Alcool etilic | Practic insolubil | Puțin solubil | Practic insolubil |
| DMSO | Ușor solubil | Moderat solubil | Foarte ușor solubil |
| Hexan | Practic insolubil | Foarte puțin solubil | Practic insolubil |
| Cloroform | Puțin solubil | Foarte puțin solubil | Practic insolubil |
| Soluție de hidroxid de sodiu 0,1 M | Practic insolubil | Practic insolubil | Practic insolubil |
| Soluție de acid clorhidric 0,1 M | Practic insolubil | Practic insolubil | Practic insolubil |
| Soluție tampon de acid clorhidric 0,1 M, cu pH=1,2 | 0,08 mg/ml | 0,08 mg/ml | 0,075 mg/ml |
| Soluție tampon fosfat cu pH=4,5 | 0,075 mg/ml | 0,075 mg/ml | 0,07 mg/ml |
| Soluție tampon fosfat cu pH=6,8 | 0,07 mg/ml | 0,07 mg/ml | 0,065 mg/ml |

După cum se poate observa din tabelele 10 și 11, comportamentul substanțelor la dizolvare în diferiți solvenți se modifică în funcție de structura chimică. Astfel, MF-001 se dizolvă bine în DMSO, PEG 400 și Polisorbat 20, este puțin solubil în cloroform, pe când în restul solvenților este foarte puțin solubil sau practic insolubil.

Tabelul 11. Rezultatele determinării solubilității în cadrul LASCM

| Solvent | MF-001 | MF-001-$H_2SO_4$ | β-CD-MF-001 |
|---|---|---|---|
| Ulei de floarea soarelui | Puțin solubil | Practic insolubil | Ușor solubil |
| Polietilenglicol (PEG) 400 | Ușor solubil | Practic insolubil | Ușor solubil |
| Polipropilen | Puțin solubil | Practic insolubil | Ușor solubil |
| Polisorbat 20 | Ușor solubil | Ușor solubil | Ușor solubil |

Pentru MF-001-$H_2SO_4$, fiind sare a unui acid anorganic, se aștepta o dizolvare bună în apă, alcool și mediile de dizolvare cu pH prestabilit, dar acest lucru nu s-a întâmplat. Substanța este ușor solubilă doar în Polisorbat 20 și moderat solubil în DMSO, în restul solvenților nu se dizolvă.

Cmplexul β-CD-MF-001 este apropiat după solubilitate cu MF-001, fiind mai avantajos după solubilitate în DMSO, Ulei de floarea soarelui și Polipropilenă.

Este cunoscut faptul, că amestecurile de apă-cosolvent sunt pe larg utilizate în tehnologia farmaceutică pentru a crește solubilitatea medicamentelor slab solubile în apă în timpul elaborării formelor farmaceutice. PEG 400 este un cosolvent folosit cel mai frecvent în elaborarea soluțiilor perorale și parenterale. S-a studiat capacitatea PEG-ului de a influența gradul de dizolvare în apă a substanțelor testate (tabelul 12). Astfel, compusul β-CD-MF-001 se solubilizează imediat după adăugarea primelor porțiuni de PEG 400, MF-001 devine solubil după adăugarea a 3 ml de PEG 400, pe când MF-001-$H_2SO_4$ rămâne insolubil.

Tabelul 12

Rezultatele determinării capacității PEG-ului de a influența gradul de dizolvare în apă a substanțelor testate

| Cantitatea de PEG adăugată | MF-001 | MF-001-$H_2SO_4$ | β-CD-MF-001 |
|---|---|---|---|
| 1 ml | Puțin solubil | Practic insolubil | Ușor solubil, solubilizare completă |
| 2 ml | Moderat solubil | Practic insolubil | - |
| 3 ml | Solubil | Practic insolubil | - |
| 4 ml | Ușor solubil | Pușin solubil | - |

Rezultatele obținute în urma studiului de solubilitate a conpușilor studiați vor servi drept bază pentru selectarea solvenților optimali la elaborarea metodelor de analiză și pentru etapele tehnologice de cercetare a compușilor testați.

*Pierderi la uscare.*

Capacitatea substanțelor de a absorbi moleculele de apă din aer este un parametru fizic extrem de important și determinant în selectarea și formularea condițiilor de depozitare.

S-a determinat umiditatea substanțelor prin metoda de uscare. S-a constatat, că MF-001 pierde la uscare 0,70 %, MF-001-$H_2SO_4$ – 5,77 % și β-CD-MF-001 – 11,52 %.

*Higroscopicitatea.*

Pentru studierea capacității de absorbție a apei, s-a studiat cinetica absorbției acesteia de către substanțele testate (tabelul 13).

Tabelul 13

Determinarea gradului de absorbţie a umidităţii pentru substanțele testate

| t, ore | | 0 | 2 | 4 | 6 | % apă |
|---|---|---|---|---|---|---|
| MF-001 | masa, g | 0,10006 | 0,12993 | 0,12997 | 0,12992 | 29,84 |
| MF-001-$H_2SO_4$ | masa, g | 0,10016 | 0,12153 | 0,13618 | 0,14956 | 49,32 |
| β-CD-MF-001 | masa, g | 0,10015 | 0,11135 | 0,11250 | 0,11258 | 12,41 |

Pe parcursul a 6 ore substanțele au fost supuse cântăririi (peste fiecare 2 ore de depozitare).

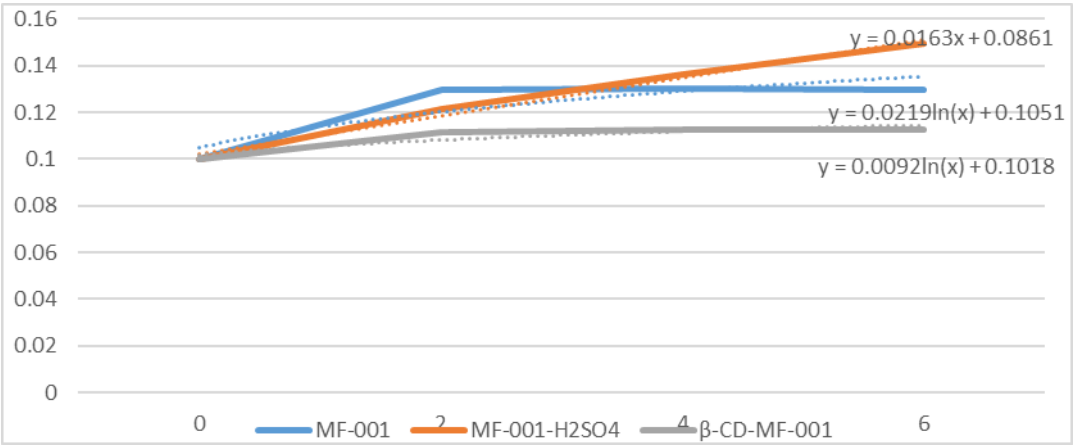



Fig. 10. Curbele ce descriu cinetica absorbției apei de către substanțele testate

Din fig. 10 se poate observa, că fenomenul de absorbție a umidității de către MF-001-$H_2SO_4$ este descris printr-o funcție liniară pe cînd în cazul MF-001 și β-CD-MF-001 absorbția este descrisă printr-o funcție logaritmică, ceia ce confirmă proprietățile higroscopice mai impresionante ale MF-001-$H_2SO_4$. Cercetarea influenței apei asupra integrităților substanțelor a permis stabilirea unor condiții prealabile de păstrare a acestora.

Evaluarea unor parametri fizico-chimici a compușilor MF-001, MF-001-$H_2SO_4$ și β-CD-MF-001 din grupul propiltiodiazolochinazolinonei – prin determinarea punctului de topire și a comportamentului termic, evaluarea comportamentului spectral în regiunea IR, determinarea solubilității în diverși solvenți și medii de dizolvare și a posibilității utilizării PEG-ului 400 în calitate de cosolvent, determinarea umidității și a higroscopicității substanțelor – au scos în evidență proprietățile distincte pentru fiecare substanță. Aceste studii permit continuarea cercetărilor în vederea determinării biodisponibilității acestor compuși, selectarea substanței cu proprietăți optimale și elaborarea unei forme farmaceutice cu acțiune antituberculoasă.

### 5.3. Studii de biodisponibilitate a compușilor cercetați

S-a efectuat un studiu pilot de biodisponibilitate şi farmacocinetică a MF-001, MF-001-$H_2SO_4$ și β-CD-MF-001 din grupul propiltiodiazolochinazolinonei.

Procedee analitice, utilizate pentru dozarea substanţei studiate în material biologic:

*Prepararea probelor de plasma sanguină*: 100 µl probă de analizat şi 200 µl amestec acetonitril – metanol (9:1) se amestecă într-o eprubetă tip Eppendorf de 0,5 ml (Vortex). După centrifugare 3-5 min la 4000-6000 g, alicota 10 µl din stratul supernatant, cu ajutorul injectorului automat, se amestecă cu 30 µl apă şi se injectează în sistemul cromatografic. Paralel se analizează probele de calibrare, ce conţin 10 mg/l substanţa MF-1 în plasma donatorilor, preparate după acelaşi procedeu.

*Prepararea probelor de ţesuturi*: La 50-100 mg (masa exactă) ţesut de analizat, plasat într-o eprubetă tip Eppendorf de 0,5 ml, se adaugă apă în cantitatea egală cu ½ din masa ţesutului. Conţinutul se omogenizează cu ajutorul micro-omogenizatorului. La omogenizat se adaugă amestecul acetonitril – metanol (9:1) în volum triplu respectiv masei ţesutului, se agită (Vortex). După centrifugare 3-5 min la 4000-6000 g, alicota 10-20 µl din stratul supernatant, cu ajutorul injectorului automat, se amestecă cu 30 µl apă şi se injectează în sistemul cromatografic. Paralel se analizează probele de calibrare în plasma sanguină, preparate ca şi pentru analiza plasmei, iar rezultatul obţinut se înmulţeşte la 1,5.

*Condiţii de analiză cromatografică*:

Aparatul: Cromatograf de lichide din seria "Agilent 1260", dotat cu pompă binară, injector automat, termostat de coloane şi detector UV-VIS cu şir de diode;

Coloana cromatografică: Zorbax Eclipse Plus C18, 3.5 µm, 4.6 x 100 mm;

Faza mobilă: Amestec de acetonitril şi soluţie acid trifluoracetic 0,05% în raportul 50:50, debitul 1,2 ml/min; Detecţia la 275 nm.

Calcularea rezultatelor se efectuează prin metoda standard extern.

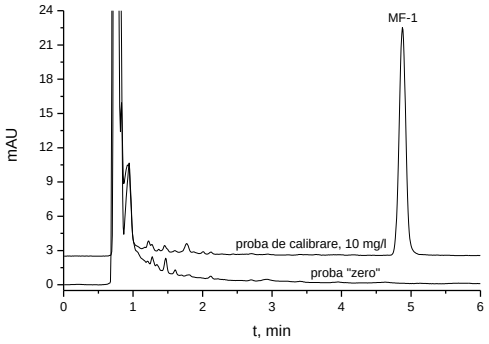



Fig. 11. Cromatogramele probelor "zero" şi de calibrare.

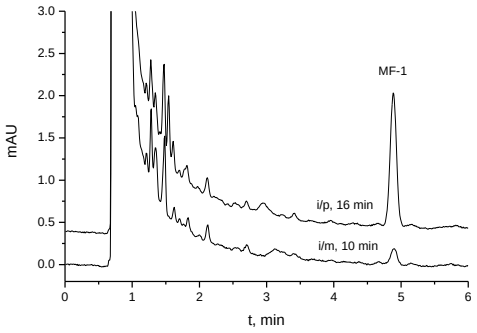



Fig. 12. Cromatogramele probelor de plasma sanguină de la şobolani după administrarea intraperitoneală şi intramusculară în doza 20 mg/kg.

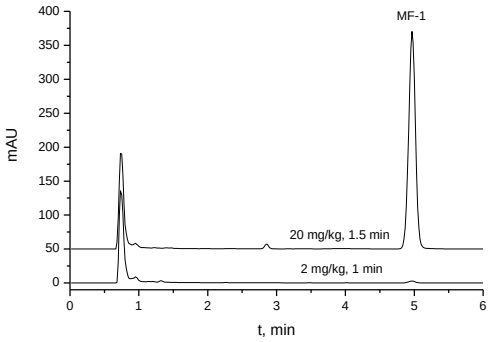



Fig. 13. Cromatogramele probelor de plasma sanguină de la şobolani după administrarea intravenoasă în dozele 20 mg/kg (de la cadavru) şi 2 mg/kg.

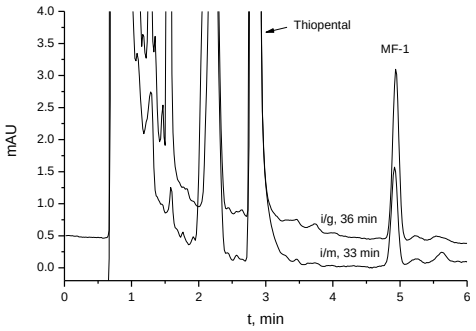



Fig. 14. Cromatogramele probelor de plasma sanguină de la şoricei după administrarea intragastrală în doza 200 mg/kg şi intramusculară în doza 20 mg/kg.

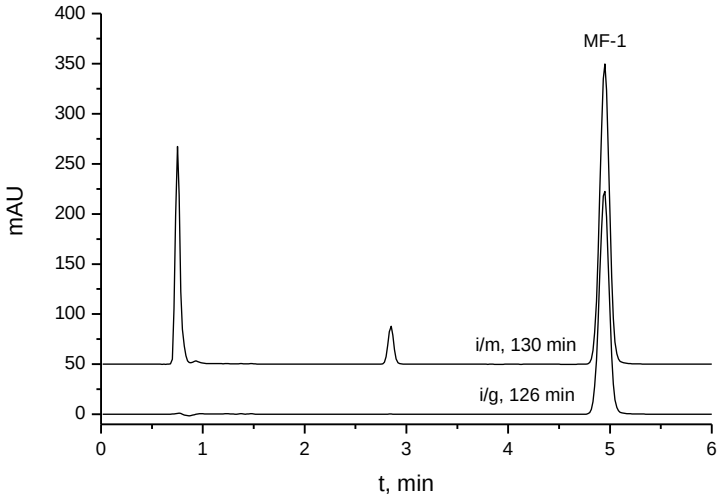



Fig. 15. Cromatogramele probelor de conţinut al stomacului şi ţesutul muscular din locul injectării, prelevate de la şoricei după administrarea intragastrală şi intramusculară corespunzător.

*Studiul pilot a farmacocineticii substanţei MF-001 în formă de bază la administrarea intramusculară şi intraperitoneală*

Substanţa MF-001 în formă de soluţie în dimetilsulfoxid (DMSO), 20 mg/kg, s-a administrat la 2 şobolani neanesteziaţi:

Şobolanul nr. 1 (290 g) - administrare intraperitoneal (i/p);

Şobolanul nr. 2 (320 g) - administrare intramuscular (i/m);

Sângele pentru analiză s-a colectat din aorta abdominală cu ajutorul cateterelor plasate prin artera femurală cu 24 ore anterior experimentului. Probele în volum de 0,25 ml au fost prelevate înaintea administrării (proba "zero") şi după 15, 30, 60, 120, 240 şi 420 min.

*Rezultatele obţinute pentru substanţa MF-001 în probele de plasmă:*

| Nr. | Conc. mg/l | Mostra |
|---|---|---|
| 1 | 0.767 | şobolanul nr. 1, 20 mg/kg i/p, proba 1 - 16 min |
| 2 | 0.472 | şobolanul nr. 1, 20 mg/kg i/p, proba 2 - 31 min |
| 3 | 0.433 | şobolanul nr. 1, 20 mg/kg i/p, proba 3 - 61 min |
| 4 | 0.271 | şobolanul nr. 1, 20 mg/kg i/p, proba 4 - 121 min |
| 5 | 0.185 | şobolanul nr. 1, 20 mg/kg i/p, proba 5 - 242 min |
| 6 | 0.044 | şobolanul nr. 1, 20 mg/kg i/p, proba 6 - 420 min |
| 7 | 0.109 | şobolanul nr. 2, 20 mg/kg i/m, proba 1 - 5 min |
| 8 | 0.086 | şobolanul nr. 2, 20 mg/kg i/m, proba 2 - 10 min |

*Notă:* Şobolanul nr. 2 (adm. i/m) după prelevarea probei de 10 min a fost scos din experiment din cauza obturaţiei cateterului pentru prelevarea probelor.

*Studiul pilot a biodisponibilităţii substanţei MF-001 în formă de sulfat şi complex cu β-ciclodextrină la administrare intragastrală*

Substanţele au fost administrate în formă de soluţie în DMSO.

Primului şobolan i s-a administrat intragastral soluţia MF-001·$H_2SO_4$ cu concentraţia 61 mg/ml (40 mg/ml în recalcul la bază) în DMSO. Probele de sânge în volum de 0,25 ml au fost prelevate după 0, 15, 30, 60, 120 şi 240 min din aorta abdominală cu ajutorul cateterelor plasate prin artera femurală cu 24 ore anterior experimentului.

Şobolanului al doilea i s-a administrat intragastral soluţia MF-001 în formă de complex cu β-ciclodextrină cu concentraţia 114 mg/ml (20 mg/ml în recalcul la substanţa MF-001) în DMSO. Probele de sânge au fost prelevate doar după 15 şi 30 min (restul probelor nu s-au prelevat din cauza obturaţiei cateterului).

*Notă:*

La calcularea concentraţiilor luate în studiu s-a luat în consideraţie conţinutul principiului activ (MF-001 în formă de bază) în substanţele investigate (66,0% în MF-001·$H_2SO_4$ şi 17,6% în MF-1·β-ciclodextrină; valorile s-au determinat prin metoda HPLC-UV).

Conţinut teoretic al principiului activ în MF-001·$H_2SO_4$ este 73.9% în substanţa anhidră. Diferenţa dintre valoarea teoretică şi cea depistată poate fi condiţionată de prezenţa apei de cristalizare, sau substanţelor înrudite.

*Rezultatele obţinute:* Substanţa activă (MF-001) n-a fost depistată în probele de plasmă analizată.

*Studiul pilot a farmacocineticii substanţei MF-001 în formă de bază la administrare intragastrală şi intramusculară la animale de laborator*

Şoriceilor le-a fost administrată substanţa MF-001 intragastral (6 animale) în doza 200 mg/kg (soluţie în DMSO, 15 mg/ml) şi intramuscular (6 animale) în doza 20 mg/kg (soluţie în DMSO, 20 mg/ml). După 30, 60 şi 120 min animalele au fost anesteziate cu tiopental sodic 50-80 mg/kg şi s-au recoltat sângele din vena cava posterioară şi ţesutul muscular de la locul de injectare. La animalele cu administrarea intragastrală, după sacrificare, a fost investigat conţinutul stomacului.

*Rezultatele obţinute pentru substanţa MF-001 în probele de plasmă:*

| Nr. | Conc. mg/l | Mostra |
|---|---|---|
| 1 | 0.369 | şoricelul nr. 1 (28.3 g), 20 mg/kg i/m, 33 min |
| 2 | 0.291 | şoricelul nr. 4 (31.6 g), 20 mg/kg i/m, 34 min |
| 3 | 0.295 | şoricelul nr. 2 (23.5 g), 20 mg/kg i/m, 62 min |
| 4 | 0.201 | şoricelul nr. 5 (21.6 g), 20 mg/kg i/m, 63 min |
| 5 | 0.178 | şoricelul nr. 3 (25.4 g), 20 mg/kg i/m, 129 min |
| 6 | 0.077 | şoricelul nr. 6 (31.0 g), 20 mg/kg i/m, 130 min |
| 7 | 0.642 | şoricelul nr. 1 (28.0 g), 200 mg/kg i/g, 36 min |
| 8 | 0.162 | şoricelul nr. 2 (33.2 g), 200 mg/kg i/g, 37 min |
| 9 | 0.058 | şoricelul nr. 3 (29.8 g), 200 mg/kg i/g, 65 min |
| 10 | 0.410 | şoricelul nr. 4 (33.3 g), 200 mg/kg i/g, 67 min |
| 11 | 0.049 | şoricelul nr. 5 (30.2 g), 200 mg/kg i/g, 122 min |
| 12 | 0.082 | şoricelul nr. 6 (31.1 g), 200 mg/kg i/g, 126 min |

*Studiul pilot a farmacocineticii substanţei MF-001 la administrarea intravenoasă la animale de laborator*

Substanţa MF-001 a fost administrată în formă de soluţie în DMSO.

La 2 şobolani (nr.3 şi nr.4) le-a fost administrat intravenos (i/v) soluţia MF-1 cu concentraţia 20 mg/ml în DMSO. Prelevarea probele de sânge, în volum de 0,25 ml, s-a efectuat după 1, 3, 10, 20, 40, 90 şi 180 min, din aorta abdominală cu ajutorul cateterelor plasate prin artera femurală cu 24 ore anterior.

Şobolanul nr. 3 a decedat imediat după administrarea substanţei studiate în doza 20 mg/kg. Şobolanului nr. 4 i-a fost administrată doza 2 mg/kg, iar după recoltarea tuturor probelor de sânge planificate i s-a efectuat administrarea repetată în doza 5 mg/kg, injectând soluţia mai lent, şi s-au recoltat probele de sânge după 3, 8, 15 şi 30 min.

*Rezultatele obţinute pentru substanţa MF-001 în probele de plasmă:*

| Nr. | Conc. mg/l | Mostra |
|---|---|---|
| 13 | 78.3 | şobolanul nr. 3 (360 g), 20 mg/kg i/v, 1,5 min (proba prelevată de la cadavru) |
| 14 | 0.677 | şobolanul nr. 4 (440 g), 2 mg/kg i/v, 1 min |
| 15 | 0.328 | şobolanul nr. 4 (440 g), 2 mg/kg i/v, 3 min |
| 16 | 0.103 | şobolanul nr. 4 (440 g), 2 mg/kg i/v, 9,5 min |
| 17 | 0.052 | şobolanul nr. 4 (440 g), 2 mg/kg i/v, 20 min |
| 18 | 0.022 | şobolanul nr. 4 (440 g), 2 mg/kg i/v, 40 min |

| | | |
|---|---|---|
| 19 | 0.011 | şobolanul nr. 4 (440 g), 2 mg/kg i/v, 91 min |
| 20 | 0.006 | şobolanul nr. 4 (440 g), 2 mg/kg i/v, 180 min |
| 21 | 0.082 | şobolanul nr. 4 (440 g), 5 mg/kg i/v, 3 min |
| 22 | 0.061 | şobolanul nr. 4 (440 g), 5 mg/kg i/v, 8 min |
| 23 | 0.019 | şobolanul nr. 4 (440 g), 5 mg/kg i/v, 15 min |
| 24 | 0.011 | şobolanul nr. 4 (440 g), 5 mg/kg i/v, 30 min |

*Studiul pilot a biodisponibilităţii substanţei MF-001 la administrarea intragastrală şi intramusculară la animale de laborator*

Au fost analizate ţesutul muscular din locul injectării şi conţinutul stomacului, prelevate de la şoriceii.

*Rezultatele obţinute pentru substanţa MF-001 în probele analizate:*

| Nr. | Conţinut mg/probă | % din doza adm. | Mostra |
|---|---|---|---|
| 1 | 0.69 | 115 | şoricelul nr. 1 (28.3 g), 20 mg/kg i/m, 33 min, ţesut muscular |
| 2 | 0.59 | 98 | şoricelul nr. 4 (31.6 g), 20 mg/kg i/m, 34 min, ţesut muscular |
| 3 | 0.47 | 78 | şoricelul nr. 2 (23.5 g), 20 mg/kg i/m, 62 min, ţesut muscular |
| | (o parte de probă s-a vărsat la omogenizare) | | |
| 4 | 0.77 | 128 | şoricelul nr. 5 (21.6 g), 20 mg/kg i/m, 63 min, ţesut muscular |
| 5 | 0.51 | 85 | şoricelul nr. 3 (25.4 g), 20 mg/kg i/m, 129 min, ţesut muscular |
| 6 | 0.70 | 117 | şoricelul nr. 6 (31.0 g), 20 mg/kg i/m, 130 min, ţesut muscular |
| 7 | 5.3 | 88 | şoricelul nr. 6 (31,0 g), 200 mg/kg i/g, 126 min, conţinutul stomacului / 100 ml |

În rezultatul acestor studii s-a constatat o biodisponibilitate foarte joasă a substanțelor MF-001·$H_2SO_4$ şi MF-1·$\beta$-ciclodextrină. Substanţa MF-001 în toate formele chimice studiate posedă biodisponibilitate sistemică joasă, dar relativ mai mare decât derivații săi, la toate căile extravasculare de administrare. Acest fenomen este cauzat de solubilitatea extrem de scăzută a substanţei active în medii apoase, fapt ce provoacă precipitarea ei la locul injectării sau în lumenul gastric, respectiv practic nu se absoarbe de la locul administrării. La administrarea intravenoasă substanţa MF-001 a demonstrat distribuţia şi/sau eliminare foarte rapidă.

## 6. ELABORAREA METODELOR DE ANALIZĂ ȘI STANDARDIZARE PENTRU SUBSTANȚELE ACTIVE. ELABORAREA DAN.

În urma cercetărilor preclinice efectuate, s-a stabilit că compusul MF-001 este acel care posedă proprietăți farmaceutice și farmacologice optimale, astfel, etapa de elaborare a metodelor de analiză și standardizare a fost efectuată doar pentru acest compus.

### 6.1. Elaborarea metodelor de analiză și standardizare pentru substanțe active

***Elaborarea metodei spectrofotometrice în UV de dozare a substanței MF-001***

A fost cercetat intervalul de linearitate pentru MF-001 (*2-(propiltio)-5H-[1,3,4]-tiadiazol[2,3-b] quinazolin-5-onă).* Pentru o serie de 10 soluţii standard pregătite în intervalul

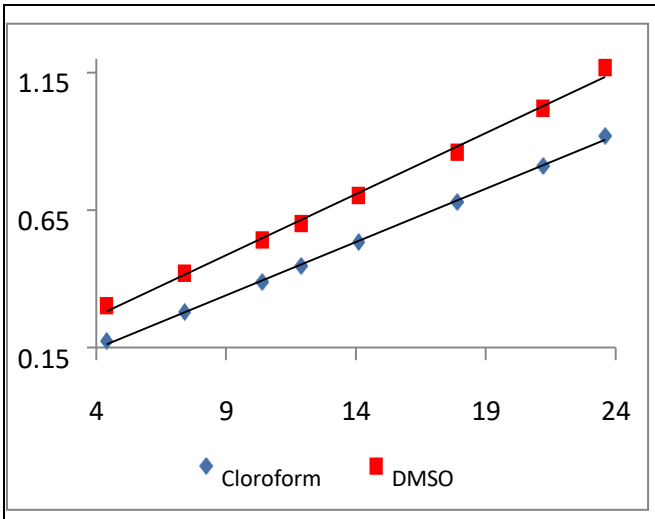



Fig. 16. Curba de calibrare a substanței analizate în cloroform și DMSO la 332 nm

de concentraţie 1-25 µg/ml a fost utilizată micro- pipeta *Gillson 1000.* Aceste valori cuprind un domeniu, care acoperă concentraţiile aşteptate în probe. Au fost măsurate valorile absorbanţelor acestui şir de soluţii cloroformice și în DMSO la lungimile de undă 301 și 332 nm. Pentru a observa stabilitatea ambelor substanţe în mediu apos; înregistrarea valorii absorbanţei pentru fiecare concentraţie s-a realizat în intervalele de timp 1 min., 3 min., 5 min., 7 min., şi 10 min. Rezultatele obţinute în baza datelor de achiziţie au fost utilizate pentru obținerea curbele de calibrare, care ulterior au fost supuse prelucrării statistice utilizând programului *Microsoft Excel,* pentru a asigura elegant şi exact corelaţia dintre semnalul analitic şi concentraţie. Parametrii dreptei de regresie au fost calculați prin metoda pătratelor minimale (MPM). La aplicarea MPM, a fost asumată certitudinea, că cea mai dreaptă linie pentru relaţia dintre semnalul analitic (absorbanţă) şi concentraţie dată este exprimată prin ecuaţia $y=mx+b$; unde $m$ - panta; $b$ - intercepta. O condiţie obligatorie pentru stabilirea ecuaţiei de regresie a fost asumarea că orice deviere a valorilor semnalului analitic (A) de la presupusa linie, considerată ca cea mai dreaptă, nu sunt altceva decât erorile la măsurarea valorii absorbanţei (eroare instrumentală). Concentraţiile soluţiilor standard au fost 4,4 – 23,6 µg/ml. Pentru 5 serii de determinări în timp diferit (10 min.) a şirului de 10 soluţii s-a calculat curba regresiei liniare. Pe baza calculării valorilor pantei, interceptei şi în final ecuaţiei regresiei liniare a fost posibilă construirea curbei de calibrare care întruneşte cea mai bună aproximare a liniarităţii datelor. Eficacitatea linearităţii a fost demonstrată cu ajutorul coeficientului de corelare *Pearson, R* care exprimă corelaţia liniară între două variabile, x (concentrație). La 5 serii de determinări au fost stabiliti coeficienţii de corelare ca o măsură a gradului de corelare între valorile semnalului analitic şi variabilele independente exprimată prin concentraţie. S-a stabilit, că coeficientul de corelaţie R>0,99 indică o linearitate bună dintre semnalul analitic şi concentraţiile standard ale *2-(propiltio)-5H-[1,3,4]-tiadiazol[2,3-b] quinazolin- 5onei.* S-au construit curbele de calibrare pentru substanță in soluții cloroformice și în DMSO la ambele lungimi

de undă (fig. 16).

Ecuaţiile regresiilor liniare au fost calculate pentru ambele curbe de calibrare. Pentru 301 nm ea fiind y=0.01797x+0.04575 ; cu r2= 0.999885 (soluția cloroformică) și y=0.1121x+0.04450 ; cu r2= 0.999398 (soluția în DMSO)

În ambele cazuri, valorile coeficientului de corelație indică o oblicitate mică a metodei de analiză. Testele statistice asupra ordonatelor la origine arată că acestea nu sunt semnificative diferite de zero. În același timp prin compararea pantelor curbelor cu valoarea teoretică ”1”, printr-un *test Student,* s-a constatat că pantele curbelor comune de calibrare ale 2-(propiltio)-5H-[1,3,4]- tiadiazol[2,3-b] quinazolin-5-onei nu sunt statistic diferit de 1, și prin urmare, se poate spune că metoda spectrofortometrică este una liniară în domeniul 4,0 -24

μg/ml.

*Dozarea spectrofotometrică în UV a 2-(propiltio)-5H-[1,3,4]-tiadiazol[2,3-b] quinazolin-5-onei substanţă en gross*

În baza cercetărilor efectuate a fost elaborată metoda spectrofotometrică de dozare a *2-(propiltio)-5H-[1,3,4]-tiadiazol[2,3-b] quinazolin-5-onei* prin respectarea legii universale a absorbției în limita concentrațiilor stabilite anterior. Deoarece liniaritatea dintre semnalul analitic (absorbanță) și concentrația substanței analizate se respectă în limitele 4-24 μg/ml, propunem un algoritm de diluții pentru a atinge o concentrație inclusă în acest segment.

Pentru fiecare seria măsurările au fost efectuate a câte 5 repetări. Rezultatele obținute au fost supuse evaluării statistice.

Abaterea standard a reproductibilității intragrup nu depășește 0,1; intervalul de încredere al mediei $X$ la un nivel de siguranță de 95% este 98,93-99,99 ; eroarea relativă E% este 0,28. Abaterea standard a reproductibilității intragrup (pentru trei serii de *substanță*) este 0,40; intervalul de încredere al mediei $X$ la un nivel de siguranță de 95% este 98,16 – 98,59; eroarea relativă E% nu depășește 0,1%. În concluzii putem menţiona, că metoda elaborată este exactă şi precisă.

***Elaborarea și validarea metodei HPLC de dozare a substanței MF-001***

MF-001 este cercetat în vederea elaborării metodelor de analiză și standardizare, a Documentelor Analitice de Normare a calității (DAN) pentru utilizarea în calitate de principiu activ la elaborarea formelor farmaceutice antimicobacteriene.

Dezvoltarea evolutivă a metodelor analitice pune la dispoziția cercetătorilor o gamă variată de tehnici moderne, avantajoase și rentabile. Cromatografia de lichide de înaltă presiune (HPLC) este una din ele, fiind bazată pe separarea componentelor între două faze sub presiune, permite identificarea și dozarea substanțelor individuale, din forme farmaceutice, dar și a posibilelor impurități parvenite din sinteză sau degradare. Determinarea cantitativă a substanțelor medicamentoase este una din cele mai importante etape a analizei, fiind și principalul parametru de calitate. Exigențele atribuite unei metode de dozare în procesul analizei farmaceutice sunt stipulate în diverse ghiduri, care reglementează procedurile analitice. Validarea metodelor analitice, în conformitate cu ghidurile Conferinţei Internaţionale de Armonizare (ICH), are drept obiectiv" demonstrarea faptului că metoda este adecvată scopului propus".

Fiind un compus nou sintetizat, pentru MF-001 nu există metode oficializate de analiză. Astfel, în acest studiu se propune dezvoltarea în premieră a unei metode HPLC de dozare a MF-001ului și validarea acesteia în conformitate cu prevederile ghidurilor ICH.

Cercetările experimentale au fost efectuate în cadrul Laboratorului de analiză, standardizare şi controlul medicamentelor (LASCM) al Universităţii de Stat de Medicină şi Farma- cie „Nicolae Testemiţanu". Elaborarea metodei de dozare a MF-001ului s-a efectuat în baza prevederilor ghidurilor ICH „Q2R1: Pentru proceduri analitice şi validare".

În studiu s-a utilizat substanța medicamentoasă MF-001, sintetizat în cadrul Laboratorului de sinteză organică și biofarmaceutice a Institutului de Chimie, seriile de sinteză: MF1-001, MF1-002, MF1-003; standard de referință intern de 2-(propiltio)-5H-[1,3,4]-tiadiazol[2,3-b] quinazolin-5-onă substanţă, purificat prin recristalizare în cadrul LASCM (concentrația 99,98%).

*Aparataj:* A fost utilizat sistemul cromatografic HPLC Shimadzu LC-20AD, analytical column *Zorbax Eclipse Plus C18*, 5 µm, 4.6 x 250 mm; detector UV-VIS, lungimea de undă 300 nm.

*Reagenţi:* Acetonitril (ACN) grd de puritate "pro HPLC analysis" (Sigma Aldrih), dimetilsulfoxid (DMSO) grad de puritate" pro analysis" (Merck), apă purificată bidistilată.

*Condiţii de cromatografiere*: Faza mobilă a fost preparată prin amestecarea ACN cu apă purificată în proporţii 80:20 după volum, filtrarea soluţiei sub vid prin filtru din capron *Millipore XF 5423050* (0,2-0,45µm), și degazare în aparatul DONAU-LAB SONIC DLS 660-T/H. Temperatura coloanei cromatografice a fost $30^0$C; volumul de injecţie 20 µl; debitul fazei mobile – 1 ml /min. Timpul de retenție a fost de 4,5 min.

*Prepararea soluţiei standard*: Circa 0,001 g (masa exactă) standard de referință intern se plasează într-un balon cotat cu capacitatea 25,0 ml, se dizolvă în 5 ml DMSO, se agită până la dizolvare, se adaugă10 ml fază mobilă și se omogenează, apoi se completează cu acelaşi solvent până la cotă şi se amestecă (soluția standard stoc). 5 ml soluţie standard stoc se plasează într-un balon cotat cu capacitatea de 10 ml şi se completează cu acelaşi solvent până la cotă. Soluţia se utilizează proaspăt preparată.

*Controlul utilităţii sistemului cromatografice:* Înainte de a efectua analiza, coloana cromatografică se stabilizează cu fază mobilă timp de 10 min, apoi se cromatografiază câte 20 µl soluţie standard până la obţinerea unui timp de retenţie stabilit (4,5 min) în urma a două injectări consecutive; se obţin cel puţin 3 cromatograme. Sistemul cromatografic se consideră util, atunci când: performanţa coloanei, calculată după picul MF-001ului, este de cel puţin 2000 de talere teoretice; coeficientul de asimetrie a picului, calculat la nivelul ½ a înălţimii picului nu depăşeşte 1,5; devierea standard relativă a ariei picului nu depăşeşte 2,0%.

*Prepararea soluţiei probă*: Circa 0,001 g (masa exactă) MF-001 se plasează într-un balon cotat cu capacitatea 25,0 ml, se dizolvă în 5 ml DMSO, se agită până la dizolvare, se adaugă 10,0 ml fază mobilă și se omogenează, apoi se completează cu acelaşi solvent până la cotă şi se amestecă. 5,0 ml soluţie obţinută se plasează într-un balon cotat cu capacitatea de 10 ml şi se completează cu acelaşi solvent până la cotă.

*Determinarea cantitativă:* câte 20 µl soluţie probă de analizat şi soluţie standard se cromatografiază pe rând, obţinând cel puţin câte 5 cromatograme de fiecare soluţie în condiţiile indicate mai sus. Se determină valoarea medie a ariei picului MF-001ului din cromatograma probei analizate ($S_{an}$) şi a probei standard ($S_{st}$).

Conţinutul de MF-001 (X%) în substanţă se determină conform formulei:

$$X\% = \frac{S_{an} * m_{st} * W_{an} * P_0 * [100-U] * 100}{S_{et} * m_{an} * a_x * W_{st} * 100}, \qquad (1)$$

în care,

$S_{an}$ – valoarea medie a ariei picului, calculată din cromatogramele soluţiei probă de analizat;
$S_{et}$ - valoarea medie a ariei picului, calculată din cromatogramele soluţiei standard;
$m_p$ – masa substanţei, g;
$U_s$ – umiditatea substanţei standard, %;
$m_{st}$ – masa substanţei standard, g;
$P_o$–conţinutul substanţei active, %;
$W_{st}$ *și* $W_{an}$ – volumele diluțiilor pentru substanșa standard și cea de analizat.

<u>*Validarea metodei*</u>. Metoda a fost validată conform ghidului ICH, fiind determinați parametrii: liniaritatea, exactitatea, precizia, sensibilitatea (LOQ și LOD) și robustetea, stabilitatea soluției.

*Liniaritate*. Liniaritatea rezultatelor unei proceduri de analiză reprezintă capacitatea acesteia de a obţine rezultate direct proporţionale cu concentraţia analitului din probă. S-a cercetat linearitatea metodei HPLC de dozare a MF-001 pe domeniile de concentrație 5-30 µg/ml. Astfel, inițial s-au preparat soluțiile standard stoc de MF-001 40 µg/ml. Din soluția standard stoc s-au preparat, prin diluție, utilizând ca solvent faza mobilă, 5 probe cu concentrațiile 5, 10, 15, 20 și 30 µg/ml. Acestea au fost injectate în cromatograf, fiind obținute cromatogramele și ariile picurilor. Determinările au fost efectuate în triplicat, fiind construit graficul de etalonare. A fost utilizată analiza de regresie liniară pentru a evalua liniaritatea curbei de etalonare folosind metoda celor mai mici patrate.

*Exactitate*. Exactitatea, numită deseori și acuratețe, este definită ca o caracteristică a apropierii rezultatelor analitice de valoarea adevărată și este o măsură a deviaţiei valorii medii găsită prin analiză, faţă de valoarea adevărată. Se evaluează prin aplicarea metodei de analiză studiată, la probe cu concentraţii cunoscute. Pentru determinarea exactității metodei HPLC de dozare a MF-001 s-a utilizat metoda adaosului standard (îmbogăţirea probelor) prin analiza în triplicat a soluțiilor cu concentrații de 80%, 100% și 120% (8,0 µg/ml, 10 µg/ml și 12,0 µg/ml) și s-a calculat regăsirea procentuală a cantității de susbtanță, fiind evaluată valoarea RSD pentru fiecare nivel de concentrație.

*Precizie*. Determinarea preciziei metodei de dozare s-a efectuat prin evaluarea repetabilității și a preciziei intermediare. *Repetabilitatea* a fost determinată pentru 6 probe, la nivelul de concentrație a substanței medicamentoase de 100%, în aceeași zi, respectându-se aceleași condiții. *Precizia intermediară* s-a determinat cu utilizarea aceleiași proceduri, pe probe identice, în acelaşi laborator, de către diverşi operatori, folosind echipamente diferite şi într-un interval de timp dat. Precizia intermediară a fost cercetată în 2 zile diferite, în același condiții, efectuându-se câte 6 determinări.

*Sensibilitate (LOQ și LOD).* Limita de detecție (LOD) și limita de cuantificare (LOQ) a MF-001 au fost determinate prin analiza soluțiilor de substanță și măsurarea raportului semnal/zgomot. Limita de detecție (LOD) este concentrația, care se datorează proporției semnal/zgomot de aproximativ 3:1, în timp ce limita de cuantificare (LOQ) este concentrația care dă un raport semnal/zgomot de aproximativ 10:1 cu valori RSD (n = 3) mai mic de 10%.

*Robusteţe.* Robustețea unei metode analitice se demonstrează prin evaluarea capacităţii metodei de a rămâne neafectată de variaţii mici, deliberate ale unor parametri. S-a determinat prin variația următoarelor condiții de cromatografiere: debitul fazei mobile cu ±0,1 ml/min, cantitatea de acetonitril în faza mobilă cu ±2% și temperatura coloanei cu ±5$^0$C.

*Stabilitatea soluției.* Stabilitatea soluțiilor analitice standard și probă a fost determinată prin analizarea acestora imediat după preparare și după 24 de ore de păstrare la frigider și la temperatura camerei (25°C). S-au efectuat trei determinări, fiind evaluate ariile picurilor, concentrația analitului în probă (în raport cu o soluție de referință proaspăt preparată) și s-a calculat RSD.

**Rezultate**:

*Optimizarea metodei.* Studiul prealabil al proprietăților fizico-chimice a MF-001 a permis dezvoltarea metodei analitice HPLC prin selectarea preliminară condiții cromatografice, inclusiv lungimea de undă de detectare, faza mobilă, faza staționară și procedura de pregătire a probelor. În acest scop, s-au efectuat o serie de încercări variind raportul dintre acetonitril și apă, optimizarea condițiilor cromatografice pe coloana *Zorbax Eclipse Plus C18*, 5 µm, 4.6 x 250 mm. Rezultatele optimizării metodei sunt rezumate în tab.

14. Faza mobilă constă din acetonitril și apă în raport 80:20 v/v cu o rată de flux de 1ml/min, volumul injecției 20 µl, timpul de rulare 6 min și temperatura coloanei $30^0$C la lungimea de undă (λ) 300 nm. S-a determinat că acestea sunt condițiile optimale în care MF-001 a fost eluat formând picuri simetrice, rezoluție și timp de analiză adecvat, cu timp de retenție în jur de 4,5 min (Fig. 17).

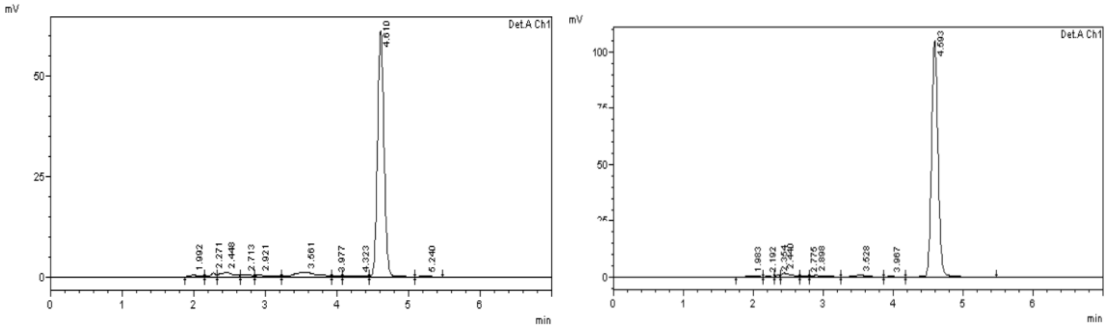



Fig. 17. Cromatogramele soluțiilor de MF-001 cu concentrația 20 µg/ml:
A – soluția standard; B – soluția probă

*Linearitate*. Prin evaluarea mediilor ariilor picurilor obținute în determinările HPLC, reprezentate în raport cu concentrațiile corespunzătoare s-a obținut graficul de calibrare. Rezultatele studiului de liniaritate (tab. 15; fig. 18, 19) au arătat o relație liniară pe intervalul de concentrație de 5-30 µg/ml pentru MF-001.

Din analiza de regresie, a fost obținută o ecuație liniară: y=36472x-44580, iar coeficientul de corelație ($r^2$) a fost 0,9999, fapt ce indică o relație liniară între concentrația analitului și aria picului cromatografic.

Tabelul 14

Rzultatele optimizării metodei HPLC de dozare a MF-001

| Coloana utilizată | Faza mobilă | Viteza | Lungimea de undă | Observașii | Rezultate |
|---|---|---|---|---|---|
| Nucleosil 100, *C-18, 15 µm., 4 x 150 mm* | Acetonitrile : apă 80 : 20 | 1.0 ml/min | 235 nm | Rezoluție slabă 1.3 | Metoda respinsă |
| Zorbax Eclipse Plus C18, *5 µm, 4.6 x 250 mm* | Acetonitrile : apă 80 : 20 | 1.0 ml/min | 300 nm | Rezoluție bună 2.4 | Metoda acceptată |
| Zorbax Eclipse Plus C18, *5 µm, 4.6 x 250 mm* | Acetonitrile : apă 65 : 35 | 1.0 ml/min | 300 nm | Rezoluție slabă 1.8 | Metoda respinsă |

Tabelul 15

Date de calibrare pentru MF-001

| Concentrația soluției, µg/ml | Timpul de retenție, min | Aria picului |
|---|---|---|
| 5 | 4.483 | 135014.00 |
| 10 | 4.487 | 270657.00 |
| 15 | 4.471 | 405158.00 |
| 20 | 4.477 | 541687.00 |
| 30 | 4.479 | 823649.00 |

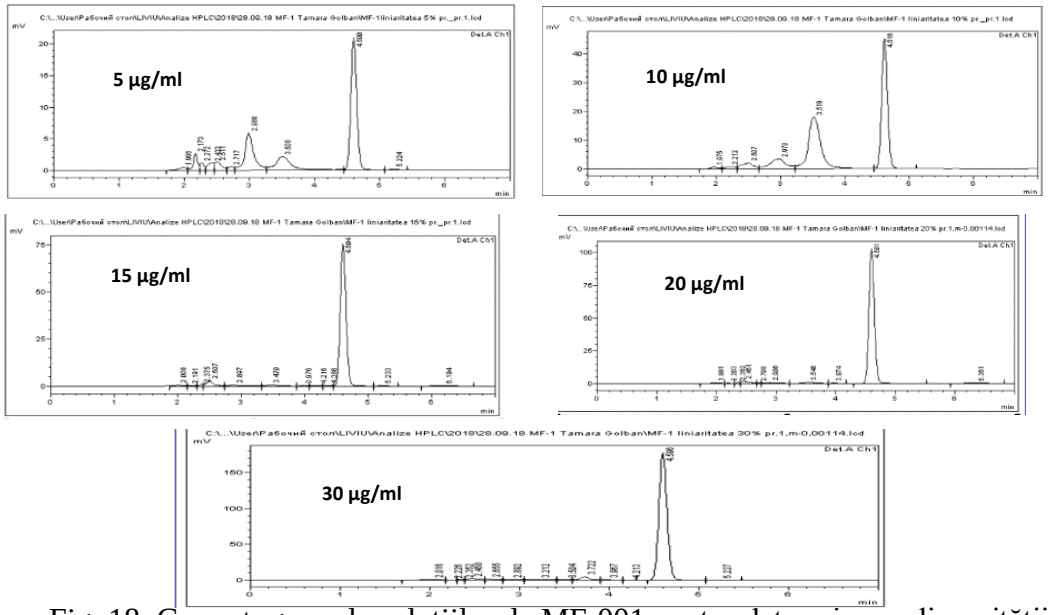



Fig. 18. Cromatogramele soluțiilor de MF-001 pentru determinarea liniarității

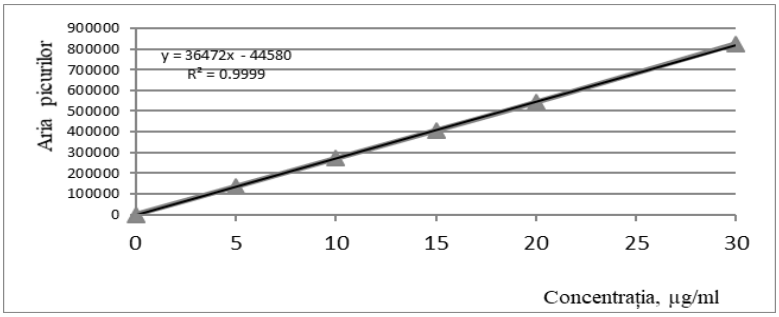



Fig. 19. Dreapta de etalonare a soluției standard de MF-001

*Exactitate*. Prin determinarea exactității procedurii analitice de dozare s-a constatat selectivitatea rezultatelor obținute în această metodă pentru a atinge valoarea adevărată. După cum se vede din tab. 16 valorile RSD sunt cuprinse între 0,03 – 0,24. La analiza în triplicat a soluțiilor cu concentrații de 80%, 100% și 120% (8,0 µg/ml, 10 µg/ml și 12,0 µg/ml) s-a determinat o recuperare procentuală a cantității de substanță de min 100,23% și maxim 100,91%, valori care au fost în limitele acceptate de la 98,0% la 102,0%, ceea ce indică aplicabilitatea metodei pentru analiza cantitativă.

Tabelul 16

Rezultatele determinării exactității dozării pentru MF-001

| Nivele de concentrații, % | Nr de determinări | Concentrație teoretică, µg/ml | Aria picului | Concentrașia obținută, µg/ml | % regăsire | Media, % RSD |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 80 | 1 | 8 | 6746764.55 | 8.045 | 100.56 | 100.53 |
| | 2 | 8 | 6747213.28 | 8.046 | 100.58 | |
| | 3 | 8 | 6739989.94 | 8.037 | 100.46 | 0.061 |
| 100 | 1 | 10 | 8433455.69 | 10.045 | 100.45 | 100.71 |
| | 2 | 10 | 8460275.02 | 10.077 | 100.77 | |
| | 3 | 10 | 8472697.44 | 10.091 | 100.91 | 0.24 |
| 120 | 1 | 12 | 10110546.81 | 12.033 | 100.28 | 100.26 |
| | 2 | 12 | 10108824.57 | 12.031 | 100.26 | |
| | 3 | 12 | 10105489.14 | 12.027 | 100.23 | 0.031 |
| *Note: RSD – abaterea relativă standard* | | | | | | |

*Precizie*. Precizia exprimă îngustimea acordului (gradul de dispersie, coeficientul de variaţie) dintre o serie de măsurători care provine din mai multe serii ale aceleiaşi probe omogene (rezultate independente) în condiţii identice de lucru. Precizia oferă date asupra erorilor întâmplătoare şi nu are nici o legătură cu valoarea adevărată. Deoarece toate măsurătorile conţin erori întâmplătoare, rezultatul unei singure măsurători nu poate fi acceptat ca valoare adevărată. Pentru a prezice domeniul în care se găseşte valoarea adevărată este necesară o estimare a acestei erori, acest lucru făcându-se prin repetarea măsurătorii de mai multe ori. Din acest proces se obţin doi parametri importanţi şi anume valoarea medie şi variabilitatea măsurătorilor [12]. Rezultatele determinărilor au arătat că metoda este precisă în limitele acceptabile. RSD a fost calculat pentru timpul de retenție, aria picului și concentrație, toate valorile fiind mai mici decât 1% (tab 17 și 18).

Tabelul 17.

Rezultatele determinărilor repetabilității metodei HPLC de dozare a MF-001

| No. | Timp de retenție, min | Aria picului | Concentrație, % |
|---|---|---|---|
| 1 | 4.483 | 8433455.69 | 100.45 |
| 2 | 4.487 | 8460275.02 | 100.77 |
| 3 | 4.471 | 8472697.44 | 100.91 |
| 4 | 4.477 | 8439984.05 | 100.53 |
| 5 | 4.479 | 8433455.69 | 100.45 |
| 6 | 4.484 | 8439984.05 | 100.53 |
| Media | 4.480 | 8446641.98 | 100.60 |
| RSD, % | 0.128 | 0.191 | 0.188 |

Tabelul 18

Rezultatele determinărilor preciziei intermediare la validarea metodei HPLC de dozare a MF-001

| | Ziua 1 | | | Ziua 2 | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| No. | Timp de retenție, min | Aria picului | Concentrație, % | Timp de retenție, min | Aria picului | Concentrație, % |
| 1 | 4.483 | 8433455.69 | 100.45 | 4.495 | 9275724.35 | 101.73 |
| 2 | 4.487 | 8460275.02 | 100.77 | 4.937 | 9303352.96 | 102.03 |
| 3 | 4.471 | 8472697.44 | 100.91 | 4.922 | 9189046.32 | 100.78 |
| 4 | 4.477 | 8439984.05 | 100.53 | 4.956 | 9388533.41 | 102.96 |
| 5 | 4.479 | 8433455.69 | 100.45 | 4.988 | 9307879.46 | 102.08 |
| 6 | 4.484 | 8439984.05 | 100.53 | 4.943 | 9268835.80 | 101.65 |
| Average | 4.480 | 8446641.98 | 100.60 | 4.949 | 9288895.38 | 101.87 |
| RSD, % | 0.128 | 0.191 | 0.188 | 0.450 | 0.698 | 0.698 |

*Sensibilitate*. Limita de detecție și Limita de cuantificare (LOD și LOQ). Limita de detecție (LOD) este cea mai mică cantitate de analit dintr-un eșantion care poate fi detectat, dar nu neapărat cuantificat, în timp ce limita de cantiție (LOQ) este cea mai mică cantitate de analit într-un eșantion care poate fi determinat cantitativ cu precizie adecvată [15]. Rezultatele

determinărilor au arătat un LOD și LOQ pentru alogliptin de 0,729 µg/ml și 2,210 µg/ml respectiv.

*Robustețe*. Robustețea metodei analitice a fost testată pentru a evalua lipsa influenței unor modificări minore în condițiile cromatografierii asupra rezultatelor analizei. Rezultatele testării au arătat că la o modificare minoră a condițiilor metodei, cum ar fi compoziția și debitul fazei mobile, temperatura colanei, metoda este robustă. S-a realizat o bună separare, iar valorile RSD sunt în limită și nu depășesc 2,0% (tab. 19).

Tabelul 19

Rezultatele determinării robusteții metodei HPLC de dozare a MF-001

| Parametrii variabili | | Timp de retenție, min | Aria picului | Concentrație, % |
|---|---|---|---|---|
| Debitul fazei mobile 0,9 ml/min | | 4.482 | 8434755.24 | 99.72 |
| Debitul fazei mobile 1,1 ml/min | | 4.472 | 8461005.87 | 100.03 |
| Acetonitril:apă purificată 80:20 | | 4.486 | 8473097.57 | 100.17 |
| Acetonitril:apă purificată 81,6:18,4 | | 4.479 | 8439784.07 | 99.78 |
| Temperatura coloanei $30^0$ C | | 4.481 | 8432915.21 | 99.70 |
| Temperatura coloanei $35^0$ C | | 4.482 | 8438584.13 | 99.77 |
| Valoarea medie | $\overline{X}$ | 4.480 | 8.45E+06 | 99.86 |
| Abaterea standard | $S^2$ | 2.19E-05 | 2.70E+08 | 3.77E-02 |
| | S | 0.005 | 16418.795 | 0.194 |
| Deviația standard relativă | RSD | 0.104 | 0.194 | 0.194 |

*Stabilitatea soluției.* În urma testării stabilității soluției concentrația de MF-001 în soluții a variat de la 99,7% până la 100,1% și RSD nu a fost mai mare de 2,0%, ceea ce indică o stabilitate înaltă a soluțiilor probă și standard pentru 24 ore atât prin păstrare la frigider, cât și în condiții obișnuite. Rezultatele testării stabilității soluției sunt prezentate în tab. 20.

Tabelul 20.

Rezultatele testării stabilității soluției pentru metoda HPLC de dozare a MF-001ului

| Parametrii determinați | Perioada de depozitare | Timp de retenție, min | Aria picului | Concentrație, % | RSD pentru aria picului |
|---|---|---|---|---|---|
| Soluția standard | 0 ore | 4.483 | 8457894.12 | - | 0.03 |
| | 24 de ore la $25^0$C | 4.479 | 8457387.08 | 100.09 | 0.17 |
| | 24 de ore la frigider | 4.482 | 8457614.21 | 100.10 | 0.07 |
| Soluția probă | 0 ore | 4.484 | 8434755.24 | - | 0.05 |
| | 24 de ore la $25^0$C | 4.484 | 8432915.21 | 99.70 | 0.21 |
| | 24 de ore la frigider | 4.479 | 8433089.57 | 99.71 | 0.11 |

Concluzii: A fost elaborată și validată metoda HPLC de dozare a MF-001ului, care s-a dovedit a fi simplă, rapidă, exactă și precisă, sensibilă și robustă. Condițiile cromatografice și faza mobilă selectate oferă o bună rezoluție pentru substanța analizată. Timpul de retenție nu depășește 5 min. Pe parcursul experimentelor s-au respectat rigorile ghidurilor ICH cu referire la validarea metodelor de analiză. Metoda HPLC elaborată şi validată poate fi inclusă în Documentele Analitice de Normare a calităţii pentru dozarea MF-001ului.

## 6.2. Cercetarea stabilității substanței MF-001

***Cercetarea în condiții de stres***

Datorită faptului că studiile de stabiltate oferă informații privind căile de degradare și produsele de degradare a MF-001 care ar putea apărea în timpul depozitării și transportării, este de o importanță majoră de a elabora metode eficiente de analiză și de a crea condițiile potrivite pentru analiză. Studiile de degradare forțată în condiții de stres pot contribui la facilitarea dezvoltării farmaceutice, în etapele de preformulare și de formulare propriu-zisă a substanței, precum și în domenii precum elaborarea de formulări, fabricarea și ambalarea, în care cunoașterea comportamentului chimic poate fi utilizată pentru îmbunătățirea unui produs medicamentos. Este foarte important de a alege condițiile potrivite pentru analiză.

În testarea accelerată a stabilității, un produs este supus acțiunii mai multor factori: la mai multe temperaturi ridicate (mai superioare decât cele ambientale) și se determină cantitatea de aport de căldură necesară pentru a provoca defectarea produsului. Aceasta se face pentru a supune produsul la o condiție care accelerează degradarea. Aceste informații sunt proiectate pentru a prezice durata de valabilitate sau folosite pentru a compara stabilitatea relativă a formulărilor alternative. Acest lucru oferă, de obicei, o indicație timpurie a termenului de valabilitate a produsului și astfel scurtarea programului de dezvoltare. Pe lângă temperatură, condițiile de stres aplicate în timpul testării de stabilitate accelerată sunt umiditatea, lumina, variații ale pH-ul și ambalajul. În testarea accelerată a stabilității, eșantioanele sunt supuse stresului, refrigerate după stres și apoi testate simultan. Deoarece durata analizei este scurtă, probabilitatea de instabilitate în sistemul de măsurare este redusă în comparație cu testarea stabilității în timp real. În plus, în testele de stabilitate accelerată, compararea produsului inițial cu cel supus stresului se face în același test, iar recuperarea probei stresate este exprimată în procente de recuperare a probelor nestresate.

Pentru studiile de degradare în condiții de stres a substanței cercetate – MF-001 – a fost utilizată metoda spectrofotometrică de dozare în raport cu standardul, elaborată anterior. În calitate de solvent pentru prepararea soluțiilor standard și probă s-a utilizat DMSO (dimetilsulfoxid), în care MF-001 se dizolvă foarte bine. Concentrația a fost calculată în raport cu absorbanța soluției standard.

<u>*Prepararea soluției standard*</u>

0,25 g de substanță standard MF-001, se plasează într-un balon cotat de 25 ml, se dizolvă și se aduce la cotă cu DMSO (sol. St. A). 0,5 ml soluția st. A se dilează pînă la 25 ml în balon cotat cu DMSO (sol. St. B). 1 ml sol.st. B se dilează pînă la 25 ml în balon cotat cu DMSO (sol. St. C). Concentrația substanței în soluția st. C este de 0,000008g/ml (8,0 µg/ml). Se determină absorbanța soluției standart C de la spectrofotometru în cuva cu grosimea 1 cm. În calitate de soluţie de referinţă a servit soluția de dimetilsulfoxid (DMSO).

Spectrul de absorbție a soluției standard de MF-001 este reprezentat în figura 20.

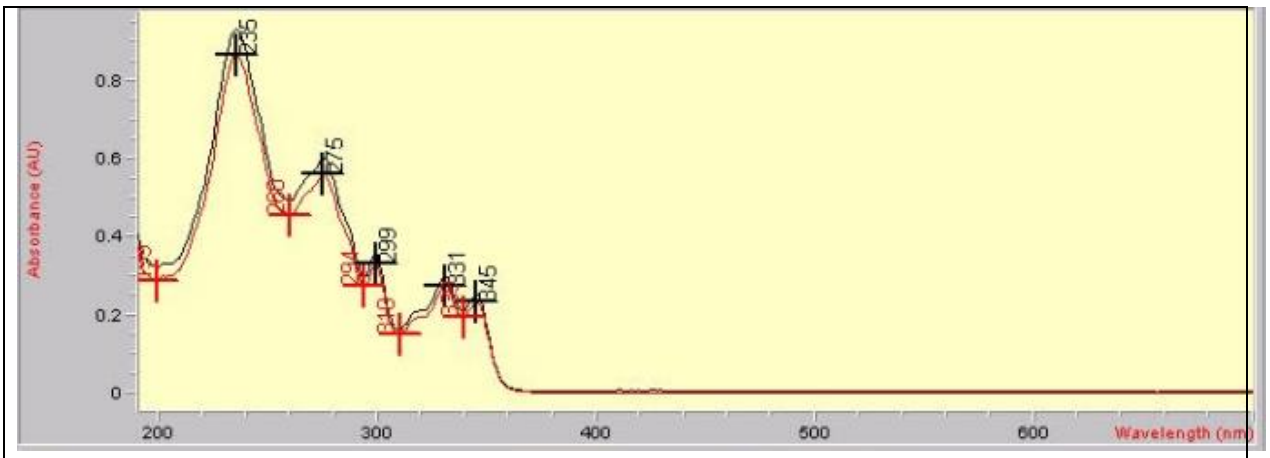



Figura 20.Spectrul de absorbție în UV-VIS a soluției standard de MF-001 cu concentrația de 8,0 µg/ml în DMSO

*Degradare oxidativă*

Oxidarea este una dintre cele mai răspândite căi de degradare chimică a substanţelor medicamentoase. Oxigenul, care participă în majoritatea reacţiilor de oxidare, se găseşte din abundenţă în mediul în care medicamentele sunt expuse, fie în timpul procesării, fie în timpul stocării pe termen lung.

Peroxidul de hidrogen este utilizat pe scară largă pentru oxidarea substanțelor medicamentoase în studiile de degradare forțată, dar pot fi folosiți și alți agenți de oxidare. Selecția unui agent oxidant, concentrația sa și condițiile depind de substanța medicamentoasă. Se raportează că supunerea soluțiilor la 0,1–3% hidrogen oxid la pH neutru și temperatura camerei timp de șapte zile sau până la o degradare maximă de 20% , ar putea genera produse de degradare relevante. Degradarea oxidativă a substanței medicamentoase implică un mecanism de transfer de electroni pentru a forma anioni și cationi reactivi.

În studiu a fost utilizat în calitate de agent de oxidare, soluția de peroxid de hidrogen de 30%. A fost efectuat studiul degradării forțate în condiții de oxidare, a 3 serii de substanță MF-001. Soluția probă a fost supusă procesului de oxidare timp de 24 de ore, cu efectuarea a trei analize cantitative prin spectofotometrie UV-VIS. Au fost determinate absorbanțele la lungimea de undă maximă de 300 nm. Concentrația a fost calculată în raport cu absorbanța soluției standard.

*Tehnica de lucru: <u>Prepararea soluției probă</u>*

Soluția probă se prepară cu concentrația de 1%: 0,25 g de substanță medicamentoasă MF-001, se plasează într-un balon cotat de 25 ml, se dizolvă și se aduce la cotă cu DMSO (soluția A).

Câte 0,5 ml soluția A se plasează în eprubete cu dop și se adaugă câte 1 ml de soluție de peroxid de hidrogen 30%; o eprubetă se lăsă pentru 3 ore și cea de-a doua pentru 24 h. pH-ul soluțiilor în prezența agentului oxidant a fost 3,45-3,47.

După 3 ore și respectiv după 24 de ore, se prelevează câte 0,5 ml de soluție oxidată și se diluează până la 25 ml în balon cotat cu DMSO (soluția B). 1 ml soluție B se dilează pînă la 25 ml în balon cotat cu DMSO (soluția C). Concentrația substanței în soluția C este de 0,000008g/ml (8,0 µg/ml). Se determină absorbanța soluției probă C de la spectrofotometru în cuva cu grosimea 1 cm. În calitate de soluţie de referinţă a servit soluția de dimetilsulfoxid (DMSO).

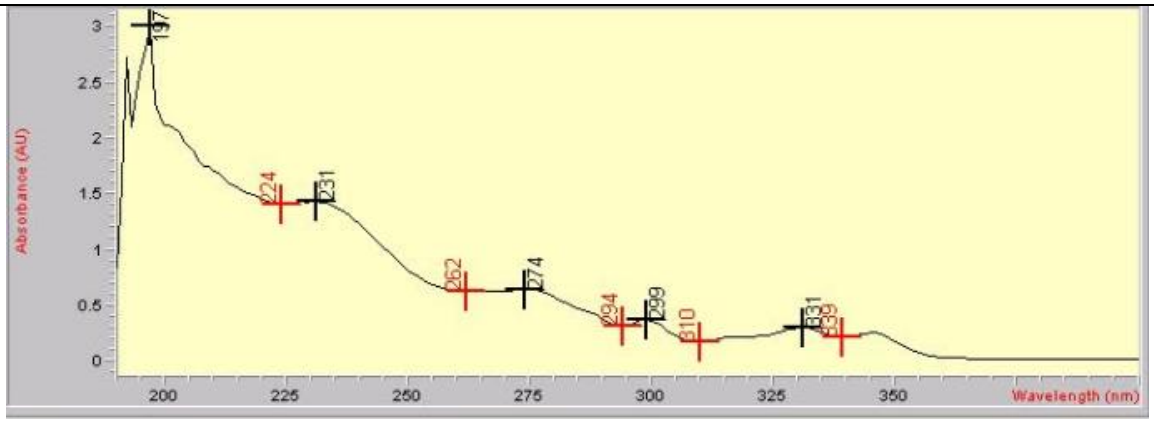



Figura 21. Spectrul de absorbție în UV-VIS a soluției probă de MF-001 expusă stresului oxidativ (8,0 µg/ml în DMSO)

Analizînd spectrul de absorbție după oxidare, figura 21 în comparație cu spectrul de absorbție al standardului, figura 20, se observă o schimbare semnificativă a spectrului, ceea ce constată degradarea substanței.

S-a calculat conținutul inițial de MF-001, după 3 ore de oxidare și după 24 de ore de oxidare. Rezultatele determinărilor sunt reprezentate în tabelul 21.

Tabelul 21. Rezultatele determinării cantitative prin metoda spectrofotometrică UV-VIS a soluției probă de MF-001 supusă stresului oxidativ

| MF-1+H2O2 Seria 01 | | | MF-1+H2O2 Seria 02 | | | MF-1 +H2O2 Seria 03 | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| λ, nm | A | C, % | λ, nm | A | C, % | λ, nm | A | C, % |
| 299 | 0,37 | 103,12842 | 299 | 0,36 | 100,34116 | 299 | 0,36 | 100,34116 |
| 300 | 0,36 | 100,34116 | 300 | 0,35 | 97,55391 | 300 | 0,36 | 100,34116 |
| 299 | 0,36 | 100,34116 | 299 | 0,35 | 96,99646 | 299 | 0,35 | 97,55391 |

Conform datelor din tabelul 4, în urma oxidării substanța suferă o degradare semnificativă, micșorîndu-se concentrația.

<u>Concluzie:</u> În urma analizei de degradare forțată sub influența oxidantului,comparînd spectrele de absorbție și rezultatele dozării, se observă degradarea MF-001ului în mediul unui oxidant puternic cu micșorarea concentrației cu 3%. Se poate constata faptul că substanțele oxidante modifică structura și concentrația MF-001ului (figura 22.).

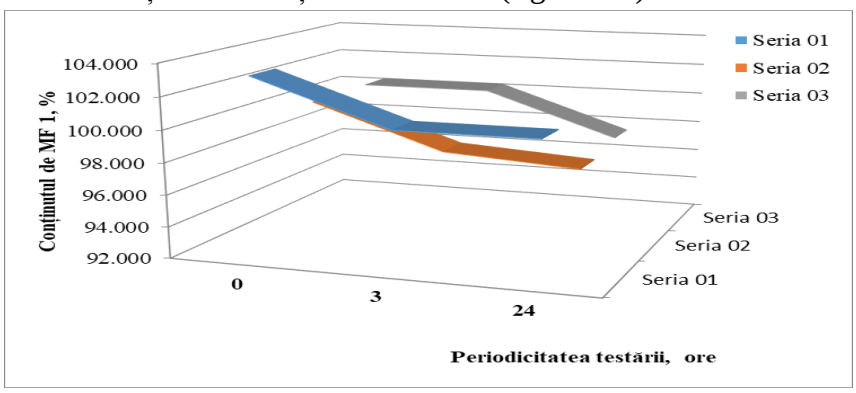



Figura 22. Reprezentarea grafică a modificării concentrației MF-001 la acțiunea oxidantului

*Degradare acido-bazică*

Hidroliza este una dintre cele mai frecvente reacții chimice de degradare pe o gamă largă de pH. Hidroliza este un proces chimic care include descompunerea unui compus chimic prin reacția cu apa. Studiul hidrolitic în condiții acide și bazice implică cataliza grupelor funcționale ionizabile prezente în moleculă. Testarea prin stres acid sau bazic implică degradarea forțată a unei substanțe medicamentoase. Selecția tipului și concentrațiilor de acid sau bază depind de stabilitatea substanței medicamentoase. Acidul clorhidric sau acidul sulfuric (0,1–1 M) pentru hidroliza acidă și hidroxidul de sodiu sau hidroxidul de potasiu (0,1–1 M) pentru hidroliza bazică sunt sugerați ca reactivi adecvați pentru hidroliză. Testarea prin hidroliză este începută în mod normal la temperatura camerei și dacă nu există nici o degradare, se aplică temperatura ridicată (50–70 $^{0}$C). Degradarea hidrolitică nu trebuie să depășească mai mult de 7 zile. Eșantionul degradat este apoi neutralizat folosind acid, bază sau tampon adecvate, pentru a evita descompunerea ulterioară.

Pentru a evidenția influența **acizilor** asupra MF-001ului a fost utilizat acidul clorhidric 0,1 mol / l, iar pentru crearea mediului **bazic** – hidroxidul de sodiu 0,1 mol / l.

Soluția probă a fost supusă procesului de hidroliză în mediu acid și în mediu bazic timp de 24 de ore, cu efectuarea a trei analize spectrofotometrice UV-VIS: la 0, 3 și 24 de ore. Au fost înregistrate absorbanțele la lungimea de undă maxima de 300 nm. Concentrația a fost calculată în raport cu absorbanța soluției standard. Spectrul soluției standard de MF-001 este redat în figura 20.

Tehnica de lucru: *Prepararea soluției probă*

Soluția probă se prepară cu concentrația de 1%: 0,25 g de substanță medicamentoasă MF-001, se plasează într-un balon cotat de 25 ml, se dizolvă și se aduce la cotă cu DMSO (soluția A). Câte 0,5 ml soluția A se plasează în eprubete cu dop și se adaugă câte 1 ml de soluție de HCl/NaOH; o eprubetă se lăsă pentru 3 ore și cea de-a doua pentru 24 h. A fost determinat pH-ul soluțiilor obținute: - mediu acid – pH= 2,01- 2,05; - mediu bazic – pH-12,26-12,28.

După 3 ore și respectiv după 24 de ore, se prelevează câte 0,5 ml de soluție hidrolizată și se diluează până la 25 ml în balon cotat cu DMSO (soluția B). 1 ml soluție B se diluează pînă la 25 ml în balon cotat cu DMSO (soluția C). Concentrația substanței în soluția C este de 0,000008g/ml (8,0 µg/ml). Se determină absorbanța soluției probă C de la spectrofotometru în cuva cu grosimea 1 cm. În calitate de soluţie de referinţă a servit soluția de dimetilsulfoxid (DMSO). În urma analizei au fost obținute spectrogramele și rezultatele următoare, figura 23 și tabelul 22, din care se observă o degradare neînsemnată a substanței, care prezintă stabilitate în mediu acid.

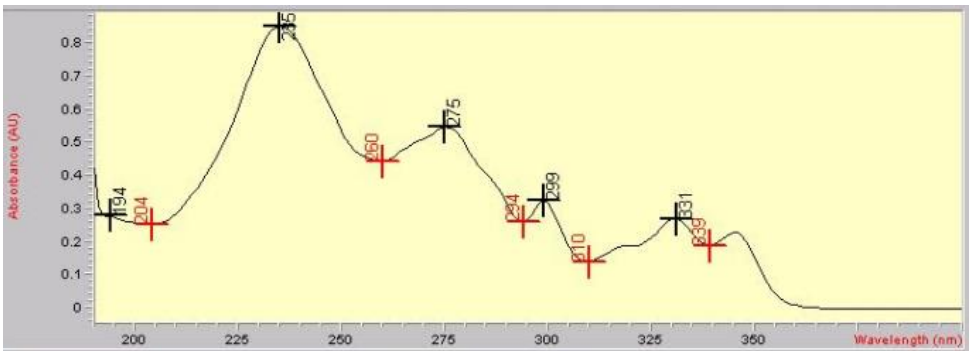



Figura 23. Spectrul de absorbție în UV-VIS a soluției probă de MF-001 expusă stresului acid (8,0 µg/ml în DMSO)

S-a calculat conținutul inițial de MF-001, după 3 ore de expunere în mediu acid și după 24 de ore de acțiune a HCl 0,1 mol/l. Rezultatele determinărilor sunt reprezentate în tabelul 5.

Tabelul 22. Rezultatele determinării cantitative prin metoda spectrofotometrică UV-VIS a soluției probă de MF-001 supusă stresului hidrolitic acid

| **Perioada testarii, ore** | MF-1+HCL Seria 01 | | | MF-1+HCL Seria 02 | | | MF-1+HCL Seria 03 | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | λ, nm | A | C, % | λ, nm | A | C, % | λ, nm | A | C, % |
| **0** | 299 | 0,32 | 89,6046 | 299 | 0,32 | 89,1642 | 299 | 0,33 | 91,9515 |
| **3** | 300 | 0,32 | 89,2311 | 300 | 0,31 | 87,7149 | 300 | 0,32 | 90,5021 |
| **24** | 299 | 0,32 | 88,8298 | 299 | 0,32 | 87,8542 | 299 | 0,32 | 87,9657 |

În urma supunerii substanței sub influența hidrolizei în mediu puternic acid , nu a fost observată o degradare semnificativă. Micșorarea concentrației este sub 2% (figura 24).

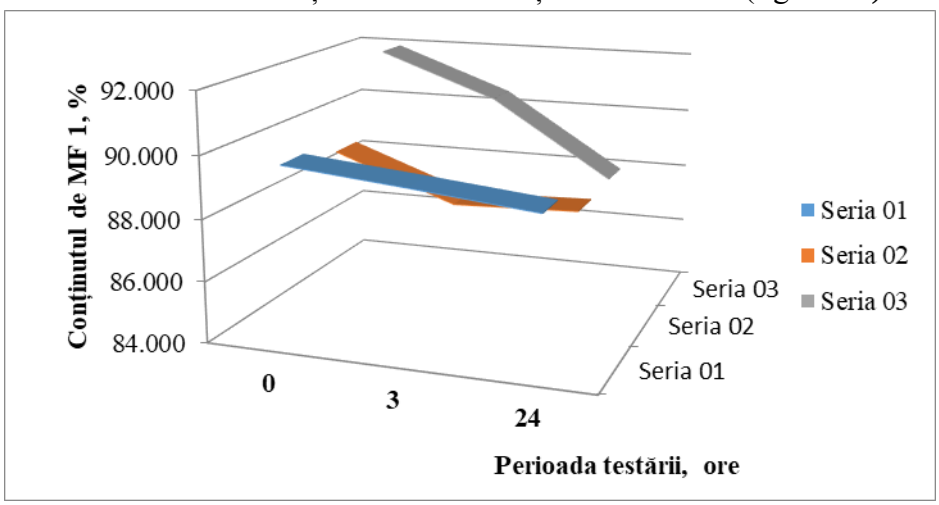



Figura 24. Reprezentarea grafică a modificării concentrației MF-001 la acțiunea acizilor.

A fost înregistrat spectrul de absorbție a soluției de MF-001 supuse hidrolizei bazice, prezentate în figura 9, conform căreia se constată degradare semnificativă a substanței. S-a calculat conținutul inițial de MF-001, după 3 ore de expunere în mediu bazic și după 24 de ore de acțiune a NaOH 0,1 mol/l. Rezultatele determinărilor sunt reprezentate în tabelul 23 și figura 25, 26, care prezintă valori mici ale concentrației substanței, ceea ce semnifică că a avut loc degradarea substanței în mediu bazic.

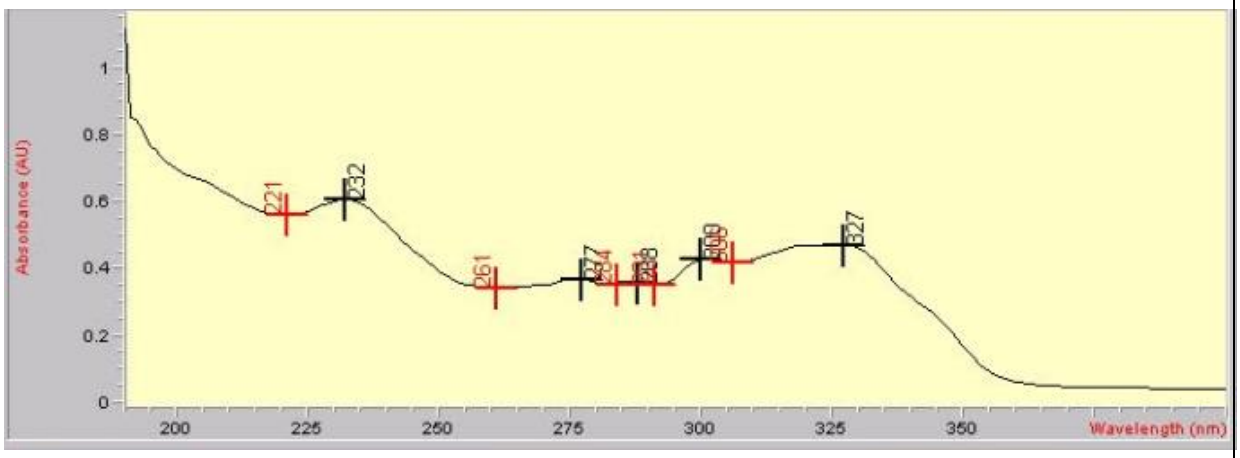



Figura 25. Spectrul UV-VIS al MF-001 supusă hidrolizei în mediu bazic (8,0 µg/ml în DMSO)

Tabelul 23. Rezultatele determinării cantitative prin metoda spectrofotometrică UV-VIS a soluției probă de MF-001 supusă stresului hidrolitic bazic

| Periodicitate a testarii, ore | MF-1+NaOH Seria 01 | | | MF-1+NaOH Seria 02 | | | MF-1+NaOH Seria 03 | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | λ, nm | A | C, % | λ, nm | A | C, % | λ, nm | A | C, % |
| 0 | 299 | 0,33 | 91,6783 | 299 | 0,33 | 91,6728 | 299 | 0,33 | 91,9515 |
| 3 | 300 | 0,33 | 91,2686 | 300 | 0,33 | 91,1711 | 300 | 0,32 | 89,5823 |
| 24 | 299 | 0,32 | 88,0493 | 299 | 0,32 | 89,1364 | 299 | 0,32 | 88,8298 |

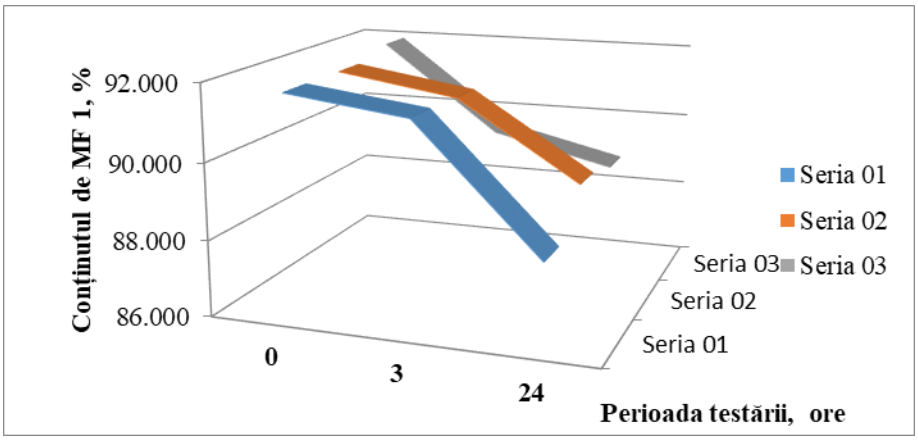



Figura 26. Reprezentarea grafică a modificării concentrației MF-001 la acțiunea bazelor

Concluzie: În urma analizei putem constata că are loc o degradare semnificativă a substanței în mediu bazic și mai puțin în mediu acid. Acest fapt trebuie luat în considerație la utilizarea excipienților și ambalajului în etapa de preformulare, substanțele cu caracter bazic nu vor prezenta avantaj.

*Degradare termică, fotocatalitică și hidrolitică*

Umiditatea, fiind un factor atmosferic, reprezintă un mediu favorabil pentru reacțiile de oxidare, hidroliză, fermentare, cît și pentru dezvoltarea microorganismelor. Totodată, lumina și temperatura prezintă un factor de activare al reacţiilor de degradare a medicamentelor, creșterea temperaturii duce la mărirea vitezei reacției de degradare. De aceea acești factori trebuie studiați în precesul de analiză al substanței. În studiu probele de substanță au fost supuse umidității ridicate (80% RH) prin păstrarea timp de 2 săptămâni într-un exicator deasupra apei. O altă probă a fost păstrată sub acțiunea razelor de lumină (1200 Lux h) timp de 48 de ore. Ulterior a fost efectuată analiza cantitativă a soluției pregătite prin metoda spectrofotometrică UV-VIS.

*Pregătirea soluției probă:* 0,005 g de substanță MF-001 a fost dizolvată în 25 ml solvent DMSO (dimetilsulfoxid). (sol A). Apoi 1 ml din sol A se aduce pînă la cotă 25 ml cu solventul DMSO. Se înregistrează absorbanța la spectrofotometru, figura 11, ce demonstrează stabilitatea substanței la lumină și umiditate, comparînd cu spectrul de absorbție a standardului, figura 20.

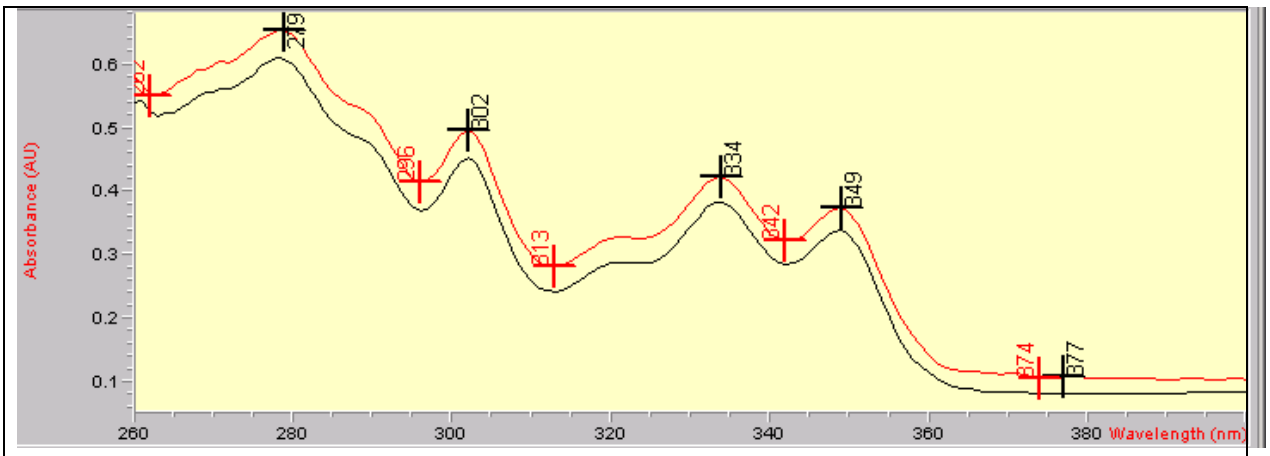



Figura 27. Spectrul de absorbție în UV-VIS la MF-001 sub acțiunea luminii și umidității

S-a calculat conținutul inițial de MF-001, după 24 ore de expunere la lumină și după 48 de ore de acțiune a luminii. Rezultatele determinărilor sunt reprezentate în tabelul 24, nu suferă mari schimbări, demonstrînd stabilitatea substanței.

Tabelul 24. Rezultatele determinării cantitative prin metoda spectrofotometrică UV-VIS a soluției probă de MF-001 supusă stresului fotocatalitic

| Perioada testarii, ore | MF-1 + lumină Seria 01 | | | MF-1 + lumină Seria 02 | | | MF-1 + lumină Seria 03 | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | λ, nm | A | C, % | λ, nm | A | C, % | λ, nm | A | C, % |
| 0 | 299 | 0.45 | 98.534 | 299 | 0.46 | 100.9800 | 299.00 | 0.46 | 100.0724 |
| 24 | 300.00 | 0.45 | 98.211 | 300.00 | 0.46 | 100.8142 | 300.00 | 0.46 | 99.79103 |
| 48 | 299.00 | 0.45 | 98.167 | 299.00 | 0.46 | 100.3495 | 299 | 0.46 | 99.67540 |

Din figura 27 și 28 se observă că lumina nu este un factor esențial de degradare, totuși, după 48 de ore concentrația are tendința de a scădea, de aceea este recomandată depozitarea substanței în flacoane din sticlă întunecată, ferit de lumină.

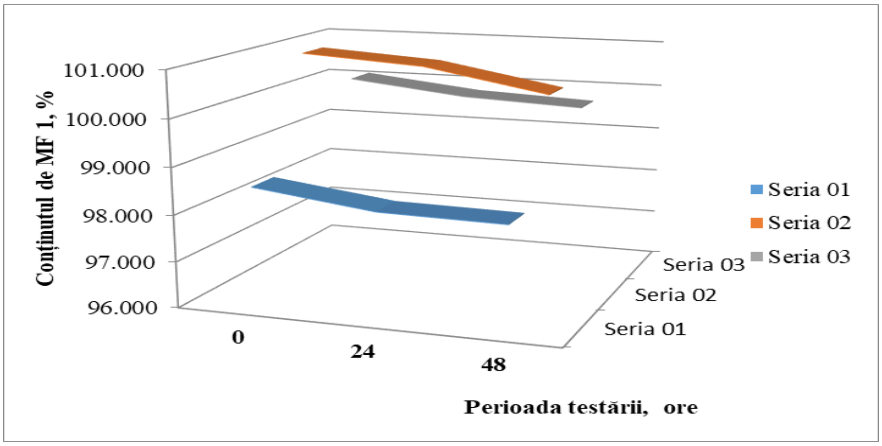



Figura 28. Reprezentarea grafică a modificării concentrației MF-001ului la acțiunea luminii

S-a calculat conținutul initial de MF-001, după 1 săptămână de expunere la umiditate și după 2 săptămâni de acțiune a umidității. Rezultatele determinărilor sunt reprezentate în tabelul 8.

Din tabelul 25 și figura 29 se observă că umiditatea nu provoacă hidroliza substanței.

Substanța medicamentoasă plasată într-un recipient deschis a fost păstrată și la temperatură ridicată ($60^0$C) în prezență de umiditate înaltă (80%RH) în termostat timp de 2

săptămâni.

Tabelul 25. Rezultatele determinării cantitative prin metoda spectrofotometrică UV-VIS a soluției probă de MF-001 supusă acțiunii umidității

| **Perioada testarii, săpt** | MF-1 + umid Seria 01 | | | MF-1 + umid Seria 02 | | | MF-1 + umid Seria 03 | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | λ, nm | A | C, % | λ, nm | A | C, % | λ, nm | A | C, % |
| **0** | 299 | 0.50 | 100.0966 | 299 | 0.50 | 100.33747 | 299.000 | 0.50 | 99.89590 |
| **1** | 300.000 | 0.49 | 98.69161 | 300.00 | 0.50 | 100.11669 | 300.000 | 0.50 | 99.87583 |
| **2** | 299.000 | 0.49 | 98.35040 | 299.00 | 0.50 | 99.89590 | 299 | 0.50 | 99.47440 |

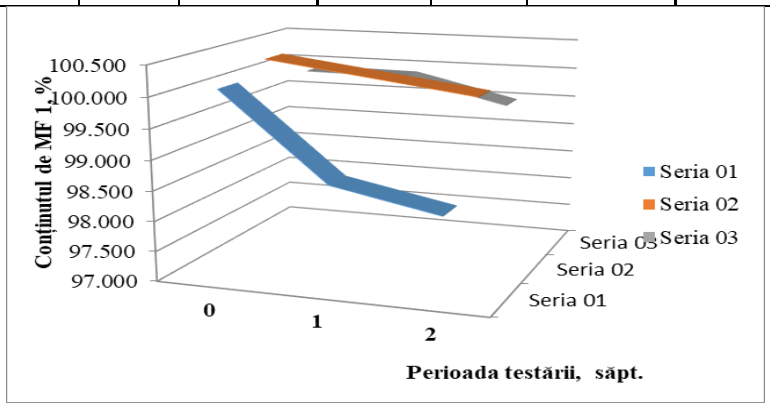



Figura 29. Reprezentarea grafică a modificării concentrației MF-001ului la acțiunea umidității

S-a urmărit influența concomitentă a temperaturii și umidității asupra MF-001ului.

*Pregătirea soluției probă*

0,005 g de substanță MF-001 a fost dizolvată în 25 ml solvent DMSO (dimetilsulfoxid). (sol A). Apoi 1 ml din sol A se aduce pînă la cotă 25 ml cu solventul DMSO. Se înregistrează absorbanța la spectrofotometru, figura 30, se observă că substanța nu suferă schimbări.

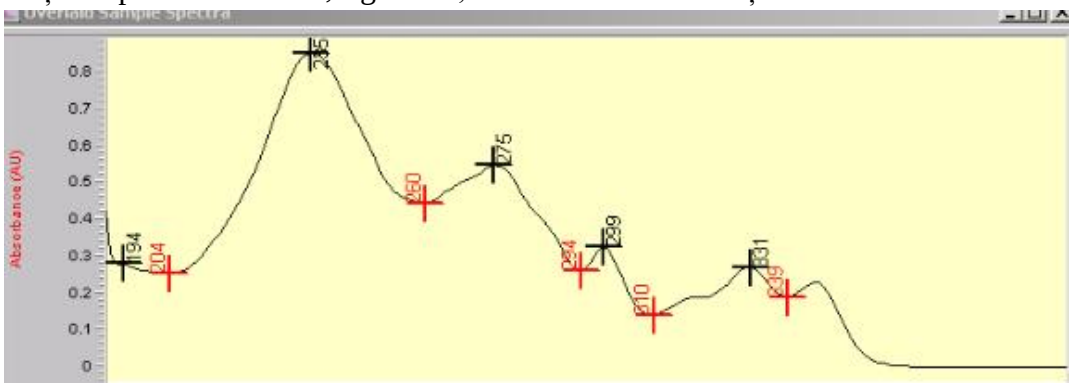



Figura 30. Spectrul de absorbție în UV-VIS la MF-001ului sub acțiunea concomitentă a temperaturii și umidității

S-a calculat conținutul inițial de MF-001, după 1 săptămână de expunere la umiditate și după 2 săptămâni de acțiune concomitentă a temperaturii și a umidității. Rezultatele determinărilor sunt reprezentate în tabelul 26 și figura 31, nesuferind schimbări semnificative.

Tabelul 26. Rezultatele determinării cantitative prin metoda spectrofotometrică UV-VIS a soluției probă de MF-001 supusă acțiunii concomitente a temperaturii și umidității

| Perioada testarii, săpt | MF-1 + t+u Seria 01 | | | MF-1 + t+u Seria 02 | | | MF-1 + t+u Seria 03 | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | λ, nm | A | C, % | λ, nm | A | C, % | λ, nm | A | C, % |
| **0** | 299,0 | 0.36 | 100.3411 | 299,0 | 0.36 | 101.45607 | 299.0 | 0.36 | 100.06244 |
| **1** | 300.0 | 0.36 | 100.0624 | 300.0 | 0.36 | 100.89861 | 300.0 | 0.36 | 99.50499 |
| **2** | 299.0 | 0.36 | 99.78371 | 299.0 | 0.36 | 100.34116 | 299.0 | 0.36 | 98.94754 |

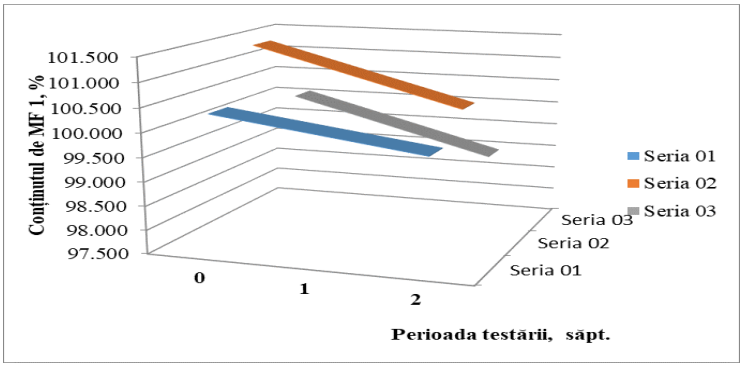



Figura 31. Reprezentarea grafică a modificării concentrației MF-001ului la acțiunea concomitentă a temperaturii și umidității

Din figura 31 se observă că MF-001ul este stabil la temperatură și umditate.

***Cercetarea stabilității prin DSC***

Se poate spune că o primă, şi cea mai simplă, evaluare a stabilităţii termice a medicamentelor se face prin urmărirea comportării termice a acestora. Reacţiile de descompunere ale medicamentelor prezintă atât semnificaţie practică, cât şi ştiinţifică. Astfel, aceste reacţii fac posibilă cunoaşterea comportarea substanţelor medicamentoase la diferite temperaturi, iar acea cunoaştere este importantă pentru predicţia condiţiilor de stocare ale formulărilor, adică medicamentului în sine. De asemenea, ele permit obţinerea de informaţii despre temperaturi la care SM poate fi supusă procesului tehnologice fără pierderea proprietăţilor sale specifice, fizico-chimice şi farmacologice. Reacţiile de descompunere sunt realizate de asemenea, pentru obţinerea de compuşi solizi, care sunt caracterizaţi prin compoziţia şi activitatea corespunzătoare, în vederea unor posibile aplicaţii tehnologice viitoare. Analiza termică reprezintă un grup de tehnici, în care o proprietate fizico-chimică a probei investigate este măsurată în funcţie de timp sau temperatură, în timp ce temperatura probei, într-o atmosferă specifică, este încălzită sau răcită cu o viteză stabilită de modifcare a temperaturii, sau este menţinută la o temperatură constantă.

Principalele metode termice de analiză sunt: - analiza termogravimetrică sau termogravimetria (TG), care constă în înregistrarea masei probei în funcţie de temperatură sau de timp (m = f(T); m = f'(t)), pe măsură ce temperatura probei creşte liniar cu timpul; - analiza termogravimetrică derivată sau termogravimetria derivată (DTG), care constă în înregistrarea vitezei de reacţie (dm/dt) în funcţie de timp sau temperatură; - analiza termică diferenţială (DTA), care constă în înregistrarea diferenţei de temperatură (ΔT), între probă şi un material inert termic, în funcţie de temperatură sau timp; - calorimetria cu scanare diferenţială (DSC) care constă în înregistrarea fluxului termic (dΔ/dt) în funcţie de temperatură sau timp. Cele mai importante aplicaţii ale analizei TG se referă la: - determinarea stabilităţii termice relative; - determinarea conţinutului de apă sau alţi componenţi volatili; - analiza cantitativă

a diferitor compuşi sau amestecuri de compuşi; - studiul reactivităţii diferitor compuşi. În ceea ce priveşte aplicaţiile tehnicilor DTA şi DSC, acestea sunt atât de natură fizică, cât şi chimică. Principalele fenomene de natură fizică, respectiv chimică care pot fi detectate cu aceste tehnici sunt: topire, cristalizare, vaporizare, sublimare, tranziţii vitroase, tranziţii cristaline, respectiv: deshidratare, descompunere, degradare oxidativă, reacţii în fază solidă, combustie.

În domeniul farmaceutic, tehnica DSC este cea mai utilizată dintre metodele termice de analiză, datorită sensibilităţii mari pe care o prezintă, ceea ce permite cuantificarea modificărilor de entalpie a unor compuşi puri sau rezultaţi dintr-o descompunere. Tehnica DSC constituie un instrument de lucru valoros pentru analiza şi controlul medicamentelor, în special datorită capacităţii mari de detecţie a tranziţiilor, respectiv a transformărilor subtile, nesesizabile altfel şi a „umerilor" în interiorul picului endotermic de topire. Acest lucru îi permite să determine cu siguranţă puritatea unei SM sau produs farmaceutic, sau contaminarea acestuia în diverse faze ale procesării sau stocării. Stabilitatea termică a unei substanţe poate fi caracterizată şi pe baza studiului cinetic, care a devenit o chestiune esenţială în analiza termică, tot mai mulţi investigatori abordând astfel de studii. Interesul este complet justificat. Pe de o altă parte, datele cinetice sunt esenţiale pentru descrierea oricărui gen de mecanism, în care descompunerea termică are loc; pe de altă parte, analiza cinetică este în legătură directă cu mecanismul de descompunere. Cunoaşterea mecanismului permite a presupune ecuaţiile cinetice sau invers, iar analiza cinetică constituie punctul de plecare pentru a presupune mecanismele descompunerii termice.

Analizele DSC ale MF-001ului s-au realizat la termogravimetrul Q200 V24.4 Build 116.

*Tehnica de lucru:* O cantitate de aproximativ 2,00 mg din fiecare probă a fost introdusă în câte un creuzet de aluminiu, cu capac perforat. După introducera probei, creuzetul şi capacul acestuia au fost închise cu ajotorul presei şi introduse în aparatul DSC, într-o atmosferă dinamică de $N_2$ (debit de 80mL/min) şi o viteză de încălzire de 10°C/min, în intervalul de temperatură 25°C - 400°C. Ca şi referinţă s-a folosit un creuzet de aluminiu de 40 µL gol, cu capac perforat şi închis cu presa. Calibrarea aparatului s-a realizat folosind un standard de indiu, în creuzet de aluminiu.

Termogramele DSC au fost înregistrate, după care au fost stocate şi prelucrate folosind software-ul STAR SW 12.10. Datele obţinute în urma analizei probelor substanţei active individuale au fost evaluate prin analiza termogramelor.

Termograma DSC a MF-001ului (figura 32 ), prezintă un pic endoterm între 67.59°C şi 70.55°C cu un maxim de temperatură la 67.87°C, corespunzător deshidratării ($\Delta H$= -67.59 mJ). Procesul de topire cu descompunere a substanţei incepe la o valoare a temperaturii mai mare de 111,06°C. Din analiza termogramelor se poate observa, că substanța suferă modificări termice semnificative după $100^0$C, dar este stabilă până la $65^0$C.

Analiza termică confirmă rezultatele obținute în cadrul studiilor de degradare în condiții de stres termic.

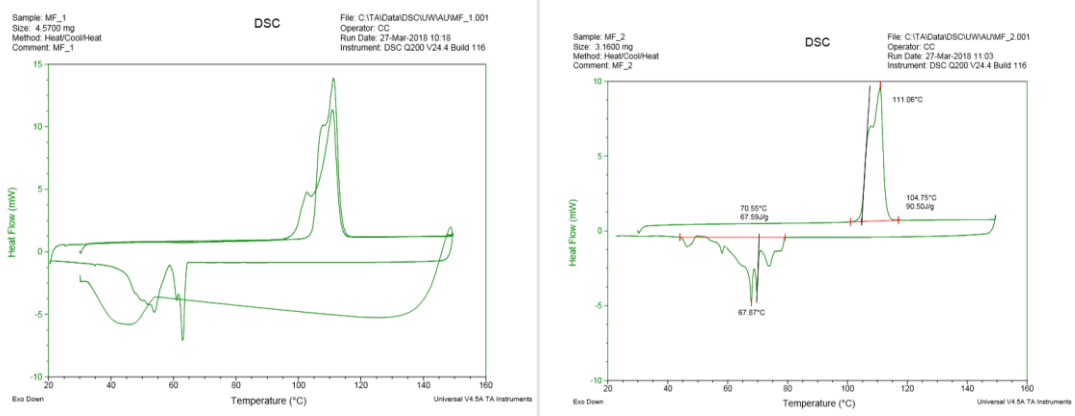



Figura 32. Termogramele DSC ale substanței MF-001

***Cercetarea stabilității în condiții de păstrare izotermică***

Este cunoscut faptul că valorile ridicate ale temperaturii duc la mărirea vitezei de reacție, ceea ce duce la mărirea vitezei de degradare. Pentru a putea urmări modificări posibile în calitatea substanței studiate, MF-001, probele de substanță au fost depozitate în condiţii de stres, la temperaturi ridicate, urmărindu-se concentrația de substanță în timp, cît și apariția unor impurități. Probele au fost plasate în termostate la temperaturi de 40 şi $60^0$C.

În studiu a fost utilizată metoda de păstrare izotermică. Au fost pregătite 6 probe pentru depozitare la 40 $^o$C cu periodicitatea analizei de 46 zile și 6 probe au fost păstrate la 60 $^o$C cu periodicitatea analizei de 12 zile. În cercetarea stabilității în condiții de păstrare izotermică a substanței cercetate – MF-001 – a fost utilizată metoda metoda cromatografiei de lichide de înaltă performanță (HPLC) pentru determinarea cantitativă în raport cu standardul. Parametrul de calitate determinat, utilizat la calcularea concentrației, a fost aria picului format. În calitate de fază mobilă a fost utilizată soluția ACN:H2O 80:20 (acetonitril:apă purificată în proporție 80:20), în care MF-001ul se dizolvă foarte bine. Concentrația a fost calculată în raport cu aria picului soluției standard.

Pe lângă concentrație (dozare), pe perioada de depozitare au mai fost determinați parametrii: aspect, solubilitate, identificare (HPLC, după timpul de retenție), conținutul de apă, impurități înrudite chimic (CSS).

*Prepararea soluției standard:* Se cîntărește masă exactă, 0,005 g de substanță standard MF-001, , se dizolvă în 25 ml ACN:H2O (80:20) (acetonitril: apă purificată - faza mobilă) (sol st A) . Apoi 1 ml soluție St A se diluează pînă la 25 ml cu fază mobilă ACN:H2O (80:20) . Concentrația substanței în soluția st. C este de 0,000008g/ml (8,0 µg/ml). Se determină aria picului soluției standard la cromatograf.

Cromatograma soluției standard de MF-001 este reprezentat în figura 33.

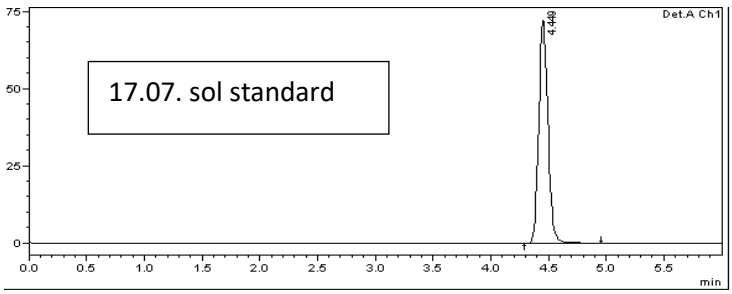



Figura 33. Cromatograma soluției standard de MF-001 cu concentrația de 8,0 µg/ml

*Depozitarea substanței în termostate la 40 și 60 °C*

Substanța a fost plasată în cîte 6 flacoane de sticlă inchise cu dop de cauciuc și depozitată în condiții de păstrare izotermică. În termenul stabilit s-a efectuat analiza cantitativă a fiecărei probe de substanță de analizat- MF-001.

*Tehnica de lucru:* *Prepararea soluției probă:* 0,005 g de substanță medicamentoasă MF-001, se dizolvă în 25 ml - faza mobilă - ACN: H2O (80:20) (acetonitril: apă purificată) (sol A). Apoi 1 ml soluție A se diluează pînă la 25 ml cu fază mobilă ACN:H2O (80:20) . Concentrația substanței în soluția de analizat este de 0,000008g/ml (8,0 µg/ml). Se determină aria picului soluției la cromatograf. Concentrația este calculată în comparație cu aria picului standard, dupa fornula:

$$C\,\% = \frac{Sx * m\ st * 100\ \%}{S\ st * m\ x},$$

în care : $S_{st}$ – aria picului soluției standard de MF-001

$S_x$ – aria picului soluției probei de MF-001

$m_{st}$ – masa exactă a substanței standard de MF-001, g

$m_x$ - masa exactă a substanței medicamentoase MF-001, g

În urma analizei în termenii prestabiliți au fost obținute următoarele cromatograme, din figura 34 și 35.

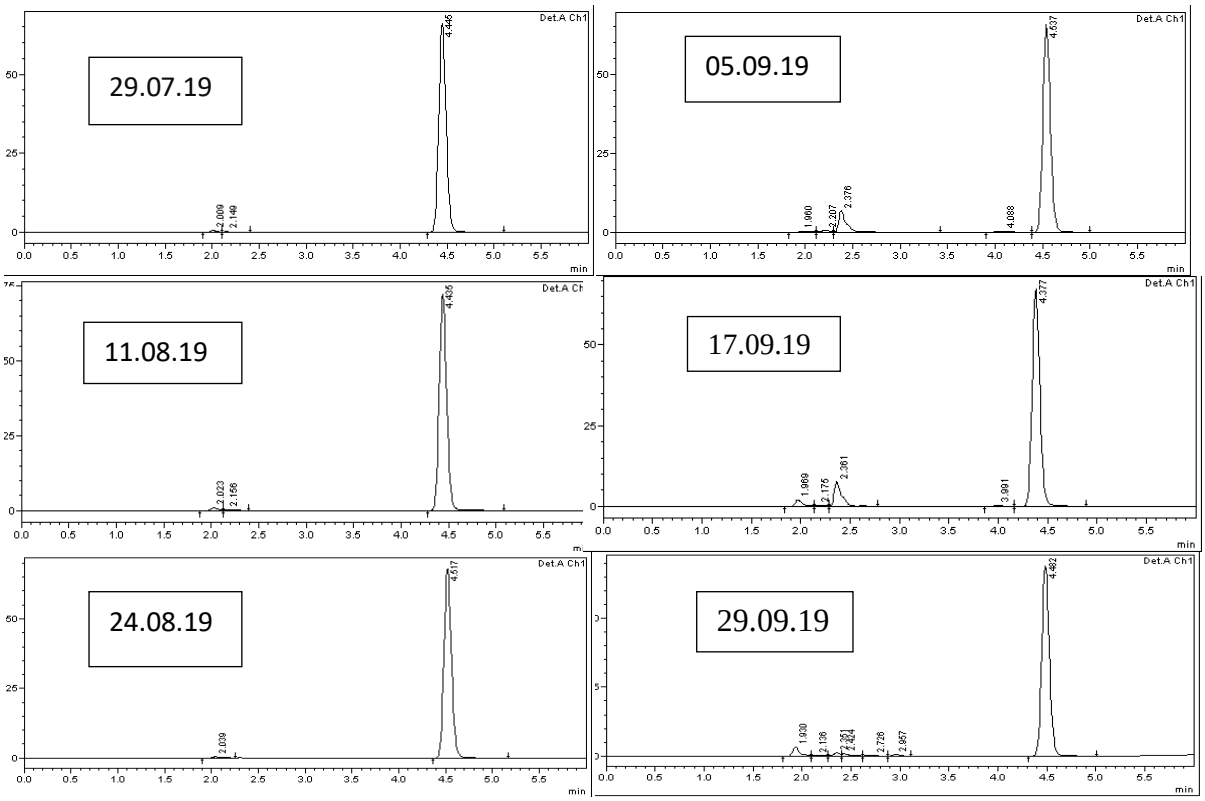



Figura 34. Cromatogramele substanței MF-001 în condiții de păstrare la 60 °C

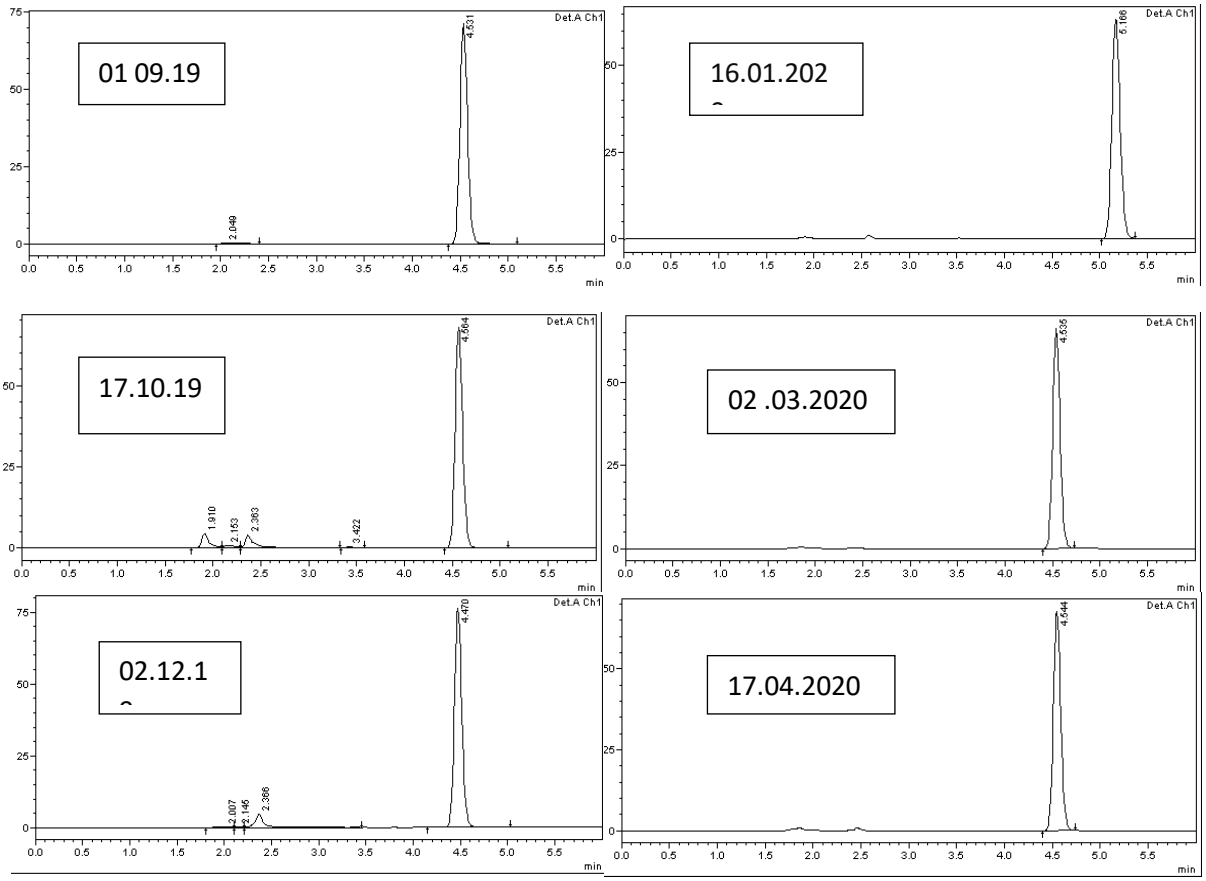



Figura 35. Cromatogramele substanței MF-001 în condiții de păstrare la 40 ºC

Concluzie: Efectuînd studiile de depozitare a substanței la temperaturi de 40 și 60 ºC , analizînd cromatogramele se constată că substanța medicamentoasă este stabilă. În baza acestor rezultate a fost calculat termenul de valabilitate pentru MF-001.

***Determinarea termenului de valabilitate***

Pentru determinarea termenului de valabilitate a MF-001ului s-a petrecut păstrarea experimentală prin metoda "Degradării accelerate" la temperaturi de 40 ºC şi 60 ºC. Cu acest scop s-au depozitat trei serii de substanță: 001; 002; 003. Substanța a fost ambalată în flacoane din sticlă cu capac din cauciuc. Cercetarea stabilităţii la temperaturi de 40 ºC şi 60 ºC s-a efectuat în termostate TS – 80M-2, TS-80-2U-450M. Înaintea depozitării experimentale s-a petrecut analiza calităţii MF-001ului stabilite anterior în proiectul specificației de calitate pentru substanță.

Indicii de calitate în procesul "Degradării accelerate" s-au determinat peste intervale egale de timp, echivalente cu şase luni de păstrare în condiţii obişnuite pentru această substanţă.

Pentru determinarea termenului de valabilitate prin metoda „Degradării accelerate" s-a stabilit: gradul reacţiilor de degradare; constantele vitezei reacţiilor de degradare.

S-a determinat prin metoda HPLC conţinutul de substanţă activă în probele care au fost supuse termostatării la 40 °C, 60 °C până la micşorarea conţinutului de substanță cu 2 %. Micşorarea conţinutului de MF-001 la depozitare la temperatura de 40 °C, are loc peste 230 zile, iar la 60 °C peste 60 zile – conţinutul de substanță are tendința de scădere.

Ulterior a fost completată Specificația de calitate pentru substanță, fișa de stabilitate pentru toate 3 serii de substanță, cu determinarea finală a termenului de valabilitate și Protocolul studiului de stabilitate.

Astfel, în urma calculelor efectuate, termenul de valabilitate pentru substanță poate fi estimat de 7 ani pentru substanța medicamentoasă, MF-001. Evident, că aceste rezultate vor fi confirmate și prin studii de stabilitate în timp real. Actualmente substanța este depozitată în condiții de temperatură și umiditate normală ($25^0$C; 65% RH) deja timp de 3 ani și 10 luni cu testarea periodică la fiecare 3 luni. Până în prezent substanța medicamentoasă corespunde tuturor criteriilor de calitate stipulate în proiectul de specificație.

**6.3. Elaborarea DAN pentru substanța MF-001**

Rezultatele obținute la executarea etapelor precedente au stat la baza elaborării Documentelor Analitice de Normare pentru substanța MF-001: Proiectul de Monografie Farmacopeică.

7. Descrierea colaborării între organizația din RM și organizațiile partenere

Colaborarea cu colegii de la Facultatea de Farmacie a Universității de Stat de Medicină din Belarus a început în anul 2017, în urma vizitei la USMF ”Nicolae Testemițanu” a unei delegații din această universitate în frunte cu decanul facultății doamna profesor Natalia Gurina. Au fost stabilite conexiuni la nivel de catedre, dar și personale, fiind totodată identificate teme de cercetare de interes reciproc. În urma anunțului cu referire la proiectele bilaterale moldo-belaruse a fost luată decizia de participare. Colaborarea cu partenerii belarași mult mai intensă s-a început deja în cadrul proiectului, aceasta fiind o oportunitate pentru dezvoltarea continuă a unui parteneriat moldo-belorus în vederea consolidării și valorificării potențialului de cercetare în domeniul obținerii și implementării de noi agenți antimicobacterieni, astfel stimulând inovarea farmaceutică din Republica Moldova și Belarus. În urma stabilirii domeniilor de activitate pentru fiecare din părți, participanții în proiect din ambele echipe de cercetare au fost în permanentă conexiune, cu realizarea schimburilor de idei, rezultate, opinii. Au fost organizate mai multe ateliere de lucru, inclusiv în format on-line, o conferință științifică cu participare internațională:

- Ateliere de lucru în vederea elaborării sarcinii tehnice a proiectului și planificarea activităților de cercetare în cadrul proiectului, executate în Republica Moldova. Participanți: V. Valica, F. Macaev, L. Uncu, S. Parii. Chișinău, 05.03.2019 și 21.03.2019.
- Atelier de lucru în vederea coordonării sarcinii tehnice a proiectului, planificarea și coordonarea activităților comune de cercetare în cadrul proiectului, executate de echipele din Belarus și Republica Moldova. Participanți: N. Gurina, N. Goleac, O. Seciko, V. Valica, F. Macaev, L. Uncu, S. Parii. Chișinău, 28.03.2019, prin teleconferință.
- Conferință științifică cu participare internațională, sub genericul” Obținerea și cercetarea farmaceutică a unor noi molecule și produse farmaceutice cu potențial terapeutic”. Organizată prin teleconferință, 31 ianuarie 2020, Chișinău, Republica Moldova. Organizator: Centrul Științific al Medicamentului, USMF ”Nicolae Testemițanu”; parteneri: Facultatea de Farmacie, Universitatea de Stat de medicină din Belarus, Minsk, Republica Belarus și

Institutul de Chimie, Laboratorul de sinteză organică și biofarmaceutice, Chișinău, Republica Moldova; comitetul de organizare: Președinte - Vladimir Valica, Vicepreședinte - Livia Uncu, Membri: Fliur Macaev, Nicolae Ciobanu, Stela Adauji, Natalia Golyak, Ecaterina Mazur. Participanți: 91 persoane, inclusiv 28 din Belarus, 8 din România și 55 din RM. Au fost ascultate 28 de comunicări; realizate discuții pe marginea rezultatelor de cercetare.

Au fost realizate publicații comune în reviste naționale și internaționale. De remarcat faptul, că în componența echipelor de cercetare au fost incluși și implicați cercetători tineri ce au format un nucleu bine structurat, prin care colaborarea echipelor de cercetare va continua și se va extinde pe plan international prin lansarea de noi initiative de proiecte commune. În perioada 30 octombrie - 2 noiembrie 2019 a fost efectuată o deplasare la Universitatea de Medicină din Minsk, Belarus, din cadrul proiectului bilateral „Obținerea și cercetarea farmaceutică a derivaților de propiltiodiazolochinazolin-onă cu proprietăți biofarmaceutice optimizate", 19.80013.80.07.08A/BL. În cadrul deplasării s-a efectuat analiza şi pregătirea pentru publicare a datelor experimentelor realizate asupra compuşilor cu activitate antituberculoasă în colaborare cu colegii de la Departamentul de Farmacologie al Universităţii de Stat de Medicină din Belarus. De asemenea, s-a lucrat asupra elaborării conceptului de proiect bilateral nou în cadrul căruia se va efectua obţinerea şi analiza preclinică a unor compuşi noi cu un potenţial înalt de activitate biologică. Au avut loc întâlniri cu echipa de parteneri pe proiect din Belarus, precum și cu m.c., prof. dr. hab. Zabinskii Vladimir din Institutul de Chimie Bioorganică al ANŞB și prof., dr. hab. Tsapenkov Valerii din Universităţii de Stat de Medicină din Belarus, în cadrul cărora s-au discutat oportunităţi de colaborare în cadrul proiectelor internaţionale (Visegrad Initiative), inclusiv celor finanţate de Comisia Europeană. În perioada 31 octombrie - 1 noiembrie 2019 echipa moldo-belorusă din cadrul proiectului s-a aflat la Universitătea de Stat de Medicina din or. Vitebsk, Belarus, unde am participat la conferința internațională "«Международная конференция, посвященной 60-летию фармацевтического факультета учреждения образования Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»" și la Conferința internațională Медицинское образование XXI века: разработка модели «Университет 3.0», în cadrul căreia am avut comunicare în plen: "55 years of pharmaceutical education in the Republic of Moldova".

8. Diseminarea rezultatelor obținute în formă de publicații

**Articole în reviste ştiinţifice**

- **în reviste din bazele de date Web of Science şi SCOPUS**

1. DUCA, Gh., POGREBNOI, S., BOLDESCU, V., AKSAKAL, F., **UNCU, A., VALICA, V., UNCU, L.,** NEGRES, S., NICOLESCU F., **MACAEV F.** Tryptanthrin analogues as inhibitors of enoyl-acyl carrier protein reductase: activity against Mycobacterium tuberculosis, toxicity, modeling of enzyme binding. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2019, Vol.19 (8), 609-619. ISSN:1860-7187. **(IF:3.442).** http://doi.org/10.2174/1568026619666190304125740 .
2. STINGACI, E.; ZVEAGHINTEVA, M.; POGREBNOI, S.; LUPAȘCU, L.; **VALICA, V.; UNCU, L.,** SMETANSCAIA, A.; DRUMEA, M.; PETROU, A.; CIRIC, A., GLAMOCLIJA, J. M.; SOKOVIC, M.; CRAVTSOV, V.; GERONIKAKI, A.; **MACAEV, F.** New vinyl-1,2,4- triazole derivatives as antimicrobial agents: Synthesis, biological evaluation and molecular docking studies. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2020, 30 (17), 127368. ISSN: 0960-894X. https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2020.127368 **(IF 2,572**).

- **în reviste din străinătate recunoscute**

3. SECHKO, O.; TSARENKOV, V.; **MACAEV, F.; UNCU, A.; VALICA, V.; UNCU, L.** Acute Toxicity Evaluation of Sulfate 2-mercapto-5H- [1,3,4]- tiadiazolo-[2,3-b]-quinazolin-5-on. *International scientific journal for pharmacists and doctors „RECEPT”,* 2020: 2-3 (23): 214-222; ISSN of print version: 1993-4882 ISSN of online version: 2414-2263. DOI: https://doi.org/10.34883/PI.2020.2.2.029

- **în culegeri internaționale**

4. **UNCU, A.** Evaluation of the latest achievements in the discovery of new molecules and drugs regimens for the treatment of tuberculosis. *Матеріали IV Міжнародної науково-практичної конференції ”ЛІКИ – ЛЮДИНІ. СУЧАСНІ ПРОБЛЕМИ ФАРМАКОТЕРАПІЇ І ПРИЗНАЧЕННЯ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ”*, Харків, НФаУ, 2020, Том 1, с. 27-35. ISSN 2412-0456.

- **în reviste din Registrul Naţional al revistelor de profil, cu indicarea categoriei**

  - ***Categoria B+***

5. **UNCU, A.** Development and validation of the high-pressure liquid chromatographic method for the quantitative determination of propylthiohinothiadiazole. *Moldovan Medical Journal*. October 2020;63(4), 32-37. ISSN 2537-6373 (print), ISSN 2537-6381 (on-line). DOI: https://10.5281/zenodo.3958549 .
6. PODGORNII, A.; **VALICA, V.;** POGREBNOI, S.; LUPASCU, L.; **UNCU, A.; MACAEV, F.** Antimycotic activity of phenoxythiazolchloralum. *Moldovan Medical Journal*. October 2020;63(4), 61-64. ISSN 2537-6373 (print), ISSN 2537-6381 (on-line). DOI: https://10.5281/zenodo.4016818

- **Alte reviste de specialitate:**

7. SECHKO, O., **UNCU, A.,** GURINA, N., SLABKO, I., GOLIAK, N., **MACAEV, F.,** TSARENKOV, **V., VALICA, V., UNCU, L.** Antimycobacterial properties of 5h- [1,3,4] thiadiazolo[2,3b] quinazolin-5-one derivatives**.** *Revista Farmaceutică a Moldovei*, Nr. 1-4, 2020, *in pess*. ISSN 1812-5077.
8. **UNCU, A.**, SECHKO, O., **VÎSLOUH, O., VALICA, V.,** GOLIAK, N., GURINA, N**., MACAEV, F., MAZUR, E., UNCU, L.** Evaluation of some physico-chemical properties of propyltiodiazolochinazolin-one derivatives. *Revista Farmaceutică a Moldovei*, Nr. 1-4, 2020, *in pess*. ISSN 1812-5077.

**Teze în culegeri ştiinţifice**

- **în lucrările conferinţelor ştiinţifice internaţionale (peste hotare)**

1. **UNCU, A.** Tratamente actuale în tuberculoză și premisele dezvoltării noilor medicamente derivate de tiadiazol. *Volum de rezumate. Conferința Națională de Farmacie Clinică, ediţia a III-a "Farmacia clinică în secolul XXI".* Bucureşti, România, 2019, p.113-115. ISBN 978-973-0-24609-4.
2. POGREBNOI, S., BOLDESCU, V., **UNCU, A., VALICA, V., UNCU, L.,** GOLIAC, N., GURINA, N., **MACAEV, F.** New synthetic analogs of tryptanthin with a valuable anti-tuberculosis potential. *Материалы Международной конференции посвященной 60-летию фармацевтического факультета учреждения образования «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет» «СОВРЕМЕННЫЕ ДОСТИЖЕНИЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ НАУКИ И ПРАКТИКИ»*. Витебск, Республика Беларусь, 2019, p.41-42. ISBN 978-985-466-971-7.
3. STYNGACH, E., POGREBNOI, S., ZVEAGHINTEVA, M., **VALICA, V., UNCU, L., MACAEV, F.** Synthesis of vinyl triazole fungicides. *Материалы Международной конференции посвященной 60-летию фармацевтического факультета учреждения образования «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет» «СОВРЕМЕННЫЕ ДОСТИЖЕНИЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ НАУКИ И ПРАКТИКИ»*. Витебск, Республика Беларусь, 2019, p.43. ISBN 978-985-466-971-7.
4. **UNCU, A.** New perspectives and options in fighting dengue virus. *In: Book of abstracts, The 19th International Symposium and Summer School on Bioanalysis,* Suior, Romania 2019, p. 52-53. ISBN 978-973-0-29898-7.
5. FURSENCO, C., CALALB, T., **UNCU, L.**. Antibacterial and antifungal activities of some Solidago species. *Матеріали IV Міжнародної науково-практичної конференції "ЛІКИ – ЛЮДИНІ. СУЧАСНІ ПРОБЛЕМИ ФАРМАКОТЕРАПІЇ І ПРИЗНАЧЕННЯ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ",* Харків, НФаУ, 2020, Том 2, с. 28-29. ISSN 2412-0456.

- **în lucrările conferinţelor ştiinţifice naţionale cu participare internaţională**

6. GRECU, T., **UNCU, A.** Stabilitatea MF-001ului în condiții de stres. *În: Materialele Congresului Studenților farmaciști, ed. 2-a, Revista Farmaceutică a Moldovei.* 2019, 1-4, p. 22. ISSN 1812-5077.

- **în lucrările conferinţelor ştiinţifice naţionale**

8. **UNCU, A.; VALICA, V.; VÎSLOUH, O.; MACAEV, F.; UNCU, L.** Degradarea accelerată a MF-001ului în cercetarea stabilității. *În: Culegere de rezumate, Congresul consacrat aniversării a 75-a de la fondarea USMF "Nicolae Testemițanu"*, Chișinău, Republica Moldova, 21-23 octombrie 2020, p. 684.
9. **UNCU, A.** Elaborarea și validarea metodei cromatografice de lichide de înaltă presiune pentru dozarea MF-001ului. *În: Culegere de rezumate, Congresul consacrat aniversării a 75-a de la fondarea USMF "Nicolae Testemițanu"*, Chișinău, Republica Moldova, 21-23 octombrie 2020, p.685.
10. DRUMEA, M., **VALICA, V.,** STÂNGACI, E., POGREBNOI, S., LUPAȘCU, L., **MACAEV, F.** Sinteza și studiul preclinic al unui nou derivat nesaturat al 1,2,4-triazolului cu acțiune antifungică. *În: Culegere de rezumate, Congresul consacrat aniversării a 75-a de la fondarea USMF "Nicolae Testemițanu"*, Chișinău, Republica Moldova, 21-23 octombrie 2020, p.662.

9. Diseminarea rezultatelor obținute în formă de prezentări (comunicări, postere, teze/rezumate/abstracte) la foruri științifice

**Foruri internaționale:**

1. *International Symposium and Summer School on Bioanalysis.* July 8-13, 2019, Șuior, Romania. New perspectives and options in fighting with Dengue virus. **UNCU, A. Comunicare**. Abstract publicat în *Book of abstracts, The 19th International Symposium and Summer School on Bioanalysis,* Suior, Romania 2019, p. 52-53. ISBN 978-973-0-29898-7.
2. *Conferința Națională de Farmacie Clinică, ediţia a III-a "Farmacia clinică în secolul XXI".* Bucureşti, România, 2019**.** Tratamente actuale în tuberculoză și premisele dezvoltării noilor medicamente derivate de tiadiazol. **UNCU, A. Comunicare**. Abstract publicat în *Volum de rezumate. Conferința Națională de Farmacie Clinică, ediţia a III-a "Farmacia clinică în secolul XXI".* Bucureşti, România, 2019, p.113-115. ISBN 978-973-0-24609-4.

**Foruri naționale:**

3. Conferința științifico-practică cu genericul "Învățământul farmaceutic superior în serviciul ocrotirii sănătății". 11 septembrie 2019, Chișinău. Perspectivele dezvoltării de noi molecule pentru tratamentul tuberculozei**. UNCU, A. Comunicare.**
4. Conferință științifică cu genericul" Obținerea și cercetarea farmaceutică a unor noi molecule și produse farmaceutice cu potențial terapeutic". 31 ianuarie 2020, Chișinău, Republica Moldova.
   - Premise de obținere a unor derivați nesaturați de triazol. **DRUMEA, M. Comunicare.**
   - Medicamente combinate dezvoltate în cadrul Centrului Științific al Medicamentului. **UNCU, L. Comunicare.**
   - Sinteza dirijată a unor noi molecule cu potențial terapeutic în cadrul Laboratorului de Sinteză organică și Biofarmaceutice al Institutului de Chimie. **MACAEV, F. Comunicare.**

- Propiltiodiazolochinazolin-ona: o nouă moleculă cu potențial antimicobacterian avansat în tratamentul tuberculozei. **UNCU, A. Comunicare.**

**5.** Congresul consacrat aniversării a 75-a de la fondarea USMF ”Nicolae Testemițanu”, 21-23 octombrie 2020, Chișinău, Republica Moldova.

- Provocări și soluții pentru combinațiile medicamentoase in vitro. **UNCU, L. Comunicare.**
- Sinteza și studiul preclinic al unui nou derivat nesaturat al 1,2,4-triazolului cu acțiune antifungică. **DRUMEA, M**. **Comunicare.** Abstract publicat în *Culegere de rezumate, Congresul consacrat aniversării a 75-a de la fondarea USMF” Nicolae Testemițanu”*, Chișinău, Republica Moldova, 21-23 octombrie 2020, p. 662.
- Degradarea accelerată a propiltiohinotiadiazolului în cercetarea stabilității. **UNCU, A. Poster.** Abstract publicat în: *Culegere de rezumate, Congresul consacrat aniversării a 75-a de la fondarea USMF” Nicolae Testemițanu”*, Chișinău, Republica Moldova, 21-23 octombrie 2020, p. 684.
- Elaborarea și validarea metodei cromatografice de lichide de înaltă presiune pentru dozarea propiltiohinotiadiazolului. **UNCU, A. Poster.** Abstract publicat în: *Culegere de rezumate, Congresul consacrat aniversării a 75-a de la fondarea USMF” Nicolae Testemițanu”*, Chișinău, Republica Moldova, 21-23 octombrie 2020, p. 685.

**6.** Conferința științifico-practică consacrată memoriei profesorului Vasile Procopișin, *cu* genericul: „FARMACISTUL ȘI ROLUL LUI ÎN SISTEMUL DE SĂNĂTATE”, Noiembrie 2020, Chișinău, Republica Moldova. Corelarea gradului de inflență a proprietăților fizico-chimice cu activitatea propiltiohinotiadiazolului. **UNCU, A. Comunicare.**

**7.** Congresul al II-lea al Asociației studenților farmaciști cu participare internațională, dedicat aniversării a 55-a a Facultății de Farmacie ” Medicamentul și farmacistul: actualități și perspective”. Chișinău, 14-17 noiembrie 2019. Stabilitatea MF-001ului în condiții de stres. **UNCU, A. Poster.** Abstract publicat în: *Materialele Congresului Studenților farmaciști, ed. 2-a, Revista Farmaceutică a Moldovei.* 2019, 1-4, p. 22. ISSN 1812-5077.

10. Protecția rezultatelor obținute în formă de obiecte de proprietate intelectuală

Nu au fost obtinute la moment. Sunt pregătite materialele pentru depunere spre brevetare a substanțelor derivate de propiltiodiazolochinazolin-onă: sarea cu acid sulfuric și complexul cu ciclodextrine.

11. Materializarea rezultatelor obținute

1. Proiect de Monografie Farmacopeică ” Propiltiohinotiadiazol *en gross*”;
2. Raport de stabilitate pentru substanța Propiltiohinotiadiazol;
3. Proiect de cercetare doctorală (la etapa de finalizare) **„Analiza, standardizarea propiltiohinotiadiazolului și a formei farmaceutice antimicobacteriene”; autor doctorand Uncu Andrei,** conducător ştiinţific dl **Valica Vladimir**, profesor universitar, doctor habilitat în ştiinţe farmaceutice, director Centru Ştiinţific al Medicamentului; conducător prin cotutelă dl **Fliur Macaev**, dr. hab. şt. chim., prof. cercet., Șef al

Laboratorului de sinteză organică și biofarmaceutică, Institutul de chimie.

Rezultatele obținute au stat la baza întocmirii documentelor analitice de normare a calității pentru substanța MF-001 și elaborarea modulului de calitate a dosarului farmaceutic pentru înregistrarea compusului cercetat în calitate de substanță medicamentoasă. Totodată, cercetările microbiologice și toxicologice efectuate vor servi la elaborarea dosarului preclinic de înregistrare. Impactul economic derivă din scurtarea perioadei și a costului procedurii de înregistrare a potențialului produs. În aspect social, ținând cont de actualitatea cercetărilor în domeniul tuberculozei – maladie cu prevalență majoră în țara noastră – elaborarea unui nou produs farmaceutic autohton, cu proprietăți antimicobacteriene avantajoase, va impulsiona soluționarea unor probleme legate de asistența cu medicamente a unor pături social-vulnerabile de pacienți.

12. Colaborări cu organizații de cercetare internaționale, proiecte de cercetare/activități comune cu parteneri externi

Unele compartimente din cercetările efectuate în cadrul proiectului au fost efectuate în colaborare cu colegi din cadrul Facultății de Farmacie a UMF ”Carol Davila”, București, România (studii de toxicitate acută pentru substanța MF-001, studii de activitate antibacteriană). Cercetarea stabilității prin metode termice (DSC) a fost realizată în cadrul mobilității de cercetare doctorală, programul CEEPUS ”Teaching and learning Bioanalysis” la Universitatea din Varșovia, Polonia. O parte din analizele prin metoda HPLC au fost efectuate în cadrul mobilității de cercetare doctorală, programul CEEPUS ”Teaching and learning Bioanalysis” la Universitatea Charles din Praga, Cehia.
Partenerii din Belarus au fost încadrați în cercetări paralele asupra compușilor evaluați în cadrul proiectului (studiul proprietăților fizico-chimice, toxicitate acută pentru compusul MF-001+H2SO4; studiul activității antimicobacteriene pe medii de cultură solide).
Membrii echipei de cercetare din Republica Moldova, reprezentați de către specialiști din cadrul Centrului Științific al Medicamentului al USMF ”Nicolae Testemițanu”, Laboratorului Microbiologie şi Morfologia Tuberculozei, Laboratorului de Sinteză Organică și Biofarmaceutice de la Institutul de Chimie, au participat și la alte proiecte internaționale (SUA, Marea Britanie, Germania, România, Ucraina, Rusia), posedă o experiență vastă în cercetare acumulată de-a lungul anilor, care a asigurat o colectare minuțioasă a datelor primare și o interpretare obiectivă a informației obținute în cadrul prezentului proiect.

13. Dificultățile în realizarea proiectului

Pe parcursul realizării proiectului au fost întâlnite dificultăți de aprovizionarea cu reactive și materiale necesare, care s-a efectuat cu întîrziere (majoritatea reactivelor comandate pentru anul curent sunt achiziționate în ultimul trimestru.). În legătură cu aceasta propunem simplificarea procedurii de achiziţionare a reactivelor şi materialelor utilizate în activitatea ştiinţifică.

14. Concluzii

Au fost obținute rezultate științifice corelate întocmai cu scopul și obiectivele stipulate: obținerea unor derivați de propiltiodiazolochinazolin-onă (sarea cu acid sulfuric și complexul cu ciclodextrine); studii microbiologice a activității antimicobacteriene și antimicrobiene; studii de toxicitate acută a substanțelor sintetizate; evaluarea disponibilității farmaceutice a substanțelor și

selectarea compusului optim, elaborarea metodelor de analiză și standardizare. Au fost utilizate metode analitice contemporane și echipament performant, s-au organizat conferințe de lucru și științifică, o vizită la partenerii belarași, fiind asigurată complementaritatea și coordonarea activităților grupurilor de cercetare. În procesul de colaborare interdisciplinară a partenerilor bilaterali s-a consolidat o echipă de cercetare experimentată, cu implicarea cercetătorilor tineri, pregătită pentru antrenarea în diverse competiții internaționale, inclusiv cu realizarea unui proiect de cercetare doctorală. Antrenarea în cercetare a specialiștilor in domeniul sintezei organice, farmaciei, microbiologiei, farmacologiei a permis să fie obținute rezultate complexe, care au fost publicate sub formă de articole în reviste internaționale cu factor de impact și naționale, rezumate, diseminate prin comunicări și postere la diverse foruri științifice. Impactul științific și socio-economic al rezultatelor proiectului se bazează pe obținerea unui potențial produs farmaceutic nou, derivat de propiltiodiazolochinazolin-onă cu proprietăți antimicobacteriene pronunțate, toxicitate joasă, cu perspective reale de utilizare în tratamentul contemporan al tuberculozei.

There were obtained scientific results, which are in exact correlation with the stipulated purpose and objectives: obtaining propylthiodiazolokinazolinone derivatives (salt with sulfuric acid and cyclodextrin complex); microbiological studies of antimicobacterial and antimicrobial activity; acute toxicity studies of synthesized substances; evaluation of the pharmaceutical availability of the substances and selection of the optimal compound; elaboration of analysis and standardization methods. Contemporary analytical methods and high-performance equipment were used, workshops and scientific conferences were organized, a visit to the Belarusian partners, ensuring the complementarity and coordination of the activities of the research groups. In the process of interdisciplinary collaboration of bilateral partners, an experienced research team was consolidated, with the involvement of young researchers, trained for participation in various international competitions, including the realization of a doctoral research project. The involvement of specialists in the field of organic synthesis, pharmacy, microbiology, pharmacology allowed to obtain complex results, which were published in the form of articles in international journals with impact factor and national, abstracts, disseminated through communications and posters to various scientific forums. The scientific and socio-economic impact of the project results is based on obtaining a potential new pharmaceutical product, derived from propylthiodiazolokinazolinone with pronounced antimycobacterial properties, low toxicity, with real prospects for use in the contemporary treatment of tuberculosis.

Conducătorul de proiect V. Val / Vladimir Valica

Data: _____

LS

Semnătura Vladimir Valica

Confirm

Serviciul resurse umane USMF

**Anexa 2A**

**Executarea devizului de cheltuieli, conform anexei nr. 2.3 din contractul de finanțare**

**Cifrul proiectului: 19.80013.80.07.08A/BL**

**2019-2020**

| **Cheltuieli, mii lei** | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Denumirea** | **Cod** | | **Anul de gestiune** | | | |
| | **Eco (k6)** | **Aprobat** | **Modificat +/-** | **Precizat** | **Executat** | **Sold** |
| Remunerarea muncii angajaților conform statelor | 211180 | 74,5 | | 74,5 | 74,5 | |
| Contribuții de asigurări sociale de stat obligatorii | 212100 | 13,4 | | 13,4 | 13,4 | |
| Prime de asigurare obligatorie de asistenta medicală achitate de angajator și angajați pe teritoriul țarii | 212210 | 3,3 | | 3,3 | 3,3 | |
| Energia electrică | 222110 | 1,3 | | 1,3 | 1,3 | |
| Deplasări de serviciu în interiorul țării | 222710 | 18,8 | -18,8 | | | |
| Deplasări în interes de serviciu peste hotare | 222720 | 25,3 | -16,8 | 8,5 | 8,5 | |
| Servicii medicale | 222810 | 46,0 | -6,0 | 40,0 | 40,0 | |
| Servicii de protocol | 222920 | 2,0 | | 2,0 | 2,0 | |
| Servicii de cercetări științifice | 222930 | 75,9 | | 75,9 | 75,9 | |
| Servicii neatribuite altor aliniate | 222990 | 9,8 | | 9,8 | 9,8 | |
| Procurarea mașinilor și utilajeor | 314110 | 9,0 | +35,1 | 44,1 | 44,1 | |
| Procurarea materialelor pentru scopuri didactice, științifice și alte scopuri | 335110 | 15,5 | +6,5 | 22,0 | 22,0 | |
| Procurarea materialelor de uz gospodăresc și rechizitelor de birou | 336110 | 5,2 | | 5,2 | 5,2 | |
| **Total** | | **300,0** | | **300,0** | **300,0** | |

Conducătorul organizației _____ / Emil Ceban

Contabil șef _____ / Becciev Parascovia

Conducătorul de proiect _____ / Vladimir Valica

Data: _____

LȘ

**Anexa 2B**

## Componența echipei proiectului

**Cifrul proiectului 19.80013.80.07.08A/BL**

| Echipa proiectului conform contractului de finanțare (la semnarea contractului) | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Nr** | **Nume, prenume (conform contractului de finanțare)** | **Anul nașterii** | **Titlul științific** | **Norma de muncă conform contractului** | **Data angajării** | **Data eliberării** |
| 1. | Valica Vladimir | 1956 | Dr. hab. farm., profesor univ. | 0,12 | 10.06.2019 | 31.12.2020 |
| 2. | Uncu Livia | 1966 | Dr. farm., conf. univ. | 0,12 | 10.06.2019 | 31.12.2020 |
| 3. | Macaev Fliur | 1959 | Dr. hab. chimie, prof. cerc. | 0,11 | 10.06.2019 | 31.12.2020 |
| 4. | Crudu Valeriu | 1957 | Dr. șt .med. | 0,11 | 10.06.2019 | 31.12.2020 |
| 5. | Parii Sergiu | 1974 | Dr. șt.med., conf.cerc. | 0,11 | 10.06.2019 | 31.12.2020 |
| 6. | Vâslouh Oxana | 1974 | f/g, cerc. șt. | 0,07 | 10.06.2019 | 31.12.2020 |
| 7. | Uncu Andrei | 1990 | f/g, doctorand | 0,08 | 10.06.2019 | 31.12.2020 |
| 8. | Mazur Ecaterina | 1986 | f/g, doctorand | 0,07 | 10.06.2019 | 31.12.2020 |
| 9. | Nicolai Eugeniu | 1984 | f/g, doctorand | 0,07 | 10.06.2019 | 31.12.2020 |
| 10. | Țiganesco Marina | 1985 | economist | 0,16 | 10.06.2019 | 31.12.2020 |

| | |
|---|---|
| Ponderea tinerilor (%) din numărul total al executorilor **conform contractului de finanțare** | **40%** |

| Modificări în componența echipei pe parcursul anului 2020 | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| **Nr** | **Nume, prenume** | **Anul nașterii** | **Titlul științific** | **Norma de muncă conform contractului** | **Data angajării** |
| 1. | - | | | | |

| | |
|---|---|
| Ponderea tinerilor (%) din numărul total al executorilor **la data raportării** | |

Conducătorul organizației _____ / Emil Ceban

Contabil șef _____ / Becciev Parascovia

Conducătorul de proiect _____ / Vladimir Valica

Data: 15.01.2021

LȘ