



UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI ȘI
PROTECȚIEI SOCIALE
AMPOSDRU



Fondul Social European
POSDRU 2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013

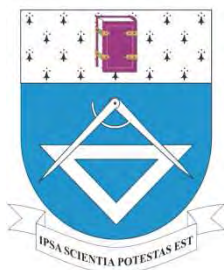


MINISTERUL
EDUCAȚIEI
CERCETĂRII
TINERETULUI
ȘI SPORTULUI

OIPOSDRU



UNIVERSITATEA TEHNICĂ
"GHEORGHE ASACHI"
DIN IAȘI



UNIVERSITATEA TEHNICĂ "GHEORGHE ASACHI" DIN IAȘI

Facultatea de Inginerie Chimică și Protecția
Mediului



în cotutelă cu



Universitatea De Sud Toulon -Var,
Franța



SISTEME SUB FORMĂ DE CAPSULE PE BAZĂ DE POLIMERI NATURALI ȘI COPOLIMERI AI ANHIDRIDELOR CICLICE PENTRU ÎNCAPSULAREA DE PRINCIPII BIOLOGIC ACTIVE

- Rezumatul tezei de doctorat -

Conducători de doctorat:

Prof. dr. ing. *dr.h.c.* Marcel Popa

Prof. dr. ing. Jean – François Chailan

Doctorand:

Ing. Delia-Mihaela Iurea (Rață)

IAȘI – 2012

UNIVERSITATEA TEHNICĂ "GHEORGHE ASACHI" DIN IAȘI
RECTORATUL

Către _____

Vă facem cunoscut că în ziua de 25 septembrie 2012 la ora 12, în Sala de Consiliu a Facultății de Inginerie Chimică și Protecția Mediului, va avea loc susținerea publică a tezei de doctorat intitulată:

**„SISTEME SUB FORMĂ DE CAPSULE PE BAZĂ DE POLIMERI NATURALI ȘI COPOLIMERI
AI ANHIDRIDELOR CICLICE PENTRU ÎNCAPSULAREA DE PRINCIPII BIOLOGIC ACTIVE”**

elaborată de doamna **ing. Delia-Mihaela Iurea (Rață)** în vederea conferirii titlului științific de doctor.

Comisia de doctorat este alcătuită din:

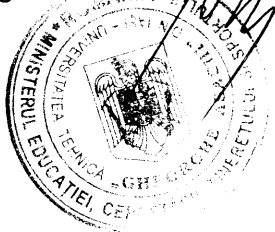
Prof.dr.ing. Silvia Curteanu Universitatea Tehnică „Gheorghe Asachi” din Iași	președinte
Prof.dr.ing. Marcel Popa Universitatea Tehnică „Gheorghe Asachi” din Iași	conducător de doctorat
Prof.dr.ing. Jean-François Chailan Université du Sud Toulon-Var , Franța	conducător de doctorat în cotutelă
Prof.dr.ing. Jacques Desbrieres Université de Pau et des Pays de l'Adour, Franța	referent oficial
Prof.dr. Patrick Martin Université d'Artois, IUT de Béthune, Franța	referent oficial
Prof.dr.ing. Lucian-Mircea Rusnac Universitatea POLITEHNICA Timișoara	referent oficial

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



UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI ȘI
PROTECȚIEI SOCIALE
AMPOSDRU



Fondul Social European
POSDRU 2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013



OIPOSDRU



UNIVERSITATEA TEHNICĂ
"GHEORGHE ASACHI"
DIN IAȘI

Teza de doctorat a fost realizată cu sprijinul financiar al proiectului „Burse Doctorale pentru Performanța în Cercetare la Nivel European (EURODOC)”.

Proiectul „Burse Doctorale pentru Performanța în Cercetare la Nivel European (EURODOC)”, POSDRU/88/1.5/S/59410, ID 59410, este un proiect strategic care are ca obiectiv general „Dezvoltarea capitalului uman pentru cercetare prin programe doctorale pentru îmbunătățirea participării, creșterii atractivității și motivației pentru cercetare. Dezvoltarea la nivel european a tinerilor cercetători care să adopte o abordare interdisciplinară în domeniul cercetării, dezvoltării și inovării.”.

Proiect finanțat în perioada 2009 - 2012.

Finanțare proiect: 18.943.804,97 RON

Beneficiar: Universitatea Tehnică “Gheorghe Asachi” din Iași

Partener: Universitatea „Babeș Bolyai” din Cluj-Napoca

Director proiect: Prof. univ. dr. ing. Mihaela-Luminița LUPU

Responsabil proiect partener: Prof. univ. dr. ing. Alexandru
OZUNU



Mulțumiri

Adresez mulțumirile mele celor care m-au încurajat și care mi-au oferit suport constant pentru elaborarea acestei teze de doctorat.

Cu deosebită considerație și recunoștință aduc mulțumiri speciale conducătorului meu științific, dumnului **Prof. univ. dr. ing. dr. h.c. Marcel Popa**, pentru încrederea, îndrumarea, rigurozitatea și sprijinul acordat în realizarea și finalizarea tezei de doctorat, dar mai ales pentru contribuția pe care a avut-o și o are în formarea mea ca cercetător.

Alese gânduri de mulțumire adresez domnului **Prof. dr. Jean – François Chailan** pentru oportunitatea pe care mi-a oferit-o de a realiza o parte din experimente sub atenta sa îndrumare, în cadrul Universității de Sud Toulon Var din Franța.

Sincere mulțumiri adresate distinșilor membri ai Comisiei de referenți, **Prof. dr. ing. Silvia Curteanu, Prof. dr. Jacques Desbrieres, Prof. dr. Patrick Martin, Prof. dr. ing. Lucian Rusnac** care au avut amabilitatea analizării și evaluării obiectivelor științifice prezentate în această teză.

Mulțumesc în mod deosebit doamnei **dr. bioing. Cătălina Anișoara Peptu** pentru încrederea, sprijinul, sfaturile și încurajările pe care mi le-a oferit din momentul începerii activității mele la doctorat.

De asemenea, aș dori să mulțumesc domnului **Prof. dr. Pascal Carriere** pentru sugestiile și sprijinul acordat pe perioada stagiului de cercetare realizat în cadrul Universității de Sud Toulon Var din Franța.

Aduc mulțumiri doamnei **Prof. univ. Carmen Elena Zamfir** și doamnei **Conf. dr. ing. Liliana Vereștiuc** pentru colaborarea deschisă și pentru efortul depus pe parcursul cercetărilor mele în vederea finalizării tezei de doctorat.

Doresc să adresez mulțumirile cuvenite domnului **dr. bioing. Cristian Peptu**, domnului **Ș.I. dr. Bogdan Ionel Tamba** și domnului **Ionuț Tudorancea** pentru sprijinul acordat în realizarea testelor in vivo.

Le mulțumesc tuturor colegilor Anca Niculina Cadinoiu, Cristina Mihaela Lefter, Mihaela Holban, Lăcrămioara Bălăiță, Mihaela Mândru, Simona Băcăiță, Gabriela Andrei, Bogdan Ciobanu, Simona Bețianu și Ancuța Rusu în mijlocul cărora am activat, pentru înțelegerea de care au dat dovadă și pentru atmosfera de prietenie și colegialitate manifestată pe parcursul acestor ani scurși de la înscrierea în programul de doctorat.

Mulțumesc din suflet persoanelor care dau un sens vieții mele, neprețuitului meu fiu **Iustin** și iubitului meu soț **Mihai**, care a fost permanent alături de mine, pentru dragostea și răbdarea cu care m-a înconjurat.

Surorii mele, **Tatiana**, și fratelui meu, **Adi**, le mulțumesc pentru prietenia și suportul pe care mi le-au oferit în momentele importante din viața mea.

Doresc să mulțumesc **părinților mei** iubiți dedicându-le această reușită. Ei mi-au insuflat dorința de a evolua în permanență, de a încerca lucruri noi, susținându-mă cu dragoste nemărginită și necondiționată în tot ceea ce am realizat. Nu în ultimul rând, aș dori să mulțumesc **socrului meu**, pentru afecțiunea, încurajările și sprijinul acordat.

Cu deosebită considerație,

Delia-Mihaela Iurea (Rață)

CUPRINS

Introducere	9
STUDIUL BIBLIOGRAFIC	
Capitolul 1. Micro și nanocapsule polimere cu aplicații în domeniul eliberării controlate de principii active	11
1.1 Introducere	11
1.2 Aspecte generale	11
1.2.1 Clasificarea sistemelor particulate	11
1.2.2 Nanocapsule. Generalități	12
1.2.3 Avantajele utilizării nanocapsulelor	14
1.3 Metode de preparare a micro și nanocapsulelor polimere	15
1.4 Încapsularea de medicamente	26
1.5 Eliberarea de medicamente	28
1.6 Metode de caracterizare a micro și nanocapsulelor	29
1.6.1 Caracterizarea structurală	30
1.6.1.1 Spectroscopia FTIR	30
1.6.1.2 Spectroscopia RAMAN	31
1.6.1.3 Rezonanța magnetică nucleară (RMN)	32
1.6.1.4 Difrakția de raze X	33
1.6.2 Caracterizarea morfologică	34
1.6.2.1 Microscopia electronică de baleiaj (SEM)	34
1.6.2.2 Microscopia electronică de transmisie (TEM)	36
1.6.2.3 Microscopia de forță atomică (AFM)	36
1.6.2.4 Difuzia dinamică a luminii (DLS)	38
1.6.2.5 Difractometria LASER	40
1.6.2.6 Potențialul zeta	41
1.6.3 Caracterizarea termică	42
1.6.3.1 Analiza termogravimetrică (TGA)	42
1.6.3.2 Calorimetria cu scanare diferențială (DSC)	43
1.7 Aplicațiile biomedicale ale nanocapsulelor polimere	45
1.7.1 Aplicații oftalmologice	45
1.7.2 Aplicații în terapia antitumorală	48
1.7.3 Administrarea orală	52
1.7.4 Aplicații transdermale	53

REZULTATE PROPRII

Capitolul 2. Parte experimentală	57
2.1 Materiale utilizate	57
2.2 Tehnici de sinteză	60
2.2.1 Obținerea de poli (acetat de vinil- <i>alt</i> -anhidridă maleică)	60
2.2.2 Obținerea de poli (N-vinilpirolidonă-anhidridă itaconică)	60
2.2.3 Obținerea de nanocapsule pe bază de poli(acetat de vinil- <i>alt</i> -anhidridă maleică) și gelatină	61
2.2.4 Obținerea de nanocapsule pe bază de poli (acetat de vinil- <i>alt</i> -anhidridă maleică) și chitosan	61
2.2.5 Obținerea de nanocapsule pe bază de poli(N-vinilpirolidonă-anhidridă itaconică) și chitosan	62
2.3 Metode de analiză și caracterizare	62
2.3.1 Spectroscopia FTIR	62
2.3.2 Metoda Kjeldahl	63
2.3.3 Difuzia dinamică a luminii (DLS)	63
2.3.4 Difractometria Laser	64
2.3.5 Microscopia electronică de baleiaj (SEM)	64
2.3.6 Microscopia electronică de transmisie (TEM)	64
2.3.7 Imagistica AFM	65
2.3.8 Analiza termogravimetrică (TGA)	65
2.3.9 Calorimetria cu scanare diferențială (DSC)	65
2.3.10 Umflarea nanocapsulelor în soluții apoase	66
2.3.11 Evaluarea biodegradabilității nanocapsulelor sub acțiunea enzimelor	66
2.3.12 Încărcarea nanocapsulelor cu principii active	68
2.3.13 Eliberarea <i>in vitro</i> a unor medicamente model	70
2.3.14 Teste de hemocompatibilitate	70
2.3.15 Teste de toxicitate	71
2.3.16 Teste <i>in vivo</i>	74
2.3.17 Determinarea <i>in vivo</i> a biocompatibilității nanocapsulelor - Examenul histopatologic	75
Capitolul 3. Sinteza și caracterizarea unor nanocapsule pe bază de poli (acetat de vinil-<i>alt</i>-anhidridă maleică) și gelatină	77
3.1 Caracterizarea structurală	79
3.2 Caracterizarea morfologică	80
3.2.1 Diametrul mediu al nanocapsulelor	80
3.2.2 <i>Potențialul zeta</i>	83

3.2.3 Randamentul de obținere a nanocapsulelor	84
3.2.4 Microscopia electronică de baleiaj (SEM)	85
3.2.5 Microscopia electronică de transmisie (TEM)	86
3.2.6 Imagistica AFM	86
3.2.7 Determinarea conținutului de azot din nanocapsule	87
3.3 Proprietățile termice ale nanocapsulelor	88
3.3.1 Analiza termogravimetrică (TGA)	88
3.3.2 Calorimetria cu scanare diferențială (DSC)	89
3.4 Comportamentul la umflare a nanocapsulelor în soluții apoase	90
3.5 Evaluarea biodegradabilității nanocapsulelor sub acțiunea enzimelor	93
3.6 Studii de încărcare a nanocapsulelor cu principii active	95
3.7 Studii de eliberare <i>in vitro</i> a unor medicamente model	95
3.8 Teste de toxicitate	97
3.9 Concluzii	97
Capitolul 4. Sinteza și caracterizarea unor nanocapsule pe bază de poli (acetat de vinil-<i>alt</i>-anhidridă maleică) și chitosan	99
4.1 Caracterizarea structurală	101
4.2 Caracterizarea morfologică	102
4.2.1 Diametrul mediu al nanocapsulelor	102
4.2.2 <i>Potențialul zeta</i> al nanocapsulelor	104
4.2.3 Microscopia electronică de baleiaj (SEM)	105
4.2.4 Microscopia electronică de transmisie (TEM)	105
4.2.5 Determinarea conținutului de azot din nanocapsule	106
4.3 Proprietățile termice ale nanocapsulelor	107
4.3.1 Analiza termogravimetrică (TGA)	107
4.3.2 Calorimetria cu scanare diferențială (DSC)	109
4.4 Comportamentul la umflare a nanocapsulelor în soluții apoase	109
4.5 Studii de încărcare a nanocapsulelor cu principii active	111
4.6 Studii de eliberare <i>in vitro</i> a unor medicamente model	112
4.7 Teste de hemocompatibilitate	114
4.8 Teste de toxicitate	115
4.9 Studiile <i>in vivo</i> ale nanocapsulelor de tip AVAM-CS-9 încărcate cu Ibuprofen	116
4.10 Determinarea <i>in vivo</i> a biocompatibilității nanocapsulelor de tip AVAM-CS-13 cu unele organe -Examenul histopatologic	118
4.11 Concluzii	120
Capitolul 5. Sinteza și caracterizarea unor nanocapsule pe bază de poli (N-vinilpirolidonă-<i>alt</i>-anhidridă itaconică) și chitosan	123

5.1 Caracterizarea structurală	125
5.2 Caracterizarea morfologică	126
5.2.1 Diametrul mediu al nanocapsulelor	126
5.2.2 Randamentul de obținere a nanocapsulelor	128
5.2.3 Microscopia electronică de baleiaj (SEM)	128
5.2.4 Microscopia electronică de transmisie (TEM)	129
5.3 Comportamentul la umflare a nanocapsulelor în soluții apoase	129
5.4 Studii de încărcare a nanocapsulelor cu 5-Fluorouracil	131
5.5 Studii de eliberare <i>in vitro</i> a 5-Fluorouracilului	131
5.6 Concluzii	132
Concluzii generale	135
Perspective	137
Bibliografie	138
Valorificarea rezultatelor	156

Introducere

În ultimii 35 de ani, dezvoltarea nanotehnologiei a deschis câteva perspective noi în știința medicală, în special în domeniul eliberării de medicamente. Termenul de "nanotehnologie" a fost tot mai mult folosit pentru a descrie procesele tehnologice și tehnicile analitice pentru materialele situate în intervalul „ultrafin” de ordinul milionimii de milimetru. Nanotehnologia cuprinde conceptele și "know-how-ul" care implică fabricarea, prelucrarea și aplicarea de structuri, dispozitive și sisteme, prin controlul formei și mărimii la scară nanometrică, și reprezintă una din tehnologiile cheie pentru dezvoltarea de noi materiale [1].

Nanomedicina poate fi definită ca aplicarea nanotehnologiei pentru prevenirea și tratamentul unor boli, precum și pentru scopuri de diagnostic. În acest context, dezvoltarea a diferite tipuri de nanodispozitive „medicament-transportator” oferă noi strategii pentru eliberarea țintită de medicamente minimizând efectele secundare și toxicitatea asociată consumului de medicamente pe scară largă pentru a trata organele sau celulele [2].

Progresele în domeniul nanotehnologiei și nanomedicinei au marcat apariția mai multor nanomateriale inovative, care sunt concepute pentru a revoluționa domeniul eliberării de medicamente, care a câștigat o atenție deosebită din partea oamenilor de știință, specialiștilor în industrie și medicilor [3]. Eliberarea de medicamente pe bază de transportori reprezintă o abordare alternativă pentru a îmbunătăți biodisponibilitatea medicamentelor. Un sistem ideal de eliberare de medicamente dispune de două elemente esențiale și anume: capacitatea de a ținti și de a controla eliberarea de substanțe active. Țintirea va asigura eficiență crescută a medicamentului și va reduce efectele secundare, mai ales atunci când este vorba despre medicamentele care se presupune că distrug celulele canceroase.

Este recunoscut faptul că atât valoarea intrinsecă a unei molecule active cât și sistemul de eliberare sunt cruciale pentru a realiza răspunsurile farmacologice dorite. Administrarea unor noi molecule de medicament este puternic limitată de profilele lor biofarmaceutice inadecvate. În plus, uneori este dificil de sintetizat noi medicamente cu proprietăți de permeabilitate și stabilitate adecvată. În acest caz, medicamentul este incapabil să ajungă la compartimentul biologic potrivit. Pornind de la acest neajuns, dezvoltarea unor sisteme de eliberare corespunzătoare pentru acești compuși ar fi un pas înainte pentru exploatarea lor clinică.

Micro/nanocapsulele au câștigat o atenție considerabilă în dezvoltarea și cercetarea sistemelor de eliberare de medicamente datorită avantajelor majore pe care le prezintă. Aceste sisteme devin din ce în ce mai atractive în industria farmaceutică, datorită dimensiunilor lor mici care permit o administrare parenterală (fără a trece prin sistemul digestiv), o mai bună direcționare și o suprafață mai mare de absorbție la membranele celulare [4].

Scopul cercetării noastre a constat în realizarea de noi biomateriale (micro și nanocapsule) apte să devină suporturi pentru încapsularea și eliberarea controlată a unor principii biologice active, care să ofere o soluție la problemele actuale din domeniul farmacologiei și medicinei.

Teza de doctorat intitulată „**Sisteme sub formă de capsule pe bază de polimeri naturali și copolimeri ai anhidridelor ciclice pentru încapsularea de principii biologice active**” a fost structurată în două părți: prima parte, corespunzătoare primului capitol, cuprinde studiul bibliografic iar a doua parte raportează rezultatele proprii obținute care sunt dezvoltate în alte patru capitole.

În **primul capitol** este prezentat un studiu amplu de literatură cu privire la stadiul actual în domeniul micro/nanocapsulelor polimere. Se discută unele noțiuni introductive, principalele metode de preparare ale micro/nanocapsulelor, metodele de caracterizare, încărcarea și eliberarea de medicamente precum și aplicațiile biomedicale ale nanocapsulelor polimere.

Al doilea capitol redă materialele utilizate, tehnicile de sinteză și metodele de analiză și caracterizare ale nanocapsulelor obținute.

Al treilea capitol tratează obținerea și caracterizarea unor nanocapsule pe bază de poli(acetat de vinil-*alt*-anhidridă maleică) și gelatină printr-un procedeu de condensare interfacială. Aceste nanocapsule oferă avantaje importante în ceea ce privește simplitatea preparării și posibilitatea ajustării morfologiei și proprietăților lor (în termeni de diametru, capacitate de umflare, etc.) în funcție de aplicațiile dorite. Diametrul nanocapsulelor este influențat de raportul dintre polimeri, concentrația soluției de polimeri și raportul dintre cele două faze.

În **capitolul IV** se prezintă prepararea și caracterizarea de nanocapsule pe baza unui copolimer sintetic, [poli(acetat de vinil-*alt*-anhidridă maleică)] și a unui polimer natural (chitosan) utilizând metoda de condensare interfacială. Optimizarea formulărilor de nanocapsule a fost evaluată studiind influența diferiților parametri după cum urmează: raportul dintre cei doi polimeri, raportul dintre soluția organică și cea apoasă, cantitatea de surfactant și timpul de reacție. Testele *in vivo* realizate au demonstrat că nanocapsulele încărcate cu ibuprofen au prezentat un efect întârziat în inhibarea durerii periferice și un efect susținut în inhibarea durerii de la nivel central.

Capitolul V constă în obținerea și caracterizarea unui sistem de nanocapsule pe bază de poli(N-vinilpirolidonă-*alt*-anhidridă itaconică) și chitosan utilizând metoda de condensare interfacială. Sistemele obținute au fost caracterizate din mai multe puncte de vedere.

Teza se încheie cu concluziile generale ale acestui studiu și lista bibliografică consultată. Teza de doctorat se extinde pe 154 pagini și conține 89 figuri, 25 tabele, 10 scheme de reacție și 236 referințe bibliografice.

REZULTATE PROPRII

Capitolul 3. Sinteza și caracterizarea unor nanocapsule pe bază de poli (acetat de vinil-*alt*-anhidridă maleică) și gelatină

Formarea nanocapsulelor se realizează prin difuzia celor doi polimeri, dizolvați în faze diferite, către interfață, unde are loc reacția ciclurilor anhidridice ale copolimerului cu grupele aminice laterale (sau chiar finale) ale gelatinei. În acest mod se obține o rețea prin formarea legăturilor de tip amidic între cei doi polimeri, produsul rezultat, sub formă de membrană, având un pronunțat caracter de hidrogel dată fiind hidrofilia ridicată a celor doi parteneri de reacție.

Deschiderea ciclului anhidridic de către gruparea aminică, mai reactivă, este însă concurată de reacția de hidroliză ce se produce, de asemenea la contactul fazelor, conducând la formarea de grupe carboxilice. Chiar dacă această reacție nu este totală, ea se desăvârșește însă în faza de separare și purificare a nanocapsulelor care presupune utilizarea apei alternativ cu alți solvenți organici. Este de presupus, în consecință, că în structura rețelei ce constituie membrana nanocapsulei nu mai există cicluri anhidridice, ci doar grupări carboxilice. Reacția globală conducând la structura membranei poate fi schematizată astfel:

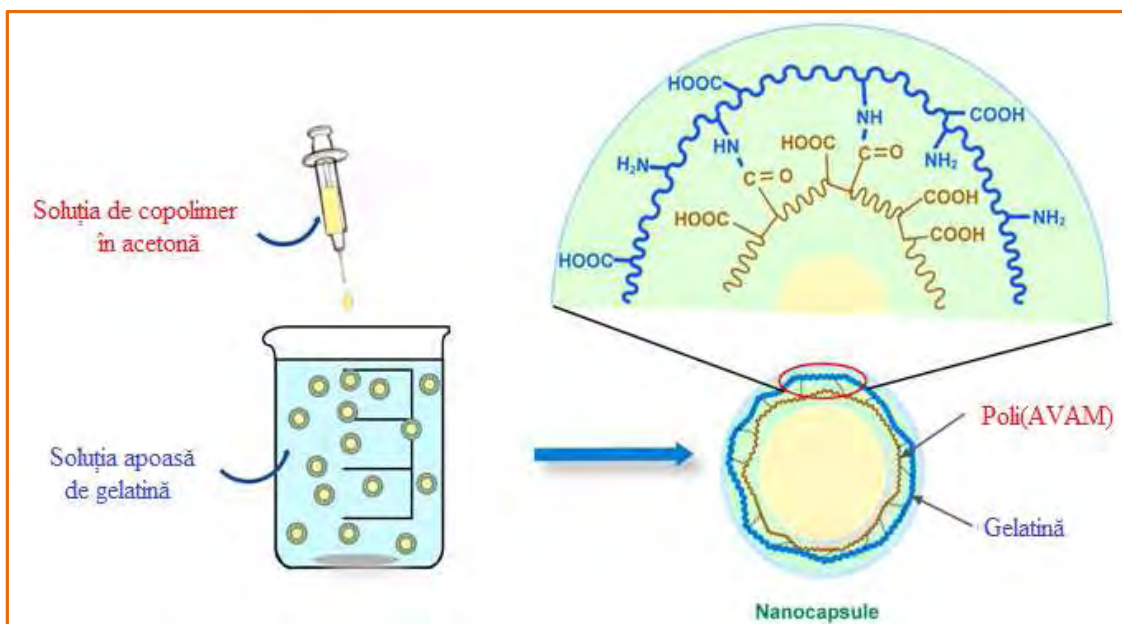


Figura 36. Ilustrarea schematică a reacției de condensare a gelatinei cu poli (AVAM) și hidroliza ciclurilor anhidridice

Programul experimental a inclus sinteza a 16 tipuri de nanocapsule în diferite condiții de reacție fiind prezentat în Tabelul 4.

Tabel 4. Programul experimental și codificarea probelor sintetizate în diferite condiții

Codul probelor	Raportul molar (moli AVAM /moli NH ₂ libere din gelatină)	Poli(AVAM) (%)	Gelatină tip B (%)	Span 80 (%)	Tween 80 (%)	Raportul Acetonă : Apă (v/v)
AVAM -G-1	22.67/1	0.3	0.075			1:4
AVAM -G-2	17.1/1		0.1	2	2	
AVAM -G-3	13.6/1		0.125			
AVAM -G-4	11.33/1		0.15			
AVAM -G-5	22.67/1	0.5	0.125			1:4
AVAM -G-6	17.1/1		0.15	2	2	
AVAM -G-7	13.6/1		0.2			
AVAM -G-8	11.33/1		0.25			
AVAM -G-9	22.67/1	0.75	0.1875			1:4
AVAM -G-10	17.1/1		0.25	2	2	
AVAM -G-11	13.6/1		0.31			
AVAM -G-12	11.33/1		0.375			
AVAM -G-13	22.67/1	0.5	0.125	3	3	1:4
AVAM -G-14	22.67/1		0.125	2	2	1:3
AVAM -G-15	22.67/1		0.125	2	2	1:5
AVAM -G-16	22.67/1		0.125	2	2	1:8

3.1 Caracterizarea structurală

Spectroscopia în infraroșu (FTIR) a confirmat producerea reacției dintre grupările anhidridice ale AVAM și grupările funcționale aminice din gelatină, prin formarea grupărilor amidice.

AVAM prezintă banda de absorbție specifică grupărilor de anhidridă la aproximativ 1731 cm⁻¹ [210].

În cazul gelatinei, peakul situat la aproximativ 1541 cm⁻¹ corespunde benzii amidice II și grupărilor aminice libere, în timp ce peakul găsit la 1643 cm⁻¹ este atribuit benzii amidice II [211].

Benzile de absorbție situate în jurul valorii de 1537 cm⁻¹ (banda amidă II este asociată cu vibrația de întindere a grupării N-H) și 1655 cm⁻¹ (banda amidă I, care este asociată cu vibrația de întindere a grupării –C=O) sunt atribuite legăturilor de tip amidă, care sunt mult mai intense decât cele prezente în gelatină.

Peakul de la 1742 cm⁻¹ corespunde benzii de absorbție specifice grupării C=O din gruparea carboxilică sugerând că toate grupările de anhidridă au participat fie la reacția de condensare cu gruparea aminică, fie la hidroliză.

3.2 Caracterizarea morfologică

Caracteristicile morfologice ale nanocapsulelor pe bază de poli(AVAM) și G au fost evidențiate atât prin difuzia dinamică a luminii cât și prin microscopie electronică de baleiaj, microscopie electronică de transmisie și microscopie de forță atomică. Potențialul zeta a pus în evidență stabilitatea suspensiilor de nanocapsule în mediu apos.

3.2.1 Diametrul mediu al nanocapsulelor

Diametrul mediu al nanocapsulelor este cuprins între 216 și 760 nm (Tabelul 5) și depinde de mai mulți parametri:

- raportul dintre polimeri;
- raportul între cele două faze;
- cantitatea de tensioactiv.

În figura 38 sunt redate curbele de distribuție granulometrică a eșantioanelor analizate. Se poate observa că distribuția granulometrică a nanocapsulelor prezintă pentru majoritatea probelor un caracter mononodal, cu excepția probei de nanocapsule AVAM-G-1 a cărei curbă de distribuție dimensională prezintă caracter binodal.

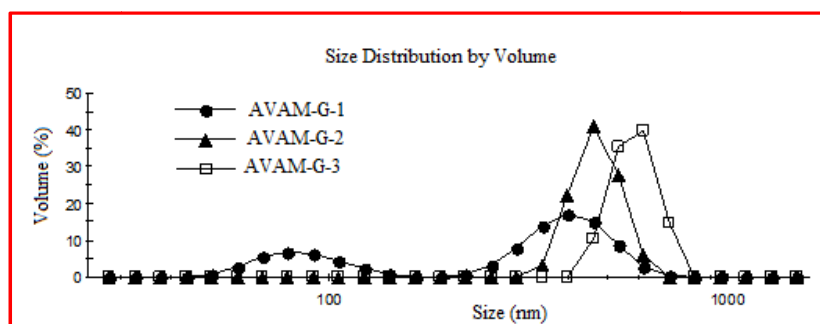


Figura 38. Curbele de distribuție dimensională pentru nanocapsulele obținute cu o concentrație a poli (AVAM) de 0,3%

Este evident, de asemenea, că diametrul nanocapsulelor crește odată cu creșterea cantității de gelatină (Figura 41). Acest efect poate avea următoarea explicație. Macromolecula de gelatină prezintă un număr redus de grupe α -aminice libere, spre deosebire de poli (AVAM) care conține un ciclu anhidridic la fiecare unitate structurală. Este deci greu de presupus că o macromoleculă de copolimer va reacționa doar cu o macromoleculă de gelatină, formând deci un monostrat (membrană) foarte subțire.

Creșterea cantității de G în raport cu poli (AVAM) va favoriza, în consecință, reacția unei macromolecule de copolimer cu tot mai multe macromolecule de gelatină, fie prin gruparea aminică laterală, fie prin cea de capăt, ceea ce va avea ca efect creșterea grosimii stratului de rețea interconectată/intercuplată formată, și în consecință a diametrului nanocapsulei.

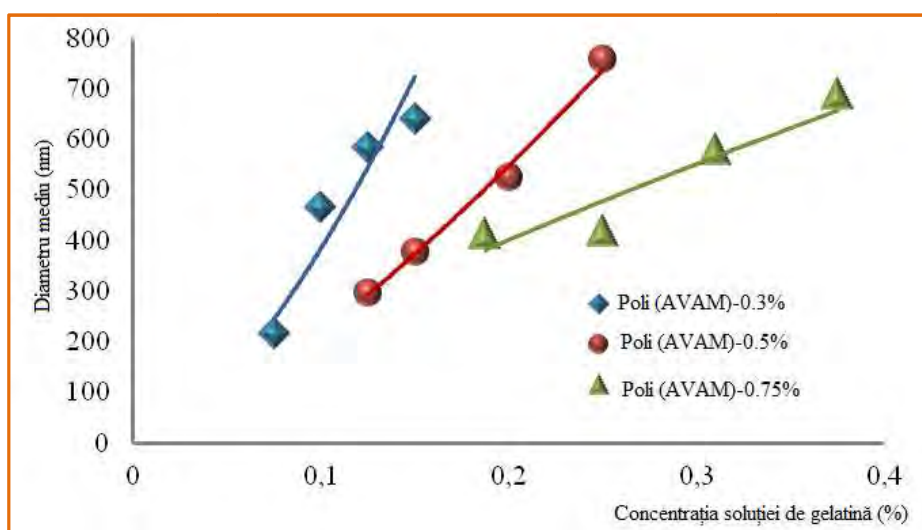


Figura 41. Variația diametrului mediu în funcție de concentrația de gelatină în soluția inițială

3.2.2 Potențialul zeta

Potențialul zeta al nanocapsulelor a fost măsurat în soluții cu valori diferite ale pH-ului, în scopul de a investiga stabilitatea suspensiilor lor apoase. S-a lucrat în soluție de electrolit (KCl) pentru a determina comportamentul capsulelor într-un mediu cu tărie ionică constantă.

O prima constatare a fost aceea ca lucrând în pH acid particulele au o tendință mai ridicată de aglomerare, reflectată și prin valoarea mai redusă a potențialului zeta. În mediu slab alcalin, tendința de aglomerare se reduce, consecință a faptului că se formează anionii carboxilat pe seama grupărilor carboxilice (de capăt sau substituenți existenți fie în gelatină, fie produse prin deschiderea ciclului anhidridic), astfel că între particulele cu încărcare negativă se vor exercita forțe de respingere mai mari decât în mediu acid. În consecință, suspensia de nanocapsule este mai stabilă, iar tendința de aglomerare se reduce [212].

După cum am prezentat anterior, condensarea celor doi polimeri este inevitabil însoțită de hidroliza ciclurilor anhidridice nereacționate cu gelatina. Prin reacția ciclului anhidridic cu gelatina se formează o nouă grupare carboxilică; prin hidroliza ciclului anhidridic se formează două grupări carboxilice. Aparent, cu cât reacționează mai multă gelatină cu copolimerul, cu atât trebuie să apară mai puține grupări carboxilice decât dacă ciclurile anhidridice ar fi hidrolizat. În realitate însă, gelatina aduce la rețeaua formată mai multe grupe carboxilice, între care una de capăt și altele provenind din acizii monoamino-dicarboxilici constituenți (α -amino glutaric sau asparagic).

Ca urmare, numărul grupelor carboxilice existente în rețeaua formată crește odată cu creșterea cantității de gelatină reactionată. Este deci logic ca potențialul zeta să crească odată cu reducerea raportului masic poli (AVAM)/G (g/g), fapt ce se constată, în general, experimental, și în cazul nostru, atât în mediu acid cât și în mediu bazic (Tabelul 6).

Tabelul 6 Rezultatele potențialului zeta

Codul probelor	Potențialul zeta (mV)		
	pH=3	pH=7.4	1 mM KCl
AVAM -G-1	-13.9	-15.9	-12.8
AVAM -G-2	-16.1	-14.8	-14.7
AVAM -G-3	-17.4	-18.4	-16.7
AVAM -G-4	-17.7	-18.9	-14.9
AVAM -G-5	-12.4	-16	-12.9
AVAM -G-6	-13.4	-16.5	-26.3
AVAM -G-7	-15.7	-18	-27.1
AVAM -G-8	-19	-19.2	-28.6
AVAM -G-9	-19.2	-16.9	-17.5
AVAM -G-10	-12.2	-14.5	-18.1
AVAM -G-11	-17.2	-19.5	-21.9
AVAM -G-12	-18	-18.7	-24.7
AVAM -G-13	-16.4	-19.5	-28.8
AVAM -G-14	-17.6	-14.2	-29.3
AVAM -G-15	-19.4	-20.4	-28.6
AVAM -G-16	-15.4	-15.9	-20.6

3.2.4 Microscopia electronică de baleiaj (SEM)

Capsulele sintetizate sunt aproximativ sferice, dar prezintă tendință de aglomerare atunci când sunt analizate în stare de pulbere, susținută și de valorile potențialului zeta. (Figura 42.A).

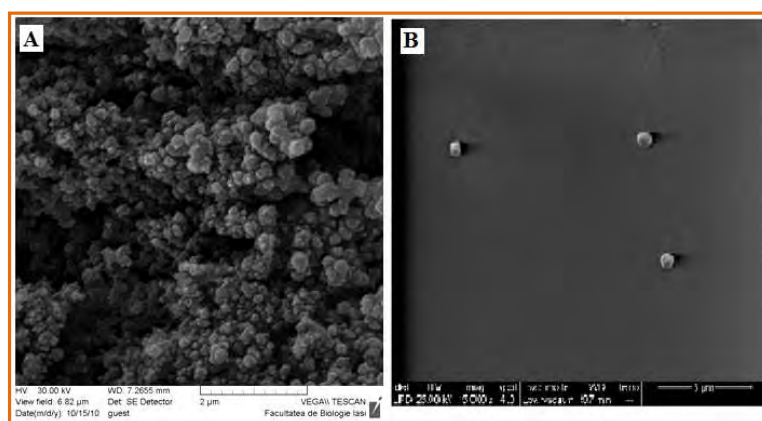


Figura 42. Microscopia electronică de baleiaj (SEM) pentru proba AVAM-G-1 analizată: A) în stare de pulbere, B) în acetonă

Când nanocapsulele sunt analizate din acetonă se observă o mai bună individualizare a lor (Figura 42.B). Diametrul nanocapsulelor prezintă valori în domeniul sutelor de nanometri, în concordanță cu rezultatele obținute prin DLS.

3.2.5 Microscopia electronică de transmisie (TEM)

Microscopia electronică de transmisie redată în Figura 43 ne-a adus informații suplimentare în ceea ce privește forma și dimensiunile nanocapsulelor. Din imaginea TEM pentru proba AVAM-G-1 putem trage următoarele concluzii:

- nanocapsulele prezintă formă sferică;
- diametrul capsulelor analizate este de aproximativ 70 nm.

În cazul probei AVAM-G-1 cu distribuție binodală particula surprinsă în câmpul vizual al microscopului electronic face parte din populația cu diametru mai redus (valoarea medie a diametrului este de 67 nm conform Figurii 38).

Aceste rezultate sunt în concordanță cu analizele DLS și SEM prezentate anterior.

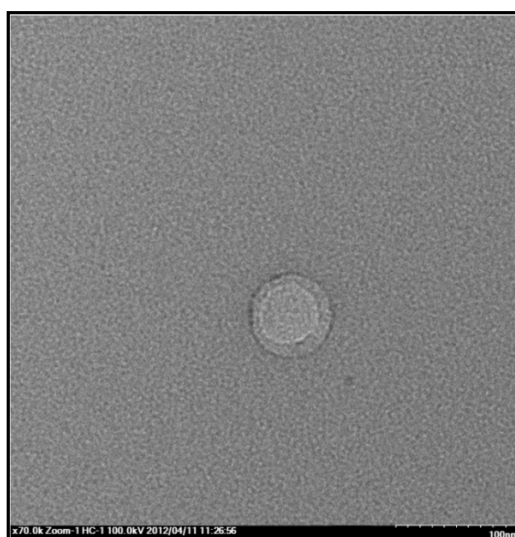


Figura 43. Microscopia electronică de transmisie (TEM) pentru proba AVAM-G-1

3.2.6 Imagistica AFM

Analiza AFM (Figura 44) a fost efectuată pentru o caracterizare mai completă din punct de vedere morfologic și dimensional, a nanocapsulelor.

Este evident că forma particulelor este destul de neregulată, polidispersitatea dimensională este ridicată (se confirmă caracterul binodal al curbei de distribuție dimensională pentru proba AVAM-G-1, observându-se două populații de particule). Forma neregulată este determinată probabil de prezența agregatelor.

Comparând diametrul nanocapsulelor măsurat din imaginile AFM cu cel obținut prin difuzie dinamică a luminii, respectiv cu cel dedus din imaginile SEM, se constată că rezultatele sunt concordante.

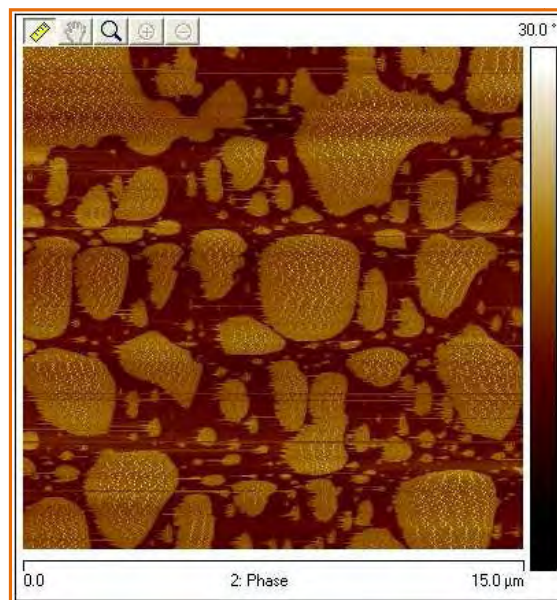


Figura 44. Imaginea AFM a probei AVAM-G-1

3.2.7 Determinarea conținutului de azot din nanocapsule

Din Figura 45 se poate observa că aproape toată gelatina care a intrat în reacție se regăsește în compoziția finală a nanocapsulelor. O altă observație importantă este aceea că odată cu creșterea concentrației de gelatină din amestecul de polimeri crește și conținutul de azot (evident, și de proteină) care se regăsește în capsule.

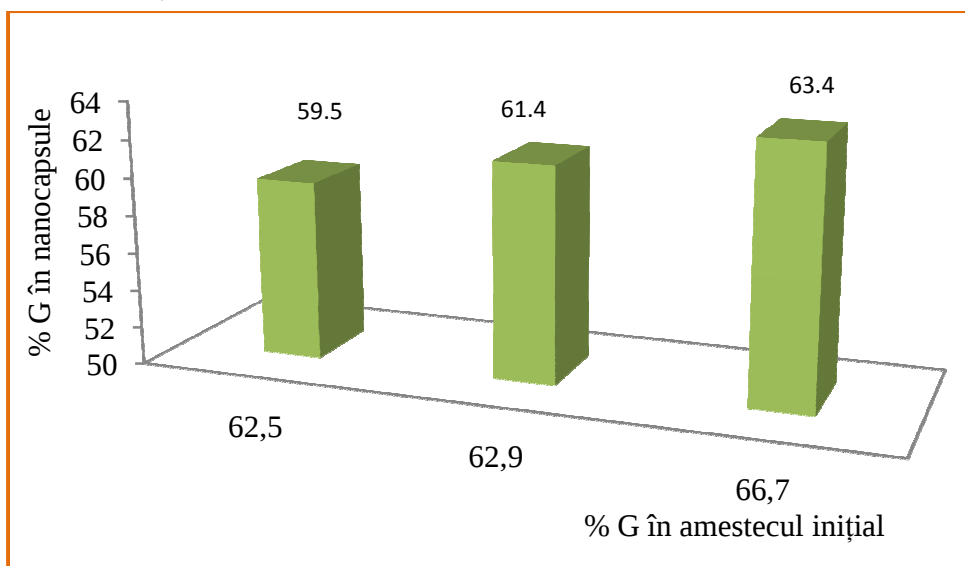


Figura 45. Influența concentrației de gelatină în amestecul inițial de polimeri asupra compoziției nanocapsulelor

3.3 Proprietățile termice ale nanocapsulelor

3.3.1 Analiza termogravimetrică (TGA)

Gelatina de tip B prezintă trei etape de pierdere de masă. În prima etapă a fost observată o pierdere de masă de 10,5% la aproximativ 77°C, care este datorată eliminării apei libere din gelatină. A doua treaptă de pierdere de masă de până la 46% are loc în jurul temperaturii de 328°C și este atribuită scindării termice a legăturii peptidice din lanțul de gelatină [213]. Ultima etapă de degradare are loc la temperatura de 595°C, unde se înregistrează și cea mai mare pierdere de masă de aproximativ 41,4%, aceasta este datorată degradării termice a scheletului de hidrocarbură.

Poli (AVAM) prezintă patru etape de pierdere de masă. Prima treaptă de circa 2,5% din greutatea inițială a fost observată la aproximativ 49°C și este atribuită deshidratării copolimerului. A doua etapă de pierdere de masă de 9% care are loc la aproximativ 152°C corespunde eliminării grupărilor acetat, fără descompunerea unităților de anhidridă maleică. O pierdere de masă semnificativă (47%) a poli (AVAM) are loc la temperatura de 272°C. Această pierdere de masă poate fi atribuită scindării așteptate a inelelor anhidridice din unitățile de anhidridă maleică (producând mari cantități de acid acetic, dioxid de carbon și monoxid de carbon) [214, 215]. Copolimerul prezintă o degradare completă la aproximativ 520°C, unde pierderea de masă este semnificativă, respectiv de 41%.

În cazul AVAM-G-7, au fost observate patru etape de descompunere. Pierderea de masă (8%), de la aproximativ 60°C este atribuită ieșirii apei libere din sistem. A doua treaptă de pierdere de masă (20%), care are loc în jurul temperaturii de 178°C, se datorează eliminării grupelor acetat și, de asemenea, apei care se găsește în interiorul capsulelor. Pierderea de masă cea mai importantă de aproximativ 42,2% a fost înregistrată la temperatura de 334°C, care se datorează scindării termice a legăturilor peptidice din gelatină. În ultima etapă s-a observat ca proba AVAM-G-7 se degradează complet rămânând aproape fără rezidu în jurul temperaturii de 512°C, cu o pierdere de masă de aproximativ 28,3%. Este de remarcat faptul că rețeaua nou formată prezintă o bună stabilitate termică.

3.3.2 Calorimetria cu scanare diferențială (DSC)

Caracterizarea termică a probelor obținute a fost completată de calorimetria de baleiaj (DSC).

Gelatina prezintă o endotermă cu un maxim în jurul temperaturii de 113°C ($\Delta H = 212.1$ J/g), și poate fi atribuită devitrifierii blocurilor bogate în α -amino acizi din lanțul polipeptidic [216]. Al doilea peak endotermic se găsește în jurul valorii de 228°C ($\Delta H = 10.89$ J/g), și corespunde cu temperatura de topire (T_m) a gelatinei. Aceste rezultate sunt în acord cu cele găsite în literatura de specialitate [217, 218].

În cazul poli (AVAM), termograma prezintă o tranziție în jurul temperaturii de 75°C care poate fi dată de tranziția sticloasă (T_g) a copolimerului. Un prim peak endotermic situat la 178°C ($\Delta H = 112.6 \text{ J/g}$) corespunde eliminării grupelor acetat.

În final, proba de nanocapsule AVAM-G-7 prezintă un peak endotermic larg în jurul valorii de 95°C ($\Delta H = 118.9 \text{ J/g}$), care poate fi atribuit evaporării apei libere absorbite în timpul manipulării eșantionului. Al doilea peak endotermic, mai pronunțat este situat la aproximativ 179°C ($\Delta H = 107.9 \text{ J/g}$) și corespunde eliminării grupelor acetat. Acest comportament este în concordanță cu rezultatele analizei termogravimetrice.

3.4 Comportamentul la umflare al nanocapsulelor în soluții apoase

Studiul comportării în dispersie apoasă a nanocapsulelor s-a impus dată fiind potențiala lor utilizare fie ca purtători de medicamente (când lucrează în medii apoase fiziologice) fie de biocide destinate vopselelor anti-fouling (când lucrează în mediu apos salin).

În Figura 49 sunt reprezentate rezultatele studiului cineticii de umflare a nanocapsulelor în soluție de tampon fosfat (pH = 7,4). Se poate observa că toate probele prezintă o umflare rapidă, care este cauzată de pătrunderea bruscă a apei în membrana polimeră, precum și în interiorul capsulelor, urmată de o umflare mai lentă până la aproximativ 7 ore, după care se instalează un echilibru.

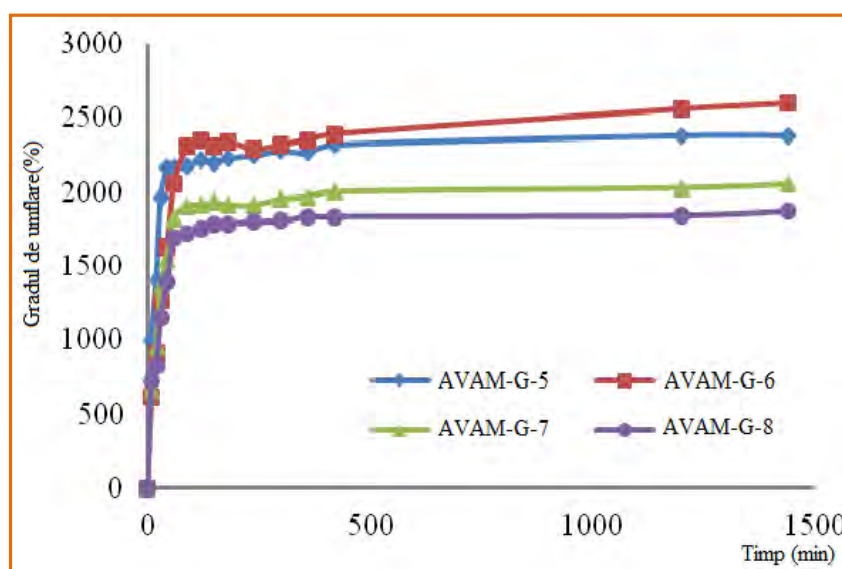


Figura 49. Cinetica de umflare a nanocapsulelor obținute la o concentrație a poli (AVAM) de 0,5%

Ionii din mediu alcalin au un efect important asupra comportamentului umflării nanocapsulelor, respectiv a membranei acestora. Grupările carboxilice, care sunt formate prin deschiderea ciclului anhidridic sunt ionizate, și repulsiile electrostatice dintre grupările carboxilat determină creșterea gradului de umflare. Acest comportament este în concordanță și cu rezultate găsite în literatura de specialitate [219].

Gradul de umflare al nanocapsulelor se constată a fi în intervalul de 1900-3230% și este puternic influențat de dimensiunea capsulelor (Figura 51); se poate observa că gradul de umflare scade cu creșterea diametrului nanocapsulelor. Pe de altă parte, raportul molar dintre polimeri joacă un rol important în procesul de umflare. Rezultatele prezentate în Figura 52 indică faptul că gradul de umflare scade odată cu scăderea raportului molar dintre poli (AVAM) și gelatină.

Anterior s-a arătat că diametrul nanocapsulelor crește cu scăderea raportului dintre polimeri (respectiv creșterea cantității de gelatină), deci rezultatele prezentate mai sus sunt în concordanță. Explicația acestui efect este următoarea: după cum s-a mai precizat anterior, creșterea cantității de gelatină în sistemul de reacție conduce la legarea unor cantități tot mai mari de proteină la copolimerul sintetic.

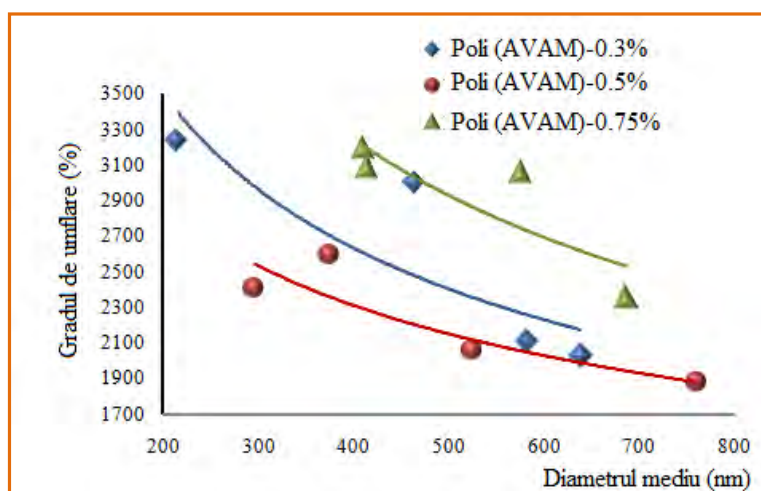


Figura 51. Gradul de umflare după 24 de ore într-o soluție de tampon fosfat (pH = 7,4) în funcție de diametrul mediu

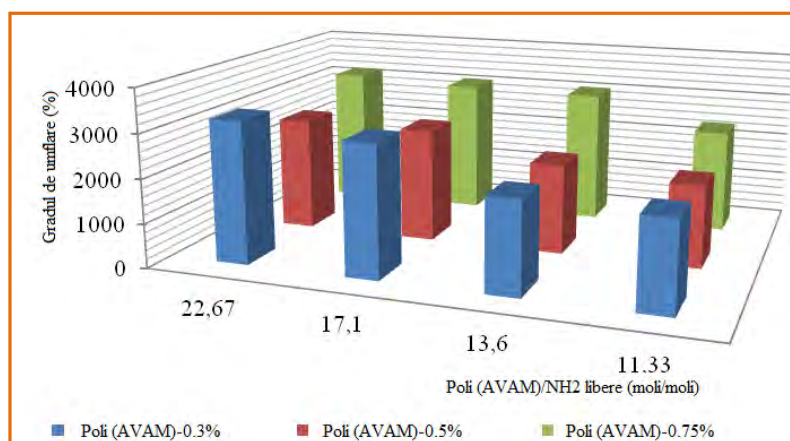


Figura 52. Gradul de umflare după 24 de ore într-o soluție de tampon fosfat (pH = 7,4) în funcție de raportul molar dintre cei doi polimeri

Peretele membranei nanocapsulei devine, în consecință, tot mai gros (ceea ce explică și creșterea diametrului particulelor cu acest parametru) ca urmare, elasticitatea membranei scade. Acest fenomen are următoarele efecte:

- difuzia apei prin membrana polimeră se reduce semnificativ;
- capacitatea nanocapsulei de a include cantități mari de apă se reduce.

Cele două efecte, cumulate, duc la reducerea gradului global de umflare a capsulelor, chiar dacă în membrana polimeră se acumulează tot mai multe grupări carboxilice aduse de proteină.

3.5 Evaluarea biodegradabilității nanocapsulelor sub acțiunea enzimelor

Se consideră că eficiența de degradare este de 100% la gelatina liberă care furnizează cea mai mare concentrație de grupări aminice primare (C_0) obținute prin hidroliza enzimatică după 29 de ore. Eficiența degradării la durate inferioare ale procesului (pentru gelatina pură) s-a exprimat ca procent al grupelor $-NH_2$ formate prin degradare la anumite intervale de timp față de C_0 în grupe aminice. Pentru fiecare din probele de nanocapsule analizate s-a determinat concentrația maximă de grupe $-NH_2$ datorate numai degradării gelatinei iar eficiența de degradare a capsulelor s-a exprimat ca procent al grupelor $-NH_2$ nou formate la durate inferioare față de acest C_0 .

Luând în considerare cantitatea inițială de gelatină din nanocapsule a fost demonstrat faptul că practic toată gelatină din componența lor a fost degradată (Figura 53).

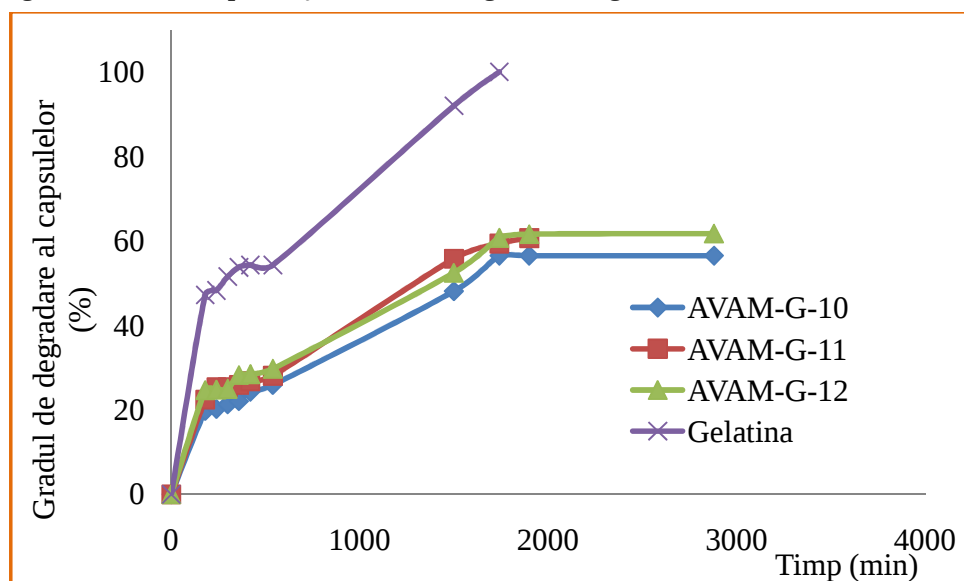


Figura 53. Evoluția în timp a degradării enzimatică a gelatinei și a unor nanocapsule

Din studiul de degradare enzimatică a nanocapsulelor pe bază de poli (AVAM) și G, precum și a proteinei libere se poate observa că gelatina pură se degradează în totalitate după aproximativ 29 de ore în timp ce nanocapsulele ating pragul maxim de degradare după 32 de ore (Figura 54).

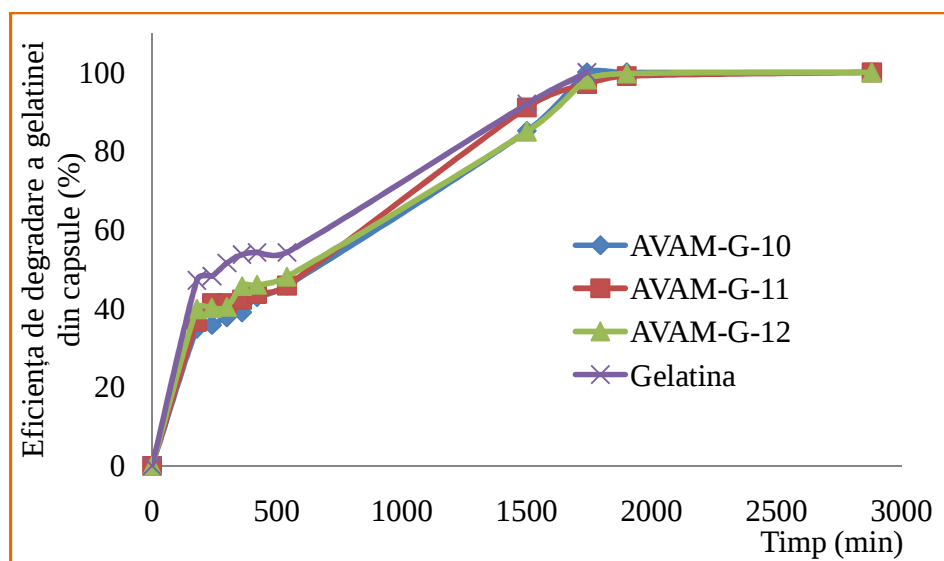


Figura 54. Eficiența de degradare a gelatinei din capsule și din gelatina pură

3.6 Studii de încărcare a nanocapsulelor cu Penicilina G

Eficiența de încapsulare a PG în nanocapsule (față de PG existentă în soluția inițială, din care s-a făcut încărcarea) se situează între 33% și 59%. Nu putem corela aceste rezultate cu gradul de umflare ale nanocapsulelor deoarece încărcarea a fost realizată în condiții diferite. Cantitatea de PG încărcată în nanocapsule crește odată cu creșterea concentrației de gelatină din amestecul inițial de polimeri. Din Tabelul 11 se poate observa că nanocapsulele prezintă o capacitate crescută de încărcare a medicamentului (raportul masic medicament/nanocapsule este mai mare decât 1, cu excepția probei AVAM-G-5), ceea ce constituie un avantaj major al acestui tip de capsule, demonstrând indirect că acestea sunt goale.

Tabelul 11 Rezultatele privind eficiența de încapsulare a PG în nanocapsule

Codul probelor	Cantitatea de PG încărcată în nanocapsule (g/g)	Eficiența de încapsulare (%)
AVAM-G-5	0,825	33
AVAM--G-6	1,025	41
AVAM--G-7	1,475	59
AVAM--G-8	1,325	53

3.7 Studii de eliberare *in vitro* a Penicilinei G

Curbele de eliberare a PG din nanocapsule în diferite medii apoase (pH = 7.4 și pH = 3) sunt prezentate în Figura 55. Eliberarea PG din nanocapsule este controlată de procesul de difuzie prin membrana polimeră. Rezultatele privind eliberarea PG sunt în concordanță cu comportamentul observat la umflare în cazul mediului alcalin.

Rezultatele arată că eficiența de eliberare a PG în mediu alcalin este între 64% și 83%, în timp ce în mediu acid se găsește între 51% și 90%.

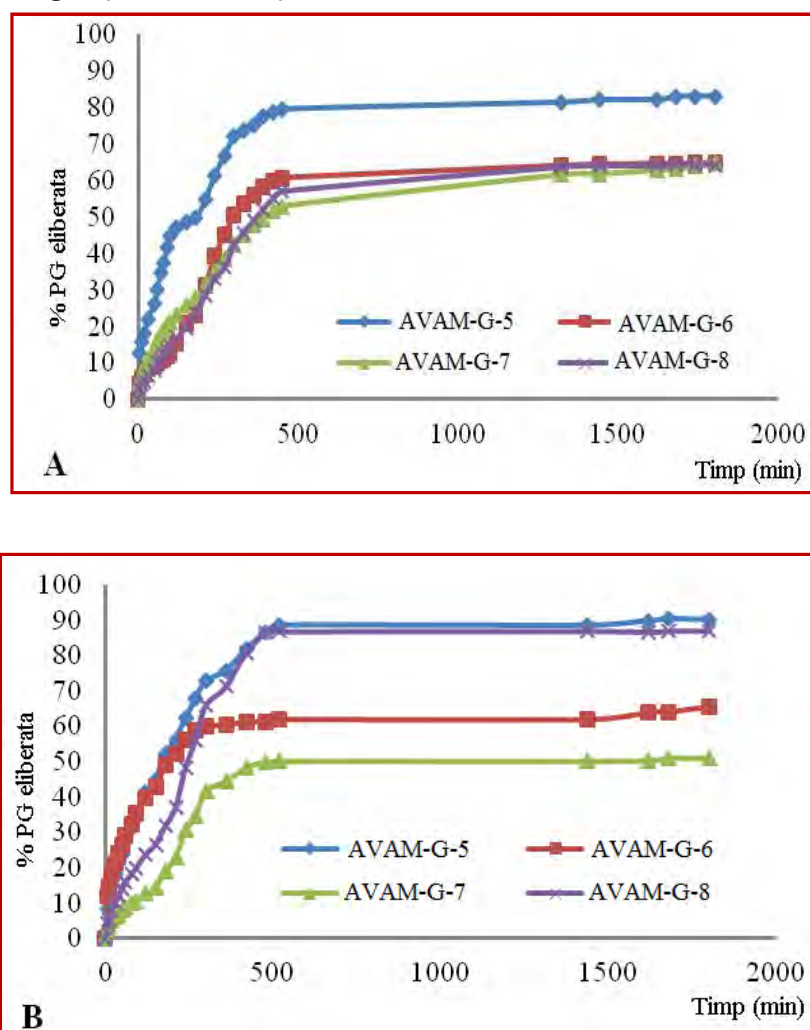


Figura 55. Profilele de eliberare *in vitro* ale PG din nanocapsule în: A- Soluție de tampon fosfat (pH = 7,4), B- soluție de tampon citrat (pH = 3)

Este evident că raportul molar dintre cei doi polimeri (care determină grosimea membranei și densitatea rețelei polimere), are un rol important în ceea ce privește eliberarea PG din nanocapsule. O altă observație este aceea că în primele ore are loc o eliberare rapidă a PG din nanocapsule („burst” effect) și apoi o eliberare lentă până la echilibru. Acest comportament poate fi datorat medicamentului adsorbit la suprafața nanocapsulelor, care se eliberează mai rapid [220].

3.8 Teste de toxicitate

Pentru prepararea nanocapsulelor au fost utilizați o serie de agenți tensioactivi (Tween 80 și Span 80) care prezintă toxicitate pentru organism. În scopul de a obține materiale cu o toxicitate cât mai scăzută și care să poată fi folosite pentru aplicații medicale, nanocapsulele au fost supuse unor

purificări stricte pentru a îndepărta orice urmă de agent tensioactiv. Doza letală a fost determinată prin metoda Speerman Karber.

În urma acestui studiu s-a constatat că valoarea dozei letale medii a nanocapsulelor este de aproximativ **3850 mg/kg corp**. Conform claselor de toxicitate Hodge și Sterner nanocapsulele sintetizate se încadrează în clasa de toxicitate scăzută ceea ce le face apte pentru aplicații medicale.

3.9 Concluzii

- ✚ În acest studiu a fost investigată prepararea unor nanocapsule polimere pe bază de poli (acetat de vinil -*alt*- anhidridă maleică) și gelatină printr-o metodă de condensare interfacială;
- ✚ Analiza FTIR a confirmat formarea noilor legături de tip amidic care are loc prin deschiderea ciclului anhidridic din copolimer sub acțiunea grupărilor NH₂ din gelatină;
- ✚ Analiza dimensională a evidențiat că diametrul capsulelor a variat între 200 și 760 nm;
- ✚ Nanocapsulele oferă avantaje importante, cum ar fi: simplitatea de preparare și obținerea unor dimensiuni medii situate în domeniul nanometric care le face potrivite pentru aplicațiile medicale;
- ✚ Nanocapsulele prezintă o bună stabilitate termică;
- ✚ Studiile de biodegradare au demonstrat că aproape toată gelatina din componența capsulelor a fost degradată;
- ✚ Acest sistem a demonstrat o excelentă capacitate de umflare, care permite încapsularea unor cantități crescute de medicament și o viteză bună de eliberare,
- ✚ Nanocapsulele prezintă o toxicitate scăzută.

Capitolul 4. Sinteza și caracterizarea unor nanocapsule pe bază de poli (acetat de vinil-*alt*-anhidridă maleică) și chitosan

Nanocapsulele au câștigat o atenție considerabilă în cercetarea și dezvoltarea de sisteme de eliberare controlată, datorită avantajelor lor semnificative: pot îmbunătăți eficacitatea și reduce toxicitatea medicamentelor, pot încapsula medicamente cu o eficiență crescută, pot juca un rol în absorbția, metabolizarea și eliminarea de medicamente [221,222]. Având în vedere aceste considerente, scopul acestui studiu a fost de a realiza noi nanocapsule apte să devină suporturi pentru încapsularea și eliberarea controlată a unor principii biologice active, care să ofere o soluție la problemele actuale din domeniul farmacologiei și medicinei.

În acest sens, s-a elaborat un sistem de nanocapsule pe baza unui polimer natural (chitosan) și a unui polimer sintetic poli (acetat de vinil-*alt*-anhidridă maleică) - [poli (AVAM)], prin metoda de condensare interfacială.

Optimizarea formulărilor de nanocapsule a fost evaluată studiind influența diferitelor variabile: raportul dintre cei doi polimeri, raportul dintre soluția apoasă și cea organică, cantitatea de agent tensioactiv și timpul de reacție.

Reacția care conduce la formarea membranei polimere poate fi formulată ca în figura de mai jos:

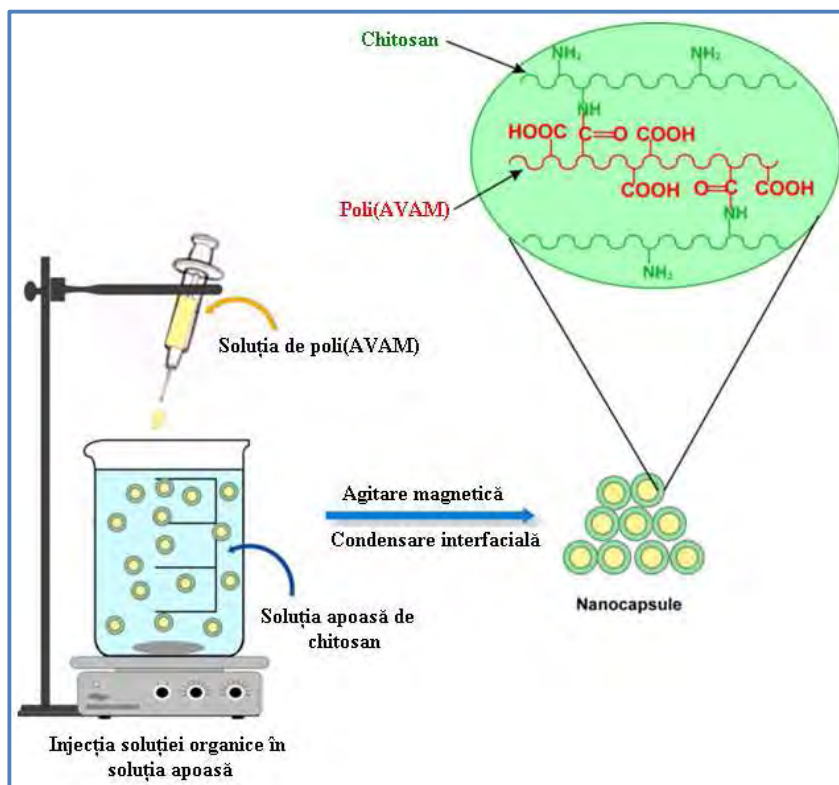


Figura 57. Ilustrarea schematică a reacției de condensare interfacială a chitosanului cu poli(AVAM) și structura finală a membranei polimere

Programul experimental care a fost urmat în prepararea nanocapsulelor este redat în Tabelul 13 (pg. 26) și conține, pe lângă parametrii considerați ca putând influența caracteristicile nanocapsulelor și codurile probelor sintetizate.

4.1 Caracterizarea structurală

Spectrele FTIR confirmă producerea reacției dintre grupările anhidridice ale poli (AVAM) și grupările aminice ale chitosanului prin formarea noilor grupări de tip amidă.

În spectrul FTIR al poli (AVAM), banda de absorbție de la 1732 cm^{-1} corespunde vibrației de întindere a grupării $\text{C}=\text{O}$ din grupările anhidridice [207].

Chitosanul prezintă banda caracteristică a grupării carbonilice ($\text{C}=\text{O}$) la 1658 cm^{-1} și a grupelor aminice libere (-NH_2) la 1600 cm^{-1} [225,226].

Nanocapsulele prezintă o bandă de absorbție la 1623 cm^{-1} , care corespunde legăturilor carbonilice din grupările amidice nou formate și peak-ul de absorbție de la 1575 cm^{-1} este atribuit grupării -NH. În plus, peak-ul de la 1731 cm^{-1} corespunde benzii de absorbție specifice grupării -C = O din gruparea carboxilică, sugerând că toate grupările anhidridice au participat fie la reacția de condensare, fie la hidroliză.

Tabelul 13 Programul experimental și codificarea probelor sintetizate

Codul probei	Raportul molar (moli de NH_2 libere din chitosan /moli (AVAM))	Concentrația de poli(AVAM) în acetonă (%)	Concentrația de Chitosan în apă (%)	Span 80 (%)	Tween 80 (%)	Soluția de poli(AVAM) /Soluția de Chitosan (v/v)	Timpul de reacție (ore)
AVAM-CS - 1	1/1.44	0.3	0.05	2	2	1:4	3
AVAM - CS -2	1/1		0.075				
AVAM - CS -3	1/0.72		0.125				
AVAM - CS -4	1/0.48		0.15				
AVAM - CS -5	1/0.41		0.175				
AVAM - CS -6	1/1.44	0.5	0.083	2	2	1:4	3
AVAM - CS -7	1/1		0.125				
AVAM - CS -8	1/0.72		0.166				
AVAM - CS -9	1/0.48		0.25				
AVAM - CS -10	1/0.41		0.29				
AVAM - CS -11	1/1.44	0.75	0.125	2	2	1:4	3
AVAM - CS -12	1/1		0.1875				
AVAM - CS -13	1/0.72		0.25				
AVAM-CS -14	1/1	0.3	0.075	2	2	1:4	8
AVAM-CS -15							12
AVAM-CS -16	1/1	0.5	0.125	3	3	1:4	3
AVAM-CS -17				1	1		
AVAM-CS -18	1/1	0.5	0.125	2	2	1:3	3

4.2 Caracterizarea morfologică

4.2.1 Diametrul mediu al nanocapsulelor

Diametrul mediu al nanocapsulelor preparate din poli (AVAM) și chitosan este situat în general, între 394 și 991 nm, iar creșterea concentrației de chitosan conduce la o creștere a diametrului nanocapsulelor.

Primele trei probe (AVAM-CS-1, AVAM-CS-2, AVAM-CS-3), caracterizate printr-un conținut mai redus de chitosan prezintă o distribuție dimensională binodală în timp ce celelalte două sunt caracterizate de o distribuție mononodală (Figura 59). Diametrul mediu al nanocapsulelor depinde de raportul dintre cei doi polimeri și de raportul dintre soluția organică și cea apoasă. Se constată astfel că diametrul mediu al nanocapsulelor crește odată cu creșterea cantității de chitosan (odată cu creșterea concentrației soluției de chitosan) (Figura 60).

Acest comportament poate fi explicat după cum urmează: în CS există, cu aproximație, o singură grupare aminică pentru fiecare unitate structurală; copolimerul sintetic conține un ciclu de anhidridă pentru fiecare unitate structurală.

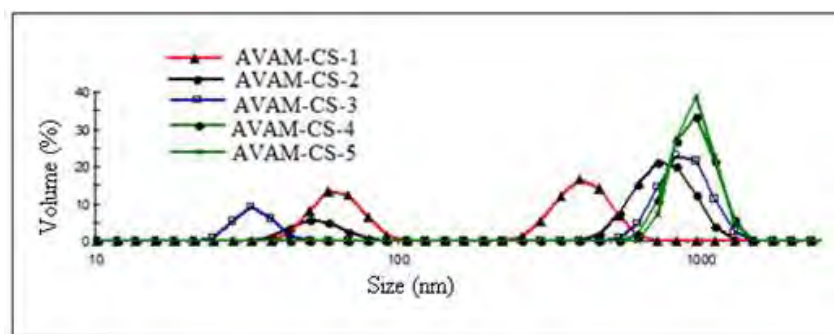


Figure 59. Curbele de distribuție dimensională ale nanocapsulelor pe bază de poli (AVAM) și chitosan

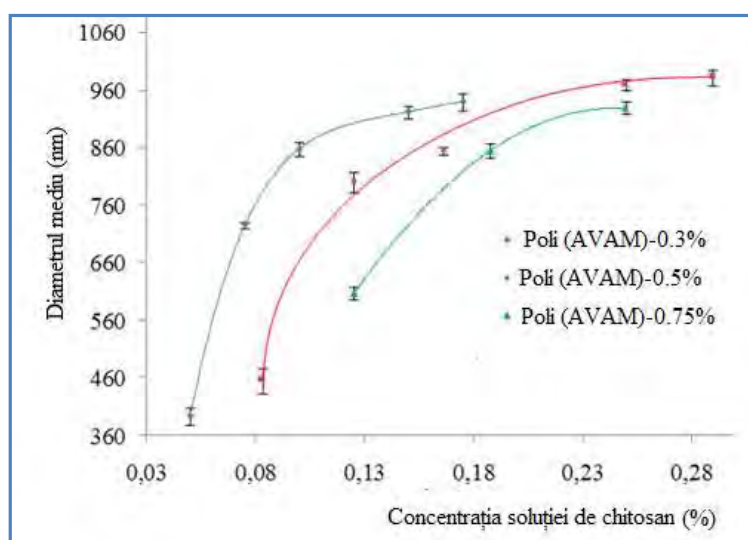


Figura.60 Variația diametrului mediu în funcție de concentrația de chitosan în soluția inițială

Ideal, macromolecula de copolimer va reacționa doar cu un singur lanț de chitosan, formând o membrană foarte subțire, dar deschiderea ciclului de anhidridă de către grupările aminice se află în competiție cu reacția de hidroliză care se realizează la contactul fazelor rezultând formarea grupărilor carboxilice.

În consecință, creșterea cantității de CS va promova reacția unei macromolecule de copolimer cu macromoleculele de CS, ceea ce conduce în primul rând la creșterea grosimii membranei și în al doilea rând la creșterea diametrului nanocapsulei. În ceea ce privește raportul între cele două faze putem observa faptul că în cazul unui raport mai mic (1:3), cum este cazul probei AVAM-CS-18, diametrul nanocapsulelor crește. Variația concentrației de surfactant nu influențează semnificativ dimensiunea nanocapsulelor.

4.2.2 Potențialul zeta al nanocapsulelor

Potențialul zeta a fost determinat pentru a investiga stabilitatea dispersiei apoase de nanocapsule și depinde, în principal, de natura chimică a polimerilor și pH-ul mediului utilizat. Prin urmare, potențialul zeta a fost măsurat în primul rând într-o soluție cu pH = 7.4 pentru a simula condițiile fiziologice, și apoi într-o soluție de electrolit (KCl), pentru a determina comportamentul capsulelor într-un mediu cu tărie ionică constantă.

Încărcarea negativă a AVAM-CS poate fi atribuită prezenței grupărilor carboxilice pe suprafața poli (AVAM). De obicei, atunci când valorile potențialului zeta sunt situate între -25 și -30 mV, se estimează o bună stabilitate coloidală datorită barierei ridicate de energie dintre particule [227].

Reacția de condensare a celor doi polimeri este însoțită de hidroliza ciclurilor anhidridice nereacționate cu chitosanul care conduce la apariția a doua grupări carboxilice din fiecare ciclu. O nouă grupare carboxilică este formată și prin reacția ciclului anhidridic cu chitosanul. Prin urmare, dacă mai mult chitosan reacționează cu poli (AVAM) apar mai puține grupări carboxilice, în comparație cu ciclurile anhidridice care ar fi hidrolizate.

În consecință, numărul de grupări carboxilice din rețeaua formată ar trebui să scadă, în principiu, cu creșterea cantității de chitosan reacționat; potențialul zeta trebuie să fie prin urmare mai mic când raportul de CS /poli (AVAM) (g/g) crește (Tabelul 15). Rezultatele măsurătorilor de potențial zeta confirmă aceste considerente teoretice.

Tabelul 15. Valorile potențialului zeta pentru nanocapsulele preparate

Codul probelor	Potențialul zeta (mV)	
	pH=7.4	1 mM KCl
AVAM –CS - 1	-22.6	-26.6
AVAM - CS -2	-22.5	-26.1
AVAM - CS -3	-22.1	-25.5

AVAM - CS -4	-21.9	-25
AVAM - CS -5	-17	-23.1
AVAM - CS -6	-16.7	-30.9
AVAM - CS -7	-16.3	-29
AVAM - CS -8	-15	-29
AVAM - CS -9	-14.2	-26.9
AVAM - CS -10	-13.8	-23.7
AVAM - CS -11	-18	-26.9
AVAM - CS -12	-17.6	-25.5
AVAM - CS -13	-16.4	-25
AVAM - CS -14	-19.4	-24.3
AVAM - CS -15	-18.7	-23.5
AVAM - CS -16	-16.1	-26.9
AVAM - CS -17	-16.4	-21.3
AVAM - CS -18	-17.3	-21

4.2.3 Microscopia electronică de baleiaj (SEM)

Microscopia electronică cu baleiaj (SEM), ne-a adus informații suplimentare cu privire la forma și dimensiunea nanocapsulelor. Din imaginile de microscopie putem deduce că:

- nanocapsulele sintetizate sunt sferice;
- prezintă o tendință de aglomerare, însă atunci când sunt introduse într-un mediu apos sub agitare, nanocapsulele se dispersează foarte bine;
- diametrul nanocapsulelor variază de la câteva zeci la sute de nanometri.

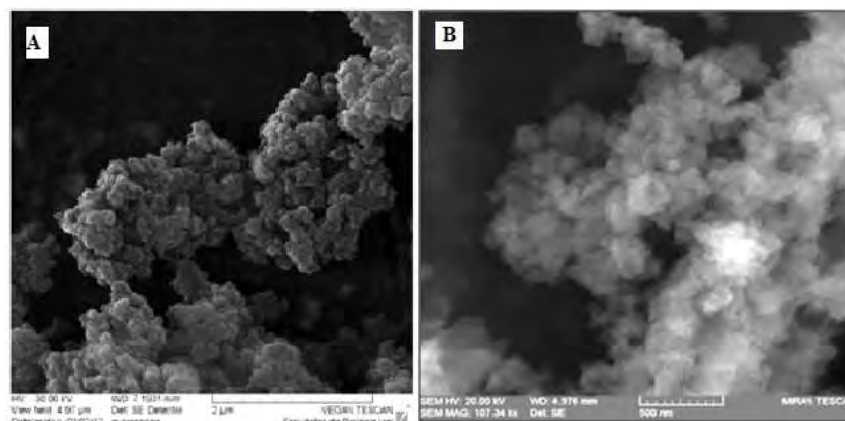


Figura 61. Microscopie electronică de baleiaj pentru nanocapsulele de tip: A) AVAM-CS-1 și B) AVAM-CS-2

În cazul ambelor probe se confirmă distribuția binodală a nanocapsulelor fapt ce este în concordanță cu rezultatele DLS (Figura 59).

4.2.4 Microscopia electronică de transmisie (TEM)

Imaginile de microscopie electronică de transmisie pentru proba AVAM-CS-1 demonstrează formarea nanocapsulelor (Figura 62).

După cum era de așteptat nanocapsulele prezintă o formă sferică și sunt goale în interior. Micrografia evidențiază faptul că diametrul capsulelor se situează în același domeniu ca și cel determinat prin analiza DLS (aproximativ 380 nm). Trebuie menționat, de asemenea, că nanocapsula surprinsă pe imaginea TEM face parte din populația cu diametru mai mare unde valoarea medie stabilită prin analiza DLS este de 394 nm.

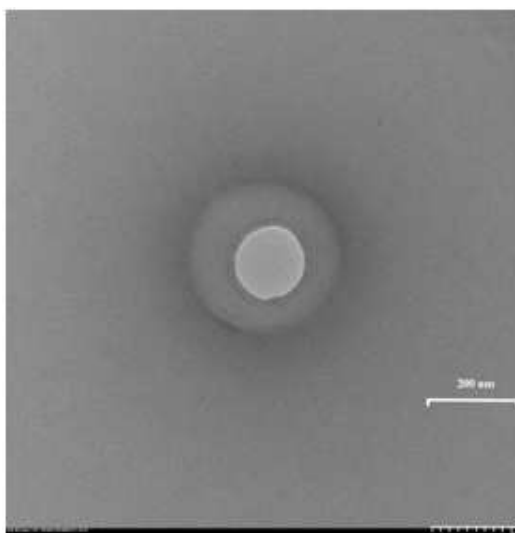


Figura 62. Microscopia electronică de transmisie (TEM) pentru proba AVAM-CS-1

4.2.5 Determinarea conținutului de azot din nanocapsule

Azotul a provenit doar din structura chitosanului ceea ce a permis stabilirea pe această bază, a procentului de chitosan din nanocapsule. După cum se poate observa din Figura 63, chitosanul se găsește în compoziția nanocapsulelor într-o proporție care variază de la 30,6 % până la 56,2% comparativ cu valorile procentului de chitosan din amestecul inițial de polimeri care se situează între 40% și 69%.

Aceste rezultate demonstrează că aproximativ 80% din chitosanul intrat în reacție se regăsește în nanocapsule. Faptul că polizaharida se regăsește în compoziția membranei la valori inferioare față de amestecul inițial probează că reacția de hidroliză a grupărilor anhidridice este destul de intensă, și sustrage mare număr de cicluri de la reacția de amidare. Așa cum era de așteptat, odată cu creșterea concentrației de chitosan din amestecul de polimeri crește și conținutul de azot care se regăsește în capsule. Acest comportament a fost întâlnit și în cazul sistemului pe bază de AVAM-G prezentat în capitolul anterior.

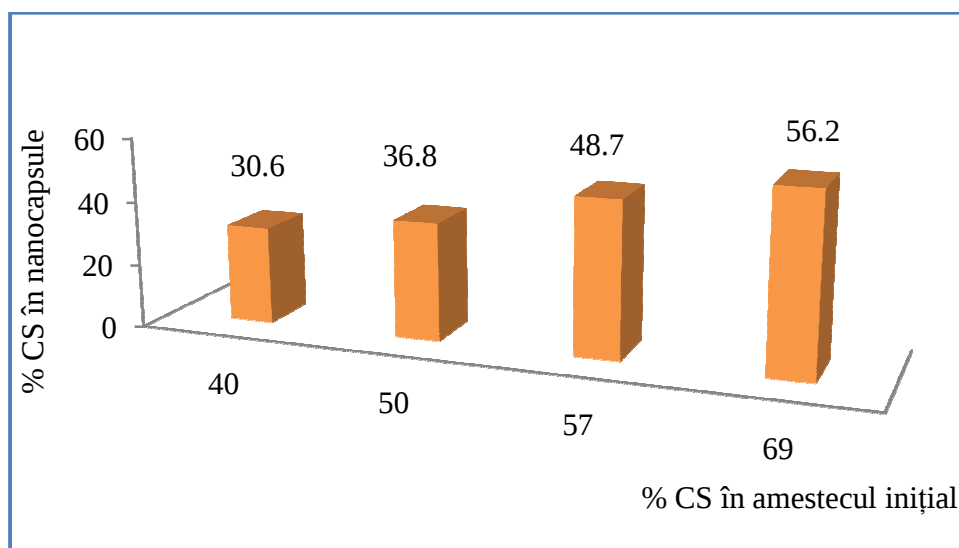


Figura 63. Influența concentrației de chitosan în amestecul inițial de polimeri asupra compoziției nanocapsulelor

4.3 Proprietățile termice ale nanocapsulelor

4.3.1 Analiza termogravimetrică (TGA)

În cazul chitosanului se pot observa trei etape de pierdere de masă. Prima începe la 62°C cu o pierdere de masă de 9% și este atribuită eliminării apei. Cea de a doua, are loc în jurul valorii de 300°C cu o pierdere în greutate de 39% și corespunde descompunerii (termice și oxidative) a chitosanului, vaporizării și eliminării produșilor volatili [228].

În literatura de specialitate se precizează că piroliza polizaharidelor începe printr-o scindare aleatorie a legăturilor glicozidice, urmată de o descompunere suplimentară, formând acidul acetic și butiric și o serie de acizi grași mai mici [229]. Chitosanul prezintă o descompunere completă la aproximativ 520°C, când pierderea de masă este de aproximativ 50%.

AVAM-CS-1 prezintă patru etape de pierdere de masă. Prima (10%) începe de la aproximativ 62°C și corespunde eliminării de apă liberă sau/și solvenți reziduali din nanocapsule. A doua etapă are loc la 175°C, cu o pierdere în greutate de 23% și este atribuită eliminării grupelor acetat și a apei din capsule.

A treia etapă (34%), care are loc la 303°C corespunde decompoziției chitosanului și scindării ciclurilor anhidridice din unitățile de anhidridă maleică. Temperatura maximă de descompunere a AVAM-CS-1 este în jurul valorii de 529°C cu o pierdere în greutate de 32%.

4.3.2 Calorimetria cu scanare diferențială (DSC)

Chitosanul pur prezintă un peak endotermic la aproximativ 103°C ($\Delta H = 271.7 \text{ J / g}$), care corespunde evaporării apei absorbite. Acest rezultat a fost raportat în alte câteva studii [228,230].

În cazul poli (AVAM), tranziția sticloasă (T_g) a fost găsită în jurul valorii de 74 °C. Peak-ul endotermic situat la 178°C ($\Delta H = 112.6 \text{ J / g}$) este atribuit eliminării grupelor acetat. Proba de nanocapsule AVAM-CS-1 prezintă un peak endotermic larg la 105°C ($\Delta H = 201.4 \text{ J / g}$), care corespunde cu peak-ul găsit în chitosanul pur. Acest comportament poate fi atribuit evaporării apei nelegate absorbite în timpul manipulării probei. Al doilea peak endotermic, este situat la aproximativ 179°C ($\Delta H = 151.6 \text{ J / g}$) și corespunde eliminării grupelor acetat, și, de asemenea, apei din interiorul capsulei. Acest comportament termic este în conformitate cu experimentul anterior de analiză termogravimetrică.

4.4 Comportamentul la umflare a nanocapsulelor în soluții apoase

Gradul de umflare al nanocapsulelor a fost investigat în soluții cu diferite valori ale pH-ului ($\text{pH} = 7,4$ și $\text{pH} = 3$) și a fost impus ca urmare a potențialei lor utilizări ca transportatori de medicamente.

În mediu alcalin grupările carboxilice, care sunt formate prin deschiderea ciclurilor anhidridice sunt ionizate; grupările carboxilat formate vor determina respingeri electrostatice între ele, permițând soluției apoase să patrundă în interiorul rețelei și cauzând creșterea gradului de umflare [231]. Gradul de umflare al nanocapsulelor în soluție de tampon fosfat ($\text{pH} = 7,4$) este situat între 1000-1500% și este puternic influențat de diametrul nanocapsulelor și de raportul inițial dintre polimeri (Figura 66).

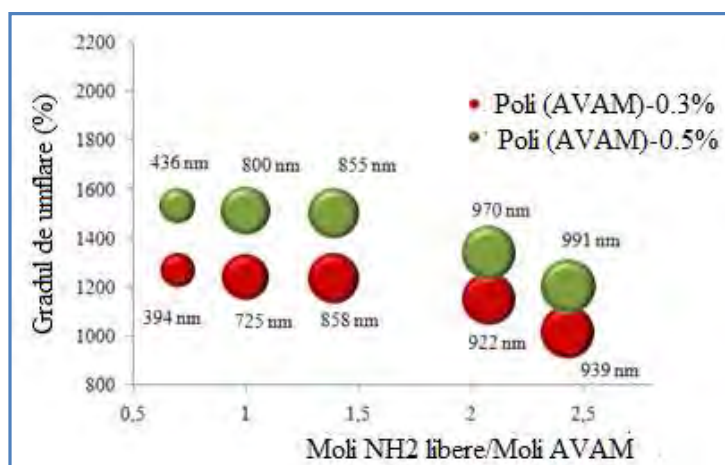


Figura 66. Variația gradului de umflare în soluție de tampon fosfat ($\text{pH} = 7,4$), după 24 ore în funcție de raportul molar dintre cei doi polimeri, în corelație cu diametrul mediu al nanocapsulelor

Rezultatele au arătat că gradul de umflare prezintă o tendință clară de diminuare cu creșterea diametrului nanocapsulelor, fenomen întâlnit și la sistemul de nanocapsule pe bază de poli (AVAM) și G. O altă observație este că gradul de umflare scade odată cu creșterea raportului molar dintre polimeri adică, cu creșterea cantității de chitosan. Acest comportament poate fi atribuit creșterii

grosimii stratului de rețea intercuplată ducând la o scădere a elasticității membranei polimere și, de asemenea, la o reducere a difuziei apei prin aceasta. Pe de altă parte, dacă mai mult chitosan reacționează cu copolimerul sintetic numărul de grupări carboxilice formate scade, conducând la o scădere a capacității de umflare, hidrofilia membranei reducându-se (se formează o singură grupare –COOH dintr-un ciclu).

În mediu acid gradul de umflare variază între 580-1300% și crește odată cu creșterea raportului molar de chitosan/poli (AVAM) (cu creșterea concentrației soluției de chitosan) (Figura 67). Această creștere poate fi explicată prin apariția repulsiilor electrostatice dintre numeroșii cationi de amoniu, care sunt formați prin protonarea grupărilor aminice din lanțurile de chitosan.

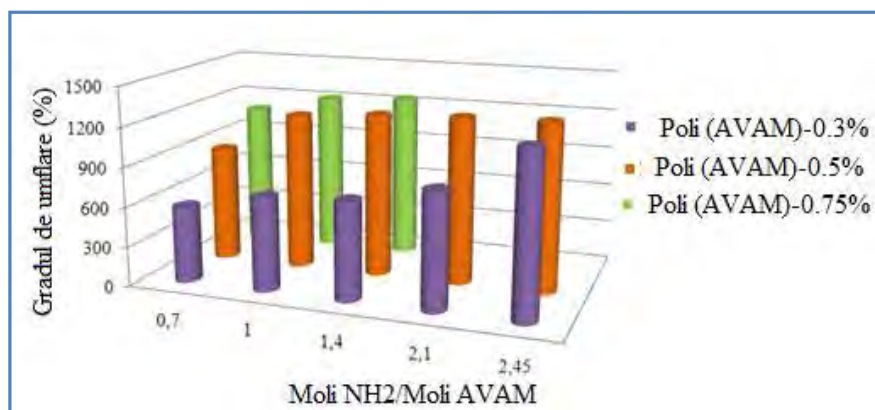


Figura 67. Gradul de umflare după 24 de ore într-o soluție de tampon citrat (pH = 3) în funcție de raportul molar dintre cei doi polimeri

4.5 Studii de încărcare a nanocapsulelor cu Penicilina G

Cantitățile de PG încărcate în nanocapsule după 24 de ore sunt prezentate în Tabelul 18. Capacitatea de încărcare scade cu creșterea cantității de chitosan datorită reducerii difuziei soluției de medicament prin membrana polimeră, fenomen care poate fi datorat creșterii densității rețelei polimere. Cu toate acestea, nu a fost observată o diferență semnificativă a capacității de încărcare a PG în nanocapsule.

Tabelul 18. Cantitatea de PG încărcată pe 1 g nanocapsule de diferite tipuri

Codul probei	PG încărcată (mg)/ g nanocapsule
AVAM –CS - 1	0,273
AVAM - CS -2	0,255
AVAM - CS -3	0,251
AVAM - CS -4	0,248
AVAM - CS -5	0,243

4.6 Studii de eliberare *in vitro* a Penicilinei G din nanocapsule

Rezultatele de eliberare a PG din nanocapsulele AVAM-CS în soluție de tampon fosfat (pH = 7,4) sunt prezentate în Figura 68. Profilele de eliberare obținute pentru acest sistem de nanocapsule prezintă același comportament întâlnit la nanocapsulele pe bază de AVAM și G, care au fost prezentate în capitoul anterior. Eliberarea PG din nanocapsule are loc printr-un mecanism de difuzie a soluției apoase prin matricea polimeră și este în concordanță cu comportamentul la umflare. Trebuie remarcat faptul că eficiența de eliberare a PG în mediu alcalin este între 35% și 85%. Pe de altă parte, o creștere a cantității de chitosan a condus la o scădere semnificativă a procentului de PG eliberat. Acest comportament poate fi datorat creșterii grosimii membranei polimere; de asemenea, densitatea rețelei de polimer conduce la o reducere a intensității de difuzie a soluției de PG prin membrana polimeră.

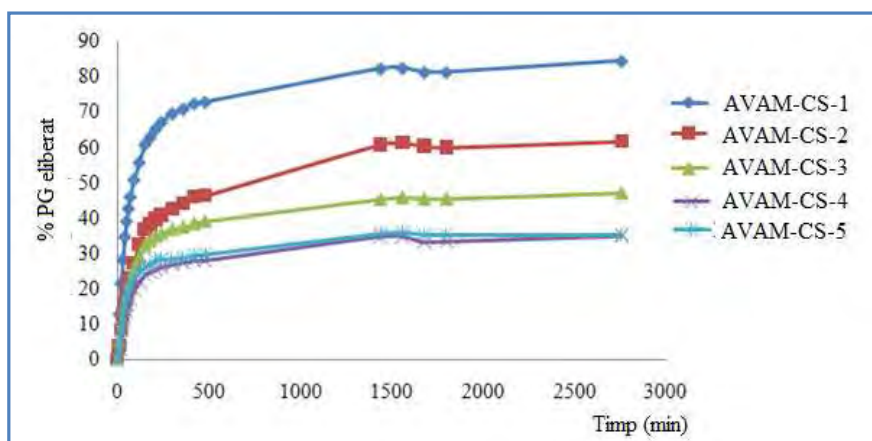


Figura 68. Cinetica de eliberare *in vitro* a PG din nanocapsule în soluție de tampon fosfat (pH = 7,4)

4.7 Teste de hemocompatibilitate

Hemocompatibilitatea este o cerință obligatorie pentru materialele care intră în contact cu sângele. Interacțiunea materialelor cu componentele sangvine poate duce la schimbarea proprietăților de coagulare plasmatică [232]. Din acest motiv au fost evaluate efectele nanocapsulelor obținute asupra sângelui cu ajutorul unui test de coagulare standard. În acest sens, s-au determinat timpul de protrombină (TP), indicele Quick (IQ) și indicele normalizat internațional (INI).

În Tabelul 20 sunt evidențiate rezultatele obținute. În urma analizei datelor obținute se pot face următoarele observații:

- ✚ nu există diferențe importante între valorile indicilor de coagulare ale probei martor și ale probei de nanocapsule;
- ✚ toți indicii de coagulare evaluați se situează în limitele valorilor normale.

Aceste informații ne sugerează că nanocapsulele obținute prezintă o bună compatibilitate cu mediul sangvin.

Tabelul 20. Rezultatele testului de hemocompatibilitate

Cod proba	Fb(g/l)	PT (s)	PT (s)mediu	IQ	INR
AVAM-CS-8	2,72	15,4	17,2	94,18	1,06
AVAM-CS-8	1,36	19			
AVAM-CS-10	1,93	16,1	17,3	93,64	1,07
AVAM-CS-10	1,47	18,5			
Martor 1	1,81	16,6	16,2	100	1
Martor 2	2,26	15,8			

4.8 Teste de toxicitate

Determinarea toxicității acute a nanocapsulelor de tip AVAM-CS-9 prin metoda Spearman Karber

După cum am menționat și în capitolul anterior, pentru a obține materiale cu o toxicitate cât mai scăzută, nanocapsulele au fost supuse purificării pentru a îndepărta urmele de agent tensioactiv. Valoarea dozei letale medii obținută pentru acest tip de nanocapsule a fost de aproximativ **3987 mg/kg corp**. Nanocapsulele sintetizate prezintă o toxicitate scăzută (conform claselor de toxicitate Hodge și Sterner) ceea ce le face apte pentru aplicații medicale.

Determinarea toxicității acute a nanocapsulelor de tip AVAM-CS-13 prin metoda creșterii și descreșterii sau sus și jos (sau up and down)

Datele pentru calcularea DL50 la 24 de ore sunt prezentate grafic în Tabelul 21, împreună cu rezultatele calculelor pentru determinarea DL50.

Tabelul 21. Datele pentru calcularea DL50 la 24 de ore

Miligrame mg	Log	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13
3000	348	0
4000	360	0 0 0
5000	370	X 0 0 0
6000	378	0 0 11
DL 50 4672		

TOTAL

y 3.48

d 0.10

A 5

B 13

N 2

m 3.67781

DL50 - 4672 mg/kg corp

În concluzie, după efectuarea testului de limitare și a testului principal, se poate aprecia că DL50 pentru nanoparticulele testate este de **4672 mg/kg corp** la 24 de ore, la 48 de ore, 72 de ore, 7 zile și 14 zile de la administrarea intraperitoneală a soluției. Această valoare a DL50 încadrează substanța în grupul celor cu **grad redus de toxicitate**.

4.9 Studiile in vivo ale nanocapsulelor de AVAM-CS-9 încărcate cu Ibuprofen

Evaluarea secundară a administrării intraperitoneale a ibuprofenului (100 mg/kg b.w.) a arătat o creștere statistică semnificativă în inhibarea durerii pentru stimularea termică nociceptivă a testului „tail flick”. Acest efect antinociceptiv și-a atins vârful la 30 de minute și a durat timp de 2 ore după care valorile de inhibare ale durerii au revenit la normal (Figura 72). Administrarea intraperitoneală a ibuprofenului (100 mg/kg b.w.) a indus, de asemenea, o inhibare foarte semnificativă a durerii la stimulii termali nociceptivi la șoarecii testați cu testul „hot plate”, (testul cu placa încălzită). Valorile de vârf au fost atinse la 45 de minute, consecință a administrării ibuprofenului (Figura 73).

Cu toate acestea, când au fost testate nanocapsule încărcate cu ibuprofen, a fost observată o durată mai mare de timp pentru debutul inhibării durerii. Testul „tail flick” (testul de scuturare a cozii) a arătat un peak de inhibare a durerii la aproximativ 4 ore după administrare, cu valori semnificative la 2 și 4h. Valorile maxime atât pentru ibuprofenul simplu cât și pentru nanocapsulele încărcate cu ibuprofen au fost similare (22% respectiv 28%).

Testul „hot plate” a prezentat un timp și mai mare pentru apariția oricărei inhibări la durere, cu un maxim la 4 ore și un $p < 0,001$ la 4 ore și la 6 ore. Nanocapsulele au arătat, de asemenea, o biodisponibilitate crescută a ibuprofenului, cu valori ale peak-ului de inhibare a durerii de 28% în comparație cu doar 19% pentru grupul de control cu ipuprofen simplu.

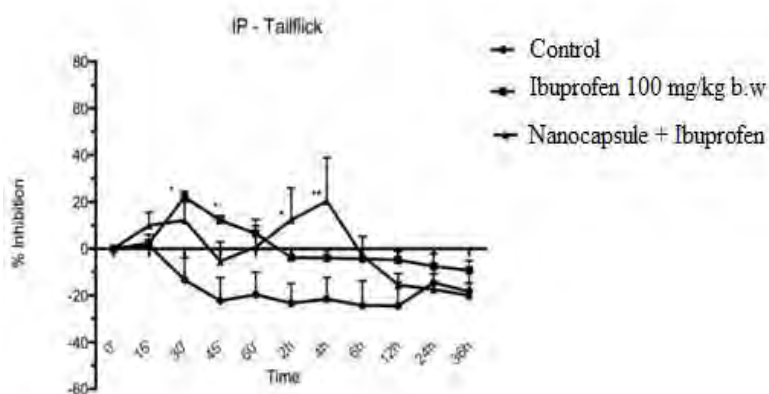


Figura 72. Testul “tail flick”. Inhibarea durerii (%) după injectarea intraperitoneală a unei soluții saline, a ibuprofenului pur și a unei suspensii apoase de nanocapsule de tip AVAM-CS-9 încărcate cu ibuprofen (* pentru $p < 0.05$, ** pentru $p < 0.01$)

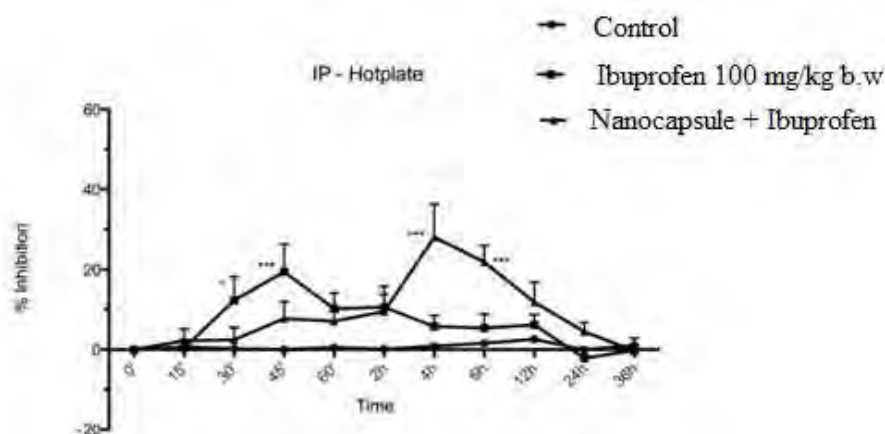


Figura 73. Testul “hot plate”. Inhibarea durerii (%) după injectarea intraperitoneală a unei soluții saline, a ibuprofenului pur și a unei suspensii apoase de nanocapsule de tip AVAM-CS-9 încărcate cu ibuprofen (* pentru $p < 0.05$, *** pentru $p < 0.001$)

Testarea *in vivo* dovedește că sistemul nostru de eliberare a medicamentului reprezintă un pas important în ceea ce privește biodisponibilitatea ibuprofenului. În timp ce ibuprofenul simplu are un timp de înjumătățire de 1-3 ore, iar autorii anteriori au arătat o îmbunătățire a efectului analgezic pentru formulările lor de nanoparticule într-un interval de 1-2 ore, sistemul nostru dispune de un interval de timp de 2 - 6 ore de eficacitate a analgezicului, cu o creștere de până la 6 ori față de formulările de referință ale ibuprofenului.

4.10 Determinarea *in vivo* a biocompatibilității nanocapsulelor de tip AVAM-CS-13 - Examenul histopatologic

Examenul histopatologic a pus în evidență biocompatibilitatea nanocapsulelor cu unele organe. Trebuie de menționat că lotul A reprezintă martorul iar lotul B este lotul cărui i s-a administrat suspensia de nanocapsule.

Examenul microscopic nu a evidențiat alterări cerebrale, hepatice, pulmonare. Singurele modificări au putut fi remarcate la nivel renal, unde s-au observat frecvente dilatări vasculare, cu sufuziuni hemoragice dispersate în parenchim, dar neînsoțite de modificări tubulo-glomerulare.

Aceste date sugerează că pe fondul unei biocompatibilități evidente, există o sensibilitate la nivel renal, de care trebuie să se țină cont în momentul definirii principalilor parametri structurali ai nanocapsulelor.

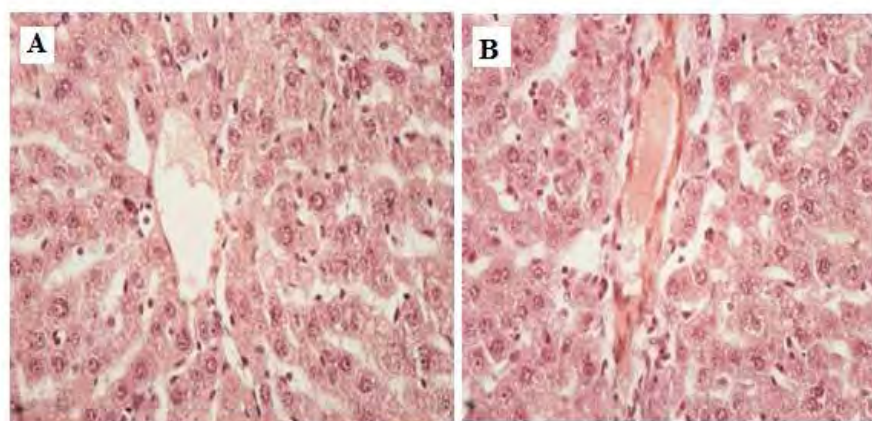


Figura 74. **Lot A martor**-morfologie hepatică normală - Col HE x 20 ; **Lot B**-Secțiune la nivel hepatic; aspect normal - Col HE x20

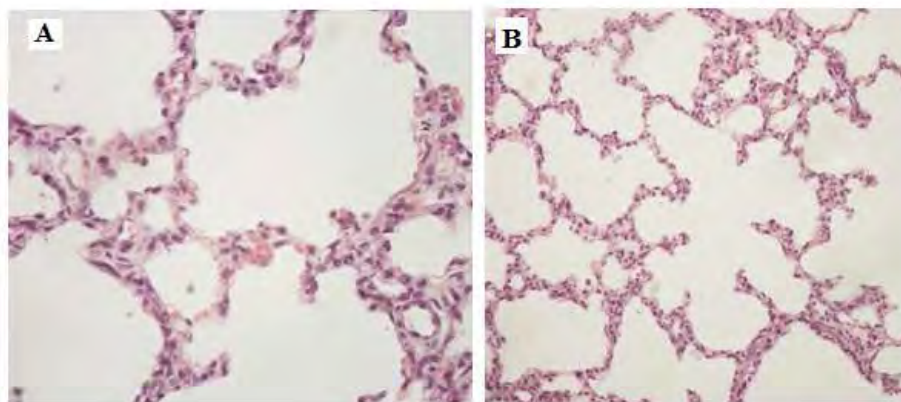


Figura 75. **Lot A martor**- Plaman-aspect normal - Col HE x20 ; **Lot B**- Morfologie pulmonara normală - Col HE x20

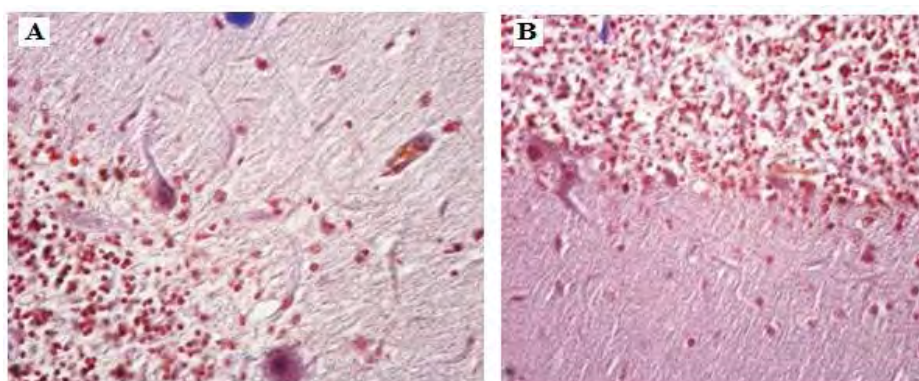


Figura 76. **Lot A martor**-Scoarță cerebeloasă- Col HE x 20 ; **Lot B**-Scoarță cerebeloasă - morfologie normală – Col HE x20

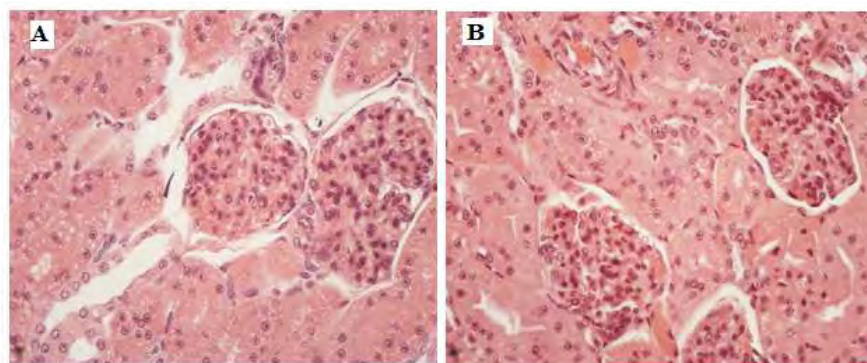


Figura 77. **Lot A martor**-Corticala renală integră - Col HE x 20 ; **Lot B**-Cortex renal de aspect normal– Col HE x20

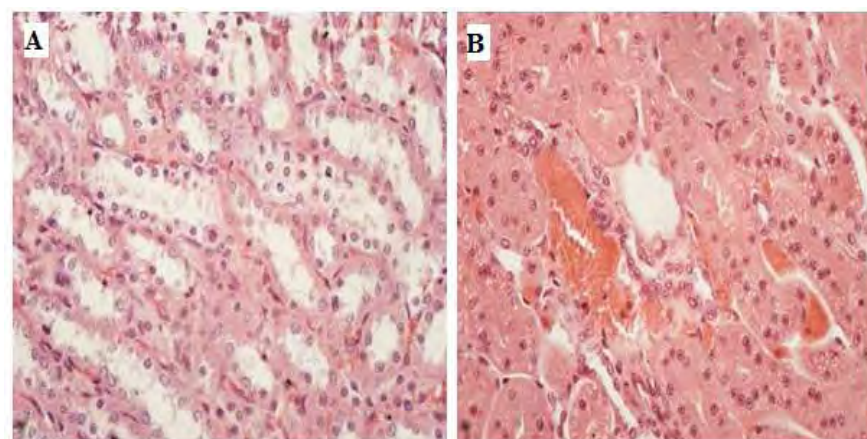


Figura 78. **Lot A martor**- Tubi uriniferi - Col HE x 10 ; **Lot B**- Sufuziuni hemoragice peritubulare– Col HE x20

4.11 Concluzii

- + Au fost preparate nanocapsule polimere pe bază de poli (anhidridă maleică-*alt*-acetat de vinil) și chitosan prin reacția de condensare interfacială;
- + Diametrul mediu al nanocapsulelor obținute a variat între 394 și 991 nm;
- + Raportul dintre polimeri determină variația în diametru a nanocapsulelor (diametrul crește odată cu creșterea raportului dintre chitosan și poli (AVAM));
- + Nanocapsulele prezintă o formă sferică bine definită;
- + Aceste sisteme prezintă o bună capacitate de umflare care este influențat de parametrii luați în considerare în acest studiu;
- + Capacitatea de încărcare și eliberare de medicamente a fost controlată de viteza de difuzie prin membrana polimeră și a fost influențată de gradul de umflare;
- + Nanocapsulele obținute prezintă o toxicitate redusă;

- Testele de hemocompatibilitate au dovedit că acest tip de nanocapsule prezintă o bună compatibilitate cu mediul sangvin;
- Testele *in vivo* au dovedit o eliberare susținută pentru inhibarea durerii la nivel central (de la 2 la 24 h), față de ibuprofenul pur (de la 0 la 2 h).
- Examenul microscopic nu a evidențiat alterări la nivel de miocard, cerebral, hepatic, pulmonar. Testele au pus în evidență, de asemenea, că există o sensibilitate la nivel renal, dar care nu prezintă modificări tubulo-glomerulare.

Capitolul 5. Sinteza și caracterizarea unor nanocapsule pe bază de poli (N-vinil pirolidonă-*alt*-anhidridă itaconică) și chitosan

În acest studiu ne-am propus prepararea unui nou sistem de nanocapsule care se bazează pe condensarea interfacială dintre poli (N-vinilpirolidonă- *alt*-anhidridă itaconică) și chitosan. Poli (N-vinilpirolidona- *alt*-anhidrida itaconică) este un copolimer sintetic care nu a mai fost utilizat până în prezent pentru prepararea de nanocapsule. Colectivul în cadrul căruia mi-am desfășurat activitatea de cercetare doctorală a folosit acest compus macromolecular pentru obținerea unor copolimeri grefați (hidrosolubili) care au servit la stabilizarea unor micro și nanoparticule [236].

Acest tip de nanocapsule prezintă o bună capacitate de umflare, influențată de parametrul luat în considerare în acest studiu. Pentru studiile de încărcare/eliberare s-a folosit ca medicament model 5 Fluorouracilul.

Structura finală a membranei polimere a nanocapsulelor obținute este prezentată în reacția de mai jos:

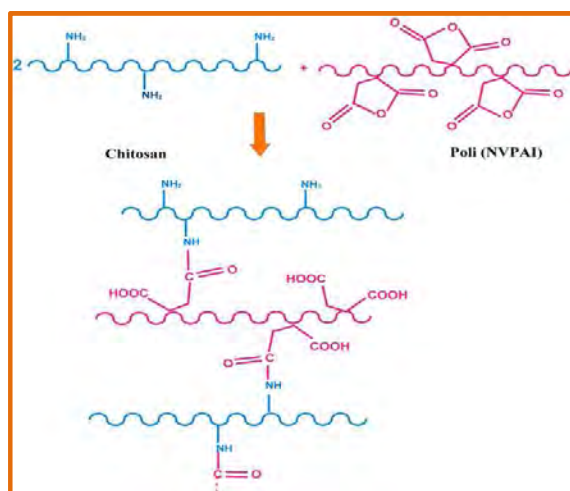


Figura 79. Ilustrarea schematică a reacției de condensare interfacială a chitosanului cu poli (NVPAI)

Prepararea nanocapsulelor a fost condusă după un plan experimental care este prezentat în Tabelul 22. Raportul dintre cei doi polimeri a fost singurul parametru variat în cadrul acestui sistem.

Tabelul 22. Programul experimental de obținere a nanocapsulelor și codificarea probelor sintetizate

Cod probă	Raportul molar (moli NH ₂ libere din chitosan /moli NVPAI)	Poli (NVPAI) (%)	Chitosan (%)	Span 80 (%)	Tween 80 (%)	Raportul dintre soluția organică : soluția apoasă (v/v)
NCS-1	1/2	2	0.42	2	2	1:2
NCS-2	1/1.7		0.5			
NCS-3	1/1.25		0.676			
NCS-4	1/1		0.845			
NCS-5	1/0.8		1.06			
NCS-6	1/0.66		1.27			
NCS-7	1/1.7	3	0.75			

5.1 Caracterizarea structurală

Poli (NVPAI) prezintă benzi de absorbție la 1780 cm⁻¹ și 1859 cm⁻¹ ce corespund vibrației de întindere a grupării -C = O din grupările anhidridice. Banda de absorbție de la aproximativ 990 cm⁻¹ este atribuită legăturii C – O – C din gruparea anhidridică.

Nanocapsulele prezintă o bandă de absorbție la 1563 cm⁻¹ care este atribuită grupării -NH din gruparea amidică.

Peak-ul de la 1650 cm⁻¹, corespunde legăturilor carbonilice din grupările amidice nou formate prin reacția copolimerului cu chitosanul.

Banda de absorbție de la 1718 cm⁻¹ corespunde cu vibrația de întindere a grupei -C = O din grupările carboxilice. Apariția acestui peak pune în evidență, că toate grupările anhidridice au participat la reacția de condensare. Un alt argument în acest sens este dispariția peak-ului de la 990 cm⁻¹ atribuit legăturii C – O – C din gruparea anhidridică.

5.2 Caracterizarea morfologică

5.2.1 Diametrul mediu al nanocapsulelor

Determinarea diametrului acestui tip de nanocapsule a fost realizată prin difractometrie laser. A fost luată în considerare valoarea diametrului mediu afișată de aparat. Măsurătorile au fost realizate în triplicat. Din Tabelul 23 se remarcă faptul că valorile diametrului mediu al nanocapsulelor obținute sunt situate între 126 și 214 nm.

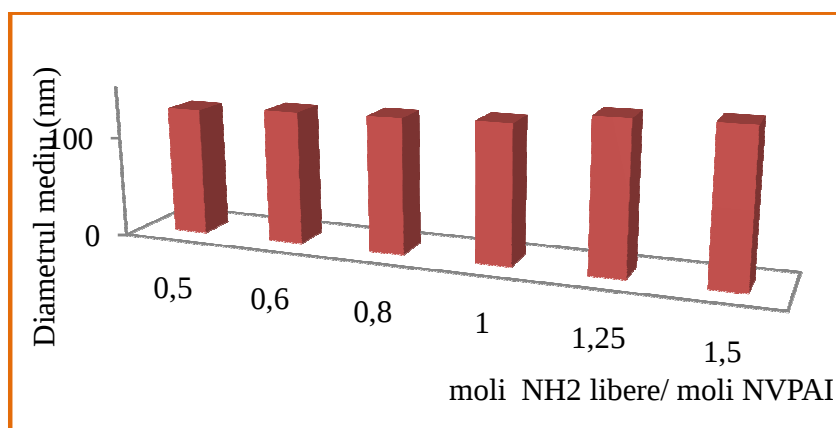


Figura 81. Variația diametrului mediu în funcție de raportul dintre cei doi polimeri

Din rezultatele obținute se deduce faptul că diametrul nanocapsulelor crește odată cu creșterea raportului dintre polimeri (cu creșterea concentrației de CS) (Figura 81). Acest comportament poate fi atribuit creșterii grosimii membranei polimere care conduce implicit la creșterea diametrului nanocapsulelor. Trebuie remarcat faptul că diferențele de diametru de la un eșantion la altul nu sunt, totuși, majore.

Curbele de distribuție granulometrică demonstrează prin caracterul lor mononodal faptul că nanocapsulele sunt omogene ca dimensiuni (Figura 82).

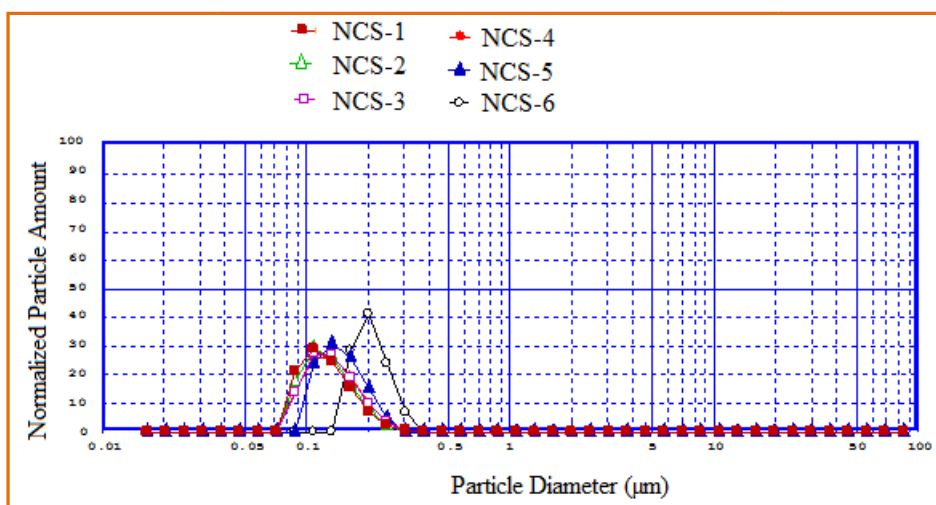


Figura 82. Distribuția granulometrică a nanocapsulelor obținute cu o concentrație a poli (NVPAl) de 2%

5.2.3 Microscopia electronică de baleiaj (SEM)

În Figura 84 sunt prezentate imaginile SEM pentru probele de nanocapsule NCS-2 și NCS-7. Pe baza acestor micrografii putem face următoarele observații:

- nanocapsulele prezintă valori ale diametrului în domeniul zecilor de nanometri; aceste rezultate sunt în concordanță cu analiza de difracție laser dacă luăm în

considerare alura largă a peak-ului de distribuție granulometrică, care ne permite să estimăm că diametrul nanocapsulelor variază de la câteva zeci de nm până la aproximativ 250 nm;

- nanocapsulele prezintă formă sferică;
- capsulele prezintă polidispersitate dimensională relativ redusă ;
- proba NCS-7 prezintă o tendință de aglomerare puțin mai ridicată față de proba NCS-2.

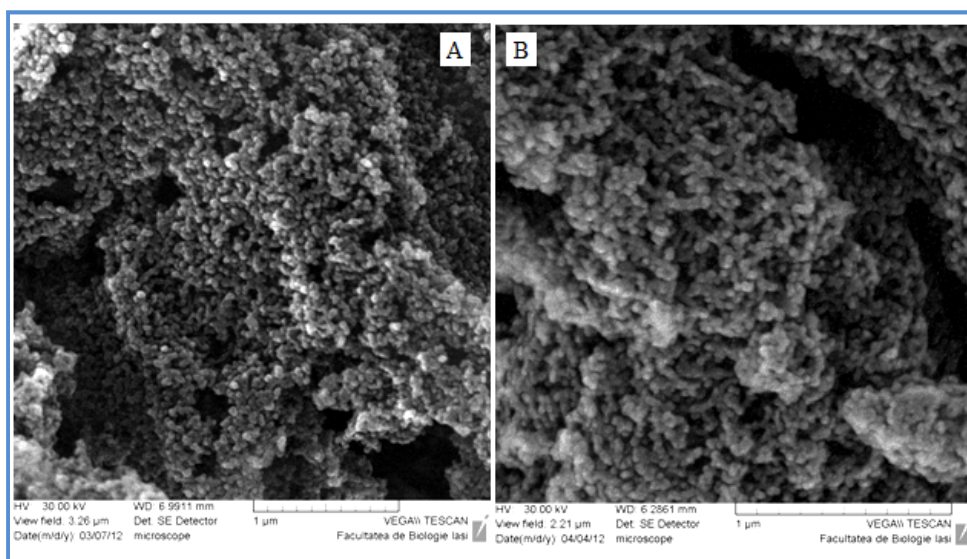


Figura 84. Microscopia electronică de baleiaj pentru nanocapsulele de tip: A) NCS-2 și B) NCS-7

5.2.4 Microscopia electronică de transmisie (TEM)

Microscopia electronică de transmisie redată în Figura 85 pune în evidență formarea membranei polimere în jurul miezului gol al nanocapsulelor.

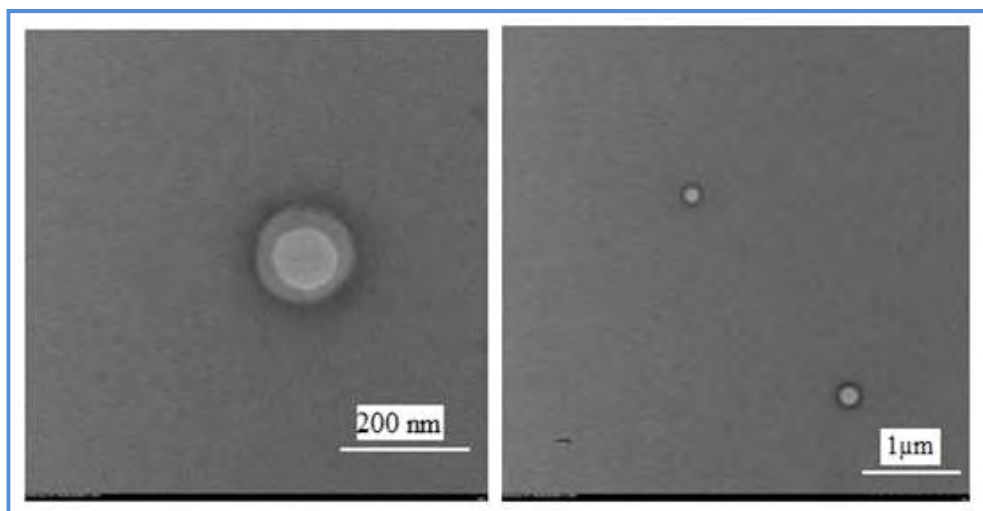


Figura 85. Microscopia electronică de transmisie (TEM) pentru proba NCS-2

Diametrul nanocapsulelor evidențiat de această analiză este în jur de 160 nm. Nanocapsulele prezintă o formă perfect sferică. Aceste rezultate sunt în concordanță cu analiza de difracție laser.

5.3 Comportamentul la umflare al nanocapsulelor în soluții apoase

Comportamentul la umflare al nanocapsulelor obținute a fost investigat în soluții cu diferite valori ale pH-ului ($\text{pH} = 7.4$ și $\text{pH} = 3$) și s-a impus datorită necesității utilizării lor ca suspensii în fluidele biologice. Aceste tipuri de nanocapsule prezintă același comportament la umflare ca și sistemele discutate anterior (în capitolele 3 și 4).

Capacitatea de umflare a nanocapsulelor în mediu ușor alcalin ($\text{pH} = 7.4$) este situată între 490-1030% și scade odată cu creșterea raportului dintre CS și NVPAI (Figura 86). Acest comportament se datorează creșterii grosimii stratului de rețea intercuplată ce duce la o scădere a elasticității membranei polimere și implicit la o reducere a difuziei soluției apoase prin aceasta.

În cazul mediului acid, capacitatea de umflare a nanocapsulelor variază între 590 și 1400% și crește odată cu creșterea raportului dintre cei doi polimeri (Figura 87). Protonarea grupărilor aminice din lanțurile de chitosan conduce la apariția repulsiilor electrostatice dintre cationii de amoniu formați, determinând astfel creșterea gradului de umflare.

O altă informație care se desprinde din aceste grafice este aceea că gradul de umflare în mediu alcalin este mai scăzut decât în mediu acid.

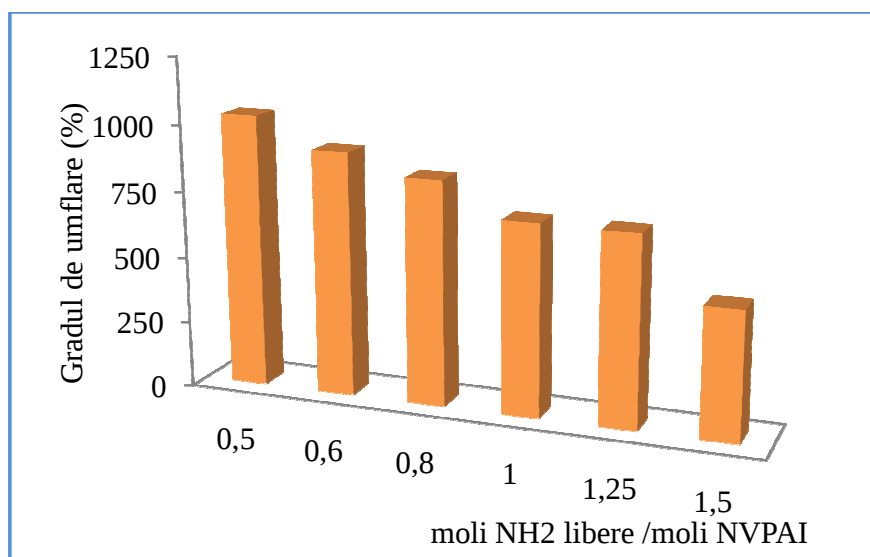


Figura 86. Gradul de umflare a nanocapsulelor în soluție de tampon fosfat ($\text{pH} = 7.4$), după 24 ore în funcție de raportul molar dintre cei doi polimeri

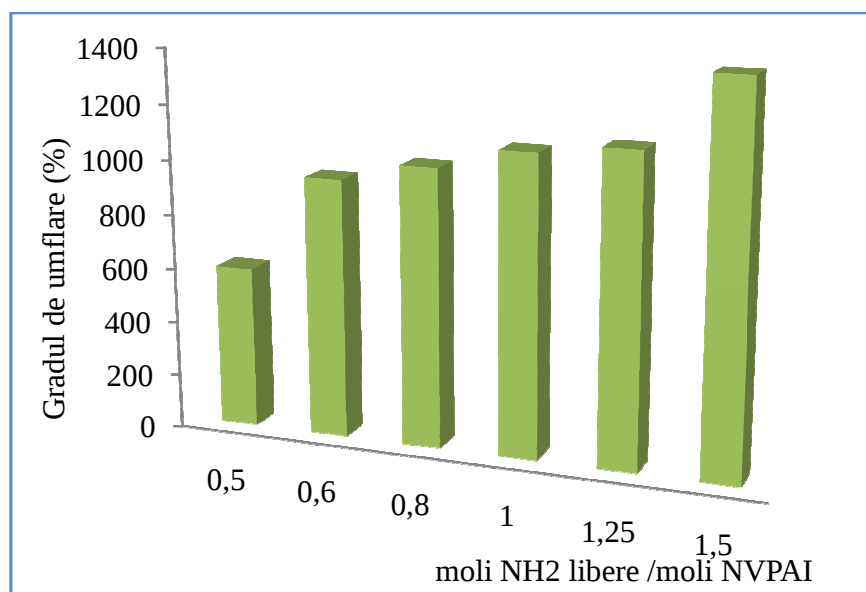


Figura 87. Gradul de umflare a nanocapsulelor în soluție de tampon citrat (pH = 3), după 24 ore în funcție de raportul molar dintre cei doi polimeri

5.4 Studii de încărcare a nanocapsulelor cu 5-Fluorouracil

Acest tip de nanocapsule a fost elaborat în scopul de a fi utilizat în terapia antitumorală. Din acest motiv s-a ales acest de medicament care după cum am menționat în capitolul 2 este folosit în tratamentul cancerului colorectal, gastric și a cancerului de sân.

Valorile eficienței de încărcare a 5-FU în nanocapsule cât și cantitatea de medicament încărcată (g 5-FU /g de nanocapsule) sunt prezentate în Tabelul 25. Atât cantitatea de 5-FU încărcată în nanocapsule cât și eficiența de încărcare a medicamentului scad odată cu creșterea concentrației de chitosan din amestecul inițial de polimeri. Acest comportament a fost întâlnit și la sistemele discutate anterior și este în concordanță cu gradul de umflare al nanocapsulelor în mediu cu pH=7,4. Eficiența de încărcare a 5-FU variază între 26% și 34,5% și este mai scăzută decât în cazul nanocapsulelor de tip AVAM-CS și AVAM-G, probabil datorită hidrofobicității copolimerului NVPAI.

Tabelul 25. Eficiența de încărcare și cantitatea de 5-FU încărcat pe 1 g nanocapsule

Codul probei	5-FU încărcat (g)/ g nanocapsule	Eficiența de încărcare (%)
NCS-1	0,226	34
NCS-2	0,220	33
NCS-3	0,200	30
NCS-4	0,196	29,5
NCS-5	0,189	28,4
NCS-6	0,173	26

5.5 Studii de eliberare *in vitro* a 5-Fluorouracilului

Studiile de eliberare a 5-Fluorouracilului din nanocapsulele de tip NCS au fost realizate în soluții cu pH diferit ($\text{pH} = 7,4$ și $\text{pH}=3$) (Figurile 88 și 89).

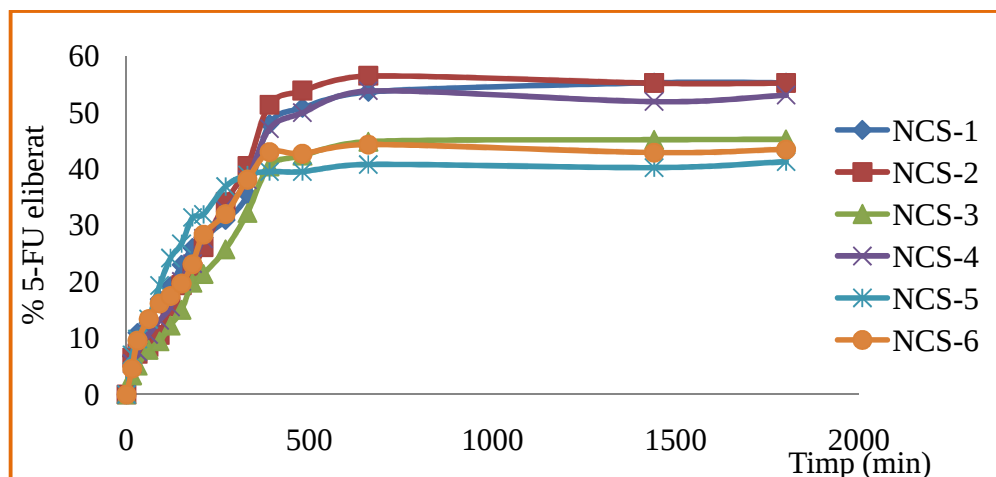


Figura 88. Cinetica de eliberare *in vitro* a 5-FU din nanocapsule în soluție de tampon fosfat ($\text{pH} = 7,4$)

Pe baza rezultatelor obținute se pot trage următoarele concluzii:

- Comportamentul de eliberare a 5-FU din acest tip de nanocapsule este similar cu cel întâlnit la celelalte sisteme studiate;

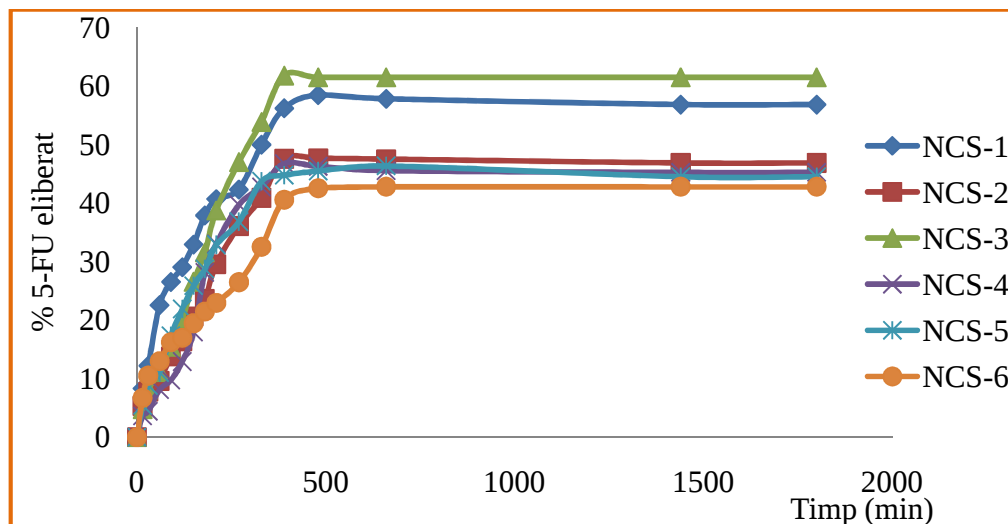


Figura 89. Cinetica de eliberare *in vitro* a 5-FU din nanocapsule în soluție de tampon citrat ($\text{pH} = 3$)

- În primele 400 de minute s-a înregistrat o eliberare mai rapidă a medicamentului în ambele medii studiate, comportament care se poate datora fenomenului de desorbție a medicamentului de la nivelul membranei;

- + Eficiența de eliberare a 5-FU în mediu alcalin este situat între 41% și 55% iar în mediu acid între 42% și 63%;
- + Eficiența de eliberare este mai mică în mediu slab alcalin decât în mediu acid, fapt ce este în concordanță cu comportamentul întâlnit la umflare;
- + Creșterea cantității de chitosan a condus la o scădere a procentului de medicament eliberat în mediile apoase studiate, cu câteva excepții.

5.6 Concluzii

- + S-a realizat un sistem de nanocapsule polimere pe bază de poli (N vinilpirolidonă-*alt*-anhidridă itaconică) și chitosan printr-un procedeu de condensare interfacială;
- + Spectroscopia FTIR a pus în evidență formarea legăturilor de tip amidic;
- + Nanocapsulele obținute prezintă un diametru mediu cuprins între 126 și 214 nm;
- + Capsulele prezintă o formă sferică și sunt goale în interior;
- + Capacitatea de umflare în mediu ușor alcalin a variat între 490-1030%, iar în mediu acid între 590 și 1400%;
- + Capacitatea de încărcare/eliberare a 5-Fluorouracilului a fost influențată de raportul dintre cei doi polimeri.

Concluzii generale

Cercetarea are ca scop dezvoltarea unei metode noi de obținere a nanocapsulelor pe bază de polimeri naturali (chitosan și gelatină) și copolimer cu cicluri anhidridice în lanțul de bază [poli (acetat de vinil-*alt*-anhidridă maleică) și poli (N-vinilpirrolidonă-*alt*-anhidridă itaconică)] printr-un proces de condensare interfacială. Acest tip de nanocapsule pot prezenta un mare interes pentru aplicații biomedicale datorită eficienței crescute de încapsulare a medicamentelor. Studiile efectuate au permis sistematizarea următoarelor concluzii generale:

1. Datorită unei biocompatibilități, biodegradabilități, non-toxicități, și a unei activități biologice excelente, gelatina și chitosanul sunt cele mai importante materiale utilizate în prepararea de micro- și nanocapsule. Ele sunt frecvent utilizate în aplicații medicale, ca materii prime pentru realizarea de sisteme de eliberare controlată de medicamente. Combinarea polimerului natural cu polimerul sintetic printr-o reacție de condensare interfacială conduce la un nou material de tip rețea interconectată cu proprietăți superioare celor ale partenerilor individuali.
2. În lucrarea de față am studiat obținerea și caracterizarea a trei sisteme de nanocapsule: i) gelatină și poli (acetat de vinil - *alt* - anhidridă maleică), ii) chitosan și poli (acetat de vinil - *alt* - anhidridă maleică) iii) chitosan și poli (N vinilpirrolidonă - *alt* - anhidridă itaconică).
3. În scopul de a elucida relația dintre structura și proprietățile acestui nou tip de material, s-a investigat efectul diferiților parametri de sinteză (raportul masic al polimerilor, raportul dintre soluția organică și cea apoasă, și variația cantității de agent tensioactiv), atât asupra structurii și morfologiei nanocapsulelor cât și asupra proprietăților termice, gradului de umflare, eficienței de încărcare/eliberare a unor medicamente model și cineticii de eliberare *in vitro* a principiului activ.
4. Spectroscopia în infraroșu (FTIR) a confirmat reacția dintre grupările anhidridice ale polimerului sintetic și grupele aminice funcționale ale polimerului natural prin formarea grupărilor amidice.
5. Diametrul mediu al nanocapsulelor depinde de mai mulți parametri: raportul dintre polimeri, raportul dintre cele două faze, cantitatea de agent tensioactiv. Creșterea cantității de polimer natural duce la o creștere a diametrului nanocapsulelor. Variația concentrației de agent tensioactiv și timpul de reacție nu influențează în mod semnificativ dimensiunea nanocapsulelor.
6. Potențialul zeta al nanocapsulelor a fost măsurat în soluții cu valori diferite ale pH-ului, în scopul de a studia stabilitatea suspensiei de nanocapsule. S-a constatat că nanocapsulele de tip AVAM-CS prezintă o stabilitate mai bună în soluțiile apoase decât cele de tip AVAM-G.
7. Microscopia electronica (SEM și TEM) a furnizat informații suplimentare cu privire la forma și dimensiunea nanocapsulelor. Toate nanocapsulele sintetizate prezintă formă sferică și au tendință de aglomerare în stare uscată, dar atunci când sunt imersate într-un mediu apos acestea se dispersează foarte bine. Diametrul nanocapsulelor variază între zeci și sute de nanometri.

8. Studiul de umflare a nanocapsulelor în soluții apoase s-a impus dată fiind potențiala lor utilizare ca purtători de medicamente. Toate probele analizate au prezentat o umflare rapidă, cauzată de pătrunderea apei în membrana polimeră și în interiorul capsulelor, urmată de o umflare mai lentă până la echilibru. Rezultatele obținute au arătat că gradul de umflare are tendința de scădere cu creșterea diametrului nanocapsulelor și cu creșterea raportului molar dintre polimeri (cu creșterea cantității de polimer natural). Nanocapsulele de tip AVAM-G prezintă un grad de umflare mai mare decât celelalte două sisteme studiate, fapt care poate fi datorat hidrofiliei mai ridicate a gelatinei față de chitosan.
9. S-a studiat capacitatea de eliberare a unor medicamente model (Penicilina G, Norfloxacin, Ibuprofen, 5-Fluorouracil) din anocapsule. Eliberarea a fost controlată de procesul de difuzie prin membrana polimeră. Raportul molar dintre cei doi polimeri joacă un rol important în procesul de eliberare a medicamentului din nanocapsule; eficiența de eliberare crește odată cu creșterea raportului dintre cei doi polimeri adică odată cu creșterea concentrației de polimer natural în soluția inițială. Acest comportament se regăsește la toate sistemele de nanocapsule studiate. O altă observație este aceea că în primele ore are loc o eliberare rapidă a medicamentului din nanocapsule („burst” effect) și apoi o eliberare lentă, comportament ce poate fi datorat absorbției medicamentului la suprafața nanocapsulelor.
10. Testele de toxicitate și hemocompatibilitate arată că nanocapsulele obținute prezintă o bună compatibilitate cu mediul de sangvin, și o toxicitate redusă care le face potrivite pentru aplicații medicale.
11. Testele *in vivo* au demonstrat că nanocapsulele de tip AVAM-CS-9 încărcate cu Ibuprofen au prezentat o eliberare susținută pentru inhibarea durerii la nivel central (de la 2 la 24 h), față de ibuprofenul pur (de la 0 la 2 h).
12. Examenul histopatologic nu a evidențiat alterări la nivel de miocard, cerebral, hepatic, pulmonar. Testele au pus în evidență, de asemenea, că există o sensibilitate la nivel renal, dar care nu prezintă modificări tubulo-glomerulare.

Bibliografie selectivă

- [1] D.M.A.M. Luykx, R.J.B. Peters, S.M. Van Ruth, and H. Bouwmeester, A Review of Analytical Methods for the Identification and Characterization of Nano Delivery Systems in Food, *J. Agric. Food Chem.*, 56 : 8231–8247, (2008).
- [2] J.M. Irache, I. Esparza, C. Gamazo, M. Agüeros, S. Espuelas, Nanomedicine: Novel approaches in human and veterinary therapeutics, *Veterinary Parasitology*, doi:10.1016/j.vetpar.2011.05.028, (2011).
- [3] R. Ravichandran, Nanotechnology-Based Drug Delivery Systems, *Nanobiotechnol*, 5:17-33, (2009).
- [4] J. Rieger, C. Jerome, R. Jerome, R. Auzely-Velty Polymeric, Nanomaterials-Synthesis, Functionalization and Applications in Diagnosis and Therapy. In: C. Kumar, *Nanotechnologies for the Life Sciences* ed. Weinheim: Wiley-VCH, 8: 342-408, (2005).
- [210] I.C. McNeill, S. Ahmed, J.G. Gorman, Thermal degradation studies of alternating copolymers: VI. Degradation of the alternating copolymer of allyl acetate and maleic anhydride: thermal analysis and product analysis studies, *Polym. Degrad. Stab.*, 63:265-271, (1999).
- [211] K.J. Payne, A. Veis, Fourier transform IR spectroscopy of collagen and gelatin solutions: deconvolution of the amide I band for conformational studies, *Biopolymers*, 27:1749–1760, (1988).
- [212] V. Koula, R. Mohameda, D. Kucklingb, H-J. P. Adlerc, V. Choudharyd, Interpenetrating polymer network (IPN) nanogels based on gelatin and poly(acrylic acid) by inverse miniemulsion technique: Synthesis and characterization, *Colloids Surf., B*, 83: 204–213, (2011).
- [213] J.F. Martucci, R.A. Ruseckaite, Biodegradable three-layer film derived from bovine gelatin, *J.Food Eng.*, 99:377–383, (2010).
- [214] I.C. McNeill, S. Ahmed, S. Rendall, Thermal degradation studies of alternating copolymers -V. Degradation of the alternating copolymer of isopropenyl acetate and maleic anhydride, *Polym. Degrad. Stab.*, 62:85-95, (1998).
- [215] S. Ahmed, L. Memetea, P.M.H. Mohammed, G.E. Zaiko , A. Ya. Polishchuk, Thermal degradation behavior of some alternating copolymers, *Polym. Degrad. Stab.*, 52:171-181, (1996).
- [216] A. Fraga and J.R. Williams, Thermal properties of gelatin films, *Polymer*, 26:113, (1985).
- [217] R.D. Patil, J.E. Marka, A. Apostolovb, E. Vassilevab, S. Fakirov, Crystallization of water in some crosslinked gelatins, *Eur. Polym. J.*, 36:1055-1061, (2000).

- [218] S. Fakirov, M.E. Cagiao, F.J. Baltá Calleja, D. Sapundjieva, E. Vassileva, Melting of Gelatin Crystals below Glass Transition Temperature: A Direct Crystal-Glass Transition as Revealed by Microhardness, *Int. J. Polym. Mater.*, 43:3-4, (1999).
- [219] M. Sadeghi, B. Heidari, K. Montazeri, Investigation and Evaluation of Swelling kinetics Related to Biocopolymers Based on CMC poly (AA-co BuMC), *World Academy of Science, Eng. Technol.*, 75, (2011).
- [220] F. Fawaz, M. Guyot, A.M. Lagueny, J.P. Devissaguet, Ciproflexacin-loaded polyisobutylcyanoacrylate nanoparticles: preparation and characterization, *Int. J. Pharm.*, 154:191–203, (1997).
- [221] P.Tewa-Tagnea, S. Brianconb, H. Fessi, Preparation of redispersible dry nanocapsules by means of spray-drying: Development and characterization, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 30:124-135, (2007).
- [222] M. Berrabah, D. Andre, P. Verite, A. Zahidi, O. Lafont, Aminoglutethimide included in nanocapsules suspension: comparison of GC–MS and HPLC methods for control, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 35:761–768, (2004).
- [225] Y. Boonsongrit, B. W. Mueller, A. Mitrevej, Characterization of drug–chitosan interaction by ¹H NMR, FTIR and isothermal titration calorimetry, *J. Pharm. Biopharm.*, 69:388–395, (2008).
- [226] J.M. Yang, W.Y. Su, T.L. Leu, M.C. Yang, Evaluation of chitosan/PVA blended hydrogel membranes, *J. Membr. Sci.*, 236: 39–51, (2004).
- [227] C.E. Mora-Huertas, H. Fessi, A. Elaissari, Polymer-based nanocapsules for drug delivery, *Int. J. Pharm.*, 385:113–142, (2010).
- [228] C.G.T. Neto, J.A. Giacometti, A.E. Job, F.C. Ferreira, J.L.C. Fonseca, M.R. Pereira, Thermal Analysis of Chitosan Based Networks, *Carbohydr. Polym.*, 62:97–103, (2005).
- [229] J.M. Nieto, C. Peniche-Covas and G. Padron, Characterization of chitosan by pyrolysis-mass spectroscopy, thermal analysis and differential scanning calorimetry. *Thermochim. Acta*, 176 : 63–68, (1991).
- [230] C.L. Silva, J.C. Pereira, A. Ramalho, A.A.C.C. Pais, J.J.S. Sous, Films based on chitosan polyelectrolyte complexes for skin drug delivery: Development and characterization, *J. Membr. Sci.*, 320: 268-279, (2008).
- [231] M. Sadeghi, B. Heidari, K. Montazeri, Investigation and Evaluation of Swelling kinetics Related to Biocopolymers Based on CMCpoly(AA-co BuMC), *WASET*, 75:401-404, (2011).
- [232] V. Balan, I. A. Petrache, M. I. Popa, M. Butnaru, E. Barbu, J. Tsibouklis, L. Verestiuc, Biotinylated chitosan-based SPIONs with potential in blood-contacting applications, *J Nanopart. Res.*, 14:730, (2012).

- [236] L.Cismaru, T. Hamaide, M. Popa, Itaconic anhydride based amphiphilic copolymers: Synthesis, characterization and stabilization of carboxyl functionalized, PEGylated nanoparticles, *Eur.Polym. J.*, 43:4843–4851, (2007).

Valorificarea rezultatelor

Lucrări publicate

1. Delia Mihaela Iurea (Rață), O.M. Baltag, M. Popa, J-F. Chailan, C.A.Peptu, „Nanocapsules polymères porteuses de principes biologiquement actifs”, X^{eme} Colloque Franco-Roumain sur les Polymeres, „Polymeres & Materiaux Avances: Developpement Durable et performances”, Conference Proceedings, pg 45-48.

Lucrări trimise spre publicare

1. Delia Mihaela Iurea (Rață), Marcel Popa', Jean-François Chailan, Pascal Carriere, Catalina Anisoara Peptu, Sub-micronic capsules based on Gelatin and Poly (maleic anhydride -*alt*- vinyl acetate) obtained by interfacial condensation with potential biomedical applications – Journal of Nanoscience and Nanotechnology - trimisă spre publicare;
2. Delia Mihaela Iurea (Rață), Marcel Popa, Jean-François Chailan, Bogdan Ionel Tamba, Ionut Tudorancea, Cătălina Anișoara Peptu, Ibuprofen Chitosan/ Poly (maleic anhydride -*alt* -vinyl acetate) controlled release nanocapsules for pain treatment - Journal of Bioactive and Biocompatible Polymers - trimisă spre publicare.

Capitol carte

1. Mihaela Holban, Delia Iurea (Rață), Marcel Popa, Polymeric Nanocapsules, Capitolul 11 In Polymeric Nanomedicine, editori M.Popa, C.V Uglea, editura Bentham Science Publishers Ltd. – sub tipar

Participarea la manifestări științifice

Postere

1. D.M. Iurea (Rata), M. Popa, J.Morris, I. Bunia, M.N.Holban, C.A.Peptu, New Nanoparticles Based On Natural And Synthetic Polymers Prepared By An Interfacial Condensation Method, Conferinta Europeana de Biomateriale (ESB), 11-15 Septembrie 2010, Tampere, Finlanda.
2. M.N. Holban, C.A. Peptu, A.N. Jatariu, M. Popa, D.M. Iurea, Preparation of Microcapsules Based on Natural Polymers Using a Double Emulsion Technique, Conferinta Europeana de Biomateriale (ESB), 11-15 Septembrie 2010, Tampere, Finlanda.
3. Delia Mihaela Rață, Delia Grebinișan, Marcel Popa, Cătălina Anișoara Peptu, Sinteza și caracterizarea de micro și nanocapsule pe bază de polimeri naturali și sintetici prin metoda de policondensare interfacială, Zilele Facultatii de Inginerie Chimica si Protectia Mediului, Editia a VII-a „90 De Ani De La Nasterea Academicianului Cristofor Simionescu” Iasi, 17-19 Noiembrie 2010.
4. Delia Grebinișan, Marcel Popa, Valeriu Șunel, Radița Aparaschivei, Mihaela Holban, Delia Rață, Marian Grebinișan Noi conjugate polimer-principiul activ. Sinteza si caracterizare, Zilele Facultatii

de Inginerie Chimica si Protectia Mediului, Editia a VII-a „90 De Ani De La Nasterea Academicianului Cristofor Simionescu” Iasi, 17-19 Noiembrie 2010.

5. D.M. Iurea (Rață), O.M. Baltag, M. Popa, J.F. Chailan, C.A.Peptu, “Original Method for Preparing Nanocapsules Based on Gelatin and Maleic Anhydride-Vinyl Acetate Copolymer Suitable for Biomedical Applications”, Conferinta Europeana de Biomateriale, ESB 4-8 Septembrie 2011, Dublin, Irlanda.

6. Delia Mihaela Iurea (Rață), Anca Niculina Jătariu (Cadinoiu), Marcel Popa, Cătălina Anișoara Peptu, „New Type of Nanocapsules based on Natural and Synthetic Polymers for Biomedical Applications”, Conferinta Internationala Chimia 2012, 24 - 26 mai, Constanta, Romania.

7. Anca Niculina Jătariu (Cadinoiu), Delia Mihaela Iurea (Rață), Cătălina Anișoara Peptu, Marcel Popa, “Double crosslinked microparticles based on chitosan and poly(vinyl alcohol)”, Conferinta Internationala Chimia 2012, 24 - 26 mai, Constanta, Romania.

8. D.M. Iurea (Rață), M. Popa, A.N. Cadinoiu, C.M. Ignat (Lefter), C.A. Peptu, „New nanocapsules based on chitosan and poly(N-vinylpyrrolidone-alt-itaconic anhydride for drug delivery”, Workshop-ul International: Career in Polymers IV, 29 iunie – 30 iunie 2012, organizatori: Institute of Macromolecular Chemistry, Praga, Cehia și Central and East European Polymer Network.

Comunicari orale

1. D.M. Iurea (Rață), O.M. Baltag, M. Popa, J-F. Chailan, C.A.Peptu, „Nanocapsules polymères porteuses de principes biologiquement actifs”, Al X-lea Colocviu Franco-Roman al Polimerilor, 6-8 Septembrie 2011, Douai, Franta.

2. Delia Mihaela Iurea (Rață), Marcel Popa, Jean-François Chailan , Cătălina Anișoara Peptu , Nanocapsule pe baza de Poli(acetat de vinil-*alt*-anhidrida maleica) si Gelatina sau nanocapsule pe baza de Poli(acetat de vinil-*alt*-anhidrida maleica) si Chitosan?, Zilele Facultății de Inginerie Chimică și Protecția Mediului *EDIȚIA a VIII-a ” Materiale Si Procese Inovative”* Iași, 16-18 Noiembrie 2011.

3. D.M. Iurea (Rață), M. Popa, A.N. Cadinoiu, C.M. Ignat (Lefter), C.A. Peptu, „New nanocapsules based on chitosan and poly(N-vinylpyrrolidone-alt-itaconic anhydride for drug delivery”, Workshop-ul International: Career in Polymers IV, 29 iunie – 30 iunie 2012, organizatori: Institute of Macromolecular Chemistry, Praga, Cehia și Central and East European Polymer Network.

Burse obținute la Manifestări Științifice

1. Bursa „Rudolfs Cimmins Travel award” obținută din partea Societății Europene de Biomateriale cu ocazia celei de-a XXIV-a Conferință Europeană de Biomateriale, (ESB 2011), 4-8 Septembrie, Dublin, Irlanda.