

**UNIVERSITATEA TEHNICĂ „GH.ASCHI” IAȘI
FACULTATEA DE INGINERIE CHIMICĂ ȘI PROTECȚIA MEDIULUI**



**CERCETĂRI ÎN DOMENIUL MATERIALELOR
BIOACTIVE ȘI BIODEGRADABILE PE BAZĂ DE
CELULOZĂ REGENERATĂ**

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

AUTOR:
Chim. Alina Murariu

CONDUCĂTOR ȘTIINȚIFIC:
Prof.dr.ing. Sorin Ciovică

2011-Iași

**UNIVERSITATEA TEHNICĂ "GHEORGHE ASACHI" IAȘI
R E C T O R A T U L**

Către: _____

Vă facem cunoscut că în ziua de **luni 30 mai 2011**, la ora **10:00**, în **Sala de consiliu a Facultății de Inginerie Chimică și Protecția Mediului Iași**, va avea loc susținerea publică a tezei de doctorat intitulată:

***"CERCETĂRI ÎN DOMENIUL MATERIALELOR BIOACTIVE ȘI
BIODEGRADABILE PE BAZĂ DE CELULOZĂ REGENERATĂ"***

Elaborată de doamna **ALINA MURARIU** în vederea conferirii titlului științific de doctor.

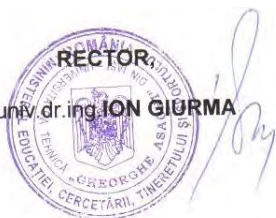
Comisia de doctorat este alcătuită din:

- | | |
|---|------------------------------|
| -Prof univ. dr.ing. DAN CAȘCAVAL
Universitatea Tehnică "Gh.Asachi" din Iași | PREȘEDINTE |
| - Prof.univ.dr.ing. SORIN CIOVICĂ
Universitatea Tehnică "Gh.Asachi" din Iași | CONDUCĂTOR ȘTIINȚIFIC |
| - Prof.univ.dr.ing. THEODOR MĂLUȚAN
Universitatea Tehnică "Gh.Asachi" din Iași | MEMBRU |
| - Prof.univ.dr.chim. VALERIU ȘUNEL
Universitatea „Al.I.Cuza” Iași | MEMBRU |
| - Conf. dr. ILEANA COJOCARU
Universitatea de Medicină și Farmacie “ Gr. T. Popa “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.

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



Secretar universitate,

Ing. Cristina Nagi

CUPRINS

Capitolul 1: STADIUL ACTUAL AL PROBLEMEI

- 1.1. Introducere
- 1.2. Polimeri naturali și funcționalizarea lor
 - 1.2.1. Celuloza
 - 1.2.2. Chitosanul
- 1.3. Polimeri sintetici
- 1.4. Materiale compozite
 - 1.4.1. Hidrogeluri
 - 1.4.2. Membrane
 - 1.4.3. Alte materiale compozite
- 1.5. Aplicații medicale ale materialelor compozite biodegradabile
 - 1.5.1. Metode de imobilizare a medicamentelor
 - 1.5.1.1. Imobilizare prin incluziune
 - 1.5.1.2. Imobilizare prin cuplare

Concluzii

CONTRIBUȚII ORIGINALE ÎN DOMENIUL MATERIALELOR BIOACTIVE ȘI BIODEGRADABILE PE BAZĂ DE CELULOZĂ REGENERATĂ

Capitolul 2: OBIECTIVELE STUDIILOR, MATERIALE ȘI METODE DE ANALIZĂ

- 2.1. Obiectivele studiilor
- 2.1. Materiale
- 2.2. Metode de analiză

Capitolul 3: FUNCȚIONALIZAREA CELULOZEI ȘI A UNOR DERIVAȚI

- 3.1. Oxidarea selectivă celulozei în mediu eterogen
- 3.2 Carboximetilarea celulozei în mediu eterogen
- 3.2. Condensarea sulfatazolului pe carboximetilceluloză

Concluzii

Capitolul 4: BIODEGRADABILITATEA MATRICII CELULOZICE ÎN SIMULATED BODY FLUID

Concluzii

Capitolul 5: COMPOZITE CELULOZĂ REGENERATĂ - COMPUȘI CU ACTIVITATE BIOLOGICĂ

Concluzii

Capitolul 6 : ACIDUL POLIASPARTIC – AGENT DE RANFORSARE A MATRICII CELULOZICE ȘI DE LEGATURĂ ÎNTRE MATRICE SI COMPUȘI BIOACTIVI

- 6.1. Obținere, structură și proprietăți
- 6.2. Caracterizarea acidului poliaspartic sintetizat
- 6.3. Copolimeri ai acidului poliaspartic
- 6.4. Prepararea unui material compozit celuloză-acid poliaspartic.

Concluzii

CONCLUZII FINALE

BIBLIOGRAFIE

LISTA LUCRĂRILOR PUBLICATE

INTRODUCERE

Stadiul actual al cercetărilor în domeniu.

Circumscrie eforturilor de lărgire a posibilităților terapeutice și chirurgicale în cazul unor maladii grave, cercetările referitoare la compuși macromoleculari de interes farmaceutic și biomedical sunt de dată relativ recentă și au atras considerabil atenția specialiștilor [1].

Fundamentul acestor cercetări este legat de interdependența dintre fenomenele chimice, fizice, biologice și medicale, un rol important revenind, în acest context, chimiei polimerilor.

Procese biologice sunt controlate și reproduse de structurile macromoleculare ale mediatorilor specifici. Exemple în acest sens furnizează fenomenele genetice, imunitare, enzimatică, condiționate de marea specificitate a structurilor polimere a receptorilor celulari [2].

Problematica asimilării compușilor macromoleculari în terapeutică este complexă datorită situării acestor compuși la limita a două domenii: cel al chimiei polimerilor și cel medical, în special farmacologic [3].

Prospectarea polimerilor în farmaceutică și elaborarea unor scheme raționale de terapie cu astfel de compuși, pe baza relațiilor dintre structura chimică și acțiunea biologică, presupun aplicarea unor metode de studiu dependente de natura interacțiunilor polimeri-biopolimeri. Această problemă este de iminentă actualitate și cu certe perspective de viitor [4].

Soluții convenabile ar oferi realizarea de compuși caracterizați prin existența, într-o entitate macromoleculară, a unei combinații optime de funcțiuni, destinată satisfacerii cerințelor de biocompatibilitate, solubilitate, respectarea pH-ului biologic, stimulare catalitică, toxicitate redusă, etc.

Fără a fi încă elucidate toate mecanismele de acțiune ale polimerilor biologic activi și perfectate tehnologiile de obținere, rezultatele experimentărilor clinice atestă valoarea deosebită a unor compuși macromoleculari naturali și sintetici ca medicamente propriu-zise sau ca adjuvanți pentru imobilizarea unor substanțe biologice active.

Grupele funcționale pot fi combinate cu diferiți receptori specifici pe proteine, la suprafața celulelor sau în zona lipidelor pentru a realiza diferite legături transportoare de medicamente [6].

În eliberarea controlată, interesul dominant constă în creșterea timpului de eficiență a dozei terapeutice într-o singură administrare, minimizând concentrațiile dozelor, adesea prea mari.

Avantajul eliberării controlate constă, între altele, în capacitatea de a elibera medicamentul în mod selectiv, concentrat pe zone specifice, reducându-se astfel toxicitatea la nivelul metabolismului.

Contribuțiile personale s-au concentrat asupra unor aspecte legate de conferirea biodegradabilității celulozei regenerată, bioactivarea acesteia prin funcționalizare sau includere de principii bioactive, precum și realizarea unor materiale compozite celuloză-acid poliaspartic (și copolimeri ai acestuia) cu proprietăți reologice, de sorbție și bioactivitate adecvate utilizării ca implant pentru regenerare tisulară.

În acest sens s-au delimitat următoarele obiective:

- funcționalizarea celulozei și a unor derivați
- caracterizarea biodegradabilității matricii celulozice funcționalizate în simulated body fluid
- obținerea unor materiale compozite celuloză regenerată - compuși cu activitate biologică
- utilizarea acidului poliaspartic ca agent de ranforsare a matricii celulozice și de legătură între matrice și compuși bioactivi.

Teza de doctorat este structurată pe 6 capitole, conține 160 de pagini, 69 de figuri, 33 de tabele și 322 de referințe bibliografice. Cercetările efectuate în cadrul tezei de doctorat au fost materializate prin publicarea a 2 articole cotate ISI, 5 lucrări publicate în reviste și volume recunoscute CNCSIS, 4 lucrări publicate în volumele unor manifestări științifice interne și internaționale, 3 participări la manifestări științifice interne și internaționale, participarea la bursa de studii doctorale în cadrul programului Marie Curie Training Sites în perioada iunie 2004-iunie 2005, contract HPMT-CT-2001-00379 din proiectul Modern Polymeric Materials for Environmental Application Studies, la Technical University of Krakow, Poland, și prin publicarea unei lucrări în baza de date texonline.ro recunoscută de CNCSIS, în cadrul proiectului TD 484, program de finanțare PN II (2007-2013) contract nr. 522/01.10.2007

Rezumatul prezentat cuprinde, într-o formă sintetică, rezultatele originale obținute. S-a păstrat numerotarea din teza de doctorat a capitolelor, figurilor, tabelelor și referințelor bibliografice.

PARTEA A-II-A

CONTRIBUȚII ÎN DOMENIUL MATERIALELOR BIOACTIVE ȘI BIODEGRADABILE PE BAZĂ DE CELULOZĂ REGENERATĂ

CAPITOLUL 3

FUNCȚIONALIZAREA CELULOZEI ȘI A UNOR DERIVAȚI

Pe baza informațiilor din literatura de specialitate referitoare la posibilitățile de oxidare a celulozei în vederea dobândirii biodegradabilității *in vivo* se adoptă procedeul oxidării controlate a grupelor hidroxil de la C(2) și C(3), la parametri care să nu afecteze dramatic morfologia și proprietățile mecanice ale matricii.

3.1 Oxidarea selectivă celulozei în mediul eterogen

Oxidarea selectivă la grupele OH primare conferă celulozei biodegradabilitate, proporțional cu conținutul de grupe carboxil introduse, dar sensibilitatea deosebită la apă și rezistența la compresiune a matricii o recomandă doar ca agent hemostatic [20].

Oxidarea selectivă a grupelor OH secundare cu acid periodic sau sărurile sale cu formare de 2,3-dialdehidceluloză este cel mai selectiv procedeu de oxidare a celulozei, gradul de modificare putând fi controlat cantitativ prin durata reacției [20,261].

Prepararea 2,3-Dialdehid celulozei (2,3-DAC)

Conținutul de grupe aldehydice în matricea celulozică modificată, determinat prin reacție Cannizzaro, este dependent de durata reacției și de raportul molar

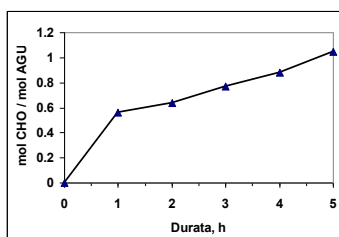
celuloză/ NaIO_4 . Rezultatele sunt menționate în tabelul 3.1 și figura 3.1, conținutul de grupe aldehydice fiind exprimat în mol / mol AGU.

Tabelul 3.1
Conținutul de grupe aldehydice obținute în reacția de oxidare

Proba	Timp de reacție, ore	mol CHO/mol AGU
1	1	0,559
2	2	0,635
3	3	0,770
4	4	0,880
5	5	1,050

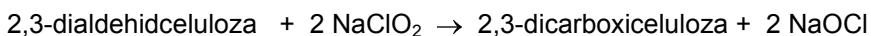
Obs.: AGU / unitatea structurală anhidroglucoză

Figura 3.1 *Cinetica reacției de oxidare a celulozei*



În conformitate cu particularitățile reacțiilor eterogene, domeniile accesibile reactivului se modifică cu viteză mai mare. În acelaș timp, se constată că durata reacției controlează cu destulă acuratețe gradul de oxidare a celulozei.

Prepararea 2,3-Dicarboxicelulozei (2,3-DCOC)



A fost utilizată dialdehidceluloza obținută în urma oxidării timp de o oră , respectiv 2 și 3 ore

Condițiile celei de-a doua etape a oxidării implică transformarea aproape completă a grupelor aldehydice în grupe carboxilice, aspect confirmat prin determinarea potențimetrică a grupelor carboxil (tabelul 3.2, fig. 3.2 și 3.3) și prin spectroscopie FTIR (fig. 3.4). Valorile din tabelul 3.2 corespund duratei de 1-3 ore de oxidare a celulozei la 2,3-dialdehidceluloză, respectiv o oră de contact cu H_2O_2 .

Tabelul 3.2
Conținutul de grupe carboxil obținut în reacția de oxidare

Proba	mol COOH/mol AGU	COOH/CHO
1	0,538	0,962
2	0,647	1,019
3	0,800	1,038

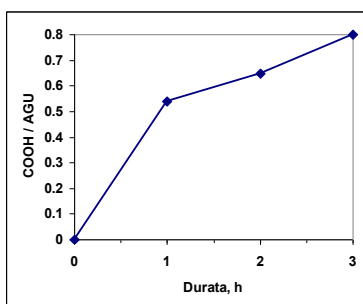


Figura 3.2.:
Oxidarea 2,3 DAC la 2,3-DCOC
funcție de timpul de reacție

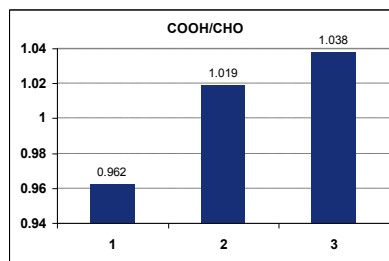
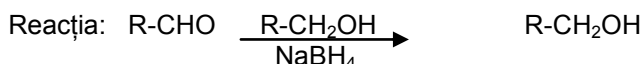


Figura 3.3
Gradul de transformare al
grupelor CHO în COOH

Prepararea 2,3-diolcelulozei (2,3-DALC)

Prin reducerea grupelor aldehydice ale 2,3-dialdehidcelulozei se dobândesc unele proprietăți care favorizează utilizarea matricii ca material biocompatibil și biodegradabil: rezistență sporită la tratamentul de sterilizare hidrotermică și la pH, conservare mai bună a proprietăților mecanice și a porozității.



3.2. Carboximetilarea celulozei și funcționalizarea CMC cu sulfatazazol

Carboximetilarea matricii (celuloză sub formă de spongi) s-a realizat în condiții experimentale care să protejeze morfologia inițială a acesteia. O-alkilarea este confirmată prin spectrofotometrie FTIR și prin determinarea gradului de substituție prin metode gravimetrice.

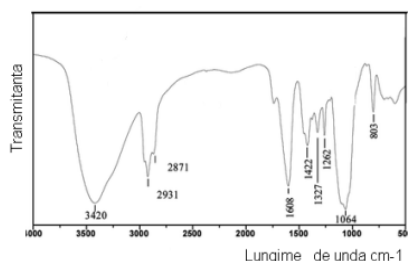


Figura 3.6
Spectrul FTIR al carboximetilcelulozei obținute

Condensarea grupărilor carboxilice sau hidroxilice ale polymerului cu grupe funcționale complementare ale sulfatazazolului s-a realizat în prezența diciohexilcarbodiimidei [268,269] în mediu de acetat de etil, la temperatura de 0-5 °C.

Analiza FTIR (fig. 3.7) confirmă reacția de condensare prin prezența legăturilor amidice (la 1612 cm⁻¹), eterice (la 1070 cm⁻¹) și a structurii aromatice.

CONCLUZII

1. Pentru dobândirea biodegradabilității *in vivo* s-a modificat celuloza regenerată sub formă de spongi prin oxidare selectivă obținându-se 2,3-dialdehidceluloză, 2,3-dicarboxiceluloză și 2,3-diolceluloză în condiții care să nu afecteze dramatic morfologia și proprietățile mecanice ale matricii. Formarea derivaților a fost confirmată prin determinări analitice și prin spectroscopie FTIR.
2. Gradul de modificare este cuprins între 0,6 – 1,05 mol 2,3-DAC/ mol AGU în prima etapă de oxidare. Viteza de reacție este dependentă de accesibilitatea celulozei, iar conținutul în grupe CHO poate fi prestabilit prin durata tratamentului.
3. Transformarea 2,3-DAC în 2,3-DCC este completă, participarea C(6) la reacția de oxidare în mediu de $\text{NaClO}_2 / \text{H}_2\text{O}_2$ nefiind însă exclusă.
4. Pentru valorificarea unor potențiale avantaje oferite matricii celulozice ca implant a fost sintetizată 2,3-DALC prin reducerea grupelor CHO la grupe hidroxil.
5. În scopul imobilizării de compuși bioactivi cu funcții terapeutice a fost utilizată carboximetilceluloza sintetizată pe matricea celulozică, pe care, printr-o reacție de condensare activată de dicitlohexilcarbodiimidă, s-a grefat sulfatiazol.

CAPITOLUL 4 BIODEGRADABILITATEA MATRICII CELULOZICE ÎN SIMULATED BODY FLUID

Biocompatibilitatea celulozei cu țesuturile vii justifică aplicațiile potențiale în domeniile medical și farmaceutic. Alături de alte materiale hidrophile și cu porozitate ridicată, a fost intens investigată ca transportor de compuși bioactivi cu funcții terapeutice, suport pentru culturi de celule sau ca implant pentru regenerare de țesuturi [268-274].

Dacă pentru unele utilizări în aceste domenii nu este obligatorie biodegradabilitatea, această proprietate devine indispensabilă în cazul implantării.

Predictibilitatea biodegradării, alături de alte caracteristici (ex. proprietăți fizico-mecanice, porozitate) poate fi asigurată prin valori adecvate ale gradului de polimerizare, cristalinității și prin nivelul unor modificări chimice ale polimerului. Din acest punct de vedere, celuloza regenerată sub formă de spongi poate fi materie primă ideală.

Aplicațiile celulozei oxidate la C(6) sunt frecvente în practica chirurgicală prin calitățile hemostatice recunoscute și pentru funcția de barieră în prevenirea postchirurgicală a adeziunii [20,247,255,275]

Depolimerizarea excesivă în timpul oxidării și rapiditatea resorbției în plasma sanguină sunt însă inadecvate pentru implanturi.

În acest context, 2,3-DAC și 2,3-DCOC posedă avantajele prezervării mai bune a caracteristicilor matricii și a unui control riguros al gradului de oxidare care asigură biodegradabilitatea. Aceleași avantaje aparțin potențial și derivatului 2,3-DALC.

Investigațiile *in vitro* ale materialelor destinate regenerării țesuturilor osoase au reliefat importanța soluțiilor având compoziție asemănătoare lichidului limfatic, denumite generic "simulated body fluid, SBF". Ele au permis aprofundarea mecanismelor de mineralizare și de biosorbție pentru un număr mare de produse de

natură anorganică sau compozite cu participare de polimeri naturali și sintetici [276-281].

Celuloza regenerată sub formă de spongi, funcționalizată, a fost imersată în simulated body fluid (SBF) având compoziția precizată în tabelul 4.2 la 37 °C pentru o perioadă de 7-30 de zile. Conținutul de material “solubilizat” a fost determinat prin cântărirea rezidului rezultat după filtrare (diametrul porilor 0,42 μm) și prin analiza carbonului organic din filtrat, iar compoziția sa – prin cromatografie de gaz și SEC.

Rezultatele sunt sistematizate în tabelul 4.3 și în figurile 4.1 – 4.6

Tabelul 4.3
Biodegradarea matricii celulozice funcționalizate în SBF

Proba	Durata reacției pentru obținerea:		Durata imersării în SBF, zile	Material solubilizat, %	
	2,3-DAC, h	2,3-DCOC, h		Filtrare	Analiză C org.
O1	3		7	18,25	17,25
			15	21,16	25,58
			30	22,50	31,64
O2	1	4	7	30,94	31,01
			15	32,87	32,93
			30	34,17	36,88
O3	2		7	36,21	40,96
			15	38,99	43,76
			30	40,23	44,22
O4	2	3	7	47,49	48,85
			15	56,02	60,61
			30	64,63	72,63
O5	3	4	7	69,76	76,78
			15	71,23	78,31
			30	71,60	78,84
DALC	1		14	32,42	-
	1		21	35,30	-
			30	36,18	-

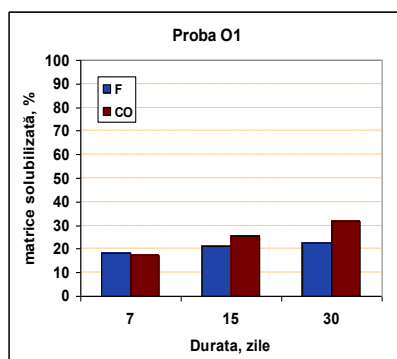


Figura 4.1

*Degradarea 2,3-DCOC în SBF,
proba O1*

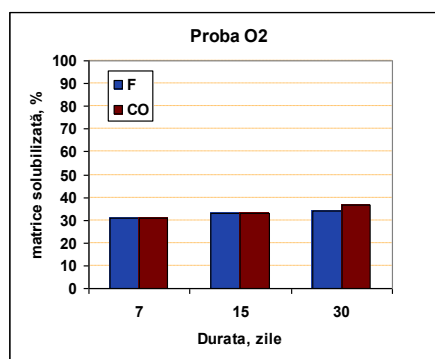


Figura 4.2

*Degradarea 2,3-DCOC în SBF
proba O2*

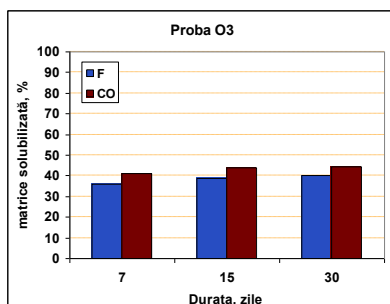


Figura 4.3

Degradarea 2,3-DCOC în SBF, proba O3

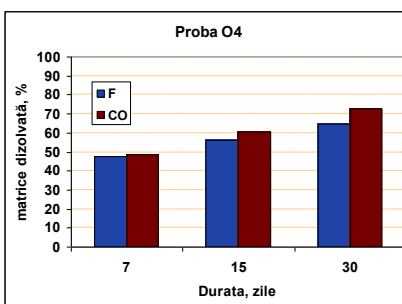


Figura 4.4

Degradarea 2,3-DCOC în SBF, proba O4

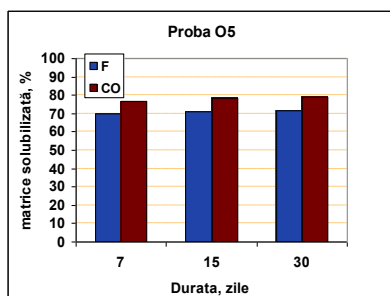


Figura 4.5

Degradarea 2,3-DCOC în SBF, proba O5

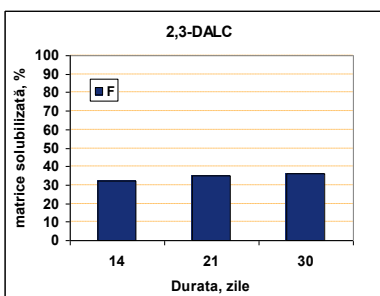


Figura 4.5

Degradarea 2,3-DALC în SBF

Analiza rezultatelor experimentale confirmă biodegradarea în SBF a celulozei modificate. Pentru parametrii experimentali utilizați, celuloza este solubilizată *in vitro* în proporție de 20-80%, funcție de durata ambelor etape de oxidare. Principal, creșterea duratei de oxidare în fiecare etapă face posibilă prestabilirea nivelului acestei caracteristici pentru diverse aplicații.

În acest context, semnalăm diferențele în aprecierea solubilității prin cele două metode utilizate; ele se pot datora în parte compoziției SBF sau a gradientului de densitate a lichidului, realizat pe durata analizei carbonului organic.

Este demonstrată posibilitatea conferirii biodegradabilității în SBF prin reducerea grupelor CHO la grupe –OH cu desfacerea ciclului piranozic. Pentru aceleași condiții de oxidare a matricii

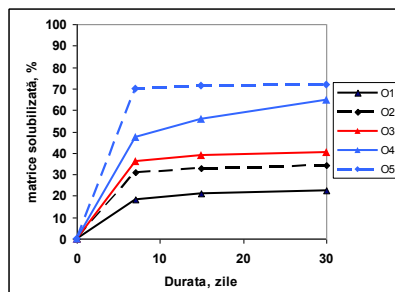


Figura 4.6
Cinetica solubilizării în SBF a celulozei oxidate

celulozice în etapa întâia de modificare, solubilitatea 2,3-DALC este chiar mai mare cu cca. 30% decât cea a 2,3-DCC.

Cinetica biodegradării celulozei oxidate în SBF indică faptul că inițial viteza de degradare a matricii este mare, probabil din cauza diferențelor între gradul de modificare a celulozei în regiunile amorse și cele cristaline ale polymerului (fig. 4.6).

Tabelul 4.4: *Analiza GC a fracțiilor celulozei oxidate solubilizate în SBF*

Proba	Durata imersării în SBF, zile	Monomeri %	Dimeri %	Trimeri %	Total Vs. Vs.matrice %	solubile %
O1	7	6,58	1,10	-	7,68	1,40
	15	7,51	0,52	0,24	8,27	1,75
	30	5,60	0,44	-	7,40	1,36
O2	7	11,30	32,34	7,13	50,77	21,07
	15	11,99	21,66	8,95	42,60	19,61
	30	22,09	16,77	9,78	48,64	23,17
O3	7	4,20	1,00	-	5,20	1,61
	15	5,05	0,58	-	5,63	1,85
	30	4,76	0,45	-	5,21	1,73
O4	7	4,06	0,32	-	4,38	1,49
	15	3,89	0,26	-	4,15	1,42
	30	-	-	-	-	-
O5	7	10,31	9,30	8,83	28,44	19,84
	15	12,83	8,39	9,12	30,39	21,65
	30	15,59	6,75	8,91	31,25	22,37
DALC	15	10,17	10,20	2,96	28,55	10,33
	30	14,56	33,21	3,95	60,05	19,47

O durată de 4 ore a reacției de oxidare a 2,3-DAC la 2,3-DCC (probele O2 și O5) determină formarea în proporție mare a fracțiunilor jos moleculare (monotrizaharide) în materialul solubilizat, care pot fi ușor resorbibile în organism. Aceeași particularitate se remarcă și în cazul derivatului 2,3-DALC. Pentru celelalte probe se constată absența trimerilor.

Aceste particularități în comportare sunt confirmate prin analiză SEC, cu folosirea SBF ca agent de transport (tabelul 4.5)

Tabelul 4.5
Caracterizarea fracției solubilizate în SBF

Proba	Durata imersării în SBF, ore	Mn	GP _n
O1	7	6338	39
	15	6822	42
	30	6848	42
O2	7	2051	12
	15	1990	12
	30	1926	12
O3	7	6555	40
	15	6080	37
	30	5407	33
O4	7	6356	39
	15	5992	37
	30	-	-
O5	7	1436	9
	15	1481	9
	30	1484	9
DALC	15	1072	6
	30	1671	10

CONCLUZII:

1. Biodegradarea matricii de celuloza oxidată (spongi) in SBF la 37°C este dependentă de conținutul de grupe carboxil, de condițiile de reacție din a doua etapă a oxidării și de durata imersării în SBF. Gradul de biodegradare al matricii oxidate este cuprins între 20% și 80%.

2. Reducerea grupelor aldehidice la grupe hidroxil cu formare de 2,3 diolceluloză poate asigura un nivel al biodegradabilității comparabil (sau superior) cu cel al oxixelulozei.

3. Se evidențiază două viteze de biodegradare ale matricii; viteza de biodegradare mai mare la inceputul contactului cu SBF poate fi explicată prin particularitățile reacțiilor eterogene aplicate și prin nivelul modificărilor realizate.

4. Se confirmă mecanismul de biodegradare specific celulozei oxidate cu NaClO₂ / H₂O₂ în a doua etapă de oxidare: fragmentarea catenelor este dominantă în raport cu scindarea legăturilor de hidrogen intermoleculare.

5. Optimizarea duratei de oxidare a celulozei în fiecare etapă a procesului face posibilă prestabilirea nivelului de biodegradabilitate și destinația aplicațiilor medicale.

Capitolul 5

COMPOZITE CELULOZĂ REGENERATĂ - COMPUȘI CU ACTIVITATE BIOLOGICĂ

S-au utilizat compozite polimerice pe bază de celuloză regenerată având porozitate ridicată (spongi) [304].

Includerea compușilor bioactivi (sulfatiazol, nistatin și cloramfenicol) s-a realizat prin solubilizarea lor într-un solvent organic biocompatibil (etanol), urmată de imersarea matricii celulozice în această soluție [288-291].

Rezultatele experimentale sunt prezentate în tabelul 5.1:

Tabelul 5.1. Rezultatele experimentale ale procedurii de includere

Medicament inclus	Nr. Probei	% medicament inclus în matrice
cloramfenicol 0.5%	1	88.68
	2	88.70
	3	87.63
cloramfenicol 1.2%	4	86.69
	5	89.72
	6	87.94
cloramfenicol 2%	7	83.97
	9	86.22
sulfatiazol 0.5%	10	86.08
	11	89.08
	12	85.44
sulfatiazol 1.2%	13	86.90
	14	88.31
	15	90.88
sulfatiazol 2%	16	85.48
	17	86.34
	18	87.52
nistatin 0.5%	19	87.64
	20	86.68
nistatin 1.2%	21	93.02
	22	93.02
nistatin 2%	23	92.52
	24	93.86

Cantitatea de compus bioactiv inclusă în matricea celulozică depinde de structura și forma moleculei, de concentrația sa în soluția alcoolică, precum și de porozitatea, structura și forma cavităților din matricea celulozei regenerată.

Determinarea cantității de substanțe medicamentoase eliberată

♦ Eliberarea cloramfenicolului și nistatinului

Eliberarea cloramfenicolului și nistatinului din matrice s-a realizat prin solubilizare în apă distilată, cantitatea transferată din matrice fiind determinată prin spectroscopie UV-VIS funcție de durata procesului de eliberare.

Valorile stabilite, exprimate în % față de cantitatea inclusă inițial în matrice, sunt prezentate în tabelele 5.2 – 5.3 și în fig. 5.5 – 5.6

Tabel 5.2 . Cinetica procesului de eliberare a cloramfenicolului

Timp(min)	30	60	90	120	150	180	240
Proba 6	58,31	90,77	96,01	99,88	95,87	95,28	96,74
Proba 9	33,63	56,98	68,29	70,7	80,2	83,45	85

Tabel 5.3 Cinetica eliberării nistatinului

Timp, min	30	60	90	120	150	180	240
proba12	23	26,6	30,63	30,77	32,32	31,94	34,67
proba 15	62,1	84,83	93,76	98,36	100	100	100

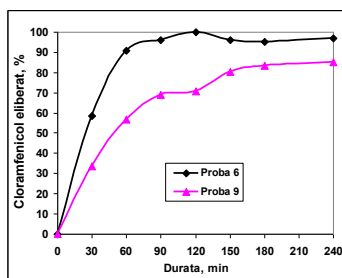


Figura 5.6.:
Eliberarea cloramfenicolului
din matricea celulozei

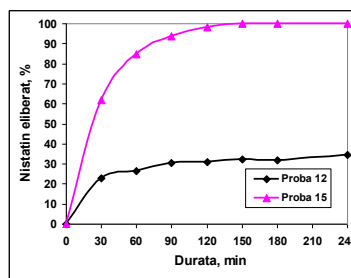


Figura 5.6.:
Eliberarea nistatinului din
matricea celulozei

• Eliberarea sulfatiazolului

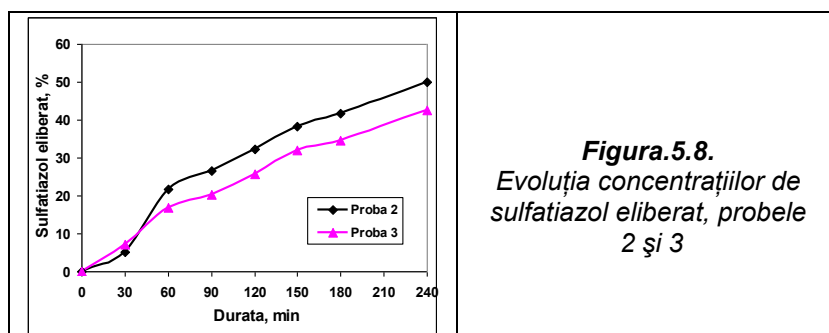
Pentru determinarea cantității de sulfatiazol cedate s-a utilizat detecția HPLC și UV-VIS cuantificată prin metoda standardului intern. Rezultatele sunt menționate în tabelele 5.4 – 5.5 și în figura 5.8.

Tabelul 5.4
Valorile cedării sulfatiazolului, proba 2

Proba 2							
Timp de extracție (min)	30	60	90	120	150	180	240
Compus bioactiv cedat (%)	5,18	21,71	26,52	32,41	38,31	41,72	49,88

Tabelul 5.5.
Valorile cedării sulfatiazolului, proba 3

Proba 3							
Timp de extracție (min)	30	60	90	120	150	180	240
Compus bioactiv cedat (%)	7,87	16,89	20,39	25,77	31,87	34,68	42,62



CONCLUZII:

- 1.S-a obținut un compozit pe matrice de celuloză regenerată cu porozitate și hidrofilie ridicate prin includere fizică de compuși bioactivi având potențiale aplicații în design-ul încălțămintei pentru tratarea piciorului diabetic sau ca element profilactic la nivelul piciorului.
2. Substanțele medicamentoase incluse: nistatin, cloramfenicol și sulfatiazol fac parte din clasa antimicoticelor, antibioticelor și sulfamidelor.
3. Gradul de retenție este dependent de porozitatea și distribuția dimensională a porilor matricii celulozice, de volumul molecular și de solubilitatea în etanol a compușilor bioactivi.
4. Cantitatea de medicament eliberată este proporțională cu cea inclusă, iar cinetica eliberării din matricea celulozei regenerate este specifică fiecăruia, depinzând de aceiași factori care asigură includerea.

CAPITOLUL 6

ACIDUL POLIASPARTIC – AGENT DE RANFORSARE A MATRICII CELULOZICE ȘI DE LEGATURĂ ÎNTRE MATRICE ȘI COMPUȘI BIOACTIVI

Aminoacizii au funcții importante în organism, fiind utilizați în construcția peptidelor ca furnizori de structură, transport, cataliză sau intermediari în substratul metabolic.

Pot fi ca transportori de informație sub forma unor substanțe excitotoxice sau enzimatic. În ansamblu, aminoacizii contribuie la îmbunătățirea parametrilor funcționali ai organismului: pH-ul, tăria ionică, potențialul redox, electric și osmotic la nivel celular.

Unele polipeptide sintetice, cum ar fi acidul poliaspartic și derivații săi, au capacitatea de a înhăta nefrotoxicitatea provocată de administrarea antibioticelor cu structură aminoglicozidică.

Proprietățile sale deosebite îl recomandă ca substrat temporar al grefelor cutanate în tratamentul arsurilor sau ca substrat intermediar în dezvoltarea culturilor celulare în implanturile ortopedice.

Obținerea acidului poliaspartic

Acidul poliaspartic poate fi sintetizat sub două forme: una ciclică, anhidră, și o formă liniară, ca acid α,β -poliaspartic. Schema generală de obținere este prezentată în figura 6.1:

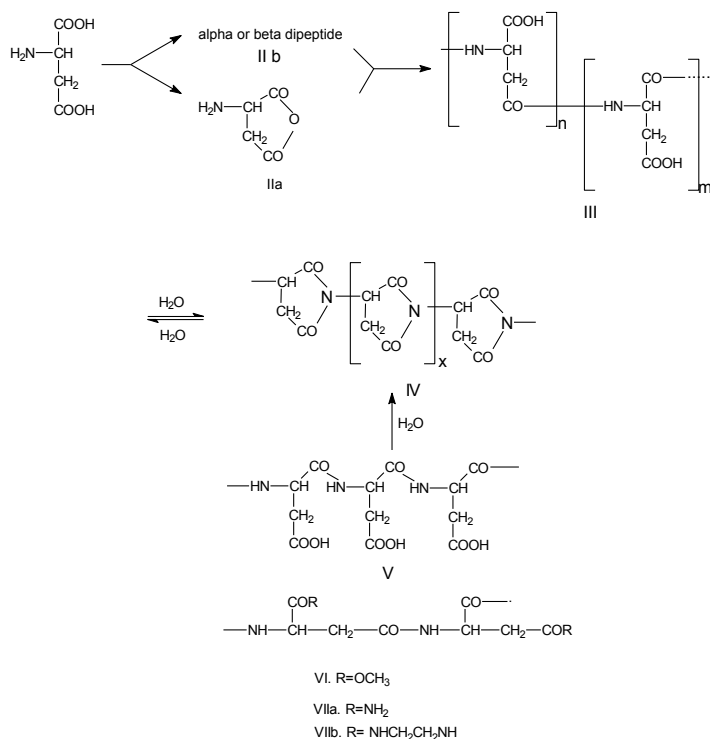


Figura 6.1

Sinteza acidului poliaspartic: forma ciclică (IV) și liniară (V)

Acidul poliaspartic se obține printr-o reacție de polimerizare termică a acidului aspartic sau a anhidridei maleice la 200-250 °C în prezența unor catalizatori (acid fosforic sau acid p-toluensulfonic. Sinteza polisuccinimidei (PSI) se desfășoară în prezență de propilen, etilen sau butilen carbonat ca solvent și durează de la 2 la 7 ore [317].

Metodele clasice de obținere a PAS sunt sintetizate în tabelul 6.2 [317].

Tabelul 6.2: Policondensarea acidului L-aspartic în cataliză acidă

Nr. crt.	Solvent	Catalizator	Temperatura de reacție	Randa - mentul (%)	M _w	(M _w /M _n)
1	Mesitilen	85% acid fosforic	164-166	77	24800	(1,5)
2	Sulfolan	85% acid fosforic	158-159	89	19000	(1,5)
3	Mesitilen/DMF	85% acid fosforic	150-152	59	12900	(1,2)
4	Mesitilen /NMP	85% acid fosforic	160-162	96	24500	(1,6)
5	Dietilbenzen/sulfolan	85% acid fosforic	176-178	96	49300	(1,9)
6	Mesitilen/sulfolan	85% acid fosforic	160-162	96	64300	(1,9)
7	-	Acid p-toluensulfonic	160-162	89	27000	(1,5)
8	-	Acid sulfuric	160-162	96	27900	(1,6)

Iradieria cu microunde - o alternativă în sinteza acidului poliaspartic

În scopul îmbunătățirii randamentelor și evitarea condițiilor extreme de reacție s-a introdus în sinteza organică iradierea cu microunde. Utilizarea acestei metode aduce unele modificări în desfășurarea unei reacții: eficiență energetică crescută, randament ridicat, reducerea duratei procesului de sinteză [314].

Sinteza polimerilor a beneficiat de tehnologia iradierii cu microunde, fapt demonstrat de numeroasele aplicații prezentate în literatura de specialitate [315].

Există diferențe fundamentale în transferul termic față de tehnologiile uzuale, evitându-se sau atenuând dificultățile legate de conducția și convecția termică ce pot apare în cazul încălzirii termice clasice [316].

În cadrul tezei a fost abordată sinteza acidului poliaspartic atât pentru forma ciclică a polimerului, cât și pentru forma liniară.

- sinteza formei ciclice a polimerului din acid aspartic (AA), fără catalizator:

a). Sinteza clasică:

O suspensie formată din 50g AA (0.276 mol) în 100 ml propilen carbonat este introdusă într-un balon cu trei gâturi prevăzut cu agitator mecanic, termometru și refrigerent la care este fixat un vas pentru colectarea apei prin distilare azeotropă.

După 6 ore de reacție la 210-215°C, amestecul rezultat se răcește, se îndepărtează solventul prin precipitare în metanol (200ml). Produsul se spală repetat cu apă distilată și se usucă, inițial la temperatura camerei și apoi la vid.

b). Sinteza prin iradiere cu microunde:

O suspensie formată din 50g AA (0.276 mol) în 100 ml propilen carbonat este introdusă într-un balon și apoi în microreactorul "MicroSYNTH" (Milestone) setat la E=380 W, prevăzut cu refrigerant ascendent și colector de apă. Produsul reacției se separă prin precipitare în metanol, se spală și se usucă similar metodei clasice de sinteză. Parametrii reacției sunt sintetizați în tabelul 6.4:

Tabelul 6.4
Parametrii reacției de sinteză fără catalizator

timp(min)	Temp(°C)	Energie reactor(W)
3	176	380
8	197	286
12	204	293
14	210	296
20	217	278
28	225	390
35	231	270
40	230	288

- sinteza din anhidridă maleică

Anhidrida maleică este hidrolizată în apă, după care se adaugă hidroxidul de amoniu. Reacția decurge la 100°C. Maleatul de amoniu obținut este apoi introdus în microreactor, ciclul de polimerizare fiind setat similar sintezei precedente. PSI se separă prin precipitare în metanol, spălare și uscare la temperatura camerei și apoi la vid.

Analiza FT-IR confirmă valori de bandă de vibrație de intensitate mare caracteristice grupelor C=O aparținând ciclului imidic la 1716cm^{-1} , respectiv 1791cm^{-1} , benzi de intensitate mare caracteristice legăturii C-H aromatic $3000\text{-}3100\text{cm}^{-1}$ și de asemenea banda de intensitate mare la 1363cm^{-1} , caracteristică carbonului aminic.

- sinteza din acid aspartic, catalizată de acid fosforic

a). Sinteza clasică:

La amestecul de reacție inițial se adaugă acid fosforic în proporție de 3% față de masa acidului aspartic. Spre deosebire de sinteza fără catalizator, timpul de reacție se reduce la 4 ore.

b). Sinteza prin iradiere cu microunde:

O suspensie formată din 50g AA (0.276 mol) în 100 ml propilen carbonat și 3% acid fosforic față de masa acidului aspartic este introdusă într-un balon și apoi în microreactorul setat la E=380W prevăzut cu refrigerant ascendent și colector de apă. Produsul se obține prin precipitare în metanol, urmată de uscare la temperatura camerei și apoi la vid. Polimerul rezultat are culoare mai deschisă decât în cazul obținerii acidului poliaspartic prin sinteza clasică datorită gradului de conversie mai ridicat.

Evoluția parametrilor este prezentată în tabelul următor:

Tabelul 6.4

Parametrii reacției de obținere a acidului poliaspartic în reactor cu microunde, catalizată de acid fosforic

Timp, min	Temp(°C)	Energie reactor(W)
2	125	357
3	169	380
4	179	380
7	186	380
10	196	336
11	205	285
14	209	267
20	218	280
23	223	262
25	222	0

Polimerii obținuți au fost caracterizați prin RMN în dimetilsulfoxid (DMSO)-d₆ și analiză FTIR utilizând spectrofotometrul IR cu transformata Fourier Bio-Rad FTS 165, cu rezoluție de 2 cm⁻¹ și interval de 4000-600 cm⁻¹.

-sinteza formei liniare a acidului poliaspartic

La o soluție de 2g polisuccinimidă în 10 ml apă se adugă 2,5 ml hidroxid de amoniu (soluție 25%). După agitare puternică timp de 5 minute se obține produsul de reacție prin evaporarea apei din sistem sau prin precipitare cu metanol. Structura liniară a polimerului a fost confirmată prin spectroscopie FTIR (fig. 6.9).

Se confirmă prezența valorilor de bandă de vibrație de intensitate mare caracteristice N-H amidic la 1595 cm⁻¹, 1485 cm⁻¹ și 1400 cm⁻¹. O bandă puternică de absorbție caracteristică grupelor aminice se regăsește la 3373 cm⁻¹.

6.2. Caracterizarea acidului poliaspartic sintetizat

Tabelul 6.6 sintetizează parametrii reacțiilor de sinteză efectuate, evidențiind avantajele iradierii cu microunde în privința duratei necesare pentru obținerea polimerului și a randamentelor. Tabelul 6.5 ilustrează diferențierea valorilor parametrilor de reacție funcție de metodele de obținere ale acidului poliaspartic. Rezultatele arată că metoda prin iradiere cu microunde îmbunătățește nu numai timpul de reacție dar și randamentul acesteia.

Tabelul 6.5: Parametrii reacțiilor de sinteză a acidului poliaspartic (forma ciclică)

Nr.	Reactant	Puterea micreoreac torului (W)	Catali- zator	Temp. (°C)	Timp (min)	Randament (%)
1	Acid aspartic (metoda clasică)	-	-	240	360	60
2	Acid aspartic (microunde)	380	-	230	40	85
3	Acid aspartic (microunde)	380	H ₃ PO ₄	200	20	95
4	Anhidridă maleică (metoda clasică)	-	-	150	240	40
5	Anhidridă maleică (microunde)	390	-	150	30	80
6	Anhidridă maleică (microunde)	390	H ₃ PO ₄	90	25	90

În cazul utilizării acidului aspartic ca reactiv pentru sinteza polimerului, utilizarea iradierii cu microunde permite creșterea randamentului de la 60% la 85%, simultan cu reducerea de 9 ori a timpului necesar pentru finalizarea reacției. (fig. 6.10).

Avantaje semnificative se înregistrează și pentru celelalte variante de sinteză realizate prin iradiere cu microunde. Evident, ele sunt accentuate în cazul reacțiilor catalizate.

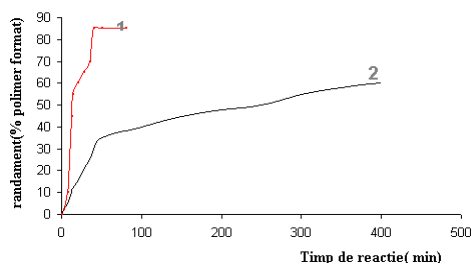


Figura.6.10

1-sinteza prin iradiere cu microunde

2-sinteza clasică

Randamentul în polimer PAS format funcție de timpul de reacție

Analiza FTIR arată existența unei benzi de vibrație de intensitate mare caracteristică grupelor C=O (aparținând inelului ciclic imidic în zona de valori 1690-1790cm⁻¹). Bandă puternică de absorbție caracteristică grupelor aminice se regăsesc valorile 3500-3100 cm⁻¹.

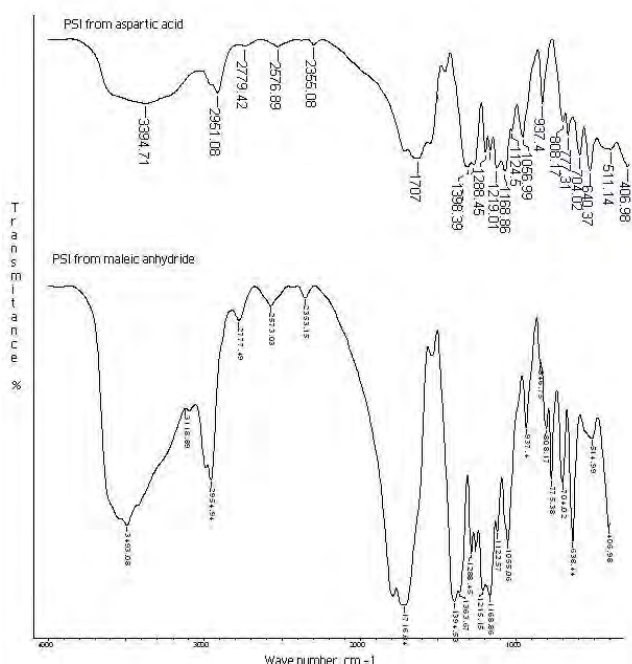


Figura 6.11

Spectrul FT IR al acidului poliaspartic obținut din anhidrida maleică și din acid aspartic prin metoda iradierii la microunde (catalizator acid fosforic)

Analiza prin rezonanță magnetică nucleară (^1H NMR) a acidului poliaspartic în DMSO-d_6 obținut prin metoda iradierii la microunde cu acid fosforic catalizator din acid aspartic evidenziază semnale ale protonului metinic în intervalul 4,5 -5,4 ppm. Protonul grupării metilenice este observat la 3,3 și 2,8 ppm.

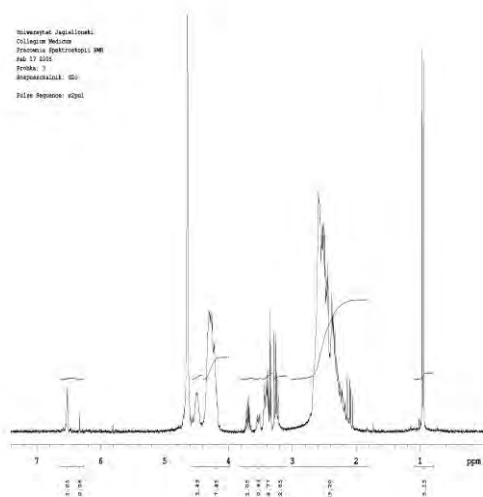


Figura 6.12

Spectrul ^1H NMR al PSI în DMSO-d_6

Spectrul ^{13}C NMR al acidului poliaspartic în

DMSO- d_6 este caracterizat prin două picuri ale grupării carbonil, evidențiate la 173 și 174 ppm, reprezentând cele două grupări carbonil repetitive în unitatea succinimidei. Unitățile repetitive metilen și metan sunt observate la 32 și 47 ppm. Rezultatele confirmă calitativ și cantitativ structura acidului poliaspartic obținut prin metoda iradierii cu microunde.

Determinarea masei moleculare a PAS prin metoda viscozimetrică

Pentru stabilirea masei moleculare s-a utilizat un vâscozimetru capilar de tip Ubbelohde. Polimerul a fost dizolvat în amestec de dimetilformamidă 0,1n / LiCl, determinările fiind efectuate la 25°C . Pentru calculul masei moleculare a fost aplicată ecuația Mark- Houwink [321], unde $K = 1.32 \times 10^{-2} \text{ g/cm}^3$, $\alpha = 0.76$:

$$\eta_{\infty} = KM_v^{\alpha}$$

Valorile stabilite sunt prezentate în tabelul 6.6:

Tabelul 6.6.

Masele moleculare ale acidului poliaspartic (forma ciclică)

Metoda de sinteză a polimerului din acid aspartic	Masa moleculară (Da)
Sinteza clasică	2850
Sinteza prin iradiere cu microunde fără catalizator	3311
Sinteza prin iradiere cu microunde (catalizator acid fosforic)	4570

Sinteza acidului poliaspartic obținut prin iradiere cu microunde permite creșterea masei moleculare a polimerului în măsură mai mare decât în cazul metodei clasice de sinteză. Cea mai mare valoare a acestei caracteristici se dobândește în sinteza catalizată de acidul fosforic.

Analiza termogravimetrică

Analiza termogravimetrică (TG) este o metodă analitică utilizată în determinarea stabilității termice a unui material și a fracțiilor componentelor volatili. Măsurătorile decurg în mod obișnuit în aer sau în atmosferă inertă (heliu, argon), masa fiind înregistrată ca funcție a variației temperaturii.

Analizele termogravimetrice s-au realizat pe aparat Netzsch TG 209, în mod dinamic, la o viteză de încălzire de 10°K/min . în atmosferă de argon, în tăvi deschise de $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$. Datele au fost convertite în fișiere ASCII, iar analiza cinetică a fost realizată în Netzsch Thermokinetic Program (varianta . 99/10)

Tabelul 6.7

Temperaturile caracteristice ale acidului poliaspartic (forma ciclică)

Metoda de sinteză	$T_i (^{\circ}\text{C})$	$T_{\max} (^{\circ}\text{C})$	$T_f (^{\circ}\text{C})$
Sinteza clasică	256	295	547
Sinteza la microunde fără catalizator	337	394	538
Sinteza la microunde cu acid fosforic catalizator	354	402	590

unde:

T_i – temperatura corespunzătoare începutului procesului termo-oxidativ

T_{max} - temperatura la viteza maximă a pierderii de masă

T_f – temperatura corespunzătoare încheierii procesului termo-oxidativ

Analiza termogravimetrică evidențiază un proces de descompunere a PSI în două etape, având ca rezultat final o pierdere de masă de 35% în cazul sintezei clasice și în jur de 60% pierdere de masă în cazul sintezei prin iradiere cu microunde (fără catalizator) (fig.6.14).

Degradarea termică a PSI obținut prin sinteza la microunde cu acid fosforic drept catalizator decurge în două etape : până la 180 °C pierderea de masă este de cca. 20%, iar în a doua etapă aceasta valoare crește până la 60%.

Corelarea masei moleculare cu stabilitatea termică a compușilor analizați oferă informații asupra influenței dimensiunilor moleculare asupra stabilității termice a acidului poliaspartic obținut prin cele două metode: sinteza clasică și sinteza la microunde (tabelul 6.8).

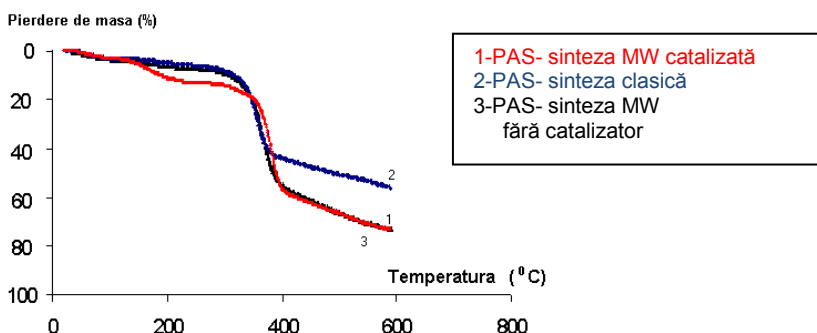


Figura 6.13

TGA : a) PAS – Sinteza clasică; b)PAS- Sinteza MW(fără catalizator) c)PAS- Sinteza MW (cu H_3PO_4 drept catalizator)

Tabelul 6.8: Influența masei moleculare asupra stabilității termice a acidului poliaspartic obținut utilizând metoda clasică și metoda iradierii cu microunde(cu și fără catalizator acid)

Compusul macromolecular	Masa moleculară(Da)	Temperatura la care are loc pierderea de masă maximă T_{max} (°C)
PAS-Sinteza clasică	2850	295
PAS-Sinteza la microunde fără catalizator	3311	394
PAS-Sinteza la microunde cu H_3PO_4 drept catalizator	4570	402

Pe lângă avantajele economice menționate, sinteza acidului poliaspartic prin iradiere în microunde permite obținerea unui polimer cu masă moleculară mai mare și –implicit- cu stabilitate termică sporită.

6.3. Derivați ai acidului poliaspartic

Cercetările științifice în domeniul copolimerilor biodegradabili au cunoscut o dezvoltare remarcabilă în medicină și farmacie, prin capacitatea acestora de a oferi o gamă variată de posibilități în construcția sistemelor de eliberare controlată sau/și ținută a medicamentelor. Exigențele impuse acestor copolimeri: biocompatibilitatea, lipsa toxicității și rezistența chimică pot fi satisfăcute și corelate cu cerințele actuale ale domeniului medical.

Având ca obiectiv de referință acest aspect, s-a abordat obținerea unor **copolimeri** ai acidului poliaspartic cu **N,N-dimetiletanolamina** având potențiale utilizări în sistemele de eliberare controlată a unor principii bioactive pentru terapia unor afecțiunile neurologice cu efecte la nivelul funcționalității aparatului locomotor, dat fiind efectul antidepressiv al aminei [322].

Varianta clasică de sinteză presupune încălzirea amestecului de reacție ce conține acid aspartic și N,N-dimetiletanolamină în propilencarbonat ca solvent la temperatura de 120-350°C, timp de 3-4 ore.

Parametrii sintezei la microunde, pentru un adaos de 10% N,N-dimetiletanolamină în raport cu acidul aspartic sunt prezentați în tabelul 6.10

Tabelul 6.9 : Parametri de reacție a copolimerizării acidului aspartic cu N,N-dimetiletanolamina

Nr. etapa	Durata(min)	Puterea (W)	Temperatura(°C)	Modificări de culoare ale mediului de reacție
METODA CONVENȚIONALĂ [59]				
1	190	-	170-220	brun
METODA PRIN IRADIERE LA MICROUNDE				
1	3	380	176	incolor
2	3	390	196	roz deschis
3	3	400	216	roz-rosu
4	3	410	230	rosu
5	30	410	230	rosu brun închis

Utilizarea microundelor a determinat o micșorare a timpilor de reacție de la 3 ore la aproximativ 40 de minute, simultan cu o creștere a randamentului cu 70%.

Copolimerul obținut a fost analizat FT-IR și termogravimetric.

Analiza FT-IR confirmă valori de bandă de vibrație de intensitate mare caracteristice grupelor C=O amidic la 1633 cm⁻¹, grupei N-C la 1080 cm⁻¹, CO eteric la 1170 cm⁻¹, respectiv valori de 1712 cm⁻¹ corespunzătoare grupei N-H amidic. O bandă puternică de absorbție caracteristică grupelor aminice se regăsește între 3500-3100 cm⁻¹.

Structura copolimerului format, confirmată prin analiza spectrofotometrică susține ipoteza formării copolimerului prin evoluția în două etape distincte (confirmate de altfel și de evoluția culorii mediului de reacție):

- prima etapă implică polymerizarea AA la imidă cu structură ciclică ;
- a doua etapă presupune fixarea fragmentului aminic liniar în interiorul structurii polimerului.

Analiza termogravimetrică confirmă faptul că introducerea structurii liniare a aminei în structura PAS reduce stabilitatea termică a compusului.

Copolimerul astfel obținut este termic stabil până la 280°C, în comparație cu un compus obținut la un adaos de 30% N,N-dimetiletanolamină (2) a cărui stabilitate termică se limitează la 160°C (figura 6.15).

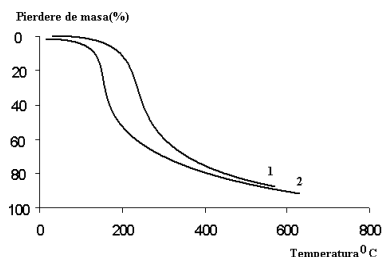


Figura 6.15
Curbele termogravimetrice ale copolimerului obținut

Obținerea clorurii acide a acidului poliaspartic

Reacția s-a realizat într-un balon de 500 ml prevăzut cu refrigerent de reflux și tub de clorură de calciu, în care se introduce o suspensie de acid poliaspartic și clorură de tionil în raport molar 1:3 în dimetilformamidă (DMF). Amestecul s-a refluxat pe baie de apă 3 ore. Excesul de clorură de tionil a fost îndepărtat prin distilare la presiune normală și apoi la presiune scăzută.

După îndepărtarea clorurii de tionil se precipită derivatul clorurat. Spectrul FTIR evidențiază o bandă de vibrație caracteristică grupelor C=O amidice în zona 1714 -1778 cm^{-1} . Bandă puternică de absorbție caracteristică legăturii C-Cl se regăsește la 638 cm^{-1} , picurile de la 1394 cm^{-1} , 1215 cm^{-1} , 1288 cm^{-1} , 1313 cm^{-1} , fiind atribuite legăturii aminice C-NH.

Condensarea acidului poliaspartic cu nistatin

Condensarea s-a efectuat în prezența unui activator: DCCI (N,N'-diciohexilcarbodiimidă), reacția având loc între gruparea carboxil liberă a nistatinului și cea aminică a acidului poliaspartic. Raportul molar între reactanți este de 1:1. Aceștia sunt introduși în 30 ml acetat de etil la 0-5°C, se adaugă o soluție ce conține DCCI (raport 1:1 DCCI: reactanți) și se agită 2 ore.

Se lasă apoi amestecul de reacție 24 de ore la temperatura camerei. Produsul se precipită în dietileter, se filtrează și se înlătură acetatul de etil prin evaporare.

Analiza FTIR a compusului obținut confirmă structura condensatului.

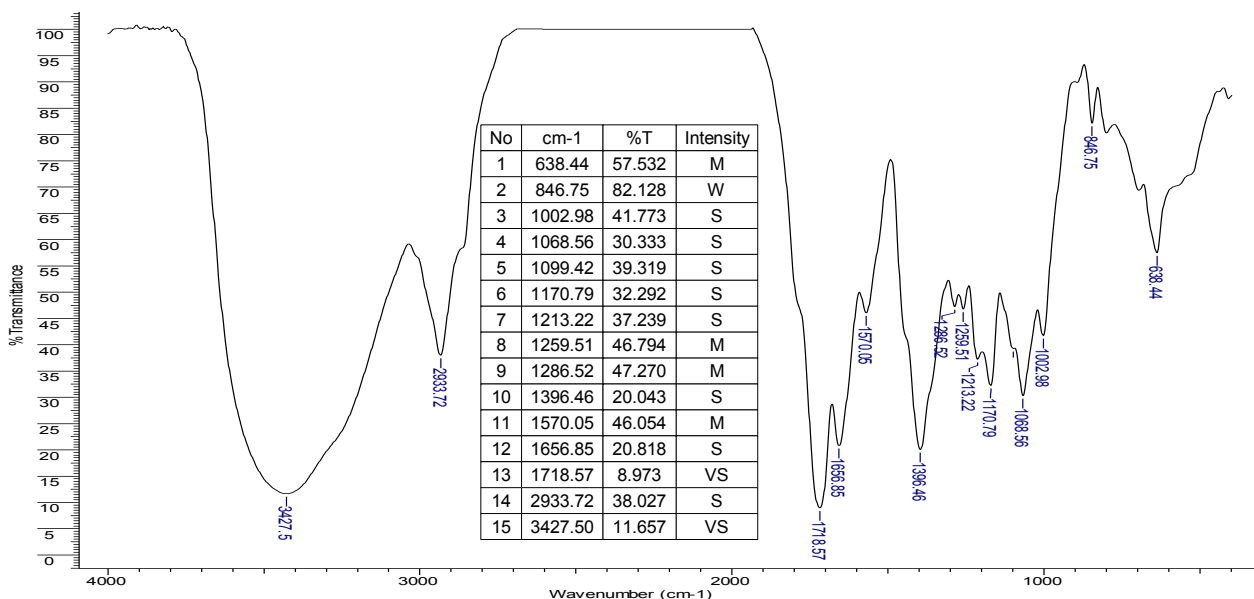


Figura 6.19
Spectrul FT-IR a compusului obținut

6.4. Prepararea unui material compozit celuloză-acid poliaspartic

Materialele absorbante cu structura poroasă formată din cavități au numeroase aplicații medicale: transportori ai medicamentelor, bază pentru culturi celulare, implanturi în regenerare tisulară [322].

S-a obținut un material compozit celuloză-acid poliaspartic prin imersarea matricii celulozice sub formă de spongi într-o soluție 10% de acid poliaspartic în diferiți solvenți.

Acidul poliaspartic a fost sintetizat catalitic într-un reactor cu microunde la 176 °C timp de 20 minute dintr-o suspensie de acid aspartic (50g, 0.276 mol) în propilen carbonat (100ml). Solventul a fost îndepărtat, polimerul a fost precipitat cu metanol, purificat și utilizat la obținerea materialului compozit [323].

După derularea timpului de includere, materialul a fost scos din soluție, imersat în metanol pentru precipitarea acidului poliaspartic în matrice și uscat la temperatura camerei.

Structura microscopică a materialului compozit este ilustrată în fig. 6.20.

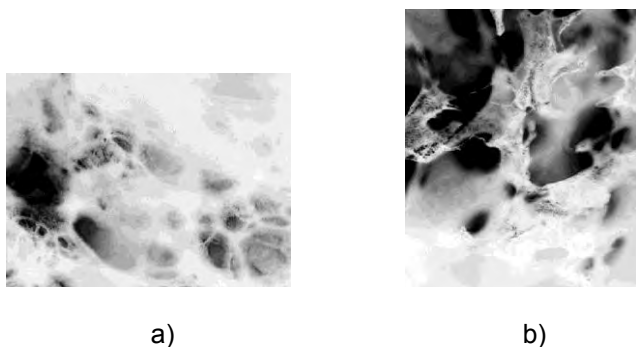


Figura 6.20:
Structura microscopică a celulozei (a) și a compozitului celuloză-acid poliaspartic(b)

Analiza microscopică evidențiază existența unei structuri fibrilare în matricea celulozică, cu cavitățile vizibile în secțiune paralelă.

Semnalele de la 2998 cm^{-1} sunt atribuite grupelor aromatice. Banda cuprinsă între 1690 și 1760 cm^{-1} indică prezența grupelor carboxil esterice sau amidice, iar picurile de la 1080 , 1300 and 3000 cm^{-1} pot fi atribuite grupelor O-H și N-H ale acidului poliaspartic

Compoziția și proprietățile materialului compozit sunt impuse de parametrii procesului de includere:

În studiul includerii compusului cu potential bioactiv s-au urmărit următorii parametri :

- timpul de includere.

S-au folosit pentru includere soluții 10% acid poliaspartic în:

- propilen carbonat(PC)
- dimetilformamida(DMF)
- dimetilacetamida(DMAc)

Nr. probei	Condiții de includere	% PAS din masa spongilor
1	PC/1h	44.27
2	PC/20h	39.79
3	PC/72h	31.70
4	DMF/1h	27.43
5	DMF/20h	28.71
6	DMF/72h	30.94
7	DMAc/1h	28.61
8	DMAc/20h	29.18
9	DMAc/72h	36.36

urmărindu-se în permanență păstrarea unui exces de acid poliaspartic în timpul procedurii de includere.

Temperatura de includere este menținută constantă, la 37°C , modificându-se timpul de includere, indicat în tabelul 6.10.

Tabelul 6.10: Parametri de includere a acidului poliaspartic în matricea spongilor de celuloză, pentru diferiți solvenți.

Dependenta cantității de acid poliaspartic inclus de timpul de includere indică o „cinetică” de includere dependentă de natura solventului folosit (în esență, de vâscozitatea soluției).

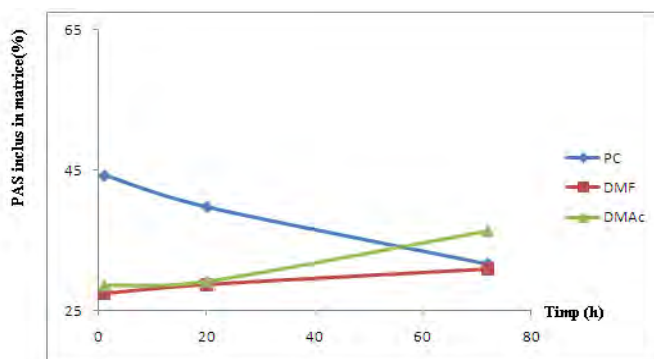


Figura 6.22:
Dependența PAS inclus de solventul folosit

Reducerea cantitatii de PAS inclus folosind soluție în PC poate fi pusă pe seama diferenței de porozitate a suportului celulozic folosit pentru cei trei timpi de imersie.

- raportul masic celuloză : PAS

Tabelul 6.11 : Dependența procentului de PAS inclus în matrice funcție de rapoartele masice PAS: Cell folosite

Nr. probei	Solvent utilizat	Raport masic Cell: PAS	% PAS inclus
1	PC	1:1	-
2	PC	1:3	41.43
3	PC	1:6	61.35
4	PC	1:10	76.69
5	DMF	1:1	-
6	DMF	1:3	62.21
7	DMF	1:6	69.90
8	DMF	1:10	77.71
9	DMAc	1:1	-
10	DMAc	1:3	49.11
11	DMAc	1:6	67.66
12	DMAc	1:10	72.55

Cantitatea de acid poliaspartic reținut în materialul compozit sugerează o evoluție ce depinde hotărâtor de raportul masic celuloză/PAS folosit, natura solventului afectând totuși compoziția produsului final.

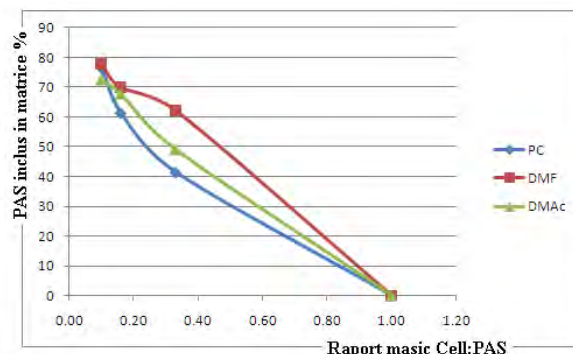


Figura 6.22:

Dependența procentului de PAS inclus în matrice funcție de rapoartele masice Cell: PAS folosite

6.4.1. Caracterizarea materialului compozit Comportarea la compresie

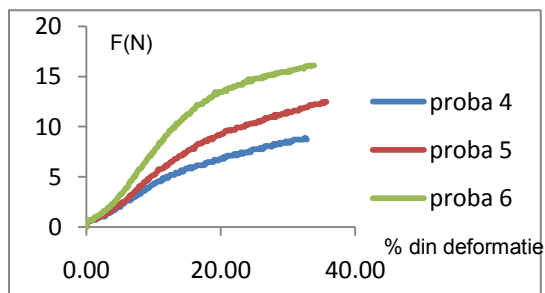
Pentru investigarea comportării la compresie a materialului compozit, extrem de importantă în cazul utilizării ca implant pentru regenerare tisulară s-au pregătit blenduri celuloză-acid poliaspartic în condițiile menționate în tabelul 6.12:

Tabelul 6.12: Obținerea blendului celuloză: PAS în diferiți solvenți

Nr. proba	Solvent folosit	Concentrația PAS în solvent(%)	% PAS din M_f
2	PC	10	41.43
3	PC	15	61.35
4	PC	20	76.69
6	DMF	10	62.21
7	DMF	15	69.90
8	DMF	20	77.71
10	DMAc	10	49.11
11	DMAc	15	67.66
12	DMAc	20	72.55

Epruvetele au avut o dimensiune medie de 19 x 11 x 8 mm. Încercările au fost efectuate pe un aparat Zwick 1445 până la o deformare maximă prin compresie de 20% cu o viteză de 1 mm/min. Rezultatele obținute sunt trecute în tabelul 6.14.

Dependența dintre forța aplicată și deformația realizată este reprezentată în fig. 6.24.



solvent : DMF –dimetilformamida

proba 4: cell fără PAS

proba 5: cell: PAS=1:6

proba 6: cell: PAS= 1:12

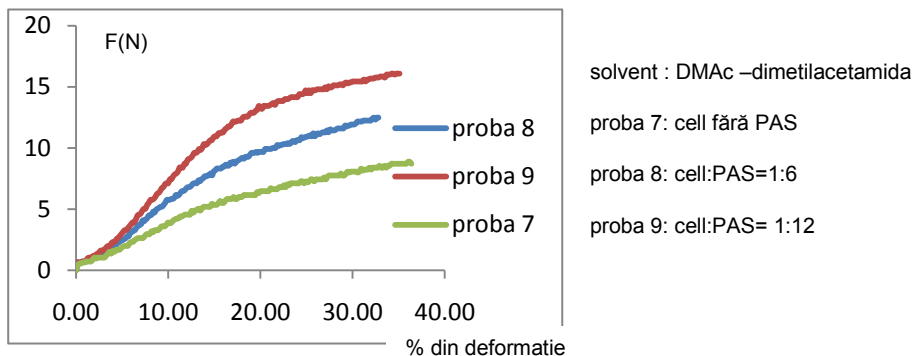


Figura 6.24:
Dependența dintre solicitare și comprimarea realizată

Prin includerea acidului poliaspartic în matricea celulozei crește semnificativ rigiditatea materialului compozit, determinând atenuarea deformațiilor și deplasărilor în cazul implantării. Extinderea domeniului viscoelastic și rezistența la compresiune cresc proporțional cu cantitatea de PAS inclusă. Natura solventului afectează proprietățile reologice ale materialului compozit doar prin intermediul cantității de PAS inclusă.

6.4.2. Determinarea capacității de sorbție a apei

Pentru determinarea capacității maxime de sorbție a apei de către materialul compozit, probele au fost imersate în apă distilată timp de 10 min, după care este îndepărtat excesul de apă. Capacitatea de sorbție s-a determinat gravimetric.

Valorile obținute sunt prezentate în tabelul 6.15.

Tabelul 6.15: *Determinarea capacității maxime de absorbție a apei a compozitului celuloză-acid poliaspartic*

Proba	Caracteristicile materialului	Densitatea spongiilor (g/cm ³)	% apă sorbită/g matrice
0	Spogi celulozici simpli	0,085	24,15
1		0,122	20,64
2		0,227	19,18
3	Compozit în solvent DMF (Cell:PAS=1:6)	0,144	20,15
4		0,207	18,46
5		0,214	17,11
6	DMF (Cell:PAS=1:12)	0,135	19,23
7		0,217	16,34
8		0,327	15,87
9	DMAc (Cell:PAS=1:6)	0,187	17,54
10		0,297	15,38
11		0,357	14,68

Rezultatele experimentale arată că factorul determinat în sorbția apei în cazul materialelor compozite cu matrice celulozică având structură poroasă rămâne gradul de porozitate al matricii, reflectat în valorile densității sale. Prezența polimerului inclus în porii matricii celulozice determină reducerea capacității de sorbție a apei, proporțional cu modificarea densității sale.

Hidrofilia materialului compozit rămâne la valori ridicate, favorizând includerea de principii bioactive prin difuzie sau chimic și mecanismele de regenerare tisulară exercitate prin implantare.

CONCLUZII FINALE:

- Problematika asimilării compușilor macromoleculari în terapeutică este complexă datorită situării acestora în zona interdisciplinară a chimiei polimerilor și farmacologiei.

- Principal, biomaterialele având aplicații medicale sunt materiale inerte, care tratează, înlocuiesc sau asigură funcția unui țesut sau organ natural, vin în contact cu acesta sau cu fluidele biologice. Ele sunt părți constitutive ale implanturilor medicale, proiectate să îndeplinească în interiorul biomatriei o funcție specifică: de suport mecanic, de detectare a unui metabolit sau debitor de medicamente.

- Rezultatele experimentărilor clinice atestă valoarea deosebită a unor compuși macromoleculari naturali și sintetici ca medicamente propriu-zise și ca adjuvanți pentru condiționarea și imobilizarea unor substanțe biologic active. În acest context, polizaharidele au aplicații variate ca suport pentru grefarea și imobilizarea unor principii active, ca vehicul de transport a acestora și ca mediu pentru cultivare de celule sau pentru regenerare tisulară.

- Avantajul eliberării controlate este conferit de capacitatea de a elibera medicamentul selectiv, concentrat, pe zone specifice, reducându-se variațiile de concentrații ale acestuia și toxicitatea la nivelul metabolismului. Tehnicile și sistemele pentru eliberare controlată actuale sunt capabile să controleze viteza de eliberare a principiilor active, menținând la nivel optim efectul terapeutic.

- Accesibilitatea celulozei și comportarea sa în interacțiuni fizice și chimice este influențată de:

- numărul, mărimea și accesibilitatea canalelor, porilor, cavităților și interstițiilor fibrilare ce permit accesul la substrat

- caracterul și volumul molecular al reactantului

- suprafața accesibilă internă, determinată de mărimea elementelor fibrilare sau agregatelor acestora ce formează structura fibrilar-franjurată a substratului fibros

- dispunerea catenelor celulozei în cristalite elementare și agregatele acestora, importantă pentru reactivitatea grupelor –OH de pe suprafața lor.

- Justificat de răspândire, de disponibilitatea ca sursă regenerabilă, de biocompatibilitate și biodegradabilitate și de prezența grupelor funcționale în unitatea structurală, interesul pentru modificarea chimică a celulozei cunoaște o creștere semnificativă. El este accentuat de varietatea proprietăților dobândite de derivații săi și de diversificarea domeniilor de utilizare.

- Biodegradabilitatea celulozei *in vivo* se dobândește doar prin funcționalizarea sa. Oxidarea este, până în prezent, singura transformare chimică a celulozei care asigură această proprietate.

- Trebuie precizat faptul că puțini dintre solvenții celulozei investigați în ultimii ani au un potențial real pentru funcționalizarea controlată a celulozei. Limitele aplicabilității lor sunt determinate de toxicitate, desfășurarea unor reacții secundare nedorite, scăderea capacității de solubilizare pentru celuloză pe parcursul procesării acesteia.

- Polimerii naturali și sintetici și numeroși derivați ai lor sunt utilizați frecvent în medicină sub formă de hidrogeluri, membrane sau variate materiale compozite cu structură tridimensională.

- Principalele utilizări ale hidrogelurilor în medicină și farmacologie se regăsesc în domeniul biosenzorilor, eliberării controlate a medicamentelor și regenerării țesuturilor și se datorează proprietăților remarcabile pe care acestea le posedă.

- Membranele au aplicații în diverse sisteme controlate prin difuzie, pompe osmotice sau ca sisteme care se erodează ușor.
- Materialele compozite cu structură tridimensională oferă o mare varietate de proprietăți fizico-mecanice, valorificate îndeosebi în chirurgia reparatorie și în echipamentele medicale.
- Pentru dobândirea biodegradabilității *in vivo*, s-a modificat celuloza regenerată sub formă de spongi prin oxidare selectivă obținându-se 2,3-dialdehidceluloză, 2,3-dicarboxiceluloză și 2,3-diolceluloză în condiții care să nu afecteze dramatic morfologia și proprietățile mecanice ale matricii. Formarea derivaților a fost confirmată prin determinări analitice și prin spectroscopie FTIR.
- Gradul de modificare este cuprins între 0,6 – 1,05 mol 2,3-DAC/ mol AGU în prima etapă de oxidare. Viteza de reacție este dependentă de accesibilitatea celulozei, iar conținutul în grupe CHO poate fi prestabilit prin durata tratamentului.
- Transformarea 2,3-DAC în 2,3-DCC este completă, participarea C(6) la reacția de oxidare în mediu de $\text{NaClO}_2 / \text{H}_2\text{O}_2$ nefiind însă exclusă.
- Pentru valorificarea unor potențiale avantaje oferite matricii celulozice ca implant a fost sintetizată 2,3-DALC prin reducerea grupelor CHO la grupe hidroxil.
- În scopul imobilizării de compuși bioactivi cu funcții terapeutice a fost utilizată carboximetilceluloza sintetizată pe matricea celulozică, pe care, printr-o reacție de condensare activată de dicitlohexilcarbodiimidă, s-a greșat sulfatazozol.
- Biodegradarea matricii de celuloza oxidată (spongi) în SBF la 37°C este dependentă de conținutul de grupe carboxil, de condițiile de reacție din a doua etapă a oxidării și de durata imersării în SBF. Gradul de biodegradare al matricii oxidate este cuprins între 20% și 80%.
- Reducerea grupelor aldehydice la grupe hidroxil cu formare de 2,3-diolceluloză poate asigura un nivel al biodegradabilității comparabil (sau superior) cu cel al oxixelulozei.
- Se evidențiază două viteze de biodegradare ale matricii; viteza de biodegradare mai mare la începutul contactului cu SBF poate fi explicată prin particularitățile reacțiilor eterogene aplicate și prin nivelul modificărilor realizate.
- Se confirmă mecanismul de biodegradare specific celulozei oxidate cu $\text{NaClO}_2 / \text{H}_2\text{O}_2$ în a doua etapă de oxidare: fragmentarea catenelor este dominantă în raport cu scindarea legăturilor de hidrogen intermoleculare.
- Optimizarea duratei de oxidare a celulozei în fiecare etapă a procesului face posibilă prestabilirea nivelului de biodegradabilitate și desinația aplicațiilor medicale.
- S-a obținut un compozit pe matrice de celuloză regenerată cu porozitate și hidrofilie ridicate prin includere fizică de compuși bioactivi având potențiale aplicații în design-ul încălțămintei pentru tratarea piciorului diabetic sau ca element profilactic la nivelul piciorului.
- Substanțele medicamentoase incluse: nistatin, cloramfenicol și sulfatazozol fac parte din clasa antimicoticelor, antibioticelor și sulfamidelor.
- Gradul de retenție este dependent de porozitatea și distribuția dimensională a porilor matricii celulozice, de volumul molecular și de solubilitatea în etanol a compușilor bioactivi.
- Cantitatea de medicament eliberată este proporțională cu cea inclusă, iar cinetica eliberării din matricea celulozei regenerate este specifică fiecăruia, depinzând de aceiași factori care asigură includerea.

- S-a sintetizat în laborator acidul poliaspartic prin metode convenționale și prin iradiere cu microunde.
- În cazul utilizării iradierii cu microunde s-a demonstrat existența unor diferențe fundamentale în transferul termic, energia eliberată suplinind problemele legate de conducția și convecția termică, simultan cu creșteri semnificative ale randamentelor și cu reducerea duratei până la finalizarea reacției.
- S-au obținut copolimeri ai acidului poliaspartic cu amine, aminoacizi și acizi hidroxicarboxilici
- S-a realizat un material compozit prin includerea PAS în matricea celulozei. Cantitatea de PAS inclus este dependentă de durata procesului, raportul gravimetric polimer inclus/matrice și de viteza de difuzie a soluției de polimer în structura poroasă a matricii, afectată de natura solventului.
- Includerea acidului poliaspartic în matricea celulozei conferă calități superioare unui material destinat implantării:
 - atașează un polimer biocompatibil, biodegradabil și cu potențiale efecte terapeutice;
 - elimină sau atenuează dezavantajul determinat de deformarea facilă a implantului prin creșterea rigidității sale;
 - menține un nivel ridicat al hidrofiliei, afectat totuși de creșterea densității.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

266. **Huangqin C.**, „Novel Thermally Sensitive pH-dependent Chitosan/ Carboxymethyl Cellulose Hydrogels”, *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, **23**, 1, 38-48 (2008)
268. Goldberg E.P., Yaacobi Y., Burns J.W., Staples M.et all., “Water soluble polymers for tissue protection during surgery”, *Polymer Preprints*, **30** (2): 359 (1989)
273. Ciofica S., Lönnberg B., Lönnqvist K., “Cellulose composite materials as sorbents - sorption and rheological properties”, in: *Proceedings of Cellucon'98 Conference*, Turku/Åbo, Finland, December 14 -16 (1998).
274. Ciofica S., Lönnberg B., Södergård U., Strandberg T., Lönnqvist K., "Cellulose - liquid interaction in regenerated medical cellulose", in: *Proceedings of FiberMed 2000 Conference*, Tampere, Finland, June 12-14, 87-99 (2000)
283. Pajulo O., Lönnberg B., Lönnqvist K., Viljanto J., *The XXVII Congress of the European Society for Surgical Research (ESSR)*, Turku, Finland, Abstract Book, p.156 (1993).
284. Langer R., Vacanti J.P., *Science*, 260, 920-926, (1993)
285. Ciofica S., Lönnberg B., Lönnqvist K., Cellulose composite as sorbents-sorbition în rheological properties, în: *"Cellulosic Pulps, Fiber and Materials"*, G.F. Kenedy, G.O. Phillips, P.A. Williams (Eds.), Woodhead Publ. Ltd., Cambridge, p. 305-317 (2000)
286. Neu H.C., Gootz T.D.: Antimicrobial Chemotherapy: Antimicrobial inhibitors of Ribosome Function, în: *"Baron's Medical Microbiology"* (Baron S. et all, eds.), 4th ed., Univ of Texas Medical Branch, (1996)
287. Griggs K.: "Frog killer fungus 'breakthrough", BBC News, 10 30 (2007)
288. Murariu C., Butnaru R., Harnagea F., Ciovică, S., **Alina Murariu.**, „Biocompozite polimerice cu aplicații medicale”, *Industria Textilă*, **.2**, 62, 91-96 (2010)

289. Murariu C., „*Cercetări în domeniul materialelor compozite și utilizarea lor în industria textilă*”, Teză de doctorat, Univ. Tehnică „Gh. Asachi” Iași (2009)
290. Murariu C., Butnaru R., Ciofica S., **Murariu A.**, “Medical application of biocomposite materials” – *RSCC Magazine*, **8**, 3, 32-38 (2008)
291. Murariu C., **Murariu A.**, Harnagea M., Ciofica S., Cheptea C., Sunel V., „Polymer –Drug System Based on Regenerated cellulose used in Textile Industry”, *Cellulose Chemistry and Technology*, **44**, 7/8, 223-230, (2010)
296. Mocanu C., Ciofica S., **Murariu A.**, K. Pielichowski, „Acidul poliaspartic-un polimer biodegradabil cu multiple aplicații”, *RSCC Magazine*, **6**, 1, 42-51 (2006)
314. **Murariu A.**, Pielichowski K., Ciovică S., Pielichowski J., Mocanu C., Polaczek J., Tylek E., „Microwave Irradiation as a Novel Alternative for Poly (Aspartic Acid) Synthesis”, *RSCC Magazine*, **5**, p.39-42 (2005)
315. Polaczek J., Dziki E., Pielichowski J., *Biomater.*, **28**, 21 (2003)
316. **Roweton, S., S.J.Huang, G.Swift**, „Poly(aspartic acid): synthesis, biodegradation, and current applications”, *J. Environ. Polym. Degrad.* **5**, 175-181 (1997)
317. Pielichowski J., Pielichowski K., Tylek E., Dziki E., *Polimery*, **11**, p.50 (2005)
322. **Murariu A.**, Pielichowski K., Mocanu C., Ciofica S., Pielichowski J., Polaczek J., “Implantable Drug Delivery System Based on Cellulose-Poly(aspartic acid) Composite Materials”, *Modern Polymeric Materials for Environmental Application*, vol.1 pp.105-108 (2004)

ACTIVITATEA ȘTIINȚIFICĂ DIN CADRUL TEZEI DE DOCTORAT

Articole publicate în reviste cotate ISI (2)

1. C.Murariu, **Alina Murariu**, M. Harnagea, S. Ciovică, C. Cheptea, V. Șunel, “Polymer drug system based on regenerated cellulose used în textile industry”, *Cellulose Chemistry and Technology* **44**, 7/8, 223-230 (2010)
2. C.Murariu, R.Butnaru, M.Harnagea, F.Harnagea, **Alina Murariu**,– „Noi materiale biocompozite bazate pe celuloza regenerată utilizate la confecționarea branțurilor destinate diabeticii”, *Industria Textilă*, **2**, 61, 91-96 (2010)

Lucrări publicate în reviste și volume recunoscute CNCSIS (5)

1. **Alina Murariu**, K. Pielichowski, S. Ciovică, J. Pielichowski, Corina Mocanu, Jolanta Polaczek, Elzbieta Tylek, “Microwave Irradiation as a Novel Alternative for Poly (Aspartic Acid) Synthesis”, *RSCC Magazine*, **5**, 2, 39-42 (2005)
2. Corina Mocanu, S. Ciovică, **Alina Murariu**, K. Pielichowski, “Poly(aspartic acid) -a biodegradable polymer with high possibilities for environmentally friendly applications”, *RSCC Magazine*, **6**, 1, 52-60 (2006)

3. Corina Mocanu, S. Ciovică , **Alina Murariu**, K. Pielichowski, "Cellulose dissolution în Lithium Chloride/N,N-dimethylacetamide system, under microwaves irradiation", Bull. Instit. Polit. Iasi, Tom LI(LV), fasc. 3-4, 89-97 (2005)

4. C.Murariu, R.Butnaru, S.Ciovică, **Alina Murariu** „Medical application of biocompozite materials", RSCC Magazine, **8**, 3, 35-39 (2008)

5. C.Murariu, R.Butnaru, V.Tamuzs, **Alina Murariu**, S. Ciovică, K. Pielichowski, "Feature improving of composite materials used în textile industry: Cellulose –carbon fibers composite material", Bull. Instit. Polit. Iasi, Tom LIII(LVII), fasc.5,(2007)

Lucrări publicate la manifestări științifice interne și internaționale (4)

1. Alina Murariu, K.Pielichowski, S.Ciovică, C.Murariu, Th. Malutan, C. Mocanu, J. Pielichowski, J.Polaczek, „ Pressure and water absorbtion effects în drug delivery matrix based on cellulose – poly(aspartic acid) composite material", *Modern polymeric materials for environmental applications*, Vol. 2, pp.113-116 (2006)

3. Alina Murariu, K.Pielichowski C. Mocanu, S. Ciovică, J. Pielichowski, " Implantable Drug Delivery System Based on Cellulose-Poly(aspartic acid) Composite Materials", *Modern Polymeric Materials for Environmental Application*, Vol.1 pp.105-108 (2004) ;

4. C. Mocanu, K.Pielichowski , **Alina Murariu**, S. Ciovică, J. Pielichowski," Cellulose Dissolution în LiCl/DMAc System, an Important Step în Cellulose Functionalization Towards Biodegradable Composite", *Modern Polymeric Materials for Environmental Application*, Vol.1, pp.101-104, (2004) ;

5. Corina Mocanu, S. Ciovică , K. Pielichowski, **Alina Murariu**, "Cellulose Phosphates în LiCl/DMAc System as Biomaterials", *Modern Polymeric Materials for Environmental Application*, vol.2, pp. 109-112, (2006)

Participări la manifestări științifice interne și internaționale(3)

1. **Alina Murariu**, C.Murariu, K.Pielichowski, S.Ciovică, Corina Mocanu "Thermal stability of poly(aspartic acid) synthesized by microwave irradiation", Zilele facultății de Inginerie Chimică și Protecția Mediului, noiembrie (2005)

2. Corina Mocanu, S. Ciovică , **Alina Murariu** ,K. Pielichowski, "Preparation of a Biodegradable Blend Based on Cellulose and Poly(aspartic acid)", Zilele facultății de Inginerie Chimică și Protecția Mediului , noiembrie (2005)

3. C.Murariu, M.Harnagea, **Alina Murariu**, F.Harnagea , „Bio composite materials for însoles designated to diabetic patients" - Masa rotundă a specialiștilor din domeniul încălțăminte, Universitatea Tehnică „Gheorghe Asachi" din Iași, Facultatea de Textile, Pielărie și Management Industrial, decembrie (2009)

Publicații online(1)

1.C.Murariu, Alina Murariu, R.Butnaru - Comportarea la compresie a coloanelor de beton ranforsate cu materiale compozite polimerice - Texonline (2008), www.texonline.ro, in cadrul proiectului de cercetare pentru tineri doctoranzi - tip TD cod 484 « Cercetări in domeniul materialelor compozite polimerice și utilizarea lor in industria textilă », 2007-2009

Specializări în străinătate(1)

2004-2005- Bursă de studii doctorale , Early stage researcher under “Marie Curie Training Site“ (under contract no.HPMT-CT-2001-00379) în Modern Polymeric Materials for Environmental Application Studies, Technical University of Krakow, Poland