



UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI,
PROTECTORII SOCIALE ŞI
PERSONELOR VÂRSTNICE
AMPOSDRU



Fondul Social European
POSDRU 2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013



MINISTERUL
EDUCAȚIEI
NAȚIONALE
OIPOSDRU



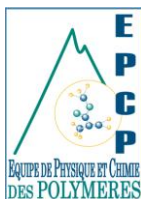
UNIVERSITATEA TEHNICĂ
"GHEORGHE ASACHI" DIN
IASI



UNIVERSITATEA TEHNICĂ
"GHEORGHE ASACHI" DIN IAȘI
Facultatea de Inginerie Chimică și Protecția
Mediului

În cotutelă cu

UNIVERSITÉ de PAU et des PAYS de
l'ADOUR, FRANCE
IPREM – U.M.R. 5254



BIOMATERIALE POLIMERICE COMPLEXE PENTRU MODELAREA CINETICII DE ELIBERARE A MEDICAMENTELOR

- rezumatul tezei de doctorat -

Conducători de doctorat:

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

Prof. univ. dr. ing. *dr.h.c.* Jacques Desbrières

Doctorand:

Bioing. Bogdan Constantin Ciobanu

IAȘI - 2013

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

Către

Vă facem cunoscut că, în ziua de 25 septembrie 2013 la ora 10⁰⁰ în Sala de Consiliu a Facultății de Inginerie Chimică și Protecția Mediului, va avea loc susținerea publică a tezei de doctorat intitulată:

"BIOMATERIALE POLIMERICE COMPLEXE PENTRU MODELAREA CINETICII DE ELIBERARE A MEDICAMENTELOR"

elaborată de domnul bioing. **CIOBANU BOGDAN CONSTANTIN** în vederea conferirii titlului științific de doctor.

Comisia de doctorat este alcătuită din:

- | | |
|--|-----------------------|
| 1. Prof.univ.dr.ing. Dan Cașcaval | președinte |
| Universitatea Tehnică "Gheorghe Asachi", Iași, România | |
| 2. Prof.univ.dr.ing. <i>dr.h.c.</i> Marcel Popa | conducător științific |
| Universitatea Tehnică "Gheorghe Asachi", Iași, România | |
| 3. Prof.univ.dr.ing. <i>dr.h.c.</i> Jacques Desbrières | conducător științific |
| Université de Pau et des Pays de l'Adour, Pau, Franța | în cotutelă |
| 4. Prof.univ.dr.ing. Jean-François Chailan | membru, referent |
| Université de Sud Toulon-Var, Franța | |
| 5. Prof.univ.dr.ing. Patrick Martin | membru, referent |
| Université d'Artoise IUT, Bethune, Franța | |
| 6. Conf.dr.ing. Liliana Vereștiuc | membru, referent |
| Universitatea de Medicină și Farmacie "Gr.T.Popa", Iași, România | |

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

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


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

Secretar universitate,

Ing. Cristina Nagiț



UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI,
PROTECTORII SOCIALE ȘI
PERSOANELOR VÂRSTNICE
IMPOSDRU



Fondul Social European
POSDRU 2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013



MINISTERUL
EDUCAȚIEI
NAȚIONALE
OIPOSDRU



UNIVERSITATEA TEHNICĂ
"GHEORGHE ASACHI" IAȘI

Teza de doctorat a fost realizată cu sprijinul financiar al proiectului **“STUDII DOCTORALE PENTRU PERFORMANȚE EUROPENE ÎN CERCETARE ȘI INOVARE (CUANTUMDOC)”** POSDRU/107/1.5/S/79407.

Proiectul **“STUDII DOCTORALE PENTRU PERFORMANȚE EUROPENE ÎN CERCETARE ȘI INOVARE (CUANTUMDOC)”** POSDRU/107/1.5/S/79407, este un proiect strategic care are ca obiectiv general *„Aplicarea de strategii manageriale, de cercetare și didactice destinate îmbunătățirii formării inițiale a viitorilor cercetători prin programul de studii universitare de doctorat, conform procesului de la Bologna, prin dezvoltarea unor competențe specifice cercetării științifice, dar și a unor competențe generale: managementul cercetării, competențe lingvistice și de comunicare, abilități de documentare, redactare, publicare și comunicare științifică, utilizarea mijloacelor moderne oferite de TIC, spiritul antreprenorial de transfer al rezultatelor cercetării. Dezvoltarea capitalului uman pentru cercetare și inovare va contribui pe termen lung la formarea doctoranzilor la nivel european cu preocupări interdisciplinare. Sprijinul financiar oferit doctoranzilor va asigura participarea la programe doctorale în țara și la stagii de cercetare în centre de cercetare sau universități din UE. Misiunea proiectului este formarea unui tânăr cercetător adaptat economiei de piață și noilor tehnologii, având cunoștințe teoretice, practice, economice și manageriale la nivel internațional, ce va promova principiile dezvoltării durabile și de protecție a mediului înconjurător.”*

Proiect finanțat în perioada 2010 - 2013

Finanțare proiect: **16.810.100,00 RON**

Beneficiar: Universitatea Tehnică “Gheorghe Asachi” din Iași

Partener: Universitatea „Babeș Bolyai” din Cluj-Napoca

Director proiect: Prof. univ. dr. ing. Mihai BUDESCU

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



UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI,
PROTECTORII SOCIALE ȘI
PERSONELOR VÂRSTNICE
ASFOPOSDRU



Fondul Social European
POSDRU 2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013



MINISTERUL
EDUCAȚIEI
NAȚIONALE
OIPOSDRU



UNIVERSITATEA TEHNICĂ
"GHEORGHE ASACHI" CLUJ
NAPOCA

Profund recunoscător ți sunt domnului Prof. univ. dr. ing. dr.h.c. Marcel Popa pentru îndrumarea oferită în timpul anilor de studiu, atât pe plan profesional cât și personal. Doresc să ți mulțumesc și pe această cale pentru gândurile bune, optimismul, rigurozitatea, seriozitatea și entuziasmul transmis.

De asemenea, ți mulțumesc domnului Prof. univ. dr. ing. dr.h.c. Jacques Desbrières pentru sprijinul acordat în perioada șederii mele în Franța și pentru oportunitatea de a efectua activitate de cercetare alături de domnia sa.

Aș dori să mulțumesc membrilor comisiei, domnilor Prof. dr. ing. Dan Cașcaval, Prof. univ. dr. ing. Jean-François Chailan, Prof. univ. dr. ing. Patrick Martin și doamnei Conf. dr. ing. Liliana Vereștiuc. În mod special mulțumesc acestora pentru imboldul oferit în timpul studiilor desfășurate la Facultatea de Bioinginerie Medicală ce m-a determinat să urmez doctoratul în domeniul Ingineria Materialelor și pentru încrederea de a mă recomanda conducătorului științific Prof. univ. dr. ing. dr.h.c. Marcel Popa. Doamnei biolog dr. Maria Butnaru ți mulțumesc pentru ajutorul său la realizarea testelor de citotoxicitate.

Mulțumesc în mod deosebit doamnei dr. bioing. Cătălina Peptu pentru prietenia sa, ajutorul și ideile sugerate pentru finalizarea acestei teze de doctorat.

Le pot respect deosebit și le mulțumesc pentru căldura cu care m-au primit colegele mele Lăcrămioara Bălăiță, Anca Cadînoiu, Delia Rață, Cristina Ignat, Gabriela Andrei, Simona Băcăiță, Liana Alupei și nu în ultimul rând, colegului meu Andrei Gâlcă.

Mulțumesc prietenilor mei George Pleșcan, Dragoș Bobu, Lucian Scutariu, Andrei Zarif, Codrin Țiuu, Adrian Duca, Gabriela Rađu Bostan și Larisa Cioclu pentru prietenia lor, încurajări și sprijinul acordat în momente de cumpănă.

Cele mai calde mulțumiri mamei, surorii și bunicilor mei cărora le dedic aceste realizări. O bună parte din ambiția și motivația avută se datorează amintirii tatălui meu și bunicii mele cărora le-ar fi plăcut să citească aceste rânduri.

CUPRINS	1
Glosar	4
Introducere	5
Studiu bibliografic	9
CAPITOLUL 1. Sisteme polimer-medicament cu eliberare controlată	9
1.1. Hidrogeluri - suporturi macromoleculare pentru obținerea sistemelor de eliberare controlată/suștinută a medicamentelor	10
1.1.1. Considerații generale asupra hidrogelurilor	10
1.1.2. Polimeri utilizați pentru obținerea de hidrogeluri	11
1.1.2.1. Chitosan	12
1.1.2.2. Gelatină	15
1.1.2.3. Poli(alcool vinilic)	18
1.1.3. Metode de obținere a hidrogelurilor	19
1.1.3.1. Reticularea covalentă	19
1.1.3.2. Reticularea ionică	20
1.1.3.3. Reticularea prin legături de hidrogen	21
1.1.3.4. Interacțiuni hidrofobe	26
1.1.4. Pharmacocinetica și farmacodinamica eliberării de medicamente din hidrogeluri	27
1.2. Lipozomi- vezicule purtătoare de medicamente	31
1.2.1. Clasificare	33
1.2.2. Obținere și caracterizare	34
1.2.3. Aplicații	35
1.2.4. Limite și perspective în aplicarea lipozomilor	36
1.3. Posibilități de modelare a cineticii de eliberare a medicamentelor	37
1.4. Considerații generale asupra tegumentului uman	39

Rezultate originale	45
CAPITOLUL 2. Materiale și metode experimentale	49
2.1. Materiale	49
2.1.1. Reactivi	49
2.2. Metode experimentale	51
2.2.1. Tehnici de lucru	51
2.2.1.1. Metoda de preparare a hidrogelurilor CG obținute prin dublă reticulare	51
2.2.1.2. Metoda de preparare a hidrogelurilor CP obținute prin dublă reticulare	53
2.2.1.3. Metoda de preparare a lipozomilor SUV	53
2.2.1.4. Metoda de preparare a hidrogelurilor obținute prin reticulare cu AT	55
2.2.1.5. Metoda de obținere a hidrogelurilor încărcate cu calceină	56
2.2.2. Tehnici de caracterizare	57
2.2.2.1. Caracterizarea lipozomilor	57
2.2.2.2. Spectroscopia FT-IR	57
2.2.2.3. Microscopia Electronică de Baleiaj (MEB)	58
2.2.2.4. Studiul capacității de umflare a hidrogelurilor	58
2.2.2.5. Studiul capacității de eliberare a calceinei din hidrogeluri	59
2.2.2.6. Studiul cineticii de eliberare a AT din hidrogeluri	61
2.2.2.7. Teste de citocompatibilitate	62
2.2.2.8. Studiul degradării termice a hidrogelurilor	63
2.2.2.9. Studiul eliberării transdermice a calceinei	64
CAPITOLUL 3. Hidrogeluri dublu reticulate pe bază de CG și CP: Obținere și caracterizare	65
3.1. Chimismul reacției de reticulare a hidrogelurilor	65
3.2. Caracterizarea prin spectroscopie FT-IR	67
3.3. Studiul comportării la umflare în PBS a hidrogelurilor dublu reticulate	69
3.4. Studiul cineticii de eliberare a calceinei din hidrogeluri	70

CAPITOLUL 4. Hidrogeluri pe bază de chitosan și CP obținute prin reticulare cu AT	75
4.1. Structura chimică a hidrogelurilor	76
4.2. Caracterizarea prin Spectroscopie FT-IR	77
4.3. Morfologia hidrogelurilor determinată cu ajutorul MEB	79
4.4. Studiul degradării termice a hidrogelurilor determinat prin ATG	82
4.5. Studiul comportării în apă a hidrogelurilor reticulate cu AT	85
4.6. Studiul cineticii de eliberare a AT din hidrogeluri	92
4.7. Studiul cineticii de eliberare a calceinei din hidrogeluri	94
4.8. Citocompatibilitatea hidrogelurilor reticulate cu AT	95
4.9. Studiul eliberării transdermale a calceinei	96
CAPITOLUL 5. Sisteme complexe pe bază de polimeri-lipozomi-medicament	99
5.1. Caracterizarea și selectarea lipozomilor	100
5.2. Studii cinetice de eliberare a calceinei din sisteme complexe	100
5.2.1. Studiul eliberării calceinei din sisteme complexe dublu reticulate	100
5.2.2. Studiul eliberării calceinei din sisteme complexe obținute prin reticulare cu AT	104
5.3. Modelarea matematică a cineticii de eliberare a calceinei din hidrogeluri	107
5.3.1. Hidrogeluri pe bază de amestecuri CG dublu reticulate și sisteme complexe bazate pe acestea	111
5.3.2. Hidrogeluri pe bază de amestecuri CP dublu reticulate și sisteme complexe bazate pe acestea	115
5.3.3. Hidrogeluri pe bază de chitosan reticulate cu AT și sisteme complexe bazate pe acestea	118
5.3.4. Hidrogeluri pe bază de amestecuri CP reticulate cu AT și sisteme complexe bazate pe acestea	121
CAPITOLUL 6. Concluzii generale și Perspective	126
Bibliografie	131

GLOSAR

AG: Aldehidă glutarică sau glutaraldehidă

AT: acid tanic

C: chitosan

DD: grad de deacetilare

G: gelatină

PAV: poli(alcool vinilic)

CP: Chitosan/poli(alcool vinilic)

CG: Chitosan/gelatină

NP: nanoparticule

PBS: soluție tampon fosfat

PC: fosfatidilcolină

PEG: poli(etilen glicol)

POE: poli(oxid etilen)

TPP: tripolifosfat de sodiu

SC: strat cornos

GAG: glucozaminoglicani

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

RES: Sistemul Reticulo-Endotelial

EPR: Enhanced Permeability Effect

MLV: vezicule (lipozomi) multilamelari

SUV: vezicule (lipozomi) unilamelari mici

LUV: vezicule (lipozomi) unilamelari mari

HC: chitosan de masă moleculară mare

MC: chitosan de masă moleculară medie

Introducere

Principalul obiectiv al tezei de doctorat intitulată “Biomateriale polimerice complexe pentru modelarea cineticii de eliberare a medicamentelor” îl constituie, evident, obținerea de noi sisteme, mai complexe decât cele curente, a căror proiectare permite **modelarea și un mai bun control al cineticii de eliberare a principiului activ**. Principal, medicamentul este inclus în lipozomi iar aceștia sunt dispersați într-o matrice de tip hidrogel, care constituie o barieră suplimentară în eliberarea principiului activ, evitând astfel „burst effect”-ul ce apare la administrarea clasică de medicamente (eliberarea unei cantități mari de medicament înainte de atingerea unei cinetici de eliberare constante).

Realizarea acestui obiectiv general presupune rezolvarea mai multor obiective specifice.

Primul dintre acestea îl constituie obținerea unor filme polimerice de tip hidrogel superioare celor existente, prin combinarea unor polimeri naturali (chitosan și gelatina) cu poli(alcoolul vinilic), polimer sintetic. Agenții de reticulare chimici utilizați obișnuit în sinteza hidrogelurilor, cum ar fi formaldehida și glutaraldehida, prezintă toxicitate la contactul cu țesutul uman și de aceea atenția este îndreptată spre utilizarea reticulanților ionici ca sulfatul de sodiu, tripolifosfatul de sodiu și a agenților de reticulare de proveniență naturală. Legăturile covalente imprimă hidrogelurilor proprietăți mecanice mai bune în detrimentul proprietăților de încărcare/eliberare de medicamente. Ca urmare, reticulantul covalent nu trebuie total înlocuit din rețelele de obținere a hidrogelurilor, ci doar substituit până la limita la care stabilitatea rețelei nu este afectată dramatic. Trebuie avut în vedere, de asemenea, controlul capacității hidrogelurilor de a se umfla în mediu apos, caracteristică de care se leagă strâns capacitatea de eliberare a principiilor active. În consecință, în prima parte a lucrării cercetările s-au îndreptat spre găsirea unui compromis între utilizarea reticulanților covalenți (toxici, în general) și a celor ionici (acceptați biologic) pentru obținerea hidrogelurilor. În același context și subordonată aceleiași obiectiv este utilizarea unui compus natural, acidul tanic, capabil de a realiza reticularea prin numeroase, dar mai slabe în intensitate, legături de hidrogen, a polimerilor sau amestecurilor de polimeri caracterizați prin prezența grupărilor $-OH$ sau $-NH_2$ ca substituenți, respectiv a celor doi polimeri selectați pentru prezentul studiu. Marele avantaj al acestui reticulant îl constituie obținerea unui material total lipsit de toxicitate, atât datorită naturii componentelor săi cât și a evitării utilizării de reticulanți covalenți, și chiar ionici.

Al doilea obiectiv specific îl constituie obținerea sistemelor complexe polimer-lipozomi-medicament, ceea ce presupune mai întâi încapsularea principiului activ în lipozomi, și ulterioră includere a acestora în matrici polimerice de tip hidrogel sub formă de filme. Desigur, problema fundamentală în cadrul acestui obiectiv o constituie stabilirea cineticii de eliberare a medicamentului din sistemul complex comparativ cu eliberarea doar din film, respectiv verificarea ipotezei de plecare. Mecanismul și cinetica eliberării medicamentului sunt aceleași indiferent de calea de administrare (orală, parenterală, respiratorie, rectală, vaginală, respiratorie, implant subcutanat, etc.) și afecțiunea ce urmează a fi tratată. Dat fiind că astfel de sisteme au fost obținute sub formă de filme, o potențială aplicație ar constitui-o utilizarea lor ca pansamente pentru tratarea unor afecțiuni ale dermei, sau pentru administrarea de medicamente pe cale transdermală.

Teza de doctorat cuprinde 6 capitole ce însumează 152 pagini ce cuprind 81 figuri, 11 tabele, 11 relații de calcul și formule, 274 note bibliografice.

Prima parte a tezei, cuprinzând un singur capitol, tratează suporturile macromoleculare de tip hidrogel utilizate în eliberarea controlată de medicamente. Pe lângă considerațiile generale asupra hidrogelurilor, sunt amintite structura, proprietățile fizico-chimice și cele mai recente aplicații ale polimerilor utilizați în cadrul cercetărilor efectuate în cadrul tezei de doctorat. Sunt amintite principalele metode de obținere a hidrogelurilor și ulterior detaliate principiile esențiale de farmacocinetică și farmacodinamică aplicabile acestor sisteme de eliberare de medicamente.

Rezultatele originale sunt tratate ulterior în cele 4 capitole ce debutează cu cel dedicat materialelor și tehnicilor de lucru și caracterizare folosite pentru elaborarea tezei.

Capitolul 3 prezintă rezultatele obținute în cadrul studiului hidrogelurilor dublu reticulate (ionic și covalent) pe bază de chitosan/gelatină și chitosan/poli(alcool vinilic). În cadrul acestui capitol este corelată capacitatea de eliberare a calceinei (analog pentru compuși activi hidrofilii de masă moleculară mică) cu compoziția hidrogelurilor obținute: tipul polimerului partener chitosanului la co-reticulare, raportul între cei doi polimeri, tipul de reticulant ionic și cantitatea utilizată pentru obținerea hidrogelurilor.

În capitolul 4 se tratează hidrogelurile pe bază de chitosan și chitosan/poli(alcool vinilic) reticulate cu AT sunt prezentate morfologia hidrogelurilor, studiul comportării în apă a acestora și studiul eliberării aceluiași principiu activ model din aceste matrici. În plus, sunt prezentate rezultatele de citocompatibilitate efectuate pe celule de tip osteoblastic și a eliberării transdermice *in vitro* a calceinei.

Capitolul 5 este dedicat caracterizării sistemelor complexe realizate atât prin dublă reticulare cât și prin reticulare cu acid tanic. Se prezintă și se justifică atenuarea “burst effect”-ului cu creșterea densității de reticulare a matricilor polimerice ce conțin lipozomi unilamelari mici purtători de medicament. În cazul hidrogelurilor complexe obținute prin reticulare cu polifenolul se obțin curbe cinetice de “ordin zero” care ulterior, împreună cu hidrogelurile obținute prin dublă reticulare, au fost prelucrate matematic conform ecuației Peppas iar rezultatele probează posibilitatea modelării teoretice a eliberării calceinei din sistemele polimerice de tip hidrogel obținute. Mecanismul de transport ce guvernează eliberarea compusului model din hidrogel este unul combinat la care participă cel puțin trei fenomene: umflarea, relaxarea și eroziunea matricilor polimerice.

Lucrarea se încheie cu concluziile generale, perspectivele studiului efectuat și enumerarea referințelor bibliografice citate.

Rezumatul tezei de doctorat respectă denumirea capitolelor, numerotarea figurilor, tabelelor și a referințelor bibliografice.

1. Sisteme polimer-medicament cu eliberare controlată

Polimerii utilizați în medicină trebuie să îndeplinească o serie de condiții esențiale. În principal acestea sunt: biocompatibilitatea, non-toxicitatea, non-imunogenicitatea și biodegradabilitatea. Aceste caracteristici variază în funcție de sursa și proprietățile fizico-chimice ale polimerilor în discuție și devin indispensabile în elaborarea de sisteme de eliberare de medicamente. Există numeroase situații când medicamentele de masă moleculară mică administrate clasic nu reușesc să îndeplinească profilele terapeutice impuse datorită căilor fiziologice de apărare a organismului uman. Astfel apare necesitatea elaborării unor structuri complexe care să răspundă punctual în mediul cu care sunt puse în contact. Aceste structuri au la bază polimeri reticulați fizic și/sau chimic și se prezintă sub diferite forme: bureți, filme, nanoparticule, etc. Reticularea polimerilor conferă materialelor obținute proprietăți distincte față de cele ale constituenților macromoleculari. De aceea, se poate spune că posibilitățile de combinare a acestora și a agenților de reticulare sunt infinite. Dintre aceste biomateriale hidrogelurile simple și multicomponent ce formează rețele interpenetrante sau semi-interpenetrante au luat amploare în domeniul eliberării controlate de medicamente dar și în domenii ca ingineria tisulară unde biomaterialele polimerice îndeplinesc numeroase funcții.

Pentru controlul proprietăților fizice al acestor hidrogeluri se recurge la reticularea polimerilor liniari atât prin metode chimice cât și fizice [9, 10].

Hidrogelurile au captat tot mai mult interesul cercetătorilor în ultimul deceniu datorită proprietăților intrinseci pretabile aplicațiilor medicale. Biocompatibilitatea acestora, capacitatea de a elibera din rețeaua polimerică compuși hidrosolubili și versatilitatea în modelarea proprietăților fizico-chimice permit generarea de noi biomateriale cu aplicații în domeniul eliberării controlate de medicamente.

Chitosanul, gelatina și poli(alcoolul vinilic) sunt polimerii tratați mai detaliat în teza de doctorat, justificarea constând în faptul că acești polimeri au fost utilizați ca materii prime pentru cercetările efectuate. Sunt subliniate metodele de obținere, proprietățile acestora și aplicațiile în care se regăsesc până în prezent.

Principalele metode de obținere a hidrogelurilor pe bază de polimeri naturali sau/si sintetici sunt identificate și sunt enumerate proprietățile și aplicațiile potențiale ale acestor materiale. Hidrogelurile pot fi obținute prin două mecanisme principale: hidrogeluri cu legături covalente sau ireversibile și hidrogeluri cu legături reversibile sau fizice [101]. Cea de-a doua categorie cuprinde subclase variate cum ar fi interacțiunile ionice (hidrogeluri reticulate ionic sau complexe polielectrolitice) și interacțiuni secundare (hidrogeluri „încălcite”, hidrogeluri grefate sau complexate, etc.). În cadrul paragrafului “Reticularea prin legături de hidrogen” se detaliază proprietățile fizico-chimice și biologice ale acidului tanic, polifenol utilizat în calitate de reticulant al chitosanului sau amestecului chitosan/poli(alcool vinilic). Procesul de reticulare reprezintă o metodă prin care hidrogelurile se pot adapta cerințelor fiecărei aplicații (viteza de biodegradare, proprietățile mecanice, gradul de umflare, capacitatea de includere/eliberare principii active, porozitatea, etc.).

Pharmacocinetica și farmacodinamica eliberării de medicamente din hidrogeluri constituie subiectul unei cercetări bibliografice în care se arată interacțiunile dintre organism și medicament. Acestea pot fi clasificate în două categorii: procese farmacocinetice, când se analizează impactul pe care organismul îl are asupra medicamentului, și procese farmacodinamice, când accentul este pus pe acțiunea medicamentului asupra organismului [160]. Căile de administrare a formulărilor pe bază de

hidrogel sunt: orală, parenterală, nazală și transdermală. În funcție de mecanismul ce dictează eliberarea, acestea se pot clasifica în sisteme controlate de difuzie (sisteme cu membrană și sisteme monolit), sisteme controlate chimic (sisteme biodegradabile și bioerodabile), sisteme activate de solvent (controlate osmotic și controlate de umflare) și sisteme cu eliberare modulată [163]. Aceste mecanisme de eliberare sunt dictate de caracteristicile fizico-chimice ale hidrogelurilor dar și de metoda de încărcare a medicamentelor în suport.

Hidrogelurile, în orice formă de prezentare - filme, bureți, particule pline- prezintă o capacitate limitată de includere a medicamentelor, pe lângă dezavantajul că pot fi încărcate doar cu medicamente hidrosolubile sau cu solubilitate în amestecuri apă-alcool. În sfârșit, încărcarea lor cu medicament se face prin difuzie în timp, de regulă după ce au fost sintetizate. Multe dintre aceste dezavantaje pot fi recuperabile utilizând lipozomii ca vezicule capabile să încapsuleze, să transporte și să elibereze cantități mai mari de medicamente, atât hidrofile cât și hidrofobe. Principalul dezavantaj al acestor vezicule îl reprezintă stabilitatea lor mecanică și biochimică redusă, ceea ce nu le permite să reziste în sistemul circulator decât un interval redus de timp, după care se sparg eliberând brusc medicamentul încapsulat cu manifestarea unui „burst effect” pe curbele cinetice. Includerea de lipozomi purtători de medicamente în matricii polimere de tip hidrogel poate combina avantajele integrării celor două tipuri de purtători de principii active, reprezentând și o cale de modelare a cineticii de eliberare, ceea ce constituie obiectivul principal al acestei lucrări.

Mecanismul prin care medicamentul este eliberat depinde de modul de formulare al sistemului transportor și de calea de administrare. Administrarea pe cale orală, în funcție și de natura polimerului cu care este asociat principiul activ, va determina, în aparatul digestiv, fie o eliberare prin degradarea totală (enzime) chimică sau enzimatică a matricii, fie o eliberare guvernată de un proces difuzional, conform legii lui Fick [166]. De regulă, acest din urmă tip de eliberare este mai mult sau mai puțin perturbat de interacția medicamentului cu matricea polimeră, de porozitatea (dimensiunea porilor) acesteia sau de densitatea de reticulare.

Simplitatea cu care se pot realiza lipozomii, biocompatibilitatea de care dau dovadă, lipsa toxicității [168], similitudinea lipozomilor cu celulele și organele celulare interne atât din punct de vedere al dimensiunilor cât și a compoziției chimice [169-171], mărimea veziculelor ce poate fi modificată în funcție de specificul aplicației [172], posibilitatea înglobării atât a principiilor hidrofobe cât și a celor hidrofile, alături de sensibilitatea la stimuli ca temperatură, pH, lumină și câmp magnetic, fac din aceste formațiuni bistratificate biomimetice o arie de interes ce deschide noi orizonturi în domeniul nanotehnologiilor și implicit în cel biomedical.

Cercetarea bibliografică prezentată ne-a condus la concluzia că utilizarea unor sisteme complexe de tip polimer-lipozomi-medicament pentru reglarea procesului de eliberare a principiilor active reprezintă o nișă insuficient explorată.

Rezultate originale

2. Materiale și metode experimentale

2.1. Materiale

Materialele și reactivii utilizați pentru efectuarea studiilor au fost achiziționate de la firme specializate în producerea lor și sunt de puritate analitică. În continuare sunt prezentate selectiv cele mai importante materiale utilizate în studiul întreprins.

Pentru studiile efectuate a fost folosit chitosan de masă moleculară mare (HC) și chitosan de masă moleculară medie (MC), gelatină de tip B, de origine bovină, poli(alcool vinilic) cu un grad de hidroliză de 80%, aldehida glutarică (AG), sulfatul de sodiu, tripolifosfatul de sodiu, acid tanic, fosfatidilcolină, Triton X-100 extrapure, calceina și Sephadex G-25.

2.2. Metode experimentale

2.2.1. Tehnici de lucru

2.2.1.1. Metoda de preparare a hidrogelurilor CG obținute prin dublă reticulare

Metoda de preparare a hidrogelurilor obținute prin dublă reticulare se poate observa schematic în Figura 15. Pe scurt, hidrogelurile pe bază de CG și CP au fost preparate printr-o reticulare covalentă parțială cu AG urmată de o reticulare ionică cu $\text{Na}_2\text{SO}_4/\text{TPP}$ [104,109]. Condițiile de obținere au fost următoarele: polimerii, într-o cantitate totală de 125 mg, au fost dizolvați timp de 24 de ore în 5 mL soluție acid acetic 2% (v/v), la temperatura camerei. Cantitatea specifică de AG necesară pentru a reticula 20% dintre grupările aminice libere ale chitosanului și gelatinei a fost adăugată, în picături, sub agitare energetică, peste soluția de polimeri. Grupările aminice libere ale gelatinei au fost calculate ținând cont de compoziția aproximativă a aminoacizilor diamino monocarboxilici din gelatina de tip B [61]. Grupările aminice ale polizaharidului au fost calculate în funcție de gradul de deacetilare al acestuia. Cantitatea minimă optimă de AG pentru ca filmele să prezinte stabilitate mecanică minimă a fost fixată în urma unor teste preliminare. Amestecul obținut a fost supus ultrasonării la baia de ultrasunete pentru a se îndepărta bulele de aer formate în timpul agitării manuale. Ulterior, hidrogelurile au fost introduse în etuvă timp de o oră la temperatura de 40°C pentru a usca parțial hidrogelurile și a permite umflarea în soluția de reticulant ionic. Apoi, acestea au fost imersate în soluții apoase de sulfat de sodiu/tripolifosfat de sodiu de concentrații diferite timp de 30 de minute. Cantitatea corespunzătoare de agent de reticulare ionică a fost dizolvată în 10 mL apă distilată. Pentru optimizarea proprietăților hidrogelurilor s-a urmărit influența raportului masic între polimeri, a tipului de reticulant ionic și a cantității acestora.

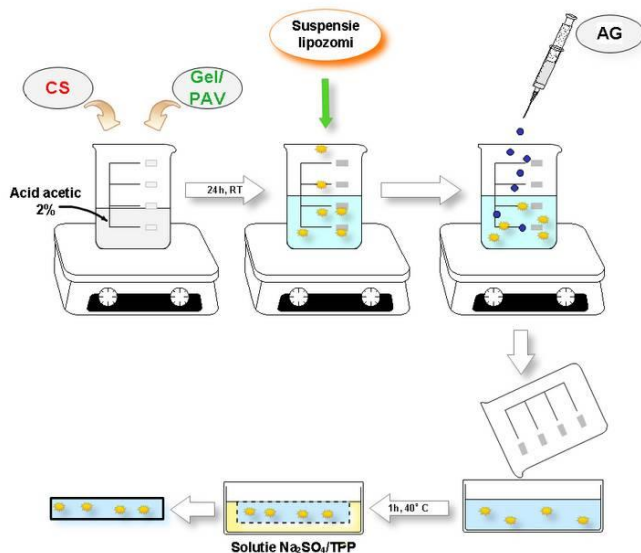


Figura 15. Reprezentare schematică a procesului de obținere a hidrogelurilor complexe dublu reticulate

2.2.1.2. Metoda de preparare a hidrogelurilor CP obținute prin dublă reticulare

Au fost obținute hidrogeluri dublu reticulate pe bază de CP prin aceeași metodă descrisă anterior (Figura 15) cu mențiunea că hidrogelurile reticulate covalent au fost imersate în soluții de reticulant ionic de concentrație 1% în toate cazurile. Parametrii variați au fost tipul de reticulant ionic și raportul între cei doi polimeri.

2.2.1.3. Metoda de preparare a lipozomilor SUV

Pentru prepararea lipozomilor de tip SUV pe bază de fosfatidilcolină s-a utilizat metodei hidratării filmului lipidic [244]. Principiul metodei constă în dizolvarea a 200 mg Phospholipon-90G într-un amestec de solvenți organici volatili - cloroform/metanol 2:1 (v:v) - într-un balon cu fund rotund de 250 mL, urmată de evaporarea lentă a acestora sub vid redus realizat cu un evaporator rotativ fixat la viteza de rotație de 60 rpm și temperatura de 30°C. Suspensia de lipozomi multilamelari rezultată a fost supusă ultrasonării la o sondă de ultrasunete la o frecvență de procesare de 20 kHz, pe baie de gheață. Această etapă permite reducerea dimensiunii lipozomilor precum și a polidispersității acestora. Pentru obținerea lipozomilor SUV a fost nevoie de 10 cicluri cu durata de 1 minut, permițând un timp de răcire de 30 de secunde. După ultrasonare, suspensia a fost lăsată la temperatura camerei timp de 2 ore pentru reasamblarea lipozomilor și corectarea defectelor membranare [245]. Separarea lipozomilor SUV de calceina liberă și de lipozomii MLV rămași s-a realizat prin cromatografie de excludere cu gel. A fost utilizat în acest scop o coloană de Sephadex G-25 - 25 cm lungime, 1 cm diametru - eluată cu soluție PBS (PH 7,4) cu debit de 2,2 mL/min. Datorită instabilității lipozomilor, aceștia au fost utilizați în primele ore de la preparare.

2.2.1.4. Metoda de preparare a hidrogelurilor obținute prin reticulare cu AT

În studiul efectuat au fost preparate și caracterizate două categorii de hidrogeluri obținute prin reticulare cu AT. Primul este cel pe bază de chitosan iar al doilea cel pe baza unui amestec CP în diferite rapoarte molare unul față de celălalt. Hidrogelurile au fost obținute prin dizolvarea a 200 mg polimer/amestec polimeric într-o soluție de acid acetic 2% cu un volum de 16 mL, la temperatura camerei. Agentul de reticulare a fost dizolvat de asemenea în 4 mL soluție acid acetic de aceeași concentrație ca în cazul anterior și a fost adăugat, în picături, peste soluția de polimer(i) sub agitare, rezultând o concentrație polimerică finală de 1%.

Soluțiile rezultate au fost păstrate sub agitare energetică timp de 30 minute, apoi au fost lăsate în repaus pentru îndepărtarea bulelor de aer formate și au fost turnate în forme de plastic, introduse apoi în etuvă la 60°C, pentru timpi prestabiliți în vederea evaporării apei și obținerii filmelor. A fost determinată valoarea t_0 , moment la care filmele prezintă integritate și pot fi desprinse din tăvițe pentru a putea fi imersate în apă distilată și a opri astfel procesul de reticulare. În toate cazurile, t_0 a fost atins după 12 ore. Ceilalți timpi analizați au fost $t_1=18$ h și $t_2=20$ h. După expirarea timpului, filmele au fost scoase de la etuvă și spălate cu apă distilată. În final, filmele au fost lăsate la uscat la temperatura camerei timp de 24 de ore. Pentru obținerea filmelor pe baza amestecului CP s-a urmărit protocolul descris anterior cu mențiunea că timpul de reticulare a fost de 20h.

2.2.1.5. Metoda de obținere a hidrogelurilor încărcate cu calceină

Pentru obținerea hidrogelurilor martor 640 μ g calceină a fost adăugată fiecărei soluții polimerice înaintea introducerii agentului de reticulare. Sistemele complexe au fost obținute în mod similar hidrogelurilor de control cu mențiunea că înaintea adăugării agentului de reticulare (fie AG, fie AT) a fost adăugat un volum cunoscut de suspensie de lipozomi a cărei concentrație de calceină a fost determinată prin spargerea lipozomilor cu tensioactivul Triton X-100 ce asigură determinarea cantității totale de calceină din suspensia de lipozomi utilizată.

2.2.2. Tehnici de caracterizare

2.2.2.1. Caracterizarea lipozomilor

2.2.2.2. Spectroscopia FT-IR

2.2.2.3. Microscopia Electronică de Baleiaj (MEB)

2.2.2.4. Studiul capacității de umflare a hidrogelurilor

2.2.2.5. Studiul capacității de eliberare a calceinei din hidrogeluri

2.2.2.6. Studiul cineticii de eliberare a AT din hidrogeluri

2.2.2.7. Teste de citocompatibilitate

2.2.2.8. Studiul degradării termice a hidrogelurilor

2.2.2.9. Studiul eliberării transdermice a calceinei

3. Hidrogeluri dublu reticulate pe bază de CG și CP: Obținere și caracterizare

Au fost obținute și caracterizate, respectiv utilizate în scopul studiilor cinetice propuse, două tipuri de hidrogeluri care au drept componentă comună chitosanul, iar ca parteneri gelatina, respectiv poli(alcoolul vinilic).

Având în vedere utilizarea acestor hidrogeluri în scopuri biomedicale, și dată fiind toxicitatea semnalată de mulți autori a AG [74], s-a optat pentru dubla reticulare - covalentă, respectiv ionică, care permite reducerea drastică a cantității de reticulant covalent și înlocuirea sa cu un reticulant ionic (sulfatul de sodiu, respectiv tripolifosfatul de sodiu) cu proprietăți de biocompatibilitate superioare AG. Acest fapt este posibil dată fiind natura substituenților la catena de bază a chitosanului și a gelatinei - grupe aminice - care în mediu slab acid cuaternizează transformându-se în cationi amoniu ce pot interacționa cu anionii din structura celor doi reticulanți amintiți.

Considerând prezența în chitosan și gelatină a grupărilor aminice ca substituenți, precum și faptul că reacția de reticulare se desfășoară în mediu acid, în Figura 29 am prezentat schematic reacțiile ce pot avea loc între ionii amoniu formați în mediu acid, atât cu reticulantul covalent, cât și cu cel ionic (anionul sulfat în acest caz), și care conduc final la obținerea unei structuri de tip rețea interpenetrată/interconectată.

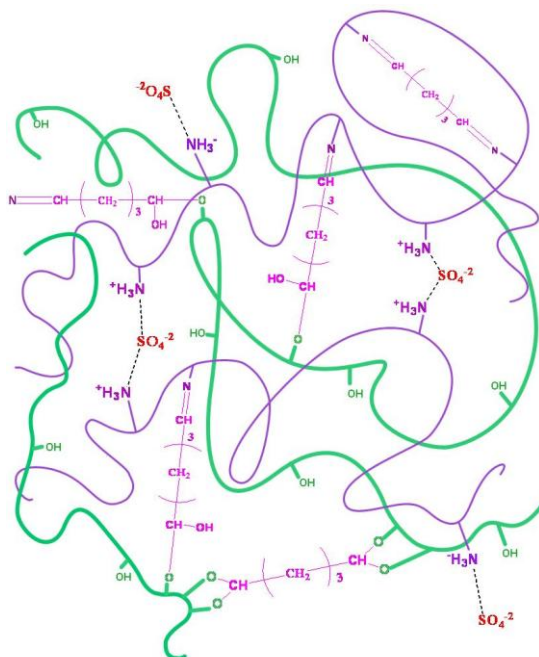


Figura 29. Prezentarea schematică a structurii hidrogelurilor realizate prin reticulare ionică cu sulfat de sodiu, respectiv covalentă cu AG cu formarea de grupări iminice, respectiv de cicluri acetale și legături semiacetale între AG și polimeri

Cei doi polimeri naturali utilizați participă la ambele tipuri de reticulare, cu precizarea că numărul punților create prin reticularea gelatinei este redus, datorită numărului mic de grupări aminice pe care le posedă proteina în comparație cu chitosanul. În principiu, chitosanul poate participa la reticularea covalentă atât prin gruparea aminică (cu formarea grupei iminice) cât și hidroxică (cu formarea grupei semiacetale), iar în cazul amestecurilor chitosan-poli(alcool vinilic) pot apare atât legături semiacetale cât și cicluri acetale.

3.2. Caracterizarea prin spectroscopie FT-IR

Aspecte structurale privind hidrogelurile sintetizate au fost obținute prin înregistrarea spectrelor de absorbție IR. Au fost caracterizați din acest punct de vedere polimerii de plecare, precum și câte unul dintre fiecare tip de hidrogel sintetizat (chitosan/gelatină, reticulat ionic cu anioni sulfat, respectiv tripolifosfat, precum și chitosan/poli(alcool vinilic) reticulat ionic cu anioni sulfat, respectiv tripolifosfat).

Spectrele FTIR probează faptul că reticularea, atât ionică cât și covalentă a avut loc, confirmând reacțiile propuse anterior.

3.3. Studiul comportării la umflare în PBS a hidrogelurilor dublu reticulate

Hidrogelurile pe bază de chitosan/gelatină și chitosan/poli(alcool vinilic) au fost caracterizate din punct de vedere al capacității de umflare în soluție tampon fosfat pH=7.4, dat fiind că această caracteristică influențează semnificativ procesul de eliberare prin difuzie a medicamentelor incluse. Capacitatea de umflare a hidrogelurilor obținute, evaluată prin gradul maxim de umflare atins după 48 ore, este dependentă de tipul și cantitatea de agent de reticulare ionică, dar și de natura polimerului partener la co-reticulare cu chitosanul.

În cazul hidrogelurilor pe bază de CG, gradul maxim de umflare după 48 de ore depășește valoarea de 1200% ajungând până la $\approx 1700\%$ pentru sistemele reticulate cu sulfat de sodiu. De asemenea, umflarea este mai redusă cu creșterea cantității de chitosan, pe de o parte datorită densității de reticulare mai mari determinată de numărul mai ridicat de grupe aminice (respectiv ioni amoniu) participante la reticulare, pe de altă parte datorită hidrofiliei mai reduse a polizaharidului.

Hidrogelurile reticulate cu TPP, la care densitatea de reticulare este mult mai mare ca în cazul sulfatului de sodiu, se constată o reducere substanțială a capacității de umflare.

În cazul hidrogelurilor pe bază de CP se remarcă, pentru ambele tipuri de agenți de reticulare ioni, amplificarea gradului maxim de umflare (la 48h). În cazul hidrogelurilor reticulate cu Na_2SO_4 gradul de umflare depășește 7000%, ajungând până la 9000%. Explicația constă în faptul că poli(alcoolul vinilic), care substituie gelatina, nu poate participa la reticularea ionică astfel încât densitatea de reticulare a rețelei obținute este mai joasă decât la hidrogelurile omoloage pe bază de CG. Creșterea cantității de chitosan conduce și în acest caz la o rețea mai densă, reducând ca urmare și gradul maxim de umflare. În cazul hidrogelurilor obținute prin reticulare cu TPP, gradul maxim de umflare este inferior celui obținut prin reticulare cu anioni sulfat, consecință a unei densități de reticulare mai ridicate, dar nu variază practic cu parametrii procesului de preparare.

3.4. Studiul cineticii de eliberare a calceinei din hidrogeluri

Din totalul de substanță activă inclus în filmele pe bază de CG reticulate covalent cu AG și ionic cu sulfat de sodiu o cantitate de 50-65% din cea inclusă în filme este eliberată progresiv în

supernatant timp de 5 zile. Trebuie remarcat faptul că alura curbelor cinetice de eliberare este tipică sistemelor difuzionale, observația incluzând și faptul că procesul de eliberare manifestă un „burst effect” relativ la fel de intens pentru toate sistemele studiate. Parametrii luați în discuție nu influențează semnificativ eliberarea calceinei. După circa o săptămână procesul de eliberare se oprește.

Același comportament se poate observa și în cazul sistemelor reticulate ionic cu TPP. Cantitatea de calceină eliberată atinge valorile maxime după 5 zile. În acest caz se remarcă o eficiență de eliberare a calceinei mai ridicată pentru toate cele 4 sisteme obținute.

Durata de eliberare a calceinei este considerabil redusă în cazul sistemelor ce conțin PAV așa cum se poate observa în Figura 37. Eficiența de eliberare se găsește în același interval însă apare efectul de eliberare bruscă a principiului activ inclus indiferent de tipul de agent de reticulare ionică utilizat. Cantitatea maximă este eliberată, în general, după maxim două zile, pentru ambii reticulanti ionici utilizați.

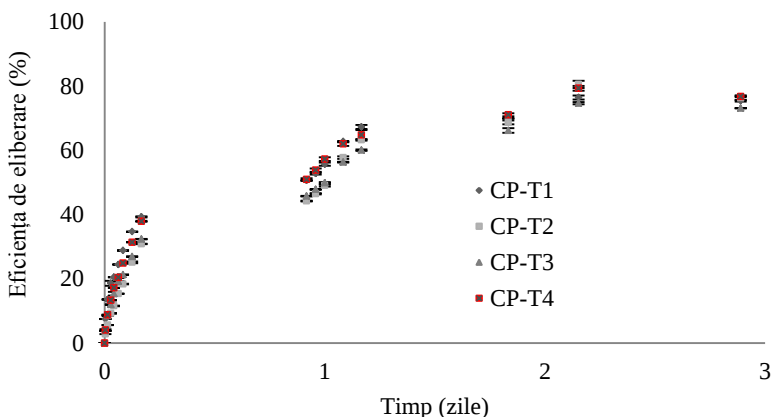


Figura 37. Variația în timp a eficienței de eliberare a calceinei din hidrogelurile martor pe bază de CP reticulate ionic cu TPP în soluție PBS, pH=7,4

Eliberarea calceinei din hidrogelurile martor este influențată, în principal, de prezența polimerului partener la co-reticulare. Poli(alcoolul vinilic) reduce semnificativ durata de viabilitate a hidrogelului (de la o săptămână la 1-2 zile). În plus, utilizarea TPP-ului are ca efect creșterea cantității și deci a eficienței eliberării calceinei din sistemele luate pentru analiză.

4. Hidrogeluri pe bază de chitosan și CP obținute prin reticulare cu AT

Un al doilea obiectiv al tezei de doctorat l-a constituit obținerea de noi hidrogeluri utilizând reticulanți total netoxici; pornind de la o indicație din literatură privind capacitatea AT de a reticula gelatina prin legături de hidrogen, ne-am propus realizarea unui studiu sistematic privind obținerea unor hidrogeluri pe bază de chitosan, reticulate cu acest polifenol. Pe lângă eliminarea reticulanților potențial toxici, utilizarea AT ar aduce și un aport suplimentar la activitatea biologică a unui astfel de hidrogel, adăugând la cea a chitosanului acțiunea antioxidantă binecunoscută a polifenolilor.

4.1. Structura chimică a hidrogelurilor

Acidul tanic conține 10 molecule de acid galic. Prezintă o moleculă de glucoză în centru ce se leagă cu 5 molecule de acid galic prin 5 legături esterice. Aceste molecule de acid galic la rândul lor sunt legate la alte 5 molecule de acid galic prin legături esterice (Figura 38) [250]. Deși nu este un acid carboxilic, este numit "acid" datorită grupărilor fenolice numeroase ce îi conferă caracter puternic acid.

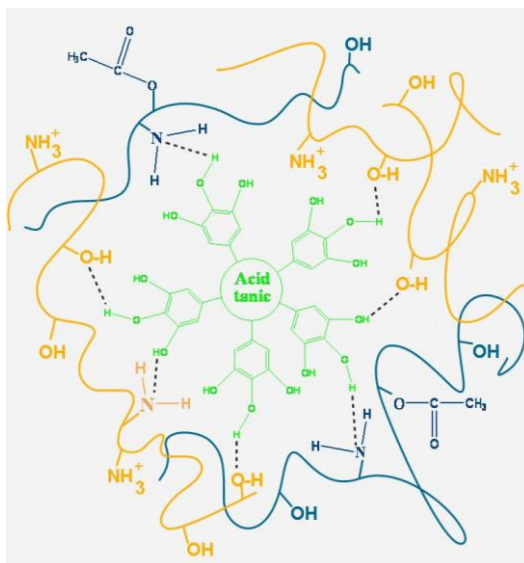


Figura 38. Reprezentare schematică a procesului de reticulare a chitosanului de către AT, prin realizarea legăturilor de hidrogen

Deși legăturile de hidrogen angajate de reticulant cu cei doi polimeri nu sunt foarte puternice, numărul lor ridicat conferă stabilitate hidrogelurilor obținute, nu doar în stare uscată ci și umflată.

În principiu, fiecare dintre cele zece grupări fenolice exterioare ale AT pot participa la reticulări. Din considerente sterice însă, doar o parte dintre acestea contribuie la formarea rețelei, pe de o parte datorită conformațiilor limitate pe care le poate lua molecula din cauza prezenței a numeroase

nuclee aromatice în structură, pe de altă parte chiar datorită distanței mici dintre grupările –OH ale chitosanului sau ale PAV ce nu permite nici participarea acestora în totalitate la reticulări.

4.2. Caracterizarea prin Spectroscopie FT-IR

Pentru a obține informații asupra structurii hidrogelurilor sintetizate, au fost selectate câteva dintre filmele obținute, spectrele FTIR înregistrate fiind discutate prin comparație cu cele ale polimerilor de plecare și ale reticulantului (reprezentate în absorbție). Aceste spectre indică faptul că în compoziția hidrogelurilor se regăsesc toate cele trei componente ale sistemului supus reticulării ceea ce atestă existența unor interacțiuni ce rețin componentele în structura hidrogelului.

4.3. Morfologia hidrogelurilor determinată cu ajutorul MEB

Filmele obținute prin reticulare cu AT fost caracterizate din punct de vedere morfologic prin Microscopie Electronică de Baleiaj. Figura 41 evidențiază aspectul suprafeței lor, pentru seria de hidrogeluri pe bază de chitosan de masă moleculară ridicată, reticulate cu AT la diferite rapoarte molare ale componentelor.

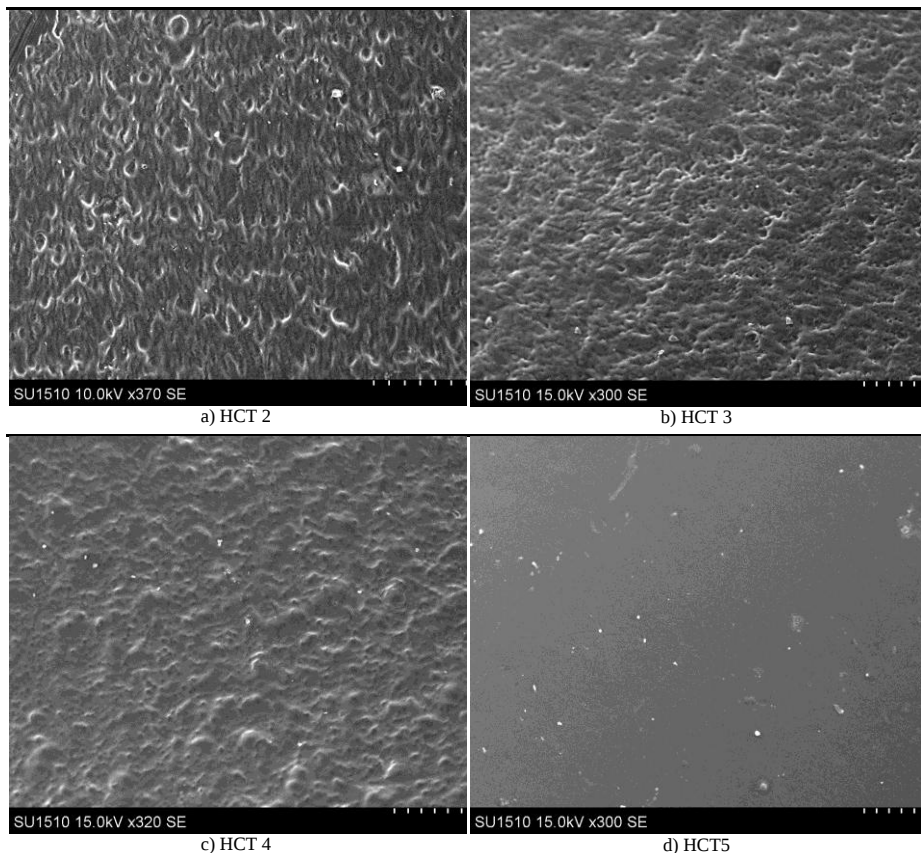


Figura 41. Morfologia filmelor pe bază de HC reticulate cu AT (la rapoarte diferite între parteneri)

Prezența în compoziția filmelor a unor cantități mari de reticulant are ca efect obținerea unei suprafețe rugoase (Figura 41.A). Aspectul rugos al suprafeței se atenuează prin reducerea cantității de polifenol, astfel încât filmele cu cantitate minimă de reticulant au un aspect neted (Figura 41.D).

Pentru proba la care raportul amestecului de polimeri și reticulant a fost de 30 s-a realizat și o fotografie care relevă aspectul secțiunii acestora. Este interesant de remarcat că filmul manifestă un aspect compact, lipsit de pori, informație care este utilă la elaborarea mecanismului de transport al medicamentului prin hidrogel, bazat pe difuzia prin rețea și nu prin porii acestora. Desigur, mecanismul anticipat trebuie validat prin teste de eliberare a principiului activ inclus în hidrogel.

Filmele pe bază de chitosan în amestec cu PAV reticulate cu AT prezintă un aspect diferit față de cele discutate anterior. Relieful este mai puțin rugos comparativ cu filmele pe bază de chitosan reticulate cu aceeași cantitate de AT, aspectul aparent poros dispare, dar la cantități mari de reticulant apar artefacte vizibile mai ales la raportul polimeri/AT=20. Explicația poate fi legată de faptul că PAV participă în mai mică măsură la formarea legăturilor de hidrogen cu AT (nucleofilicitatea atomilor de oxigen este mai redusă comparativ cu cea a atomilor de azot). În schimb, intervenind în formarea rețelei interpenetrate, el se poate intercala între macromoleculele de chitosan și reticulant, împiedicând participarea celor două componente cu numărul maxim de grupe funcționale ce pot interacționa.

4.4. Studiul degradării termice a hidrogelurilor determinat prin ATG

Dintre tipurile de hidrogeluri obținute în cadrul tezei de doctorat au fost selectate pentru acest studiu cele pe bază de chitosan, respectiv chitosan/poli(alcool vinilic) reticulate cu AT. Curbele de pierdere în greutate au fost înregistrate pentru intervalul de temperatură 25-700°C, în atmosferă de azot. Analiza termică diferențială evidențiază stabilitatea superioară a filmelor pe bază de chitosan față de polizaharid (Figura 43), dar mai redusă față de cea a poli(alcoolului vinilic).

Este interesant de reamintit faptul că până la temperatura de aproximativ 40°C pierderea de apă din hidrogeluri este inferioară chitosanului și nu depășește 2%, efect important din punct de vedere al aplicațiilor biomedicale (îndeosebi în ceea ce privește eliberarea de medicamente la nivelul pielii sau pe cale transdermală când retenția apei în cantitate cât mai mare și durata mai îndelungată de aplicare la nivelul pielii este de dorit).

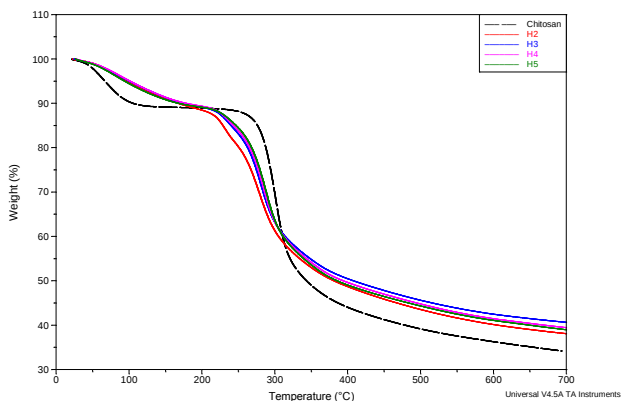


Figura 43. Curbele TG înregistrate pentru chitosan și hidrogeluri pe bază de chitosan de masă moleculară mare reticulate cu AT

4.5. Studiul comportării în apă a hidrogelurilor reticulate cu AT

Fiind vorba despre hidrogeluri, matrici capabile să includă/elibereze principii active hidrosolubile prin difuzie, comportarea lor în soluții apoase este extrem de importantă. Au fost analizate din punct de vedere al procesului de reținere a apei trei serii de filme, dintre care două reprezentând chitosan de două mase moleculare reticulate cu AT, iar cea de-a treia reprezintă filme rezultate prin co-reticularea de AT a unui amestec de HC/PAV.

O primă observație o constituie aceea că toate hidrogelurile prezintă capacitate ridicată de reținere a apei, gradul maxim de umflare variind în funcție de masa moleculară a chitosanului, de cantitatea de agent de reticulare și de compoziția amestecului de polimeri (în cazul hidrogelurilor pe bază de chitosan și PAV). Umflarea este practic instantanee, determinată desigur de caracterul hidrofil al chitosanului. În majoritatea cazurilor, după reținerea unor cantități mari de apă în primele 5-10 minute ale procesului, gradul de umflare nu mai variază foarte mult în timp, valoarea maximă fiind atinsă în cele mai multe cazuri după aproximativ două ore.

Un prim grup de hidrogeluri analizate din acest punct de vedere îl constituie cele pe bază de chitosan de masă moleculară mare, în diferite rapoarte molare față de reticulant, precum și la durate diferite (12, 18, respectiv 20 h). Analizând rezultatele prezentate în Figurile 48-50 se poate constata o evoluție logică a gradului maxim de umflare în funcție de cantitatea de AT- în sensul că acesta crește cu reducerea cantității de reticulant, ca urmare a scăderii densității de reticulare. Durata de reticulare nu constituie un parametru de influență a acestei caracteristici a hidrogelurilor. Urmărind valorile gradului maxim de umflare pentru hidrogeluri cu același raport molar C/AT nu se remarcă scăderea semnificativă a valorii acestuia cu creșterea duratei reticulării.

Pe majoritatea curbilor cinetice se poate identifica o valoare maximă a gradului de umflare, mai mult sau mai puțin accentuată, funcție de parametrii de obținere a filmelor. După atingerea acesteia, gradul de umflare scade uneori drastic, mai ales în cazul hidrogelurilor cu densitate de reticulare mai redusă. O astfel de situație se întâlnește și la hidrogelurile reticulate chimic, fiind tipică pentru cazul în care după o anumită durată sunt solubilizate fracțiuni de masă moleculară mică ce nu sunt prinse în reticulări [254]. În cazul hidrogelurilor obținute, speciile ce se pot solubiliza treptat fiind îndepărtate la timpi mai mari din hidrogel, sunt AT și fracțiile de polimer de masă moleculară mai redusă (ce conțin ca substituenți ioni amoniu formați în soluția slab acidă supusă reticulării) în virtutea caracterului polidispers al polizaharidului.

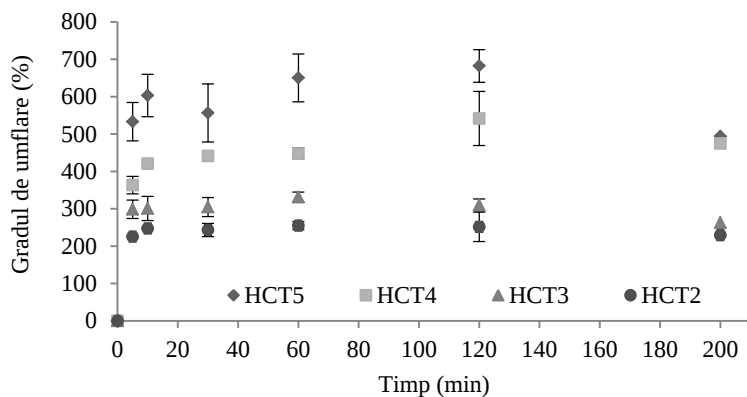


Figura 48. Variația în timp a gradului de umflare funcție de rapoartele molare HC/AT pentru hidrogeluri pe bază de chitosan de masă moleculară ridicată obținute la un timp de reticulare de 12h

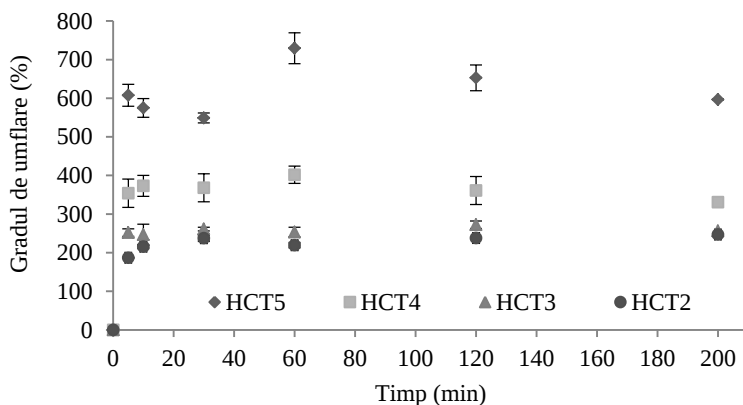


Figura 49. Variația în timp a gradului de umflare funcție de rapoartele molare HC/AT pentru hidrogeluri pe bază de chitosan de masă moleculară ridicată obținute la un timp de reticulare de 18h

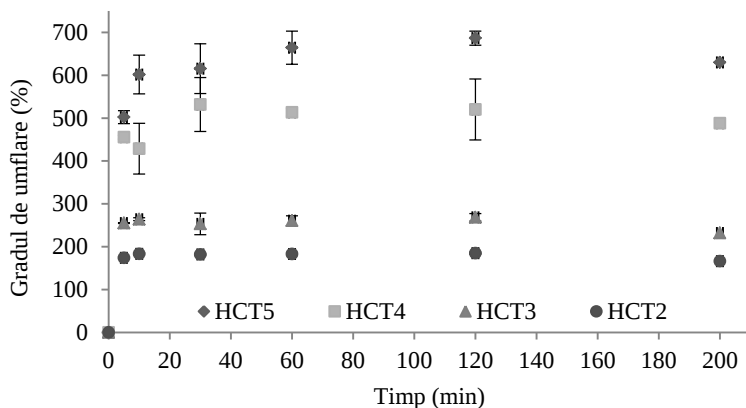


Figura 50. Variația în timp a gradului de umflare funcție de rapoartele molare HC/AT pentru hidrogeluri pe bază de chitosan de masă moleculară ridicată obținute la un timp de reticulare de 20h

A doua categorie de filme analizate, cele pe bază de MC reticulate cu AT au prezentat un grad mai ridicat de eterogenitate. Ca o observație generală, valorile gradului de umflare variază în domeniul 200-650%, funcție de compoziția hidrogelului analizat și sunt puțin reduse față de cele corespunzătoare hidrogelurilor obținute din chitosan de masă moleculară mare. În ceea ce privește influența compoziției de plecare în obținerea hidrogelurilor asupra caracteristicilor de umflare se confirmă concluzia anterioară în sensul că gradul de umflare, pe toată durata sa de evoluție, scade cu cantitatea de reticulant.

Al treilea grup de filme analizate l-a constituit cel pe bază de chitosan și PAV reticulat cu AT. Raționamentul studierii lor l-a constituit caracterul biocompatibil al PAV, pe de o parte, precum și posibilitatea de a regla hidrofilia filmelor în sensul reducerii sale prin aportul de PAV. În plus, ambii polimeri prezintă versatilitate în procesare și capacitatea de a forma filme în condiții moderate. Prezența PAV în compoziția filmelor reduce considerabil hidrofilia acestora, rezultatul fiind obținerea unor valori mult mai coborâte ale gradului de umflare (Figura 54). Pastrând constant raportul molar între polimeri, s-a urmărit influența cantității de agent de reticulare constatându-se că hidrogelurile cu conținutul cel mai mare de AT se umflă cel mai puțin în apă distilată. Acest comportament este similar cu cel observat în cazul filmelor din seria HCT; pentru filmele realizate la raport molar HC/PAV=1/1 (seria A), creșterea cantității de AT (de la amestec polimeric/acid tanic=50/1 până la 30/1) nu are ca efect o scădere prea mare a gradului de umflare.

Se confirmă, la toate cele trei serii de hidrogeluri o concluzie stabilită anterior, respectiv reducerea evidentă a gradului de umflare cu creșterea cantității de polifenol. O ultimă constatare o constituie faptul că la toate cele trei serii de filme se observă scăderea gradului de umflare la peste 200 de minute de la începerea procesului, dar în proporție mai redusă decât în cazul filmelor doar pe bază de chitosan. Nu este exclusă solubilizarea în timp a unor fracții de masă moleculară mai redusă de PAV.

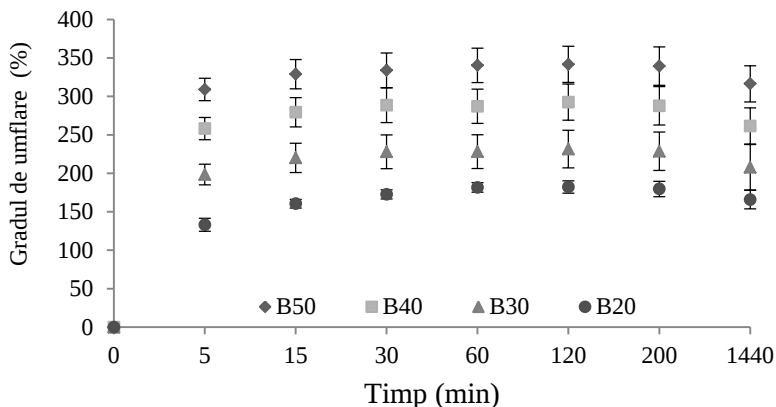


Figura 54. Variația în timp a gradului de umflare pentru hidrogeluri pe bază de CP (raport molar 3/1) funcție de diferite rapoartele molare polimeri/AT obținute la un timp de reticulare de 20h

4.6. Studiul cineticii de eliberare a AT din hidrogeluri

În timpul studiilor de umflare a hidrogelurilor pe bază de chitosan reticulat cu AT a fost remarcată o diminuare a masei acestora după atingerea valorilor maxime ale gradului de umflare. Fenomenul este datorat evident solubilizării unei cantități mici din componentele care participă la formarea rețelei iar acest fapt este explicabil prin faptul că legăturile care se stabilesc între reticulant și polimer în acest caz nu sunt de natură covalentă, ci legături mai slabe de hidrogen. În principiu, fracțiile solubile care se eliberează din rețeaua polimerică pot fi reprezentate de AT și chitosan. În consecință, o serie de filme provenind din chitosan de masă moleculară ridicată au fost studiate din punct de vedere al cineticii de eliberare a AT. Se impune a menționa că eliberarea parțială a AT poate fi considerată chiar ca fiind benefică, cunoscută fiind activitatea biologică a acestui compus.

Analiza curbelor cinetice de eliberare permite următoarele concluzii. Cel puțin până la durata de 8 zile, eliberarea AT se desfășoară conform unei cinetici tipice sistemelor difuzionale, cu un ”burst effect” pronunțat în primele 3-4 ore ale procesului. Efectul este determinat, probabil, de eliberarea AT de pe suprafața filmului sau din straturile superficiale ale acestuia unde moleculele de reticulant participă la formarea rețelei doar printr-un număr redus de grupe fenolice dintre cele 10 de care dispune. Cantitatea de AT eliberată după 8 zile este în strânsă corelare cu cea din compoziția amestecului supus reticulării. Cu cât hidrogelul este mai puțin reticulat cu atât este mai susceptibil la eliberarea reticulantului din matrice.

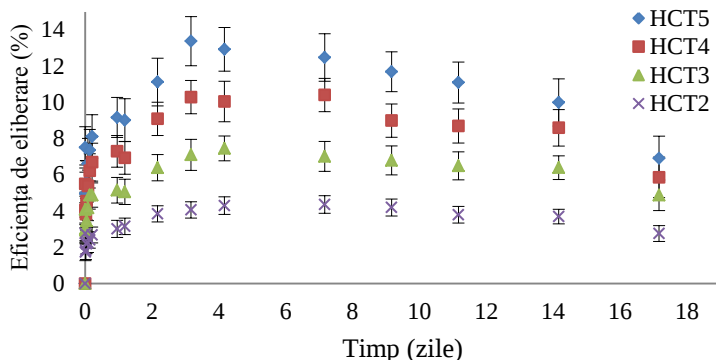


Figura 57. Variația în timp a eficienței de eliberare a AT în apă distilată din hidrogeluri obținute din chitosan de masă moleculară mare la rapoarte molare HC/AT diferite

Faptul că după aproximativ 3-4 zile cantitatea de AT difuzată în supernatant începe să scadă este surprinzător aparent; fenomenul poate fi explicat însă prin hidroliza grupelor esterice din polifenol cu formarea de molecule mai simple, precum acidul galic, care nu mai absoarbe în spectrul UV la aceeași lungime de undă ca AT. Acidul galic prezintă două maxime de absorbție situate la 220, respectiv 260 nm, în timp ce AT absoarbe la 280 nm [143]. Spectrul UV-vis înregistrat calitativ pentru supernatantul corespunzător hidrogelului HCT5 prezintă o absorbție slabă la aceste valori ale lungimii de undă, probând această ipoteză.

4.7. Studiul cineticii de eliberare a calceinei din hidrogeluri

Principala problemă a suporturilor macromoleculare de tip hidrogel, din punct de vedere al eliberării de medicamente, este difuzia rapidă a medicamentelor de masă moleculară redusă din aceste matrici, fapt ce se datorează dimensiunii ochiurilor rețelei polimerice formate, mai mare decât dimensiunea moleculelor de medicament. Este de așteptat ca un astfel de comportament să se înregistreze și în cazul hidrogelurilor obținute prin reticulare cu AT.

Au fost studiate din punct de vedere al capacității de eliberare a calceinei hidrogeluri pe bază de chitosan de masă moleculară ridicată, încărcate cu calceină în faza de preparare a filmelor, și imersate apoi în mediul de eliberare (soluție tampon fosfat - pH=7,4). Rezultatele sunt prezentate în Figura 58.

Din analiza variației eficienței eliberării calceinei în timp din hidrogeluri se observă o eliberare bruscă a acestui principiu activ model în primele 24 de ore, observație valabilă atât pentru hidrogelurile pe bază de C cât și pentru cele obținute pe baza amestecului CP. Acest “burst effect” este mai pronunțat în cazul hidrogelurilor cu cantități mici de agent de reticulare. Procesul de eliberare continuă intens timp de aprox. 24 ore, mai ales la hidrogelurile cu puțin AT în compoziție. De exemplu, hidrogelul obținut la un raport molar polimer/reticulant de 50/1 eliberează aprox. 90% din calceina inclusă în mai puțin de 24 de ore.

“Burst effect”-ul și, în general eficiența procesului de eliberare diminuează cu gradul de reticulare al hidrogelului, efect logic având în vedere difuzia încetinită a principiului activ prin rețele mai dense; de menționat buna corelare a acestor rezultate cu cele privind umflarea hidrogelurilor în apă.

De o manieră similară se comportă hidrogelurile pe bază de chitosan și PAV, însă cele mai puternic reticulate prezintă o capacitate de eliberare mai redusă și mai prelungită, fapt pus pe seama rețelei IPN formate.

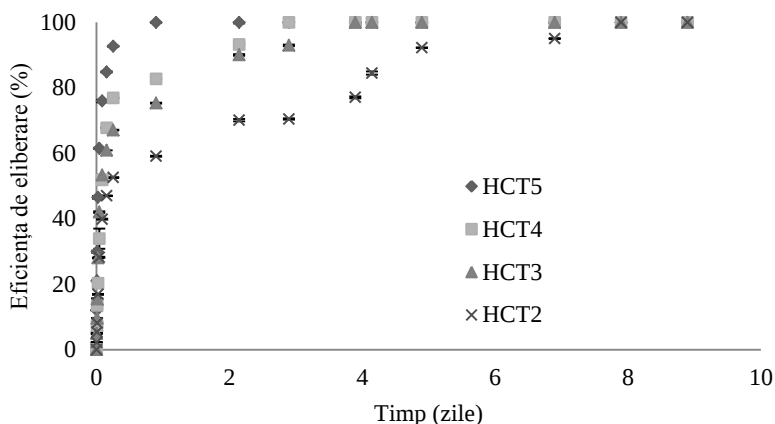


Figura 58. Variația în timp a eficienței de eliberare a calceinei din hidrogeluri pe bază de chitosan de masă moleculară înaltă funcție de diferite rapoarte molare polimer/reticulant

4.8. Citocompatibilitatea hidrogelurilor reticulate cu AT

Viabilitatea celulelor aflate în contact cu hidrogelurile preparate s-a menținut în limite care semnifică un comportament non-citotoxic al materialelor. O ușoară scădere a numărului de celule din culturile de celule experimentale poate fi cauzată de degradarea mecanică locală determinată de prezența materialului de consistență dură (Figura 60).

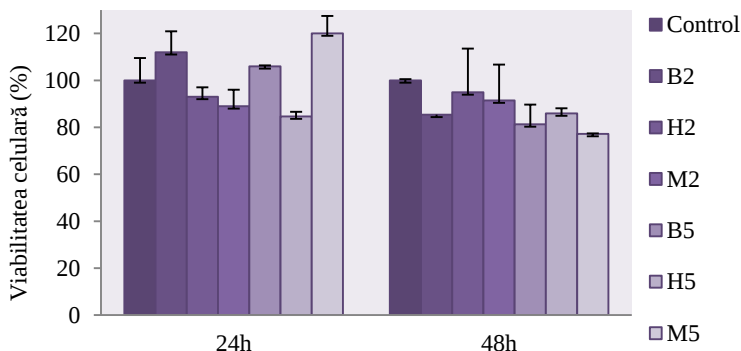


Figura 60. Viabilitatea celulară la 24h, respectiv 48h

Nu există diferențe semnificative de morfologie celulară între celulele incubate cu biomaterialele testate și culturile de control. În culturile experimentale nu există semne de apoptoză celulară sau modificări de formă și număr de nucleoli în nucleu (Figura 61).

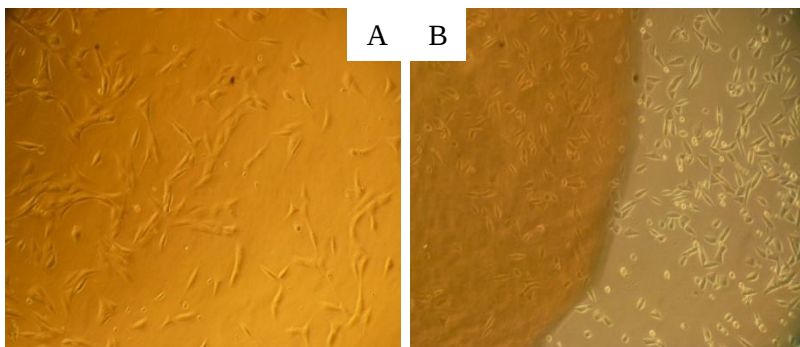


Figura 61. Imagine microscopică a celulelor în absența (A) și prezența unui film pe bază de HC reticulat cu AT (HCT2) (B)

Pe baza rezultatelor obținute în urma testelor de citotoxicitate se evidențiază faptul că materialele utilizate nu sunt citotoxice și nu eliberează substanțe citotoxice care să influențeze negativ proliferarea celulară, confirmând astfel posibilitatea utilizării acestor hidrogeluri în aplicații biomedicale.

4.9. Studiul eliberării transdermale a calceinei

Una din potențialele aplicații ale hidrogelurilor obținute în cadrul studiului este aceea de suporturi de medicamente utilizabile sub forma unor plasturi cu aplicare cutanată. Un tip de patologie pe care am avut-o în vedere este arsura de gradul 3 și gradul 4 (cele mai grave) care necesită aplicarea unor pansamente încărcate cu diverse molecule active (antibiotice, analgezice) cu rolul de a bloca pierderile de lichide din organism, a absorbi exudatul și a proteja rana de infecțiile secundare [140]. Aceste pansamente necesită îndepărtarea de pe piele la intervale de timp regulate și igienizarea locală. Procesul este complex, dureros și costisitor, de aceea, un material biocompatibil cu o durată de viabilitate prelungită, ce prezintă adezivitate și proprietăți hemostatice (grație utilizării polizaharidului), proprietăți antibacteriene, antioxidative, antimicrobiane și hemostatice (aport al polifenonului) aplicat pe arsură după încărcarea prelabilă cu medicamente este încă subiect de intense cercetări.

Au fost selectate pentru acest studiu cinetic transdermal al calceinei *in vitro* un hidrogel pe bază de chitosan reticulat cu AT și sistemul complex hidrogel-lipozomi-calceină constituit pe baza sa. Criteriul acestei alegeri l-a constituit faptul că hidrogelul analizat, cu gradul de umflare cel mai redus (aproximativ 200%), a prezentat cel mai redus “burst effect” din seria de hidrogeluri HC-AT. Un al doilea hidrogel analizat a fost HCT5, caracterizat de prezența celei mai mici cantități de AT, când s-a constatat că eliberarea este practic totală după 24 ore, cu un “burst effect” foarte pronunțat. Rezultatele au fost în foarte bună concordanță cu cele prezentate în subcapitolul 4.7. *Studiul cineticii de eliberare a calceinei din hidrogeluri*.

Figura 62 prezintă curbele cinetice de eliberare obținute pentru hidrogelul HCT2 și sistemul complex realizat pe baza acestuia.

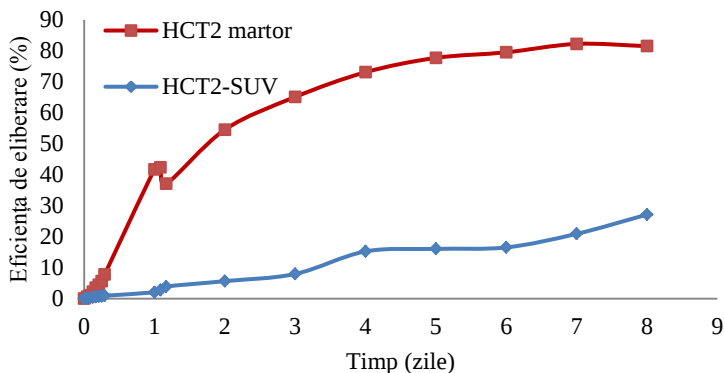


Figura 62. Variația în timp a eficacității eliberării calceinei dintr-un hidrogel pe bază de chitosan reticulat cu acid tanic, și sistemul complex hidrogel-lipozomi-calceină constituit pe baza sa

Studiul efectuat probează întârzierea eliberării calceinei, la fel ca în cazul rezultatelor prezentate în subcapitolul 4.7. Compusul model este eliberat din hidrogel cu „burst effect” pronunțat pe durata primei zile de experiment, în cantitate practic totală după 8 zile.

După cum era de așteptat, cinetica este mult mai lentă atunci când eliberarea se face din sistemul complex, eficiența fiind mult redusă după același interval de timp; important este faptul că s-a eliminat practic total „burst effect”-ul putându-se vorbi, practic, de o cinetică de „ordin zero”, dezideratul oricărui proces de eliberare controlată a medicamentelor.

Trebuie menționat faptul că în compartimentul celulei Franz, de unde sunt prelevate din timp în timp probele pentru dozarea cantității de calceină eliberată, testul cu Triton X-100 nu a condus la rezultate concludente privind prezența lipozomilor integri - valoarea „latency” a fost nulă, chiar negativă în unele situații. Rezulă în mod evident că lipozomii eliberați din matricea hidrogelului se eliberează imediat la ieșirea din aceasta sau întâlnind rezistența membranei care simulează derma, aceasta permițând doar trecerea moleculelor a căror greutate moleculară nu depășește valoarea de 16.000.

În concluzie, apreciem că sistemele complexe pe bază de hidrogeluri ale chitosanului reticulat cu acid tanic, încărcate cu lipozomi care încapsulează calceină - și prin extrapolare, medicamente hidrosolubile - sunt caracterizate de o cinetică de eliberare mult mai bine controlată atât din punct de vedere al cantității de principiu activ, cât, mai ales, al vitezei cu care acesta este eliberat. Acest rezultat confirmă, o dată în plus, justetea ipotezei de lucru care a stat la baza elaborării tezei.

5. Sisteme complexe pe bază de polimeri-lipozomi-medicament

Utilizarea hidrogelurilor în diferite domenii ale tehnologiei dar în particular ca biomateriale este determinată de proprietatea lor unică de a manifesta comportament intermediar materialelor lichide și solide. Caracterul hidrofilic al polimerilor din care hidrogelurile sunt realizate le asigură capacitatea de a reține cantități mari de apă și, în același timp, substanțe bioactive dizolvate în apă. Dezvoltarea acestor materiale a evidențiat de-a lungul timpului mai multe dezavantaje: capacitatea redusă de a reține medicamente, abilitatea de a încărca numai medicamente solubile în apă sau în amestecuri apă-alcool și eliberarea compusului activ cu un “burst effect” pronunțat. Acestea li se adaugă caracterul toxic al reticulantilor folosiți, în special al celor covalenți, ce implică operații de purificare costisitoare și de lungă durată. Principalul mecanism de eliberare a medicamentelor este difuzia prin matricea polimerică, în principal conform legii lui Fick [166] dar adesea perturbată de factori ca densitatea de reticulare, interacțiunea medicamentului cu suportul polimeric, porozitatea matricii, etc. Introducerea unei bariere suplimentare în procesul de eliberare a medicamentului poate fi o posibilitate de a controla cinetica de eliberare prin reducerea sau eliminarea “burst effect”-ului. Încapsularea medicamentului într-un rezervor a cărui membrană poate constitui o barieră suplimentară poate reprezenta o soluție pentru controlul procesului cinetic. Aceste rezervoare pot fi reprezentate de micro/nanocapsule cu o capacitate de încărcare mai mare decât a micro/nanoparticulelor pline de aceeași dimensiune. O categorie aparte de nano-rezervoare este reprezentată de lipozomi, vezicule lipidice auto-asamblabile, biocompatibile, ce pot încapsula atât medicamente hidrofile cât și hidrofobe. Principalul lor dezavantaj este instabilitatea biochimică și mecanică ce nu le permite să reziste în torentul sanguin. De aceea, includerea lipozomilor în matrici polimerice combină avantajele celor două tipuri de transportori, conturând o cale de a modela cinetica de eliberare a medicamentelor ceea ce reprezintă obiectivul principal al tezei de doctorat.

5.1. Caracterizarea și selectarea lipozomilor

Obiectivul principal al cercetărilor a fost elaborarea unor suporturi polimerice de tip hidrogel pentru controlul eliberării medicamentelor la nivelul pielii, suporturi implantabile sau adevize eligibile de a crește considerabil precizia de eliberare prin țintirea medicamentelor direct la locul de acțiune precum și de a asigura o viteză de eliberare constantă și adecvată eliberării transdermice pe o durată de timp îndelungată. Acest lucru este posibil prin utilizarea lipozomilor, care datorită efectului EPR prezintă capacitatea de a se acumula în țesuturi inflamate sau canceroase ce au o permeabilitate crescută pentru nanoparticule în comparație cu țesuturile viabile [198]. Colectarea lipozomilor de către macrofagele sistemului imun poate fi utilizată ca o altă metodă pasivă pentru elaborarea de vaccinuri pe bază de lipozomi [188].

În studiul de față au fost obținuți lipozomi de tip SUV, a căror diametru și polidispersitate au fost determinate cu ajutorul analizatorului de particule Shimadzu - Sald 7001. Diametrul acestora a fost de 120 ± 14 nm iar polidispersitatea relativ îngustă (Figura 63).

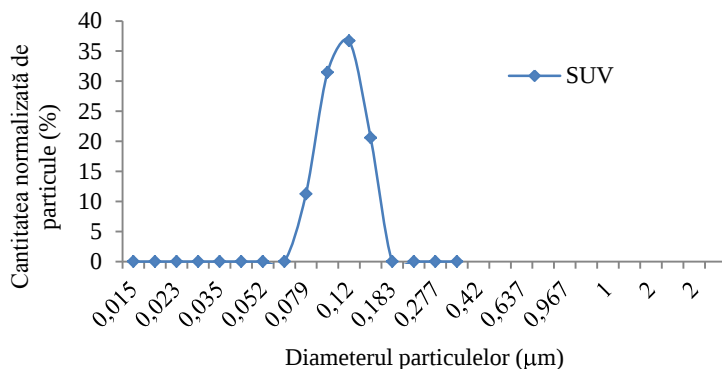


Figura 63. Curba de distribuție a lipozomilor SUV

5.2. Studii cinetice de eliberare a calceinei din sisteme complexe

5.2.1. Studiul eliberării calceinei din sisteme complexe dublu reticulate

Așa cum era de așteptat, atunci când principiul activ model a fost imobilizat în lipozomi, iar aceștia la rândul lor au fost incluși în matricea de hidrogel, cinetica se modifică în sensul că eliberarea are loc într-o manieră controlată și prelungită. Datorită faptului că principiul activ a fost inclus în filmele polimerice atât sub formă de lipozomi cât și în stare liberă (suspensia de lipozomi inclusă în film a prezentat, în toate cazurile, un *latency* de peste 90% ceea ce înseamnă că o cantitate de calceină liberă a fost mereu prezentă în suspensia utilizată), în primele momente ale eliberării se observă un „burst effect” diminuat specific sistemelor clasice de eliberare ce constă în eliberarea rapidă și necontrolată a unei cantități însemnate de compus. Acest fapt este datorat eliberării calceinei libere din masa hidrogelului dar mai ales din zonele dinspre suprafață. În cazul sistemelor de față acest fenomen poate fi prevenit prin purificarea suplimentară a lipozomilor obținându-se un profil de eliberare mai bun (luând în considerare volumul mai mare al lipozomilor în comparație cu cel al calceinei ce are implicații în procesul de difuzie).

Valorile cantității totale de calceină eliberată (atât încapsulată în lipozomi cât și liberă) în supernatant se situează în intervalul 4-9%. Ceea ce este interesant în acest caz este faptul că această cantitate de calceină este în continuă creștere chiar și după o perioadă de timp îndelungată. Acest fapt se datorează utilizării lipozomilor ce prezintă capacitatea de a difuza treptat prin matricea polimerică. Difuzia este dictată de ochiurile rețelei polimerice ce restricționează deplasarea acestora. Hidrogelurile obținute prezintă un efect protectiv pentru lipozomii dispersați în masa hidrogelurilor, o bună parte din ei rămânând intacti pe toată durata studiului efectuat.

Mai mult decât atât, parametrii variați în timpul procesului de obținere a hidrogelurilor determină un comportament cinetic logic. Datorită caracterului hidrofilic mai pronunțat al gelatinei în comparație cu chitosanul, sistemele cu un conținut mai ridicat de chitosan reduc difuzia calceinei și a lipozomilor.

Creșterea cantității de polizaharid în sistem scade gradul de eliberare al principiului activ și în cazul hidrogelurilor obținute prin reticulare ionică cu TPP. La creșterea cantității de chitosan în amestecul de plecare se obține reducerea concentrației de calceină în supernatant pentru toate cele trei

probe cu conținut mai mare de polizaharid evidențiind și de această dată caracterul hidrofil pronunțat al gelatinei.

În ceea ce privește influența tipului de agent de reticulare ionic se poate observa capacitatea de eliberare mai redusă în cazul sistemului reticulat cu TPP (cu excepția probei CG-T1) deși, teoretic, la cantitățile utilizate agenții de reticulare sunt capabili să lege același număr de grupări aminice protonate. Funcționalitatea mai mare a TPP-ului față de sulfatul de sodiu se concretizează prin retenția prelungită în matrice a lipozomilor. Acest fapt este în contradicție cu eliberarea calceinei din hidrogelurile martor unde TPP-ul determină eliberarea bruscă și amplă a materialului dispersat. Acest comportament poate fi pus pe diferența în dimensiuni a celor două materiale încapsulate. Această concluzie este valabilă pentru toate rapoartele masice între cei doi polimeri. Mai mult decât atât, ”burst effect”-ul care apare la sistemele reticulate cu Na_2SO_4 este înlocuit de eliberare treptată și prelungită a principiului activ, așa cum se poate observa în Figura 66.

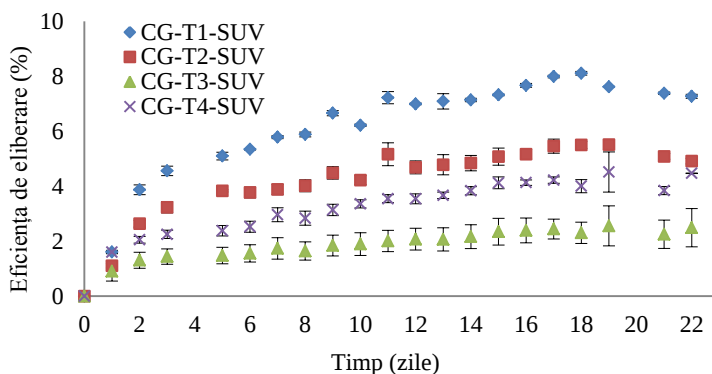


Figura 66. Variația în timp a eficienței de eliberare a calceinei din filmele pe bază de CG reticulate cu AG/TPP

În cazul sistemelor CP reticulate dublu cu AG și Na_2SO_4 /TPP s-a urmărit influența raportului între polimeri și a tipului de agent de reticulare ionică asupra proprietăților de eliberare a principiului activ hidrofil model din matrice. Comparând cineticele de eliberare a calceinei din hidrogelurile reticulate ionic cu Na_2SO_4 se observă faptul că gradul de eliberare a calceinei scade concomitent cu reducerea raportului CP punând în evidență de această dată hidrofilia polizaharidului care este mai însemnată decât cea a PAV. Plecând de la o cantitate de 10% PAV în sistem și până la 20% acest polimer reduce progresiv gradul de umflare și, respectiv, de eliberare a calceinei în supernatant. Excepția este dată de CP-S4 cu un conținut de 25% PAV în amestecul polimeric al cărui grad de umflare nu mai urmează tendința anterioară de reducere a capacității de eliberare a principiului activ. Cinetica ce aparține hidrogelului cu 25% PAV în sistem se situează deasupra cineticii corespunzătoare probei cu o concentrație de 10% PAV. El-Hefian și colab. au obținut amestecuri CP și au determinat gradul de umflare al acestor hidrogeluri [252]. Până la atingerea unui conținut de 30% PAV în sistem acest polimer reduce gradul de umflare al filmelor obținute însă, după depășirea acestui prag (probele cu 40 și 50% PAV), polimerul sintetic crește gradul de umflare al hidrogelurilor. Așadar, conținutul de PAV nu imprimă o relație de linearitate directă umflării, respectiv eliberării calceinei din hidrogelul format ci numai în anumite intervale de concentrație.

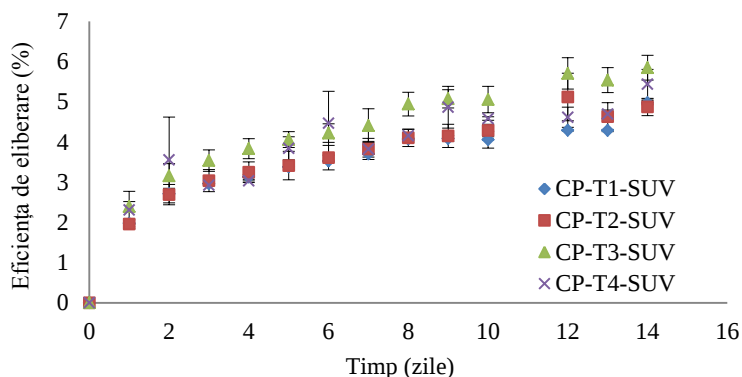


Figura 68. Variația în timp a eficienței de eliberare a calceinei din filmele pe bază de CP reticulate cu AG/TPP

5.2.2. Studiul eliberării calceinei din sisteme complexe obținute prin reticulare cu AT

Așa cum a fost arătat în capitolul anterior, sistemele compozit hidrogel-lipozomi au capacitatea de a reduce “burst effect”-ul prezent pe curbele cinetice de eliberare a unui principiu activ model hidrofil din hidrogel, în cazul în care densitatea de reticulare a acestei rețele este suficient de mare pentru a încetini difuzia lipozomilor. De aceea reducerea cantității de compus activ în primele zile ale studiului a fost mai evidentă în cazul sistemelor reticulate cu TPP, capabil de a forma hidrogeluri mai puternic reticulate.

Dintre toate hidrogelurile reticulate cu AT obținute și caracterizate au fost selectate cele pe bază de chitosan de masă moleculară înaltă și cele pe baza amestecului CP la raport molar CP de 3/1. Caracterizarea din punct de vedere al capacității de umflare în medii apoase a hidrogelurilor obținute prin reticulare cu AT a evidențiat un grad de umflare mai redus al acestor matrici polimerice în comparație cu hidrogelurile obținute prin dublă reticulare caracterizate anterior. Densitatea de reticulare mai mare sugerată de aceste rezultate se concretizează în reducerea substanțială a cantității de calceină eliberată din hidrogel, fie liberă, fie transportată de lipozomi.

Figura 69 prezintă curbele de variație în timp a eficienței eliberării calceinei pentru hidrogelurile pe bază de chitosan. Se poate constata, asemănător sistemelor complexe dublu reticulate, reducerea pronunțată a “burst effect”-ului până la dispariția sa; totodată, eliberarea calceinei este mult întârziată, eficacitatea procesului variind în limitele 5-7 % (funcție de raportul HC/AT) după 21 de zile. Familia celor 4 curbe de eliberare se plasează într-o ordine logică, eficiența eliberării reducându-se odată cu cantitatea de reticulant, respectiv cu densitatea de reticulare, în deplină concordanță cu curbele cinetice de umflare prezentate în paragraful 4.5.

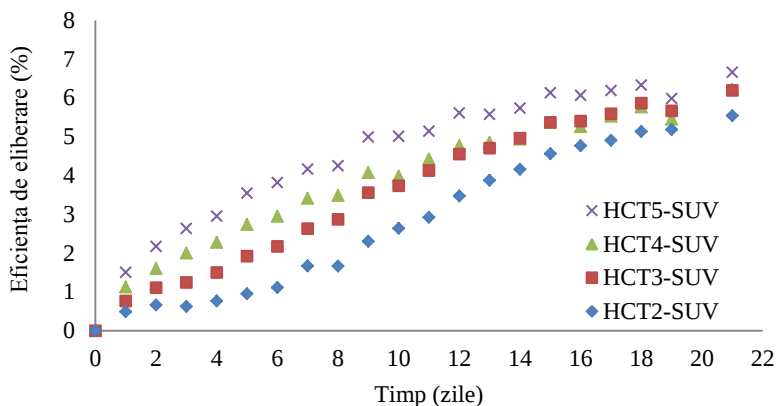


Figura 69. Variația în timp a eficienței de eliberare a calceinei din hidrogeluri pe bază de C reticulate cu AT

Parametrul de integritate lipozomală arată faptul că în primele 7 zile lipozomii ajung intacti în supernatant într-o proporție ridicată, destabilizând-se aici și eliberând calceina (Figura 70).

Surprinzător este însă faptul că hidrogelurile mai puternic reticulate prezintă valori ale acestui parametru mai mari. Ar fi fost de așteptat ca hidrogelurile cu rețele mai laxe să elibereze mai ușor lipozomii SUV încărcăți, și nu cele mai puternic reticulate. Pentru explicarea acestui efect avansăm următoarea ipoteză, care pornește de la precizarea semnificației parametrului de stabilitate lipozomală – *latency*. Valoarea acestuia exprimă, în fapt, care este procentul de calceină din cantitatea totală eliberată, care a provenit din lipozomi. După cum s-a constatat din studiul cinetic al eliberării calceinei inclusă direct în hidrogelurile reticulate cu AT, cele mai mici cantități de compus se eliberează (și cu viteză cea mai redusă) din rețelele cele mai reticulate (cu cantitate maximă de polifenol); această concluzie este confirmată de rezultatele obținute pentru sistemele complexe (Figura 69). În cantitatea totală eliberată regăsim atât calceina eliberată din rețea sub formă liberă, cât și încapsulată în lipozomii ce ajung intacti înafara matricii. Întrucât eficiența eliberării calceinei incluse direct în hidrogeluri este redusă la cele puternic reticulate, este logic să presupunem că și în sistemele complexe se eliberează cantitatea cea mai redusă de calceină în formă liberă. În aceste condiții, chiar dacă numărul de lipozomi ce difuzează prin matrice ajungând intacti la exterior este redus, ponderea calceinei pe care o poartă (și care este eliberată din aceștia prin tratarea cu tensioactivul Triton X-100) poate fi ridicată (ajungând până la aprox. 40 % din total, Figura 70). Pe măsură ce densitatea rețelelor scade, se eliberează tot mai multă calceină în formă liberă astfel încât ponderea celei eliberate în lipozomi (chiar în condițiile creșterii numărului acestora care ajung intacti în supernatant) se reduce (scade *latency*).

O altă observație importantă este aceea că, indiferent de compoziția hidrogelurilor, “burst effect”-ul dispare iar eliberarea este mult prelungită față de hidrogelurile de control în care calceina a fost inclusă în stare liberă.

Scăderea treptată a valorii *latency*-ului în timp poate fi explicată astfel. În primele zile ale procesului, difuzează spre exteriorul matricii îndeosebi lipozomii imobilizați în straturile sale superficiale, numărul acestora fiind ridicat. La durate mai mari ale procesului, îndeosebi peste 7 zile, ajung în exteriorul matricii lipozomii din straturile interne care, pe de o parte sunt din ce în ce mai puțin

numeroși, iar pe de altă parte întâmpină rezistența tot mai mare a straturilor groase ale rețelei, destabilizându-se chiar în hidrogel cu eliberarea calceinei. Se explică astfel de ce, deși *latency*-ul scade, cantitatea de calceină eliberată (exprimată prin eficacitatea eliberării) crește continuu.

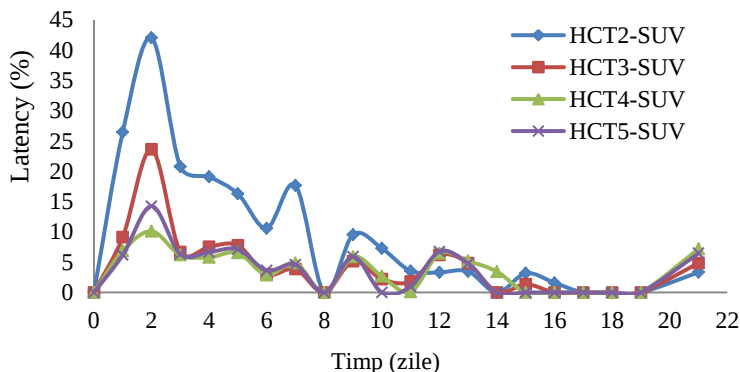


Figura 70. Parametrul de integritate lipozomală corespunzător hidrogelurilor HC-AT

Eliberarea din film și menținerea integrității acestor lipozomi devin importante dacă se intenționează utilizarea acestor hidrogeluri cu lipozomi purtători de medicamente în terapia țintită pasivă. În caz contrar, lipozomii îndeplinesc numai rolul de barieră suplimentară în difuzia medicamentelor, întârziind eliberarea acestora din hidrogeluri (pansamente cu substanțe active utilizabile în terapia arsurilor, de exemplu).

Un comportament asemănător este reliefat de hidrogelurile corespunzătoare amestecului CP. Eficiența de eliberare este mai redusă în acest caz, valorile maxime fiind atinse de hidrogelurile slab reticulate (maxim 5%) (Figura 71). Se păstrează însă ordinea de dispunere a curbelor cinetice în acest set de sisteme, în sensul că eficacitatea eliberării scade cu creșterea cantității de reticulant. Capacitatea acestor hidrogeluri de a se umfla în apă este mai redusă decât a celor doar pe bază de chitosan și de aceea a fost înregistrată o cantitate de calceină inferioară celei corespunzătoare hidrogelurilor C-AT. Eliberarea calceinei din filmele martor a prezentat diferențe asemănătoare în ceea ce privește variația eficacității procesului în funcție de compoziția filmelor.

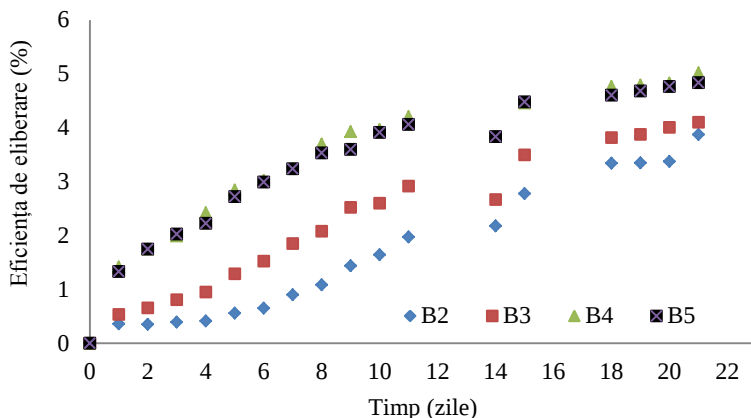


Figura 71. Variația în timp a eficienței de eliberare a calceinei din hidrogeluri pe bază de CP reticulate cu AT

Prin urmare, rezultatele prezentate indică clar faptul că densitatea de reticulare joacă un rol important în difuzia prin matrice atât a calceinei cât și a lipozomilor încărcăți cu calceină. În vederea prelungirii eliberării de principii active din matrici polimerice de tip hidrogel utilizarea lipozomilor ca barieră suplimentară este o metodă eficace. Acest procedeu a condus în cazul sistemelor de față la o eliberare a principiului activ apropiată de cea liniară și deci conformă cineticii de ordin zero [205].

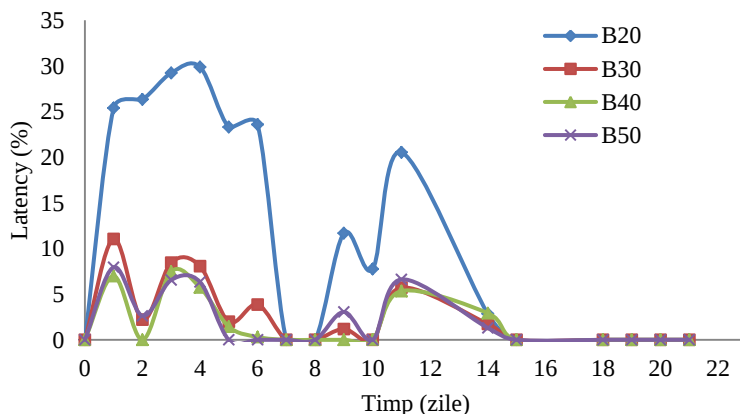


Figura 72. Parametrul de integritate lipozomală corespunzător hidrogelurilor CP reticulate cu AT

La fel ca și în cazul filmelor pe bază doar de chitosan, valoarea cea mai ridicată a parametrului de stabilitate lipozomală se înregistrează pentru filmele cele mai reticulate, explicația posibilă fiind cea anterioară. De asemenea, cu creșterea duratei procesului, valoarea *latency*-ului se reduce, în unele momente fiind chiar nulă. Este posibil ca, mai ales la durate de peste 14 zile, lipozomii

să nu mai ajungă intacti în afara matricii polimere, destabilizându-se în interiorul acesteia și determinând difuzia în continuare a calceinei doar în formă liberă.

5.3. Modelarea matematică a cineticii de eliberare a calceinei din hidrogeluri

Rezultatele experimentale prezentate în capitolele anterioare au demonstrat posibilitatea obținerii unor sisteme complexe de tip matrice polimeră-lipozomi-medicament, caracterizate de atenuarea "burst effect"-ului, necontrolat, și capabile de a elibera medicamentul hidrosolubil model ales pentru studiu – calceina, de o manieră mult mai bine controlată, pe tot intervalul procesului.

Fiind vorba despre un sistem complex, în care la eliberarea principiului activ concură mai multe fenomene, ne-am propus ca pe baza rezultatelor experimentale obținute să stabilim care este cel mai adecvat model matematic, respectiv ecuație cinetică, pentru a-l descrie. Am intenționat ca pe baza acestuia să obținem informații asupra mecanismului de transport al medicamentului prin rețeaua polimerului, respectiv să validăm pe cel formulat în capitolele anterioare.

Matricile polimere în care se includ/incapsulează medicamente pot fi formulate în diferite moduri, dar indiferent de forma lor, ele trebuie să fie biocompatibile, biodegradabile și, desigur, să aibă capacitatea de a elibera controlat principiul activ. Vorbind despre acest ultim aspect, trebuie să avem în vedere relația dintre administrarea medicamentului cât mai eficientă, la un nivel care să nu depășească pe cel terapeutic pentru a nu intra în domeniul toxic, dar nici prea coborât, situat în domeniul subterapeutic; ca urmare, trebuie să avem o imagine cât mai corectă a manierei în care se eliberează principiul activ, respectiv să cunoaștem foarte bine cinetica procesului.

Literatura este generoasă în lucrări care au ca scop identificarea funcțiilor matematice care fitează cel mai bine datele cinetice ale procesului de eliberare pentru sisteme polimer-medicament, foarte variate din punct de vedere al compoziției și al formulării. Multe dintre acestea sugerează că cinetica eliberării este influențată de factori precum masa moleculară a polimerului [256], chimismul procesului de obținere a matricii [257], pH-ul în care decurge procesul [258], dimensiunea particulelor, dacă matricea este formulată astfel [259], capacitatea de umflare a matricii polimere în mediul de eliberare [260], eroziunea matricii [261], difuzia [262], interacțiile fizice dintre medicament, matrice polimeră și mediul de eliberare. Aceste efecte nu acționează independent, interferând de cele mai multe ori ceea ce face imposibilă tratarea lor separată, ci în interdependență, cumulând efectele produse. Prin urmare, multitudinea de fenomene care apar în cursul procesului de eliberare și interdependența dintre ele determină complexitatea sistemului analizat și complică foarte mult analiza teoretică.

Începând de la modelul lui Higuchi [263] aplicabil sistemelor implicând matrici polimere care nu se umflă, deci controlate de difuzie (ecuația 8), au fost propuse ulterior numeroase modele bazate pe fenomene singulare precum umflarea, eroziunea sau dizolvarea - modele care, luând în considerare cel mult două fenomene ce decurg concomitent, conduc la ecuații matematice simple care satisfac mai mult sau mai puțin datele experimentale:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k_H \cdot t^{1/2} \quad (8)$$

unde M_t și M_∞ sunt cantitățile cumulate de medicament eliberat la timpul t și la infinit, iar k_H este o constantă caracteristică sistemului.

Majoritatea ecuațiilor propuse apelează la legi ale puterii, descriind cinetica eliberării din diferite tipuri de matrici. Un exemplu tipic este modelul empiric propus de Peppas (ecuația 9) [264]:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k \cdot t^n \quad (9)$$

unde M_t și M_∞ au aceeași semnificație ca în ecuația lui Higuchi, k este un parametru obținut experimental (prin analogie cu o reacție chimică, el exprimă constanta vitezei procesului de eliberare) iar n este un număr real, care poate oferi indicații și asupra mecanismului de eliberare. Dacă are loc o difuzie Fickiană, n este egal cu 0,5 (pentru un film subțire), 0,45 pentru o matrice cilindrică respectiv 0,43 pentru o matrice sferică. Când n depășește aceste limite, transportul medicamentului prin matrice se realizează prin difuzie non-Fickiană.

Ecuația lui Peppas este de fapt o aproximare a soluției legii lui Fick, fiind valabilă doar până la un raport $M_t/M_\infty = 0,6$, deci până când aprox. 60% din medicamentul încărcat în matrice a fost eliberat. Ecuația lui Peppas trebuie utilizată însă cu prudență pentru a clasifica mecanismul de eliberare pe baza valorii lui n . De exemplu, se cunoaște deja că, în ciuda unei difuziei Fickiene prin matrice, condițiile de graniță cum ar fi prezența unei suprafețe netede a matricii din care se face eliberarea, dau naștere unei eliberări caracterizate de o valoare a lui n mai mare decât 0,5.

S-a propus o nouă ecuație de către Peppas și Sahlin [265], care cuplează contribuția difuziei Fickiene cu cea non-Fickiană sub o formă liniară (ecuația 10).

$$M_t/M_\infty = k_1 t^n + k_2 \cdot t^{2n} \quad (10)$$

unde k_1 și k_2 sunt constante corespunzătoare contribuției Fickiene și, respectiv non-Fickiene.

O altă alternativă pentru descrierea profilelor de eliberare este bazată pe utilizarea empirică a funcției Weibull (ecuația 11) [266]:

$$M_t/M_\infty = 1 - \exp(-at^b) \quad (11)$$

unde a și b sunt constante.

Deși această funcție este aplicată frecvent pentru analiza proceselor bazate pe dizolvare și eliberare, ea a fost criticată pentru lipsa unei baze cinetice în utilizarea sa, respectiv pentru natura nefizică a parametrilor pe care îi implică [267]. Literatura prezintă însă o serie de încercări pentru a crește performanțele acestei funcții și a valida utilizarea sa [268].

O abordare alternativă, care reduce numărul de aproximări necesare în cazurile anterior prezentate o constituie cea bazată pe teoria fractalilor [269], justificată de faptul că polimerii, atât cei naturali cât și sintetici, pot fi incluși în categoria materialelor a căror structură poate fi descrisă prin intermediul geometriei fractale [270]. Utilizând tehnica de simulare Monte-Carlo pentru studiul eliberării medicamentelor prin difuzie, s-a stabilit că ecuația Weibull descrie bine toată curba de

eliberare când procesul decurge prin mecanismul difuziei Fickiene, în spațiu fractalic [271]. Deocamdată, aplicabilitatea acestui model este însă restrânsă doar la procesele de eliberare a medicamentelor din matrici polimere, controlate dominant de difuzie.

Aceste considerații teoretice bazate pe informațiile din literatura consultată ne-au servit pentru a aborda modelarea matematică a cineticii de eliberare a calceinei din hidrogelurile obținute, respectiv a sistemelor complexe hidrogel-lipozomi-calceină în sensul stabilirii modelului cel mai adecvat și a găsirii termenilor și coeficienților specifici ecuațiilor ce modelează cinetica pentru fiecare dintre cazurile analizate.

De la bun început a fost exclus modelul și ecuația cinetică a lui Higuchi, care se aplică sistemelor care nu suferă procesul de umflare în apă, respectiv în medii fiziologice, fiind utilizat doar la descrierea celor bazate pe utilizarea de matrici practic hidrofobe, în care singurul mecanism de transport al medicamentului îl constituie difuzia. În mod logic, un astfel de model nu poate fi aplicabil sistemelor matriciale de tip hidrogel, indiferent de modul în care se realizează rețeaua tridimensională.

Utilizarea celorlalte trei modele discutate anterior a permis stabilirea unor ecuații care descriu procesul, ai căror coeficienți de corelare au permis o nouă selecție. Astfel, valori mai mici în general, variind aleator și între limite largi în cadrul fiecăreia dintre seriile de hidrogeluri analizate, au fost obținute prin aplicarea modelului Peppas-Sahlin. În consecință, s-a renunțat și la utilizarea acestui model pentru cazul de față, mai ales că el este aplicabil, conform lucrărilor consultate, la sisteme formulate ca cilindri, sfere sau discuri, și nu la filme subțiri.

Modelele Weibull și Peppas au aproximat cel mai bine datele experimentale obținute pentru toate hidrogelurile și sistemele complexe obținute, probând coeficienți de corelare ridicați.

După cum s-a menționat anterior, ecuația Weibull aproximează foarte bine datele cinetice pe tot domeniul experimental, pe numeroase sisteme la care a fost aplicată. Puși în fața situației de a alege unul dintre cele două modele, am optat însă final pentru modelul Peppas, argumentele fiind următoarele:

- ecuația Weibull are aplicabilitate doar pentru sistemele controlate de difuzie și dizolvare, pentru care a și fost conceput modelul, în timp ce ecuația Peppas este aplicabilă și sistemelor controlate de eroziunea matricii, celor controlate de difuzia prin pori precum și celor în care se manifestă diferite tipuri de interacții între medicament și matricea polimeră;
- termenii și exponenții ecuației Weibull nu au o semnificație fizică, pe când cei ai ecuației Peppas, îndeosebi exponentul, în funcție de valoarea sa, oferă indicații asupra mecanismului de transport, respectiv eliberării acestuia din matricea polimerică.

Există însă și dezavantajul faptului că ecuația Peppas își dovedește valabilitatea, respectiv aproximează bine datele cinetice doar pe intervalul de timp până la care medicamentul se eliberează în proporție de 60-65 %.

Analiza avantajelor și dezavantajelor oferite de cele două modele matematice ne-au determinat ca în final să optăm la clasicul model și ecuație Peppas pentru descrierea cineticii de eliberare a calceinei din toate hidrogelurile și sistemele complexe studiate, pentru compararea acestora și elaborarea unor ipoteze privind mecanismul de transport al calceinei ca exponent al unui medicament hidrosolubil, din matricile în care a fost inclusă.

În cele ce urmează vor fi prezentate, comparativ, curbele cinetice de eliberare pe tipuri de hidrogeluri, respectiv sisteme complexe, "fitate" cu ecuația Peppas, precum și valorile parametrilor acesteia pentru fiecare caz în parte.

5.3.1. Hidrogeluri pe bază de amestecuri CG dublu reticulate și sisteme complexe bazate pe acestea

Figurile 73 **a** și **b** prezintă curbele de variație a eficienței eliberării calceinei din *hidrogeluri reticulate ionic cu anioni sulfat*, respectiv din *sisteme complexe* pe baza acelorași hidrogeluri și lipozomi SUV încărcăți cu calceină.

Pentru cazul hidrogelurilor neîncărcate cu lipozomi (Figura 73a) procesul de eliberare a fost monitorizat numai până la o valoare a eficienței eliberării de 65%, limita maximă de aplicabilitate a ecuației Peppas; aceasta este atinsă după un interval de timp de 5 zile.

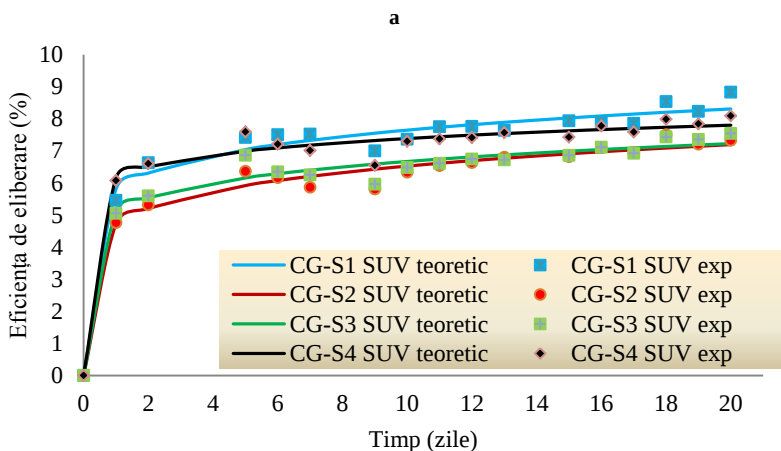
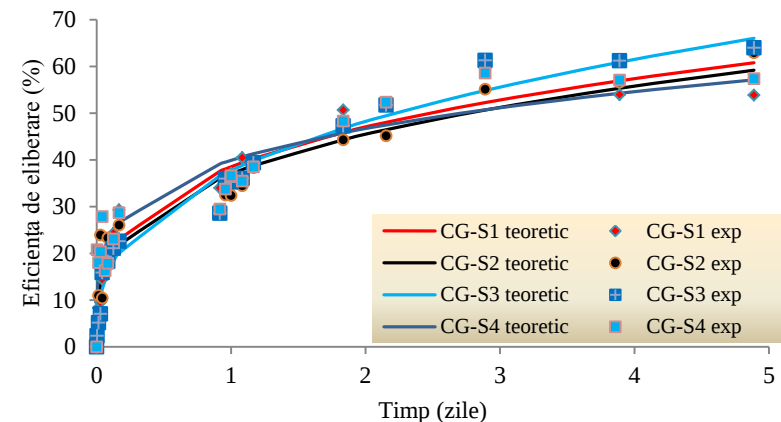


Figura 73. Variația în timp a eficienței eliberării calceinei din hidrogeluri pe bază de CG dublu reticulate (cu anioni sulfat) (a), respectiv din sisteme complexe pe baza acestor hidrogeluri încărcate cu lipozomi SUV conținând calceină încapsulată (b)

Se constată că ecuația Peppas aproximează foarte bine datele experimentale, fapt ce reiese evident și din valorile ridicate ale coeficienților de corelare prezentate comparativ în Tabelul 6, împreună cu valorile parametrilor specifici modelului.

Tabelul 6. Valorile parametrilor ecuației Peppas și ale coeficienților de corelare pentru hidrogeluri pe bază de chitosan și gelatină dublu reticulate (cu anioni sulfat) (a), respectiv pentru sisteme complexe pe baza acestor hidrogeluri încărcate cu lipozomi SUV conținând calceină încapsulată (b)

Sistem analizat	Codul sistemului	k	n	Coeficient corelare
Hidrogeluri dublu reticulate cu anioni sulfat	CG-S1	0.376194	0.255407	0.970246
	CG-S2	0.370523	0.293748	0.975797
	CG-S3	0.372568	0.312422	0.978605
	CG-S4	0.396528	0.216956	0.953943
Sisteme complexe hidrogel dublu reticulat-lipozomi-calceină	CG-S1 SUV	0.058062	0.119584	0.98845
	CG-S2 SUV	0.047173	0.140924	0.98958
	CG-S3 SUV	0.051082	0.115806	0.986597
	CG-S4 SUV	0.061522	0.079261	0.988572

După cum se poate constata, constanta k se grupează în jurul a două valori, diferite pentru cele două sisteme analizate. Pentru hidrogelurile simple, valorile constantei sunt mult mai ridicate decât pentru cele complexe, indicând (fapt evidențiat și de curbele de eliberare) viteze mai mari ale procesului. Similar, exponentul n variază pe două plaje de valori, specifice fiecărui sistem. Abaterea mare de la valoarea $n = 0,5$ indică un proces de eliberare controlat și de alți factori înafară de difuzie. În capitolele referitoare la cinetica procesului (Subcapitolele 3.4 și 4.7) precizăm că între calceină și polimerii din compoziția hidrogelurilor apar inițial interacțiuni de tip ionic, dar la suspendarea în soluția apoasă de eliberare (tampon fosfat), datorită pH-ului slab bazic al acesteia, unele legături ionice din rețea se desfac, ionii amoniu sunt neutralizați la grupări aminice, fiind posibilă astfel apariția de legături de hidrogen între acestea și compusul hidrosolubil model. Aceste interacțiuni între calceină și matrice sunt reflectate în reducerea exponentului n , probând faptul că procesul de eliberare nu este controlat doar de difuzie, ci și de posibila erodare a matricii polimere.

Valorile și mai coborâte ale acestui coeficient pentru sistemele complexe pe baza aceluiași tip de hidrogeluri indică apariția încă a unui factor perturbator. În opinia noastră, este vorba despre difuzia mult încetinită a lipozomilor purtători de calceină prin matricea polimeră, ceea ce determină și eliberarea unor cantități mai mici de compus la durate similare celor corespunzătoare hidrogelurilor simple, pe intervalul de timp 0 – 5 zile.

Faptul că după 20 zile eficiența eliberării calceinei este de maxim 8% (funcție de sistem), deci mult inferioară limitei de 65%, face ca ecuația Peppas să fie valabilă pe tot intervalul de timp studiat.

Concluziile de mai sus sunt, în general, valabile și pentru *hidrogelurile dublu reticulate cu anioni de TPP, respectiv sistemele complexe* pe baza aceluiași hidrogeluri și lipozomi SUV încărcăți cu calceină.

Figurile 74 **a** și **b** prezintă curbele cinetice de eliberare a calceinei din cele două tipuri de sisteme. Este surprinzător faptul că ecuația Peppas descrie foarte bine procesul în cazul hidrogelurilor simple chiar și la valori ale eficienței eliberării de peste 65 % (85 % în cazul de față).

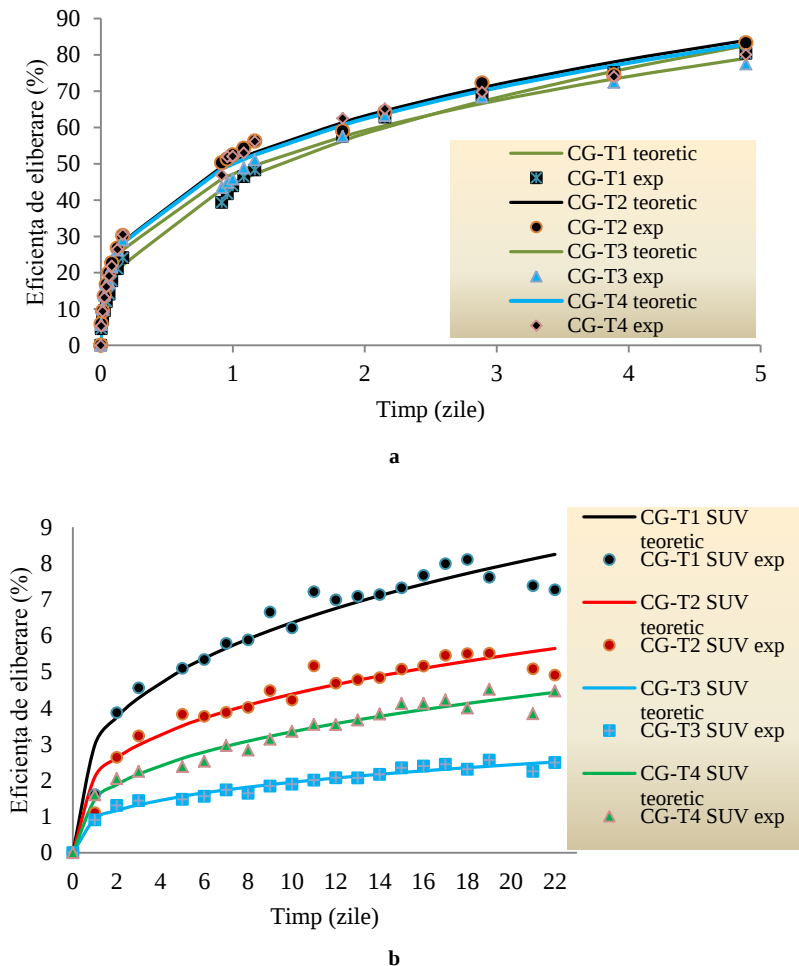


Figura 74. Variația în timp a eficienței eliberării calceinei din hidrogeluri pe bază de CG dublu reticulate (cu anioni TPP) (**a**), respectiv din sisteme complexe pe baza acestor hidrogeluri încărcate cu lipozomi SUV conținând calceină încapsulată (**b**)

Valorile coeficienților de corelare pentru ecuațiile celor două tipuri de sisteme sunt, de asemenea, ridicate. Acestea sunt prezentate în Tabelul 7, împreună cu cele ale termenilor-exponenților modelului.

Tabelul 7. Valorile parametrilor ecuației Peppas și ale coeficienților de corelare pentru hidrogeluri pe bază de CG dublu reticulate (cu anioni TPP) (a), respectiv pentru sisteme complexe pe baza acestor hidrogeluri încărcate cu lipozomi SUV conținând calceină încapsulată (b)

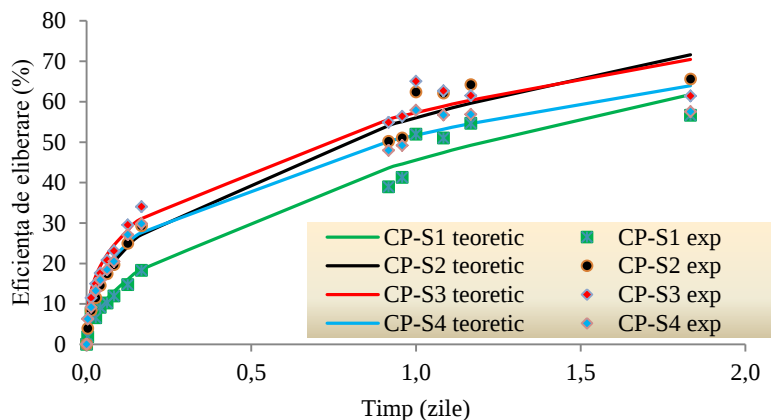
Sistem analizat	Codul sistemului	k	n	Coeficient corelare
Hidrogeluri dublu reticulate cu anioni TPP	CG-T1	0.438205	0.335624	0.98537
	CG-T2	0.494882	0.28157	0.985102
	CG-T3	0.465301	0.296498	0.99199
	CG-T4	0.489736	0.284577	0.987275
Sisteme complexe hidrogel dublu reticulat-lipozomi-calceină	CG-T1 SUV	0.0297626	0.329731	0.972792
	CG-T2 SUV	0.020928	0.321062	0.968516
	CG-T3 SUV	0.009315	0.320165	0.985369
	CG-T4 SUV	0.014656	0.357988	0.984252

Se remarcă, din nou, valorile mult mai coborâte ale constantei k pentru sistemele complexe, logice însă dată fiind și în acest caz viteza mult mai mică cu care se face eliberarea, comparativ cu hidrogelurile martor. Valorile exponentului sunt, de asemenea, mult diferite de $n = 0,5$, ceea ce duce la concluzia că procesul de difuzie este perturbat de alți factori, în principiu aceiași cu cei discutați anterior. Faptul că acestea sunt ușor superioare, în general, celor corespunzătoare hidrogelurilor reticulate cu anioni sulfat, mai ales în cazul sistemelor complexe, poate fi consecința unui proces mai puțin intens de erodare a matricii, fapt absolut plauzibil dată fiind densitatea de reticulare mai ridicată și deci rezistența chimică mai mare a matricii la acest proces.

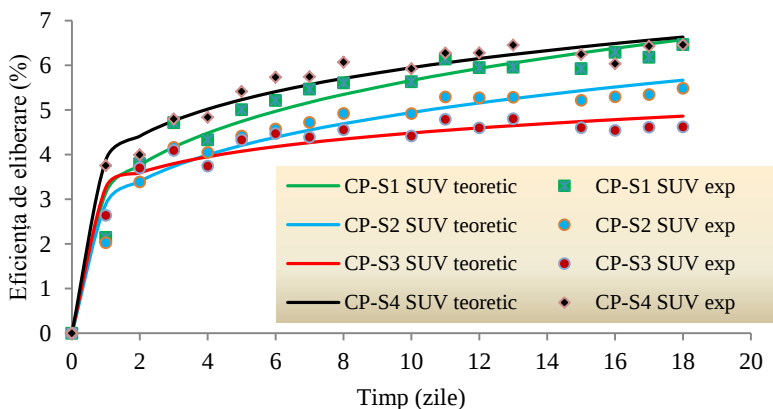
5.3.2. Hidrogeluri pe bază de amestecuri CP dublu reticulate și sisteme complexe bazate pe acestea

Prezența poli(alcoolului vinilic) în compoziția *hidrogelurilor reticulate cu anioni sulfat și a sistemelor complexe corespunzătoare* nu afectează valabilitatea modelului Peppas, curbele teoretice fiind din nou în foarte bună concordanță cu datele experimentale, după cum se poate constata din analiza Figurii 75 (a și b). Se remarcă și în acest caz că ecuația aproximează bine cinetica obținută prin experiment pentru hidrogelurile simple încărcate direct cu calceină, chiar la valori mari ale eficienței de eliberare (de până la 75 %). Valorile coeficientului de corelare sunt ridicate, justificând încă o dată valabilitatea modelului aplicat (Tabelul 8).

Valorile parametrilor ecuației sunt însă mai ridicate decât în cazul sistemelor CG, corespunzător unei viteze de eliberare ușor mai mari, evidentă dacă se compară valorile eficienței procesului corespunzătoare aceleiași durate pentru cele două sisteme. Efectul a fost explicat (Subcapitolul 3.1. *Chimismul reacției de reticulare a hidrogelurilor*) prin faptul că rețeaua interpenetrată a hidrogelurilor chitosan - poli(alcool vinilic) este mai puțin densă, consecință a neimplicării polimerului sintetic în reticularea ionică; desigur, aceasta determină o difuzie mai facilă a calceinei prin matrice.



a



b

Figura 75. Variația în timp a eficienței eliberării calceinei din hidrogeluri pe bază de chitosan și poli(alcool vinilic) dublu reticulate (cu anioni sulfat) (a), respectiv din sisteme complexe pe baza acestor hidrogeluri încărcate cu lipozomi SUV conținând calceină încapsulată (b)

Sensibil mai mari sunt valorile exponentului n , care pentru sistemul CP-S1 indică un proces clar de eliberare controlat de difuzie. Faptul că PAV nu participă la reticularea ionică poate explica acest efect: erodarea matricii prin acțiunea tamponului fosfat, care poate scindea o parte dintre legăturile reticulantului ionic cu chitosanul, este mai puțin intensă decât în cazul hidrogelurilor ce conțin gelatină, astfel încât difuzia devine factorul dominant în transportul calceinei prin matrice.

Eliberarea din sistemele complexe este foarte bine descrisă de ecuația Peppas, după cum se poate constata din analiza Figurii 75 b și din valorile coeficienților de corelare (Tabelul 9).

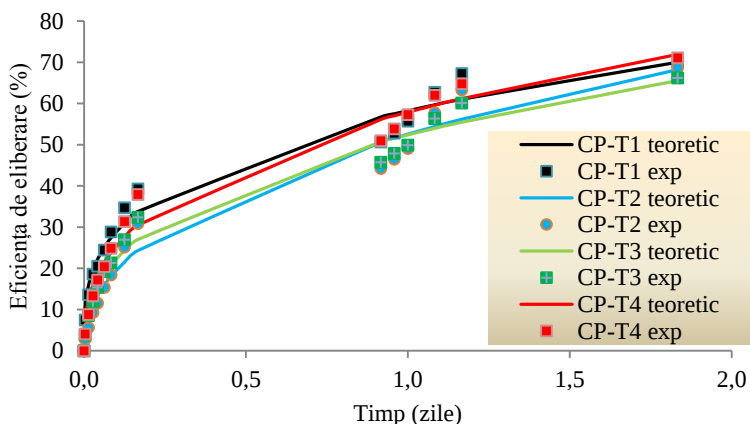
Tabelul 8. Valorile parametrilor ecuației Peppas și ale coeficienților de corelare pentru hidrogeluri pe bază de CP dublu reticulate (cu anioni sulfat) (a), respectiv pentru sisteme complexe pe baza acestor hidrogeluri încărcate cu lipozomi SUV conținând calceină încapsulată (b)

Sistem analizat	Codul sistemului	k	n	Coefficient corelare
Hidrogeluri dublu reticulate cu anioni sulfat	CP-S1	0.425892	0.412644	0.975175
	CP-S2	0.527717	0.348806	0.979874
	CP-S3	0.530129	0.28588	0.966625
	CP-S4	0.482991	0.298397	0.973865
Sisteme complexe hidrogel dublu reticulat-lipozomi-calceină	CP-S1 SUV	0.0314844	0.25479	0.978027
	CP-S2 SUV	0.028913	0.232848	0.979085
	CP-S3 SUV	0.032647	0.137785	0.976651
	CP-S4 SUV	0.038805	0.185449	0.988857

Valorile exponentului n sunt și ele mai mari comparativ cu cele caracteristice sistemelor complexe CG, argumentând o dată în plus concluzia că prezența polimerului sintetic în compoziția hidrogelului are ca efect intensificarea procesului de difuzie, nu doar a calceinei ci și a lipozomilor încărcăți cu ea, prin matricea polimeră.

Analiza rezultatelor obținute pentru *hidrogelurile pe bază de chitosan și poli(alcool vinilic) reticulate cu anioni de tripolifosfat încărcate direct cu calceină și sistemele complexe* realizate pe această bază oferă următoarele informații.

Concluzii similare celor precedente rezultă dacă se analizează rezultatele prezentate în Figura 76 (a și b), respectiv în Tabelul 9. Viteza mai ridicată de eliberare a calceinei comparativ cu hidrogelurile și sistemele complexe pe bază de chitosan și gelatină (panta tangentelor la curbele de eliberare din Figura 76) se reflectă și în valorile constantei k , cele mai ridicate dintre toate sistemele analizate.



a

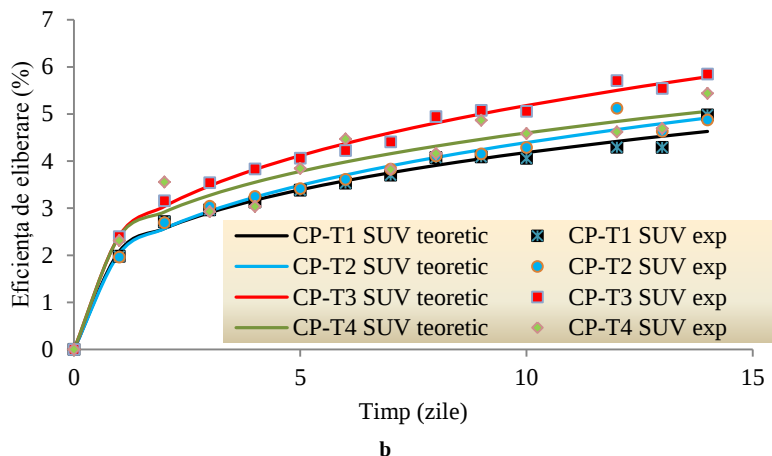


Figura 76. Variația în timp a eficienței eliberării calceinei din hidrogeluri pe bază de CP dublu reticulate (cu anioni TPP) (a), respectiv din sisteme complexe pe baza acestor hidrogeluri încărcate cu lipozomi SUV conținând calceină încapsulată (b)

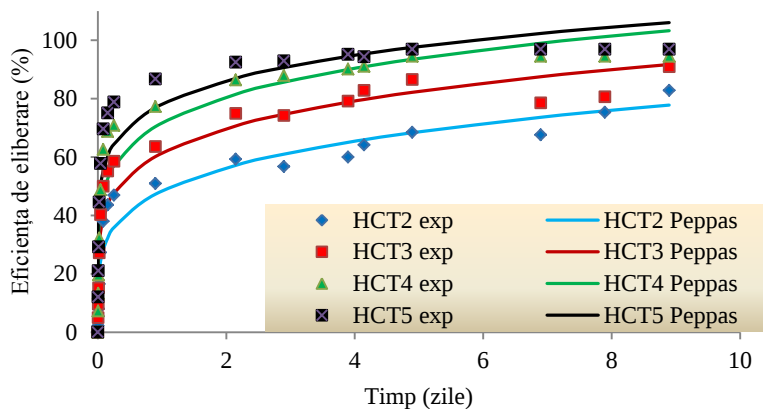
Explicația acestui efect a fost oferită în Subcapitolele 3.1. *Chimismul reacției de reticulare a hidrogelurilor* și 3.4. *Studiul cineticii de eliberare a calceinei din hidrogeluri*, fiind determinat în esență de dimensiunea mai mare a ochiurilor rețelei polimere în care poli(alcoolul vinilic) nu participă în reticularea ionică, dimensiune care facilitează difuzia nu doar a calceinei, ci și a lipozomilor în care aceasta este încărcată. Astfel, valorile exponentului n pentru sistemele complexe sunt cele mai ridicate dintre toate sistemele complexe studiate, argumentând intensificarea difuziei lipozomilor prin matricea polimeră (Tabelul 9). Faptul că nu se apropie, totuși, de valoarea 0,5 indică participarea altor fenomene adiacente difuziei, după cum s-a arătat anterior.

Tabel 9. Valorile parametrilor ecuației Peppas și ale coeficienților de corelare pentru hidrogeluri pe bază de CP dublu reticulate (cu anioni TPP) (a), respectiv pentru sisteme complexe pe baza acestor hidrogeluri încărcate cu lipozomi SUV conținând calceină încapsulată (b)

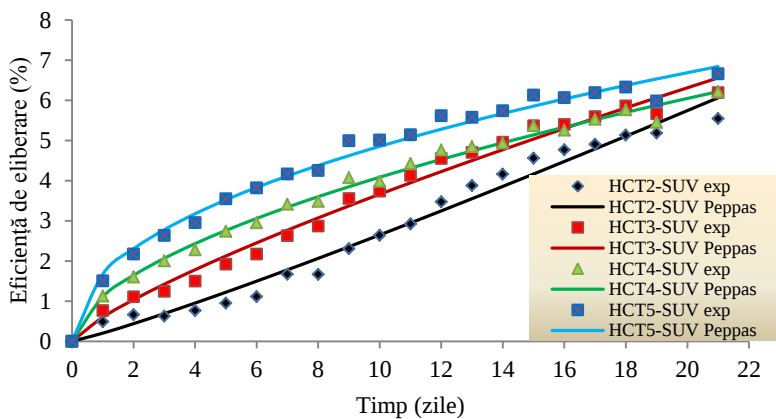
Sistem analizat	Codul sistemului	k	n	Coeficient corelare
Hidrogeluri dublu reticulate cu anioni TPP	CP-T1	0,582447	0,3037	0.987407
	CP-T2	0,525654	0,430138	0.985717
	CP-T3	0,523887	0,369992	0.990651
	CP-T4	0,578921	0,357913	0.989857
Sisteme complexe hidrogel dublu reticulat-lipozom-calceină	CP-T1 SUV	0.0208224	0.302805	0.992889
	CP-T2 SUV	0.020350	0.334228	0.993364
	CP-T3 SUV	0.024139	0.331541	0.997167
	CP-T4 SUV	0.024005	0.2823	0.966662

5.3.3. Hidrogeluri pe bază de chitosan reticulate cu AT și sisteme complexe bazate pe acestea

Pentru hidrogelurile pe bază de chitosan, respectiv sistemele complexe corespunzătoare în care s-a utilizat ca reticulant AT, ecuația Peppas s-a dovedit, de asemenea, a descrie cel mai bine procesul de eliberare. Această afirmație este argumentată de rezultatele prezentate în Figura 77 (a și b), respectiv Tabelul 10, corespunzătoare *hidrogelurilor pe bază de chitosan reticulate cu AT încărcate cu calceină*.



a



b

Figura 77. Variația în timp a eficienței eliberării calceinei din hidrogeluri pe bază de chitosan reticulate cu AT (a), respectiv din sisteme complexe pe baza acestor hidrogeluri încărcate cu lipozomi SUV conținând calceină încapsulată (b)

Trebuie remarcat faptul că în acest caz modelul Peppas descrie foarte bine eliberarea calceinei pe intervalul de timp de până la 9 zile, când pentru două dintre hidrogelurile (martor) studiate compusul model se eliberează practic total (HCT4 și HCT5).

Valori mai reduse ale exponentului n , inferioare $n = 0,5$ au fost înregistrate și în cazul hidrogelurilor discutate anterior (cu reticulanți chimici, covalenți sau ionici), fiind puse pe seama aceleiași proces de eroziune a matricii determinat de scindarea unor legături ionice. Trebuie precizat totuși că în toate sistemele caracterizate de valori ale lui n apropiate de 0,43, difuzia Fickiană constituie mecanismul dominant de transport al compusului încapsulat [272].

Tabelul 10. Valorile parametrilor ecuației Peppas și ale coeficienților de corelare pentru hidrogeluri pe bază de chitosan reticulate cu AT (a), respectiv pentru sisteme complexe pe baza acestor hidrogeluri încărcate cu lipozomi SUV conținând calceină încapsulată (b)

Sistem analizat	Codul sistemului	k	n	Coeficient corelare
Hidrogeluri reticulate cu AT	HCT2	0.484092	0.217029	0.964783
	HCT3	0.613762	0.183656	0.959605
	HCT4	0.7172	0.166773	0.950378
	HCT5	0.781239	0.139773	0.944978
Sisteme complexe hidrogel reticulate cu AT-lipozom-calceină	HCT2-SUV	0.00202502	1.117	0.989834
	HCT3-SUV	0.00599541	0.785915	0.993269
	HCT4-SUV	0.0110912	0.566279	0.996149
	HCT5-SUV	0.016713	0.463029	0.993558

În cazul sistemelor complexe formate din hidrogeluri pe bază de chitosan reticulate cu AT-lipozomi-calceină, valorile lui n sunt deosebit de ridicate. Analizând alura curbelor cinetice prezentate în Figura 77, se poate aprecia că ele sunt practic liniare, foarte apropiate de o cinetică de „ordin zero”. Conform literaturii, pentru valori ale lui n cuprinse între limitele 0,45 – 0,89, avem de a face cu un transport non-Fickian, când controlul procesului prin difuzie este completat de controlul prin umflare [273], și de fenomene de relaxare a rețelei care decurg simultan cu difuzia [274]; este cazul ultimelor trei sisteme din Tabelul 10. Într-adevăr, asumând ideea că hidrogelurile conținând lipozomi încărcăți cu calceină pot fi privite drept materiale compozite [273], devine evident că pentru hidrogelurile la care valoarea lui n este cuprinsă în domeniul 0,46 - 0,78 (Tabelul 10) se înregistrează un mecanism de transport complex controlat de difuzie, relaxare a rețelei și umflare.

Pentru sistemul HCT2-SUV, la care valoarea exponentului depășește unitatea, iar cantitatea de reticulant este maximă, cinetica este practic de „ordin zero”. În conformitate cu cele semnalate în literatură vorbim despre o „comportare anormală”, adică un mecanism non-Fickian, în care difuzia joacă un rol minim fiind dominante celelalte efecte [274].

Trebuie menționat faptul că și în cazul acestor sisteme complexe există o dependență practic liniară între valoarea lui n și cantitatea de reticulant, asemănător hidrogelurilor martor. Nu este exclusă nici în acest caz o contribuție, dar mai puțin importantă, a procesului de eroziune la eliberarea calceinei.

5.3.4. Hidrogeluri pe bază de amestecuri CP reticulate cu AT și sisteme complexe bazate pe acestea

O comportare diferită din punct de vedere cinetic se înregistrează în cazul hidrogelurilor și pe bază de chitosan și poli(alcool vinilic) reticulate cu acid tanic. Calceina, după cum s-a precizat în

Subcapitolul 4.7. *Studiul cineticii de eliberare a calceinei din hidrogeluri* se eliberează foarte rapid din rețele realizate cu puțin reticulant. Peste 65% din compusul model se eliberează în primele 4-5 ore ale procesului, ceea ce limitează la un timp foarte scurt aplicarea ecuației Peppas. Din acest motiv s-a renunțat la reprezentarea curbelor cinetice teoretice, dar în Tabelul 11 sunt prezentate valorile parametrilor acestei ecuații. Se poate constata că valoarea constantei vitezei procesului de eliberare este foarte ridicată și crește cu reducerea cantității de reticulant din sistem. Similar, valorile lui n variază de aceeași manieră. Rezultă deci că procesul de eliberare are o componentă Fickiană, dar pare să fie controlat și de fenomene de relaxare a rețelei, îndeosebi la cantități reduse de reticulant, când distanța dintre ochiurile rețelei crește permițând segmentelor de lanț tot mai lungi de chitosan să-și schimbe mai ușor conformația, relaxându-se.

În Figura 80 sunt însă prezentate curbele teoretice da variație a eficienței eliberării calceinei din sistemele complexe în care s-a folosit AT ca reticulant.

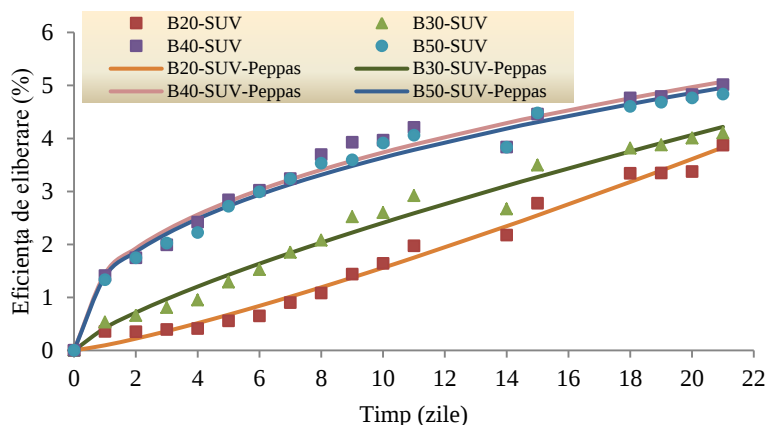


Figura 80. Variația în timp a eficienței eliberării calceinei din sisteme complexe pe bază hidrogeluri din CP reticulate cu AT, încărcate cu lipozomi SUV conținând calceină încapsulată

După cum s-a discutat într-un capitol anterior, cel mai eficient eliberează sistemele constituite din hidrogeluri cu puțin reticulant. Ele manifestă, după cum se vede în Figura 80, un “burst effect” minim, după care alura curbei cinetice este practic liniară. Valorile constantei de viteză de eliberare sunt reduse, dată fiind eliberarea frânată a calceinei, determinată pe de o parte de încapsularea sa în lipozomi și pe de altă parte de difuzia prin matricea polimeră. Valoarea lui n crește cu scăderea cantității de reticulant, după cum relevă datele din Tabelul 11 și Figura 81.

Mai dificil de interpretat sunt valorile exponentului n , foarte diferite pentru cele două tipuri de sisteme. Este evident că difuzia Fickiană este perturbată de o serie de factori, printre care foarte importantă este eroziunea matricii. După cum am demonstrat în capitolul 4.6. *Studiul cineticii de eliberare a AT din hidrogeluri*, în mediu apos, inclusiv tampon fosfat, din matricea hidrogelului pe bază de chitosan se eliberează diferite cantități de AT (îndeosebi din hidrogelurile cu mai puțin reticulant), probabil molecule care nu participă decât cu puține dintre grupările fenolice la formarea legăturilor de hidrogen (care ulterior, în timp, se descompune în acid galic),acompaniate și de fracții de masă moleculară redusă de polizaharid. Scăderea de masă a hidrogelului este cu atât mai ridicată cu cât

cantitatea de reticulant este mai redusă. Dacă urmărim variația lui n cu raportul polizaharid/AT, constatăm o scădere continuă a exponentului ecuației Peppas cu acest parametru. Concluzia evidentă este aceea că pe măsură ce scade cantitatea de reticulant, procesul de eroziune al matricii devine tot mai important, în detrimentul difuziei Fickiene, având drept efect reducerea valorii lui n .

Tabelul 11. Valorile parametrilor ecuației Peppas și ale coeficienților de corelare pentru hidrogeluri pe bază de CP reticulate cu AT, respectiv pentru sisteme complexe pe baza acestor hidrogeluri încărcate cu lipozomi SUV conținând calceină încapsulată

Sistem analizat	Codul sistemului	k	n	Coeficient corelare
Hidrogeluri reticulate cu AT	B20	0.372	0.266	0.972485
	B30	1.470	0.421	0.97178
	B40	5.296	0.544	0.997313
	B50	7.420	0.654	0.995781
Sisteme complexe hidrogel reticulat cu AT-lipozomi-calceină	B20-SUV	0.0010	1.2113	0.992812
	B30-SUV	0.0042	0.7558	0.989277
	B40-SUV	0.0145	0.4117	0.988742
	B50-SUV	0.0139	0.4172	0.991644

Valoarea exponentului n variază deci asemănător cazului sistemelor complexe pe bază de chitosan doar, reticulat cu AT. Cele mai mari valori ale acestuia sugerează o comportare non-Fickiană (îndeosebi pentru sistemele B20-SUV și B30-SUV), unde și cinetica procesului este, practic, de „ordin zero”. Reducerea cantității de reticulant face ca procesul de eliberare să transeze spre unul controlat tot mai mult de difuzie, și într-o oarecare măsură de eroziunea matricii; nu poate fi neglijată nici importanța efectului umflării.

Concluziile prelucrării matematice a datelor experimentale privind cinetica eliberării calceinei din toate sistemele studiate sunt următoarele:

- dintre toate modelele cinetice testate, ecuația Peppas aproximează cel mai bine variația în timp a eficienței de eliberare a calceinei;
- valorile parametrilor k și îndeosebi n oferă informații foarte utile pentru aprecierea sau confirmarea mecanismului de transport al calceinei prin matricile polimere obținute, indiferent dacă acest compus model este încărcat direct în hidrogel sau încapsulat în lipozomi ulterior încărcăți în hidrogel;
- se probează, și pe cale teoretică, faptul că cinetica procesului de eliberare a calceinei din diferite hidrogeluri pe bază de chitosan și sisteme complexe realizate pornind de la astfel de matrici, poate fi modelată matematic oferind și posibilitatea controlului fin.

6. Concluzii generale

Cercetările ale căror rezultate au fost raportate în teza de doctorat au avut ca obiectiv principal investigarea unei căi alternative la cele semnalate în literatură, de modelare a cineticii procesului de eliberare a medicamentelor hidrosolubile din matrici cu caracter de hidrogel, formulate ca filme, dar putând fi extinsă și la alte modalități de prezentare precum particule, bureți, implanturi, inserturi ș.a. Scopul l-a constituit eliminarea sau diminuarea “burst effect”-ului înregistrat în procesul de eliberare din astfel de sisteme, respectiv un control mai bun al procesului pe o perioadă de timp cât mai îndelungată.

Strategia utilizată pentru atingerea acestui obiectiv a constat în realizarea de sisteme complexe, alcătuite din matricea de hidrogel în care au fost incluși lipozomi conținând calceină încapsulată, în esență, pentru crearea unei bariere suplimentare în eliberarea compusului hidrosolubil.

Ca obiectiv secundar, lucrarea și-a propus elaborarea de noi hidrogeluri de tip rețea interpenetrată/interconectată total lipsite de toxicitate, bio- și citocompatibile, prin utilizarea ca materii prime a unor componente de origine naturală.

Concluziile desprinse în urma cercetării sunt următoarele:

1. Au fost obținute și caracterizate fizico-chimic și din punct de vedere al modului de comportare în medii apoase, hidrogeluri pe bază de chitosan și gelatină, respectiv poli(alcool vinilic), dublu reticulat (covalent – cu aldehida glutarică, respectiv ionic – cu anioni sulfat sau tripolifosfat).

2. Hidrogelurile au fost utilizate ca matrici pentru includerea calceinei - compus model pentru medicamente hidrosolubile -, fie în formă liberă, fie încapsulată în lipozomi unilamelari mici pe bază de fosfatidilcolină încărcăți ulterior în matricea polimeră.

3. Eliberarea calceinei inclusă direct în hidrogeluri pe bază de chitosan și gelatină dublu reticulate se realizează cu un “burst effect” pronunțat, apoi cu viteză relativ constantă, ceea ce face ca procesul să fie greu de controlat și inefficient.

4. Creșterea cantității de reticulant la realizarea hidrogelurilor determină reducerea vitezei procesului de eliberare, precum și a eficienței procesului până la durata de 7 zile experimentată.

5. Compoziția hidrogelului constituie un factor determinant al procesului de eliberare; creșterea cantității de gelatină are ca efect creșterea eficienței procesului de eliberare a calceinei datorită numărului redus de grupări amino de pe catena de bază a proteinei spre comparație cu polizaharidul pe care îl substituie în amestec; la acest efect se adaugă caracterul hidrofil mai pronunțat al proteinei.

6. Natura reticulantului ionic influențează procesul de eliberare, prin densitatea de reticulare a rețelei pe care o determină în mod direct. Eficiență mai ridicată a procesului de eliberare se realizează în cazul utilizării anionilor sulfat ca reticulant ionic.

7. Eliberarea calceinei din sisteme complexe hidrogel (dublu reticulat) – lipozomi- calceină se realizează conform unei cinetici cu “burst effect” mult mai redus, eficiența procesului variind lent în timp; ea este influențată de parametrii semnalăți în cazul hidrogelurilor conținând compusul model direct inclus în matricea polimeră. Reticularea cu tripolifosfat de sodiu generează rețele cu ochiuri mai reduse în dimensiuni ce reduc difuzia lipozomilor încărcăți cu calceină, efectul fiind reducerea “burst effect”-ului manifestat față de sistemele reticulate cu anioni sulfat.

8. Au fost obținute și caracterizate fizico-chimic hidrogeluri pe bază de chitosan și poli(alcool vinilic) dublu reticulate cu aldehidă glutarică și doi reticulanți ionici: anioni sulfat, respectiv

tripolifosfat; acestea au fost utilizate, de asemenea, ca matrici pentru includerea calceinei în formă liberă sau încapsulată în lipozomi unilamelari mici.

9. Eliberarea calceinei inclusă direct în hidrogeluri pe bază de chitosan și poli(alcool vinilic) dublu reticulate se realizează cu manifestarea unui “burst effect” mai pronunțat în comparație cu sistemele pe bază de chitosan și gelatină; efectul se datorează neparticipării polimerului sintetic la reticularea ionică.

10. Utilizarea unor cantități mai mari de reticulant ionic are ca efect creșterea densității de reticulare a rețelei și reducerea eficienței de eliberare a calceinei din hidrogelurile corespunzătoare. Observația este valabilă pentru ambii reticulanți ionici utilizați.

11. Tripolifosfatul de sodiu – capabil să lege până la 5 ioni amoniu – formează rețele mai compacte decât cele obținute prin reticulare cu sulfat de sodiu – capabil de a lega numai 2 cationi amoniu; observația este susținută de gradul de umflare mult redus al acestor hidrogeluri comparativ cu cele obținute prin reticulare cu anioni sulfat, în strânsă concordanță cu valorile eficienței de eliberare a calceinei din sistemele complexe.

13. Eliberarea calceinei din sistemele complexe pe baza hidrogelurilor chitosan/poli(alcool vinilic) are loc cu reducerea “burst effect”-ului ce apare la sistemele simple hidrogel-principiu activ, efect mai diminuat la hidrogelurile reticulate cu tripolifosfat de sodiu.

14. Au fost sintetizate și caracterizate fizico-chimic și din punct de vedere al modului de comportare în medii apoase **noi hidrogeluri pe bază de chitosan, respectiv chitosan și poli(alcool vinilic) reticulate cu acid tanic**, polifenol cu proprietăți biologice remarcabile; reticularea se realizează prin numeroasele legături de hidrogen angajate între grupele fenolice și cele aminice, respectiv hidroxilice ale polimerilor.

15. Hidrogelurile, preparate sub formă de filme, au fost caracterizate prin spectroscopie FT-IR, evidențiindu-se prezența tuturor componentelor de plecare în compoziția lor; prezența legăturilor de hidrogen nu a putut fi pusă în evidență fiind mascată de numeroasele grupe hidroxilice din partenerii care interacționează.

16. Hidrogelurile au o morfologie compactă, evidențiată prin microscopie electronică de baleiaj; suprafața are un aspect rugos – mai puțin evident la cele în compoziția cărora participă poli(alcoolul vinilic) –, ce se atenuează cu reducerea cantității de reticulant.

17. Analiza termică diferențială evidențiază stabilitatea superioară a filmelor pe bază de chitosan față de polizaharid, dar mai redusă față de cea a poli(alcoolului vinilic).

18. Hidrogelurile prezintă capacitate diferită de reținere a apei, în funcție de compoziția matricei polimerice - cantitatea de acid tanic utilizată și raportul între cei doi polimeri participanți la reticulare-, gradul maxim de umflare reducându-se cu creșterea cantității de reticulant, respectiv cu cantitatea de poli(alcool vinilic) din amestec cu chitosanul; timpul de reticulare nu influențează în mod semnificativ procesul de umflare.

19. Hidrogelurile manifestă tendință de eliberare a acidului tanic în medii apoase, cantitatea de reticulant eliberat fiind în strânsă concordanță cu proporția sa în amestecul inițial supus reticulării; rețelele slab reticulate sunt susceptibile eliminării, o dată cu acidul tanic, și a unor fracții de polimer de masă moleculară coborâtă.

20. Eliberarea calceinei inclusă direct în hidrogeluri se face într-un timp foarte scurt – 24 ore la cele slab reticulate - dar în corelație directă cu cantitatea de reticulant; constatarea este valabilă atât pentru sistemele obținute pe bază de polizaharid dar și pentru cele pe baza amestecului chitosan/poli(alcool vinilic).

21. Studiile de citocompatibilitate efectuate dovedesc caracterul non-citotoxic al materialelor supuse analizei. Imaginile microscopice efectuate și testul de viabilitate celulară susțin caracterul de biomaterial al hidrogelurilor ce nu eliberează compuși toxici care să influențeze negativ proliferarea celulelor liniei MG63 de tip osteoblastic.

23. Eliberarea compusului model din sistemele complexe hidrogel reticulat cu acid tanic-lipozomi-calceină evidențiază faptul că, în cazul rețelelor mai dense, se apropie de o cinetică de “ordin zero” pe toată durata de analiză (21 de zile); reducerea cantității de reticulant conduce la rețele mai laxe și la manifestarea unui “burst effect” tot mai însemnat.

24. În primele 7 zile ale procesului de eliberare a calceinei lipozomii difuzează spre exteriorul matricii polimerice împreună cu principiul activ pe care îl încapsulează, reprezentând în unele cazuri 30-40% din totalul eliberat; această observație este de importanță terapeutică, constituind un avantaj al acestor sisteme din punct de vedere al posibilității ținării pasive cu lipozomi încărcăți cu medicamente.

25. Hidrogelurile complexe obținute pe baza amestecului polimeric chitosan/poli(alcool vinilic) prezintă o alură a curbelor cinetice asemănătoare celor doar pe bază de polizaharid, cu o ușoară reducere a eficienței de eliberare a calceinei; și în acest caz, parametrul de integritate lipozomală indică o prezență semnificativă a veziculelor lipidice în mediul de eliberare.

26. Eliberarea calceinei din hidrogeluri în care a fost inclusă direct, în condiții ce simulează administrarea pe cale transdermală evidențiază un „burst effect” pronunțat pe durata de 8 zile, după care procesul devine mai lent până la eliberarea totală; cinetica eliberării din sistemul complex este mult mai lentă, eficiența fiind mult redusă pe același interval de timp.

27. Utilizarea acidului tanic ca reticulant constituie o metodă promițătoare și de perspectivă pentru obținerea de hidrogeluri total lipsite de toxicitate și potențial utilizabile ca suporturi pentru includerea de medicamente; chiar dacă imersarea într-un fluid biologic face ca în timp să se elibereze o cantitate redusă de acid tanic și chitosan, integritatea filmelor se păstrează, iar compușii eliberați pot contribui la amplificarea activității biologice a întregului sistem complex.

28. Încapsularea calceinei în lipozomi și includerea ulterioară a acestora în matricii polimerice de tip hidrogel modifică profund cinetica procesului de eliberare: “burst effectul” se reduce drastic sau chiar dispare iar procesul continuă timp îndelungat, cu viteză constantă.

29. Aplicarea mai multor modele cinetice procesului de eliberare a calceinei din sistemele studiate conduce la concluzia că cel mai adecvat este modelul Peppas, care aproximează cel mai bine rezultatele experimentale; în plus, acest model permite posibilitatea interpretării unor fenomene adiacente difuziei, ce facilitează formularea mecanismului de transport al compusului model, atât sub formă liberă cât și încapsulat în lipozomi.

30. Procesul de eliberare a calceinei incluse direct în hidrogeluri este, în general, de tip Fickian, controlat de difuzie, dar perturbat în cele mai multe cazuri de interacțiunea compusului cu matricea polimeră, precum și de eroziunea matricii.

31. În cazul unor sisteme complexe de tip hidrogel pe bază de chitosan sau chitosan-poli(alcool vinilic) – lipozomi – calceină, procesul de eliberare este fie de tip difuzie non-Fickiană, fie decurge după o cinetică ideală de „ordin zero”.

32. Mecanismul de transport al calceinei în sistemele complexe implică mai multe componente: eliberarea calceinei libere, existentă de la început în matrice, eliberarea calceinei eliberată prin destabilizarea parțială a lipozomilor în matrice, respectiv difuzia lipozomilor cu calceina încărcată până în exteriorul matricii unde se destabilizează eliberând compusul model; acest mecanism complex este perturbat, de asemenea, de factorii menționați anterior.

33. Includerea lipozomilor încărcăți cu medicament în matrici polimerice constituie o metodă de a crește stabilitatea acestor vezicule sensibile, dar și de reglare a cineticii de eliberare a unor medicamente hidrosolubile, condiții obligatorii pentru aplicații vizând îndeosebi administrarea de medicamente pe o durată de timp îndelungată.

34. Rezultatele raportate în lucrarea de doctorat probează justetea ipotezei care a stat la baza sa, obiectivul principal al tezei, respectiv **aducerea unor contribuții la modelarea cineticii de eliberare a medicamentelor hidrosolubile din matrici cu caracter de hidrogel în scopul realizării unui mai bun control al procesului pe toată durata desfășurării sale**, fiind astfel îndeplinit.

Perspective

1. Verificarea calității de biomaterial a hidrogelurilor obținute prin evaluarea mai multor proprietăți biologice (toxicitate, biocompatibilitate, etc); sunt în curs de efectuare teste de hemocompatibilitate.

2. Potențiala utilizare a filmelor pentru administrarea transdermală a unor medicamente impune efectuarea unor teste de eliberare *in vitro* a acestora (lidocaina, spre exemplu), încărcate direct în hidrogeluri sau încapsulate în lipozomi stabilizați apoi în hidrogeluri, folosind dispozitive care simulează acest tip de administrare; testele ar permite generalizarea mecanismului de transport ce stă la baza procesului de eliberare a principiului activ din sistemele complexe obținute.

3. În contextul posibilei utilizări a sistemelor complexe obținute în aplicații biomedicale ce vizează țesutul cutanat, efectuarea unor teste privind comportarea lor în anumite condiții de stres mecanic ar completa caracterizarea acestor materiale.

4. Extinderea studiilor *in vitro* realizate utilizând celule de difuzie Franz pe alte tipuri de membrane, precum cele animale, ce simulează mai bine țesutul cutanat uman; simultan cu medicamentul, în hidrogeluri ar putea fi încărcăți anumiți compuși chimici cu rolul de a ameliora capacitatea de permeație a pielii (de exemplu, sucroză)

Bibliografie selectivă

- 9.Jones A. și Vaughan D., *Hydrogel dressings in the management of a variety of wound types: A review*, Journal of Orthopaedic Nursing, 2005, 9, S1-S11.
- 10.Loh X. J., Peh P., Liao S., Sng C. și Li J., *Controlled drug release from biodegradable thermoresponsive physical hydrogel nanofibers*, Journal of Controlled Release, 2010, 143,175–182.
- 61.Schrieber R. și Gareis H.,*Gelatine Handbook, Theory and Industrial Practice*, Weinheim, Germany.WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KgaA, 2007.
- 74.Speer D. P., Chvapil M., Eskelson C. D. și Ulreich J., *Biological effects of residual glutaraldehyde in glutaraldehyde-tanned collagen biomaterials*, Journal of Biomedical Materials Research, 1980, 14, 753-764.
- 101.Bhattarai N., Gunn J. și Zhang M., *Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery*, Advanced Drug Delivery Reviews, 2010, 62, 83–99.
- 104.Jătariu A. D., Danu M., Peptu C. A., Ioanid C., Ibănescu C. și Popa M., *Ionically and Covalently Cross-Linked Hydrogels Based on Gelatin and Chitosan*, Soft Materials, 2013, 11, 45–54.
- 109.Jătariu (Cadinoiu) A. N., Holban M. N., Peptu C. A., Sava A., Costuleanu M. și Popa M., *Double crosslinked interpenetrated network in nanoparticle form for drug targeting-preparation, characterization and biodistribution studies*, Int. J. Pharm., 2012, 436, 66-74.
- 140.Lascar I., *Chirurgie plastica si microchirurgie reconstructiva*, Bucuresti : Editura Academiei Române, 2008, 57-94.
- 143.Aelenei N., Popa M. I., Novac O., Lisa G. și Balaita L., *Tannic acid incorporation in chitosan-based microparticles and in vitro controlled release*, J Mater Sci: Mater Med, 2009, 20, 1095–1102.
- 160.Popa M., Aelenei N. și Hritcu D., *Medical applications of Polymers*, American Scientific Publishers, California, USA, Popa M., Ottenbrite R.M. și Uglea C.V., *Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Drug Delivery by Polymer Systems*, 2, 383-412.
- 163.Peppas N. A. și Khare A. R., *Preparation, structure and diffusional behaviour of hydrogels in controlled release*, Adv Drug Delivery Rev, 1993, 11, 1–35.
- 166.Immicha A. P. S., Arias M. L., Carreras N., Boemo R. L. și Tornero J. A., *Drug delivery systems using sandwich configurations of electrospun poly(lactic acid) nanofiber membranes and ibuprofen*, Materials Science and Engineering C, 2013, 33, 4002-4008.
- 168.Vlahovska P. M., Podgorski T. și Misbah C., *Vesicles and red blood cells in flow: From individual dynamics to rheology*, C. R. Phisique, 2009, 10, 775-789.
- 169.Lipowsky R., *The Conformation of membranes*, Nature, 1991, 349, 475-481.
- 170.Lipowsky R. și Sackman E., *Structure and Dinamics of Membranes*, Amsterdam: Elsevier, 1995.
- 171.Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K. și Walter P., *Molecular Biology of the cell*. 4th. New York: Garland Publishing Inc., 2002.
- 172.New R. R. C., *Liposomes, a practical approach*, New York : Oxford University Press, 1990.
- 188.Kelly C., Jefferies C. și Cryan S. A., *Targeted Liposomal Drug Delivery to Monocytes and Macrophages*, Journal of Drug Delivery, 2011, 2011, 1-11.
- 198.Matsumura Y. și Maeda H., *A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs*, Cancer Res., 1986, 46, 6387–6392.

- 244.Piperoudi S., Ioannou P. V., Frederik P. și Antimisiaris S. G., *Arsonoliposomes: Effect of Lipid Composition on Their Stability and Morphology*, Journal of Liposome Research, 2005, 15, 187-197.
- 245.Ortan A., Câmpeanu Gh., Dinu – Pîrvu C. și Popescu L., Studies concerning the entrapment of Anethum graveolens essential oil in liposomes, Romanian Biotechnological Letters, 2009, 14, 4411-4417.
- 250.Elhamirad A. H. și Zamanipoor M. H., *Thermal stability of some flavonoids and phenolic acids in sheep tallow olein*, Eur. J. Lipid Sci. Technol. 2012, 114, 602-606.
- 254.Attaa A. M. și El-Ghazawya R. A. M., *Effect of chemical crosslinking on swelling parameters of modified poly(vinyl alcohol) hydrogel*, International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials, 2003, 52, 623-636.
- 256.Wang, L.-Y., *Preparation and characterization of uniform-sized chitosan microspheres containing insulin by membrane emulsification and a two-step solidification process*, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2006, 50, 126–135.
- 257.Wang F.-J. și Wang C.-H., *Etanidazole-loaded microspheres fabricated by spray-drying different poly(lactide/glycolide) polymers: effects on microsphere properties*, J. Biomater. Sci., 2003, 14, 157–183.
- 258.Robson H., Craig D. și Deutsch D., *An investigation into the release of cefuroxime axetil from taste-masked stearic acid microspheres: III. The use of DSC and HSDSC as means of characterising the interaction of the microspheres with buffered media*, Int. J. Pharm., 2000, 201, 211–219.
- 259.Siepmann J., Faisant N., Akiki J., Richard J. și Benoit J. P., *Effect of the size of biodegradable microparticles on drug release: experiment and theory*, J. Control. Release, 2004, 96, 123-134.
- 260.Borgquist P., Körner A., Piculell L., Larsson A. și Axelsson A., *A model for the drug release from a polymer matrix tablet—effects of swelling and dissolution*, J. Control. Release, 2006, 113, 216–225.
- 261.Raman C., Berkland C., Kim K. și Pack D. W., *Modeling small-molecule release from PLG microspheres: effects of polymer degradation and nonuniform drug distribution*, J. Control. Release, 2005, 103, 149-158.
- 262.Cabrera M. I., Luna J. A. și Grau R. J.A., *Modeling of dissolution-diffusion controlled drug release from planar polymeric systems with finite dissolution rate and arbitrary drug loading*, J. Membr. Sci., 2006, 280, 693–704.
- 263.Higuchi T., *Mechanism of sustained-action medication. Theoretical analysis of rate released of solid drugs dispersed in solid matrices*, J. Pharm. Sci, 1963, 52, 1145-1149.
- 264.Ritger P.L. și Peppas N.A., *A simple equation for description of solute release I. Fickian and non-fickian release from non-swellable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs*, J. Control. Release, 1987, 5, 23-36.
- 265.Peppas N. A. și Sahlin J. J., *A simple equation for the description of solute release. III. Coupling of diffusion and relaxation*, Int. J. Pharm., 1989, 57, 169–172.
- 266.Papadopoulou V., Kosmidis K., Vlachou M. și Macheras P., *On the use of the Weibull function for the discernment of drug release mechanisms*, International Journal of Pharmaceutics, 2006, 309, 44–50.
- 267.Costa P. și Sousa Lobo J. M., *Modeling and comparison of dissolution profiles*, Eur. J. Pharm. Sci., 2001, 13, 123–133.
- 268.Schreiner T., Schaefer U.F. și Loth H., *Immediare drug release from solid oral dosage forms*, J. Pharm. Sci., 2005, 94, 120–133.
- 269.Mandelbrot B.B., *The Fractal Geometry of Nature*, Freeman, San Francisco, USA, 1983.

- 270.Kozlov G.V. și Zaikov G.E., *Fractals and Local Order in Polymeric Materials*, Nova Science Publishers Inc., New York, USA, 2001.
- 271.Kosmidis K., Argyrakis P. și Macheras P., *A reappraisal of drug release laws using Monte Carlo simulations: the prevalence of the Weibull function*, *Pharm. Res.*, 2003, 20, 988–995.
- 272.Nochos A., Douroumis D. și Bouropoulos N., *In vitro release of bovine serum albumin from alginate/HPMC hydrogel beads*, *Carbohydrate Polymers*, 2008, 74, 451-4557.
- 273.Wei L., Cai C., Lin J. și Chen T., *Dual-drug delivery system based on hydrogel/micelle composites*, *Biomaterials*, 2009, 30, 2606-2613.
- 274.Machin R., Isasi J. R. și Velaz I., *β -cyclodextrin hydrogels as potential drug delivery systems*, *Carbohydrate Polymers*, 2012, 87, 2024-2030.

Diseminarea rezultatelor obținute

Lucrări științifice:

1. **Bogdan C. Ciobanu**, *Sisteme transdermale de eliberare a medicamentelor – prezent și perspective*, lucrare publicată în volumul Workshop-ului: „Tendențe și cerințe de interdisciplinaritate în cercetare. Prezentarea rezultatelor obținute de doctoranzi”, în cadrul proiectului Studii Doctorale pentru Performanțe Europene în Cercetare și Inovare CUAUTUMDOC POSDRU/107/1.5/S/79407, Editura POLITEHNICUM IAȘI, ISBN 978-973-621-408-0, februarie 2013, pag. 37-46.
2. **Bogdan C. Ciobanu**, Anca N. Cadinoiu, Marcel Popa, Jacques Desbrières și Cătălina A. Peptu, *Chitosan/poly(vinyl alcohol) hydrogels for entrapment of drug loaded liposomes*, trimisă spre publicare la revista Cellulose Chemistry and Technology - revistă cotate ISI.
3. **Bogdan C. Ciobanu**, Anca N. Cadinoiu, Marcel Popa, Jacques Desbrières și Cătălina A. Peptu, *Calcein loaded liposomes entrapment in double crosslinked chitosan/gelatin hydrogels*, trimisă spre publicare la revista Materials Science and Engineering C- revistă cotate ISI.
4. **Bogdan C. Ciobanu**, Cătălina A. Peptu, Jacques Desbrières și Marcel Popa, *Modelling the release kinetics of calcein loaded liposomes from chitosan/tannic acid and chitosan/poly(vinyl alcohol)/tannic acid hydrogels*, trimisă spre publicare la revista Biopolymers - revistă cotate ISI.
5. **Bogdan C. Ciobanu**, Simona Băcăiță, Marcel Popa, Jacques Desbrières și Maricel Agop, *Time evolution of drug release mechanism from chitosan based hydrogels*, trimisă spre publicare la revista Journal of Physical Chemistry - revistă cotate ISI.

Participări la manifestări științifice naționale și internaționale:

Comunicări orale:

1. **Bogdan C. Ciobanu**, Anca N. Jătaru (Cadinoiu), Cătălina A. Peptu și Marcel Popa, *Sisteme polimere complexe pentru modelarea cineticii de eliberare a medicamentelor*, în cadrul evenimentului ”Materiale și Procese Inovative” desfășurat cu ocazia Zilelor Facultății de Inginerie Chimică și Protecția Mediului, ediția a VIII-a, organizat de Facultatea de Inginerie Chimică și Protecția Mediului, Universitatea Tehnică „Gheorghe Asachi” din Iași, 17-18 noiembrie 2011, Iași, România.
2. **Bogdan C. Ciobanu**, Anca N. Cadinoiu (Jătaru), Cătălina A. Peptu, Jacques Desbrières și Marcel Popa, *Chitosan/tannic acid and chitosan/poly(vinyl alcohol)/tannic acid networks for biomedical applications*, Conferința Internațională Centenary of Education in Chemical Engineering, organizată de Facultatea de Inginerie Chimică și Protecția Mediului, Universitatea Tehnică „Gheorghe Asachi” din Iași, Școala Doctărală a Facultății de Inginerie Chimică și Protecția Mediului și Asociația Facultății de Chimie Industrială Alunni, 28-30 noiembrie 2012, Iași, România.
3. Anca N. Cadinoiu, **Bogdan C. Ciobanu**, Cătălina A. Peptu și Marcel Popa, *Chitosan-tannic acid particles as potential system for controlled drug release*, Conferința Internațională Centenary of Education in Chemical Engineering, organizată de Facultatea de Inginerie Chimică și Protecția Mediului, Universitatea Tehnică „Gheorghe Asachi” din Iași, Școala Doctărală a Facultății de Inginerie Chimică și Protecția Mediului și Asociația Facultății de Chimie Industrială Alunni, 28-30 noiembrie 2012, Iași, România.

Comunicări de tip poster:

1. **Bogdan C. Ciobanu**, A.N. Cadinoiu (Jătariu), Cătălina A. Peptu, Jacques Desbrières și Marcel Popa, *Tannic acid crosslinked chitosan/poly(vinyl alcohol) hydrogels for entrapping drug loaded liposomes*, Conferința Internațională *Frontiers in Polymer Science*, organizată de Elsevier și Revista *Polymer*, 21-23 mai 2013, Sitges, Spain.
2. Simona E. Băcăiță, **Bogdan C. Ciobanu**, Marcel Popa și Maricel Agop, *Swelling kinetics for polymeric hydrogels – an alternative approach through the fractal approximation of motion*, Conferința Internațională TIM 12 Physics Conference, organizată de Universitatea de Vest din Timișoara, Facultatea de Fizică, 27-30 noiembrie 2012, Timișoara, România.
3. Anca N. Jătariu (Cadinoiu), **Bogdan C. Ciobanu**, Cătălina A. Peptu și Marcel Popa, *Mechanism of release kinetics from hydrogels based on chitosan and gelatin entrapping liposomes*, în cadrul evenimentului "Materiale și Procese Inovative" desfășurat cu ocazia Zilelor Facultății de Inginerie Chimică și Protecția Mediului, ediția a VIII-a, organizat de Facultatea de Inginerie Chimică și Protecția Mediului, Universitatea Tehnică „Gheorghe Asachi” din Iași, 17-18 noiembrie 2011, Iași, România.
4. Anca N. Jătariu (Cadinoiu), **Bogdan C. Ciobanu**, Marcel Popa și Cătălina A. Peptu, *Solid films entrapping loaded liposomes- Preparation and pharmacokinetics*, în cadrul evenimentului "Materiale și Procese Inovative" desfășurat cu ocazia Zilelor Facultății de Inginerie Chimică și Protecția Mediului, ediția a VIII-a, organizat de Facultatea de Inginerie Chimică și Protecția Mediului, Universitatea Tehnică „Gheorghe Asachi” din Iași, 17-18 noiembrie 2011, Iași, România.
5. Anca N. Jătariu (Cadinoiu), **Bogdan C. Ciobanu**, Cătălina A. Peptu și Marcel Popa, *Systèmes complexes polymère-liposome-principe actif*, X^{ème} Colloque Franco Roumain sur les Polymères, Ecole des Mines de Douai, 6-8 Septembrie 2011, Douai, Franța.
6. Anca N. Jătariu (Cadinoiu), **Bogdan C. Ciobanu**, Cătălina A. Peptu și Marcel Popa, *Hydrogels a base de gelatine et chitosane obtenus par double reticulation- modelisation du processus a l'aide de reseaux neuronaux*, Xème Colloque Franco Roumain sur les Polymères, Ecole des Mines de Douai, 6-8 Septembrie 2011, Douai, Franța.

Membru în echipa de cercetare a Proiectului de cercetare exploratorie – idei simple - PN II-IDEI-708/2009, "Lipozomi imobilizați în matrici polimerice reticulate - nou concept în eliberarea controlată de principii biologice active".

Valoare : 1.000.000 RON

Anul 2010