

UNIVERSITATEA TEHNICĂ „GHEORGHE ASACHI” din IAȘI
RECTORATUL

Către.....

Vă facem cunoscut că în ziua de 14 ianuarie 2011, la ora 11⁰⁰ în sala de Consiliu a Facultății de Inginerie Chimică și Protecția Mediului, va avea loc susținerea publică a tezei de doctorat intitulată:

„MICRO ȘI NANOPARTICULE CU POTENȚIALE APLICAȚII BIOMEDICALE”

elaborată de doamna biong. **Anca Niculina JĂTARIU**, în vederea conferirii titlului științific de doctor.

Comisia de doctorat este alcătuită din:

1. Prof.dr.ing. Dan CASCAVAL, decan al Facultății de Inginerie Chimică și Protecția Mediului, Universitatea Tehnică „Gheorghe Asachi” din Iași - președinte
2. Prof.dr.ing. Marcel POPA, Universitatea Tehnică „Gheorghe Asachi” din Iași - conducător științific
3. Prof.dr. Jacques DESBRIERES, Université de Pau des Pays de l'Adour, Franța - membru
4. Prof.dr. Patrick MARTIN, Université d'Artois, IUT de Béthune, Franța - membru
5. Prof.dr. Constantin UGLEA, Universitatea de Medicină și Farmacie „Gr.T.Popa” din Iași - membru

Vă trimitem rezumatul tezei de doctorat cu rugămintea de a ne comunica, în scris, aprecierile dumneavoastră.

Cu această ocazie vă invităm să participați la susținerea publică a tezei de doctorat.

RECTOR,
Prof. univ. dr. ing. **ION GIURMA**



Secretar universitate,
Ing. **Cristina Nagiț**

Sincere mulțumiri și recunoștință pentru sprijinul acordat în realizarea acestei lucrări:

- ***Domnului Prof. Dr. Ing. Marcel Popa, conducător științific***
 - ***Doamnei Conf. Dr. Ing. Liliana Vereștiuc***
 - ***Doamnei Dr. Bioing. Cătălina Peptu***
 - ***Soțului meu, familiei mele, colegilor și prietenilor mei***
 - ***Tuturor celor cu care am colaborat și care m-au ajutat***
-

Cuprins

Introducere	3
--------------------	----------

STUDIU BIBLIOGRAFIC

Capitolul I. Micro și nanoparticule lipidice – lipozomi

I.1. Introducere	7
I.2. Aspecte generale	8
I.2.1. Moleculele amfifile	9
I.2.2. Clasificarea și caracteristicile lipozomilor	9
I. 3. Metode de obținere a lipozomilor	11
I.3.1. Metode de preparare a MLV-urilor și SUV-urilor	11
I.3.2. Metode de omogenizare	12
I.3.3. Metode de obținere a lipozomilor cu ajutorul solvenților organici	14
I.4. Stabilizarea lipozomilor	16
I.5. Aplicații medicale ale lipozomilor	18
I.5.1. Aplicații biomedicale ale lipozomilor convenționali	19
I.5.2. Aplicații ale lipozomilor cu circulație prelungită	21
I.5.3. Aplicații ale lipozomilor cu țintire specifică	22
I.5.4. Aplicații ale lipozomilor sensibili la stimuli externi	23

Capitolul II. Sisteme polimere particulate cu aplicații în eliberarea controlată de principii active

II.1. Introducere	25
II.2. Aspecte generale	25
II.2.1. Clasificarea sistemelor particulate	27
II.2.2. Metode de obținere a micro și nanoparticulelor	28
II.3. Metode de caracterizare	30
II.3.1. Caracterizarea structurală	30
II.3.1.1. Difrakția cu Raze X (XRD)	30
II.3.1.2. Spectroscopia IR	32
II.3.1.3. Spectroscopia RAMAN	34
II.3.1.4. Rezonanța electromagnetică nucleară (RMN)	35
II.3.2. Caracterizarea morfologică și dimensională	36
II.3.2.1. Microscopia electronică de baleiaj (SEM)	37
II.3.2.2. Microscopia electronică de transmisie (TEM)	39
II.3.2.3. Spectroscopia de corelație fonică	40
II.3.2.4. Difractometria LASER	42
II.4. Aplicații medicale ale micro și nanoparticulelor polimere	42

II.4.1. Avantajele principale ale utilizării acestui tip de sistem pentru eliberarea controlată de medicamente	43
II.4.2. Aplicații în ingineria tisulară	44
II.4.3. Aplicații oftalmologice	46
II.4.4. Aplicații în imunologie	47
II.4.5. Aplicații în terapia antitumorală	49

REZULTATE ORIGINALE

Capitolul III. Sisteme complexe de tipul polimer-lipozomi-principiu activ

III.1. Hidrogeluri dublu reticulate pe bază de chitosan și gelatină utilizate pentru imobilizarea lipozomilor	53
III.1.1. Obținerea și caracterizarea hidrogelurilor pe bază de gelatină și chitosan dublu reticulate	53
III.1.1.1. Hidrogeluri pe bază de gelatină și chitosan reticulate cu aldehydă glutarică și sulfat de sodiu	54
III.1.1.1.1. Materiale utilizate	55
III.1.1.1.2. Metoda de preparare a hidrogelurilor	56
III.1.1.1.3. Caracterizarea hidrogelurilor	58
III.1.1.1.4. Rezultate și discuții	64
III.1.1.1.5. Concluzii	74
III.1.1.2. Hidrogeluri pe bază de gelatină și chitosan reticulate cu aldehydă glutarică și TPP	75
III.1.1.2.1. Obținerea și caracterizarea hidrogelurilor	76
III.1.1.2.2. Modelarea	77
III.1.1.2.3. Rezultate și discuții	79
III.1.1.2.4. Concluzii	90
III.1.2. Imobilizarea lipozomilor în hidrogeluri pe bază de chitosan și gelatină	91
III.1.2.1. Materiale utilizate	91
III.1.2.2.1. Prepararea lipozomilor	94
III.1.2.2.2. Prepararea sistemelor complexe de tipul polimer-lipozomi-principiu activ	97
III.1.2.3. Caracterizarea lipozomilor și a sistemelor polimer-lipozomi	97
III.1.2.4. Rezultate și discuții	102
III.1.2.5. Concluzii	109
III.2. Hidrogeluri dublu reticulate pe bază de chitosan și PAV utilizate pentru imobilizarea lipozomilor	109
III.2.1. Hidrogeluri pe bază de PAV și chitosan reticulate cu aldehydă glutarică și sulfat de sodiu/TPP	110
III.2.1.1. Materiale utilizate	110
III.2.1.2. Metoda de preparare a hidrogelurilor	112

III.2.1.3. Caracterizarea hidrogelurilor	113
III.2.1.4. Rezultate și discuții	116
III.2.1.5. Concluzii	122
III.2.2. Imobilizarea lipozomilor în hidrogeluri pe bază de chitosan și PAV	123
III.2.2.1. Materiale utilizate	123
III.2.2.2.1. Prepararea lipozomilor	123
III.2.2.2.2. Prepararea sistemelor complexe de tipul polimer-lipozomi-principiu activ	123
III.2.2.3. Caracterizarea lipozomilor și a sistemelor polimer-lipozomi	124
III.2.2.4. Rezultate și discuții	124
III.2.2.5. Concluzii	129
Capitolul IV. Sisteme particulare pe bază de polimeri naturali și sintetici	
IV.1. Sisteme polimer-principiu activ sub formă de micro și nanoparticule pe bază de chitosan și gelatină	130
IV.1.1. Materiale utilizate	133
IV.1.2. Metoda de obținere	135
IV.1.3. Caracterizarea particulelor obținute	137
IV.1.4. Rezultate și discuții	142
IV.1.5. Concluzii	156
IV.2. Sisteme micro și nanoparticulate pe bază de chitosan și poli(alcool vinilic)	157
IV.2.1. Materiale utilizate	158
IV.2.2. Metoda de obținere a microparticulelor	159
IV.2.3. Caracterizarea particulelor obținute	161
IV.2.4. Rezultate și discuții	162
IV.2.5. Concluzii	175
Concluzii generale	177
Referințe bibliografice	181

Introducere

Scopul tuturor sistemelor de eliberare controlată este ca medicamentul să ajungă intact la zona țintită, într-un mediu care să poată controla administrarea principiului activ pe căi de declanșare chimice sau fiziologice. Pentru a realiza acest scop, cercetătorii își îndreaptă atenția spre lumea micro și nanotehnologiei. În ultimul deceniu, micro și nanosferele, micellele polimerice, materialele de tip hidrogel, nanocapsulele s-au arătat a avea efect în îmbunătățirea țintirii specifice a medicamentelor, scăderea toxicității sistemice a acestora, îmbunătățirea ratei tratamentului și protecția substanțelor active împotriva degradării biochimice.

Prezentul studiu a avut drept scop realizarea de noi biomateriale pe bază de polimeri naturali și sintetici, care să răspundă cerințelor eliberării controlate de principii biologice active. S-a propus obținerea de sisteme micro și nanoparticulate, dată fiind posibilitatea administrării acestora în organism pe diverse căi: orală, parenterală, intraperitoneală, respiratorie, transdermală.

O categorie aparte de microparticule capabile de a include cantități mari de principii active, atât hidrofile cât și hidrofobe, o constituie lipozomii. Aplicațiile acestora ca sisteme de eliberare controlată este însă limitată de stabilitatea lor redusă în medii fiziologice. Originalitatea tezei constă în conferirea unei stabilități ridicate lipozomilor prin includerea lor în matrici polimerice de tip hidrogel. Matricea polimeră protejează pe de o parte lipozomii și constituie și o barieră suplimentară pentru principiile active incluse în acestea modelând astfel cinetica de eliberare.

Pentru îndeplinirea acestui scop, cercetările au fost desfășurate pe următoarele direcții:

- Obținerea de noi hidrogeluri printr-o metodă originală și caracterizarea acestora din punct de vedere al structurii, stabilității mecanice, capacității de umflare în medii apoase și capacității de încărcare/eliberare a principiilor active;

- Obținerea de lipozomi și includerea acestora în matrici polimerice urmărind capacitatea sistemelor astfel formate de a elibera principiul activ inclus în lipozomi; pe baza rezultatelor obținute s-a propus și un mecanism de eliberare a principiului activ din astfel de sisteme;

- Obținerea de micro și nanoparticule polimerice cu caracter de hidrogel și caracterizarea acestora din mai multe puncte de vedere (structural, morfologic, umflare în mediu apos, încărcare/eliberare de principii active) în perspectiva utilizării lor ca matrici pentru includerea de lipozomi, aspect care face subiectul unei cercetări viitoare.

Lucrarea este structurată în patru capitole, și anume:

Studiu bibliografic

Capitolul I. Micro și nanoparticule lipidice – lipozomi

Acest capitol reprezintă un studiu privind caracteristicile lipozomilor, metodele specifice de preparare și aplicațiile biomedicale ale acestora.

Capitolul II. Sisteme polimerice particulate cu aplicații în eliberarea controlată de principii active

În acest capitol sunt prezentate succint noțiunile teoretice cu privire la caracteristicile sistemelor particulate polimerice, metodele de preparare, o parte din metodele de caracterizare precum și aplicațiile biomedicale ale acestora.

Rezultate originale

Capitolul III. Sisteme complexe de tipul polimer-lipozomi-principiu activ

Rezultatele originale din acest capitol conțin cercetări privind posibilitatea imobilizării lipozomilor de tip MLV în matrici polimere pe bază de gelatină/chitosan și chitosan/poli(alcool vinilic) dublu reticulate (covalent și ionic). A fost realizat un studiu complex privind atât influența parametrilor reacției de reticulare cât și a compoziției MLV-urilor asupra parametrului de integritate lipozomală. Un obiectiv al acestui studiu a fost elucidarea mecanismului de eliberare a unui principiu activ hidrofил inclus în lipozomii imobilizați în matricile polimere.

Capitolul IV. Sisteme particulate pe bază de polimeri naturali și sintetici

Acest capitol conține rezultatele originale obținute din prepararea unor sisteme particulate pe bază de gelatină/chitosan și chitosan/poli(alcool vinilic). Micro și nanoparticulele au fost preparate prin dublă reticulare (ionică și covalentă) în emulsie inversă și au fost caracterizate atât din punct de vedere structural și morfologic, cât și din cel al interacțiunii cu soluțiile apoase cu pH diferit (acid și bazic) și cu soluții de medicamente. Pentru sistemele particulate pe bază de gelatină și chitosan au fost efectuate teste *in vivo* de biodistribuție pentru determinarea potențialelor aplicații medicale.

Lucrarea se încheie cu **Concluzii Generale și Referințe bibliografice**.

Teza de doctorat intitulată “**Micro și nanoparticule cu potențiale aplicații biomedicale**” cuprinde circa **192** pagini, conține **128** figuri, **14** ecuații sau formule matematice, **27** tabele, **2** scheme și **215** referințe bibliografice, majoritatea de actualitate.

Rezultatele originale obținute au constituit subiectul a **5** lucrări științifice publicate în reviste (**2** în țară și **3** în străinătate) și a **8** comunicări și postere la manifestări naționale (**2**) și internaționale (**6**).

În continuare vor fi prezentate, într-o formă succintă, o parte dintre acestea, păstrându-se numerotarea din teză a capitolelor, figurilor, tabelelor, schemelor, precum și a bibliografiei.

Capitolul III. Sisteme complexe de tipul polimer-lipozomi-principiu activ

III.1. Hidrogeluri dublu reticulate pe bază de chitosan și gelatină utilizate pentru imobilizarea lipozomilor

În ultimii ani, sistemele polizaharide-proteine au prezentat un interes crescut din punct de vedere al aplicațiilor biomedicale [112-116]. Obținerea unor hidrogeluri pe bază de gelatină și chitosan cu proprietăți mecanice bune și cu caracteristici specifice de umflare pentru aplicații medicale a constituit o adevărată provocare.

În acest subcapitol va fi descrisă obținerea și caracterizarea unor hidrogeluri dublu reticulate pe bază de gelatină și chitosan utilizate pentru imobilizarea lipozomilor.

III.1.1. Obținerea și caracterizarea hidrogelurilor dublu reticulate pe bază de gelatină și chitosan

Hidrogelurile pe bază de G și CS obținute fără agenți de reticulare prezintă slabe proprietăți mecanice [117]. Este deja cunoscut faptul că agenți de reticulare precum formaldehida [118] și glutaraldehida [119] prezintă grade de toxicitate mai mari decât diferiți agenți de reticulare ionici precum sulfatul de sodiu, sulfatul de magneziu sau tripolifosfatul de sodiu. Pe de altă parte, hidrogelurile reticulate covalent prezintă proprietăți mecanice superioare celor reticulate ionic, însă proprietățile de umflare și capacitățile de încărcare/eliberare sunt inferioare [120]. O metodă originală de preparare a unor hidrogeluri dublu reticulate (reticulare covalentă urmată de ionică) a fost utilizată pentru a reduce cantitatea de agent de reticulare covalent (toxic) păstrând însă stabilitatea mecanică a hidrogelurilor obținute.

Hidrogeluri pe bază de G și CS dublu reticulate cu aldehydă glutarică/sulfat de sodiu și aldehydă glutarică/tripolifosfat de sodiu au fost studiate din punct de vedere al morfologiei, gradului de umflare, capacității de încărcare/eliberare a unor principii active model și caracteristicilor mecanice.

III.1.1.1. Hidrogeluri pe bază de gelatină și chitosan reticulate cu aldehydă glutarică și sulfat de sodiu

Obținerea hidrogelurilor pe bază de G și CS prin dublă reticulare (covalentă și ionică) are loc datorită reacției dintre grupările carbonil ale glutaraldehidei și grupările aminice libere ale celor doi polimeri, precum și a interacțiunilor dintre anionii sulfat și grupările aminice protonate ale polimerilor solubilizați în acid acetic.

III.1.1.1.2. Metoda de preparare a hidrogelurilor

Hidrogelurile pe bază de G și CS (GCS) au fost preparate printr-o reticulare covalentă parțială cu AG urmată de o reticulare ionică cu Na_2SO_4 , utilizând un plan experimental centrat, rotitor, compus, de ordinul II cu trei variabile (Tabelul III.2). Pentru obținerea hidrogelurilor s-a urmărit planul experimental prezentat în Tabelul III.3.

Tabelul III.2. Variabilele planului experimental în termeni reali și codați

Variabile		Cod				
Real	Codat	-1,682	-1	0	1	1,682
Raportul dintre polimeri G/CS (g/g)	X_1	0,11	1,92	4,56	7,2	9
Cantitatea de agent de reticulare ionic (1 mol Na_2SO_4 / 2 moli NH_2 liberă)	X_2	0,3	0,361	0,45	0,539	0,6
Timpul de reticulare ionică (minute)	X_3	60	97	150	204	240

S-au obținut 20 de probe (6 dintre ele au fost preparate în condiții identice pentru a evalua reproductibilitatea planului experimental) după cum urmează: 0,5 g polimer (în diferite rapoarte G/CS) au fost dizolvate în 25 mL soluție acid acetic 2% (v/v).

Cantitatea specifică de AG necesară pentru a reticula 20% dintre grupările aminice libere a fost adăugată peste soluția de polimeri, în picături, sub agitare energetică. Grupările aminice libere ale gelatinei au fost calculate ținând cont de compoziția aproximativă a aminoacizilor diamino monocarboxilici din gelatina de tip B [124]. Cantitatea minimă optimă de AG pentru ca filmele să fie stabile a fost fixată în urma unor teste preliminare. Amestecul obținut a fost transferat cu grijă în Petri-uri cu diametrul de 90 mm, ultrasonicat pentru a se îndepărta aerul și a evita astfel formarea de goluri, și apoi introduse în etuvă timp de 1 oră, la o temperatură de 50°C. Hidrogelurile reticulate covalent au fost imersate în soluții apoase de Na_2SO_4 de concentrații diferite (Tabelul III.3.) și menținute acolo intervale de timp precise pentru definitivarea reticulării ionice. Ulterior, probele au fost spălate succesiv cu acetonă și apă bidistilată pentru a elimina produșii nereacționați; hidrogelurile au fost uscate parțial și păstrate la o temperatură de 5°C.

Tabelul III.3. Planul experimental ce utilizează variabilele în termeni codați

Codul probei	X ₁	X ₂	X ₃
GCS-1	-1	-1	-1
GCS-2	1	-1	-1
GCS-3	-1	1	-1
GCS-4	1	1	-1
GCS-5	-1	-1	1
GCS-6	1	-1	1
GCS-7	-1	1	1
GCS-8	1	1	1
GCS-9	-1,682	0	0
GCS-10	1,682	0	0
GCS-11	0	-1,682	0
GCS-12	0	1,682	0
GCS-13	0	0	-1,682
GCS-14	0	0	1,682
GCS-15	0	0	0
GCS-16	0	0	0
GCS-17	0	0	0
GCS-18	0	0	0
GCS-19	0	0	0
GCS-20	0	0	0

III.1.1.1.4. Rezultate și discuții

Reticularea covalentă a celor doi polimeri cu AG are loc predominant la grupările aminice libere cu formarea de legături de tip imină, datorită reactivității crescute a acestor grupări față de grupările hidroxil, reacția fiind favorizată și de mediul acid. Reticularea ionică are loc prin intermediul ionilor sulfat din sulfatul de sodiu și a grupărilor aminice aflate sub forma ionului amoniu [125].

Caracteristici structurale

Structura chimică a hidrogelurilor GCS obținute a fost analizată cu ajutorul spectroscopiei FTIR.

Chitosanul prezintă ca benzi caracteristice: 3417 cm^{-1} specifică grupelor -OH, 1635 cm^{-1} specifică grupării -C=O, aceasta fiind dovada faptului că chitosanul este un produs parțial deacetilat și 1114 cm^{-1} bandă specifică structurii polizaharidice, la 1539 cm^{-1} este banda caracteristică grupelor -NH₂ libere.

Gelatina prezintă ca benzi caracteristice: 1641 cm^{-1} specifică benzii amidice I, 1521 cm^{-1} specifică benzii amidice II și grupelor aminice libere.

Gruparea iminică formată în urma reticulării covalente absoarbe într-o zonă în care mai absorb și alte grupări funcționale și de aceea a fost necesară o deconvoluție spectrală între 1500-1800 cm^{-1} . Banda de absorbție specifică pentru legătura iminică a fost găsită la 1668 cm^{-1} [126].

Reticularea ionică a fost confirmată de prezența peak-ului de absorbție specific pentru $-\text{SO}_4^{-2}$ ($\sim 619\text{cm}^{-1}$) [127].

Caracteristici morfologice

Structura hidrogelurilor a fost pusă în evidență cu ajutorul microscopiei electronice de baleiaj (Figura III.15.).

În secțiune (Figura III.15.A.), hidrogelurile prezintă o structură fibrilară, probabil, datorită macromoleculelor de chitosan care sunt predominante în compoziția probei analizate; suprafața hidrogelului (Figura III.15.B.) prezintă o structură omogenă și poroasă, porii fiind formați de spațiile dintre fibrilele din structura hidrogelului.

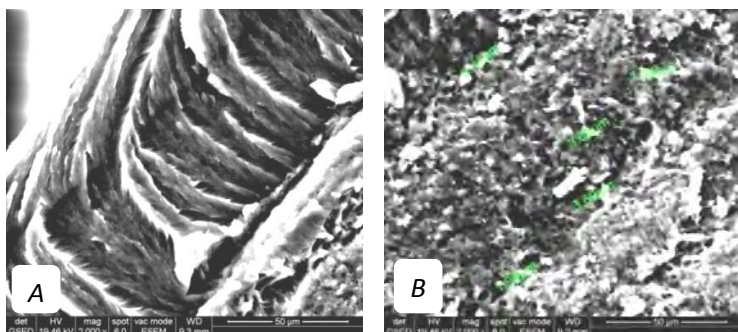


Figura II.15. Micrografii electronice pentru proba GCS-1:
A – secțiunea transversală a hidrogelului și
B – suprafața hidrogelului

Gradul maxim de umflare

Variațiile gradului maxim de umflare în soluție tampon fosfat sunt expuse în Figura III.16. ca reprezentarea grafică a suprafețelor de răspuns pentru a putea determina setările optime ale parametrilor experimentali.

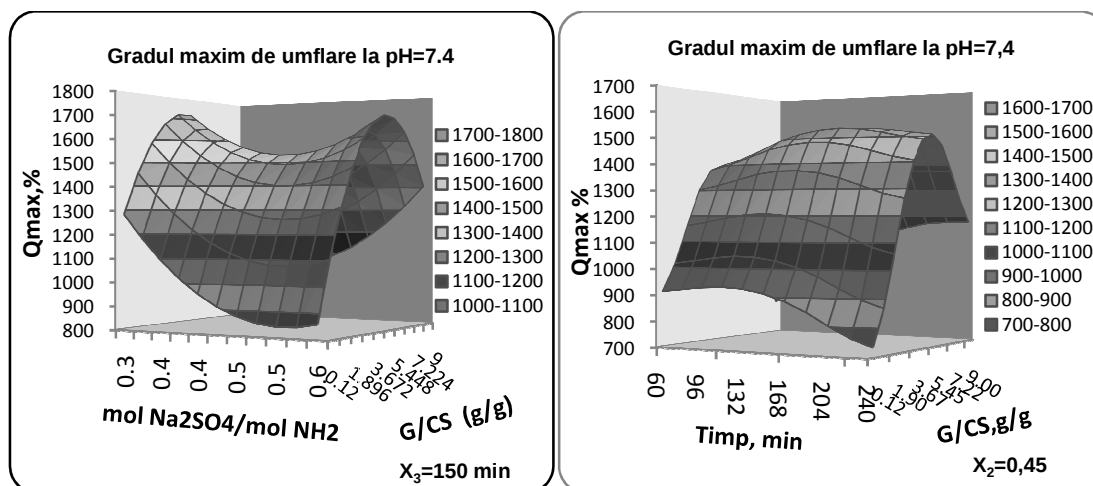


Figura III.16. Gradul maxim de umflare la pH=7,4 pentru hidrogelurile GCS:

A – suprafața de răspuns Q_{max} estimată, $Q_{max}=f(X_1, X_2)$ când $X_3=150$ și

B - suprafața de răspuns Q_{max} estimată, $Q_{max}=f(X_1, X_3)$ când $X_2=0.45$

Variația gradului maxim de umflare în funcție de parametrii variabili au condus la câteva concluzii interesante:

➤ $Q_{\max}$ variază în general între 850 și 1700% în funcție de raportul inițial dintre cei doi polimeri (G/CS);

➤ $Q_{\max}$ crește când raportul $G/CS < 4$, pentru orice cantitate de agent de reticulare ionică (Figura II.16.A.). Acest lucru poate fi atribuit hidrofiliei crescute a gelatinei care va influența capacitatea maximă de umflare a hidrogelurilor. Pe de altă parte, CS are câte o grupare aminică la fiecare unitate structurală și G are de obicei mai puține grupări aminice – numărul grupărilor aminice vor determina densitatea rețelei finale, astfel se explică gradele mari de umflare în cazul probelor ce conțin mai multă G; o comportare neașteptată a fost observată pentru un raport $G/CS > 4$ când s-a înregistrat o tendință de scădere a $Q_{\max}$;

➤ O cantitate crescută de CS în amestecul inițial și o cantitate crescută de Na_2SO_4 conduce la $Q_{\max}$ scăzute datorită densității crescute de reticulare (Figura II.16.A.);

➤ În funcție de timpul de reticulare ionică, pentru diferite rapoarte G/CS, s-au înregistrat comportamente diferite ale $Q_{\max}$: o cantitate crescută de CS în amestecul inițial și un timp de reticulare crescut are ca rezultat un $Q_{\max}$ scăzut iar o cantitate inițială crescută de G conduce la o creștere a $Q_{\max}$ din aceleași motive explicate mai sus.

Capacitatea de încărcare/eliberare utilizând un medicament model

Eficiența de eliberare a cafeinei a fost cuprinsă între 92.6% and 96.9% ceea ce indică faptul că aproape toată cantitatea de cafeină încărcată a fost eliberată.

Cantitatea maximă de cafeină eliberată (dupa 24 h) de hidrogelurile GCS în soluție tampon fosfat cu pH=7,4 este reprezentată în Figura III.18. Eliberarea cafeinei are, în general, aceeași comportare întâlnită și la $Q_{\max}$ ceea ce confirmă caracterul difuzional al eliberării medicamentului hidrofili din acest material nou. Este de asemenea confirmată și influența densității rețelei polimerice asupra capacității de încărcare/eliberare a medicamentelor.

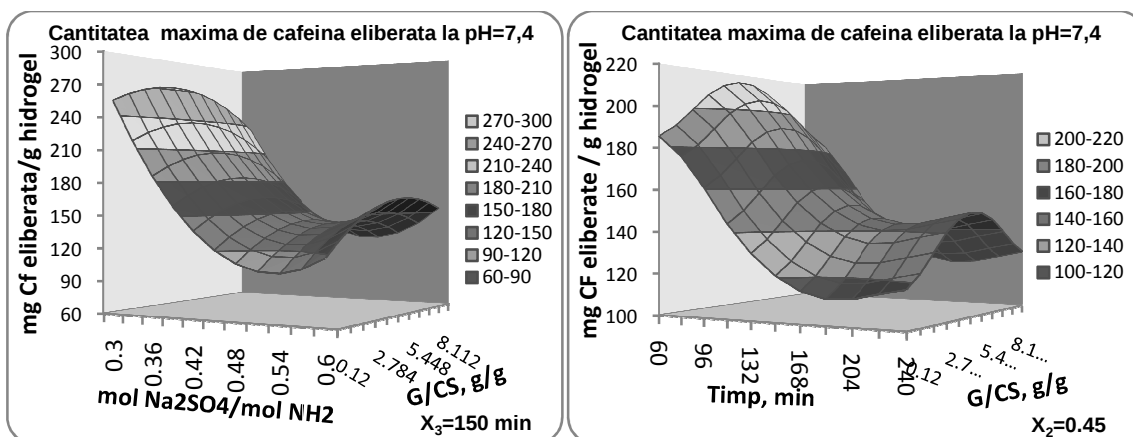


Figura III.18. Cantitatea maximă de cafeină eliberată pentru hidrogelurile GCS:

A – suprafața de răspuns C_f eliberată estimată, $C_f = f(X_1, X_2)$ când $X_3 = 150$

B - suprafața de răspuns C_f eliberată estimată, $C_f = f(X_1, X_3)$ când $X_2 = 0.45$

Cinetica de eliberare a cafeinei indică faptul că majoritatea probelor ating cantitatea maximă de cafeină eliberată după două ore în soluție tampon fosfat iar curbele cinetice sunt tipice pentru sistemele de eliberare controlată prin difuzie.

Studii de reologie

Caracteristicile vâscoelastice ale materialelor pot fi eficient evaluate cu ajutorul testelor oscilatorii reprezentate prin următoarele mărimi:

a) Modulul de acumulari (G') care este o măsură a *energiei de deformare acumulată* în probă în cursul procesului de forfecare. După îndepărtarea solicitării această energie este disponibilă, acționând ca forță motoare a procesului de reformare. Deci G' caracterizează comportarea elastică a materialului analizat.

b) Modulul de pierderi (G'') este o măsură a energiei de deformare utilizată de probă în cursul procesului de forfecare și, de aceea, este complet pierdută la îndepărtarea solicitării. G'' caracterizează comportarea vâscoasă a materialului [128, 129].

c) Factorul de pierderi, $\tan(\delta) = G''/G'$ caracterizează contribuțiile porțiunilor elastice și vâscoase în comportarea globală a probei analizate. În general, pentru starea lichidă $\tan(\delta) > 1$ ($G'' > G'$), pentru starea de gel (solidă) $\tan(\delta) < 1$ ($G' > G''$), iar la punctul de tranziție (gelifiere) $\tan(\delta) = 1$ ($G' = G''$) [128].

d) Vâscozitatea complexă, η^*

În cazul acestor teste sunt valabile următoarele relații :

$$|G^*| = \sqrt{(G')^2 + (G'')^2} \quad \text{și} \quad |\eta^*| = \sqrt{(\eta')^2 + (\eta'')^2}$$

Testele reologice în regim oscilatoriu oferă posibilitatea măsurărilor nedestructive. Astfel, au fost efectuate trei tipuri de teste în regim dinamic:

Testul de baleiaj de amplitudine (AS), la o frecvență unghiulară constantă de $10 \text{ rad}\cdot\text{s}^{-1}$, a fost utilizat pentru determinarea limitei domeniului de vâscoelasticitate liniară (LVE) și pentru determinarea stabilității mecanice a probei. Figura III.20. prezintă variația G' and G'' pentru două hidrogeluri (GCS-1 și GCS-3) cu cantități diferite de agent de reticulare ionic (vezi Tabelul III.2. și Tabelul III.3.). Amplitudinea a variat între 0,01 și 100%. Din testele de baleiaj de amplitudine au fost selectate valorile deformăției și a tensiunii aplicate. Toate testele au fost efectuate la o temperatură de 37°C (temperatura corpului uman). De obicei, testele de baleiaj de amplitudine sunt folosite doar pentru a determina limitele domeniului de vâscoelasticitate liniară (LVR), însă uneori acestea pot aduce informații cu privire la stabilitatea structurală și mecanică a probelor analizate, în acest caz a hidrogelurilor GCS. Limitele domeniului de vâscoelasticitate liniară oferă indicii cu privire la capacitatea gelului de a rezista la sinereză (la suprafața gelului se formează un strat lichid).

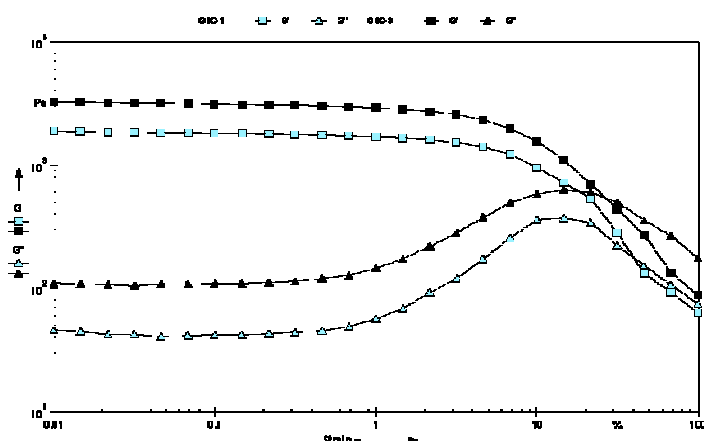


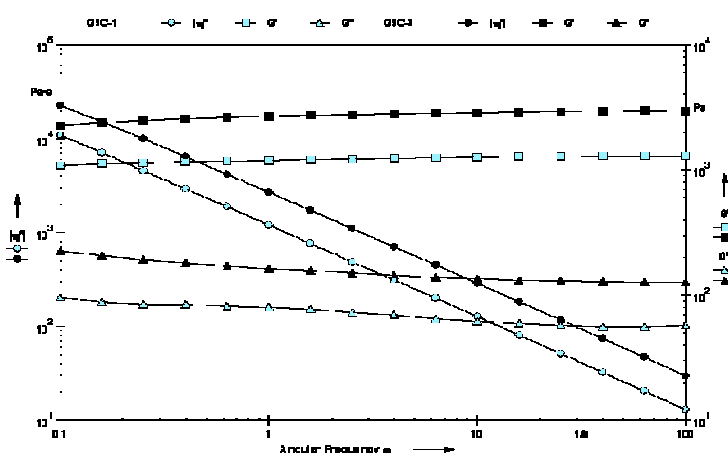
Figura III.20. Baleiajul de amplitudine pentru probele GSC-1 și GSC-3

Creșterea cantității de agent de reticulare ionic generează valori crescute ale G' și G'' și în consecință mărește limitele LVR, sugerând structuri mai stabile. Pentru a verifica

această observație s-au folosit frecvențe diferite pentru testele de baleiaj de amplitudine. Chiar dacă o creștere a frecvenței reduce puțin limitele LVR, influența generală a cantității de agent de reticulare asupra stabilității mecanice se păstrează. Raportul G/CS are și el influență asupra limitelor LVR; creșterea raportului G/CS reduce limitele LVR. Pentru o creștere a acestui raport de la valoarea minimă la cea maximă (GCS-9 și GCS-10) se înregistrează o scădere semnificativă a LVR (de la 5,0 la 0,1%).

Baleiajul de frecvență, adesea folosit ca test standard în reologia polimerilor, oferă informații utile legate de structura internă și masa moleculară a polimerului. În cazul acestor teste se aplică o tensiune sinusoidală cu o amplitudine constantă (caracteristică pentru fiecare probă, între limitele LVR) și se variază frecvența oscilatorie (între 10^{-2} și 10^2 s^{-1}).

Figura III.21. Baleiajul de frecvență pentru probele GCS-1 și GCS-3



În Figura III. 21. sunt prezentate comportările G' , G'' și ale vâscozității complexe ($|\eta^*|$) funcție de frecvență pentru aceleași două probe. Curbele sunt caracteristice pentru materialele solide, cu $G' > G''$ pe un domeniu larg de frecvențe. Au fost observate structuri stabile de gel pentru toate probele analizate, G' și G'' fiind aproape independente de frecvență pe mai bine de trei decade [129]. Valorile modulului de acumulari și diferențele dintre G' and G'' indică faptul că rețeaua hidrogelului este stabilă și prezintă o elasticitate ridicată [129]. Gradul crescut de elasticitate a hidrogelurilor este, de asemenea, evidențiat prin valorile scăzute ale $\tan \delta$, în jur de 0,1 pentru toate probele analizate.

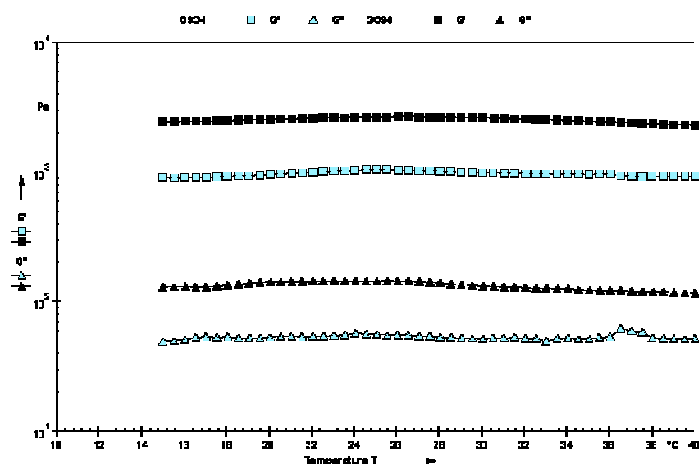


Figura III.22. Baleiajul de temperatură pentru probele GCS-1 și GCS-3

Atunci când crește cantitatea de agent de reticulare ionic (probele GCS-1 și GCS-3) se observă o creștere a G' ceea ce poate indica o creștere a densității rețelei hidrogelului (observația este valabilă și pentru probele GCS-6 și GCS-8 sau probele GCS-11 și GCS-12).

Testele de baleiaj de temperatură au început după ce proba a fost adusă la o temperatură de echilibru de 10°C . Probele au fost apoi încălzite de la 10°C la 40°C cu $0,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ la o frecvență unghiulară de 1 s^{-1} și o tensiune constantă în limitele LVR (între 0,1 and 5,0 % pentru toate probele).

Baleiajul de temperatura (Figura III.22.) indică faptul că hidrogelurile GCS sunt stabile pe domeniul de temperatură ales pentru analiză ($10\text{-}40^{\circ}\text{C}$).

Pe curba G'' apare în jurul temperaturii de 37°C un peak care poate indica o reorganizare a rețelei, însă acest fenomen va trebui analizat în viitor mai în profunzime.

III.1.1.2. Hidrogeluri pe bază de gelatină și chitosan reticulate cu aldehydă glutarică și TPP

Obiectivul acestui studiu a fost obținerea și caracterizarea unor hidrogeluri pe bază de gelatină și chitosan dublu reticulate cu glutaraldehidă și TPP utilizând un plan experimental centrat rotitor de ordinul II cu trei variabile (Tabelul III.2. cu două modificări: raportul între polimeri este acum CS/G față de G/CS utilizat în cazul hidrogelurilor reticulate cu AG/ Na_2SO_4 , iar agentul de reticulare ionică este TPP-ul) [141]. Prepararea hidrogelurilor a urmărit planul experimental prezentat în Tabelul III.3. (agentul de reticulare ionică este TPP-ul iar codul probelor este înlocuit – GCS devine CSG). Caracterizarea acestora a constat în evaluarea morfologiei, caracteristicilor de umflare și încărcare/eliberare a unor medicamente hidrofile. În același timp s-a încercat utilizarea rețelelor neuronale pentru optimizarea principalelor caracteristici ale hidrogelurilor (gradul de umflare în soluție tampon citrat (CBS), gradul de umflare în soluție tampon fosfat (PBS), cantitatea maximă de cafeină eliberată în CBS și cantitatea maximă de cafeină eliberată în PBS) în funcție de parametrii reacției (raportul CS/G, cantitatea de agent de reticulare ionică, timpul de reticulare ionică). Modelările directe și inverse utilizând rețele neuronale permit evaluarea procesului în ambele direcții: se pot efectua predicții pentru valorile caracteristicilor finale ale hidrogelurilor și se pot identifica condițiile inițiale optime care vor conduce la valori finale impuse. S-a propus și utilizat o metodă generală de modelare, cu posibilitatea de a fi aplicată și altor sisteme complexe dublu reticulate.

III.1.1.2.4. Rezultate și discuții

Caracteristici structurale

Spectrele FTIR pentru cei doi polimeri de plecare și pentru hidrogelurile preparate au evidențiat faptul că cele două tipuri de reticulări au avut loc.

Morfologia hidrogelurilor CSG

Cu ajutorul microscopiei electronice de baleiaj s-a putut observa morfologia compactă a hidrogelurilor (Figura III.26.), fără pori evidenți. Această morfologie poate fi atribuită densității crescute de reticulare având în vedere numărul mare de grupări aminice și reactivitatea agentului de reticulare ionică față de aceste grupări, respectiv funcționalitatea sa ridicată.

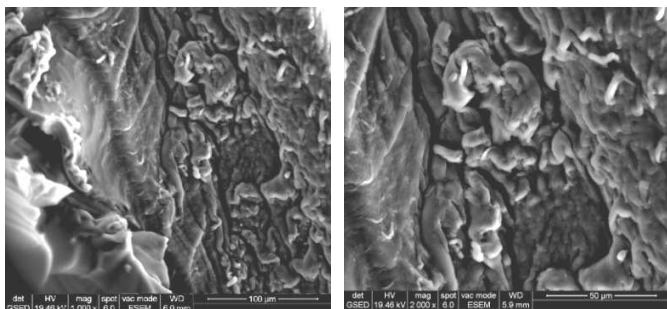


Figura III.26. Microscopie electronică de baleiaj pentru proba CSG-2

Gradul maxim de umflare

Gradele de umflare ale hidrogelurilor CSG nu au fost foarte mari, comparativ cu cele ale hidrogelurilor GCS.

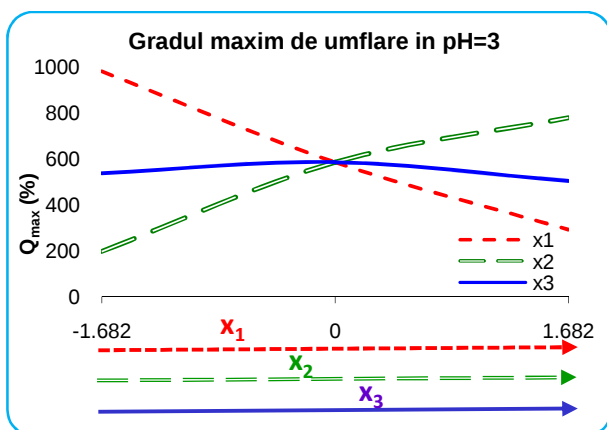


Figura III.27. Gradul maxim de umflare la pH=3 când unul din parametri este variabil și ceilalți doi sunt constanți

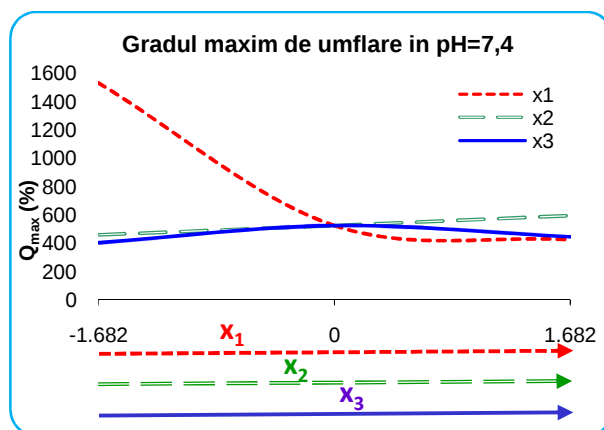


Figura III.28. Gradul maxim de umflare la pH=7,4 când unul din parametri este variabil și ceilalți doi sunt constanți

Gradul maxim de umflare ($Q_{\max}$) determinat în mediul slab bazic (pH=7,4) (Figura III.28.) a fost, în general, mai mic comparativ cu cel măsurat în mediul acid (pH = 3) (Figura III.27.), cu o excepție în cazul probelor cu un raport CS/G scăzut, adică o cantitate crescută de G în amestecul inițial. În mediul alcalin se formează anionii carboxilat din proteină care vor determina respingeri electrostatice și vor permite pătrunderea soluțiilor apoase în rețea.

Gradul maxim de umflare în mediul acid crește cu creșterea cantității de agent de reticulare iar în mediul bazic cantitatea de agent de reticulare ionică nu are o influență notabilă asupra $Q_{\max}$.

Remunan-Lopez și Bodmeier au raportat faptul că filmele chitosan-TPP sunt sensibile în mediul acid, se umflă foarte tare și în final se dizolvă [146]. Această observație ne ajută să înțelegem de ce gradele de umflare ale hidrogelurilor cresc o dată cu creșterea cantității de agent de reticulare ionică. În cazul utilizării unei cantități mici de agent de reticulare, după 24 de ore în mediul acid, hidrogelul începe deja să se dizolve. În cazul utilizării unei cantități crescute de TPP vom avea o rețea mult mai densă și deci desfacerea tuturor legăturilor ionice va necesita un timp mai lung de 24 de ore în mediul acid.

Timpul de reticulare ionică nu manifestă o influență semnificativă asupra gradului maxim de umflare a hidrogelurilor CSG în mediul bazic; reactivitatea crescută a TPP-ului face ca reticularea să aibă loc în primele 60 minute.

Capacitatea de încărcare/eliberare a Cafeinei

Eficiența de eliberare a Cafeinei a avut valori crescute în mediul alcalin, între 83 și 94%, și valori medii în acid, între 46 și 62%.

Cantitatea maximă de cafeină eliberată după 24 h din hidrogelurile CSG în mediul bazic a fost cuprinsă între 17 - 115 mg/g hidrogel iar în mediul acid între 9 - 59 mg/g hidrogel. Comportarea hidrogelurilor CSG la eliberarea unui medicament model, hidrofil, a fost similară cu comportarea acestora la umflare atât în mediul bazic cât și în mediul acid. Cantitatea maximă de Cafeină eliberată în mediul acid a fost mai mică comparativ cu cantitatea eliberată în mediul bazic.

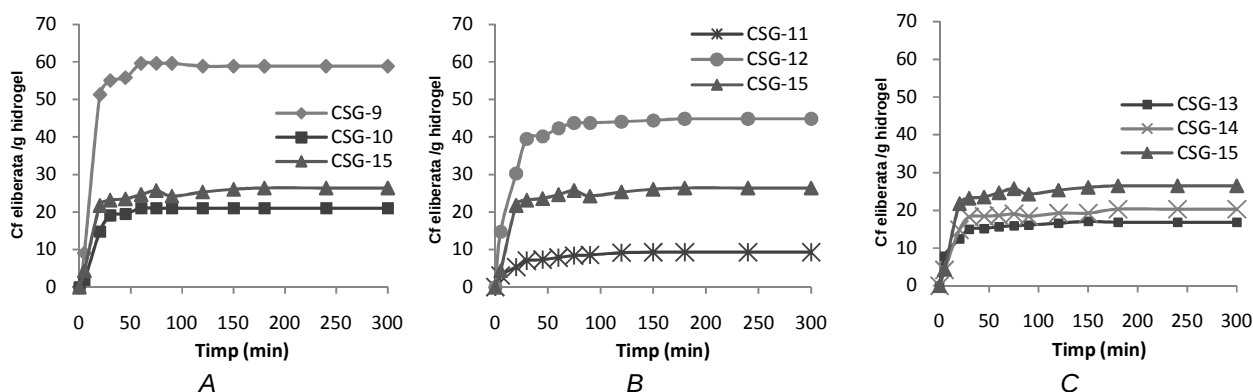


Figura III.32. Cinetica de eliberare a cafeinei la pH=3 pentru hidrogelurile: A – CSG-9, CSG-10, CSG-15; B – CSG-11, CSG-12, CSG-15; C – CSG-13, CSG-14, CSG-15.

Modelarea cu ajutorul rețelelor neuronale

Modelarea cu ajutorul rețelelor neuronale are drept scop stabilirea influenței condițiilor de reacție asupra caracteristicilor finale ale hidrogelurilor. Prin urmare, rețeaua proiectată are ca variabile de intrare: x_1 - CS/G (g/g), x_2 - moli TPP/ 2 moli NH_2 libere, x_3 – timpul de reticulare ionică (minute), iar ca variabile de ieșire: y_1 – gradul maxim de umflare în PBS (pH = 7.4) (SD_{PBS}) (%), y_2 – gradul maxim de umflare în CBS (pH = 7.4) (SD_{CBS}) (%), y_3 – cantitatea maximă de cafeină eliberată în PBS (Cf_{PBS}) și y_4 - cantitatea maximă de cafeină eliberată în CBS (Cf_{CBS}). Fiecare ieșire este corelată prin modelare cu cele trei intrări și, de aceea, au fost proiectate patru modele.

Modelele neuronale s-au obținut prin antrenări bazate pe date reprezentate de perechi intrare/ieșire, urmărindu-se realizarea valorilor impuse ca ieșiri. Corecția între predicțiile rețelelor neuronale și datele experimentale (procesul de învățare sau antrenare) se bazează pe o procedură de regresie neliniară. Antrenarea presupune evaluarea ieșirilor rețelei și calcularea abaterii față de datele experimentale. Când aceste abateri devin prea mari, trebuiesc ajustate ponderile neuronilor, iar procesul reia evaluarea ieșirilor rețelei.

O problemă majoră în proiectarea modelelor cu ajutorul rețelelor neuronale este determinarea arhitecturii rețelei, reprezentată prin numărul straturilor ascunse și numărul neuronilor de pe fiecare strat ascuns. Se utilizează metoda încercare și eroare

pentru testarea câtorva topologii (arhitecturi ale rețelei) și pentru compararea abaterilor predicțiilor. Abaterile minime indică o arhitectură corespunzătoare, cu potențiale rezultate bune în fazele de antrenare și validare.

Rezultatele antrenării rețelelor neuronale sunt evaluate pe baza abaterii medii pătratice (MSE), corelației (r) (concordanța între datele experimentale și predicțiile rețelei neuronale) și eroarea procentuală (E_p). În cazul procesului abordat, cele mai bune performanțe au fost înregistrate de MLP(3:5:1), o rețea de tip perceptron multistrat, cu trei neuroni în stratul de intrare corespunzător celor trei variabile de intrare (x_1, x_2, x_3), un strat ascuns cu 5 neuroni și un strat de ieșire cu un neuron pentru y_1, y_2, y_3 și y_4 (în cazul celor 4 modele neuronale).

Chiar dacă numărul datelor experimentale nu este prea mare, s-a putut obține un model bun de rețea neuronală deoarece datele sunt uniform distribuite pe domeniul analizat. Experimentele au fost planificate astfel încât să se pregătească un număr minim de probe, dar care să acopere uniform întreaga arie investigată.

Pentru acest studiu s-au folosit rețele neuronale “feedforward” (cu reacție pozitivă) cu o arhitectură (3:5:1). Acestea au fost obținute prin metoda încercărilor succesive și au fost antrenate cu binecunoscutul algoritm “backpropagation”. Performanțele obținute în faza de antrenare, respectiv MSE , r și E_p sunt prezentate în tabelul III.6.

Tabelul III.6. Performanțele rețelelor neuronale în faza de antrenare

Parametri de ieșire	MSE	r	E_p %
SD_{PBS} (y_1)	0,00021	0,99942	1,4932
SD_{CBS} (y_2)	0,000055	0,99979	0,56361
Cf_{PBS} (y_3)	0,00067	0,98087	2,16925
Cf_{CBS} (y_4)	0,000048	0,99997	0,66138

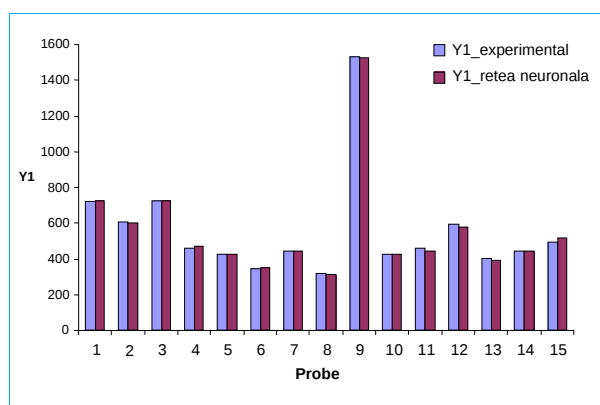


Figura III.36. Valorile experimentale SD_{PBS} (y_1) comparate cu rezultatele rețelei neuronale pentru etapa de antrenare

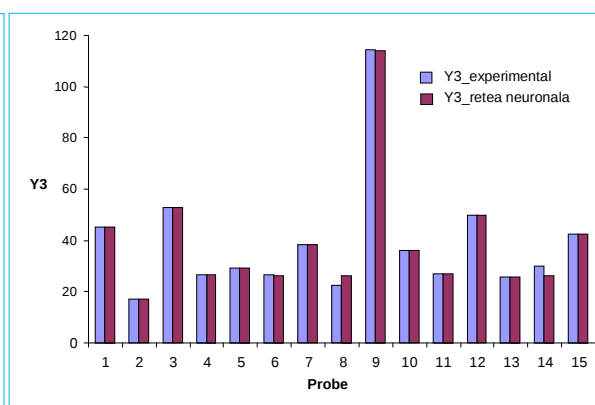


Figura III.37. Valorile experimentale Cf_{PBS} (y_1) comparate cu rezultatele rețelei neuronale pentru etapa de antrenare

Valorile prezise de rețeaua neuronală sunt în concordanță cu valorile experimentale pentru toți cei patru parametri, ceea ce demonstrează că modelul

neural a învățat bine comportamentul procesului. Figurile III.36. și III.37. prezintă două exemple pentru parametrii de ieșire SD_{PBS} (y_1) și Cf_{PBS} (y_3).

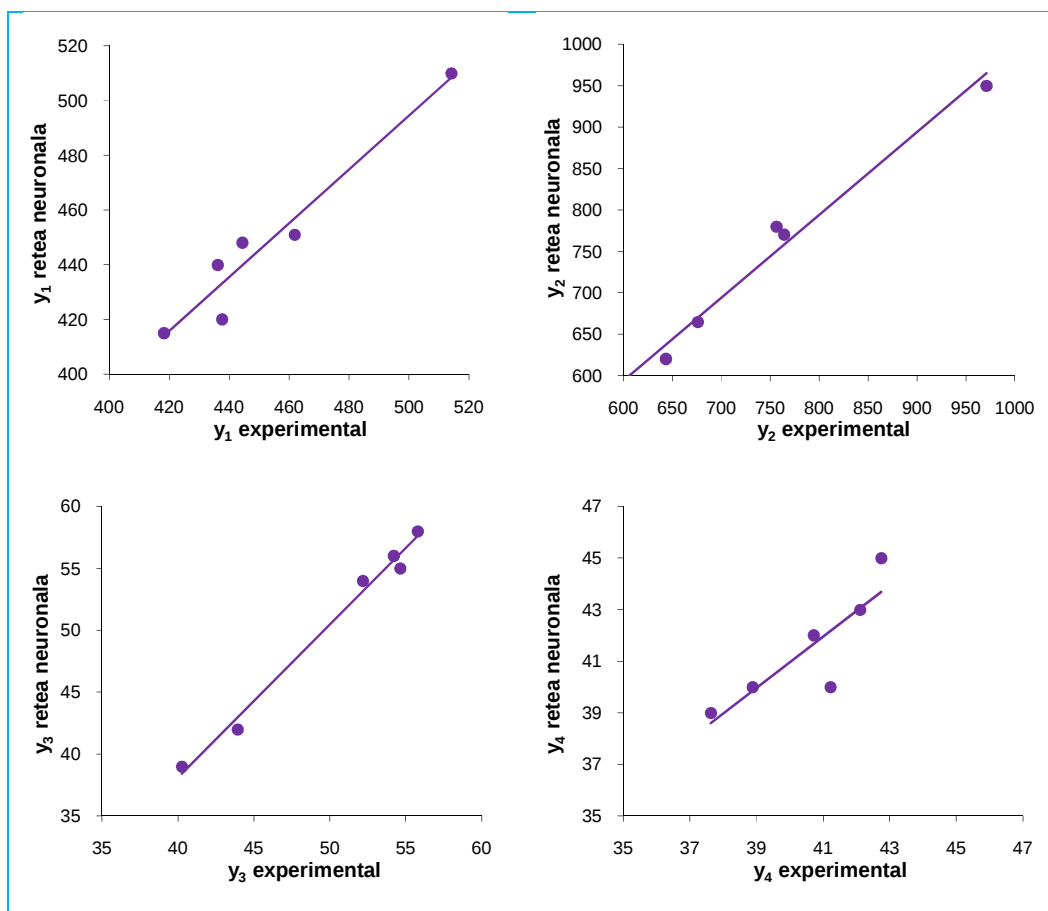


Figura III.38. Datele experimentale comparate cu rezultatele rețelei neuronale pentru faza de validare

Principalul avantaj al rețelelor neuronale constă în capacitatea acestora de a generaliza, respectiv de a furniza predicții față de valori de intrare pe care nu le-a vazut încă. Șase probe experimentale au fost păstrate pentru etapa de validare pentru a verifica dacă modelul neuronal prezintă capacitate de generalizare. În Figura III.38. este prezentată comparația între datele experimentale (neincluse în setul de antrenare) și predicțiile modelului MLP(3:5:1) pentru toate ieșirile rețelelor neuronale. O eroare maximă relativă de 6 % arată faptul că predicțiile modelelor neuronale sunt corecte.

În consecință, modelele neuronale pot fi folosite pentru a face predicții pentru date de intrare neincluse în setul experimental, înlocuind experimente sau furnizând informații practice experimentale.

Modelarea neuronală directă permite estimarea cantității de cafeină eliberată și a gradului de umflare pentru diferite condiții de reacție.

Informații suplimentare se pot obține prin modelare neuronală inversă, aceasta fiind o problemă de optimizare ce constă în identificarea condițiilor de reacție care conduc la valori finale impuse pentru y_1 , y_2 , y_3 sau y_4 . Pot fi formulate diverse probleme de optimizare pentru a fi rezolvate cu ajutorul modelării neuronale inverse.

De exemplu, dacă avem x_2 (moli TPP/ 2 moli NH_2), x_3 (timpul de reticulare ionică) și y_1 (gradul de umflare în PBS) impuse, se poate afla x_1 (CS/G).

O rețea neuronală care răspunde la o asemenea problemă are ca valori de intrare x_2 , x_3 și y_1 și ca valoare de ieșire x_1 . Mai multe teste în modelarea neuronală inversă au condus la o arhitectură optimă de tipul MLP (3:12:4:1) cu $\text{MSE} = 0.000006$, $r = 0.99991$ și $E_p = 0.181415\%$ pentru faza de antrenare. În Figura III.39. sunt prezentate predicțiile modelului MLP (3:12:4:1) pentru o serie de date pentru care modelul nu știe răspunsurile experimentale (faza de validare).

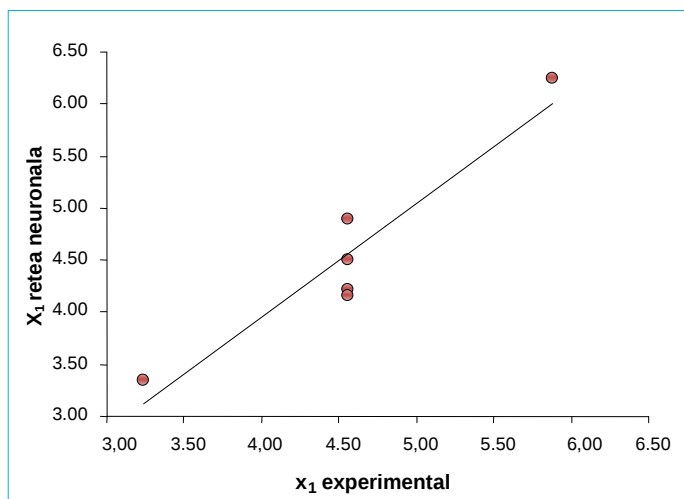


Figura III.39. Validarea modelului neuronal invers: datele experimentale comparate cu predicțiile rețelei neuronale pentru date „nevăzute” de rețea

Un alt exemplu este reprezentat de următoarea problemă: dacă avem x_1 (CS/Gel), x_3 (timpul de reticulare) și y_3 (cantitatea de cafeină eliberată în PBS) impuse se poate afla x_2 (moli TPP/ 2 moli NH_2).

Răspunsul la întrebarea de mai sus este dat de o rețea neuronală cu două straturi ascunse de tipul MLP(3:33:11:1), cu x_1 , x_3 și y_3 intrări ale rețelei și x_2 ieșirea modelului. Rezultatele simulării sunt în concordanță cu datele experimentale (Figura III.40.), având o eroare relativă maximă de 9%.

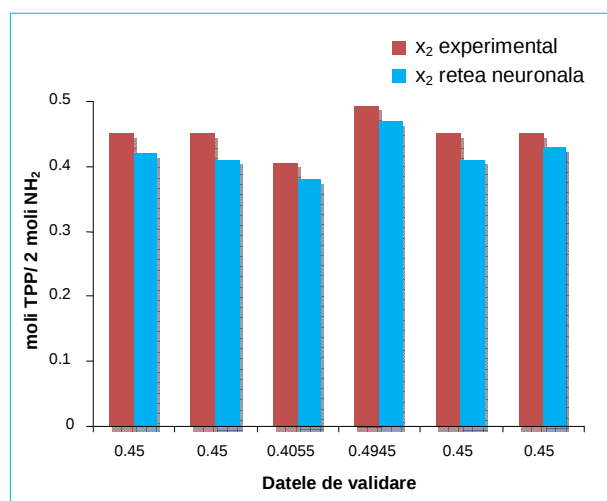


Figura III.40. Datele experimentale și predicțiile rețelei neuronale pentru faza de validare a modelării inverse

III.1.2. Imobilizarea lipozomilor în hidrogeluri pe bază de chitosan și gelatină

După cum s-a observat în cadrul subcapitolului anterior, hidrogelurile pe bază de G și CS prezintă grade de umflare și capacități de includere/eliberare ridicate, bineînțeles în funcție de cantitatea și de tipul agentului de reticulare ionică utilizat. În schimb, aceste tipuri de hidrogel nu se pretează la eliberarea pe termen lung a principiului activ tocmai datorită proprietăților enunțate anterior.

În partea bibliografică, au fost prezentate și dezavantajele lipozomilor din punctul de vedere al utilizării lor ca sisteme de eliberare controlată. Printre acestea, cel mai important din punct de vedere al studiului efectuat, îl constituie stabilitatea lipozomilor în timp.

În cadrul acestui subcapitol s-a studiat posibilitatea controlului eliberării principiului activ din sisteme complexe de tip hidrogel – lipozomi. Pentru comparație au fost studiate două tipuri de hidrogeluri – hidrogeluri pe bază de G și CS dublu reticulate cu AG și Na_2SO_4 și hidrogeluri pe bază de G și CS dublu reticulate cu AG și TPP, ambele tipuri preparate după un plan experimental centrat, rotitor, compus, de ordinul II cu trei variabile.

Din punctul de vedere al lipozomilor analizați, a fost studiat un singur tip de lipozomi din punct de vedere morfologic, și anume: lipozomi multilamelari mari (Multilamellar Vesicles - MLV) și două tipuri de lipozomi diferiți din punct de vedere al compoziției acestora.

Principalele direcții de cercetare ale acestui studiu au fost: studiul stabilității lipozomilor imobilizați în filmele polimere și capacitatea sistemelor polimeri – lipozomi de a elibera principiul activ.

III.1.2.2.1. Prepararea lipozomilor

Pentru imobilizarea lipozomilor în hidrogeluri polimere au fost preparate în scopul comparării două tipuri de lipozomi multilamelari (MLV) ce diferă prin compozițiile de plecare, și anume:

- MLV-uri cu o compoziție de plecare pe bază de PC
- MLV-uri cu o compoziție de plecare pe bază de PC/Chol (raport molar 2:1)

Pentru prepararea lipozomilor multilamelari a fost utilizată *metoda hidratării filmelor lipidice* [148], aceasta fiind una dintre cele mai utilizate tehnici de obținere a acestui tip de lipozomi.

III.1.2.2.2. Prepararea sistemelor complexe de tipul polimer-lipozomi-principiu activ

Sistemele polimer-lipozomi au fost realizate sub formă de hidrogeluri în care au fost imobilizați lipozomi de tip MLV încărcăți cu calceină. Au fost alese câte patru probe din fiecare set de hidrogeluri prezentate în primele două subcapitole, după cum urmează:

Tabelul III.7. Codul sistemelor de tip polimer-lipozomi

Cod probă	Agent de reticulare ionică	Cod probă	Agent de reticulare ionică
GCS-3-L	Na_2SO_4	CSG-3-L	TPP
GCS-10-L		CSG-10-L	
GCS-12-L		CSG-12-L	
GCS-15-L		CSG-15-L	

Prepararea hidrogelurilor a urmat același protocol ca cel prezentat în primele două subcapitole, cu mențiunea că toate cantitățile au fost reduse de 4 ori (de exemplu, în loc de 0,5g vom avea 0,125g amestec polimeri). Pentru obținerea sistemelor complexe de tipul polimer-lipozomi, o suspensie de lipozomi în apă a fost adăugată în fiecare soluție de polimeri înaintea aldehidei glutarice [149].

III.1.2.4. Rezultate și discuții

În cadrul acestui subcapitol vor fi prezentate rezultatele obținute în urma preparării unui sistem complex de tipul polimer-lipozomi-principiu activ. Se va face referire atât la caracterizarea lipozomilor cât și a sistemului complex din diferite puncte de vedere.

Determinarea dimensiunii lipozomilor

Dimensiunile lipozomilor multilamelari atât pentru cei pe bază de PC cât și pentru cei pe bază de PC/Chol sunt prezentate în Tabelul III.8.

Tabelul III.8. Diametrul mediu al lipozomilor

Compoziția lipozomilor	Diametrul mediu al MLV-urilor (μm)
PC	$1,050 \pm 0,237$
PC/Chol	$2,407 \pm 0,217$

Lipozomii de tip MLV sunt vezicule mari cu dimensiuni ce variază în funcție de compoziția acestora, lipozomii din PC/Chol sunt mai mari decât cei numai din PC.

Studiul distribuției lipozomilor în filmele polimere

Aceste studii au fost realizate cu ajutorul microscopiei confocale de fluorescență, cu ajutorul căreia s-a putut pune în evidență prezența lipozomilor în interiorul matricilor polimere.

Au fost preparați lipozomi în care a fost inclusă rodamina, ca principiu fluorescent hidrofob, pentru a se evita difuzia acestuia în afara lipozomilor și modificarea proprietăților fluorescente ale întregului sistem. Acești lipozomi au fost apoi imobilizați în hidrogelurile polimere. Pentru comparație s-au preparat și probe-martor fără lipozomi imobilizați.

Imaginile de fluorescență au fost făcute pe secțiuni de hidrogel de $\sim 100 \mu\text{m}$ grosime, în stare uscată, la o mărire de $\times 10$. În Figura III.54.A este prezentată imaginea de fluorescență a lipozomilor MLV imobilizați în hidrogelul CSG-3. Lipozomii sunt omogen distribuiți în aproape toată masa hidrogelului.

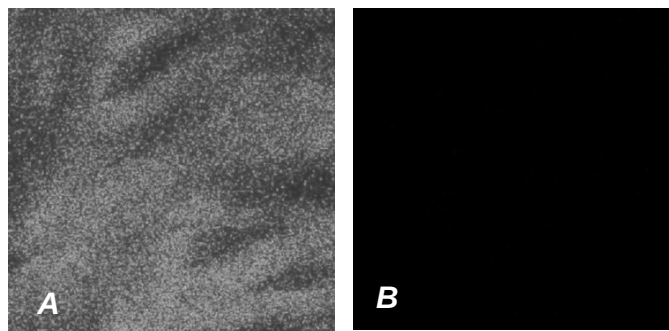


Figura III.54. Imagini de fluorescență pentru lipozomi MLV imobilizați în hidrogelul CSG-3 (A) comparativ cu hidrogelul martor CSG-3 (B) pentru o mărire $\times 10$

Studiul capacității de eliberare a calceinei din sistemele complexe polimer-lipozomi-principiu activ

Calceina, un principiu activ hidofil, a fost inclusă în lipozomi mari de tip MLV de diferite compoziții (PC și PC/Chol). Lipozomii încărcăți cu calceină au fost apoi imobilizați în hidrogeluri pe bază de gelatină și chitosan dublu reticulate. Comportamentul hidrogelurilor fără lipozomi a fost studiat în cele două subcapitole anterioare. Acestea au prezentat grade de umflare ridicate, în funcție de compoziție și agentul de reticulare ionică utilizat, și cantități crescute de cafeină încărcate/eliberate. Cinetica de eliberare a principiului activ hidofil a indicat faptul că acesta a fost eliberat aproape complet după 2-3 ore de la imersarea hidrogelurilor încărcate în soluții apoase cu pH diferit. Pentru a surmonta acest dezavantaj al hidrogelurilor s-a recurs la realizarea sistemului complex polimer-lipozomi-principiu activ. În acest fel s-a încercat și rezolvarea problemei legată de instabilitatea lipozomilor în timp.

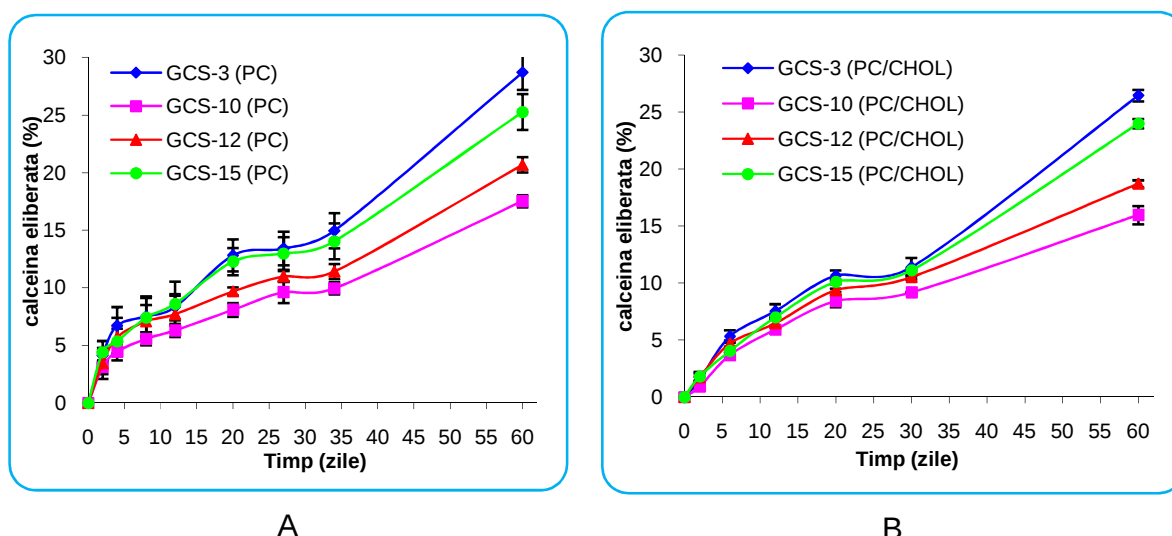


Figura III.56. Cinetica de eliberare a calceinei în pH=7,4 pentru hidrogelurile pe bază de G și CS dublu reticulate cu AG/Na₂SO₄ încărcate cu lipozomi din PC (A) și PC/CHOL (B)

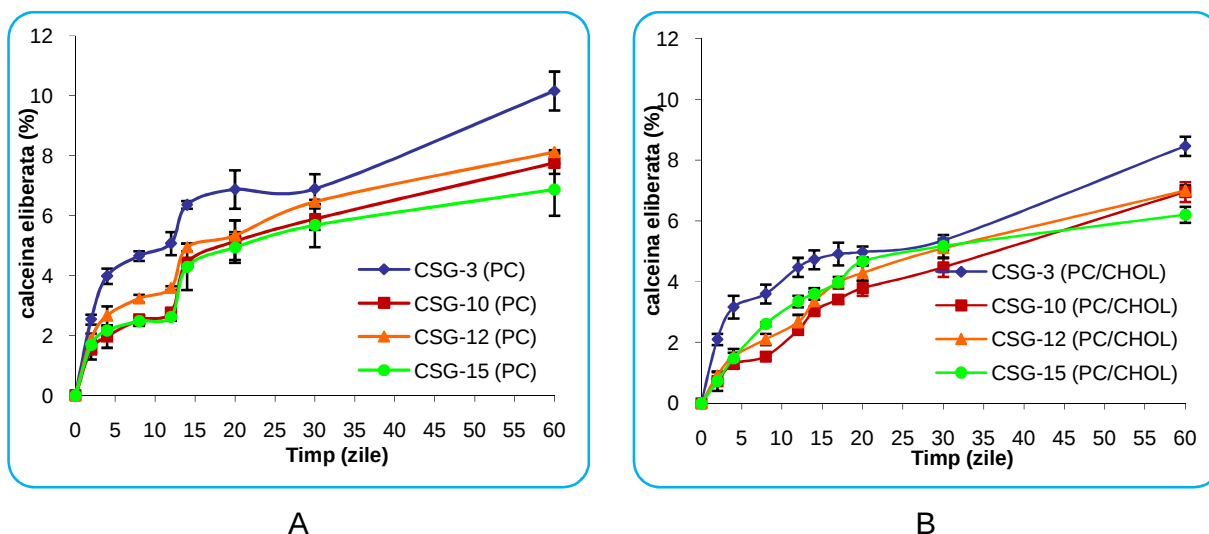


Figura III.57. Cinetica de eliberare a calceinei în pH=7,4 pentru hidrogelurile pe bază de G și CS dublu reticulate cu AG/TPP încărcate cu lipozomi din PC (A) și PC/CHOL (B)

În hidrogelurile GCS (reticulate cu AG și Na_2SO_4) și hidrogelurile CSG (reticulate cu AG și TPP) au fost imobilizați lipozomi mari de tipul MLV cu compoziții diferite (PC și PC/Chol) încărcăți în prealabil cu calceină. Cinetica de eliberare a calceinei din aceste hidrogeluri este prezentată în Figura III.56. și Figura III.57.

Din curbele cineticii de eliberare se poate observa că eliberarea calceinei este influențată atât de compoziția hidrogelurilor și tipul agentului de reticulare ionică cât și de compoziția lipozomilor. Influența compoziției este similară cu cea descoperită în cazul eliberării unui principiu activ hidrofil din filmele martor pe bază de G și CS dublu reticulate (Capitolul III.1.1.1. și Capitolul III.1.1.2.). Filmele reticulate ionic cu TPP eliberează mai greu lipozomii/calceina iar acest lucru se datorează reactivității crescute a TPP comparativ cu Na_2SO_4 . Lipozomii ce au în compoziția inițială PC/CHOL sunt mai stabili [153], și eliberează mai greu calceina.

Cantitățile reduse de principiu activ hidrofil eliberat comparativ cu cele măsurate pentru filmele martor, constituie dovada faptului că lipozomii au rămas intacti în timpul proceselor de reticulare a G și CS.

Determinarea integrității lipozomilor

Lipozomii aflați în straturile superficiale ale hidrogelului sunt eliberați treptat în mediul apos în care este imersat hidrogelul. O parte din acești lipozomi se destabilizează eliberând astfel principiul activ. Însă nu numai lipozomii eliberați în mediul apos se pot destabiliza ci și cei aflați încă în interiorul rețelei polimere iar principiul activ este în acest caz eliberat prin difuzie din hidrogel.

Procentele de calceină eliberată, calculate înainte și după adăugarea detergentului (Triton X-100), pentru proba GCS-10-L sunt reprezentate în Figura III.58.

Integritatea lipozomilor din afara hidrogelurilor pe bază de G și CS dublu reticulate cu AG/ Na_2SO_4 și AG/TPP a fost calculată și este reprezentată în Figura III.59 și Figura III.60.

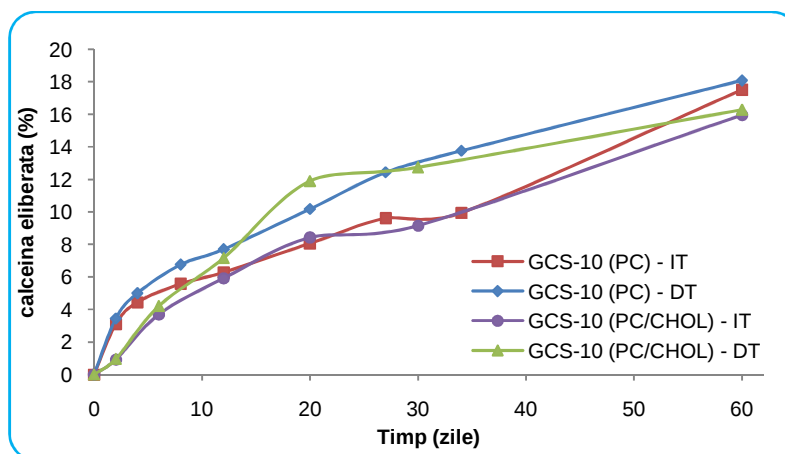


Figura III.58. Procentele de calceină eliberată, calculate înainte și după adăugarea detergentului, pentru proba GCS-10-L

După 60 de zile se înregistrează o scădere considerabilă, până la 1-2%, a parametrului de integritate lipozomală ceea ce indică faptul că lipozomii ce au fost eliberați din matricile polimere s-au dezintegrat aproape în totalitate, astfel cantitățile de

calceină calculate înainte și după adăugarea detergentului sunt foarte apropiate ca valoare (Figura III.58.).

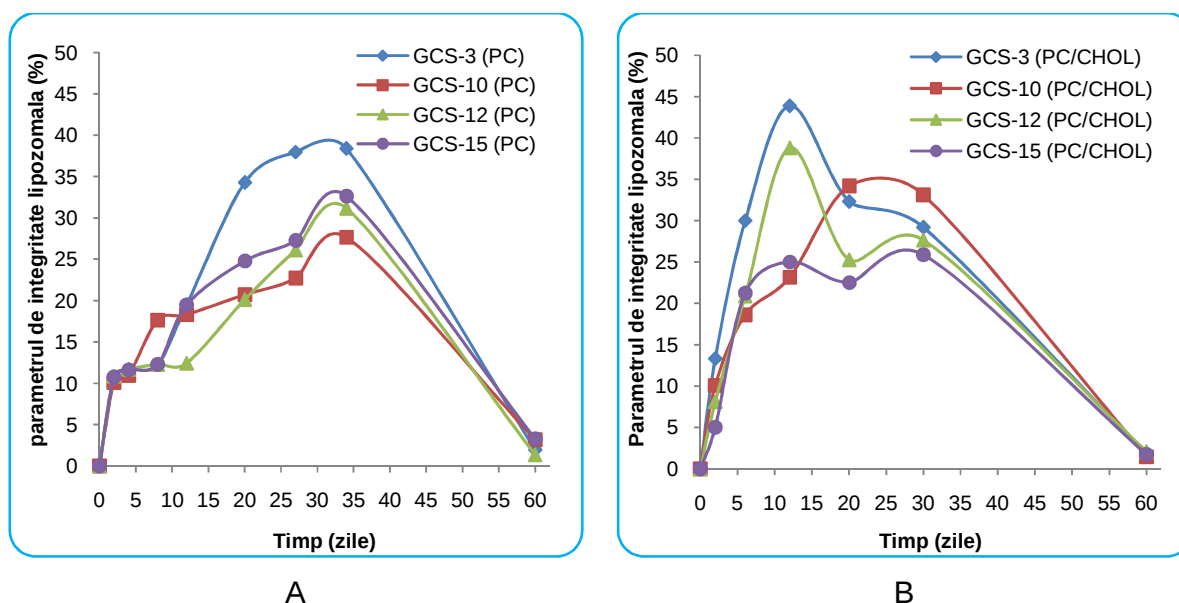


Figura III.59. Variația parametrului de integritate lipozomală pentru hidrogelurile pe bază de G și CS dublu reticulate cu AG/Na₂SO₄ încărcate cu lipozomi din PC (A) și PC/CHOL (B)

Parametrul de integritate lipozomală este mai mic pentru hidrogelurile dublu reticulate cu AG/TPP (Figura III.60.) comparativ cu cel al hidrogelurilor dublu reticulate cu AG/Na₂SO₄ (Figura III.59.), demonstrând astfel că lipozomii se dezintegrează în interiorul hidrogelului iar calceina este apoi eliberată prin difuzie.

Colesterolul are influență asupra stabilității lipozomilor, fapt demonstrat de valorile mai mari ale parametrului de integritate pentru lipozomii ce au în compoziție PC/CHOL.

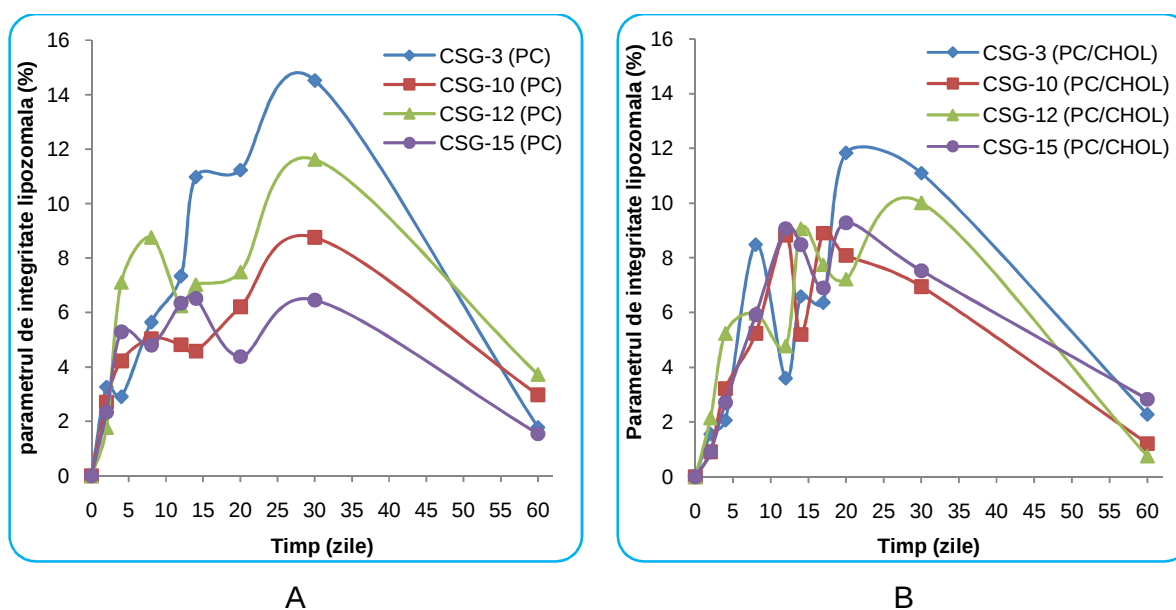


Figura III.60. Variația parametrului de integritate lipozomală pentru hidrogelurile pe bază de G și CS dublu reticulate cu AG/TPP încărcate cu lipozomi din PC (A) și PC/CHOL (B)

Mecanismul de eliberare a calceinei din sistemele complexe de tipul polimer-lipozomi-principiu active

Lipozomii încărcăți cu calceină ce se află la suprafața hidrogelului și care au dimensiuni corespunzătoare pentru a ieși prin porii rețelei (după umflare) sunt eliberați din hidrogel iar în acest caz calceina este eliberată după dezintegrarea lipozomilor. Restul de calceină va rămâne în matricea polimeră (în compartimentul apos al veziculelor) până când o parte din lipozomi se vor dezintegra, caz în care calceina va fi eliberată prin difuzie din hidrogel, sau până când hidrogelul se va descompune. Compoziția hidrogelului precum și dimensiunea veziculelor înglobate în hidrogel sunt parametri importanți ce influențează eliberarea calceinei din sistemele complexe studiate.

III.2. Hidrogeluri dublu reticulate pe bază de chitosan și PAV utilizate pentru imobilizarea lipozomilor

În acest subcapitol vor fi prezentate obținerea și caracterizarea unor sisteme complexe polimer-lipozomi-principiu activ cu potențiale aplicații biomedicale. Suportul polimeric este constituit din hidrogeluri dublu reticulate (reticulare covalentă urmată de reticulare ionică) pe bază de chitosan și poli(alcool vinilic). Lipozomii imobilizați în matricea polimeră sunt reprezentați de două tipuri MLV-uri diferiți din punct de vedere al compoziției acestora.

III.2.1. Hidrogeluri pe bază de PAV și chitosan reticulate cu aldehydă glutarică și sulfat de sodiu sau tripolifosfat de sodiu

În cadrul acestui subcapitol a fost studiată influența parametrilor variabili (raportul masic CS/PVA), tipul și concentrația agentului de reticulare ionică) asupra morfologiei hidrogelurilor, a proprietăților de umflare, a capacităților de încărcare/eliberare a cloramfenicolului.

Obținerea hidrogelurilor pe bază de CS și PAV prin dublă reticulare (covalentă și ionică) are loc datorită reacției dintre grupările carbonil ale glutaraldehydei și grupările aminice libere ale CS precum și grupările hidroxil ale PAV și a interacțiunilor dintre anionii sulfat și grupările aminice protonate ale chitosanului.

III.2.1.2. Metoda de preparare a hidrogelurilor

Cantități corespunzătoare de CS și PAV (rapoarte masice diferite - Tabelul III.10.) au fost dizolvate în soluție de acid acetic 2% (v/v) la temperatura camerei [171]. Cantitatea specifică de AG necesară pentru a reticula 20% dintre grupările aminice și hidroxilice libere a fost adăugată, în picături, sub agitare energetică, peste soluția de polimeri. Cantitatea minimă optimă de AG pentru ca filmele să fie stabile a fost fixată în urma unor teste preliminare. Amestecul obținut a fost transferat cu grijă în Petri-uri cu diametrul de 90 mm, ultrasonicat pentru a se îndepărta aerul și a evita astfel formarea de goluri, și apoi introduse în etuvă timp de 1 oră, la o temperatură de 50°C. Hidrogelurile reticulate covalent au fost apoi imersate în soluții apoase de Na₂SO₄/TPP de concentrații diferite (Tabelul III.10.) și menținute acolo 30 minute. Ulterior, probele au fost spălate succesiv cu acetonă și apă bidistilată pentru a elimina produșii nereacționați; hidrogelurile au fost uscate prin liofilizare și păstrate în exicator.

Tabelul III.10. Planul experimental utilizat pentru obținerea hidrogelurilor

Codul probei	Masa amestecului de polimeri (g)	% CS	% PAV	Na ₂ SO ₄	TPP
CPN-1	0,5	95	5	25 mL, 3%(w/w)	-
CPN-2		90	10		
CPN-3		85	15		
CPN-4		80	20		
CPN-5		75	25		
CPN-6	1	95	5	50 mL, 3%(w/w)	-
CPN-7		90	10		
CPN-8		85	15		
CPN-9		80	20		
CPN-10		75	25		
CPT-1	1	95	5	-	50 mL, 1%(w/w)
CPT-2		90	10		
CPT-3		85	15		
CPT-4		80	20		
CPT-5		75	25		
CPT-6	1	95	5	-	50 mL, 3%(w/w)
CPT-7		90	10		
CPT-8		85	15		
CPT-9		80	20		
CPT-10		75	25		

III.2.1.4. Rezultate și discuții

Amestecul celor doi polimeri a fost supus mai întâi unei reticulări covalente prin intermediul aldehidei glutarice. Reacția cu AG are loc atât la grupările aminice situate de-a lungul catenei chitosanului, cu formarea legăturilor iminice, cât și la grupările hidroxil ale poli(alcoolului vinilic) cu formarea unor noi legături de tip acetal. Reticularea covalentă este urmată de o reticulare ionică cu sulfatul de sodiu sau tripolifosfatul de sodiu. La această reacție participă grupările funcționale de tip -NH₂, aflate sub forma ionului amoniu, aparținând chitosanului.

Caracteristici structurale

Produșii de reticulare au fost analizați prin spectroscopie FTIR.

Reticularea covalentă a chitosanului a fost demonstrată de prezența benzii de absorbție caracteristică legăturilor iminice la 1633 cm⁻¹ în cazul hidrogelurilor CPN și la 1638 cm⁻¹ în cazul hidrogelurilor CPT.

Benzile de absorbție de la 1101 cm⁻¹ din spectrul hidrogelurilor CPN, și de la 1062 cm⁻¹ din spectrul hidrogelurilor CPT sunt caracteristice legăturilor de tip acetal, prezența lor justificând reticularea covalentă a poli(alcoolului vinilic).

Reticularea ionică a fost confirmată de prezența peak-ului de absorbție specific pentru SO_4^{2-} ($\sim 616 \text{ cm}^{-1}$) [127] în cazul hidrogelurilor CPN și de prezența peak-ului de absorbție caracteristic legăturii asimetrice P-O-P ($\sim 893 \text{ cm}^{-1}$) în cazul hidrogelurilor CPT.

Caracteristici morfologice

Structura hidrogelurilor pe bază de CS și PAV dublu reticulate a fost pusă în evidență cu ajutorul microscopiei electronice de baleiaj (Figura III.65.).

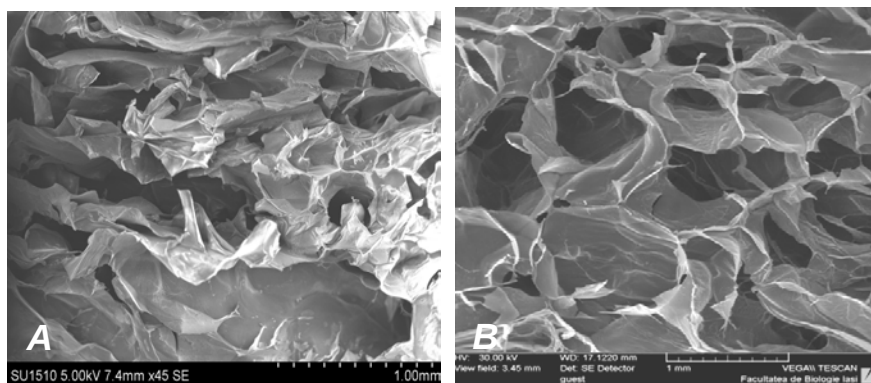


Figura III.65. Micrografii electronice pentru probele CPN-3 (A) și CPT-1 (B)

Structurile ambelor tipuri de hidrogeluri sunt omogene și poroase; porozitatea ridicată poate fi pusă pe seama uscării prin liofilizare.

Determinarea conținutului de azot din compoziția hidrogelurilor

Așa cum era de așteptat conținutul de azot din hidrogeluri scade o dată cu creșterea cantității de PAV în amestecul inițial. Este evident faptul că PAV-ul participă activ la reacția de reticulare covalentă formând împreună cu chitosanul o rețea polimeră interpenetrată de tip interconectat.

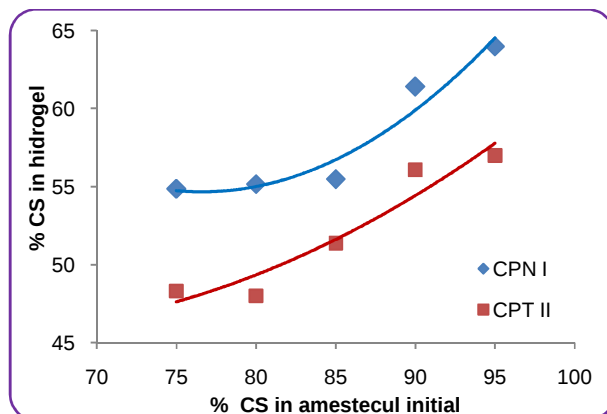


Figura III.66. Influența compoziției inițiale a amestecului de polimeri asupra compoziției hidrogelurilor

Se observă o diferență între conținutul de azot din hidrogelurile reticulate cu sulfat de sodiu și cele reticulate cu tripolifosfat de sodiu, pentru același raport de polimeri în amestecul inițial, diferență ce provine din structura celor doi agenți de reticulare.

Gradul maxim de umflare

Cinetica de umflare a hidrogelurilor (Figura III.67.) evidențiază faptul că atât cantitatea de PAV din amestecul inițial cât și tipul și concentrația agentului de reticulare influențează gradul de umflare.

Hidrogelurile reticulate cu AG/ Na_2SO_4 ating gradul maxim de umflare după aproximativ 4 ore în PBS (Figura III.67.A.) în timp ce hidrogelurile reticulate cu AG/TPP se umflă mult mai repede, acestea atingând gradul maxim de umflare după numai 2 ore (Figura III.67.B.).

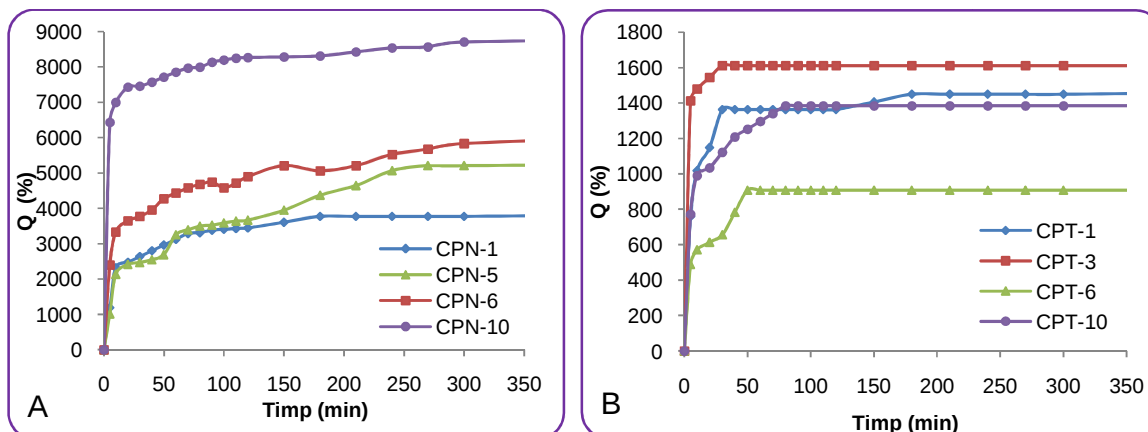


Figura III.67. Cinetica de umflare în PBS pentru hidrogelurile CPN (A) și CPT (B)

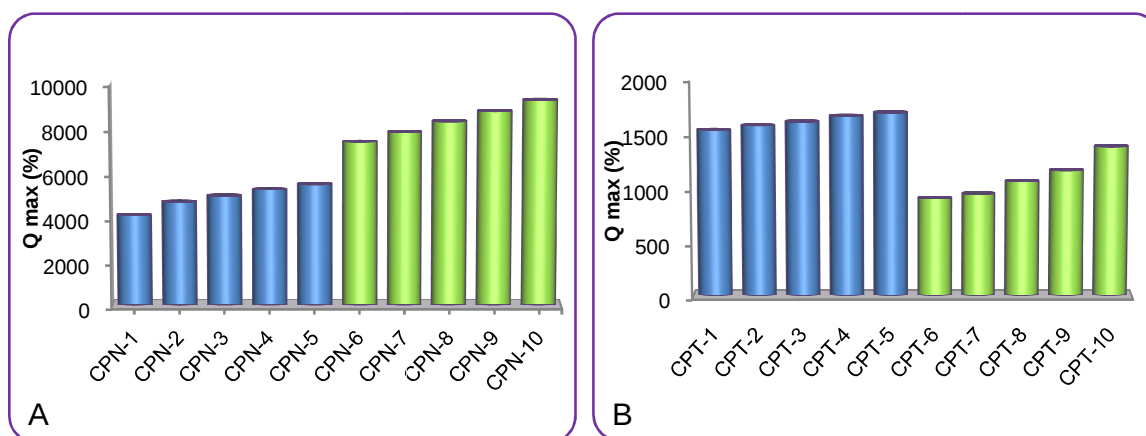


Figura III.68. Gradul maxim de umflare în PBS pentru hidrogelurile CPN (A) și CPT (B)

Cantitatea de PAV în amestecul inițial are și ea o influență pozitivă asupra gradului de umflare; o creștere a cantității de PAV în amestecul inițial conduce la o creștere a gradului maxim de umflare a hidrogelurilor (Figura III.68.). Scăderea cantității de chitosan în amestecul inițial de polimeri face ca densitatea de reticulare a rețelei să se reducă, reducându-se numărul punților de reticulare ionică.

Influența agentului de reticulare este evidentă și datorită faptului că hidrogelurile reticulate ionic cu TPP au grade de umflare mult mai mici comparativ cu cele reticulate cu Na_2SO_4 (Figura III.68.). Cantitatea de agent de reticulare ionică are de asemenea influență asupra gradului de umflare; o cantitate crescută de agent de reticulare crește densitatea rețelei inducând în acest fel un gradul de umflare scăzut (Figura III.68.B.).

De asemenea, s-a observat că o creștere în grosime a hidrogelurilor a crescut și gradul de umflare (Figura III.68.A.). Grosimea hidrogelurilor a fost modificată prin dublarea cantităților de polimeri și agenți de reticulare cu păstrarea aceluiași tip de Petri (90 mm diametru) pentru prepararea acestuia. Acest lucru se datorează în principal difuziei mai rapide a agentului de reticulare ionic în interiorul rețelei în cazul unei grosimi mai mici.

Capacitatea de încărcare/eliberare a cloramfenicolului

Cantitatea de cloramfenicol încărcată/eliberată în cazul hidrogelurilor pe bază de chitosan și poli(alcool vinilic) este redată în Figura III.69.

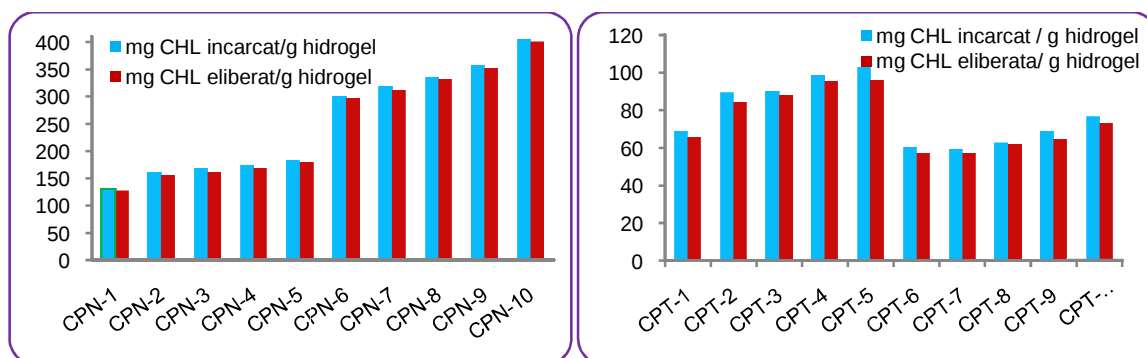


Figura III.69. Cantitatea de CHL încărcată/eliberată pentru hidrogelurile CPN (a) și CPT (b)

Cantitatea de cloramfenicol încărcată/eliberată (Figura III.69.) urmărește aceleași variații și este influențată de aceiași parametri ca și gradul maxim de umflare.

Cinetica de eliberare a cloramfenicolului în soluție tampon fosfat (pH=7,4) pentru o parte din hidrogelurile pe bază de CS și PAV este prezentată în Figura III.70.

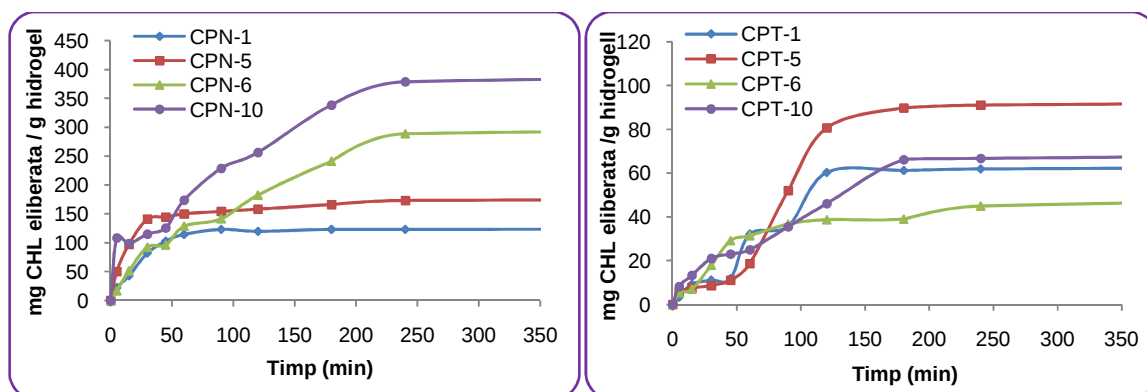


Figura III.70. Cinetica de eliberare a CHL în PBS pentru hidrogelurile CPN (a) și CPT (b)

Cantitatea de PAV din amestecul inițial, tipul și concentrația agentului de reticulare influențează cantitatea de cloramfenicol eliberată în aceeași manieră ca și gradul de umflare al hidrogelurilor. Cinetica de eliberare urmărește aceleași reguli de variație ca și cinetica de umflare ceea ce demonstrează caracterul difuzional al eliberării cloramfenicolului la pH=7,4.

Cinetica de eliberare a cloramfenicolului (Figura III.70.) indică faptul că majoritatea probelor ating cantitatea maximă eliberată după două ore în soluție tampon fosfat pentru hidrogelurile CPT și patru ore pentru hidrogelurile CPN.

III.2.2. Imobilizarea lipozomilor în hidrogeluri pe bază de chitosan și poli(alcool vinilic)

După cum s-a observat în cadrul subcapitolului anterior, hidrogelurile pe bază de CS și PAV prezintă grade de umflare și capacități de includere/eliberare ridicate, în funcție de cantitatea și de tipul agentului de reticulare ionică utilizat dar și în funcție de raportul masic dintre CS și PAV în amestecul inițial. Aceste tipuri de hidrogel nu prezintă potențial pentru eliberarea pe termen lung a principiului activ tocmai datorită proprietăților enunțate anterior.

Ca și în cazul hidrogelurilor pe bază de G și CS s-a încercat surmontarea acestor dezavantaje prin includerea de lipozomi în aceste sisteme în timpul preparării, chiar înainte de adăugarea agentului de reticulare covalentă. Au fost imobilizați în matricile polimere două tipuri de lipozomi multilamelari (MLV) ce diferă prin compozițiile de plecare: PC și PC/Chol (raport molar 2:1).

III.2.2.2. Prepararea sistemelor complexe de tipul polimer-lipozomi-principiu activ

Sistemele polimer-lipozomi au fost realizate sub formă de hidrogeluri pe bază de chitosan și poli(alcool vinilic) în care au fost imobilizați lipozomi de tip MLV încărcăți cu calceină. Au fost alese câte patru probe din fiecare set de hidrogeluri prezentate în subcapitolul anterior, după cum urmează:

Tabelul III.12. Codul sistemelor de tip polimer-lipozomi

Cod probă	Agent de reticulare ionică	Cod probă	Agent de reticulare ionică
CPN-6-L	Na ₂ SO ₄	CPT-1-L	TPP
CPN-7-L		CPT-2-L	
CPN-8-L		CPT-3-L	
CPN-9-L		CPT-4-L	

Prepararea hidrogelurilor a urmat același protocol ca cel prezentat în subcapitolul anterior, cu mențiunea că toate cantitățile au fost reduse de 4 ori. Pentru obținerea sistemelor complexe de tipul polimer-lipozomi, o suspensie de lipozomi (încărcați cu calceină) în apă a fost adăugată în fiecare soluție de polimeri înaintea aldehidei glutarice.

III.2.2.4. Rezultate și discuții

În cadrul acestui subcapitol vor fi prezentate rezultatele obținute în urma imobilizării lipozomilor încărcăți cu calceină în hidrogeluri pe bază de chitosan și poli(alcool vinilic) dublu reticulate. Caracterizarea lipozomilor a fost prezentată în detaliu în Capitolul III.1.2. În acest subcapitol se va face referire doar la sistemul complex de tipul polimer-lipozomi.

Studiul distribuției lipozomilor în filmele polimere

În Figura III.71.A este prezentată imaginea de fluorescență a lipozomilor MLV imobilizați în hidrogelul CPT-1 în comparație cu hidrogelul martor fără lipozomi (Figura III.71.B). Lipozomii sunt omogen distribuiți în toată masa hidrogelului.

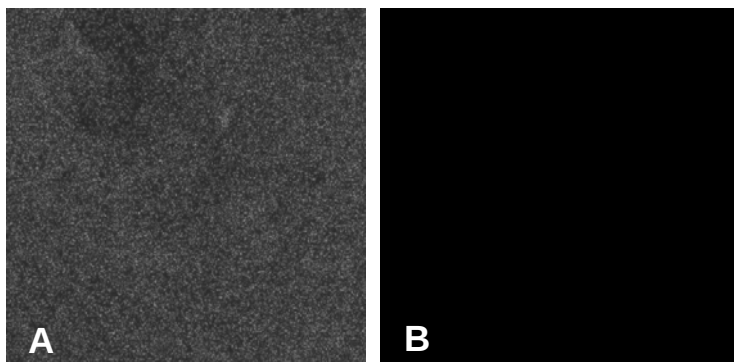


Figura III.71. Imagini de fluorescență pentru lipozomi MLV imobilizați în hidrogelul CPT-1 (A) comparativ cu hidrogelul martor CPT-1 (B) pentru o mărire $\times 10$

Studiul capacității de eliberare a calceinei din sistemele complexe polimer-lipozomi-principiu activ

Calceina, un principiu activ hidrofil, a fost inclusă în lipozomi mari de tip MLV de diferite compoziții (PC și PC/Chol). Lipozomii încărcăți cu calceină au fost apoi imobilizați în hidrogeluri pe bază de chitosan și poli(alcool vinilic) dublu reticulate. Comportamentul hidrogelurilor pe bază de CS și PAV fără lipozomi a fost studiat în subcapitolul anterior. Acestea au prezentat grade de umflare ridicate, în funcție de compoziție și agentul de reticulare ionică utilizat, și cantități crescute de medicament încărcate/eliberate. Cinetica de eliberare a principiului activ din hidrogelurile martor a indicat faptul că acesta a fost eliberat aproape complet după 2-4 ore de la imersarea hidrogelurilor încărcate în soluții apoase cu pH bazic. Pentru a surmonta acest dezavantaj al hidrogelurilor s-a recurs la realizarea sistemului complex polimer-lipozomi-principiu activ. În acest fel s-a încercat și rezolvarea problemei legată de instabilitatea lipozomilor în timp.

În hidrogelurile CPN (reticulate cu AG și Na_2SO_4) și hidrogelurile CPT (reticulate cu AG și TPP) au fost imobilizați lipozomi mari de tipul MLV cu compoziții diferite (PC și PC/Chol) încărcăți în prealabil cu calceină. Cinetica de eliberare a calceinei din aceste hidrogeluri este prezentată în Figura III.72. și Figura III.73.

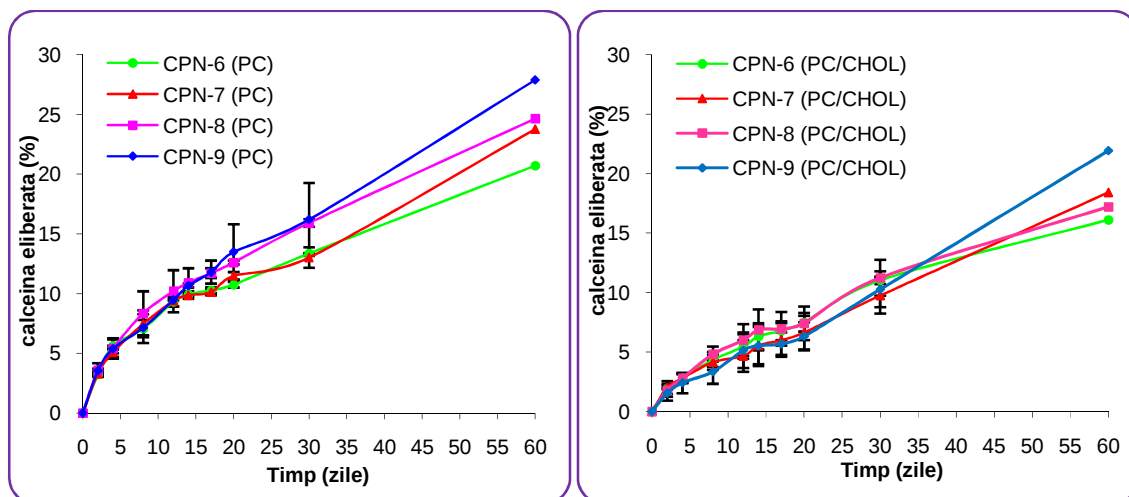


Figura III.72. Cinetica de eliberare a calceinei în $\text{pH}=7,4$ pentru hidrogelurile pe bază de CS și PAV dublu reticulate cu $\text{AG}/\text{Na}_2\text{SO}_4$ încărcate cu lipozomi din PC (A) și PC/CHOL (B)

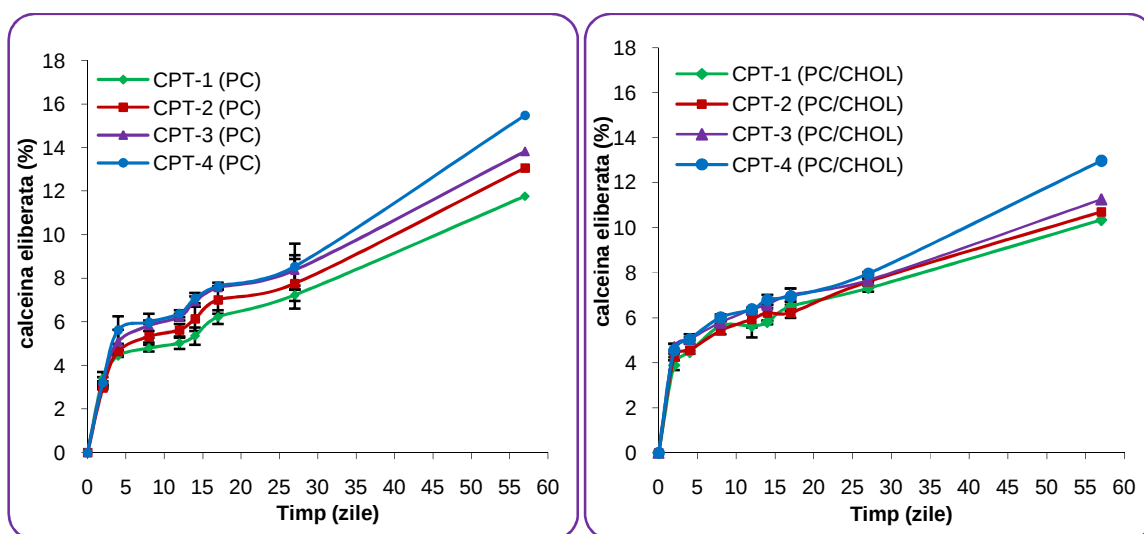


Figura III.73. Cinetica de eliberare a calceinei în pH=7,4 pentru hidrogelurile pe bază de CS și PAV dublu reticulate cu AG/TPP încărcate cu lipozomi din PC (A) și PC/CHOL (B)

Din curbele cineticii de eliberare se poate observa că eliberarea calceinei este influențată atât de compoziția hidrogelurilor și tipul agentului de reticulare ionică cât și de compoziția lipozomilor. Influența compoziției este similară cu cea descoperită în cazul eliberării unui principiu activ din hidrogelurile martor pe bază de CS și PAV dublu reticulate (Capitolul III.2.1.). Hidrogelurile reticulate ionic cu TPP eliberează mai greu lipozomii/calceina iar acest lucru se datorează reactivității și funcționalității crescute a TPP comparativ cu Na_2SO_4 .

Lipozomii ce au în compoziția inițială PC/CHOL sunt mai stabili, așa cum s-a observat și în Capitolul III.1.2., și eliberează mai greu calceina.

Determinarea integrității lipozomilor

Ca și în cazul sistemelor complexe de tipul polimer-lipozomi prezentat în Capitolul III.1.2., lipozomii aflați în straturile superficiale ale hidrogelului sunt eliberați treptat în mediu apos în care este imersat hidrogelul. O parte din acești lipozomi se destabilizează eliberând astfel principiul activ. Însă nu numai lipozomii eliberați în mediul apos se pot destabiliza ci și cei aflați încă în interiorul rețelei polimere iar principiul activ este în acest caz eliberat prin difuzie din hidrogel.

Integritatea lipozomilor din afara hidrogelurilor pe bază de CS și PAV dublu reticulate cu AG/ Na_2SO_4 și AG/TPP a fost calculată și este reprezentată în Figura III.74 și Figura III.75.

Parametrul de integritate lipozomală este mai mic pentru hidrogelurile dublu reticulate cu AG/TPP comparativ cu cel al hidrogelurilor dublu reticulate cu AG/ Na_2SO_4 , comportament întâlnit și la hidrogelurile dublu reticulate pe bază de G și CS, demonstrând astfel că lipozomii se dezintegrează în interiorul hidrogelului iar calceina este apoi eliberată prin difuzie.

După 60 zile se înregistrează o scădere considerabilă, a parametrului de integritate lipozomală ceea ce indică faptul că lipozomii ce au fost eliberați din matricile polimere s-au dezintegrat aproape în totalitate, astfel cantitățile de calceină calculate înainte și după adăugarea detergentului sunt foarte apropiate ca valoare.

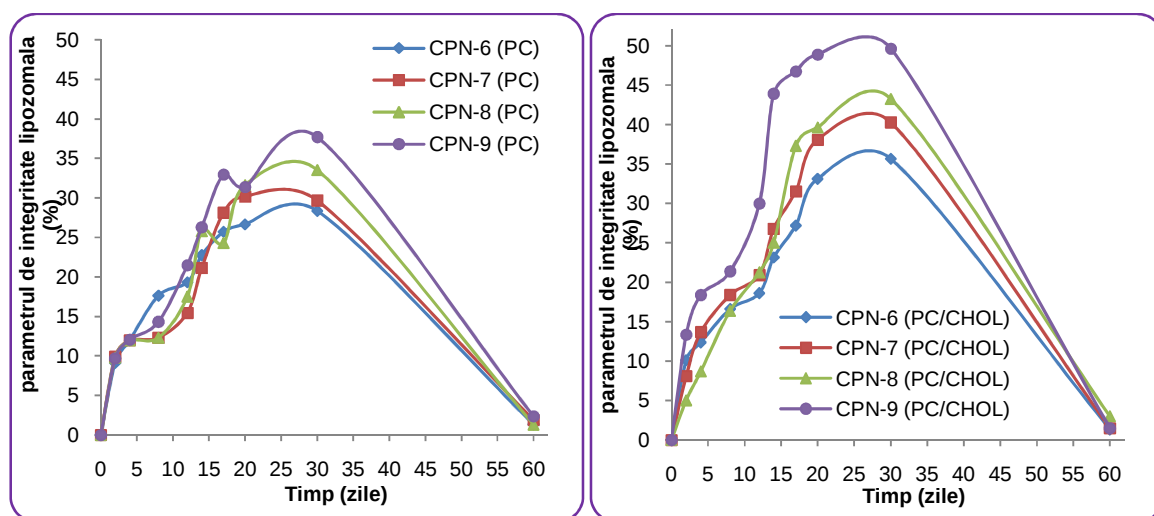


Figura III.74. Variația parametrului de integritate lipozomală pentru hidrogelurile pe bază de CS și PAV dublu reticulate cu AG/Na₂SO₄ încărcate cu lipozomi din PC (A) și PC/CHOL (B)

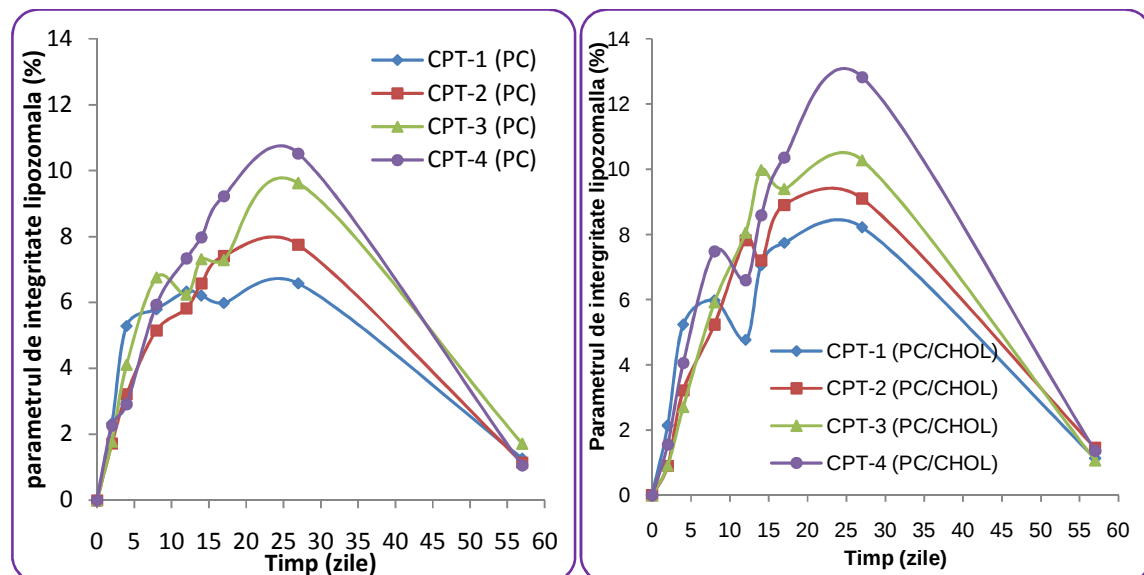


Figura III.75. Variația parametrului de integritate lipozomală pentru hidrogelurile pe bază de CS și PAV dublu reticulate cu AG/TPP încărcate cu lipozomi din PC (A) și PC/CHOL (B)

Colesterolul are influență asupra stabilității lipozomilor, fapt demonstrat de valorile mai mari ale parametrului de integritate pentru lipozomii ce au în compoziție PC/CHOL.

Capitolul IV. Sisteme particulate pe bază de polimeri naturali și sintetici

IV.1. Sisteme particulate pe bază de Gelatină și Chitosan

În continuare vor fi prezentate rezultatele experimentale privind obținerea unor sisteme microparticulate pe bază de gelatină și chitosan. Numeroasele avantaje pe care le prezintă cei doi polimeri din punct de vedere al utilizării lor în domeniul eliberării controlate de principii biologice active au constituit principalul motiv pentru care s-a realizat un nou material care să îmbine avantajele proteinelor cu cele ale polizaharidelor.

Pentru valorificarea avantajelor celor doi polimeri, s-au studiat mai multe posibilități de realizare a unor sisteme suport sub formă de micro și nanoparticule realizate prin reticulare ionică sau covalentă [175-178]. Însă, puțini cercetători au folosit până acum dubla reticulare pentru obținerea sistemelor de eliberare a medicamentelor [179-185].

Metoda utilizată în cadrul acestui studiu a constatat în dubla reticulare în emulsie inversă a soluției celor doi polimeri solubili în apă. Reticularea s-a realizat mai întâi ionic cu ajutorul sulfatului de sodiu, și apoi, pentru stabilizarea particulelor s-a recurs la o reticulare covalentă, interfacială, prin intermediul unei soluții saturate de AG în toluen. S-a recurs la această tehnică din următoarele considerente:

- Utilizarea reticulantului ionic are ca efect reducerea cantității de reticulant covalent, adeseori toxic;

- Agentul de reticlare covalentă nu poate fi total exclus, deoarece el asigură o stabilitate dimensională și mecanică particulelor obținute.

Această metodă a mai fost folosită pentru obținerea de microparticule dublu reticulate pe bază de chitosan și gelatină cu potențiale aplicații în oftalmologie [186]. Rezultatele ce urmează a fi prezentate au fost obținute prin optimizarea parametrilor utilizați pentru realizarea sistemelor amintite anterior. Astfel, modificând cantitatea de agent tensioactiv și raportul de faze al emulsiei s-a reușit stabilirea unor condiții optime pentru obținerea de microparticule cu dimensiuni variate și polidispersitate dimensională relativ îngustă, potrivite pentru administrarea intravenoasă și intraperitoneală. Pentru testele de încărcare/eliberare a fost folosit un medicament model (cloramfenicol) cu o solubilitate scăzută în apă.

IV.1.2. Metoda de obținere

Metoda utilizată pentru prepararea microparticulelor pe bază de G și CS constă în reticularea ambilor polimeri din soluție, proces ce s-a desfășurat în emulsie inversă, de tip apă în ulei. S-a realizat întâi o reticulare ionică în emulsie cu sulfat de sodiu pentru gelifierea polimerilor, urmată de o reticulare covalentă la interfață cu AG. Atât cantitatea de sulfat de sodiu cât și cantitatea de AG au fost utilizate în exces.

Pentru un mai bun control al reacțiilor ce au loc în sistem, și pentru corelarea acestora cu proprietățile particulelor obținute s-a realizat un program experimental, în care variabilele au fost:

- Compoziția amestecului (%G, %CS)

- Concentrația surfactantului, raportată la volumul de emulsie

În tabelul IV.2. sunt redate codurile tuturor probelor obținute precum și valorile parametrilor variați.

Tabelul IV.2. Valorile parametrilor urmăriți și codurile probelor preparate

Codul probelor	% G	% CS	% Span80 (w/v)	% Tween80 (w/v)	Soluție Na ₂ SO ₄ 10%(ml)	Soluție saturată de AG în toluen (ml)
2x10G90CS	10	90	2	2	40	20
2x30G70CS	30	70				
2x50G50CS	50	50				
2x70G30CS	70	30				
2x90G10CS	90	10				
3x10G90CS	10	90	3	3	40	20
3x30G70CS	30	70				
3x50G50CS	50	50				
3x70G30CS	70	30				
3x90G10CS	10	90				

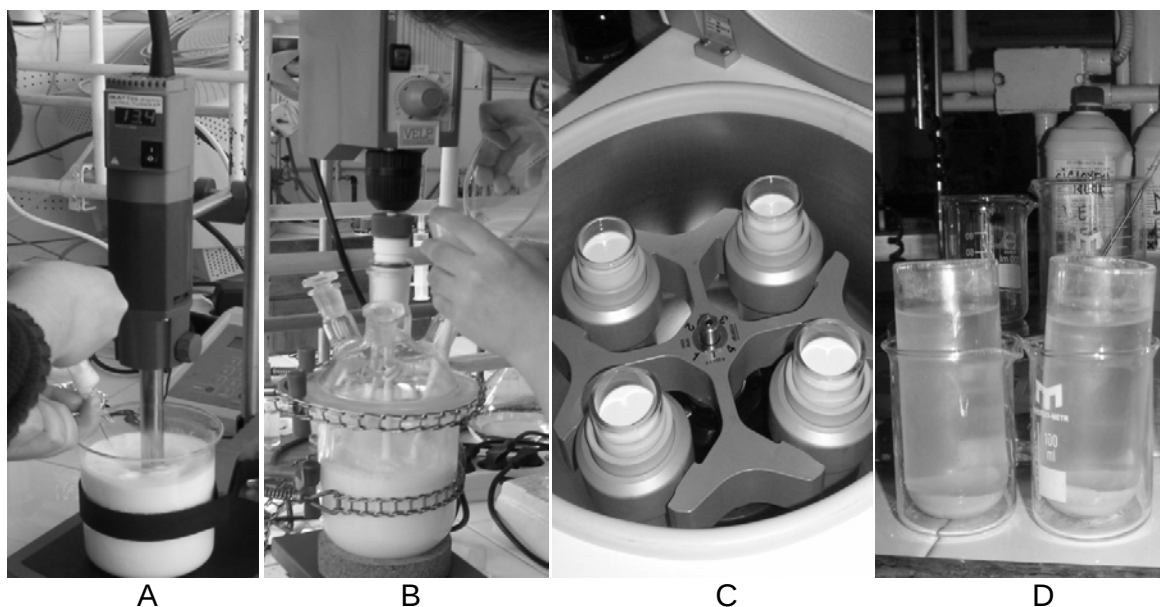


Figura IV.1. Metoda de obținere a particulelor G-CS: A - prepararea emulsiei; B – transferul emulsiei pentru definitivarea reticulării covalente; C – separarea particulelor prin centrifugare; D – spălarea produsului obținut

Pentru testele *in vivo* s-au preparat microparticule fluorescente (2x50G50CS-F). Chitosanul folosit în această sinteză a fost mai întâi modificat prin legarea de fluoresceină la grupele aminice prin activarea reacției cu 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimidei (EDAC) după metoda publicată de Angela M. de Campos și colab. [187], pentru ca mai apoi să poată fi obținute microparticulele fluorescente conform protocolului enunțat mai sus.

Testarea „*in vivo*” a sistemelor particulate pe bază de chitosan și gelatină

Testele *in vivo* au avut drept scop obținerea unor biodistribuții la nivel de țesuturi a microparticulelor fluorescente 2x50G50CS-F în eventualitatea utilizării acestora în eliberarea controlată de medicamente și pentru a observa care cale este cea mai

eficientă pentru administrare. Aceste teste au fost realizate pe șobolani Wistar albi, masculi, cu greutate cuprinse între 250 și 300 g. Suspensii de particule (1%), echivalentul a 0,4 ml/Kg corp șobolan, într-o singură doză, au fost administrate pe două căi: intraperitoneal (Lot I) și parenteral – în vena cozii (Lot II). Lotul martor nu a primit suspensii de particule pentru a permite compararea rezultatelor. Fiecare lot a avut câte 10 șobolani.

Dupa 24 ore de la administrare, toate animalele din toate loturile au fost anesteziate cu Pentotal și apoi sacrificate prin secționarea arterelor carotide. Organe sau fragmente de organe ca: plămân, cord, creier, testicul, ficat, arcade gingivo-dentare, au fost recoltate în ser fiziologic. Imediat după recoltare, din organele respective s-au realizat secțiuni la gheață (criostat) cu grosime de 2 – 3 microni. Secțiunile au fost recoltate în paraformaldehidă și examinate apoi la microscop. Fiecare imagine a fost examinată prin microscopie obișnuită, apoi prin microscopie pentru imunofluorescență, obținându-se prin suprapunerea imaginilor o imagine compusă la o mărire de 60x.

IV.1.4. Rezultate și discuții

Între G și CS au fost realizate două tipuri de reacții, în funcție de natura legăturilor nou create. Mai întâi, soluțiile celor doi polimeri au fost supuse unei reticulări ionice prin intermediul ionilor sulfat din sulfatul de sodiu. La această reacție participă grupările funcționale de tip $-NH_2$, aflate sub forma ionului amoniu, aparținând celor doi polimeri; reacția conduce la formarea unei rețele polimere interpenetrante de tip interconectat [192].

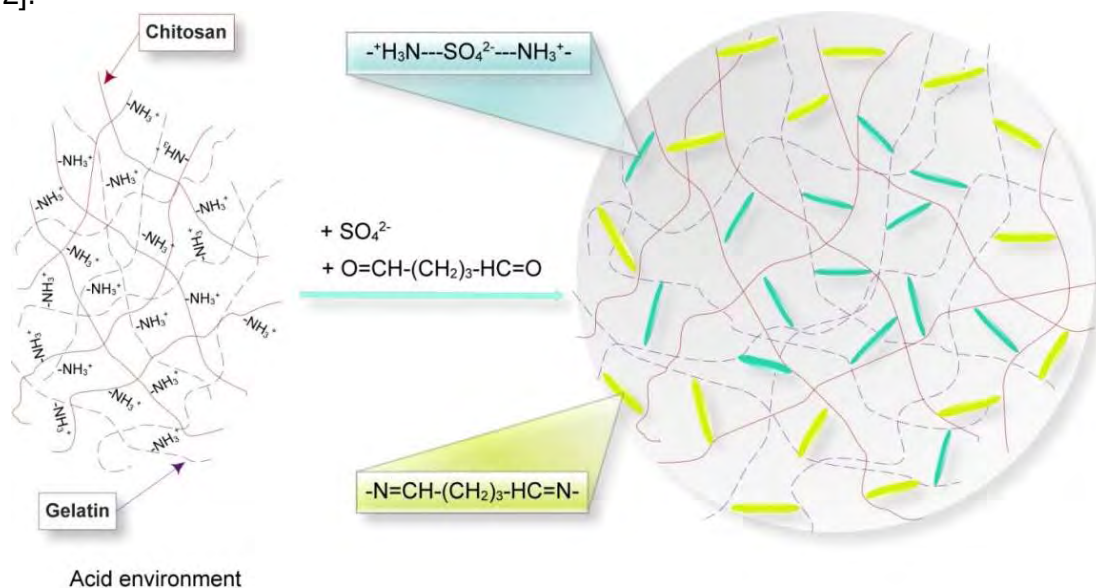


Figura IV.7. Rețeaua polimeră de tip IPN nou-formată

O reprezentare schematică a rețelei nou-formată este descrisă în figura IV.7.

Reticularea ionică se manifestă prin gelifierea soluțiilor celor doi polimeri. În sistemul studiat, reacția de reticulare ionică este declanșată prin adăugarea unei soluții de Na_2SO_4 într-o emulsie inversă de tip apă în ulei, în care raportul fazelor a fost 1:4. În acest mod a avut loc formarea particulelor de G / CS ce vor fi stabilizate ulterior prin reticulare covalentă cu AG.

Reacția cu AG are loc tot la grupările aminice situate de-a lungul catenei ambilor polimeri cu formarea de legături iminice [193]; ea se realizează prin ruperea legăturilor ionice formate prin intermediul ionilor sulfat sau prin participarea grupelor aminice încă libere, de la suprafața particulelor de gel întrucât AG a fost extrasă în toluen și deci este normal ca aceasta să reacționeze preponderent la suprafața microparticulelor.

Spectroscopia FTIR

Prođușii de reticulare au fost analizați prin spectroscopie FTIR.

Banda de absorbție caracteristică legăturii iminice formate în urma reticulării covalente este prezentă în spectrul probei 2x50G50CS la 1654 cm^{-1} .

Peak-ul corespunzător ionilor sulfat se regăsește în spectrul probei 2x50G50CS (619 cm^{-1}) ceea ce demonstrează reticularea ionică.

Caracteristici morfologice ale particulelor

Microparticulele preparate prin reticulare ionică și covalentă au fost analizate din punct de vedere al morfologiei atât prin studii de difractometrie laser cât și prin microscopie electronică, pentru determinarea formei și a aspectelor de suprafață.

În scopul determinării dimensiunii, microparticulele au fost analizate în acetonă pentru a evita procesele de umflare și a obține astfel valori cât mai aproape de cele din stare uscată. Un rol important în obținerea unor particule sferice a fost determinat de prezența substanțelor cu proprietăți tensioactive în ambele faze ale emulsiei [194], asigurând astfel o stabilizare mai bună a picăturilor de soluție apoasă și mai târziu a celor de gel ionic.

În tabelul IV.3. sunt prezentate valorile diametrului mediu al microparticulelor preparate. Este important de menționat că valorile prezentate sunt cele medii afișate de aparat. Valorile reprezintă media aritmetică a valorilor diametrelor medii măsurate pentru câte 5 eșantioane din fiecare probă.

Tabelul IV.3. Valorile diametrelor medii ale particulelor preparate

Codul probelor	Diametrul mediu (μm)	Codul probelor	Diametrul mediu (μm)
2x10G90CS	0,665 $\pm$ 0,091	3x10G90CS	0,527 $\pm$ 0,109
2x30G70CS	0,788 $\pm$ 0,055	3x30G70CS	0,673 $\pm$ 0,091
2x50G50CS	0,804 $\pm$ 0,056	3x50G50CS	0,769 $\pm$ 0,055
2x70G30CS	0,826 $\pm$ 0,057	3x70G30CS	0,802 $\pm$ 0,057
2x90G10CS	0,897 $\pm$ 0,041	3x90G10CS	0,878 $\pm$ 0,045

Valorea diametrului mediu al particulelor crește cu creșterea cantității de gelatină (Figura IV.11. și Figura IV.12.) fapt ce se poate explica prin aceea că reticularea ionică a CS este mult mai puternică și mai rapidă decât a G; acest efect este determinat de prezența în structura chitosanului a unui număr mai mare de grupe aminice capabile de a forma reticulări ionice și covalente. O altă observație desprinsă din curbele de distribuție este scăderea diametrului mediu al particulelor cu creșterea cantității de surfactant.

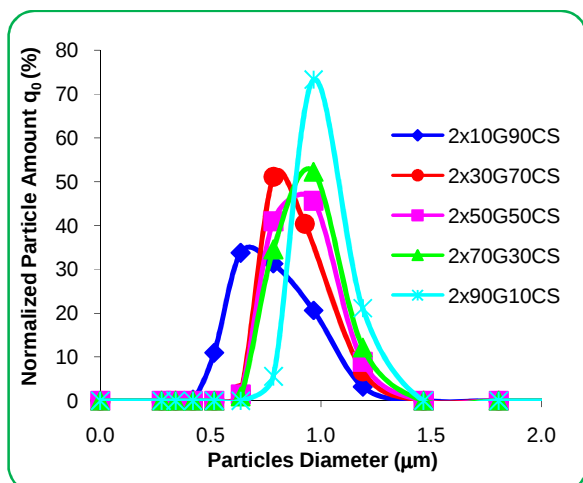


Figura IV.9. Distribuția dimensională a microparticulelor preparate cu o concentrație a surfactantului de 2%

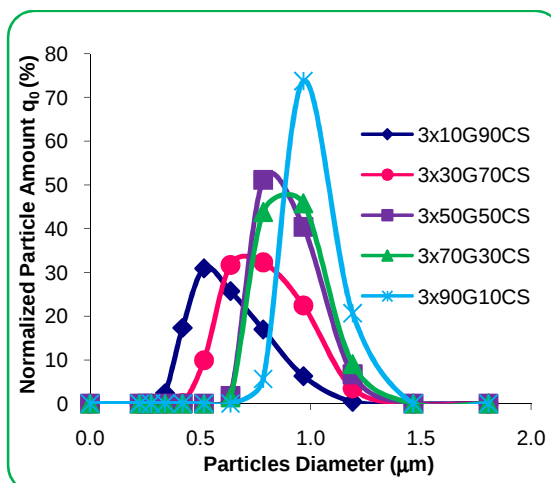


Figura IV.10. Distribuția dimensională a microparticulelor preparate cu o concentrație a surfactantului de 3%

Microscopia electronică de baleiaj a adus informații suplimentare privind forma, aspectul suprafeței și dimensiunile particulelor. În figura IV.13. sunt prezentate imaginile de microscopie electronică de baleiaj pentru o parte din probele analizate.

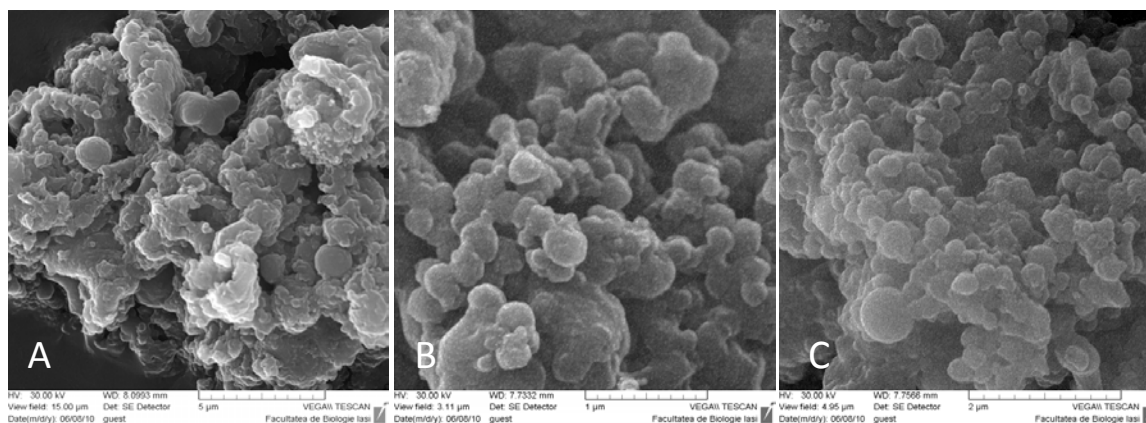


Figura IV.13. Microscopie electronica de baleiaj pentru: 2x50G50C (A), 2x90G10C (B) și 3x90G10C (C)

Din studiile de microscopie electronică s-au obținut următoarele informații:

- Doar o parte din particule prezintă o formă sferică bine definită;
- Pe migrografiile obținute se pot observa și aglomerate; Acestea se redispersează însă în apă, prin agitare sau ultrasonare;
- Suprafața particulelor variază de la foarte neted la rugos; această observație este în concordanță cu datele existente în literatură [195-197].

Obținerea de particule fluorescente a fost demonstrată cu ajutorul microscopiei confocale de fluorescență (Figura IV.14.).

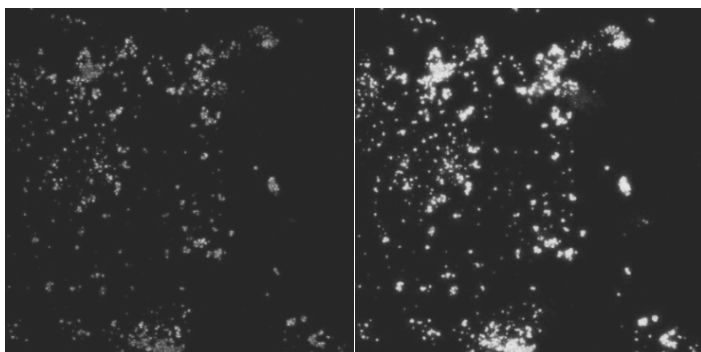


Figura IV.14. Microscopie confocală de fluorescență pentru microparticulele marcate cu fluoreceină

Determinarea caracteristicilor de retenție a soluțiilor apoase cu pH diferit

Capacitatea de retenție a soluțiilor apoase a microparticulelor preparate a fost studiată în două medii diferite: soluție tampon acetat (pH=4) și soluție tampon fosfat (pH=7,4). Cantitatea de apă inclusă în microparticule a fost cuantificată utilizând variația diametrului mediu în timp, valori măsurate prin difractometrie Laser.

Valoarea maximă a diametrului mediu al particulelor în mediu acid (Figura IV.15.-a) scade o dată cu creșterea cantității de gelatină în sistem, fiind comparativ mai mare decât cea în mediu bazic

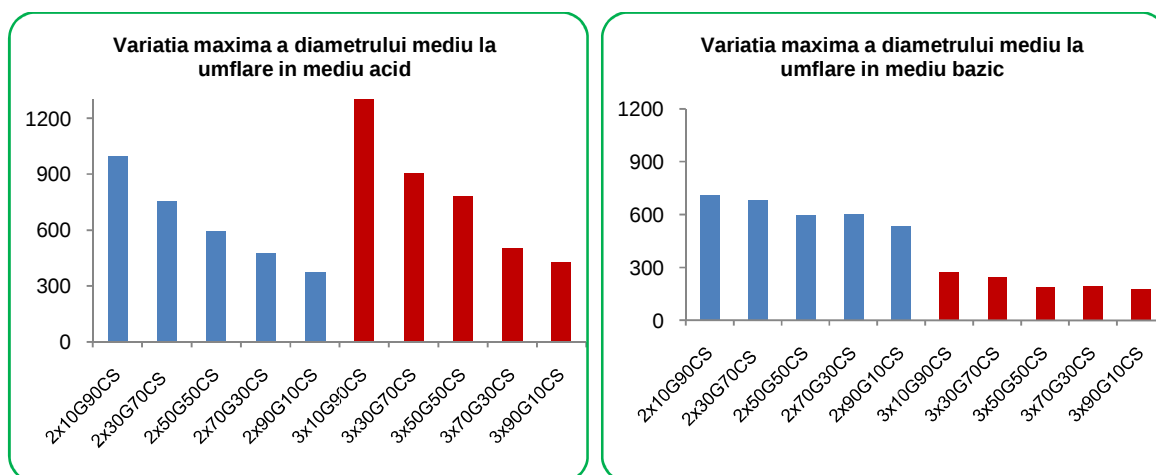


Figura IV.15. Variația diametrului mediu maxim al particulelor în mediul acid (a) și în mediul bazic (b)

Proprietățile de umflare sunt influențate de tăria interacțiilor ionice dintre lanțurile polimere care determină densitatea de reticulare a rețelei.

Capacitatea particulelor de încărcare/eliberare a cloramfenicolului

Cantitățile de cloramfenicol încărcate după 24 ore sunt prezentate în tabelul IV.8.

Datorită faptului că particulele au fost încărcate într-un mediu diferit față de cel în care s-au monitorizat gradele de umflare, nu poate fi făcută o corelație între gradele de umflare și cele de încărcare. Cea mai mare cantitate de cloramfenicol încărcată s-a înregistrat în cazul particulelor 2x10G90C - 35,63 mg CHL/100mg particule uscate iar cea mai mică în cazul particulelor 3x10G90C - 26,94 mg CHL/100mg particule uscate.

Tabel IV.8. Cantitatea de cloramfenicol încărcată în 100 mg particule

Codul probelor	mg CHL /100mg particule	Codul probelor	mg CHL /100mg particule
2x10G90CS	35,63	3x10G90CS	26,94
2x30G70CS	27,47	3x30G70CS	29,45
2x50G50CS	35,19	3x50G50CS	32,07
2x70G30CS	28,65	3x70G30CS	30,16
2x90G10CS	28,76	3x90G10CS	29,58

Din analiza rezultatelor obținute se pot face o serie de observații după cum urmează:

➤ Eficiența de eliberare este mai mică în cazul eliberării în mediu bazic decât în mediu acid, fapt explicat prin aceleași diferențe apărute în cazul umflărilor;

➤ În cazul particulelor 2x10G90C și 2x90G10C s-a înregistrat o creștere semnificativă a absorbantei în soluția de supernatant la 4 ore de la începerea eliberării, creștere pusă pe seama umflării neașteptate a particulelor;

➤ Rezultatele obținute în cazul includerii se corelează cu cele obținute în cazul eliberării, atât în mediu acid cât și în mediul bazic.

➤ În mediu acid se constată o eliberare mai lentă a cloramfenicolului în cazul probelor 2x50G50C și 3x30G70C, efect pentru care nu s-a găsit încă o explicație plauzibilă.

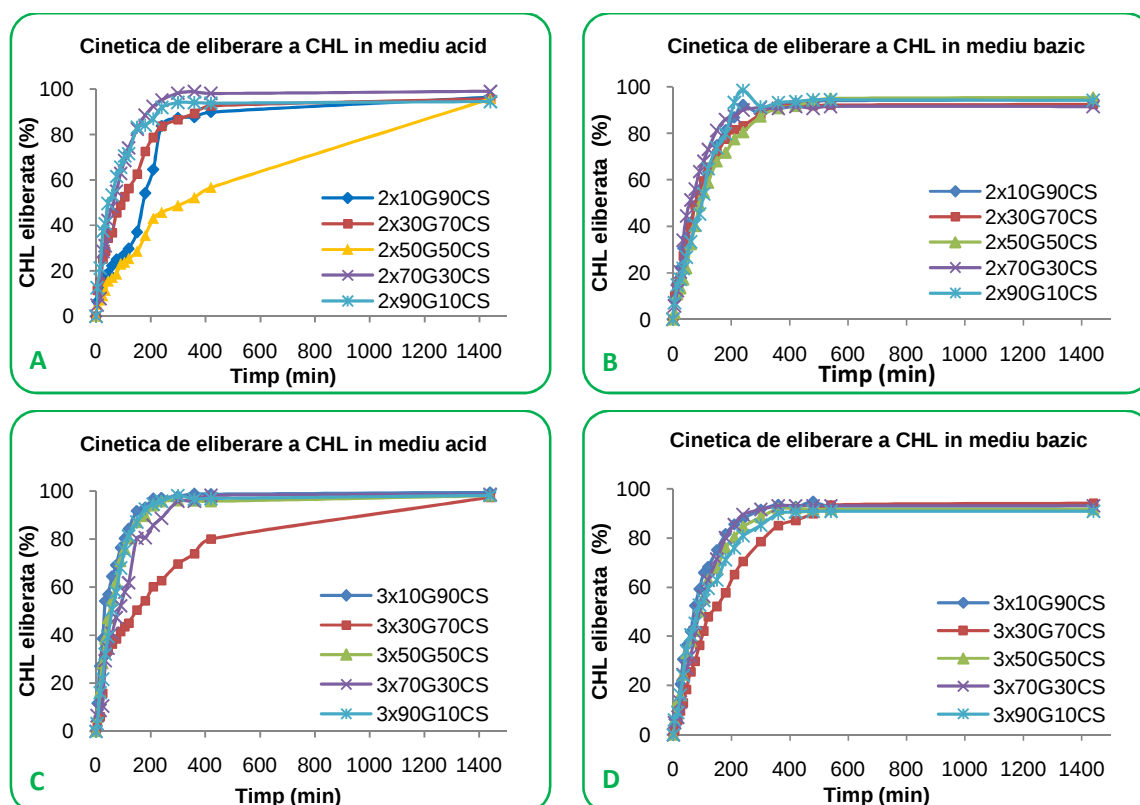
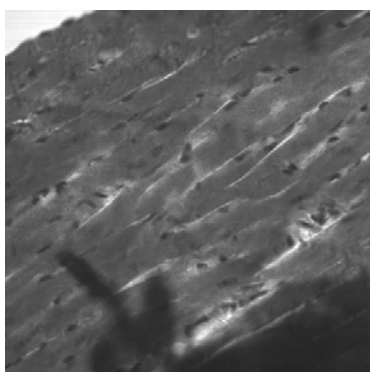


Figura IV.16. Curbele cinetice de eliberare a cloramfenicolului din particule atât în mediu acid (A și C) cât și în mediu bazic (B și D)

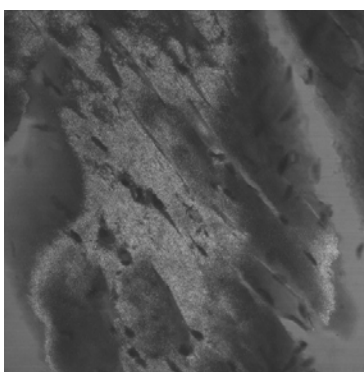
Testarea „*in vivo*” a sistemelor particulate

Testele *in vivo* realizate au adus informații foarte importante în ce privește biodistribuția particulelor marcate cu fluoresceină la nivelul organismului:

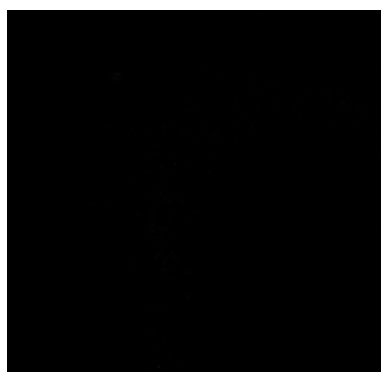
- Lotul II prezintă mai multă activitate fluorescentă pentru cord decât Lotul I;
- În ficat activitatea fluorescentă este relativ similară pentru cele două loturi;
- La nivelul creierului activitatea imunofluorescentă este mai puternică în cazul Lotului II;
- La nivelul gingiei activitatea este similară pentru cele două loturi;
- În cazul testiculului activitatea imunofluorescentă este slabă, dar similară pentru cele două loturi;
- La nivelul plămânului se remarcă activitate fluorescentă mult mai accentuată pentru Lotul II.



*Imagine compusă cord
Lotul I*



*Imagine compusă cord
Lotul II*



*Imagine cord
Lotul Martor*

Planșa 1. Microfotografiile comparative pentru cord, între lotul martor și cele două loturi investigate

Se constată că aceste nanoparticule au capacitatea de a ajunge la organe; organele care ar putea fi folosite ca și organe țintă pentru microparticule fiind creierul, cordul și ficatul.

Calea de administrare optimă pentru microparticule rămâne, pentru majoritatea organelor, calea sangvină (administrare intravenoasă).

IV.2. Sisteme particulate pe bază de Chitosan și Poli(alcool vinilic)

Acest subcapitol prezintă rezultatele experimentale obținute prin realizarea unor sisteme microparticulate pe bază de chitosan și poli(alcool vinilic). Avantajele celor doi polimeri din punct de vedere al utilizării lor în domeniul eliberării controlate de principii biologice active au reprezentat punctul de pornire pentru obținerea unui nou material capabil să îndeplinească cerințele unui sistem de eliberare controlată de medicamente pentru aplicații oftalmologice.

În literatură sunt deja publicate rezultate referitoare la amestecul chitosanului cu poli(alcoolul vinilic) [172, 173, 206-209] însă nu apar date referitoare la dubla reticulare a acestui tip de amestec.

Metoda utilizată în cadrul acestui studiu a constatat în dubla reticulare (ionică urmată de covalentă) în emulsie inversă a celor doi polimeri solubili în apă.

Rezultatele obținute prin variația unor parametri precum concentrația polimerilor în soluție, timpul de reticulare și cantitatea de agent tensioactiv vor fi prezentate în continuare. Pentru testele de încărcare/eliberare a fost folosită pilocarpina, un agent miotic utilizat pentru controlul presiunii intraoculare în glaucomul cronic simplu.

IV.2.2. Metoda de obținere

Metoda utilizată pentru prepararea microparticulelor pe bază de CS și PAV este similară metodei de obținere a microparticulor pe bază de chitosan și gelatină prezentată în capitolul IV.1. Atât cantitatea de sulfat de sodiu cât și cantitatea de AG au fost utilizate în exces.

Programul experimental realizat pentru obținerea microparticulor pe bază de CS și PAV a cuprins următoarele variabile:

- Compoziția amestecului (%PAV, %CS)
- Concentrația soluției de polimeri (%) (w/v)
- Timpul de reticulare covalentă (ore).

În tabelul IV.9. sunt redată codurile probelor, precum și valorile parametrilor variați.

Tabelul IV.9. Valorile parametrilor urmăriți și codurile probelor preparate

Codul probelor	% PAV	% CS	Concentrația soluției de polimeri (%) (w/v)	Soluție Na ₂ SO ₄ 10% (ml)	Soluție saturată de AG în toluen (ml)	Timpul de reticulare covalentă (ore)
10P90CSx0,5	10	90	0,5	2,5	5	4
20P80CS x0,5	20	80				
30P70CS x0,5	30	70				
40P60CS x0,5	40	60				
50P50CS x0,5	50	50				
10P90CSx1	10	90	1	5	10	6
20P80CS x1	20	80				
30P70CS x1	30	70				
40P60CS x1	40	60				
50P50CS x1	50	50				

Experimentele debutează cu prepararea soluției celor doi polimeri într-un pahar Berzelius de 100 ml; CS și PAV (cantități corespunzătoare raportului dorit între polimeri) sunt dizolvați în cantitatea corespunzătoare concentrației utilizate (0,5% sau 1%) în soluție de acid acetic (2%) (volumul soluției de polimeri a fost de 50 ml). La aceasta s-a adăugat ulterior cantitatea specifică de Tween80 (mg) (2% față de masa soluției de polimeri).

Amestecul se menține sub agitare magnetică până la omogenizarea completă și dizolvarea tensioactivului. Separat, într-un alt pahar Berzelius de 500 ml s-au pus 200 ml toluen în care s-a adăugat Span80 (mg) (2% față de masa toluenului), după care s-a agitat pentru omogenizarea soluției.

Prepararea emulsiei s-a realizat cu ajutorul ultraturaxului (6000 rpm) prin adăugarea în picături a fazei apoase în faza de toluen. Amestecul a fost lăsat sub agitare 10 minute, după care s-a adăugat soluția de sulfat de sodiu, de concentrație 10% (w/w), și s-a menținut agitarea încă 10 minute.

Emulsia a fost transferată rapid într-un reactor cu fund rotund montat la un agitator mecanic. S-a pornit agitarea (500 rpm) și s-a adăugat AG extrasă în toluen. Sistemul a fost menținut sub agitare încă 4/6 ore pentru definitivarea reticulării covalente (s-a ținut cont de faptul că PAV are nevoie de un timp mai mare pentru a reticula cu AG).

Pentru separarea particulelor, emulsia a fost centrifugată 30 minute la 5000 rpm după care a fost înlăturată faza organică. Sedimentul a fost spălat apoi cu acetonă, apă și hexan (de 3 ori pentru fiecare tip de solvent), pentru îndepărtarea surfactanților, a AG nereacționate, precum și a sulfatului de sodiu în exces. Ultima spălare a fost realizată în hexan, un solvent foarte volatil ce permite uscarea în aer liber la temperatura camerei.

IV.2.4. Rezultate si discutii

Amestecul celor doi polimeri a fost supus mai întâi unei reticulări ionice prin intermediul sulfatului de sodiu. La această reacție participă grupările funcționale de tip -NH₂, aflate sub forma ionului amoniu, aparținând chitosanului.

Reticularea ionică (Figura IV.20.) este declanșată prin adăugarea unei soluții concentrate de Na₂SO₄ într-o emulsie inversă de tip apă în ulei, în care raportul fazelor a fost 1:4. În acest mod a avut loc formarea particulelor de gel ce vor fi stabilizate ulterior prin reticulare covalentă cu AG.

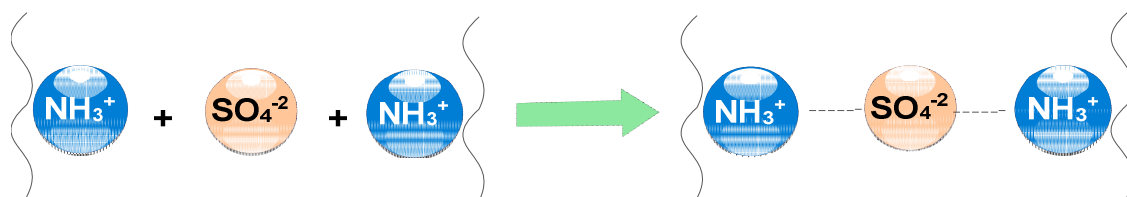


Figura IV.20. Reacția de reticulare ionică a chitosanului

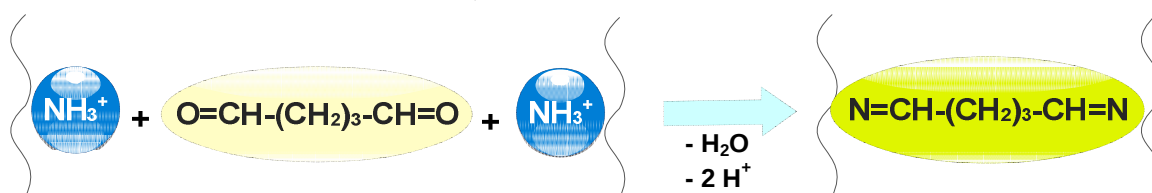


Figura IV.21. Reacția de reticulare covalentă a chitosanului

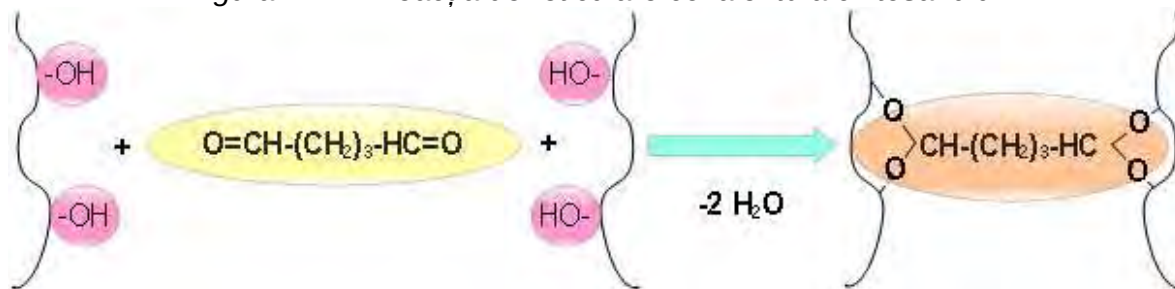


Figura IV.22. Reacția de reticulare covalentă a poli(alcoolului vinilic)

Reacția cu AG are loc atât la grupările aminice situate de-a lungul catenei chitosanului, cu formarea legăturilor iminice, cât și la grupările hidroxil ale poli(alcoolului vinilic) cu formarea unor noi legături de tip acetal; reacția are loc la suprafața particulelor de gel întrucât AG a fost extrasă în toluen, nemiscibil cu apa, și deci este normal ca aceasta să reacționeze preponderent la suprafața microparticulelor.

Reacțiile de reticulare covalentă a celor doi polimeri sunt reprezentate schematic în Figura IV.21. și Figura IV.22.

Spectroscopia FTIR

Produșii de reticulare au fost analizați prin spectroscopie FTIR.

Reticularea covalenta a chitosanului este demonstrată prin prezența benzii de absorbție caracteristică legăturilor iminice la 1638 cm^{-1} .

Prezența benzii de absorbție la 1097 cm^{-1} , caracteristică legăturilor de tip acetal, justifică reticularea covalentă a poli(alcoolului vinilic).

Banda de absorbție corespunzătoare ionilor sulfat se regăsește în spectrul probei 50P50CSx1 (619 cm^{-1}) ceea ce demonstrează reticularea ionică.

Caracteristici morfologice ale particulelor

Microparticulele pe bază de chitosan și poli(alcool vinilic) preparate prin dublă reticulare au fost analizate din punct de vedere al morfologiei atât prin studii de difractometrie laser cât și prin microscopie electronică de baleiaj, pentru determinarea formei și a aspectului de suprafață.

Tabelul IV.10. Valorile medii ale diametrelor particulelor preparate

Codul probelor	Diametrul mediu (μm)	Codul probelor	Diametrul mediu (μm)
10P90CSx0,5	3,970 $\pm$ 0,251	10P90CSx1	3,216 $\pm$ 0,279
20P80CS x0,5	3,331 $\pm$ 0,254	20P80CS x1	2,883 $\pm$ 0,121
30P70CS x0,5	2,894 $\pm$ 0,252	30P70CS x1	2,328 $\pm$ 0,273
40P60CS x0,5	2,406 $\pm$ 0,333	40P60CS x1	1,918 $\pm$ 0,267
50P50CS x0,5	2,325 $\pm$ 0,317	50P50CS x1	1,700 $\pm$ 0,274

Pentru a evita procesele de umflare și a obține astfel valori cât mai aproape de cele din stare uscată, dimensiunea microparticulelor a fost analizată în acetonă. Un rol important în obținerea unor particule sferice l-a jucat prezența substanțelor cu proprietăți tensioactive în ambele faze ale emulsiei, care au asigurat astfel o stabilizare mai bună a picăturilor de soluție apoasă și mai târziu a celor de gel ionic.

Valorile medii ale diametrelor particulelor scad cu creșterea cantității de PAV și implicit cu scăderea cantității de chitosan din amestecul inițial fapt ce se poate explica prin faptul că reticularea ionică are loc doar la CS; scăderea cantității de chitosan și păstrarea unei aceleași cantități de agent de reticulare ionică crește gradul de reticulare.

O altă observație este aceea că timpul de reticulare covalentă are și el o influență asupra diametrului mediu al particulelor; creșterea timpului de reticulare covalentă produce o scădere a dimensiunii microparticulelor.

Microscopia electronică de baleiaj a adus informații suplimentare privind forma, aspectul suprafeței și dimensiunile particulelor. În figura IV.28. sunt prezentate imaginile de microscopie electronică de baleiaj pentru o parte din probele analizate.

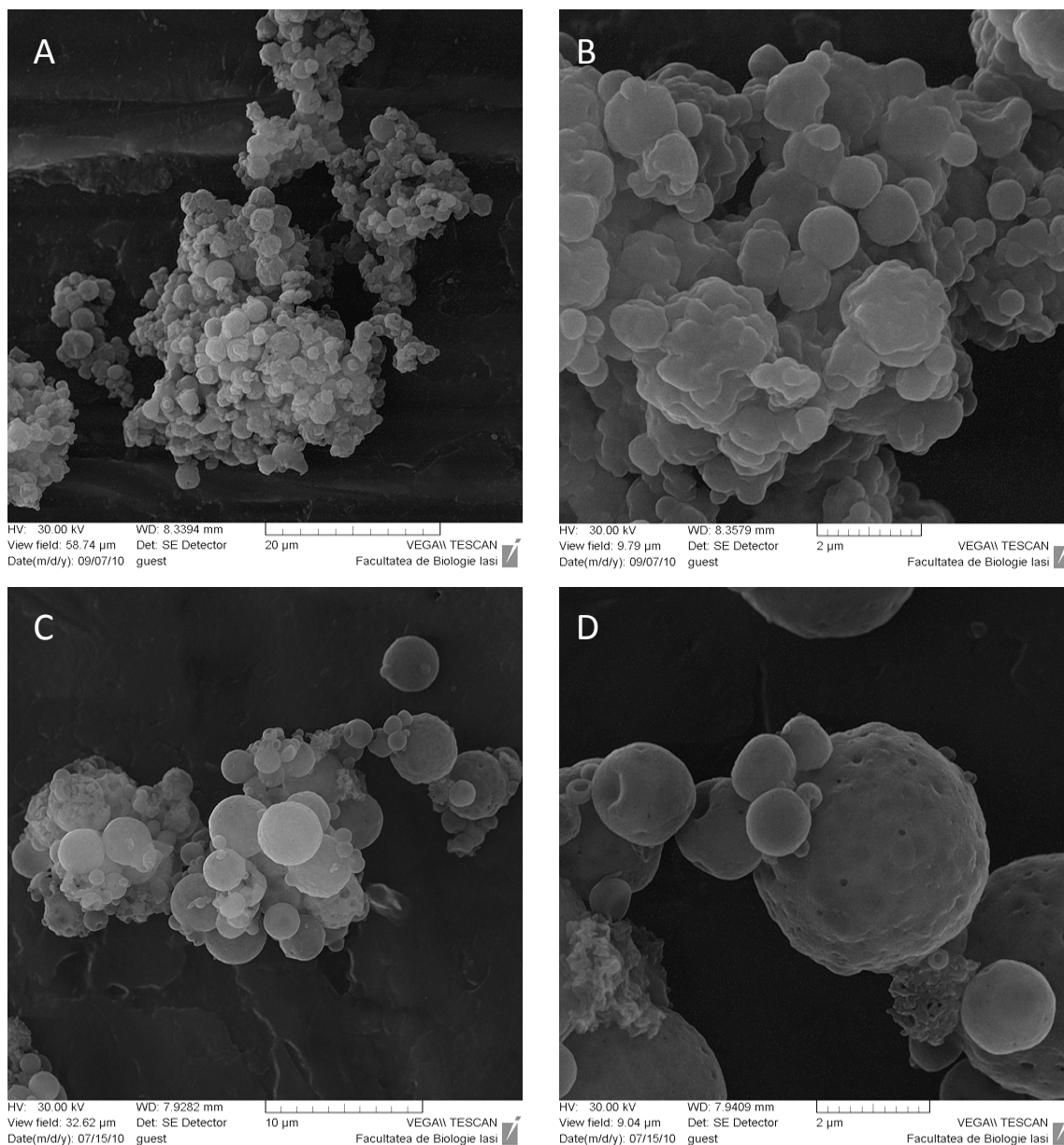


Figura IV.28. Microscopie electronica de baleiaj pentru: 50P50CS x0,5 (A și B) și 30P70CS x1 (C și D)

Din studiile de microscopie electronică s-au obținut următoarele informații:

➤ Doar particulele cu timp de reticulare covalentă mai mare prezintă o formă sferică bine definită. Efectul poate fi datorat faptului că poli(alcoolul vinilic) prezintă grupe funcționale –OH mai puțin nucleofile, și deci mai slab reactive decât cele aminice, necesitând prin urmare durate de reacție mai mari pentru a participa în număr tot mai mare la reacția cu aldehida glutarică;

-
- Particulele pe bază de CS și PAV prezintă o polidispersitate crescută,
 - Suprafața particulelor variază de la foarte neted la rugos.

Determinarea conținutului de azot din compoziția microparticulelor

Poli(alcoolul vinilic) este un polimer cunoscut pentru utilizarea ca tensioactiv în stabilizarea emulsiilor sau suspensiilor apoase de polimeri. În amestecul de polimeri studiat, el va avea deci un dublu rol: participant la formarea rețelei interpenetrante/interconectate, dar și agent stabilizant al sistemului; ca urmare, participarea sa la reacția de reticulare va fi limitată. Aceasta poate explica de ce în compoziția microparticulelor se regăsește CS-ul ca polimer majoritar.

Pe de altă parte, creșterea cantității de PAV în amestecul de plecare (respectiv reducerea cantității de CS) poate avea ca efect o mai bună stabilizare a particulelor, respectiv scăderea dimensiunilor acestora (efect logic la creșterea cantității/concentrației de tensioactiv într-o emulsie), ceea ce poate explica fenomenul semnalat anterior, aparent contrar așteptărilor.

Un alt aspect ce trebuie menționat este că reticularea ionică are loc doar la grupele aminice libere ale chitosanului ceea ce favorizează păstrarea acestuia în rețeaua polimerică nou-formată.

În compoziția microparticulelor s-au regăsit valori ale conținutului de chitosan cuprinse între 73,29 % și 93,23%, iar comparativ cu valorile de plecare se observă o creștere a acestor valori o dată cu creșterea cantității de CS în amestecul inițial de polimeri (figura IV. 29):

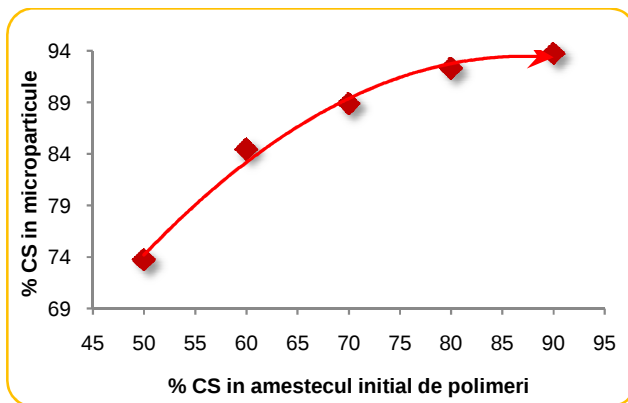


Figura IV.29. Influența compoziției inițiale a amestecului de polimeri asupra compoziției microparticulelor

Determinarea capacităților de umflare a microparticulelor în soluții apoase cu pH diferit

Capacitatea de umflare a microparticulelor preparate a fost studiată în două medii diferite: soluție tampon acetat (pH=4) și soluție tampon fosfat (pH=7,4). Cantitatea de apă inclusă în microparticule a fost cuantificată prin difractometrie Laser, măsurând variația diametrului mediu în timp.

Variația diametrului mediu în timp la umflare atât în mediu acid cât și în mediu bazic sunt prezentate în Figurile IV.30 – IV.33.

Variația diametrului microparticulelor pe bază de chitosan și poli(alcool vinilic) în mediul acid indică scăderea acestuia o dată cu scăderea cantității de chitosan din amestecul inițial; acesta este, comparativ, mai mare decât în mediul bazic. În mediul

acid are loc protonarea grupelor amino libere ale chitosanului conducând astfel la repulsii electrostatice între lanțurile polimere; o dată cu scăderea cantității de chitosan scade și intensitatea acestor respingeri, ceea ce explică valorile mai mici ale diametrului particulelor.

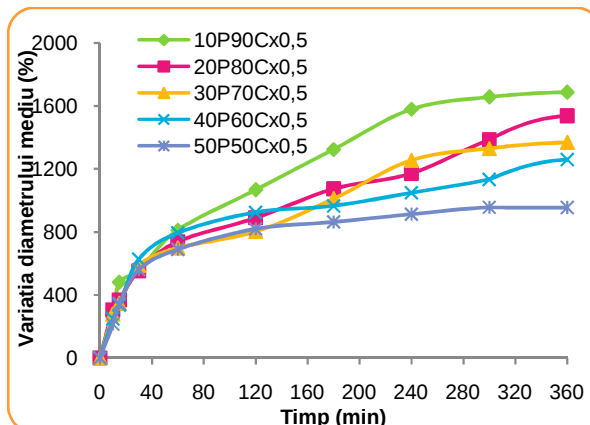


Figura IV.30. Variația diametrului mediu în timp la umflare în mediu acid pentru microparticulele obținute cu o concentrație inițială a soluției de polimeri de 0,5%

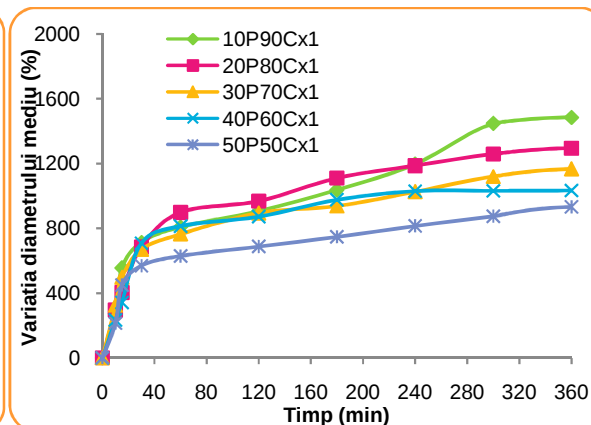


Figura IV.31. Variația diametrului mediu în timp la umflare în mediu acid pentru microparticulele obținute cu o concentrație inițială a soluției de polimeri de 1%

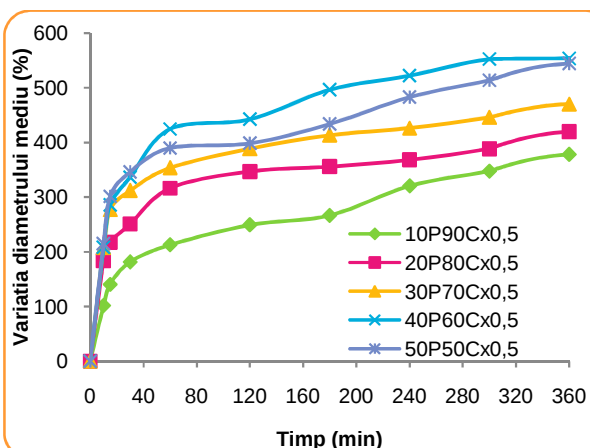


Figura IV.32. Variația diametrului mediu în timp la umflare în mediu bazic pentru microparticulele obținute cu o concentrație inițială a soluției de polimeri de 0,5%

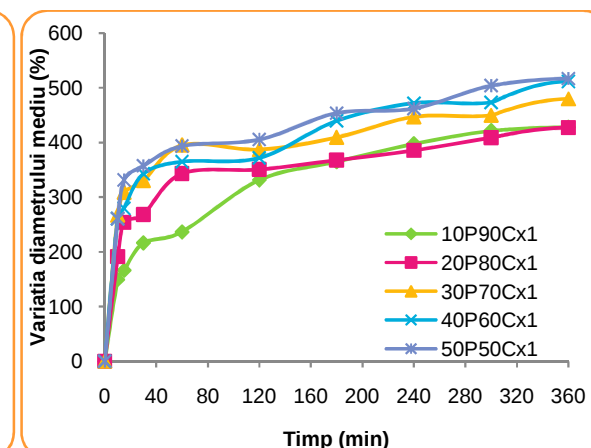


Figura IV.33. Variația diametrului mediu în timp la umflare în mediu bazic pentru microparticulele obținute cu o concentrație inițială a soluției de polimeri de 1%

Valoarea maximă a diametrului mediu la umflare al microparticulelor în mediul bazic crește o dată cu scăderea cantității de CS din amestecul inițial (Figura VI.32. și Figura IV.33.) și implicit cu creșterea cantității de PAV. Scăderea cantității de chitosan în compoziția particulelor face ca densitatea de reticulare a rețelei să se reducă, reducându-se numărul punților de reticulare ionică.

Prezența chitosanului în proporție tot mai mare în compoziția particulelor poate avea două efecte contrare:

— pe de o parte, crește densitatea de reticulare a rețelei, reducând gradul de umflare și diametrul particulelor

➤ pe de altă parte, în mediu acid produce creșterea gradului de umflare, fenomen care nu se mai întâlnește în mediul bazic.

Gradul de umflare al particulelor, atât în mediu acid cât și în mediu bazic, atinge valoarea maximă după 6 ore, pentru toate probele.

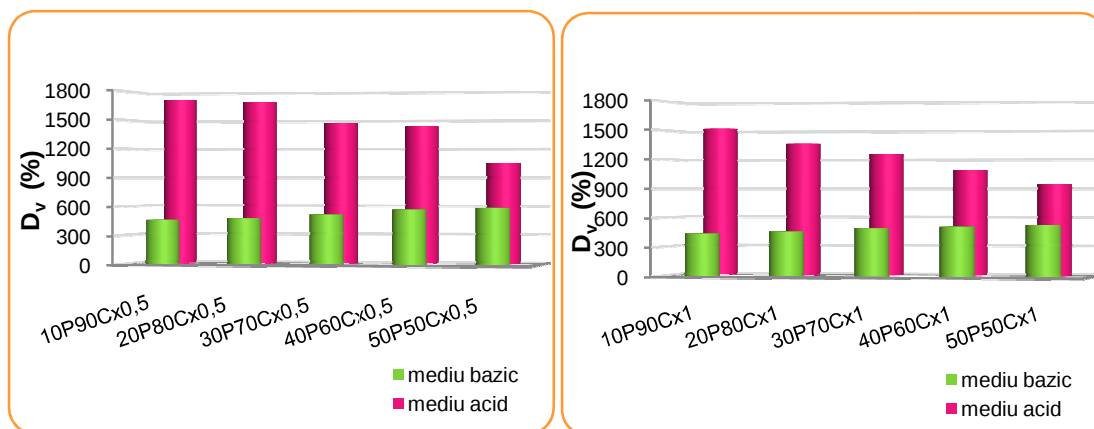


Figura IV.34. Variația maximă a diametrului microparticulelor (D_v), după 24h

Capacitatea particulelor de încărcare/eliberare a pilocarpinei

Tabelul IV.11. Cantitatea de pilocarpină încărcată în 100 mg particule

Codul probelor	mg Pn /100mg particule	Codul probelor	mg Pn /100mg particule
10P90CSx0,5	39,58	10P90CSx1	39,08
20P80CSx0,5	38,58	20P80CSx1	36,07
30P70CSx0,5	36,07	30P70CSx1	33,57
40P60CSx0,5	35,57	40P60CSx1	34,07
50P50CSx0,5	33,07	50P50CSx1	28,56

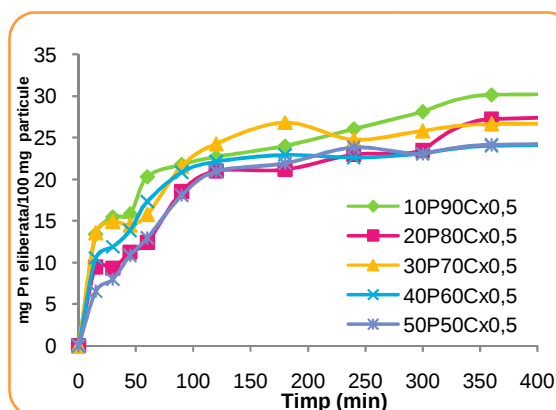


Figura IV.36. Curbele cinetice de eliberare a pilocarpinei din microparticulele obținute cu o concentrație inițială a soluției de polimeri de 0,5%

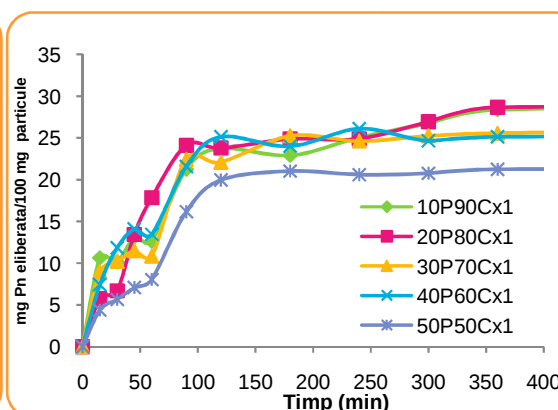


Figura IV.37. Curbele cinetice de eliberare a pilocarpinei din microparticulele obținute cu o concentrație inițială a soluției de polimeri de 1%

Cantitățile de pilocarpină încărcate după 24 ore sunt prezentate în tabelul IV.11. Observațiile ce reies din analiza rezultatele obținute sunt următoarele:

- Rezultatele obținute în cazul eliberării pilocarpinei se corelează cu cele obținute în cazul includerii;
- Eficiența de eliberare este cuprinsă între 72,03 % în cazul probei 40P60CSx0,5 și 81,88 % în cazul probei 30P70CSx1.

Concluzii generale

- Hidrogeluri pe bază de gelatină și chitosan cu aplicații biomedicale au fost preparate folosind o nouă metodă (reticulare covalentă urmată de reticulare ionică a celor doi polimeri); această metodă folosește cantități mici de glutaraldehidă, cunoscută ca fiind un agent toxic, însă suficient cât să asigure o bună stabilitate mecanică hidrogelurilor ce urmează a fi supuse reticulării ionice;
 - Proprietățile de umflare, încărcare și eliberare a hidrogelurilor pe bază de gelatină și chitosan pot fi ușor controlate prin ajustarea parametrilor studiați;
 - Testele de reologie au demonstrat că hidrogelurile obținute sunt rezistente, elastice și stabile în timp;
 - Proprietățile reologice ale hidrogelurilor analizate sunt îmbunătățite prin creșterea cantității de agent de reticulare ionic; raportul G/CS și timpul de reticulare ionic au, de asemenea, influență asupra stabilității mecanice a hidrogelurilor;
 - Toate probele au manifestat o stabilitate satisfăcătoare la temperatură.
 - Procedura de modelare în cazul hidrogelurilor pe bază de gelatină și chitosan dublu reticulate cu AG/TPP a fost condusă pe baza datelor experimentale și scopul acesteia a fost de a evalua influența condițiilor de reacție asupra gradului de umflare și a cantității de cafeină eliberate;
 - Au fost propuse o rețea neuronală cu un design simplu și metode simple de stabilire a structurii rețelei și s-au obținut predicții bune cu toate modelele neuronale considerate, cu o medie a erorii mai mică de 9%;
 - Modelele neuronale propuse au probat o bună reprezentare a procesului de sinteză a hidrogelurilor dublu reticulate pe bază de chitosan și gelatină dublu reticulate cu AG/TPP.
 - Lipozomii preparați au prezentat dimensiuni cuprinse între 1,050 și 2,407 μm , în funcție de compoziția lipidelor de plecare, cele mai mari dimensiuni le-au avut lipozomii din PC/CHOL;
 - Realizarea sistemelor complexe de tipul polimer-lipozomi-principiu activ s-a realizat prin amestecarea suspensiei de lipozomi, purtători de principiu activ, cu soluția de polimeri înainte de adăugarea agentului de reticulare covalent;
 - Studiile de microscopie confocală de fluorescență indică o distribuție uniformă a lipozomilor de tip MLV în filmele pe bază de G și CS dublu reticulate;
 - Calceina din lipozomii de tip MLV a fost eliberată în cantitate mai mică din hidrogelurile reticulate cu AG/TPP comparativ cu cantitatea eliberată din hidrogelurile reticulate cu AG/ Na_2SO_4 ;
 - Capacitatea de eliberare depinde și de compoziția lipozomi utilizați. Astfel, s-a înregistrat o cantitate mai mare de calceină eliberată din lipozomii pe bază de PC față de lipozomii pe bază de PC/CHOL
-

➤ Parametrul de integritate lipozomală este minim pentru filmele pe dublu reticulate cu AG/TPP, demonstrând astfel că eliberarea calceinei se realizează prin difuzie după ce lipozomii s-au destabilizat în interiorul hidrogelului;

➤ Se poate afirma, deci, că sistemele complexe studiate eliberează principiul activ hidrofil printr-un mecanism combinat: pe de o parte calceina este eliberată datorită destabilizării lipozomilor în mediul exterior filmului și, pe de altă parte datorită destabilizării lor în interiorul filmelor după care aceasta se eliberează prin difuzie din film în supernatant.

➤ Au fost preparate micro și nanoparticule pe bază de G și CS prin reacții de reticulare ionică cu Na_2SO_4 urmată de reticulare covalentă cu AG. Procedul a constat în reticularea în emulsie inversă a soluțiilor celor doi polimeri;

➤ Studiile de spectroscopie FTIR au demonstrat prezența celor doi polimeri în microparticulele analizate, precum și a celor două tipuri de reticulări;

➤ Particulele au prezentat dimensiuni cuprinse între $0,527\ \mu\text{m}$ și $0,897\ \mu\text{m}$;

➤ Particulele nu prezintă o formă sferică bine definită și formează aglomerate, care se redispersează însă relativ ușor în medii apoase, prin agitare mecanică sau ultrasonare;

➤ Capacitatea de interacție cu soluțiile apoase a fost determinată prin măsurarea diametrului mediu al particulelor imersate în soluții cu pH acid și bazic. Particulele s-au dovedit sensibile atât la pH acid cât și la pH bazic;

➤ Gelatina influențează variația în diametru a particulelor, determinând creșterea acestuia, datorită hidrofiliei pe care o imprimă materialului;

➤ Parametrii procesului nu influențează semnificativ dimensiunea și polidispersitatea particulelor, probabil și datorită utilizării unui exces mare de anioni sulfat, care maschează influența altor factori.

➤ Particulele se comportă similar atât la încărcarea cât și la eliberarea CHL;

➤ Testele de biodistribuție au dovedit că particulele marcate cu fluoresceină au capacitatea de a ajunge la organele studiate; organele care ar putea fi folosite ca organe țintă pentru microparticule sunt creierul, cordul și ficatul.

➤ Călea de administrare optimă pentru microparticule rămâne, pentru majoritatea organelor, calea intravenoasă.

➤ Au fost preparate microparticule pe bază de CS și PAV prin dublă reticulare (ionică și covalentă) în emulsie inversă a soluțiilor celor doi polimeri;

➤ Particulele au prezentat dimensiuni cuprinse între $1,70\ \mu\text{m}$ și $3,97\ \mu\text{m}$;

➤ Particulele prezintă o formă sferică bine definită dar formează și aglomerate, care se redispersează însă relativ ușor în medii apoase, prin agitare mecanică sau ultrasonare;

➤ Capacitatea de umflare în soluții apoase cu diferite pH-uri a fost evaluată prin măsurarea variației diametrului mediu în timp. Particulele s-au dovedit a fi sensibile atât la pH acid cât și la pH bazic;

➤ Cantitatea de chitosan din amestecul inițial de polimeri influențează variația în diametru la umflare a particulelor atât în mediul acid cât și în mediul bazic;

➤ Particulele se comportă similar atât la încărcarea cât și la eliberarea pilocarpinei.

Referințe bibliografice

112. L. Gan, S. H. Zhang, X.L. Yang, and X. HB. Immunomodulation and antitumor activity by a polysaccharide–protein complex from *Lycium barbarum*. *International Immunopharmacology*. 4(4):563-569, **2004**.
113. R.L. Reis, N.M. Neves, J.F. Mano, et al., *Natural-based polymers for biomedical applications*. Cambridge: Woodhead Publishing;832, **2008**.
114. Z. Chen, M.Y. Soo, N. Srinivasan, B. Kwong Huat Tan, and Chan SH. Activation of macrophages by polysaccharide-protein complex from *Lycium barbarum* L. *Phytother. Res*. 23(8):1116-22, **2009**.
115. Y. Chang, L. Xiao, and Q. Tang, Preparation and Characterization of a Novel Thermosensitive Hydrogel Based on Chitosan and Gelatin Blends. *Journal of Applied Polymer Science*.113:400-407, **2009**.
116. S.S. Silva, B.J. Goodfellow, J. Benesch, et al. Morphology and miscibility of chitosan/soy protein blended membranes. *Carbohydrate Polymers*.70:25-31, **2007**.
117. S. KIM, M.E. NIMNI, Y. ZHI, and HAN B. Chitosan/gelatin-based films crosslinked by proanthocyanidin. *Journal of biomedical materials research*. 75B(2):442-450, **2005**.
118. K. Solomons and J.W. Cochrane. Formaldehyde toxicity. Part II. Review of acute and chronic effects on health. *S Afr Med J*.66(3):103-6, **1984**.
119. T. Takigawa and Y. Endo. Effects of Glutaraldehyde Exposure on Human Health. *Journal of Occupational Health*. 48:75-87, **2006**.
120. J. Berger, M. Reist, J.M. Mayer, et al. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 57:19-34, **2004**.
124. S. Reinhard and H. Gareis, *Gelatine Handbook: Theory and Industrial Practice*. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 347, **2007**.
125. A.N. Jătariu (Cadinoiu), M. Danu, C.A. Peptu, G. Ioanid, C. Ibanescu, M. Popa, Ionically and covalently crosslinked hydrogels based on gelatin and chitosan, acceptat pentru publicare la *Soft materials*.
126. B. Hoffmann, D. Seitz, A. Mencke, A. Kokott, G. Ziegler, Glutaraldehyde and oxidised dextran as crosslinker reagents for chitosan-based scaffolds for cartilage tissue engineering, *J Mater Sci: Mater Med*, 20:1495-1503, **2009**.
127. L. Xiao, Z. Yu, C. Yang, H. Zhu, and D. Yu-min, Swelling Studies of Chitosan-Gelatin Films Cross-Linked by Sulfate. *Wuhan University Journal of Natural Sciences*. 9(2):247-251, **2004**.
128. T.G. Mezger, *The Rheology Handbook*, ed. Edition n. Hannover: Vincentz Network GmbH; **2006**.
129. H.A. Barnes, *Handbook of Elementary Rheology*. University of Wales: Institute of Non-Newtonian Fluid Mechanics; **2000**.
141. A.N. Jătariu, C.A. Peptu, M. Popa, C. Ibanescu, M. Danu, G. Ioanid, RESEAUX INTERPENETRES - INTERCONNECTES A BASE DE GELATINE ET CHITOSANE OBTENUS PAR DOUBLE RETICULATION, 9eme Colloque Franco-Roumain sur Polymères, 27-29 august **2009**.
142. A.N. Jătariu (Cadinoiu), C.A. Peptu, S. Curteanu, M. Popa, DOUBLE CROSSLINKED INTERPENETRATED - INTERCONNECTED NETWORKS BASED ON CHITOSAN AND GELATIN, trimisă pentru publicare la *Biomacromolecules*.
-

-
146. C. Remuñán-López and R. Bodmeier, Mechanical, water uptake and permeability properties of crosslinked chitosan glutamate and alginate films, *Journal of Controlled Release* 44(2-3): 215-225, **1997**.
148. A. ORTAN, GH. CÂMPEANU, C. DINU - PÎRVU, L. POPESCU, Studies concerning the entrapment of *Anethum graveolens* essential oil in liposomes, *Roumanian Biotechnological Letters*, 14(3):4411-4417, **2009**.
149. C. Peptu, M. Popa, and S. G. Antimisiaris, Release of Liposome-Encapsulated Calcein from Liposome Entrapping Gelatin-Carboxymethylcellulose Films: A Presentation of Different Possibilities, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 8:1-10, **2008**.
153. X. Liang, G. Mao, K.Y. Simon, Mechanical properties and stability measurement of cholesterol-containing liposome on mica by atomic force microscopy, *Journal of Colloid and Interface Science*, 278:53-62, **2004**.
171. A.N. Jătaru, M. Popa, C. A. Peptu, Two Steps Crosslinked Hydrogels Based on Natural and Synthetic Polymers - Preparation and Characterization, 23rd European Conference on Biomaterials, Tampere, 11-15 September, **2010**.
172. Y.H. Bae, and S.W. Kim, Hydrogel Delivery Systems Based on Polymer Blend Block Copolymer or Interpenetrating Networks. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 11(1-2): 109-135, **1993**.
173. R. Morita, R. Honda and Y. Takahashi, Development of a New Dissolution Test Method for an Oral Controlled Release Preparation, the PVA Swelling Controlled Release System (SCRS). *Journal of Controlled Release*, 90(1):109-117. **2000**.
175. A.K. Singla, M.L. Sharma, S. Dhawan, Nifedipine loaded chitosan microspheres: characterization of internal structure. *Biotech. Histochem.* 76: 165-171, **2001**.
176. Y. Kato, H. Onishi, Y. Machida, Application of chitin and chitosan derivatives in the pharmaceutical field. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 4: 303-309, **2003**.
178. G. Xu, X. Huang, L. Qiu, J. Wu, Y. Hu, Mechanism study of chitosan on lipid metabolism in hyperlipidemic rats, *Asia Pac J Clin Nutr.* 16 Suppl 1:313-7, **2007**.
179. S.H. Yang, C.K. Hsu, K.C. Wang, S.M. Hou and F.H. Lin, Tricalcium phosphate and glutaraldehyde crosslinked gelatin incorporating bone morphogenetic protein - A viable scaffold for bone tissue engineering, *J. Biomed. Mater. Res. - B* 74 (1): 468-475, **2005**.
180. J. Chen, Y. Maekawa, M. Asano and M. Yoshida, Double crosslinked polyetheretherketone-based polymer electrolyte membranes prepared by radiation and thermal crosslinking techniques, *Polym.* 48 (20): 6002-6009, **2007**.
181. H. Gu, L. He, L. Liu and Y.C. Jin, Construction of dermal skeleton by double cross-linking with glutaraldehyde and ultraviolet radiation, *Zhonghua ShaoShang Za Zhi*, 24 (2):114-7, **2008**.
182. S. Liang, L. Liu, Q. Huang and K.L. Yam, Preparation of single or double-network chitosan/poly(vinyl alcohol) gel films through selectively cross-linking method, *Carbohydr. Polym.* 19:718-724, **2009**.
183. J. Lee, C.K. Yeom, C.U. Kim, B.S. Kim, K.J. Kim, S.B. Oh, *Process for preparing controlled-released chitosan microcapsule*, United States Patent 6228291, **2001**.
184. K.B. Yoon, E. A. Lee, E. Jeon, Y.J. Lee, *Process for preparing porous hybrid comprising zeolite and chitosan and porous hybrid prepared thereby*, United States Patent 7601211, **2009**.
185. X. Zhao, *Process for the production of multiple cross-linked hyaluronic acid derivatives* United States Patent 7514541, **2009**.
-

186. C.A. Peptu, G. Buhus, M. Popa, A. Perichaud, D. Costin, Double Cross-linked Chitosan-Gelatin Particulate Systems for Ophthalmic Applications, *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 25 (1): 98-116, **2010**.
187. A.M. de Campos, Y. Diebold, E.L.S. Carvalho, A. Sánchez, M. José Alonso, Chitosan Nanoparticles as New Ocular Drug Delivery Systems: in Vitro Stability, in Vivo Fate, and Cellular Toxicity, *Pharmaceutical Research*, 21(5), **2004**.
192. J. Berger, M. Reist, J.M. Mayera, O. Felt, N.A. Peppas and R. Gurny, Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 57, 19-34, **2004**.
193. V.L. Gocavales, M.C.M. Laranjeira, V.T.Favere, R.C.Pedrosa, Effect of crosslinking agents on chitosan microspheres in controlled release of diclofenac sodium, *Polimeros: Ciencia e Tecnologia*, 15 (1), 6-12, **2005**.
194. L.Y. Wang, Y.H. Gu, Q.Z.Zhou, G.H. Ma, Y.H. Wan and Z.G. Su, Preparation and Characterization of Uniform-Sized Chitosan Microspheres Containing Insulin by Membrane Emulsification and a Two-Step Solidification Process, *Colloid Surface B.* 50: 26-135, **2006**.
195. A. P. Rokhade, N. B. Shelke, S. A. Patil and T.M. Aminabhavi, Novel interpenetrating polymer network microspheres of chitosan and methylcellulose for controlled release of theophylline, *Carbohydr. Polym.* 69: 678-687, **2007**.
196. X.Z. Shu and K.J. Zhu, Chitosan/gelatin microspheres prepared by modified emulsification and ionotropic gelation. *J. Microencapsul.* 18: 237-245, **2001**.
197. Y.J. Yin, F. Zhao, X.F. Song, K.D. Yao, W.W. Lu and J.C. Leong, Preparation and characterization of hydroxyapatite/chitosan-gelatin network composite, *J. Appl. Polym. Sci.* 77: 2929-2938, **2000**.
206. G. Crini, Non-Conventional Low-Cost Adsorbents for Dye Removal: A review. *Bioresource Technology*, 97(9):1061-1085, **2006**.
207. A.M. Stephen, G.O. Phillips and P.A. Williams, Food Polysaccharides and Their Applications. Marcel Dekker Inc, New York, Basel, **1995**.
208. M. Ratajska, and S. Boryniec, Physical and Chemical Aspects of Biodegradation of Natural Polymers. *Reactive and Functional Polymers*, 38(1): 35-49. **1998**.
209. X. Yang, Z. Zhu, Q. Liu, X. Chen and M. Ma, Effects of PVA, agar contents, and irradiation doses on properties of PVA/WSChitosan/Glycerol Hydrogels Made by γ -Irradiation Followed by Freeze-Thawing, *Radiation Physics and Chemistry*, 77(8): 954-960, **2008**.

Valorificarea rezultatelor cercetării

Lucrări publicate în reviste cotate ISI

1. **Anca N. Jățariu**, Marcel Popa, and Cătălina A. Peptu, Different particulate systems-bypass the biological barriers? *Journal of Drug Targeting*, 18(4): 243–253 **2010**;
 2. Eugen Barbu, Liliana Vereștiuc, Mihaela Iancu, **Anca Jățariu**, Adriana Lungu and John Tsibouklis, Hybrid polymeric hydrogels for ocular drug delivery: nanoparticulate systems from copolymers of acrylic acid-functionalized chitosan and *N*-isopropylacrylamide or 2-hydroxyethyl methacrylate, *Nanotechnology*, 20(22):225108 **2009**;
 3. **A.N. Jățariu (Cadinoiu)**, M. Danu, C. A. Peptu, G. Ioanid, C. Ibănescu, M. Popa, Ionically and covalently crosslinked hydrogels based on gelatin and chitosan, acceptată pentru publicare în *Soft Materials*.
-

Lucrări publicate în reviste BDI

1. Cătălina Peptu, **Anca Jătariu**, Anca Indrei, M. Popa, Noi tendințe în eliberarea controlată de medicamente – lipozomi imobilizați în matrici polimere”, *Revista Medico Chirurgicală a Societății de Medici și Naturaliști din Iași*, vol. 113, ianuarie-martie **2009**;
2. **Anca Jătariu**, Cătălina Peptu, Anca Indrei, M. Popa, MICRO AND NANOPARTICLES – MEDICAL APPLICATIONS, *Revista Medico Chirurgicală a Societății de Medici și Naturaliști din Iași*, vol. 113, octombrie-decembrie **2009**.

Lucrări trimise spre publicare

1. **A.N. Jătariu (Cadinoiu)**, C. A. Peptu, S. Curteanu, M. Popa, DOUBLE CROSSLINKED INTERPENETRATED – INTERCONNECTED NETWORKS BASED ON CHITOSAN AND GELATIN, trimisă spre publicare la *Biomacromolecules*;
2. **A.N. Jătariu (Cadinoiu)**, M. Iancu (Holban), A. Indrei, M. Costuleanu, M. Popa, C. A. Peptu, Ionic and Covalent Crosslinked Microparticles Based on Chitosan and Gelatin for medical applications, trimisă spre publicare la *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*.

Comunicări prezentate la manifestări științifice

1. **A.N. Jătariu**, C. A. Peptu, M. Popa, C. Ibănescu, M. Danu, G. Ioanid, RESEAUX INTERPENETRES - INTERCONNECTES A BASE DE GELATINE ET CHITOSANE OBTENUS PAR DOUBLE RETICULATION, 9eme Colloque Franco-Roumain sur Polymères, 27-29 august, **2009**;
 2. **A.N. Jătariu**, C. A. Peptu, M. Popa, C. Ibănescu, M. Danu, G. Ioanid, HYDROGELS A BASE DE GELATINE ET CHITOSANE OBTENUS PAR DOUBLE RETICULATION: SYNTHÈSE, CHARACTERIZATION, APPLICATIONS, 9eme Colloque Franco-Roumain sur Polymères, 27-29 august, **2009**;
 3. **A.N. Jătariu**, C. A. Peptu, M. Popa, Preparation And Properties Of The Two Steps Crosslinked Hydrogels Based On Gelatin And Chitosan, 22nd European Conference on Biomaterials, Lausanne, Switzerland, September 7-11, **2009**;
 4. **A.N. Jătariu**, M. Popa, C.A. Peptu, MICROPARTICULE CHITOSAN - GELATINĂ RETICULATE IONIC ȘI COVALENT, Zilele Facultății de Inginerie Chimică și Protecția Mediului, Ediția a-VI-a, “Noi frontiere în chimie și inginerie chimică”, Iași, 18-20 noiembrie, **2009**;
 5. **A.N. Jătariu**, M. Popa, C.A. Peptu, NOI HIDROGELURI DUBLU RETICULATE PE BAZĂ DE GELATINĂ ȘI CHITOSAN, Zilele Facultății de Inginerie Chimică și Protecția Mediului, Ediția a-VI-a, “Noi frontiere în chimie și inginerie chimică”, Iași, 18-20 noiembrie, **2009**;
 6. **A.N. Jătariu**, M. Popa, C. A. Peptu, Two Steps Crosslinked Hydrogels Based on Natural and Synthetic Polymers – Preparation and Characterization, 23rd European Conference on Biomaterials, Tampere, FI, September 11-15, **2010**;
 7. **A.N. Jătariu**, M. Popa, A. Indrei, C.A. Peptu, Ionic and Covalent Crosslinked Microparticles Based on Chitosan and Gelatin, 23rd European Conference on Biomaterials, Tampere, FI, September 11-15, **2010**;
-

8. **A.N. Jătariu**, M. Popa, C. A. Peptu, Drug Loaded Particles Immobilized in Polymer Hydrogels, International Symposium "Technology & Sustainable Development", Bethune, Franța, 20-23 octombrie **2010**.

Contracte de cercetare

1. Membru al echipei de cercetare în cadrul proiectului "Lipozomi imobilizați în matrici polimere reticulate - nou concept în eliberarea controlată de principii biologice active", Program **PN II – IDEI**, COD ID_353, Contract nr. **708/2009**.
