



UNIVERSITATEA TEHNICĂ
“GHEORGHE ASACHI” DIN IAȘI

Școala Doctorală a Facultății de Inginerie
Chimică și Protecția Mediului

în cotutelă cu



UNIVERSITATEA DIN ROUEN



CONTRIBUȚII LA STUDIUL PROPRIETĂȚILOR BIOMEDICALE ALE UNOR MATERIALE POLIURETANICE

- Rezumatul tezei de doctorat -

Conducători Științifici:

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

Maître de conf. dr. Laurent Lebrun

Doctorand:

Bioinginer Mihaela Mândru

IAȘI - 2012



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

UNIVERSITATEA TEHNICĂ "GHEORGHE ASACHI" DIN IAȘI
RECTORATUL

Către _____

Vă facem cunoscut că în ziua de 24 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:

**„CONTRIBUȚII LA STUDIUL PROPRIETĂȚILOR BIOMEDICALE ALE UNOR MATERIALE
POLIURETANICE”**

elaborată de domnișoara **bioing. Mihaela Mândru** în vederea conferirii titlului științific de doctor.

Comisia de doctorat este alcătuită din:

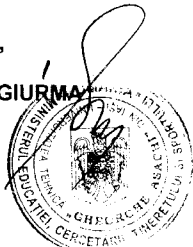
Prof.dr.ing. Silvia Curteanu	președinte
Universitatea Tehnică „Gheorghe Asachi” din Iași	
Prof.dr.ing. Marcel Popa	conducător de doctorat
Universitatea Tehnică „Gheorghe Asachi” din Iași	
Maître de conf.dr. Laurent Lebrun	conducător de doctorat
Université de Rouen, Franța	în cotutelă
Prof.dr. Patrick Martin	referent oficial
Université d'Artois, IUT de Béthune, Franța	
CS.I. dr. Constantin Ciobanu	referent oficial
Institutul de Chimie Macromoleculară „P.Poni” Iași	
Prof.dr.ing. Jacques Desbrieres	referent oficial
Univeriste de Pau et des Pays de l'Adour, Franța	

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
AMFOSUDRU



Fondul Social European
POSDRU 2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013



OPISORU



UNIVERSITATEA TEHNICĂ
"GHEORGHE ASACHI"
IASI

Mulțumiri:

*Profund respect și recunoștință conducătorului științific **Prof.Dr.Ing.dr.h.c. Marcel Popa**, pentru sprijinul moral și îndrumările științifice, pentru încrederea acordată, bunăvoință și înțelegere!*

*Sincere mulțumiri și recunoștință conducătorului științific **dr.Laurent Lebrun**, pentru încrederea și înțelegerea acordată, pe întreaga perioadă a realizării stagiului meu în Laboratorul Polimeri, Biopolimeri, Suprafețe de la Universitatea din Rouen. De asemenea îi mulțumesc pentru prețioasele sugestii, și îndrumarea acordată în cursul elaborării testelor de activitate antimicrobiană și antifungică.*

*Recunoștință și sincere mulțumiri domnului Cercetător Științific I, **dr. Constantin Ciobanu**, model de competență profesională și ținută morală, căruia îi datorez cele mai importante momente ale formării mele științifice.*

*Cu deosebit respect aș dori să mulțumesc, domnului Cercetător Științific II, **dr. Stelian Vlad**, căruia îi sunt profund recunoscătoare pentru prețioasele sugestii, și contribuția sa oferită pe parcursul desfășurării tezei mele de doctorat.*

*Deosebite mulțumiri și recunoștință dnei **Conf. dr. ing. Liliana Vereștiuc** pentru prețioasele sugestii, disponibilitatea și pentru posibilitatea realizării unor experimente în cadrul tezei.*

*Sincere mulțumiri dnei **șef de lucrări Maria Butnaru**, pentru îndrumarea acordată în realizarea experimentelor de biocompatibilitate celulară în cadrul laboratorului de culturi celulare de la Facultatea de Bioinginerie Medicală.*

Doresc sa adresez mulțumirile cuvenite tuturor celor care, direct sau indirect, prin sprijinul necondiționat, au contribuit la conturarea acestui drum științific și m-au susținut în finalizarea lui. Mulțumesc astfel colegilor de la Institutul de Chimie Macromoleculară Petru Poni, Luiza Grădinaru, Maurușa-Elena Ignat, Otilia Potolinca, pentru răbdarea și ajutorul acordat în timpul desfășurării tezei. De asemenea doresc să mulțumesc colegilor de la Universitatea „Gheorghe Asachi” din Iași, Delia Iurea (Rață), Cristina Ignat(Lefter), Cătălina Peptu, Anca Niculina Jatariu, Gianina Dodi, Simona Potorac(Betianu), Anca Uliniuc, Mihaela Iancu pentru susținerea acordată.

Sincere mulțumiri profesorilor de la laboratorul Polimeri, Biopolimeri și Suprafețe, Universitatea din Rouen, Franța, pentru căldura cu care am fost primită, răbdarea și sprijinul acordat pe timpul stagiului efectuat în laboratorul lor. De asemenea, doresc să mulțumesc doctoranzilor laboratorului, Nadine, Raphael, Ghania, Camille, Alexandre, Elias, Vincente și Abdel pentru prețioasele sugestii și susținerea acordată.

Calde mulțumiri prietenilor, prietenelor și familiei mele, în special mamei mele, care mi-au fost alături și m-au încurajat în finalizarea acestei lucrări.

Cu deosebită considerație,

Mihaela Mândru

CUPRINS

Introducere

1

STUDIU BIBLIOGRAFIC

I. MATERIALE POLIURETANICE CU APLICAȚII BIOMEDICALE

3

I.1 Poliuretani. Istoric

3

I.2 Componentele de bază ale poliuretanilor

4

I.2.1. Diizocianați

4

I.2.2. Polioli

5

I.2.3 Alungitori de catenă

6

I.3. Structură-proprietăți

6

I.3.1.Morfologia poliuretanilor

6

I.3.2.Formarea legăturilor de hidrogen

8

I.4.Biodegradarea

9

I.4.1.Degradarea prin hidroliză

11

I.4.2.Degradarea termică

12

I.5.Biocompatibilitatea poliuretanilor

13

I.5.1. Metode de evaluare a biocompatibilității

13

I.5.2. Evaluarea *in vitro* a biocompatibilității materialelor poliuretanic

17

I.5.3. Evaluarea *in vivo* a biocompatibilității materialelor poliuretanic

18

I.6.Aplicații medicale ale materialelor poliuretanic

19

I.6.1.Aplicații medicale ale materialelor poliuretanic în ingineria tisulară

20

I.6.2.Aplicații medicale ale materialelor poliuretanic pentru dispozitive cardiovasculare

23

CAPITOLUL II

II. Sisteme poliuretanic-principiu activ cu aplicații medicale

25

II.1.Generalități

25

II.2. Mecanisme de eliberare a principiilor active

28

II.3. Factori determinanți în eliberarea susținută a medicamentelor din matrici hidrofile

33

II.3.1. Medicament

33

II.3.1.2. Greutatea moleculară

33

II.3.1.3. Solubilitatea medicamentelor

33

II.3.1.4. Doza

34

II.3.1.5. Mărimea particulelor de medicament

35

II.3.2. Polimer

35

II.3.2.1. Tipul de polimer

36

II.3.2.2.Mărimea particulei de polimer

37

II.3.2.3.Concentrația polimerului

37

II.3.3.PH

39

II.3.4.Porozitate

39

II.4.Tipuri de sisteme poliuretani cu principii active:

40

II.4.1.Sisteme poliuretani-principiu activ de tip membrană

40

II.4.2.Sisteme poliuretan-principiu activ de tip particule

41

II.4.3.Sisteme poliuretan-principiu activ de tip hidrogel

41

II.4.4. Aplicații medicale ale sistemelor poliuretanic

42

II.4.4.1. Acoperirea dispozitivelor medicale

42

II.4.4.2.Acoperiri de dispozitive în domeniu vascular

43

II.4.4.3. Ingineria tisulară

44

CAPITOLUL III

MATERIALE SI METODE EXPERIMENTALE	46
III.1. Concept experimental	46
III.2. Materiale utilizate	47
III.3. Obținerea poliuretanilor	51
III.4. Obținerea sistemelor poliuretanic-principiu activ	50
III.4.1. Prepararea soluțiilor poliuretan-principiu activ	50
III.4.2. Prepararea membranelor poliuretan-principiu activ	50
III.5. Metode de caracterizare	51
III.5.1. Caracterizarea structurală	51
III.5.1.1. Spectroscopia IR cu transformată Fourier (FTIR)	51
III.5.1.2. Rezonanța magnetică nucleară (¹ H-RMN)	52
III.5.2. Cromatografia pe gel permeabil (GPC)	53
III.5.3. Metode de analiză termică	54
III.5.3.1. Calorimetria diferențială de baleiaj (DSC)	54
III.5.3.2. Analiza termogravimetrică (ATG)	55
III.5.4. Metode de analiză a suprafeței	55
III.5.4.1. Microscopia electronică de baleiaj (SEM)	55
III.5.4.2. Microscopia de forță atomică (AFM)	57
III.5.4.3. Metoda unghiului de contact	57
III.5.5. Metode de evaluare <i>in vitro</i> a sistemelor poliuretanic obținute	59
III.5.5.1. Determinarea gradului de umflare a membranelor poliuretanic	59
III.5.5.2. Studii <i>in vitro</i> de eliberare a principiilor active din sistemele poliuretanic	59
III.5.5.3. Mecanism de eliberare <i>in vitro</i>	60
III.5.5.4. Măsurarea concentrației minim inhibitoare (CMI)	60
III.5.5.5. Studii <i>in vitro</i> privind activitatea antimicrobiană și antifungică a materialelor poliuretanic	61
III.5.6. Teste de hemocompatibilitate	61
III.5.7. Teste de biocompatibilitate	62

CAPITOLUL IV

Sisteme poliuretanic-principiu activ pe bază de poli (butilen adipat) diol și poli (tetrametilen oxid) diol

IV.1. Reacția de sinteză	64
IV.2. Analiza structurală a poliuretanilor sintetizați	65
IV.2.1. Caracterizarea prin spectroscopie FTIR-ATR	65
IV.2.2. Caracterizarea prin spectroscopie ¹ H-RMN	66
IV.3. Analiza termogravimetrică	69
IV.4. Izoterma de sorbție/ desorbție	70
IV.5. Test de hemocompatibilitate	71
IV.6. Studii de biocompatibilitate	72
IV.6.1. Studii <i>in vitro</i> de culturi celulare – viabilitatea celulară	72
IV.7. Obținerea membranelor poliuretani- rifampicină	73
IV.7.1. Analiza structurală (FTIR-ATR)	73
IV.7.2. Analiza termică (DSC)	76
IV.7.3. Unguri de contact și determinarea energiei libere la suprafață	76
IV.7.4. Microscopia de forță atomică (AFM)	77
IV.7.5. Microscopia electronică de baleiaj (SEM)	79
IV.7.6. Studiul eliberării <i>in vitro</i>	80

IV.7.7. Mecanism de eliberare	80
IV.7.8. Coeficienți de difuzie	81
IV.7.9. Activitatea antibacteriană	82
IV.8. Obținerea membranelor poliuretani-nistatină	83
IV.8.1. Analiza structurală a sistemelor poliuretani-nistatină	83
IV.8.2. Analiza termică (DSC)	86
IV.8.3. Analiza suprafeței	86
IV.8.3.1. Microscopie electronică de baleiaj (SEM)	86
IV.8.4. Studiul <i>in vitro</i> de eliberare	91
IV.8.5. Mecanism de eliberare	90
IV.8.6. Studiul <i>in vitro</i> al activității antifungice	91
CAPITOLUL V	
Sisteme poliuretanece–principiu activ pe bază de poli(butilen adipat) diol și poli(etilen glicol)	93
V.1. Reacția de sinteză	93
V.2.1 Analiza spectrală	94
V.2.1.1. Caracterizare prin spectroscopie FTIR-ATR	94
V.2.1.2. Caracterizare prin spectroscopie ¹ H-RMN	95
V.3. Absorbția de apă	96
V.4. Test de hemocompatibilitate	96
V.5. Teste de biocompatibilitate	98
V.6. Obținerea membranelor poliuretanece încărcate cu rifampicină	99
V.6.1. Analiza structurală a sistemelor poliuretan-rifampicină	99
V.6.1.1. Spectroscopie ATR-FTIR	99
V.6.2. Analiza termică (DSC)	100
V.6.3. Unghiul de contact și determinarea energiei de suprafață	101
V.6.4. Microscopia electronică de baleiaj (SEM)	102
V.6.5. Microscopia electronică de forță atomică (AFM)	104
V.6.6. Eliberarea <i>in vitro</i> a rifampicinei	105
V.6.7. Mecanism de eliberare	106
V.6.8. Activitatea antibacteriană	106
V.7. Obținerea membranelor poliuretani-nistatină	108
V.7.1. Analiza structurală a sistemelor poliuretani-nistatină	108
V.7.1.1. Caracterizare prin spectroscopie ATR-FTIR	108
V.7.2 Analiza termică (DSC)	109
V.7.3. Unghiul de contact și determinarea energiei libere	110
V.7.4. Eliberarea <i>in vitro</i> a nistatinei	110
V.7.5. Activitatea antifungică	111
CAPITOLUL VI	
Sisteme poliuretanece –principiu activ pe bază de poli(ε-caprolactonă) diol	113
VI.1. Reacția de sinteză	113
VI.2. Analiza structurală a poliuretanilor sintetizați	114
VI.2.1. Caracterizare spectrală FTIR-ATR	115
VI.2.2. Caracterizare spectrală ¹ H-RMN	116
VI.3. Studii de biocompatibilitate	116
VI.4. Obținerea membranelor poliuretani-rifampicină	117
VI.4.1. Analiza structurală a sistemelor poliuretanece-rifampicină	118
VI.4.1.1. Caracterizare prin spectroscopie ATR-FTIR	118
VI.4.2. Analiza termică	119

VI.4.3.Unghi de contact și determinarea energiei libere	120
VI.4.4.Studiul de eliberare <i>in vitro</i>	121
VI.4.5.Studiul activității antimicrobiene	121
VI.5.Obținerea membranelor poliuretani -nistatină	122
VI.5.1.Analiza structurală a sistemelor poliuretani-nistatină	122
VI.5.1.1.Caracterizare spectrală ATR-FTIR	122
VI.5.2 Analiza termică (DSC)	123
VI.5.3.Unghi de contact și determinarea energiei suprafeței	124
VI.5.4.Eliberarea <i>in vitro</i> a nistatinei	125
VI.5.5.Activitatea antifungică	125
CONCLUZII GENERALE	128
REFERINȚE BIBLIOGRAFICE	
DISEMINAREA REZULTATELOR	

INTRODUCERE

Biomaterialele polimerice constituie un subiect foarte actual ce a cunoscut o dinamică deosebită, dată fiind diversitatea cerinței din domeniul medical, farmaceutic și cosmetic. Complexitatea comportamentului pe care îl manifestă materialele polimerice în contact cu natura diversă a mediului biologic (țesut sau sânge) trebuie să țină seama, atât de biocompatibilitatea cu materialul biologic cât și de caracteristicile fizico-chimice ale materialului polimeric ales. În ultimii ani, cercetările în domeniul științei materialelor au evidențiat un mare interes pentru această categorie de biomateriale, și în particular pentru sistemele de eliberare susținută a principiilor biologice active.

Studiile întreprinse au ca scop optimizarea proprietăților terapeutice ale produselor medicamentoase, făcându-le cât mai puțin toxice pentru organism și nu în ultimul rând mult mai eficiente. În cercetarea efectuată în cadrul acestei teze de doctorat s-a optat pentru alegerea materialelor poliuretane datorită excelentelor lor proprietăți fizico-chimice și biomedicale.

În urma analizei datelor Sistemelor Naționale de Supraveghere a Infecțiilor Nosocomiale s-a constatat un indice crescut în cazul infecțiilor sangvine, de la nivelul tractului respirator sau a țesutului moale (piele). Astfel, infecția rămâne un impediment pentru utilizarea pe o perioadă de timp mai mare a dispozitivelor medicale în aplicații biomedicale precum implanturi vasculare, boli respiratorii sau cele ale țesutului moale, al pielii. Pentru obținerea unor materiale care au ca scop prevenirea diverselor infecții, precum cele nosocomiale, una din strategiile utilizate a constat în formularea unor sisteme de eliberare susținută de principii active.

Utilizarea unor sisteme poliuretane sub formă de membrană pentru eliberarea susținută a unor medicamente antibacteriene precum nistatina și rifampicina poate contribui la menținerea unei terapii cât mai eficiente, care să evite necesitatea administrării repetate a dozelor. De asemenea, pe această cale poate fi diminuată apariția acestor tipuri de infecții, precum și evoluția lor în timp. Prin urmare **noutatea** acestei teze constă în formularea unor sisteme polimer-medicament de eliberare prelungită care au ca scop prevenirea eventualelor infecții de la nivelul cateterelor vasculare și ale țesutului moale, al pielii.

Pentru a atinge acest **obiectiv** cercetările au urmărit:

- sinteza de poliuretani pe bază de polieteri - poli(etilen glicol) și poli (tetrametilen oxid) diol, respectiv de poliesteri - poli(caprolactona) diol și poli(butilen adipat) diol -, prin varierea compoziției în grupări uretanice, foarte des utilizați în aplicații biomedicale;

- studiul biocompatibilității și hemocompatibilității acestor poliuretani obținuți cu scopul utilizării în diferite aplicații biomedicale;

- formularea unor sisteme poliuretane de tip membrană încărcată cu principii active, prin procedeul inversiei de fază, transfer de masa solvent-nesolvent în matricea polimeră, în vederea obținerii unei eliberări susținute;

-evidențierea corelației structură-proprietăți de eliberare a principiilor active alese și evaluarea mecanismului de eliberare a medicamentului din sistemele obținute;

-studiul proprietăților antimicrobiene ale sistemelor poliuretanic-principiu activ obținute, față de unele bacterii gram-pozitive, gram-negative și antifungice de tipul *C.albicanus*;

Teza este alcătuită din două părți, una teoretică și cealaltă experimentală, fiind structurată în șapte capitole, dintre care primele două reprezintă studiul bibliografic, iar celelalte, partea originală. În **capitolul I** sunt prezentate noțiuni generale despre poliuretani, componentele lor de bază, structura și proprietățile acestora, noțiuni despre biodegradabilitate și biocompatibilitate precum și potențialele aplicații biomedicale ale acestor materiale poliuretanic. **Capitolul II** descrie câteva noțiuni generale despre sistemele poliuretanic pentru eliberarea de medicamente și mecanismele de difuzie ale acestora. Se analizează factorii care determină eliberarea medicamentelor din matrici hidrofile precum și tipurile de sisteme poliuretanic-principiu activ existente sub diferite forme: membrane, hidrogel sau particule. În final, se clasifică și se discută potențialele aplicații biomedicale ale acestora. În **capitolul III** sunt prezentate materialele folosite pe parcursul experimentelor, metodele de sinteză a poliuretanilor, metodele de obținere a sistemelor poliuretanic cu principiu activ și în final metodele de caracterizare a produșilor obținuți. **Capitolul IV** descrie primul sistem poliuretan de eliberare susținut pe bază de poli(tetrametilen oxid) diol. Se prezintă schema de reacție și caracterizarea spectrală, caracteristicile de suprafață și sunt discutate sistemele poliuretanic cu cele două medicamente - nistatină și rifampicină. Se pune în evidență corelația structură-proprietăți de eliberare în funcție de concentrația în grupări uretanice sau de compoziția segmentului „hard” din poliuretanii sintetizați. În **capitolul V** este prezentată sinteza și obținerea unui alt tip de sistem poliuretan pe baza de poli(etilen glicol). Se analizează corelația structură-proprietăți de eliberare pentru două concentrații în grupări uretanice, proprietățile biomedicale ale poliuretanilor obținuți și activitatea antimicrobiană a sistemelor poliuretan-medicament.

Capitolul VI discută sinteza, proprietățile biomedicale ale unor poliuretani pe bază de poli(caprolactona) diol cu doi diizocianați alifatic și aromatic și analizează din punct de vedere spectral și al suprafeței, sistemele poliuretanic cu cele două medicamente studiate: nistatina și rifampicina. În final este analizată activitatea antimicrobiană a sistemului poliuretan cu medicamentele încorporate. **Capitolul VII** prezintă principalele concluzii evidențiind contribuțiile originale ale lucrării.

Referințele bibliografice consultate pe parcursul studiilor efectuate încheie lucrarea. Rezultatele obținute pe parcursul acestei teze au fost valorificate prin publicarea și trimiterea spre publicare a 6 lucrări, între care 4 la reviste cu coeficient de impact, precum și în comunicarea a 5 lucrări la manifestări științifice interne și internaționale.

Teza de doctorat se extinde pe 148 pagini și conține 94 figuri, 25 tabele, 15 ecuații și 206 citări bibliografice. Rezumatul tezei de doctorat respectă denumirea capitolelor, numerotarea figurilor, tabelelor și a referințelor bibliografice din teză.

III.1. Concept experimental

Domeniul eliberării susținute a unei game largi de medicamente constituie obiectul de studiu a numeroase echipe de cercetare, din întreaga lume, vizând aplicații farmaceutice, cosmetice și biomedicale.

În ultimele decenii s-a urmărit obținerea unor sisteme de eliberare susținută a medicamentelor în dorința de a obține o eliberare prelungită a diverselor principii active solubile sau insolubile în apă, cu viteze de eliberare care să permită reducerea numărului de administrări zilnice și nu în ultimul rând să îmbunătățească complianța pacientului. Scopul multor cercetări a constat în obținerea unei viteze adecvate de eliberare a principiilor active alese cu scopul asigurării unor concentrații în sânge situate în domeniul terapeutic și pentru o durată dorită.

Interesul legat de utilizarea materialelor poliuretane în formularea unor sisteme de eliberare susținută cu rifampicină sau nistatină este de actualitate datorită necesității de prevenire a infecțiilor care au loc în diferite aplicații biomedicale: de la implanturi vasculare până la infecțiile de la nivelul țesutului moale, al pielii. Materialele poliuretane au fost alese datorită proprietăților fizico-chimice foarte bune și a biocompatibilității lor în contact cu organismul uman. Acestea au aplicații nelimitate în domenii precum industrie, medicină, dar și în cosmetică.

În urma analizei rezultatelor științifice din domeniul utilizării materialelor poliuretane în aplicații biomedicale, s-a optat în această lucrare pentru o strategie de cercetare ce a avut ca obiectiv central:

Obținerea de sisteme poliuretane pentru eliberarea susținută a unor antimicrobiene în scopul prevenirii apariției infecțiilor în aplicații biomedicale.

Pentru atingerea acestui obiectiv cercetările au fost orientate în două direcții:

-sinteza de poliuretani, studiul biocompatibilității și hemocompatibilității lor, în scopul utilizării acestora în sisteme de eliberare susținută și inginerie tisulară.

-obținerea de sisteme poliuretane cu principii active și caracterizarea acestora în corelație cu potențialele lor aplicații biomedicale.

Poliuretanii sintetizați au în structură diferiți poliesteri și polieteri de tipul poli(tetrametilen oxid) diol și poli(etilen glicol) foarte utilizați în aplicații biomedicale, și prezintă diferite concentrații ale grupărilor uretanice. Alegerea a fost datorată faptului că acestea constituie o clasă de materiale cu structuri care permit interacțiuni fizice și chimice cu diferiți compuși moleculari. S-a urmărit formularea sistemelor poliuretane cu diverse principii active ca membrane, studiindu-se influența concentrației în grupări uretanice și a tipului de segment dur asupra procesului de eliberare susținută, ceea ce constituie un element de **noutate** din punct de vedere al procesului de eliberare.

Valorificarea acestor sisteme s-a orientat spre prevenirea infecțiilor în diferite aplicații biomedicale precum implanturi, pansamente, poliuretani având deja calități recunoscute pentru aceste tipuri de bioaplicații.

III.3. Obținerea poliuretanilor

Poliuretani au fost sintetizați prin procesul de polimerizare în masă, unul dintre cele mai utilizate procedee industriale utilizate la obținerea poliuretanilor, în urma cărui nu sunt deversați din sinteza solvenți sau alți produși moleculari toxici în mediul înconjurător. S-au sintetizat poliuretani cu două concentrații în uretan: 1,5 mmol.g⁻¹ respectiv 2,5 mmol.g⁻¹ după metoda utilizată anterior [140]. Reacția de sinteză a început cu deshidratarea polioliilor, la vid, la 120°C timp de 2 h. Reacția cu diizocianat s-a realizat sub agitare, la temperatura de 85°C, în soluție de DMF, iar butandiolul a fost adăugat la temperatura de 60°C. Polimerizarea a fost întreruptă, atunci când vâscozitatea a ajuns la 7200 respectiv 7000 cP, la 20°C cu o soluție de 10 ml alcool etilic: DMF 1:1 (v/v). Produsul obținut s-a purificat prin precipitare în apă bidistilată, timp de 3 zile, interval în care apa bidistilată a fost schimbată de câte 3 ori pe zi. Poliuretanul a fost introdus în etuvă pentru uscare la vid.

III.4. Obținerea sistemelor poliuretane-principiu activ

III.4.1. Prepararea soluțiilor poliuretan-principiu activ

Cantitatea de medicament a fost dizolvată în soluția de dimetilformamidă (DMF). După completă dizolvare a medicamentului soluția a fost turnată în soluția de poliuretan DMF (30%; c=5 g poliuretan). Amestecarea a avut loc timp de 3 ore după care soluțiile poliuretane cu medicament și soluția simplă de poliuretan au fost turnate în vase Petri (Ø=110mm) și lăsate peste noapte timp de 24 ore.

III.4.2. Prepararea membranelor poliuretan-principiu activ

Obținerea membranelor poliuretane din soluțiile poliuretan-principiu activ s-a realizat prin metoda inversiei de fază, precipitare în non-solvent [140, 142]. Fiecare probă astfel preparată s-a precipitat în apă distilată la temperatura de 45°C și s-a lăsat în aceste condiții până a avut loc separarea completă a membranei din vasele Petri. Membranele poliuretane obținute au fost spălate de 3 ori cu apă bidistilată, apoi s-au uscat la temperatura camerei și presiune scăzută 0,02 mbar, într-un interval de 72 ore. Procentul de medicament eliberat din membrane în apă bidistilată, a fost calculat pe baza unei curbe de etalonare a medicamentului utilizat în apă bidistilată. În final s-a stabilit, cantitatea de medicament rămasă în membranele poliuretane obținute prin inversia de fază.

CAPITOLUL IV

Sisteme poliuretane-principiu activ pe bază de poli (butilen adipat) diol și poli (tetramilen oxid) diol

În cercetarea științifică din această teză s-a optat pentru alegerea materialelor poliuretane datorită excelentelor lor proprietăți fizico-chimice și biomedicale. Pentru obținerea unor produse cu aplicații în prevenirea diverselor infecții de tipul celor nosocomiale, una din strategiile utilizate a constat în formarea unor sisteme de eliberare susținută a principiilor active. Încorporarea de agenți anti-infecțivi în matricea polimeră reprezintă o metodă de distrugere a bacteriilor și combate posibilitatea eventualelor infecții residuale [42]. Utilizarea unor sisteme poliuretane sub formă de membrană, pentru eliberarea susținută a unor medicamente antibacteriene precum nistatina și rifampicina, pot contribui la scăderea apariției acestor tipuri de infecții și ameliorarea evoluției lor în timp. Unii dintre poliuretani utilizați ca biomateriale sunt elastomerii poliuretani, utilizați în mod curent, într-o varietate de aplicații biomedicale, precum dispozitivele în contact cu sângele, datorită bunei biocompatibilității și stabilității în mediu biologic [42].

Luându-se în considerare cele menționate mai sus, s-a studiat posibilitatea sintezei unor elastomeri poliuretani, proces urmat de obținerea unor membrane poliuretane pentru includerea și eliberarea unor medicamente antimicrobiene: rifampicina și nistatina. Poliuretanii obținuți au la bază poli(tetramilen oxid) diol și poli (butilen adipat) diol, fiind sintetizați cu două concentrații în grupări uretanice de $1,5 \text{ mmol.g}^{-1}$ respectiv $2,5 \text{ mmol.g}^{-1}$. Prezența grupărilor funcționale specifice poliuretanilor și a celor două medicamente alese au fost urmărite prin analiza spectrală. S-a analizat formarea interacțiilor fizice cu ajutorul calorimetriei diferențiale de baleiaj. A fost studiată morfologia la suprafață și în secțiune precum și proprietățile biomedicale ale poliuretanilor, iar în final activitatea antimicrobiană a membranelor poliuretane cu medicamente.

IV.1. Reacția de sinteză

În vederea preparării poliuretanilor sintetizați s-a utilizat un polieter poli(tetramilen oxid) diol (PTMO) cu masa molară de 2000 Da, poli(butilen adipat) diol (PBA) cu masa molară de 2000 Da, 1,4 butandiol (BG) și 4,4-diizocianat de difenil metan (MDI), în soluție de dimeitil formamidă (DMF) după metode publicate anterior [140]. Raportul molar dintre poliuretani 1:1 :3,8 :1,8 pentru PU₁ cu concentrația în grupări uretanice de $1,5 \text{ mmol.g}^{-1}$ și de 1:1:8,6:6,4 pentru PU₂ cu concentrația în grupări uretanice de $2,5 \text{ mmol.g}^{-1}$. Principial reacția de sinteză este prezentată în figura IV.31.

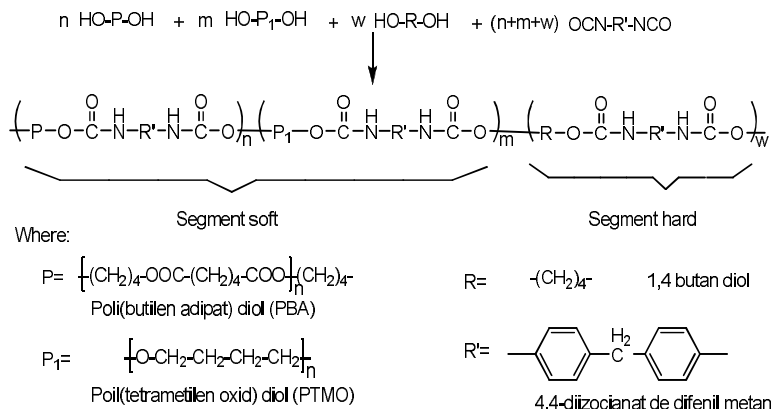


Figura IV.31. Schema reacției de sinteză a poliuretanilor

Cele două concentrații în grupări uretanice au fost alese conform studiilor de sinteză din laboratorul de Poliadiție, Institutul Petru Poni din Iași, unde s-a constatat că proprietăților fizico-chimice ale poliuretanilor nu se modifică liniar cu creșterea concentrației molare în grupări uretanice pe lanțul macromolecular. Pentru cazul poli(ester uretanilor), de la o concentrație în uretan de $2,22 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$ iar pentru poli(eter uretan) de la o concentrație în uretan de $2,42 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$, modulul inițial de elasticitate își modifică valoarea, crescând după o dreaptă cu o pantă mult mai mare [25,140]. Până la aceste concentrații majoritatea legăturilor de hidrogen inter și intramoleculare se formează între grupările uretanice și cele esterice sau eterice, structurându-se matricea amorfă a poliuretanilor. Peste aceste valori concentrația în structuri uretanice ajunge la un punct de cristalizare, unde structurile cristaline se separă de cele amorse [140, 25]. Aceste clustere, structuri cristaline, sunt goluri care se produc datorită efectului de hibridizare între azot și hidrogen, cu structura în care difuzează medicamentul nostru. Fiind bogat în legături de hidrogen, acesta reacționează cu gruparea carbonil și mărește gradul de împachetare a grupărilor uretanice, astfel încât în analiză se observă o structurare a polimerului, deoarece gruparea uretanică are afinitate asupra grupării OH, NH₂.

IV.2. Analiza structurală a poliuretanilor sintetizați

IV.2.1. Caracterizare prin spectroscopie FTIR-ATR

Spectrele ATR-FTIR ale celor doi poliuretani sunt prezentate în Figura IV.32.

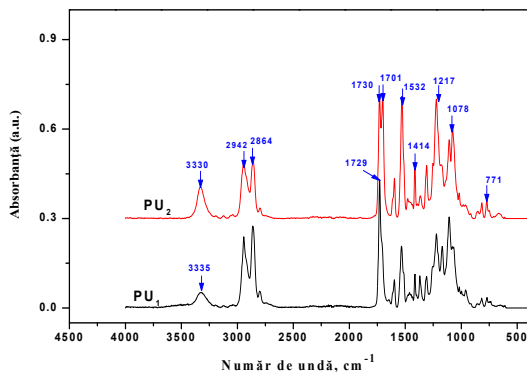


Figura IV.32. Spectru ATR-FTIR pentru PU₁ și PU₂

Spectrele specifice celor doi poliuretani sintetizați prezintă benzi caracteristice vibrației de întindere ν (N-H) uretanice cu maximul la 3335, respectiv 3330 cm^{-1} [140]. Picul de la 2942, respectiv 2943 cm^{-1} este caracteristic vibrației de întindere asimetrice a grupării ν $(\text{CH}_2)_{\text{asim}}$ iar cel de la 2864 cm^{-1} este caracteristic vibrației de întindere simetrice ν $(\text{CH}_2)_{\text{sim}}$ [140]. Banda caracteristică vibrației de întindere ν (C-O) prezintă un maxim la 1730, respectiv 1727 cm^{-1} , ce aparține grupării carbonil amorf, iar picul de la 1712 cm^{-1} , respectiv 1701 cm^{-1} aparține grupării carbonil legate [155]. Picul de la 1595 cm^{-1} aparține vibrațiilor de valență ale legăturilor C-C din ciclurile benzenice ale diizocianatului [140]. Amida II este formată din contribuția mai multor tipuri de legături: vibrația de deformare δ (N-H) și vibrația de alungire ν (C-N) și se găsește la lungimea de undă de la 1532 cm^{-1} [156]. Vibrația de întindere CH_2 se găsește la 1414 și 1366 cm^{-1} [156]. Picul de la 1221 cm^{-1} reprezintă 2 tipuri de vibrații de alungire ν (C-N) și de deformare δ (N-H) numită și Amida III. Vibrația de întindere a grupării ν (C-O) din eterul alifatic este suprapusă peste vibrația de întindere a grupării ν (C-O) din ester și se regăsește la picul de la 1179 cm^{-1} [3]. Între 1107 cm^{-1} și 1078 cm^{-1} se regăsește banda caracteristică vibrației de întindere ν (C-O-C) simetrică din funcțiunile eterice care se suprapun cu cele din funcțiile esterice [156]. Picul de la 771 cm^{-1} este reprezentat de CH_2 rocking [138]. Obținerea poli (ester-eter uretan)-ului îmbogățit în structuri de tip uretan (PU₂), se caracterizează prin prezența picului de la 1701 cm^{-1} caracteristic structurii legate a grupării carbonil și deplasarea picului de la 3328 cm^{-1} spre lungimi de undă mai mari.

IV.5. Test de hemocompatibilitate

Datele experimentale privind influența concentrației în grupări uretanice asupra capacității de coagulare a sângelui sunt prezentate în tabelul 9 și Figura IV.40.

Tabel 9. Mărimea cheagului format pe suprafața polimerului în contact cu sângele în condiții *in vitro*.

Tip material 50 mm ² suprafața incubată	Greutate cheag proaspăt obținut (mg)
Cheag martor la 6 min fără polimer	2,38±1,41
Film collagen bovin Martor pozitiv	42,5±3,50
PU ₁	8,03±1,05
PU ₂	10,6±1,00



Figura IV.40. Formare cheag de sânge pentru PU₁, PU₂

Interacțiunile nedorite dintre polimer și sânge pot apărea la contactul direct al sângelui cu diverse dispozitive medicale, precum catetere, stenturi sau valve cardiace. În urma contactului direct al sângelui cu polimerii sintetizați s-a observat o creștere în diametrul cheagului, odată cu creșterea concentrației în grupări uretanice (Tabel 9). Putem astfel afirma că materialele astfel obținute sunt trombo rezistente, atunci când sunt puse în contact cu sângele uman după cum atestă testele efectuate. Masa cheagului obținut este de patru sau de cinci ori superioară (pentru PU₁ și PU₂) în comparație cu cea a martorului (cheagul de sânge) dar inferioară a celei obținute în prezența collagenului.

IV.6. Studii de biocompatibilitate

Selecția materialelor folosite în diverse aplicații biomedicale este bazată pe capacitatea acestora de a nu provoca nici o reacție adversă în contact cu țesutul uman. Totodată, pentru anumite aplicații biomedicale este necesar ca materialele testate să fie biodegradabile în timp și să reacționeze cu țesutul uman, evitându-se caracterul lor inert în contact cu organismul. Una din metodele folosite pentru a studia biocompatibilitatea poliuretanilor sintetizați a constat în viabilitatea celulară. Testele *in vitro* efectuate pe poliuretani sintetizați, au fost efectuate pe o perioadă stabilită de timp: 72 de ore. În urma testului de viabilitate celulară, rezultatele obținute oferă informații cu privire la eliberarea unor compuși din poliuretani sintetizați care pot influența negativ dezvoltarea celulară. Prezența aceluiași număr de celule viabile, în momentul contactului cu acestea pe o perioadă determinată de timp a fost studiată cu testul MTT și WST-1.

IV.6.1. Studii *in vitro* pentru culturi celulare – viabilitatea celulară

Biocompatibilitatea poliuretanilor sintetizați a fost testată cu celule fibroblaste din dermul uman și celule embrionare “kidney”. Protocolul utilizat a fost MTT, având ca reactiv sarea de terazoliu și WST-1, un test colorimetric de proliferare celulară. Rezultatele obținute în urma testelor au demonstrat că mai mult din 70% din celulele viabile s-au înregistrat timp de 72 de ore. În figurile următoare sunt prezentate rezultatele testului, MTT, de viabilitate celulară care confirmă non-citotoxicitatea celulară pentru poliuretani sintetizați.

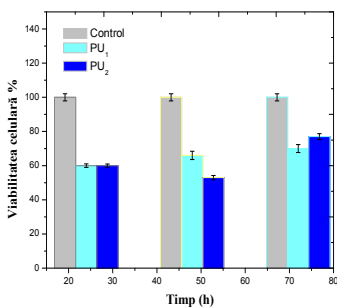


Figura IV.41. Viabilitatea celulară cu fibroblaste umane pentru PU₁ și PU₂

IV.7. Obținerea membranelor poliuretani – rifampicină

Obținerea membranelor poliuretane cu rifampicină s-a realizat prin metoda inversiei de fază, precipitare în non-solvent (apa bidistilată). Precipitarea a avut loc la 45°C, până în momentul separării complete a membranelor din vasele Petri. În urma procesului de eliberare,

în apă distilată a medicamentelor, concentrațiile soluției rămase în PU₁-R și PU₂-R au fost de 2,2% respectiv 2,6%.

IV.7.1 Analiza structurală

Benzile de absorbție în ATR-FTIR pentru spectrele membranelor PU₁ și PU₂ și ale membranelor cu rifampicină snt prezentate în Figura IV.43. Spectrele relevă o absorbție largă și intensă a benzilor cu maximum la 3335, respectiv 3330 cm⁻¹, aparținând vibrației de întindere $\nu(\text{N-H})$ ale hidrogenului legat, iar absorbțiile de la 2943, 2942 cm⁻¹ reprezintă vibrația de întindere $\nu(\text{CH}_2)$ asimetrică și simetrică ale segmentului soft [140].

Carbonilul liber aparține grupării uretanice și lanțului poliestere $\nu(\text{C=O})$ și se regăsește la 1729, 1728 cm⁻¹, iar carbonilul legat aparținând grupării uretanice se regăsește la 1712, respectiv 1701 cm⁻¹ [3].

Rifampicina prezintă benzi de absorbție la următoarele lungimi de undă: vibrația de valență -OH – la 3439 cm⁻¹, vibrațiile de întindere asimetrice și simetrice $\nu(\text{CH}_2)$ la 2970 respectiv 2971 cm⁻¹, iar vibrația de întindere ale carbonilului liber și legat $\nu(\text{C=O})$ se regăsește la 1734, 1710 cm⁻¹ [162]. Picul intens al vibrației de întindere $\nu(\text{C=C})$ se află la 1565 cm⁻¹ iar picul de la 1020 cm⁻¹ aparține vibrației de întindere $\nu(\text{C-O-C})$. Forma sterică a rifampicinei, este considerată forma II, datorită prezenței celor două picuri în regiunea carbonilului de la 1714 și 1734 cm⁻¹, denumită forma cristalină a medicamentului [163,164].

În tabelul 10 se regăsesc benzile de absorbție ale poliuretanilor sintetizați. Aceste benzi se suprapun cu benzile de absorbție ale rifampicinei, ele având aceleași tipuri de grupări și vibrând la aceleași lungimi de undă.

În spectrele PU₁, PU₂, PU₁-R și PU₂-R nu se observă diferențe majore între benzile de absorbție, datorită probabil a concentrației mici de rifampicină de 2,2 % (w/w), 2,6%(w/w), pentru PU₁-R, respectiv PU₂-R (Figura IV.43). Analiza grupării carbonil în spectrul poliuretanilor oferă informații cu privire la formarea legăturilor de hidrogen [165].

Modificări în benzile de absorbție ale poliuretanilor cu rifampicină sunt cel mai bine definite la gruparea carbonilului uretanic pentru concentrația de 10% (w/w) în rifampicină în regiunea 1800-1650 cm⁻¹. Absorbanța carbonilului legat se regăsește la picul de la 1700 cm⁻¹ și crește în intensitate la concentrația de 10% cu rifampicină, deoarece hidrogenul liber al rifampicinei interacționează cu carbonilul liber al uretanului de la 1728 cm⁻¹, formând legături de hidrogen (Figura IV.43).

În regiunea carbonilului de la 1800-1630 cm⁻¹, raportul dintre aria benzii de absorbție al carbonilului liber și aria benzii de absorbție a carbonilului legat $A_{\text{C=O liber}}/A_{\text{C=O legat}}$ este de 1:1,06 pentru PU₂ și de 1:1,14 pentru PU₂-10% R. Prezența legăturilor de hidrogen a fost, de asemenea, studiată între acești poliuretani și nistatină [142].

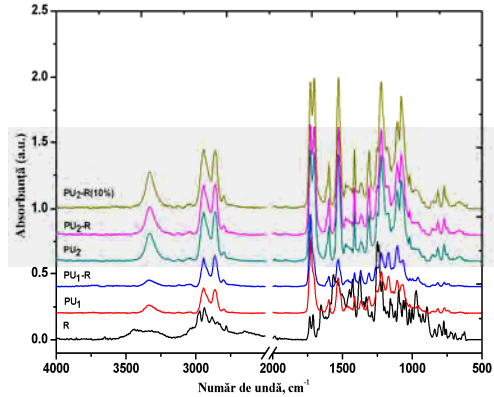


Figura IV.43. Spectrele ATR-FTIR pentru R, PU₁, PU₂, PU₁-R, PU₂-R

Tabel 10. Benzile de absorbție ATR-FTIR ale poliuretanilor și poliuretanilor cu rifampicină

Lungimea de undă (cm ⁻¹)		Atribuire	Intensitate
PU ₁ /PU ₁ -R	PU ₂ /PU ₂ -R		
3335/3336	3330/3331	v(N-H), hidrogenul legat	w, m
2943/2942	2943/2942	v(CH ₂) _{asim}	m
2861/2862	2858/2862	v (CH ₂) _{sim}	m
1728/1728	1729/1728	v (C=O), carbonilul liber al uretanului	vs
1704/1702	1701/1701	v (C=O), carbonilul legat al uretanului	vs
1597/1597	1596/1597	v (C=C) inelul aromatic	m
1532/1532	1529/1532	δ(N-H)+ v(C-N), amide II	s
1414/1413	1413/1413	δ (C-H) legănare și încrucișare	w
1220/1220	1221/1220	δ(N-H) + v (C-N), amida III	vs
1170/1171	1106/1107	v(C-O) în grupul eter	s
1107/1106	1078/1078	v (C-O-C) _{sim} , grupul eter și ester	vs
771/771.3	771/771,3	CH ₂ vibrația rocking	w

w= slab; m= mediu; s=puternic; vs= foarte puternic

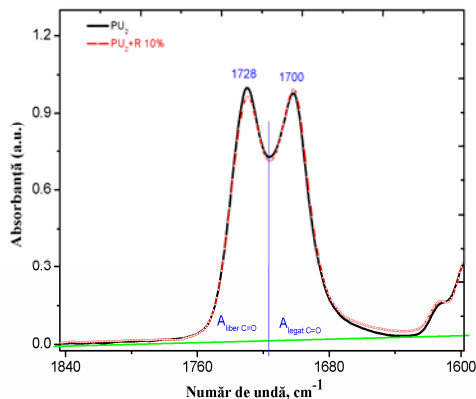


Figura IV.44. Benzile carbonilului uretanic în regiunea 1800-1630 cm^{-1} : negru- PU_2 și roșu- $\text{PU}_2+\text{R}10\%$

IV.7.2. Analiza termă (DSC)

Rezultatele obținute pentru cele două membrane poliuretane cu rifampicină investigate sunt prezentate în Figura IV.45. Fenomenul separării de fază cristalin-amorf, apare atunci când concentrația în structuri uretanice depășește $2,2 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$ [140]. Creșterea valorii T_g -ului pentru cei doi poliuretani exprimă posibila interacție dintre rifampicină și poliuretani [166, 167].

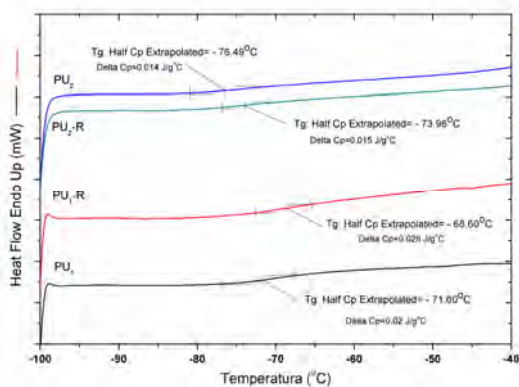


Figura IV.45. Calorimetria diferențială de baleiaj pentru PU_1 , $\text{PU}_1\text{-R}$, PU_2 , $\text{PU}_2\text{-R}$

IV.7.3. Unghi de contact și determinarea energiei libere

Proprietățile hidrofile și hidrofobe ale suprafeței sunt importante în studiul biocompatibilității materialelor polimerice [168]. Mobilitatea și flexibilitatea lanțului molecular fac posibilă reorganizarea sa, în scopul creării unei suprafețe bogate în grupări hidrofile și hidrofobe [168]. Acest lucru poate fi de asemenea determinat și prin variația cantității segmentului hard în structura poliuretanilor [169]. Suprafețele solide pot fi caracterizate prin măsurarea unghiului de contact, compus din interacțiile celor trei suprafețe descrise prin ecuația lui Young[170]. În tabelul 11 sunt prezentate valorile unghiului de contact. PU₁ (98°) are o valoare mult mai mică decât PU₂ (122°). Aceste variații pot fi atribuite modificării structurale de la suprafața poliuretanilor [171]. Studii din literatură au arătat o creștere a caracterului hidrofob odată cu creșterea cristalinității poliuretanilor [172]. Rifampicina este considerată un medicament hidrofil, solubil în pH=7,4 (fosfat tampon) [173]. În tabelul 11 sunt prezentate valorile unghiului de contact obținute pentru poliuretani simpli și poliuretani cu rifampicină. Se observă o scădere ușoară a unghiului de contact pentru poliuretani cu rifampicină, datorită probabil a concentrației mici de rifampicină în poliuretan.

Energia liberă la suprafață (γ_{SV}), a fost determinată prin măsurarea unghiului de contact cu apa bidistilată și etilen glicol. Aceasta este o mărime care este descrisă de două componente: cea polară (γ_{SV}^p) care include două tipuri de interacții dipol-dipol și dipol- dipol indus și cea dispersă (γ_{SV}^d) reprezentată de interacțiile van der Waals [174]. Valorile energiei libere de suprafață (γ_{SV}), cât și a celei polare (γ_{SV}^p) și disperse (γ_{SV}^d) au fost obținute conform metodei Owens-Wendt-Rabel și Kaelbe [148,170]. Lucrul de adeziune (W_a), componentă dispersa (γ_{SV}^d) și component polară (γ_{SV}^p) ale energiei de suprafață se regăsesc în tabelul 11. În urma rezultatelor obținute se observă o scădere a componentei polare și a lucrului de adeziune, odată cu creșterea componentei disperse și concentrației în uretan pentru poliuretanul PU₂.

Pe de altă parte, o scădere în valorile unghiului de contact și o creștere în energia liberă la suprafață și a lucrului de adeziune pentru ambii poliuretani cu rifampicină, poate fi atribuită interacțiilor dintre rifampicină și carbonilul grupeii uretanice din matricea polimeră. În plus, în urma scăderii unghiului de contact, udarea suprafeței este mult mai bună.

Udarea poate influența eliberarea rifampicinei astfel încât eliberarea mai rapidă poate preveni adeziunea inițială a bacteriei datorită efectului antiseptic (mai mic decât concentrația terapeutică a medicamentului) [162]. În funcție de valorile unghiului de contact se va observa o cantitate mai mare de eliberare a rifampicinei pentru PU₁-R în comparație cu poliuretanul PU₂-R cu rifampicină.

Tabel 11. Unghiul de contact cu apa bidistilată, lucrul de adeziune, energia liberă la suprafață și componentele disperse și polare ale măsurătorilor energiei libere la suprafață

Probe	θ (°)	W_a mN/m	γ_{SL} mN/m	γ_{SV} mN/m	γ_{SV}^d mN/m	γ_{SV}^p mN/m
PU ₁	98,0	62,6	31,9	19,6	2,2	19,6
PU ₂	112,0	45,5	47,0	28,8	0,1	28,6
PU ₁ -R	90,0	72,8	31,9	31,9	2,3	29,5
PU ₂ -R	104,8	54,1	47,7	43,0	0,2	42,7

IV.7.4. Microscopia de forță atomică (AFM)

În imaginile de microscopie de forță atomică s-au analizat topografia suprafeței membranelor poliuretanilor și a poliuretanilor cu rifampicină (Figura IV.46). S-au obținut imagini tridimensionale cu modificări pe suprafața acestora, indicându-se posibilele interacții dintre gruparea uretanică și rifampicină. Factorul de rugozitate pentru PU₁-R este de 1,0366 și pentru PU₂-R este de 1,00781. Astfel, suprafața PU₂-R este mai netedă decât suprafața lui PU₁-R. Acest lucru poate fi explicat prin simplu fapt că o suprafață mai rugoasă constituie o arie mai mare pentru eliberare și suportă astfel ideea influenței suprafeței în eliberarea medicamentului [175].

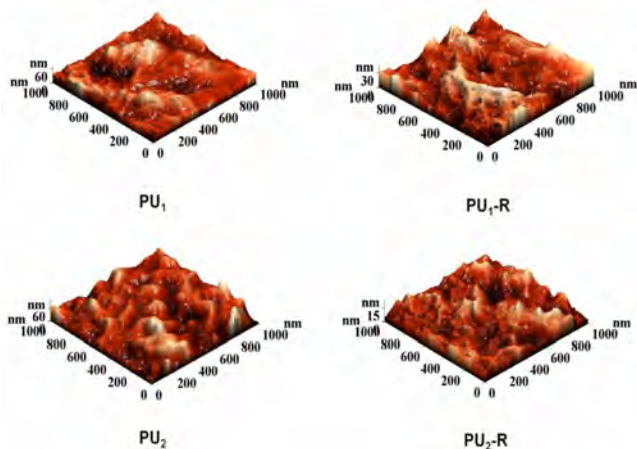
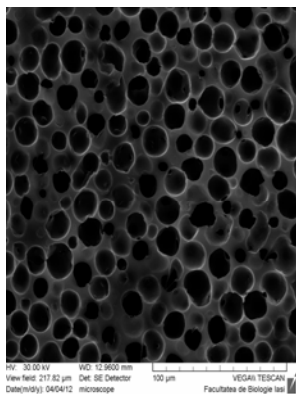


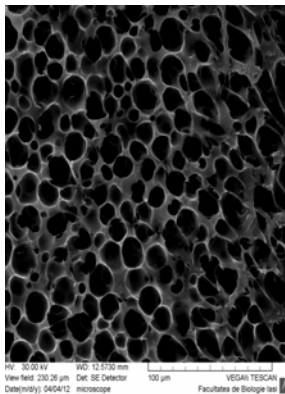
Figura IV.46. Imaginile AFM pentru PU₁, PU₂, PU₁-R, PU₂-R

IV.7.5. Microscopia electronică de baleiaj (SEM)

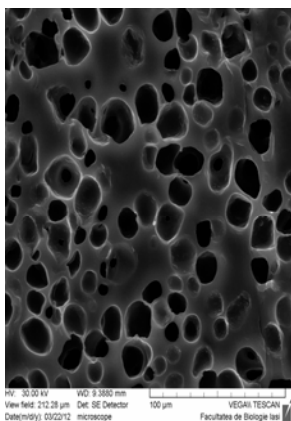
Suprafețele secțiunilor pentru membranele cu rifampicină înainte și după eliberare sunt prezentate în Figura IV.47. Mecanismul de pătrundere a apei prin membranele microporoase este complex, în comparație cu un transport simplu a moleculelor de apă prin diverse microcapilare. Membranele poliuretanică cu rifampicină analizate în secțiune prin microscopie electronică de baleiaj prezintă pori interconectați, de diferite dimensiuni. Astfel, datorită porilor mari, mecanismul care guvernează difuzia poate fi cel Fickian iar eliberarea cineticii de tip zero nu poate fi atinsă [176].



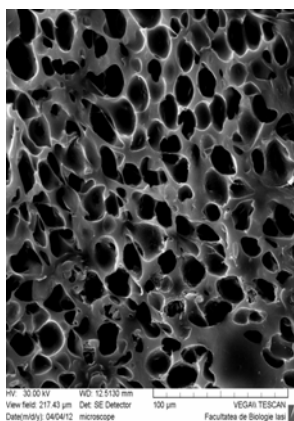
(A)



(B)



(C)



(D)

Figura IV.47. Imaginile SEM în secțiune pentru PU₁-R înainte și după eliberare (A) (B) și PU₂-R înainte și după eliberare (C) (D)

IV.7.6.Studiul eliberării *in vitro*

Comportamentul de eliberare a rifampicinei din membranele poliuretane a fost studiat în tampon fosfat pH=7,4 la 37°C (Figura IV.48). Profilurile de eliberare pentru cei doi poliuretani cu rifampicină PU₁-R și PU₂-R sunt similare, în prima etapă se observă un “burst” inițial fiind urmată de o eliberare prelungită a rifampicinei din membranele poliuretane. Eliberarea acestora se datorează, pe de o parte de concentrația în grupările uretanice; pentru poliuretanul PU₁-R se eliberează o cantitate mai mare decât pentru PU₂-R. În urma analizei de regresie liniară pentru experimentele cu rifampicină în intervalul 48-216 h se observă că în cazul PU₁-R se eliberează 0,0142 μg/mL în timp ce PU₂-R eliberează doar 0,0121 μg/mL, sugerând astfel o eliberare susținută a rifampicinei din matricea poliuretanică. Valorile obținute în urma eliberării sunt mult mai mari decât concentrația minim inhibitoare a rifampicinei pentru bacteriile Gram-pozitive [177,178]. Efectul unei eliberări prelungite pentru cazul concentrației în uretan de 2,5 mmol.g⁻¹ a fost observat și la eliberarea nistatinei [142].

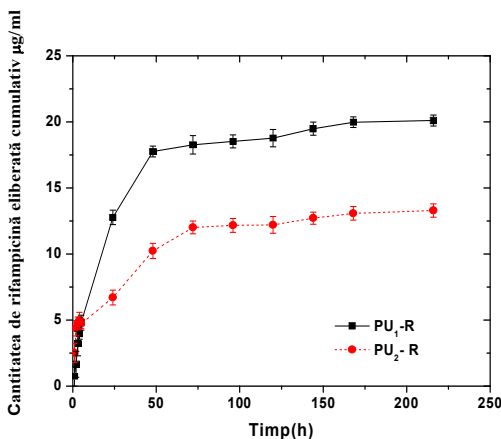


Figura IV.48. Curba de eliberare a rifampicinei din PU₁-R și PU₂-R

IV.7.9.Activitatea antibacteriană

Eliberarea rifampicinei din membranele poliuretane, în primele momente (1 oră), asigură o concentrație de medicament, mult mai mare decât concentrația minim inhibitoare pentru bacteriile gram pozitive (mai mică decât 0,008 μg/mL pentru meticilin-resistent *S.aureus* (MRSA) și <0.0016 μg/mL decât *S. epidermidis* RP 62 A prezentate în Figura IV.50 [177, 178]. Concentrația minim inhibitoare a rifampicinei împotriva *P.Aeruginosa* a fost determinată prin metoda diluțiilor în mediu lichid, fiind de 9 μg/mL. Diametrul zonei de inhibiție a rifampicinei a fost evaluat prin testul “plate transfer”. Efectul antibacterian s-a

menținut pe o durată de 9 zile, printr-o difuzie lentă a rifampicinei, dar suficient de activă în cazul *S.epidermidis*. Toate membranele cu rifampicină se caracterizează printr-un diametru al zonei de inhibiție, măsurată pe plăcile Petri acoperite cu *S.epidermidis* și *P.Aeruginosa*, în timp ce la martor (poliuretanul fără medicament), nu s-a observat apariția acestei zone de inhibiție. Rifampicina este un antibiotic mai puțin activ împotriva bacteriilor negative, precum *E.coli*, în timp ce speciile de *Pseudomonas Aeruginosa* sunt intrinsec rezistente la rifampicină [183]. Cu toate acestea, după cum se poate observa din profilele de inhibiție prezentate în Figura IV.50, diametrul zonei de inhibiție pentru PU₁-R este mult mai mare decât PU₂-R pentru cele două bacterii studiate. Studiul de eliberare a rifampicinei, din amestecurile cu cei doi poliuretani este în corelație cu diametrul zonei de inhibiție a membranei cu rifampicină, o zona de inhibiție mai mare în cazul poliuretanului PU₁-R față de cazul PU₂-R.

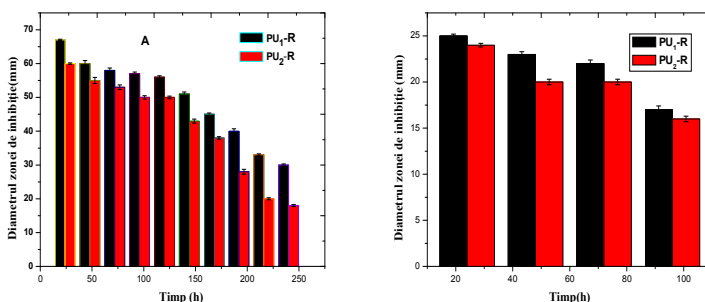


Figura IV.50. Diametrul zonei de inhibiție pentru PU₁-R și PU₂-R împotriva A) *S. Epidermidis* B) *P. Aeruginosa*

IV.8. Obținerea membranelor poliuretani – nistatină

Prepararea membranelor poliuretani-nistatină

Au fost obținute un număr de patru membrane poliuretane încărcate cu nistatină conform metodelor descrise în capitolul III. Concentrațiile medicamentului în membrane după separarea, spălarea și uscarea acestora au fost de :1,6%, 4,1%, 7,9%, 11,9% pentru PU₁-N și 1,8%, 4,7%, 9,1%, 13,3% pentru PU₂-N, respectiv.

IV.8.1. Analiza structurală a sistemelor poliuretani-nistatină

Poli(ester-eter) uretanii și membranele poliuretane cu nistatină au fost caracterizate prin spectroscopie ATR-FTIR. Comparațiile dintre spectrele ATR-FTIR ale poliuretanilor și ale membranelor poliuretane cu diferite concentrații de nistatină sunt reprezentate de Figurile IV.51, IV.52. O primă constatare este aceea a suprapunerii benzilor de absorbție ale nistatinei cu cele ale poliuretanilor. Astfel, benzile de absorbție caracteristice poliuretanului ester-eter aromatic se regăsesc aproximativ la același număr de undă la ambii polimeri, diferența

constând în principal în raportul absorbanelor $A_{C=O \text{ liber}}/A_{C=O \text{ legat}}$ din intervalul 1800-1628 cm^{-1} . Dacă la PU_1 absorbanta carbonilului uretanic legat este la 1712 cm^{-1} aceasta este mai accentuată pentru poliuretanul al doilea la 1701 cm^{-1} , datorită creșterii concentrației în grupări uretanice de la 1,5 mmol.g^{-1} la 2,5 mmol.g^{-1} și a prezenței separărilor de fază [140,142].

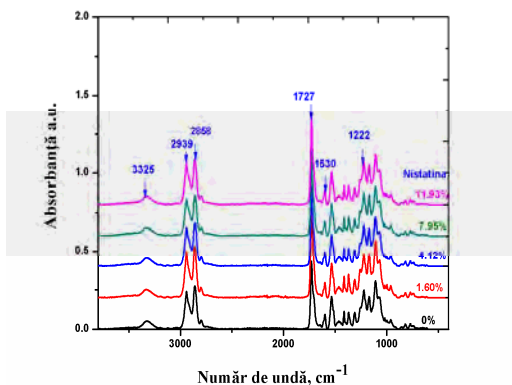


Figura IV.51. Spectrele ATR-FTIR PU_1 și PU_1 -Nistatină (diferite concentrații)

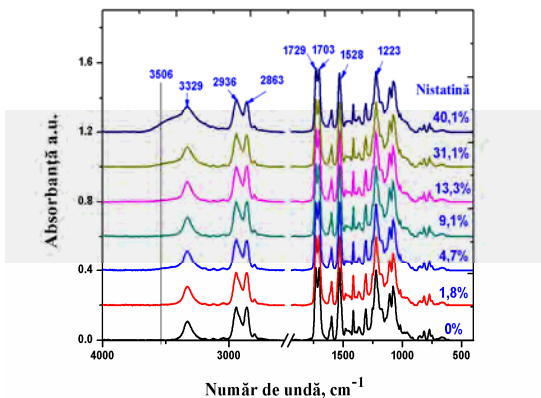


Figura IV.52. Spectrele ATR-FTIR PU_2 și PU_2 -Nistatină (diferite concentrații)

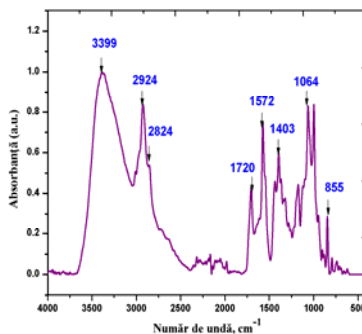


Figura IV.53. Spectrul ATR-FTIR Nistatină

Benzile corespunzătoare lungii de undă de 3325 și 3329 cm^{-1} sunt produse de vibrația de întindere caracteristică $\nu(\text{N-H})$ legat. Picurile de la 2939, 2858 și 2936, 2863 cm^{-1} sunt reprezentate de vibrațiile caracteristice de întindere asimetrice și respectiv simetrice ale grupării $\nu(\text{CH}_2)$ [3]. Vibrația de întindere a grupării carbonil se regăsește la 1727 și 1729 cm^{-1} aparținând lanțului poliesteric și grupărilor uretanice libere, iar picurile de la 1712 și respectiv 1701 cm^{-1} aparțin vibrațiilor de întindere ale grupărilor carbonil din structurile uretanice legate prin legături de hidrogen [140].

Spectrul ATR-FTIR al nistatinei (Figura IV.53) prezintă maxime ale benzilor de absorbție situate la : 3399 cm^{-1} - datorită vibrației de întindere a hidrogenului legat; la 2924, 2824 cm^{-1} apare vibrației de întindere asimetrică CH_2 ; la 1720 cm^{-1} se regăsește vibrația de întindere a carbonilului de la ester și acidul carboxilic; picurile de la 1572, 866 cm^{-1} , sunt corespunzătoare dublei legături $\text{CH}=\text{CH}$; la 1403 cm^{-1} apare vibrației de deformare $\nu(\text{-CH})$ iar la 1064 cm^{-1} datorită grupărilor hidroxil din nistatină [184,185,186]. Aceste benzi de absorbție se suprapun peste benzile de absorbție din poliuretanii PU_1 respectiv PU_2 , care au aceleași tip de grupări și vibrează la aceeași lungime de undă. Din această cauză, banda de absorbție de la 3506 cm^{-1} (reprezentată de hidrogenul liber al grupării -NH-COO- sau -OH și -COOH de la nistatină), este foarte bine definită în spectrul blendurilor asociat blendurilor PU_2 -nistatină la concentrațiile de 30% și 40%. Pentru concentrațiile în nistatină mai mici de 30%, hidrogenul se leagă de grupările polare din carbonilul esterului, uretanului și eterului, fenomen ce accentuează compatibilitatea dintre cei doi compuși odată cu formarea unor blenduri bine structurate.

IV.8.2. Analiza termică (DSC)

În acest experiment, temperatura de tranziție sticloasă (T_g) furnizează informații legate de interacțiile dintre lanțurile poliuretanice și nistatină (Figura IV.54). Creșterea valorii

Tg-ului conduce la formarea legăturilor de hidrogen dintre medicament și poliuretani [186], medicamentul jucând rolul de antiplastifiant [187]. Temperaturile de tranziție la PU₁, PU₂ și amestecurile formate cu nistatină sunt prezentate pe curbele din figura IV.54.

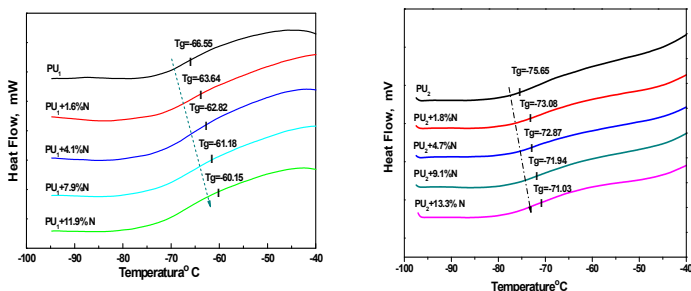


Figura IV.54. Curbele DSC pentru PU₁, PU₂ și amestecuri cu diferite concentrații de nistatină

Valoarea mai mică a Tg-ului pentru poliuretanul PU₂ în comparație cu PU₁, se datorează diferenței în concentrația de grupări uretanice. Primul poliuretan conține 1,5 mmol.g⁻¹ iar cel de-al doilea conține numai 2,5 mmol.g⁻¹ grupe uretanice. Fenomenul se datorează separării de faza amorf-cristalin, care este întâlnită la poliuretani, atunci când concentrația în structuri uretanice depășește 2 mmol.g⁻¹ [140]. Valorile Tg cresc odată cu proporția de nistatină din matricea polimeră, ceea ce arată că nistatina structurează, prin legăturile de hidrogen, macromoleculele poliuretanului. În urma interacțiilor fizice formate, macromoleculele își modifică conformația iar materialul poliuretan-nistatină devine mai rigid, fapt evidențiat de o ușoară creștere a temperaturii de tranziție sticloasă cu nistatina încorporată.

IV.8.3. Analiza suprafeței

IV.8.3.1. Microscopie electronică de baleiaj (SEM)

Prin imaginile SEM s-a observat o schimbare în aspectul suprafeței membranei, reflectată în totalul și dimensiunea porilor atât de la suprafață cât și în secțiune. Poliuretani PU₁ și PU₂ prezintă un aspect macroporos în secțiune. Nistatina modifică numărul porilor, prin schimbarea parametrilor transferului de masă solvent-apă, în matricea polimeră, în faza de formare a membranei. În Figurile IV.55-57 se prezintă comparativ imaginile SEM ale sistemelor poliuretani și amestecurilor sisteme poliuretani-nistatină. În urma acestui studiu s-a observat că mai mult de 60% din porii membranei au un diametru mediu mai mic decât 10 μm și 12,5 μm pentru PU₁ sau PU₂ și mai puțin de 17,05 μm și 17,9 μm pentru PU₁-N, sau PU₂-N. Fotografiele arată o bună distribuție a porilor în membrana poliuretanică formată,

prezentând pori interconectați cu o medie de 40-70%. În principiu, procesul eliberării de medicament este controlat de influența concentrației în grupări uretanice ale poliuretanilor, dar și de dimensiunea porilor membranei. Poliuretanul cu concentrația în grupări uretanice de $1,5 \text{ mmol.g}^{-1}$ determină o eliberare rapidă a nistatinei, fapt dovedit experimental. Se observă, de asemenea, că prezența nistatinei determină închiderea porilor la suprafața membranei, indiferent de concentrația acesteia. Acest lucru este cunoscut, deoarece în cazul medicamentelor insolubile în apă, formarea porilor în matrice este foarte limitată [117]. În schimb secțiunile prin membrană relevă pori de diametru mai mare și mai uniformi distribuiți în masă acesteia față de membrana încărcată cu medicament (figurile IV.58, 59). Medicamentul localizat în cantitate mare pe suprafața membranelor explică și „burstul effect” pronunțat observat pe curbele cinetice de eliberare, în primele momente ale procesului (cap.IV 8.4).

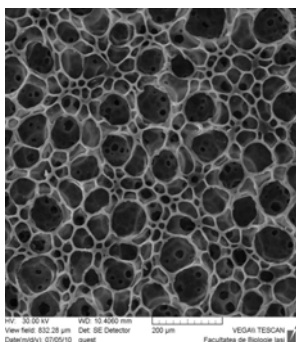
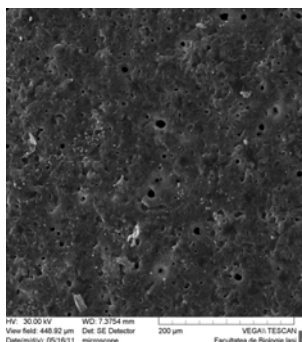


Figura IV.55 PU₁



PU₁+ 11.93% N

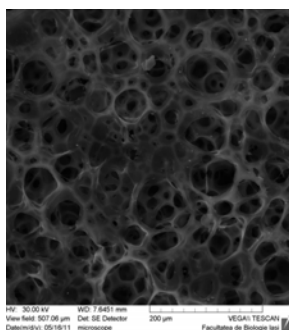
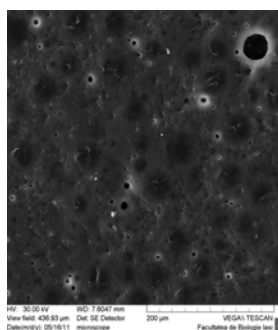


Figura IV.56. PU₂



PU₂+13,3% Nistatină

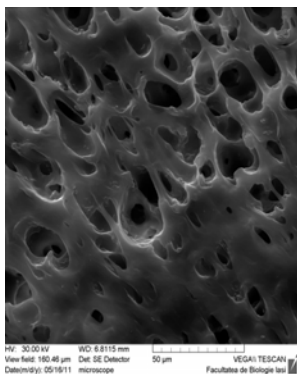
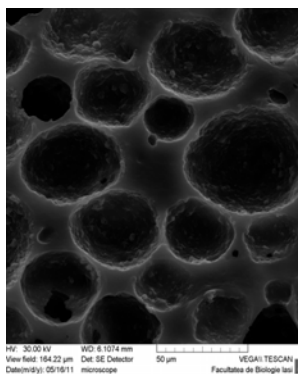


Figura IV.58. PU₁(secțiune)



PU₁+11,9% nistatină (secțiune)

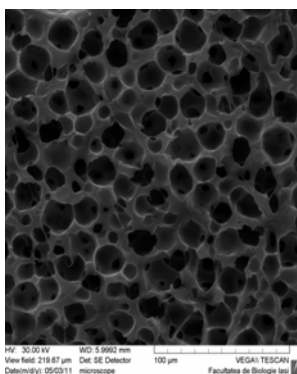
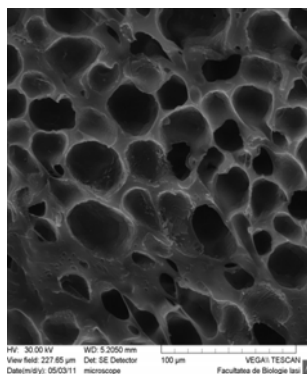


Figura IV.59 PU₂ (secțiune)



PU₂ +9.1% nistatină (secțiune)

IV.8.4 Studiul *in vitro* de eliberare

O caracteristică importantă a sistemelor de eliberare a medicamentului constă în modul de eliberare în organism. Pentru sistemele studiate membranele poliuretaneice au fost imersate în mediu biologic (pH=7,4 la 37°C) (Figura IV.62). Eliberarea nistatinei din membranele poliuretaneice s-a realizat timp de 216 ore pentru ambele tipuri de sisteme (PU₁-N, respectiv PU₂-N). În ambele cazuri, viteza de eliberare a nistatinei crește cu concentrația acesteia în membrane.

Profilul de eliberare pentru cei doi poliuretani se caracterizează printr-un „burst” inițial de eliberare, urmat de o eliberare prelungită a nistatinei din matricea poliuretanică. Eliberarea este puternic influențată de concentrația în grupări uretanice.

De exemplu din sistemul poliuretan-nistatină PU₁-N se eliberează 10,53 µg/mg după 216 ore iar pentru sistemul poliuretan-nistatină PU₂-N se eliberează doar 5,85 µg/mg. Eliberarea

mai lentă întâlnită în cazul sistemului PU₂-N, se datorează pe de o parte concentrației mai mici a grupelor uretanice din polymerul matricei, dar și datorită prezenței interacțiilor mai puternice de tipul legăturilor de hidrogen dintre nistatină și poliuretan. PU₁-N are concentrația în grupări uretanice de 40% mai mică decât în sistemul PU₂-N.

Se poate concluziona astfel că o concentrație mare de grupări uretanice în matricea poliuretanică nu favorizează eliberarea unei cantități mari de nistatină din sistemele obținute.

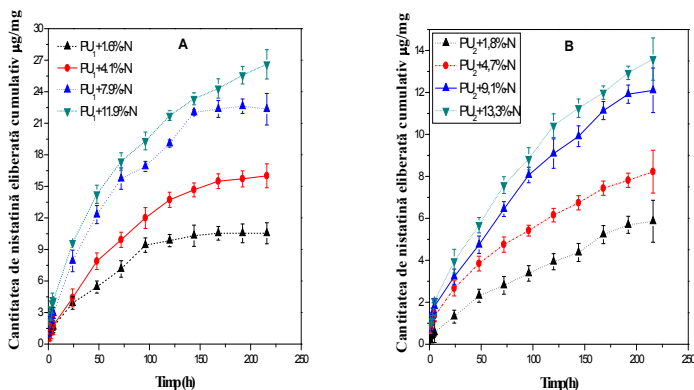


Figura IV.62. Eliberarea nistatinei în timp A) PU₁-N și B) PU₂-N cu diferite proporții de medicament (pH=7,4)

Tabel 13. Eliberare medicament *in vitro* din sistemul PU₁-N and PU₂-N în pH=7,4

Probe	Cantitate de nistatină μg /mg	Eliberarea nistatinei pH 7,4, 216 ore Cinetica de eliberare cu ecuația Korsmeyer-Peppas		
		μg /mg	k	n
PU ₁ -N	16,0976	10,53±1,00	0,0668	0,5257
	41,2813	16,00±1,14		
	79,5186	22,34±1,50		
	119,3217	26,60±1,40		
PU ₂ -N	18,0899	5,85±1,00	0,0660	0,5275
	47,2706	8,22±1,50		
	91,4805	12,10±1,06		
	133,9153	13,58±1,01		

IV.8.6 Studiul *in vitro* al activității antifungice

Activitatea antimicrobiană a membranelor poliuretan- nistatină a fost evaluată cu *Candida albicans*, o bacterie care provoacă infecții atât la nivel dermic cât și la nivelul cateterelor vasculare. Zonele de inhibiție determinate de membranele cu diferite concentrații în nistatină, pe această cultură bacteriană sunt prezentate în tabelul 14. La o eliberare de 2,8 μg /mg nistatină la 72 de ore, din sistemul PU₂-N, zona de inhibiție este de 12,2 mm, iar pentru o eliberare de 7,6 μg /mg probă, zona de inhibiție ajunge la 25,3 mm. Toate membranele cu nistatină studiate au zonele de inhibiție cuprinse între 12 -25 mm (Tabel 14). S-a observat că odată cu creșterea concentrației de nistatină în membrană, crește și zona de inhibiție.

Această inhibiție nu are un parcurs liniar comparativ cu creșterea concentrației de nistatină, pe de o parte datorită interacțiilor fizice dintre nistatină și poliuretan dar și a difuziei diferite a nistatinei în agar (suportul utilizat pentru dezvoltarea culturii microbiene) [189].

Tabel 14. Activitatea antifungică a membranelor poliuretan-nistatină prin metoda difuziei în agar

Probe	Zona de inhibiție, 72 h mm $\pm$ SD	Eliberare $\mu\text{g}/\text{mg}$ probă la 72 h
PU ₂ (2,8 $\mu\text{g}/\text{mg}$)	12,2 $\pm$ 0,4	2,8
PU ₂ (4,75 $\mu\text{g}/\text{mg}$)	15,4 $\pm$ 0,5	4,75
PU ₂ (6,44 $\mu\text{g}/\text{mg}$)	23,5 $\pm$ 0,2	6,44
PU ₂ (7,58 $\mu\text{g}/\text{mg}$)	25,3 $\pm$ 1,0	7,6
Nystatin, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$	28,1 $\pm$ 0,2	-
DMSO	-	-

CAPITOLUL V

Sisteme poliuretane–principiu activ pe bază de poli(butilen adipat) diol și poli(etilen glicol)

O aplicație biomedicală a materialelor poliuretane obținute sub formă de film, membrană, geluri sau nanofibră constă în realizarea unor sisteme de eliberare susținută pentru prevenirea diferitelor tipuri de infecții. Membranele poliuretane pot fi poroase sau neporoase [190,191], dimensiunea porilor și interconectivitatea lor având o influență semnificativă atât în procesul de eliberare a medicamentelor cât și pentru proliferarea și creșterea celulară. Transportul medicamentului prin membrană depinde de difuzia medicamentului prin aceasta, datorită fie cantității de medicament, fie solubilității acestuia în mediul de eliberare [192]. Astfel, atenția este îndreptată spre obținerea de sisteme care să elibereze medicamentele într-o manieră controlată și prelungită [193]. Poli (etilen glicol)ul este un polimer hidrofil, solubil în apă, cu excelente proprietăți: este noncitotoxic, biocompatibil, non-imunogenic și foarte des utilizat în aplicațiile biomedicale [194]. Diverse studii pentru prevenirea infecțiilor de pe implanturi au folosit în structura poli (etilen glicol)-ul de diferite mase moleculare, pentru obținerea unei eliberări prelungită [195].

În funcție de aceste aspecte, în acest capitol s-a propus sinteza unor poliuretani pe bază de poli(etilen glicol) și poli(butilen adipat) diol, cu două concentrații în grupe uretanice specifice $1,5 \text{ mmol.g}^{-1}$ și $2,5 \text{ mmol.g}^{-1}$ precum și, obținerea unor sisteme de eliberare prelungită în vederea utilizării lor în prevenirea infecțiilor de la nivelul cateterelor sau a pielii. Capitolul este consacrat sintezei poliuretanilor pe bază de poli(etilen glicol) și obținerii de membrane poliuretane cu principii active: rifampicină și nistatină. Scopul urmărit privind studiile efectuate asupra sistemelor membrană poliuretanică/medicament a constat în stabilirea influenței concentrației în grupe uretanice asupra eliberării principiului activ, biocompatibilității și hemocompatibilității acestor materiale în vederea unor potențiale bioaplicații.

V.1. Reacția de sinteză

Poliuretanii sintetizați din poli(etilen glicol), poli (butilen adipat) diol, 4, 4 diizocianat de difenil metan și butilen glicol cu rapoartele molare de 0,875:0,125:2:1 și 0,875:0,125:4:3 iar concentrația în uretan $1,5 \text{ mmol.g}^{-1}$ și $2,5 \text{ mmol.g}^{-1}$. Masele molare pentru cei doi poliuretani sunt 56,750 Da, respectiv 71,960 Da, iar polidispersitatea este de 1,339 respectiv 1,379.

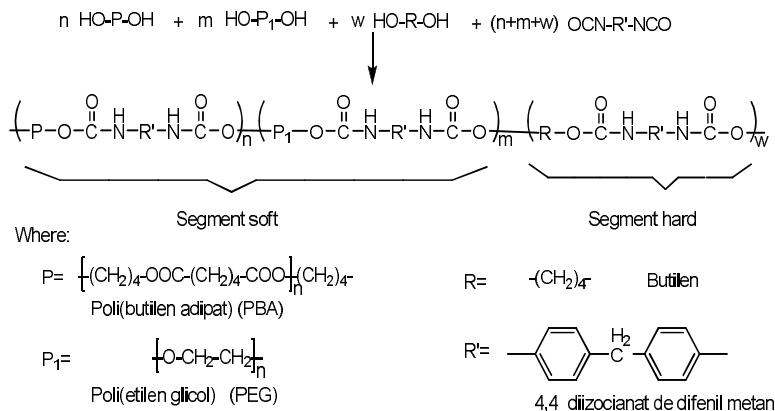


Figura IV.63. Schema de sinteză a poliuretanilor

V.3. Absorbția de apă

Absorbția de apă a membranelor poliuretaneice este prezentată în Figura V.66. O umflare continuă a matricei polimere permite o difuzie susținută a moleculelor de principiu activ în membrană, în procesul de încărcare. Gradul de umflare descreește de la 32% la 24% odată cu creșterea concentrației în grupe uretanice de la 1,54 mmol.g⁻¹ la 2,44 mmol.g⁻¹ (Figura V.66). În concluzie deoarece PU₄ se umflă mai puțin decât PU₃, eliberarea medicamentului urmează să fie mai rapidă pentru PU₃ încărcat cu medicament.

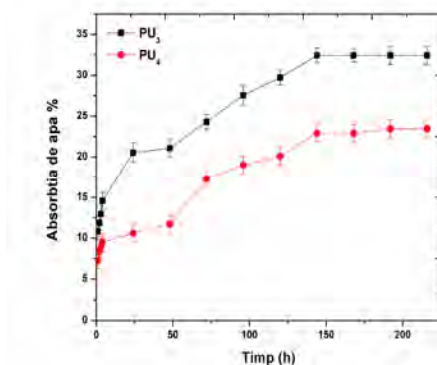


Figure V.66. Variația în timp a gradului de umflare al membranelor poliuretaneice

V.4. Test de hemocompatibilitate

În scopul aplicării poliuretanilor studiați, pentru prevenirea infecțiilor de la nivelul cateterelor sau a pielii s-a analizat comportamentul membranelor poliuretaneice obținute în contact cu sângele uman. Principal, interacțiile nefavorabile ale unor materiale cu componentele sângelui conduc la modificări în proprietățile plasmei sângelui, în urma incubării acestuia cu aceste materiale. O creștere a timpului de coagulare descrie interacția dintre membranele poliuretaneice cu adsorbția de proteină și adeziunea plachetară conducând la formarea unor suprafețe trombogene, cum au fost observate în alte sisteme [196]. În studiul nostru, valorile obținute pentru timpul Quick (timp de coagulare), timpul parțial de tromboplastină (APTT) și pentru timpul de prototrombină (PT) sunt prezentate în tabelul 15.

Timpul de coagulare (Quick) și timpul de tromboplastină sunt foarte des determinate în testele de coagulare. Ele permit evaluarea *in vitro* a coagulării, testând în principal calea extrinsecă de coagulare prin timpul Quick și calea intrinsecă de coagulare prin timpul de tromboplastină.

Timpul de prototrombină reflectă la fel eficacitatea sistemului extrinsec. El este sensibil la variațiile factorilor de coagulare din complexul prototrombic (factorul I (fibrinogen) V, VII et X). În valorile obținute nu se observă diferențe majore în comparație cu controlul, reprezentat de sângele uman. Aceste nemodificări în plasma sangvină în prezența poliuretanilor cu sângele, s-au semnalat de asemenea și în alte studii din literatură [199].

Tabel 15. Proprietăți de coagulare

Poliuretani	TQ(s)	APPT(s)	PT (s)
Control (sânge înainte de incubare)	12,4±0,3	28,6±0,3	11,8±0,3
Control (sânge după incubare)	13,4±0,3	27,6±0,3	12,0±0,5
PU ₃	13,2±0,2	27,8±0,5	11,6±0,4
PU ₄	12,6±0,6	27,6±0,7	11,8±0,4
Valori de referință	11-14	26-40	11-13,5

V.5. Teste de biocompatibilitate

Biocompatibilitatea membranelor poliuretaneice a fost evaluată prin testul MTT, care are ca reactant sarea de tetrazoliu. Au fost utilizate celule fibroblaste din dermul uman. Este știut din literatură că această metodă de testare a viabilității celulare este frecvent aplicată pentru testarea toxicității punând în evidență activitatea metabolică a culturilor de celule [198]. Rezultatele obținute, împreună cu studiul morfologiei suprafeței certifică biocompatibilitatea

materialelor poliuretane studiate. În figura V.67 se prezintă rezultatele obținute în urma testului de viabilitate celulară.

Membranele poliuretane sunt necitotoxice în contact cu celulele umane. Mai mult de 80% din viabilitatea celulară a fost obținută în urma testului de analiză, după intervalul de timp 24, 48 și 72 de ore, în urma incubării materialelor cu celule. Cel mai mare nivel de viabilitate celulară a fost observat la poliuretanul PU₄ de aproximativ 100% (Figura IV.67). Morfologia celulară este reprezentată de celulele fibroblaste umane fixate cu ajutorul protocolului de hematoxinil-eozină, (Figura V.68). Se poate observa, astfel forma normală a fibroblastelor în ambele culturi de celule incubate cu eșantioanele de poliuretan (PU₃ și PU₄) în comparație cu controlul negativ (celule fibroblaste umane).

Fibroblastele s-au dezvoltat în mediul de cultură cu membranele poliuretane, care nu au avut nici un efect toxic asupra lor. Aceste rezultate împreună cu viabilitatea celulară probează biocompatibilitatea membranelor poliuretane.

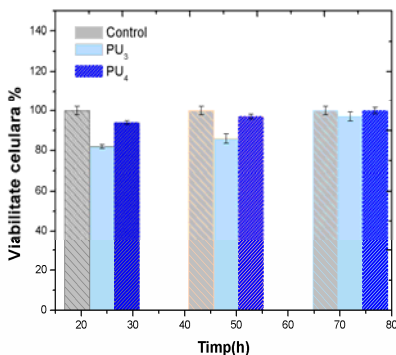


Figura V.67. Viabilitatea celulară obținută prin metoda MTT

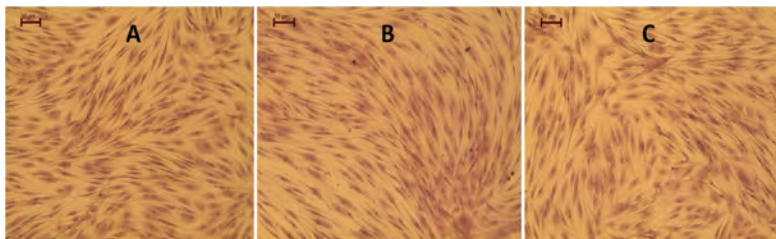


Figura V.68. Microscopie optică a celulelor fibroblaste umane după 72 h (A) Control negativ; (B)PU₃; (C) PU₄

V.6. Obținerea membranelor poliuretane încărcate cu rifampicină

Obținerea membranelor poliuretane încărcate cu rifampicină s-a realizat prin metoda inversiei de fază, precipitare în non-solvent (apa bidistilată). În urma procesului de încărcare, concentrația medicamentului în cele 2 membrane s-a determinat a fi de 2,6% (PU₃-R) respectiv 2,7% (PU₄-R).

V.6.1. Analiza structurală a sistemelor poliuretan-rifampicină

V.6.1.1. Spectroscopie ATR-FTIR

Spectrele ATR-FTIR ale poliuretanilor sintetizați și sistemelor poliuretan-rifampicină sunt prezentate în Figura V.69. Pozițiile fiecărei grupări funcționale ale poliuretanilor sintetizați se suprapun cu benzile rifampicinei. Forma sterică a rifampicinei constă în forma II, forma cristalină amintită în capitolul IV. În figura V.69 sunt reprezentate de benzile de absorbție ale membranelor de poliuretani, precum și ale membranelor de poliuretani cu rifampicină. Rifampicina după cum am observat și în capitolul IV prezintă aceleași benzi de absorbție ca și ale membranelor de poliuretani, vibrând la aceleași lungimi de undă.

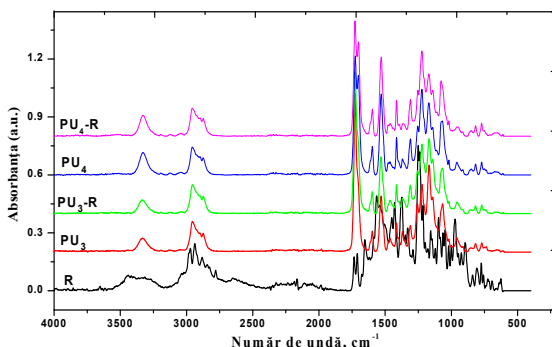


Figura V.69. Spectrele R (Rifampicină), PU₃, PU₄, PU₃-R, PU₄-R

Schimbările spectrale specifice de membranele poliuretane cu rifampicină au fost analizate la nivelul absorbției carbonilului din spectrele cu poliuretani, care pot da informații cu privire la formarea legăturilor de hidrogen [165]. În intervalul carbonilului dintre 1800-1630 cm⁻¹, raportul dintre aria benzii de absorbție a carbonilului liber și cea a carbonilului total (carbonil liber și carbonil legat), în relația ($A_{\text{legat C=O}} : A_{\text{C=O}}$) pentru PU₃ este de 0,872 și PU₃-R de 0,881, respectiv, iar pentru PU₄ este de 0,395 și PU₄-R este de 0,443. Schimbările apărute în structurile poliuretanilor cu rifampicină sunt atribuite prezenței legăturilor de hidrogen formate.

Table 17. Raportul între carbonilul legat și carbonil (liber+legat)

Poliuretani, poliuretani cu rifampicină	C=O ^a legat/C=O ^b
PU ₃	0,872
PU ₃ -R	0,881
PU ₄	0,395
PU ₄ -R	0,443

^aAria (1716-1630 cm⁻¹); ^b Aria (1800-1630 cm⁻¹)

V.6.2. Analiza termică (DSC)

În Figura V.70 sunt prezentate curbele DSC pentru PU₁, respectiv PU₂ cu rifampicină și valorile temperaturii de tranziție sticloasă (T_g). Valorile T_g se regasesc la -33,95 °C și -41,25 °C. Diferența dintre temperaturile de tranziție sticloasă ale PU₄ față de PU₃ se datorează apariției fenomenului de separare de fază, întâlnit și la poliuretani din capitolul IV. Prezența rifampicinei în matricea poliuretanilor determină creșterea temperaturii de tranziție sticloasă, în faza amorfă. Același fenomen pentru o concentrație de 3% de rifampicină în poliuretani a fost studiat și de alți autori [167] , care au constatat că efectul creșterii T_g este în concordanță cu abilitatea rifampicinei de a forma legături de hidrogen [166].

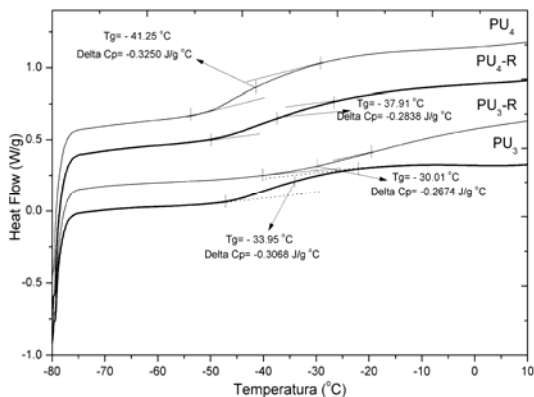


Figure V.70. Curbele DSC pentru PU₃, PU₄, PU₃-R și PU₄-R

V.6.3. Unghiul de contact și determinarea energiei de suprafață

Analiza proprietăților de suprafață ale poliuretanilor este foarte importantă în stabilirea biocompatibilității [199]. Acestea pot fi controlate prin cantitatea de segment „hard” din

structura poliuretanilor. Unghiul de contact are valori diferite pentru fiecare poliuretan și este determinat prin interacția dintre cele trei interfețe descrise de ecuația lui Young [170]. Valorile unghiului de contact pentru membranele poliuretanică și poliuretanică cu rifampicină sunt prezentate în tabelul 18. Hidrofilia scăzută a poliuretanului PU₄ poate fi explicată prin cantitatea de segment „hard” din compoziția sa. De asemenea, rifampicina este considerată un medicament hidrofili [173]. În tabelul 18 valorile obținute pentru unghiul de contact scad ușor odată cu concentrația în rifampicină, evident datorită medicamentului introdus. Lucrul de adeziune și tensiunea liberă la suprafață sunt prezentate în tabelul 18.

Creșterea energiei de suprafață poate fi explicată prin prezența grupărilor funcționale ale rifampicinei. Valorile unghiului de contact pentru poliuretani pot varia, atât, datorită diferenței în structura chimică cât și în configurația suprafeței și desigur medicamentului introdus în matricea polimeră [171]. Din tabelul 18 se poate observa că valoarea unghiului de contact pentru PU₃-R este de 70,26° iar pentru PU₄-R este de 79,94°. În urma acestei metode de analiză o consecință a procesului de eliberare ar fi udarea matricei pentru PU₃-R mai intensă pentru PU₄-R.

Tabel 18. Unghiul de contact, lucrul de adeziune, energia liberă la suprafață și componentele polare și disperse ale energiei de suprafață măsurate.

Probe	Unghiul de contact cu apa θ (°)	Lucrul de adeziune W_a	Energia liberă la suprafață γ_{sv} , (mN/m)	γ_{sv}^p , (mN/m)	γ_{sv}^d , (mN/m)
PU ₃	73,66 ±1,0	93,28	30,166 ±1,1	23,69	6,47
PU ₄	86,77 ±0,5	76,89	21,03 ±1,2	10,91	10,12
PU ₃ -R	70,26 ±1,2	97,38	33,00 ±1,1	26,42	6,58
PU ₄ -R	79,94 ±1,1	85,50	25,10 ±0,9	17,47	7,63

V.6.4 Microscopia electronică de baleiaj (SEM)

Imaginile SEM pentru membranele poliuretan-rifampicină în secțiune, înainte și după eliberare sunt prezentate în Figura V.71. Acestea au fost analizate cu un software Image J versiunea 1.42u (valabil de la Institutul Național de Sănătate din USA), pentru a obține o medie a dimensiunii porilor și a distribuției lor.

Media distribuției porilor pentru fiecare membrană a fost luată din colțul fiecărei imagini pe o suprafață de 200 μm^2 . Considerând diagrama de distribuție a porilor, se constată că membranele poliuretanică analizate înainte și după eliberarea rifampicinei (Figura V.72) prezintă o schimbare în distribuția porilor. Astfel la PU₃-R, proporția porilor cu dimensiunile

2,5 și 7,5 μm^2 scade după eliberare cu 1,72 % respectiv 11,5%, în timp ce proporția porilor cu dimensiunile 25, 35, 45 μm^2 , crește cu un procent de 7%, 2%, respectiv 3%.

Același fenomen se observă și la PU₄-R, numărul porilor cu dimensiunile 15, 25, 35 μm^2 crește cu 3%, 11%, 7%. Acceptând ideea că medicamentul este inclus nu numai în matricea polimeră ci și depus pe suprafața porilor, comportamentul amintit mai sus, poate fi pus pe seama eliberării rifampicinei. Astfel membrana dintre pori devine mai subțire, iar porii mai mari.

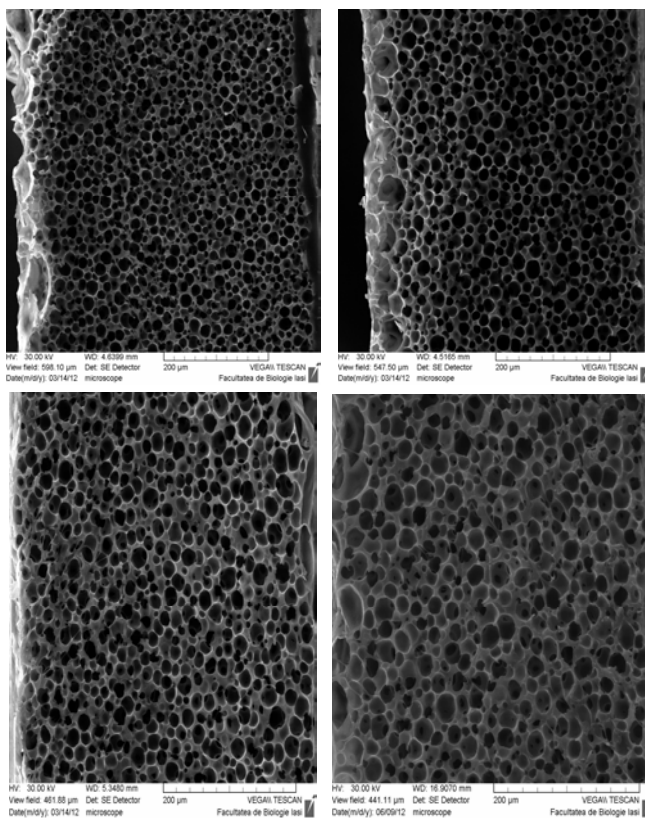


Figura V.71. PU₃-R înainte de eliberarea rifampicinei (A), PU₃-R după eliberarea rifampicinei (B), PU₄-R înainte de eliberare (C), PU₄-R după eliberarea rifampicinei

V.6.5. Microscopia electronică de forță atomică (AFM)

Topografia suprafeței pentru membranele poliuretanică și a poliuretanilor cu rifampicină s-a analizat cu ajutorul microscopiei de forță atomică (Figura V.73). Factorul de rugozitate pentru PU₁-R este de 1,03407 și pentru PU₂-R este de 1,01616 comparativ cu poliuretanii PU₁ (1,05127) și PU₂ (1,03407). Rugozitatea crescută a membranelor cu medicament comparativ

cu a celor lipsite de rifampicină este datorată evident prezenței acestuia depus nu numai pe suprafața porilor ci și pe cea a membranei. Acest lucru poate fi explicat prin simplu fapt că o suprafață mai rugoasă determină o arie mai mare pentru eliberare și conduce astfel la ideea influenței suprafeței în eliberarea medicamentului [175].

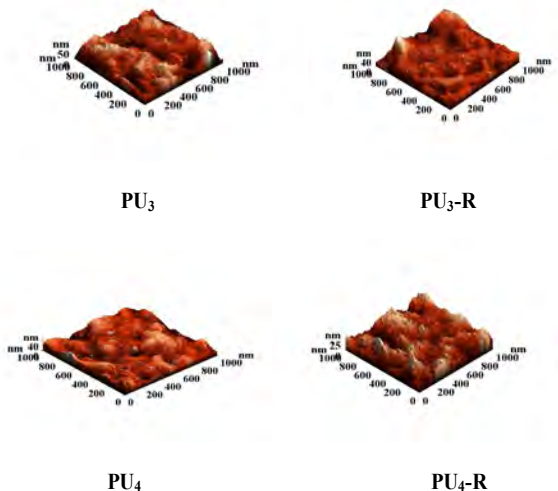


Figura V.73. Imaginile AFM pentru membranele neîncărcate și încărcate cu rifampicină, PU₁,PU₃,PU₁-R, PU₂-R

V.6.6. Eliberarea *in vitro* a rifampicinei

În Figura V.74 este reprezentată eliberarea cumulativă a rifampicinei din matricea poliuretanică în tampon fosfat pH=7,4 la 37°C. În profilul de eliberare al poliuretanilor PU₃-R și PU₄-R se observă un „burst effect” inițial de eliberare urmat de o eliberare îndelungată a rifampicinei din membrană. Eliberarea este dependentă în principal de concentrația în grupările uretanice : pentru poliuretanul PU₃-R este semnificativ mai mare, decât pentru PU₄-R (Figura V.74). Deoarece PU₃ se umflă mai puțin decât PU₄ eliberarea medicamentului este mai rapidă decât în cazul PU₄-R. În urma analizei de regresie liniară pentru eliberarea rifampicinei în intervalul 72-216 ore s-a constatat că PU₃-R eliberează 0,0458 μg.mL⁻¹, iar PU₄-R eliberează doar 0,0284 μg.mL⁻¹. Cantitățile eliberate sunt mult mai mari decât concentrația minim inhibitoare (MIC) de către rifampicină pentru bacteriile Gram-pozitive, ca și în cazul poliuretanilor studiați în capitolul IV [177,178]. O cantitate mare de grupări uretanice conduce la o eliberare prelungită a medicamentului. „Burst” efectul care se observă

pe ambele curbe cinetice este datorat, desigur, eliberării încă din primele momente a medicamentului de pe suprafața membranei și a porilor acesteia respectiv din straturile superficiale mai accesibile eliberării în soluția tampon.

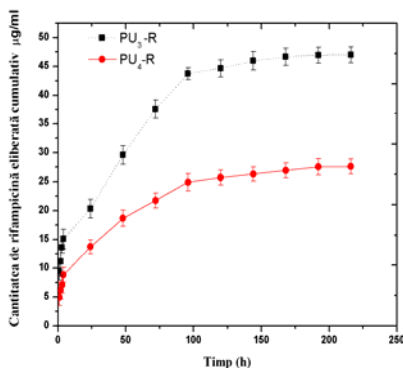


Figura V.74. Curbele cinetice de eliberare a rifampicinei în funcție de timp pentru membranele PU₃-R și PU₄-R

V.6.8. Activitatea antibacteriană

Activitatea antibacteriană a membranelor poliuretane cu medicament, s-a studiat pentru două bacterii, una gram pozitivă *S. Epidermidis* RP 62 A și una gram-negativă *P. Aeruginosa* ATCC 1544, utilizând agarul Muller-Hinton. Figura V.75 prezintă aspectul plăcilor de agar înșămânțate cu cele două culturi microbiene. Cantitatea de medicament eliberată în prima oră este mult mai mare decât concentrația minim inhibitorie importiva bacteriilor gram-pozitive și gram negative amintite în capitolul IV. Diametrul zonei de inhibiție pentru rifampicină a fost evaluat prin transfer de plăci timp de 216 ore. O inhibiție scăzută s-a observat în cazul *P. Aeruginosa*, ceea ce confirmă și rezultatele din literatură, ce atestă rezistența la rifampicină a bacteriei *P. Aeruginosa* [183]. Eliberarea medicamentului este în corelație cu diametrul de inhibiție determinat de poliuretani cu rifampicină. PU₃-R inhibă o cantitate de bacterii mai mare decât PU₄-R. În condiții statice bacteria *S. Epidermidis* se caracterizează printr-o activitate antibacteriană mult mai eficace și mai prelungită decât în cazul bacteriile gam-negative *P. Aeruginosa*.

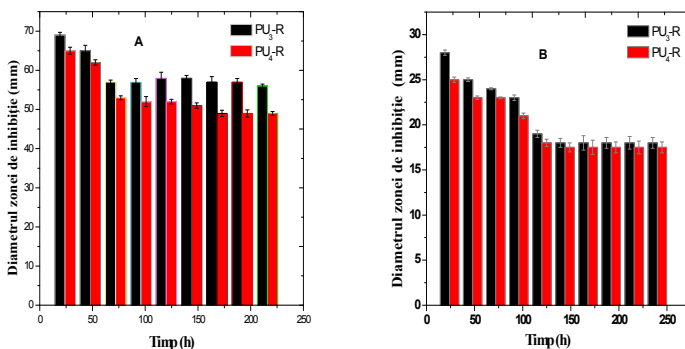


Figura V.75 Diametrul zonelor de inhibiție pentru PU₃-R, PU₄-R cu (A) *S. Epidermidis*, (B) *P. Aeruginosa*

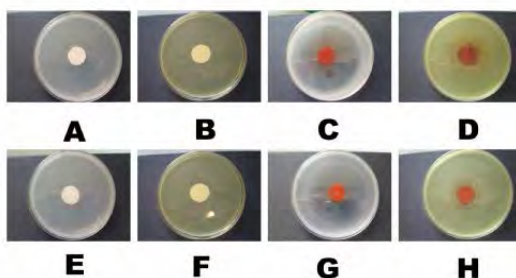


Figura V.76. Fotografii ale plăcilor însămânțate cu culturi microbiene, relevând diametrul zonei de inhibiție a bacteriilor studiate după 96 de ore.

(A) PU₃ și *S. Epidermidis* (B) PU₃ și *P. Aeruginosa* (C) PU₃-R și *S. Epidermidis* (D) PU₃-R și *P. Aeruginosa* (E) PU₄ și *S. Epidermidis* (F) PU₄ și *P. Aeruginosa* (G) PU₄-R și *S. Epidermidis* (H) PU₄-R și *P. Aeruginosa*.

V.7. Obținerea membranelor poliuretani – nistatină

Membranele poliuretane cu nistatină s-au realizat prin procedeul descris la punctul V.6., cel al inversiei de fază. Concentrațiile nistatinei în matricea poliuretanică sunt de 2,6% pentru PU₃-N respectiv 2,7% pentru PU₄-N.

V.7.1. Analiza structurală a sistemelor poliuretani-nistatină

V.7.1.1. Caracterizare prin spectroscopie ATR-FTIR

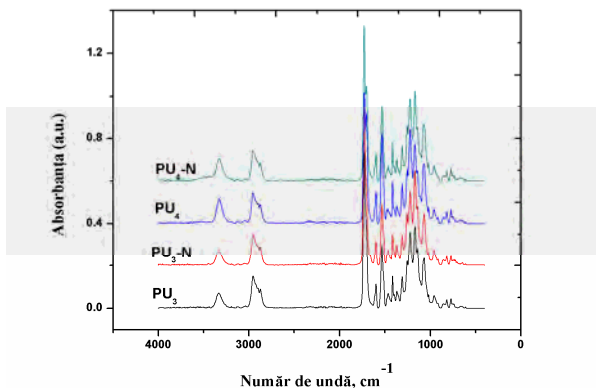


Figura V.77. Spectrele ATR-FTIR al PU₃, PU₄, PU₃-N, PU₄-N

Poliuretanii sintetizați și membranele conținând nistatină sunt prezentate în Figura V.77. Fiecare poziție al grupărilor funcționale pentru poliuretanii sintetizați se suprapune cu benzile nistatinei deoarece nistatina prezintă aceleași benzi de absorbție ca și ale poliuretanilor sintetizați. Modificările în benzile spectrelor determinate de poliuretanii cu nistatină s-au analizat pentru banda de absorbție specifică carbonilului uretanic care oferă informații despre formarea unor legături de hidrogen între cei doi compuși [165].

Pentru intervalul cuprins între 1800-1630 cm⁻¹, raportul dintre aria benzii de absorbție a carbonilului legat și cea a carbonilului total (carbonil liber și carbonil legat), în relația ($A_{\text{legat C=O}} / A_{\text{C=O}}$) este pentru PU₃ de 0,175 și pentru PU₃-N de 0,186, iar pentru PU₄ este de 0,611 și PU₄-R este de 0,722. Aceste diferențe în spectru se datorează evident interacțiilor dintre medicament și nistatină înglobată în matrice.

Tabel 20. Raportul între carbonilul legat și carbonilul (liber+legat)

Poliuretani, poliuretani cu nistatină	$C=O^a \text{ legat} / C=O^b$
PU ₃	0,175
PU ₃ -N	0,186
PU ₄	0,611
PU ₄ -N	0,722

^aAria (1716-1630 cm⁻¹); ^bAria (1800-1630 cm⁻¹)

V.7.2 Analiza termică (DSC)

În Figura V.78 sunt prezentate curbele DSC pentru PU₃, respectiv PU₄ cu nistatină ca și valorile temperaturii de tranziție sticloasă (T_g). Valorile T_g se regăsesc la temperaturi de -38.95 °C și -42.00 °C. Apariția diferențelor dintre temperatura de tranziție sticloasă a PU₃ și PU₄ sugerează, prezența fenomenului de separare de fază [120]. Adăugarea nistatinei în matricea poliuretanică determină o creștere a valorii temperaturii de tranziție sticloasă, fenomen ce exprimă interacțiunile dintre poliuretan și medicament.

Prezența legăturilor de hidrogen între poliuretani și nistatină a fost studiată și la o concentrație de 2% cu aceleași concentrații în grupări uretanice [142].

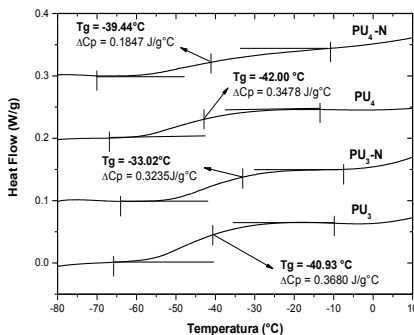


Figura V.78. Curbele temperaturii de tranziție sticloasă pentru PU₃, PU₃, PU₄-N și PU₄-N

V.7.3. Unghiul de contact și determinarea energiei libere

Mobilitatea și flexibilitatea lanțurilor macromoleculare, determină rearanjarea lor pentru a forma o suprafață bogată în grupări hidrofile și hidrofobe [168]. Valorile unghiului de contact pentru membranele poliuretanică și cele încărcate cu nistatină sunt redată în tabelul 21. Interacțiunile polare sunt caracterizate de cele de tip Coulomb dintre dipoli permanenți [200]. Despre interacțiunile de tip „forțe de dispersie” se știe că pot fi cauzate de fluctuațiile în timp, în urma distribuției lor în interiorul moleculelor [200].

Unghiul de contact dintre poliuretani și nistatină scade odată cu introducerea nistatinei în matricea poliuretanică. Când suprafața poliuretanilor cu nistatină este expusă la picătură cu apă, componentele mai polare sunt orientate la suprafață (pentru PU₃-N $\gamma_{pSV} = 29,37$ mN/m iar pentru PU₄-N $\gamma_{pSV} = 25,48$ mN/m).

Această reorientare are ca efect crearea unei suprafețe mai hidrofile, cu o valoare a energiei de suprafață, ($\gamma_{SV} = 34,49$ mN/m) pentru PU₃-N față de PU₄-N ($\gamma_{SV} = 29,18$ mN/m). Unghiul de contact pentru PU₃-N este de 69,3°, iar pentru PU₄-N este de 79,94°, ceea ce ne sugerează o mai mare eliberare a medicamentului în cazul PU₃-N.

Tabel 21. Unghiul de contact, lucrul de adeziune, energia liberă la suprafață și componentele polare și disperse ale energiei de suprafață măsurate pentru două membrane polimere libere și încărcate cu nistatină.

Poliuretani, poliuretani cu nistatină	Unghiul de contact cu apa θ (°)	Lucrul de adeziune W_a mN/m	Energia liberă la suprafață, γ_{sv} , mN/m	γ_{sv}^p , mN/m	γ_{sv}^d , mN/m
PU ₃	73,66 ±1,0	93,28	30,166 ±1,1	23,69	6,47
PU ₄	86,77 ±0,5	76,89	21,03 ±1,2	10,91	10,12
PU ₃ -N	69,3±0,55	97,38	34,49 ±1,1	29,37	5,11
PU ₄ -N	79,94±0,49	85,50	29,18 ±0,9	25,48	3,70

V.7.4. Eliberarea *in vitro* a nistatinei

În Figura V.79 este reprezentată eliberarea cumulativă a nistatinei din matricile poliuretaneice în tampon fosfat pH=7,4 la 37°C. Profilul de eliberare al PU₃-N și PU₄-N se caracterizează printr-un “burst effect” inițial urmat de o eliberare prelungită a nistatinei din membrană poliuretanică. Fenomenul poate fi explicat prin faptul că medicamentul difuzează într-o primă etapă din straturile superficiale ale materialului, din porii acestuia. Eliberarea nistatinei este dependentă în principal de concentrația în grupările uretanice: pentru poliuretanul PU₃-N este semnificativ mai mare decât pentru PU₄-N (Figura V.77). Deoarece PU₄ se umflă mai puțin decât PU₃, eliberarea medicamentului este mai rapidă pentru PU₃-N decât în cazul PU₄-N.

Un alt parametru care influențează o eliberare prelungită a nistatinei în matricea poliuretanică constă în concentrația de uretan din compoziția poliuretanului. Concentrația minim inhibitorie pentru *Candida Albican* este cuprinsă între 4-6 μg/mL [186]. Membranele poliuretaneice cu nistatină asigură eliberarea acestora peste concentrația minim inhibitorie, după 3 ore de eliberare

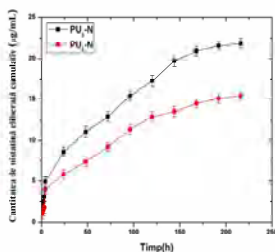


Figura V.79. Eliberarea nistatinei în funcție de timp pentru membranele PU₃-N și PU₄-N

V.7.5. Activitate antifungică

Activitatea antibacteriană a acestor membrane poliuretane cu medicament încorporat a fost analizată față de specia bacteriană *Candida Albican* ATCC 90028. În figura V. 78 se observă profilul zonei de inhibiție pentru cei doi poliuretani studiați cu nistatină; PU₄-N are o mai bună activitate antifungică în timp, în comparație cu PU₃-N. Neconcordanța dintre profilul de eliberare și zona de inhibiție se poate datora sensibilității metodei Kirby-Bauer, deoarece zona de inhibiție a bacteriei este produsă de o concentrație de antibiotic care depășește valoarea concentrației minim inhibitoare. Acest proces a fost întâlnit și în alte studii de inhibiție bacteriană, unde s-a observat o necorelație între profilul de eliberare și inhibiția bacteriană [195].

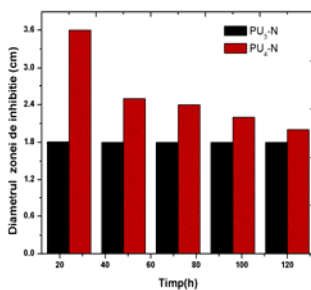


Figura V.80. Diametrul zonei de inhibiție PU₃-N și PU₄-N

CAPITOLUL VI

Sisteme poliuretane–principiu activ pe baza de poli (ϵ -caprolactonă) diol

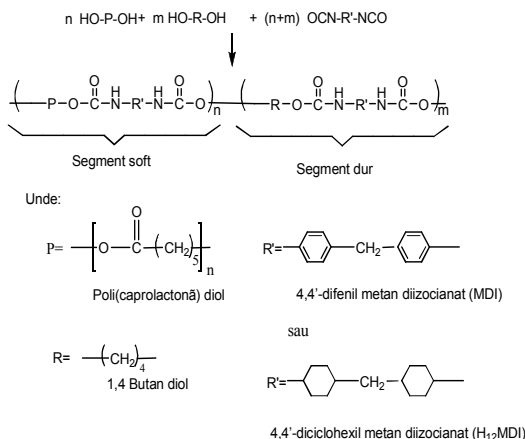
Domeniul eliberării prelungite poate utiliza astăzi o gamă largă de medicamente care pot fi direcționate spre o tumoră, sau spre un vas sangvin. Sistemele poliuretane cu principiu-activ sunt utilizate în tratarea bolilor degenerative cronice, precum tulburările sistemului nervos central, a bolilor respiratorii sau cardiovasculare [42], a disfuncțiilor celulare și ingineria tisulară [122]. În ultimii ani, atenția a fost îndreptată spre dezvoltarea unor sisteme de eliberare pe bază de polimeri biocompatibili, care să asigure un control al eliberării pe o perioadă prelungită de timp. Astfel au fost studiați polimeri biodegradabili precum poliesterii, polianhidridele sau polieteri [122].

Poli(ϵ -caprolactona) diol este un poliester aprobat de Administrația de medicamente și alimente, ca fiind un material utilizat în implanturile biomedicale [201]. El este un poliester biodegradabil foarte utilizat în sistemele de eliberare datorită netoxicității sale sau a prețului scăzut în comparație cu alți poliesteri biodegradabili [202].

Pe baza celor amintite, în acest capitol s-a urmărit sintetizarea unor poliuretani având ca poli(ester) poli(ϵ -caprolactona) diol, cu doi diizocianați: unul aromatic (4,4 difenil metan diizocianat) și unul alifatic (4'4-diciclohexil metan diizocianat) precum și studiul influenței diizocianatului asupra eliberării de medicamente. Prezența grupărilor funcționale și a interacțiilor fizice dintre membranele poliuretane și medicamente au fost analizate prin studii spectrale și calorimetria diferențială de baleiaj. S-au studiat proprietățile antimicrobiene ale sistemelor poliuretane utilizate în prevenirea infecțiilor, de la nivelul cateterelor, sau ale țesutului moale, al pielii.

VI.1. Reacția de sinteză

S-au sintetizat poliuretanii pe bază de poli(ϵ -caprolactona) de masă molară 2000 Da cu rapoartele molare 1:4:3, cu un diizocianat alifatic și unul aromatic. Masele molare ale poliuretanelor obținute sunt de 46,055 Da respectiv 49,078 Da, iar polidispersitatea este de 1,265 respectiv 1,553.



Schema VI.81. Schema de sinteză a poliuretanilor

VI.2. Analiza structurală a poliuretanilor sintetizați

Spectrele ATR-FTIR pentru membranele obținute la cei doi poliuretani sunt prezentate în Figura VI.82.

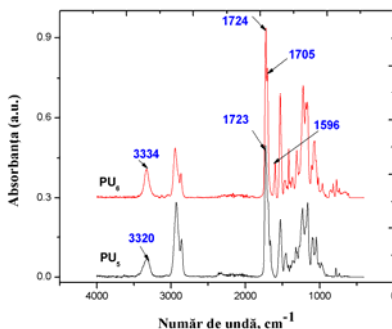


Figura VI.82. Spectrul ATR-FTIR al poliuretanilor sintetizați

Pentru poliuretanii sintetizați banda caracteristică vibrației de întindere $\nu(\text{N-H})$ uretanic se găsește între $3419\text{--}3223 \text{ cm}^{-1}$, cu maximum la 3328 , respectiv 3339 cm^{-1} [120]. Vibrația de întindere asimetrică a grupării $\nu(\text{CH}_2)_{\text{asim}}$ se regăsește la picul de la 2929 , respectiv 2944 cm^{-1} iar vibrația de întindere simetrică pentru gruparea $\nu(\text{CH}_2)_{\text{sim}}$, este caracteristică semnalului de la 2858 respectiv 2866 cm^{-1} [3]. Banda vibrației de întindere a grupării $\nu(\text{C-O})$ este cuprinsă între $1790\text{--}1662 \text{ cm}^{-1}$ cu maxim la 1726 , respectiv 1723 cm^{-1} , aparținând grupării carbonil

amorse, iar umărul de la 1701 cm^{-1} aparține grupării carbonil legat [140]. Vibrația de valență ale legăturilor C-C din ciclurile benzenice ale diizocianatului se regăsește la picul de la 1596 cm^{-1} . Amida II este formată din contribuția mai multor tipuri de legături: vibrație de deformare $\delta(\text{N-H})$ și vibrația de alungire $\nu(\text{C-N})$. Vibrația de forfecare și legănare $\delta(\text{CH}_2)$ se regăsește la 1414 și 1366 cm^{-1} iar picul de la 1221 , respectiv 1230 cm^{-1} reprezintă cele două tipuri de vibrații de alungire $\nu(\text{C-N})$ și de deformare $\delta(\text{N-H})$ numită și Amida III [142]. Vibrația de întindere a grupării $\nu(\text{C-O})$ din eterul alifatic este suprapusă peste vibrația de întindere a grupării $\nu(\text{C-O})$ din ester fiind reprezentată de picul de la 1161 și 1188 cm^{-1} [156].

Diferența dintre cei doi poliuretani constă în apariția picului de la 1596 cm^{-1} specific inelului aromatic la poliuretanul cu 4,4'-diizocianat de difenil metan și a carbonilului legat prin accentuarea picului de la 1701 cm^{-1} .

VI.3. Studii de biocompatibilitate

Biocompatibilitatea materialelor studiate este foarte importantă în scopul aplicațiilor biomedicale pentru care ele sunt sintetizate. Astfel, un test de viabilitate celulară a fost realizat și un studiu al morfologiei pe timp de 72 de ore, pentru a se confirma noncitotoxicitatea acestora. S-au utilizat celule fibroblaste din dermul uman. Rezultatele obținute în figura 85 prezintă o viabilitate de peste 80% pentru materialele obținute. Cel mai bun rezultat a fost dat de poliuretanul cu poli(caprolactona) diol și 4,4 diizocianat de difenil metil (MDI). Astfel de rezultate sunt confirmate și de studii din literatură în care au fost de asemenea analizați poliuretani alcătuiți din aceeași componenți, dar cu alte rapoarte molare. De asemenea, analiza morfologică a membranelor poliuretaneice a prezentat o bună dezvoltare a fibroblastelor timp de 72 de ore (Figura VI.86).

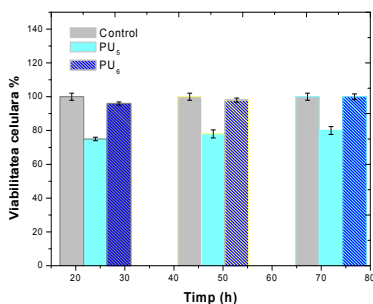


Figura IV.85. Viabilitatea celulară a poliuretanilor sintetizați

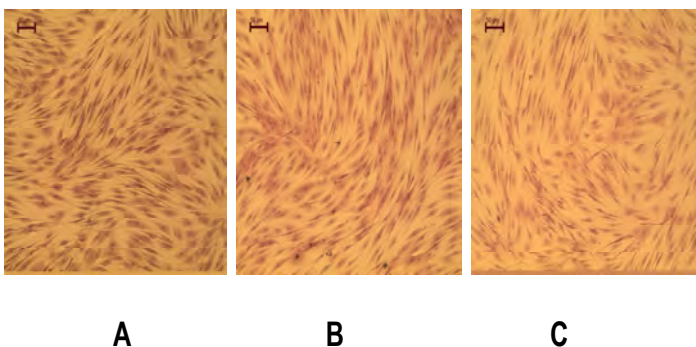


Figura IV.86. Studiul morfologiei poliuretanilor sintetizați (A) control (B) PU₅ (C) PU₆

VI.4. Obținerea membranelor poliuretani- rifampicină

Metoda inversiei de fază, precipitare în apa bidistilată la 45°C a fost utilizată pentru obținerea membranelor poliuretanice cu rifampicină. Temperatura de precoagulare s-a menținut până în momentul desprinderii complete a membranei de vasele Petri. După ce a avut loc și eliberarea rifampicinei în apă distilată concentrațiile soluțiilor rămase în PU₃-R și PU₄-R au fost de 2,7% respectiv 2,8%.

VI.4. 1. Analiza structurală a sistemelor poliuretani-rifampicină

VI.4.1.1. Caracterizare prin spectroscopie ATR-FTIR

În Figura VI.87 se evidențiază benzile de absorbție în ATR-FTIR a membranelor poliuretanice demonstrând astfel prezența grupărilor funcționale. Picului de la 1596 cm⁻¹, specific inelului aromatic accentuează prezența diizociantului aromatic, precum și separarea de faza din carbonilul uretanic liber și cel legat. Aceste benzi de absorbție din poliuretanii PU₅ și PU₆ se suprapun peste benzile de absorbție ale rifampicinei care vibrează la aceleași lungimi de undă. La concentrația de 3% a rifampicinei în poliuretani nu se pot observa diferențe majore la nivelul benzilor de absorbție.

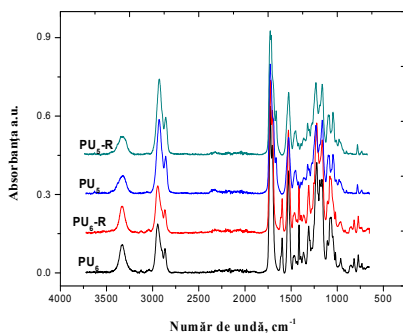


Figura VI.87. ATR-FTIR pentru spectrele PU₅, PU₆, PU₅-R, PU₆-R

Picurile caracteristice rifampicinei sunt caracterizate de prezența la 3439 cm⁻¹ a vibrației de întindere specifică hidrogenului liber, vibrația de întindere asimetrică și simetrică $\nu(\text{CH}_2)_{\text{asi}}$, $\nu(\text{CH}_2)_{\text{sim}}$ de la 2970 și 2917 cm⁻¹ iar carbonilul liber și legat se regăsește la vibrațiile de întindere de la 1734, 1710 cm⁻¹[144]. Vibrația de întindere $\nu(\text{C-O-C})$ se regăsește la 1020 cm⁻¹.

Diferitele schimbări spectrale determinate de membranele poliuretane cu rifampicină au fost analizate după aceeași metodă ca și la celelalte sisteme, la nivelul absorbției carbonilului uretanic care poate oferi informații despre prezența legăturilor de hidrogen [165]. În tabelul 22, s-a analizat raportul dintre banda absorbției carbonilului legat și a carbonilului total (carbonilul legat+carbonilul liber). Se observă o ușoară creștere a ariei matricei poliuretane cu rifampicină, ceea ce poate fi pusă pe seama formării legăturilor de hidrogen.

Tabel 22. Raport între carbonilul legat și carbonilul (liber+legat)

Poliuretani, poliuretani cu rifampicină	C=O ^a legat/C=O ^b
PU ₅	0,843
PU ₅ -R	0,856
PU ₆	0,361
PU ₆ -R	0,372

^a Aria (1716-1630 cm⁻¹)/^b Aria (1800-1630 cm⁻¹)

VI.4.2. Analiza termică (DSC)

Rezultatele obținute pentru cele două membrane poliuretane cu rifampicină sunt prezentate în figura VI.88. Se observă o creștere a valorii temperaturii de tranziție sticloasă (T_g) pentru cele două serii de poliuretan. Pentru poliuretanul PU₅ se observă o valoare a Tg-

ului de -62.90°C [203] iar pentru $\text{PU}_5\text{-R}$ de -55.94°C . În ceea ce privește poliuretanul PU_6 valoarea este de -46.28°C iar pentru $\text{PU}_6\text{-R}$ este de -40.84°C . Aceasta creștere a temperaturii de tranziție sticloasă poate fi datorată prezenței interacțiilor observate și în capitolul IV și V.

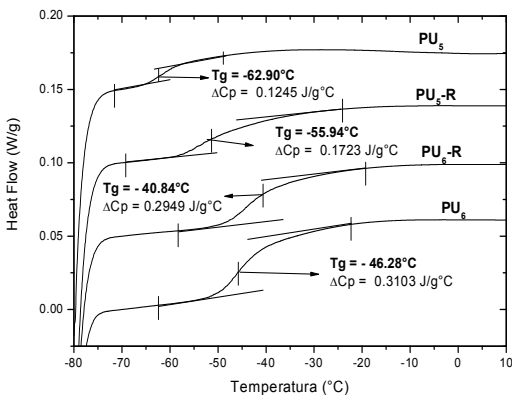


Figura VI.88. Calorimetria diferențială de baleiaj pentru PU_5 , $\text{PU}_5\text{-R}$, PU_6 , $\text{PU}_6\text{-R}$

VI.4.3. Unghiul de contact și determinarea energiei de suprafață

Unghiul de contact dintre poliuretani și rifampicină scade odată cu introducerea medicamentului în matricea poliuretanică. Datorită structurii complexe a rifampicinei în amestecul acesteia cu matricea poliuretanică, macromoleculele de la suprafață își schimbă conformația locală, astfel încât în momentul expunerii la picătura de apă, componentele polare au tendința de a se orienta spre suprafață.

Tabel 23. Unghiul de contact pentru poliuretani și pentru cei încarcați cu rifampicină

Probe	θ (°)	W_a mN/m	γ_{sv} , mN/m	γ_{sv}^p , mN/m	γ_{sv}^d , mN/m
PU_5	87,10	76,47	25,15	6,34	18,80
PU_6	104,08	55,08	19,96	1,15	18,51
$\text{PU}_5\text{-R}$	81,06	84,10	24,31	17,65	6,65
$\text{PU}_6\text{-R}$	90,83	71,73	26,99	3,199	23,79

În tabelul 23 sunt prezentate valorile unghiului de contact. Pentru PU_5 valoarea unghiului este de $87,10^{\circ}$ este mult mai mică decât PU_6 ($104,08^{\circ}$). Aceste variații pot fi atribuite modificărilor structurale de la suprafața poliuretanilor. După cum s-a prezentat în capitolul anterior rifampicina este un medicament hidrofil [172]. În tabelul 23, sunt prezentate valorile

unghiului de contact obținute pentru poliuretani simpli și poliuretani cu rifampicină. Scăderea lentă a valorilor unghiului de la suprafață, pentru poliuretanii cu rifampicină, se datorează probabil concentrației în rifampicină a membranei poliuretanilor.

VI.4.4. Studiul de eliberare *in vitro*

Comportamentul de eliberare a rifampicinei din membranele poliuretaneice a fost studiat în tampon fosfat pH=7,4 la 37°C. Profilurile de eliberare pentru cele doua sisteme obținute se caracterizează printr-un “burst efect” inițial și o eliberare prelungită a rifampicinei din membrana poliuretanică. Pentru poliuretanul cu diisocianat alifatic s-a observat o cantitate mai mare de eliberare a medicamentului, datorită probabil a diferenței de structură din matricea poliuretanică și a legăturilor de hidrogen care se formează. Această eliberare prelungită a medicamentului din matricea poliuretanică constituie un avantaj pentru prevenirea infecțiilor de la nivelul cateterelor vasculare, sau în cazul țesutului moale, al pielii.

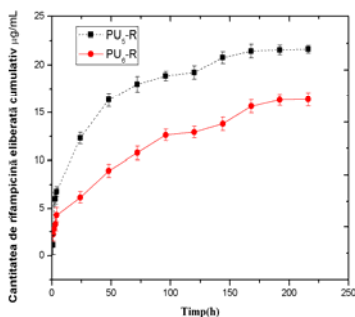


Figura VI.89. Curba de eliberare PU₅-R, PU₆-R în pH=7,4

VI.4.5. Studiul activității antimicrobiene

În figura VI.90 este prezentat diametrul zonei de inhibiție a poliuretanilor cu rifampicină studiat împotriva culturilor microbiene gram negativ și gram pozitiv. S-a observat o corelație a zonei de inhibiție cauzată de eliberarea rifampicinei în agarul însemănat cu culturile bacteriene, cu profilurile de eliberare a celor doi poliuretani cu rifampicină în tampon fosfat pH=7,4. Pentru poliuretanii simpli fără medicament încorporat nu s-a putut înregistra nici o zonă de inhibiție. Perioada de timp și diametrul zonei de inhibiție este corelată cu rezistența medicamentului la cultura bacteriană studiată. S-a dovedit în diferite studii din literatură, rezistența rifampicinei la bacteriile gram negative, în special la *P. Aeruginosa*. Astfel, timpul mai scurt, și gradul mic de inhibiție al rifampicinei împotriva bacteriei gram negative este justificat prin efectul inhibitor specific fiecărei bacterii. Pentru *Staphilococcus*

Epidermidis perioada de inhibiție a fost prelungită, s-a ajuns la 8 zile de inhibiție, în comparație cu *P.Aeruginosa* la care perioada a fost de maxim 4 zile.

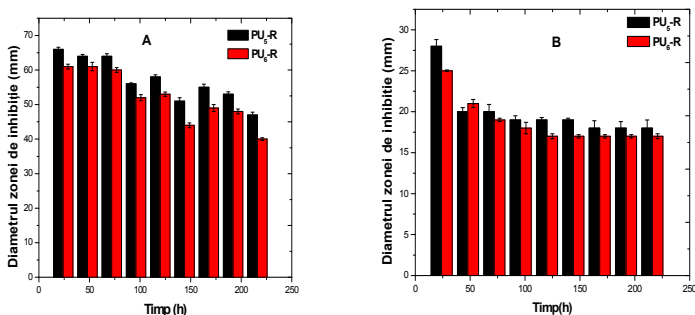


Figura VI.90. Diametrul zonei de inhibiție pentru bacteriile *S.Epidermidis* RP 62 A, *P.Aeruginosa* ATCC 1544.

VI.5. Sisteme poliuretani-nistatină

Pentru poliuretanii pe bază de poli (caprolactona) diol cu nistatină, obținute prin inversia de fază, concentrațiile finale în matricea poliuretanică sunt de 2,7 % pentru PU₅-N și 2,9% pentru PU₆-N.

VI.5.1.Analiza structurală a sistemelor poliuretani-nistatină

V.5.1.1. Spectroscopie ATR-FTIR

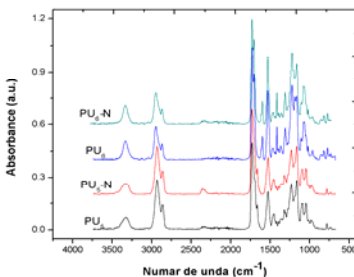


Figura VI.91. Spectrul ATR-FTIR al PU₃, PU₄, PU₃-N, PU₄-N

Poliuretanii sintetizați și membranele conținând nistatină sunt prezentate în Figura VI.91. Deoarece nistatina prezintă benzile de absorbție la aproximativ aceleași lungimi de undă cu ale poliuretanilor studiați, pentru a stabili diferențele modificări în spectre s-a studiat

banda specifică a carbonilului. Modificările în benzile spectrelor determinate de poliuretani cu nistatină s-au analizat pentru banda de adsorbție specifică a carbonilului care oferă informații despre formarea unor legături de hidrogen între cei doi compuși.

Pentru intervalul 1800-1630 cm^{-1} , raportul dintre aria benzii de absorbție ale carbonilului legat și cea a carbonilului total (carbonil liber și carbonil legat), în relația $(A_{\text{legat C=O}} / A_{\text{C=O}})$ pentru PU_3 0,182 și pentru $\text{PU}_3\text{-N}$ 0,196, iar pentru PU_4 este de 0,721 și $\text{PU}_4\text{-R}$ este de 0,780. Aceste diferențe mici, se datorează probabil interacțiilor dintre medicament și nistatina înglobată în matrice.

Tabel 24. Aria grupării carbonil pentru poliuretani și poliuretani cu rifampicină

Poliuretani, poliuretani cu rifampicină	C=O^a legat / C=O (legat + liber) ^b
PU_3	0,182
$\text{PU}_3\text{-R}$	0,196
PU_4	0,721
$\text{PU}_4\text{-R}$	0,780

^aAria (1716-1630 cm^{-1}); ^b Aria (1800-1630 cm^{-1})

V.5.2 Analiza termică (DSC)

În figura VI.92 sunt prezentate curbele DSC pentru PU_5 , respectiv PU_6 cu nistatină, precum și valorile lor ale temperaturii de tranziție sticloasă (T_g). Valorile lui T_g apar la -53,9 °C și -46,28° C. Apariția diferenței de temperatura de tranziție sticloasă a PU_5 și PU_6 sugerează apariția fenomenului de separare de fază [140]. Adăugarea nistatinei în matricea poliuretanică determină o creștere a valorii temperaturii de tranziție sticloasă, fenomen ce se poate explica prin apariția interacțiilor dintre poliuretani și medicament.

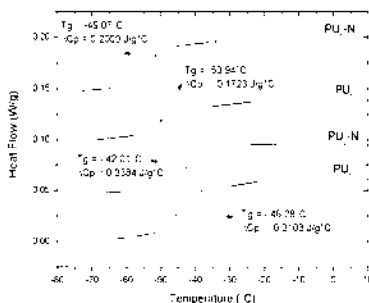


Figura VI.92. Curbele DSC pentru PU_5 , PU_6 , $\text{PU}_5\text{-N}$ și $\text{PU}_6\text{-N}$

V.5.3. Unghiul de contact și determinarea energiei de suprafață

Orice material sintetic sau natural care intră în contact cu testul viu și cu fluidele biologice, utilizat ca diagnostic sau terapie și nu afectează componentele biologice sau funcțiile organismului întreg, poartă denumirea de biomaterial [199]. S-a studiat rolul energiei libere și a tensiunii interfaciale dintre biomaterial și sânge în procesul de aderare sangvină [204]. Metodele de determinare a energiei libere la suprafață se bazează pe măsurătorile unghiului de contact dintre membrana poliuretanică și picătura de solvent: apa distilată sau etilen glicol. O valoare a unghiului de contact sub 90° caracterizează o suprafață hidrofilă, în timp ce o valoare peste 90° arată că suprafața rezistă la udare. În tabelul 25 sunt prezentate valorile unghiurilor de contact ale membranelor poliuretactice, împreună cu valoarea energiei de suprafață.

Tabel 25. Unghiul de contact, lucrul de adeziune, energia liberă la suprafață și componentele polare și disperse ale energiei de suprafață măsurate pentru membrane pe bază de poliuretan libere și încărcate cu nistatină.

Probe	θ ($^\circ$)	W_a (mN/m)	γ_{sv} (mN/m)	γ_{sv}^p , mN/m	γ_{sv}^d , mN/m
PU ₅	87,10	76,47	25,15	18,8	6,34
PU ₅ -N	81,33	83,7	26,2	24,0	2,16
PU ₆	104,07	55,08	19,96	1,02	18,94
PU ₆ -N	89,43	73,53	18,78	11,26	7,51

θ – unghi de contact cu apa, W_a – lucrul de adeziune, γ_{sv} – energia liberă la suprafață

Se observă o tendință de scădere a valorilor unghiului de contact pentru membranele poliuretactice cu nistatină, datorită caracterului polar al acesteia. Unghiul de contact pentru PU₅-N este de $81,33^\circ$ iar pentru PU₆-N este de $89,43^\circ$, ceea ce ne sugerează o mai mare eliberare a medicamentului în cazul PU₅-N.

V.5.4. Studiu de eliberare *in vitro* a nistatinei

Figura VI.93 prezintă eliberarea cumulativă a nistatinei din matricile poliuretactice în tampon fosfat pH=7,4 la 37°C . Profilul de eliberare al PU₅-N și PU₆-N se caracterizează printr-un “burst effect” inițial urmat de o eliberare prelungită a nistatinei din membrană poliuretanică. Un parametru care influențează eliberare prelungită a nistatinei în matricea poliuretanică constă în cantitatea de uretan din matrice. În cazul speciei de bacterie studiată *Candida Albican* concentrația minim inhibitorie este cuprinsă între 4-6 $\mu\text{g/mL}$ [186]. Membranele poliuretactice cu nistatină asigură eliberarea acesteia peste concentrația minim inhibitorie, după 3 ore de eliberare.

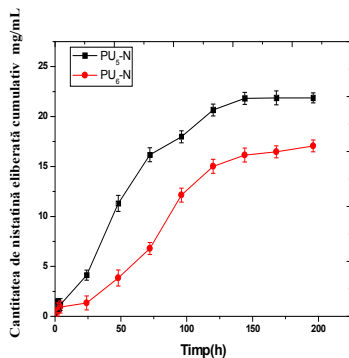


Figura VI.93. Eliberarea nistatinei în funcție de timp pentru membranele PU₅-N și PU₆-N

V.5.5. Activitatea antifungică

Pentru sistemele poliuretane cu nistatină activitatea antifungică a fost studiată contra *Candida Albican* ATCC 90028. În urma testului antifungic s-a observat o neconcordanță între profilul de eliberare și diametrul zonei de inhibiție. Pentru PU₅-N s-a obținut o zonă de inhibiție mai mică decât pentru PU₆-N. Această neconcordanță poate fi datorată difuziei medicamentului în mediu de agar, sau chiar și a sensibilității metodei de analiză Kirby-Bauer : concentrația de antibiotic produsă depășește valoarea concentrației minim inhibitoare, fenomen întâlnit și în alte studii de activitate antimicrobiană [195].

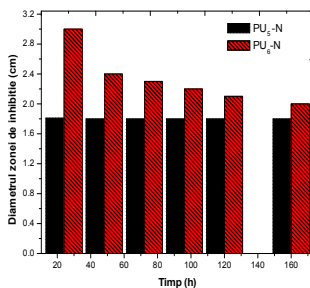


Figura VI.94. Diametrul zonei de inhibiție PU₅-N și PU₆-N împotriva *C. albican*

CAPITOLUL VII

CONCLUZII GENERALE

Materialele poliuretane au cunoscut în ultimii ani o atracție și o dinamică deosebită atât în studii teoretice cât și aplicative, având ca scop obținerea unor produse medicale, ca urmare a caracteristicilor conferite de proprietățile fizico-chimice și a biocompatibilității acestora. În prezent, cercetarea științifică din acest domeniu caută să diversifice și să amelioreze calitatea implanturilor și a dispozitivelor de analiză a organismului, să crească biocompatibilitatea materialelor poliuretane ce urmează să intre în contact direct cu țesuturile biologice sau să perfecționeze sisteme vectoriale performante de eliberare, care să conducă la organul țintă, diferite principii active. Lucrarea prezintă rezultate originale privind obținerea unor sisteme de eliberare susținută pe bază de materiale poliuretane și două antimicrobiene - nistatina și rifampicina -, pentru prevenirea infecției în diferite aplicații biomedicale.

Rezultatele obținute pe parcursul cercetării au permis formularea următoarelor concluzii:

1. Rolul poliuretanilor în domeniul științei polimerilor a cunoscut o deosebită importanță. Materialele poliuretane, în particular elastomerii sintetici sunt indispensabili în nenumărate aplicații industriale, medicale și de consum. Poliuretanii constituie o mare familie a materialelor polimerice cu proprietăți și compoziție chimică foarte diverse. Sunt polimeri liniari, ramificați sau reticulați a căror structură este formată din segmente amorfе, în general, cunoscute în literatură ca segmente „elastice”. Grupările uretanice împreună cu alungitorul de catenă de care sunt legate, conferă o ordonare ridicată a polimerului. Sunt cunoscute că materiale biocompatibile și biodegradabile cu numeroase aplicații biomedicale precum ingineria tisulară, sau sisteme de eliberare a medicamentelor.

2. Dezvoltarea formulărilor eliberării susținute este una dintre cele mai importante provocări în cercetarea farmaceutică. Matricele hidrofilice sunt unul dintre sistemele cele mai utilizate pentru controlarea eliberării, dar mecanismele implicate în eliberarea medicamentului din aceste sisteme ale matricelor sunt complexe și depind de mulți factori. În general eliberarea medicamentelor solubile în apă, este bazată pe mecanismul de difuzie prin stratul de gel, în timp ce medicamentele insolubile în apă, se caracterizează, în general, printr-un mecanism de eroziune.

Factorii determinanți cu rol important în mecanismul de eliberare sunt dependenți atât de tipul de medicament ales prin greutatea sa moleculară, solubilitate și doza sa specifică, cât

și de caracteristicile polimerului. Sistemele de eliberare prelungită sunt utilizate în diferite aplicații biomedicale precum acoperiri de dispozitive medicale, pentru prevenirea infecțiilor de la nivelul cateterelor vasculare sau a pansamentelor la nivelul pielii.

3. Au fost sintetizați poliuretani cu două concentrații în grupări uretanice: 1,5 mmol.g⁻¹, respectiv 2,5 mmol.g⁻¹, în care segmentul soft este compus din poli (tetrametilen oxid)diol și poli (butilen adipat)diol iar segmentul dur din diizocianat aromatic și butan diol, ca alungitor de catenă. Caracterizarea lor spectrală (ATR-FTIR, ¹H-RMN) a dovedit prezența benzilor de absorbție corespunzătoare structurilor sintetizate.

4. Testele de biocompatibilitate și hemocompatibilitate efectuate au probat calitățile de biomaterial ale poliuretanilor sintetizați, evidențiind o bună viabilitate celulară în urma analizelor realizate prin culturi *in vitro* de celule fibroblaste din dermul uman și celule embrionare „kidney”.

5. Au fost obținute sisteme poliuretane de tip membrană încărcate cu două medicamente antimicrobiene - nistatina și rifampicina -, în mai multe concentrații, prin tehnica inversiei de fază și precipitare în nonsolvent. Caracterizarea spectrală și termică a acestora (ATR-FTIR, DSC) au evidențiat apariția interacțiilor fizice de tipul legăturilor de hidrogen între medicamente și poliuretani.

6. Analiza morfologică a membranelor prin microscopie electronică a evidențiat formarea unor materiale poroase cu pori interconectați de dimensiuni cuprinse între 2,5-50 μm și o scădere a factorului de rugozitate odată cu introducerea rifampicinei în matricea poliuretanică.

7. Studiul cinetic al procesului de eliberare a medicamentelor din sistemele obținute a evidențiat faptul că eliberarea depinde atât de concentrația în grupări uretanice cât și de morfologia suprafeței. Cantitatea cea mai mare de medicament eliberată a fost constatată la sistemul cu 1,5 mmol.g⁻¹ grupări uretanice și cu o suprafață rugoasă cum este cazul rifampicinei. Mecanismul de transport prin membrană și eliberarea medicamentului este guvernat de procesul de difuzie Fickiană pentru ambele tipuri de sisteme.

8. Sistemele poliuretane cu medicamente au dovedit o bună activitate antimicrobiană, în special, rifampicina contra speciilor de stafilococi: *Staphylococcus Epidermidis* RP 62 A pe o perioadă prelungită de timp 216 ore. Activitatea antifungică a nistatinei a fost studiată contra speciei bacteriene *C. Albican* ATCC 90028.

9. S-au sintetizat alte două tipuri de poliuretani pe bază de poli(etilen glicol) - polieter solubil în apă – și poli (butilen adipat)diol în segmentul soft, cu concentrația în grupări uretanice de

1,5 mmol.g⁻¹, respectiv 2,5 mmol.g⁻¹. Polimerii au fost caracterizați prin metode spectrale, termice și de analiză a suprafeței, precum și din punct de vedere al caracteristicilor de biomaterial – biocompatibilitate, hemocompatibilitate -, acestea dovedind posibilitatea utilizării lor în aplicații biomedicale.

10. Sistemele poliuretane - rifampicină, respectiv nistatină, sub formă de membrană obținute prin procedeul, inversiei de fază, precipitare în nonsolvent, se caracterizează prin interacții fizice între medicament-suport poliuretanice, determinate de formarea legăturilor de hidrogen între cei doi parteneri. Prezența rifampicinei în membrană determină o scădere a gradului de rugozitate al suprafeței acestora și o creștere în diametrul porilor în urma procesului de eliberare.

11. Studiile de eliberare a medicamentelor conduc la ideea că morfologia și compoziția matricei poliuretane joacă un rol important în cinetica de eliberare a medicamentului; la o concentrație în grupări uretanice de 1,5 mmol.g⁻¹ sistemul eliberează o cantitate mai mare de medicament în comparație cu poliuretanul a cărui concentrație în grupări uretanice este de 2,5 mmol/.g⁻¹. Aceste tipuri de sisteme de eliberare studiate sunt matrici ce eliberează, totodată o cantitate mai mare de medicament pe tot parcursul procesului, în comparație cu sistemele discutate anterior care au în compoziție poliuretani pe bază de poli (tetrametilen oxid) diol, fapt datorat, probabil, prezenței polieterului în structura matricii poliuretane, polimer foarte hidrofil și care imprimă rețelei fizice a materialului un caracter elastic mai pronunțat.

12. Sistemele poliuretani-principiu activ realizate prezintă activitate antimicrobiană intensă, evidențiindu-se din acest punct de vedere cele conținând rifampicină, foarte active față de *Staphylococcus Epidermidis* RP 62 A pe o durată de timp de 216 ore.

13. S-au sintetizat noi poliuretani pe bază de poli(ε-caprolactonă) diol, polimer biodegradabil foarte utilizat în aplicații biomedicale precum inginerie tisulară și sistemele de eliberare controlată. În sinteză s-au utilizat două tipuri de dizocianați, unul aromatic și unul alifatic. Analizele spectrale (ATR-FTIR, ¹H-RMN) au dovedit obținerea structurilor poliuretane. Testele de biocompatibilitate efectuate au sugerat posibilitatea utilizării acestora la formarea de noi sisteme pentru eliberarea de medicament, selectându-se în acest scop aceleași antimicrobiene ca în cazurile anterioare, respectiv rifampicina și nistatina.

14. Analiza sistemelor polimer-medicament obținute sub formă de membrană a probat existența interacțiilor de tipul legăturilor de hidrogen între polimer și medicament, precum și creșterea hidrofiliei sistemului determinată de prezența medicamentului.

15. Studiul cinetic al procesului de eliberare a medicamentelor a fost extins pentru o perioadă de 216 h, când se ajunge la echilibru, constatându-se o influență accentuată a segmentului hard din compoziția poliuretanului asupra procesului de eliberare.

16. Toate sistemele poliuretane pe bază de poli (caprolactona) diol-medicament evidențiază zone de inhibiție ale unor culturi microbiene de tipul *Stafilococcus Epidermidis*, *Pseudomonas Aeruginosa* și *Candida Albicans*, ale căror diametre de inhibiție se mențin continuu într-un interval de timp, peste 72 ore, în bună concordanță cu cinetica eliberării *in vitro* a medicamentului.

17. Se poate concluziona astfel că sistemele poliuretane studiate influențează eliberarea de medicament prin concentrația și natura segmentului hard dar și prin morfologia suprafeței. În mod neașteptat, poliuretanii sintetizați cu diizocianați aromatici prezintă rezultate foarte bune la testele de viabilitate celulară, în special cei care conțin ca polieter poli(etilen glicol)-ul și poliester poli(ϵ -caprolactonă)diol. Poliuretanii prezintă și foarte bune proprietăți de hemocompatibilitate demonstrate prin mai multe tehnici de analiză. În prezența unor bacterii gram negative și gram pozitive și a unei bacterii antifungice sistemele nou formate generează zone de inhibiție al căror diametru de inhibiție se regăsește într-un interval de până la 10 zile.

Rezultatele obținute în prezenta lucrare reprezintă o contribuție importantă în domeniul sistemelor de eliberare susținută. Ele au ca aplicație un domeniu important, cel al prevenirii infecțiilor de la nivelul implanturilor medicale, sau al țesutului moale, pielea. Astfel, lucrarea de față s-a finalizat cu rezultate certe în ceea ce privește formarea de sisteme de eliberare susținută, și a lăsat un drum deschis pentru aspectele care țin de sisteme pe bază de combinații a două antimicrobiene, sau blenduri de poliuretani cu produse naturale de tipul hidroxi(propil celuloza) sau ulei de ricin cu rezultate promițătoare pentru potențialele aplicații biomedicale.

Bibliografie selectivă

- [3] L.C. Ciobanu, *Materiale poliuretanice. Proprietăți aplicații biomedicale*, Ed. Pim, Iasi, 2009.
- [25] C. Ciobanu, D. O. Dorohoi, V. Țura, L. C. Ciobanu, *Biopoliuretani*, Ed. Performantica, București, 2006.
- [42] P. Basak, B. Adhikari, I. Banerjee, T. K. Maiti, *Sustained release of antibiotic from polyurethane coated implant materials*. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 2009, 20, S213–S221.
- [117] M.S. Reza, M.A. Quadir, S.S. Haider, *Comparative evaluation of plastic, hydrophobic and hydrophilic polymers as matrices for controlled-release drug delivery*, Journal of Pharmaceutic Pharmacologic Science, 6, 2003, 282–291.
- [122] N.B. Shelke, M. Sairam, S. Halligudi, T.M. Aminabhavi, *Development of Transdermal Drug-Delivery Films With Castor-Oil-Based Polyurethanes*, Journal of Applied Polymer Science, 2006, 103, 779–788.
- [138] S. Akita, K. Akino, T. Imaizumi, K. Tanaka, K. Anraku, H. Yano, A. Hirano, *A polyurethane dressing is beneficial for split-graft donor wound healing*, Burns, 2006, 32, 447–451.
- [140] C. Ciobanu, X. Han, C. N. Cascaval, F. Guo, D. Rosu, L. Ignat, G. Moroi, *Influence of urethane group on properties of crosslinked polyurethane elastomers*. Journal of Applied Polymer Science, 2003, 87, 1858–1867.
- [142] M. Mandru, C. Ciobanu, M. E. Ignat, M. Popa, L. Verestiuc, S. Vlad, *Sustained release of nystatin from polyurethane membranes for biomedical applications*. Digest Journal of Nanomaterials and Biostructure, 2011, 6, 1227–1238.
- [144] D. Scutaru, *Curs de “Metode de caracterizare și testare a materialelor”*, Facultatea de Inginerie Chimică și Protecția Mediului, Universitatea tehnică “Gheorghe Asachi” din Iași, 2009.
- [148] K.L. Mittal, *Contact Angle, Wettability and Adhesion*, 2, VSP, Utrecht, Boston, 2002.
- [155] M. Rochery, I. Vroman, C. Campagne, *Poly(tetramethylene oxide)-based polyurethane coating of polyester with poly(dimethylsiloxane)- and poly(tetramethylene oxide)-based polyurethane*, Journal of Industrial Textiles, 2006, 35, 227–238.
- [156] R.M. Silverstein, F. X. Webster, D. J. Kiemle, *Spectrometric identification of organic compound*, John Wiley & Sons, New York, 2005, 72–126.
- [162] D.P. Otto, H. C. M. Vosloo, W. Liebenberg, M. M. de Villiers: *Development of microporous drug-releasing films cast from artificial nanosized latexes of poly(styrene-comethyl methacrylate) or poly(styrene-co-ethyl methacrylate)*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2008, 69, 1121–1134.
- [163] S.Q. Henwood, M. M. de Villiers, W. Liebenberg, A. P. Lotter, *Solubility and dissolution properties of generic rifampicin raw materials*. Drug Development and Industrial Pharmacy, 2001, 26, 403–408.

- [164] S.Q. Wenwood, W. Liebenberg, L. Tiedt, A.P. Lotter, M.M. de Villiers, *Characterisations of the solubility and dissolution properties of several new rifampicin polymorphs, solvates, hydrates*, Drug Delivery Industrial of Pharmaceutics, 2001, 27, 1017-1030.
- [165] G.A. Senich, W. J. MacKnight, *Fourier Transform Infrared Thermal Analysis of a Segmented Polyurethane*. Macromolecules, 1980, 13, 106-110.
- [166] S. Agrawal, Y. Ashokraj, P. Bharatam, O. Pillai, R. Panchagnula, *Solid state characterization of rifampicin samples and its biopharmaceutic relevance*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2004, 22, 127-144.
- [167] D.S. Jones, C. P. McCoy, G. P. Andrews, *Physicochemical and drug diffusion analysis of rifampicin containing polyethylene glycol-poly(ϵ -caprolactone) network designed for medical device applications*, Chemical Engineering Journal, 2011, 17, 1088-1095.
- [168] S. Vlad, M. Butnaru, D. Filip, D. Macocinschi, A. Nistor, L. M. Gradinaru, C. Ciobanu, *Polyetherurethane membranes modified with renewable resource as a potential candidate for biomedical applications*, Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures, 2010, 5, 1089-1100.
- [169] J.S. Saunders, K. C. Frisch, *Polyurethane Chemistry and Technology*. Interscience Publishers, I, London, 1962.
- [170] M. Stamm, *Polymer Surfaces and Interfaces. Characterization, Modification and Application*, Springer, England, 2008.
- [171] H. Yasuda, E. J. Charlson, E. M. Charlson, T. Yasuda, M. Miyama, T. Okuno, *Dynamics of Surface Property Change in Response to Changes in Environmental Conditions*, Langmuir, 1991, 7, 2394-2400.
- [172] K.M. Zia, M. Barikan, M. Zuber, I. A. Bhatti, M. Barmar, *Surface characteristics of polyurethane elastomers based on chitin/1,4-butane diol blends*, International Journal of Biological Macromolecules, 2009, 44, 182-185.
- [173] J.H. Park, K. D. Park, Y. H. Bae, *PDMS-based polyurethanes with MPEG grafts: mechanical properties, bacterial repellency and release behavior of rifampicin*, Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition, 2001, 12, 629-645.
- [174] K. L. Mittal, *Contact Angle, Wettability and Adhesion*, Vol 2, VSP, Utrecht, Boston, 2002.
- [175] H. Belt, D. Neut, D. R. A. Uges, W. Schenk, J. R. van Horn, H. C. Mei, H. J. Busscher, *Surface roughness, porosity and wettability of gentamicin-loaded bone cements and their antibiotic release*, Biomaterials, 2000, 21, 1981-1987.
- [176] M.C. Berg, L. Zhai, R. E. Cohen, M. F. Rubner, *Controlled Drug Release from Porous Polyelectrolyte Multilayers*, Biomacromolecules, 2006, 7, 357-364.
- [177] M. Lefebvre, C. Jacqueline, G. Amador, V. Le Mabeccque, A. Miegerville, G. Potel, J. Caillon, N. Asseray, *Efficacy of daptomycin combined with rifampicin for the treatment of experimental meticilin-resistant*, International Journal of Antimicrobial Agents, 2010, 36, 52-67.

- [178] J.J. Boelens, S. A. Zaat, J. Meeldijk, J. Dankert, *Subcutaneous abscess formation around catheters induced by viable and nonviable Staphylococcus epidermidis as well as by small amounts of bacterial cell wall components*, Journal of Biomedical Material Research 2000, 50, 546-556.
- [183] F. Esmacili, M. Hosseini-Nasr, M. Rad-Malekshahi, N. Samadi, F. Atyabi, R. Dinarvand *Preparation and antibacterial activity evaluation of rifampicin-loaded poly lactide-coglycoide nanoparticles*. Nanomedicine:Nanotechnology Biology and Medicine, 2007, 3, 161-167.
- [184] M. Gagos, M. Arczewska, *Spectroscopic studies of molecular organization of antibiotic amphotericin B in monolayers and dipalmitoylphosphatidylcholine lipid multibilayers*, Biochimica et Biophysica Acta, 2010, 1798, 2124–2130.
- [185] K. Sakeer, H.-Al Zein, I. Hassan, D. Sandip, A. Nokhodchi, *Enhancement of Dissolution of Nystatin from Buccoadhesive Tablets containing Various Surfactants and a Solid Dispersion Formulation*, Archives of Pharmacal Research, 2010, 33,1771-1779.
- [186] M.V.Gavrilin, A.V.Podluzhnaya, *Poly (Ethylene oxide)-based nystatin ointment*, Pharmaceutical Chemistry Journal, 2002, 36, 51-53.
- [187] A. A. Lin, T.K. Kwei, A. Reiser, *On the Physical Meaning of the Kwei Equation for the Glass Transition Temperature of Polymer Blends*, Macromolecules, 1989, 22, 4112-4119.
- [189]H. Liu, K. K. Leonas, Y. Zha, *Antimicrobial Properties and Release Profile of Ampicillin from Electrospun Poly(ϵ -caprolactone) Nanofiber Yarns*, Journal of Engineered Fibers and Fabrics, 2010, 5, 4.
- [190] S.Cardea, M. Sessa, E. Reverchon, *Supercritical Phase Inversion To Form Drug-Loaded Poly(vinylidene fluoride-co-hexafluoropropylene) Membranes*, Industrial Engineering Chemistry Research, 2010, 49, 2783-2789.
- [191] A. Guelcher, *Biodegradable polyurethanes: synthesis and applications in regenerative Medicine*, Tissue Engineering: Part B, 2008, 14, 3-17.
- [192] J.M. Schierholz, H. Steinhäuser, A. F. E. Rump, R. Berkels, G. Pulverer, *Controlled release of antibiotics from biomedical polyurethane: morphological and structural feature*. Biomaterials, 1997, 18, 839-844.
- [193] N.A. Salahuddin, A. A. El-Barbary, N. I. Abdo, *Delivery systems for some biologically active 1,2,4-triazine derivatives: synthesis and release*, Polymer Advanced Technology, 2009, 20, 122–129.
- [194] S.H. Lee, Z. Zhang, S.-S. Feng, *Nanoparticles of poly(lactide)-tocopheryl polyethylene glycol succinate (PLA-TPGs) copolymers for protein drug delivery*, Biomaterials, 2007, 28, 2041-2050.
- [195] V. Ruggeri, I. Francolini, G. Donelli, A. Piozzi, *Synthesis, characterization, and in vitro activity of antibiotic releasing polyurethanes to prevent bacterial resistance*. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2006, 287-298.

- [196] M.Wan, D.K. Baek, J.H. Cho, I.K. Kang, K.H. Kim, *In vitro blood compatibility of heparin-immobilized polyurethane containing ester groups in the side chain*. Journal of Material Science Materials in Medicine 2004,15,1079–1087.
- [197] S.A. Lewandowska, B. Masiulonis, M. Szymonowicz, S. Pileka, D. Paluch, *Modified polycarbonate urethane: synthesis, properties and biological investigation in vitro*, Journal Biomedical Material Research A, 2007, 82, 509–520.
- [198] M. Ding, J. Li, X. Fu, J. Zhou, H. Tan, Q. Gu, Q. Fu, *Synthesis, degradation and cytotoxicity of multiblock poly(epsilon-caprolactone urethane)s, containing gemini quaternary ammonium cationic groups*. Biomacromolecules, 2009, 10, 2857–2865.
- [199] D. Macocinschi, D. Filip, S. Vlad, A.M. Oprea, C.A. Gafitanu, *Characterization of a poly(ether urethane)-based controlled release membrane system for delivery of ketoprofen*. Applied Surface Science 2012, DOI:10.1016/j.apsusc.2012.07.060.
- [200] L. M. Gradinaru, C. Ciobanu, S. Vlad, M. Bercea, M. Popa, *Synthesis and rheology of thermoreversible polyurethane hydrogels*. Central European Journal of Chemistry, 2012, DOI: 10.2478/s11532-012-0100-8.
- [201] C. Yen, H. He, L. J. Lee, W. S. W. Ho, *Synthesis and characterization of nanoporous polycaprolactone membranes via thermally- and nonsolvent-induced phase separations for biomedical device application*. Journal of Membrane Science, 2009, 343, 180–188.
- [202] S.Ajili, N. Ebrahimi, M. Soleimani, *Polyurethane/polycaprolactane blend with shape memory effect as a proposed material for cardiovascular implants*. Acta Biomaterialia, 2009, 5, 1519–1530.
- [203] F.Li, J. Hou, W. Zhu, X. Zhanc, M. Xu, X. Luo, D. Ma, B. Kim, *Crystallinity and Morphology of Segmented Polyurethanes with Different Soft-Segment Length*, Journal of Applied Polymer Science, 1996, 62, 631–638.
- [204] D. Macocinschi, D. Filip, M. Butnaru, C.D. Dimitriu, *Surface characterization of biopolyurethanes based on cellulose derivatives*, Journal of Materials Science- Materials in Medicine, 2009, 20, 775–783.

Diseminarea rezultatelor obținute

Lucrări acceptate sau trimise spre publicare la reviste cu factor de impact din teză:

1. **M. Mândru**, C. Ciobanu, M. E. Ignat, M. Popa, L. Verestiuc, S. Vlad, *Sustained release of nystatin from polyurethane membranes for biomedical applications*. Digest Journal of Nanomaterials and Biostructure, 2011, 6, 1227-1238.
2. **M. Mândru**, C. Ciobanu, S. Vlad, M. Butnaru, L. Lebrun, M. Popa, *Characteristics of the polyurethane-based sustained release membranes for drug delivery*. Central European Journal of Chemistry, (2012)-trimisă spre publicare.
3. **M. Mândru**, C. Ciobanu, L. Lebrun, A. Nistor, S. Vlad, M. Popa, *Preparation and characterization of sustained rifampicin release from polyurethane membranes*, Polymer Bulletin, (2012)-trimisă spre publicare.
4. **M. Mândru**, C. Ciobanu, L. Lebrun, M. Butnaru, S. Vlad, M. Popa, *Rifampicin delivery from polyurethane membranes*, Journal of Optoelectronics and advanced materials, (2012)-(trimisă spre publicare).

Lucrări acceptate la reviste cu factor de impact pe perioada desfășurării tezei:

1. L. M. Gradinaru, **M. Mândru**, C. Ciobanu, D. Filip, D. Macocinschi, S. Vlad, *Influence of diisocyanate structure on the properties of some polyetherurethanes based on renewable resources*, Journal of Optoelectronics and advanced materials, 2011, 13, 286 – 292.
2. S. Vlad, C. Ciobanu, M. Butnaru, D. Macocinschi, D. Filip, L. M. Gradinaru, **M. Mândru**, *Preparation of polyurethane microspheres by electrospray technique*, Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures, 2011, 6, 2, 643-653.

Lucrări publicate în volume ale altor conferințe din teză:

- M. Mândru**, C. Ciobanu, L. M. Gradinaru, M. E. Ignat, S. Vlad, M. Popa, *Polyurethanes for sustained release of drugs*, Conferința de Reologie „Dynamics of Complex Fluids”, 5-7 mai 2011, Iași, România, pg. 129-133, ISBN 978-973-702-849-5.
- M. Mândru**, C. Ciobanu, M. E. Ignat, M. Popa, L. Lebrun, L. Vereștiuc, C. Grigoraș, *Systemes a base de polyurethane pour la liberation prolongee de principes actifs*, X-eme Colloque Franco -Roumain sur les Polymeres, 6-8 septembre 2011, Douai, Franța, pg. 250-252.

Lucrări comunicate la Manifestări științifice Internaționale din teză:

- M. Mândru**, M. Popa, L. M. Gradinaru, M. Ignat, L. Vereștiuc, C. Ciobanu, *„Polyurethanes Based Membranes for Nystatin Delivery: Formulation and In Vitro Assessments”*—a 23 a Conferința Europeană de Biomateriale, Finlanda, Tampere, 11-15 septembrie 2010.

-M. Ignat, **M. Mândru**, C. Ciobanu, M.Popa, L.Ignat, L.Vereștiuc ”*Etudes in vitro pour la liberation de nystatine a partir des membranes microporeuse d'un polyurethane*” la primul Colocviu Franco-român de Chimie Medicinală, 07-08 octombrie 2010, Iași, România.

-**M. Mândru**, C. Ciobanu, M.-E. Ignat, M. Popa, L. Lebrun, L. Vereștiuc, C. Grigoraș, *Systèmes a base de polyurethane pour la liberation prolongee de principes actifs*” la al-10-lea Colocviu Franco-Român de Polimeri, 6-8 septembrie 2011, Douai, Franța.

-**M. Mândru**, M-E Ignat, C.Ignat, M. Popa, L. Vereștiuc, M.Butnaru, C.Ciobanu *Polyurethane-nystatin formulations for sustained delivery in blood-contact applications: influence of urethane groups concentration*” la cea de a-24-a Conferință Europeană de Biomateriale, ESB, 04-08 septembrie 2011, Dublin, Irlanda.

Lucrări comunicate la Manifestări științifice Naționale din teză:

1.**M. Mândru**, L.M.Gradinaru, M.-E. Ignat, S. Vlad, M. Popa, C.Ciobanu, ”Polyurethanes for sustained release of drugs” organizat de Conferința de Reologie „Dynamics of Complex Fluids”, 5-7 Mai, 2011, Iași, România.

Lucrări comunicate la Manifestări Științifice Naționale în timpul perioadei de doctorat:

1.**M. Mândru**, M. Ignat, L. M. Gradinaru, F. Doroftei, S. Vlad, C.Ciobanu, M.Popa” *Polyurethane microsphere by electrospray technique and drug delivery*”, organizată de Universitatea „Dunarea de Jos” din Galați, Facultatea de Științe și Mediu, Departamentul de Chimie, Fizica și Mediu, 9-11 iunie, 2011, Galați, România.

2.S.Vlad, C.Ciobanu, M.Butnaru, D.Macocinschi, D.Filip, L.M.Gradinaru, **M. Mândru**, *Polyurethane microspheres by electrospraying for biomedical applications*”, la al XII lea Balkan Workshop în fizica aplicată cu participare internațională, organizată de Universitatea Ovidius din Constanța, Facultatea de Fizică, Chimie, Electronică și Tehnologia Petrolului, 6-8 iulie, 2011, Constanța, România.

3., „*A new polyesterurethane membrane for nystatin delivery*”, **M. Mândru**, A.Nistor, F. Doroftei, S. Vlad, C.Ciobanu, M.Popa, organizată de Universitatea Ovidius din Constanța, Facultatea de Fizică, Chimie, Electronica și Tehnologia Petrolului, 6-8 iulie, 2011, Constanța, România.

Premii obținute la Manifestări Științifice din teză:

1. Premiul „Rudolfs Cimdins Travel award” obținut la a 23-a Conferință Europeană de Biomateriale, (ESB 2010), 11-15 septembrie 2010, Tampere, Finlanda.

2. Premiul pentru cea mai bună comunicare de poster, la primul colloque Franco-Roumain Chimie Medicinale, 06-08 octombrie 2010, Iași, România.

Membru în echipa contractului de cercetare:

1.CNCSIS, Project ID 751/2008: Suporturi Poliuretanic Biodegradabile, Precursori pentru Ingineria Tisulară, PCE-ID – 988, 2010-2011.