



UNIVERSITATEA TEHNICĂ "GHEORGHE ASACHI" DIN IAȘI
FACULTATEA DE INGINERIE CHIMICĂ ȘI PROTECȚIA
MEDIULUI



Sisteme particulare cu aplicații în medicină și biotehnologie

– Rezumatul tezei de doctorat –

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

Doctorand
Ing. chimist Lungan Maria-Andreea

Iași – 2014

**UNIVERSITATEA TEHNICĂ "GHEORGHE ASACHI" DIN IASI
RECTORATUL**

Către

Vă facem cunoscut că, în ziua de 30 octombrie 2014, ora 11⁰⁰, în Sala de consiliu a Facultății de Inginerie Chimică și Protecția Mediului, va avea loc susținerea publică a tezei de doctorat intitulată:

"Sisteme particulare cu aplicații în medicină și biotehnologie"

elaborată de domnișoara inginer Lungan Maria-Andreea în vederea conferirii titlului științific de doctor.

Comisia de doctorat este alcătuită din:

- | | |
|--|------------------------|
| 1. Prof. univ. dr. ing. Nicolae Hurduc | președinte |
| Universitatea Tehnică "Gheorghe Asachi" din Iași | |
| 2. Prof. univ. dr. ing. dr. h. c. Marcel Popa | conducător de doctorat |
| Universitatea Tehnică "Gheorghe Asachi" din Iași | |
| 3. Prof. univ. dr. Jacques Desbrieres | referent oficial |
| Université de Pau et des Pays de l'Adour, Franța | |
| 4. Prof. univ. dr. ing. Florica Silvia Cristina Patachia | referent oficial |
| Universitatea "Transilvania" din Brașov | |
| 5. Prof. univ. dr. ing. Marcel Ionel Popa | referent oficial |
| Universitatea Tehnică "Gheorghe Asachi" din Iași | |

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

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



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

Secretar universitate,
Ing. Cristina Nagiș

Mulțumiri

Cu deosebit respect și profundă recunoștință adresez mulțumiri domnului prof. univ. dr. ing. *dr. h. c.* Marcel Popa, conducătorul științific al acestei lucrări, pentru profesionalismul și îndrumarea competentă acordată pe parcursul anilor și, totodată, pentru contribuția sa la formarea mea ca cercetător.

Sincere mulțumiri distinșilor membrii ai comisiei, domnilor prof. univ. dr. ing. Nicolae Hurduc, prof. univ. dr. Jacques Desbrieres, prof. univ. dr. ing. Marcel Ionel Popa și doamnei prof. univ. dr. ing. Florica Cristina Silvia Pațachia pentru amabilitatea și disponibilitatea recenzării acestei teze de doctorat și pentru sugestiile și observațiile formulate.

În mod special țin sa-i mulțumesc doamnei dr. ing. Silvia Vasiliu pentru încrederea acordată și de asemenea, pentru răbdarea, sprijinul și ajutorul oferit de-a lungul celor trei ani de colaborare.

Mulțumiri călduroase întregului colectiv al Laboratorului de Polimeri Funcționali din Institutul de Chimie Macromoleculară “Petru Poni” din Iași alături de care mi-am desfășurat cea mai mare parte a activității de cercetare și totodată, mulțumiri colegilor din cadrul Facultății de Inginerie Chimică și Protecția Mediului. Vă sunt recunoscătoare tuturor pentru colaborările frumoase, pentru susținerea morală și pentru prietenia oferită.

Liane, care a avut dreptate (ca de obicei)... Calendarul maiasă a dat greș, Pământul nu se învâрте invers, iar de vreun asteroid nici nu se pune problema. Merci fain pentru tot.

În final, vreau sa mulțumesc din suflet mamei și fratelui meu cărora le dedic aceste realizări și fără de care totul ar fi imposibil.

CUPRINS

INTRODUCERE	6
Cap. 1: STUDIU BIBLIOGRAFIC	8
1.1. Microparticule polimere-Definiție. Clasificare.....	8
1.2. Microparticule polimere pe bază de polimeri naturali și sintetici.....	9
1.3. Metode de preparare a microparticulelor.....	10
1.3.1. Gelifiere ionotropă.....	10
1.3.2. Metoda coacervării.....	11
1.3.3. Evaporarea solventului.....	11
1.3.4. Extracție de solvent.....	12
1.3.5. Pulverizarea/uscarea.....	13
1.3.6. Microîncapsularea în fază inversă.....	13
1.3.7. Tehnici de polimerizare.....	14
1.3.7.1. Polimerizarea interfacială.....	14
1.3.7.2. Polimerizarea în masă.....	14
1.3.7.3. Polimerizarea în dispersie.....	14
1.3.7.4. Polimerizarea în emulsie.....	15
1.3.7.5. Polimerizarea în suspensie.....	17
1.3.7.5.1. Descrierea procesului de polimerizare în suspensie.....	18
1.3.7.5.2. Cinetica procesului de polimerizare în suspensie.....	20
1.3.7.5.3. Formarea particulelor cu structură poroasă.....	21
1.4. Aplicații ale microparticulelor polimere.....	25
1.4.1. Aplicații biomedicale.....	25
1.4.1.1. Aspecte generale ale sistemelor cu eliberare controlată. Clasificare.....	25
1.4.1.2. Tipuri de sisteme purtătoare de medicamente în funcție de mecanismul și cinetica de eliberare.....	30
1.4.1.2.1. Sisteme cu eliberare controlată prin difuzie.....	30
1.4.1.2.2. Sisteme cu eliberare controlată prin eroziune și degradare.....	37
1.4.1.2.3. Sisteme cu eliberare controlată prin osmoză.....	40
1.4.1.2.4. Sisteme cu eliberare controlată prin schimb ionic.....	41
1.4.1.3. Sisteme cu eliberare de medicamente sub formă de microparticule.....	42
1.4.1.3.1. Materiale utilizate în prepararea suporturilor microparticulate.....	45
1.4.1.3.2. Polimeri acrilici și metacrilici pentru prepararea de sisteme purtătoare de medicamente.....	50

1.4.2. Aplicații biotehnologice.....	55
1.4.2.1. Imobilizarea de enzime.....	56
1.4.2.1.1. Imobilizarea prin legare pe suport.....	58
1.4.2.1.2. Imobilizarea prin entrapare.....	68
1.4.2.1.3. Imobilizarea prin reticulare.....	71
Cap. 2: MATERIALE, TEHNICI EXPERIMENTALE ȘI METODE DE	
CARACTERIZARE.....	73
2.1. Materiale.....	73
2.1.1. Monomeri.....	74
2.1.2. Polimeri naturali.....	76
2.1.3. Agenți de stabilizare și sistemul de inițiere.....	79
2.1.4. Agenți porogeni.....	80
2.1.5. Alți reactivi.....	80
2.1.6. Substanțe biologic active.....	82
2.2. Metode de obținere.....	83
2.2.1. Prepararea microparticulelor poroase pe bază de glicidil metacrilat și a particulelor poroase pe bază de glicidil metacrilat și polizaharide.....	83
2.2.1.1. Prepararea microparticulelor pe bază de glicidil metacrilat.....	83
2.2.1.2. Prepararea microparticulelor pe bază de glicidil metacrilat și polizaharide.....	83
2.2.2. Prepararea rășinilor schimbătoare de ioni.....	85
2.2.2.1. Sinteza particulelor pe bază de etilenglicol dimetacrilat, acrilonitril și acrilat de etil.....	85
2.2.2.2. Sinteza particulelor pe bază de EGDMA-AN-EA și gelan.....	86
2.2.2.3. Sinteza copolimerilor EGDMA-AN-EA-Fe ₃ O ₄	87
2.2.3. Prepararea sistemelor polimer-principiu activ.....	87
2.3. Metode de caracterizare.....	89
2.3.1. Spectroscopia FT-IR.....	89
2.3.2. Microscopia electronică de baleiaj.....	89
2.3.3. Microscopia de forță atomică.....	90
2.3.4. Analiza termogravimetrică.....	91
2.3.5. Analiza dimensională a particulelor prin difractometrie laser.....	91
2.3.6. Sorbția dinamică de vapori.....	92
2.3.7. Metoda titrimetrică HCl-dioxan pentru determinarea conținutului de grupe epoxi.....	92
2.3.8. Determinarea volumului porilor și a porozității.....	93
2.3.9. Gradul de umflare, hidrofilia și capacitatea de reținere de solvenți.....	94

2.3.10. Determinarea capacității de schimb ionic.....	94
2.3.11. Determinarea gradului de încărcare și eiberare a substanței biologice active.....	95
Cap. 3: SISTEME POLIMER-MEDICAMENT PE BAZĂ DE GLICIDIL METACRILAT ȘI XANTAN.....	96
3.1. Sinteza microparticulelor pe bază de glicidil metacrilat și xantan.....	97
3.2. Caracterizarea structurală și morfologică a microparticulelor.....	101
3.2.1. Spectroscopia FT-IR.....	101
3.2.2. Microscopia electronică de baleiaj (SEM).....	104
3.2.3. Microscopia de forță atomică.....	110
3.2.4. Distribuția dimensională a microparticulelor.....	114
3.2.5. Metode de caracterizare a structurilor poroase.....	115
3.2.6. Sorbția dinamică de vapori.....	117
3.2.7. Hidrofilia și capacitatea de reținere de solvenți.....	119
3.2.8. Conținutul de grupe epoxi.....	120
3.2.9. Analiza termogravimetrică.....	122
3.3. Obținerea sistemelor polimer-medicament.....	125
Cap. 4: SISTEME POLIMER-MEDICAMENT PE BAZĂ DE GLICIDIL METACRILAT ȘI CHITOSAN.....	135
4.1. Sinteza microparticulelor pe bază de glicidil metacrilat și chitosan.....	135
4.2. Caracterizarea structurală și morfologică a microparticulelor pe bază de glicidil metacrilat și chitosan.....	137
4.2.1. Spectroscopia FT-IR.....	137
4.2.2. Conținutul de grupe epoxi.....	139
4.2.3. Gradul de umflare și capacitatea de reținere de solvenți a microparticulelor.....	140
4.2.4. Microscopia electronică de baleiaj.....	141
4.2.5. Microscopia de forță atomică.....	142
4.2.6. Distribuția dimensională.....	144
4.2.7. Sorbția dinamică de vapori.....	144
4.2.8. Determinarea porozității și a volumului porilor.....	145
4.2.9. Analiza termogravimetrică.....	146
4.3. Obținerea sistemelor polimer-medicament.....	148
Cap. 5: SISTEME POLIMER-MEDICAMENT PE BAZĂ DE GLICIDIL METACRILAT ȘI GELAN.....	154
5.1. Sinteza microparticulelor pe bază de glicidil metacrilat și gelan.....	154

5.2. Caracterizarea structurală și morfologică a microparticulelor.....	156
5.2.1. Spectroscopia FT-IR.....	156
5.2.2. Determinarea conținutului de grupe epoxi.....	157
5.2.3. Microscopia electronică de baleiaj.....	158
5.2.4. Microscopia de forță atomică.....	162
5.2.5. Distribuția dimensională a microparticulelor.....	165
5.2.6. Metode de caracterizare a structurilor poroase.....	167
5.2.7. Sorbția dinamică de vapori.....	168
5.2.8. Analiza termogravimetrică.....	169
5.3. Obținerea sistemelor polimer-medicament.....	173
Cap. 6: SISTEME POLIMER-MEDICAMENT PE BAZĂ DE SCHIMBĂTORI DE IONI ȘI GELAN.....	177
6.1. Sinteza microparticulelor pe bază de schimbători de ioni acrilici și gelan.....	178
6.2. Caracterizarea structurală și morfologică a microparticulelor.....	180
6.2.1. Spectroscopia FT-IR.....	180
6.2.2. Microscopia electronică de baleiaj și microscopia de forță atomică..	182
6.2.3. Analiza termogravimetrică.....	183
6.3. Studii de adsorbție a medicamentelor.....	185
6.3.1. Influența concentrației soluției apoase de medicament.....	185
6.3.2. Influența temperaturii.....	186
6.3.3. Cinetica de adsorbție.....	187
6.3.3.1. Modelul cinetic de ordinul I.....	187
6.3.3.2. Modelul cinetic de ordinul II.....	189
6.3.3.3. Modelul Elovich.....	191
6.3.3.4. Modelul difuziei intraparticulă Weber-Moris.....	192
6.3.4. Izotermele de adsorbție.....	194
6.3.4.1. Izoterma Langmuir.....	195
6.3.4.2. Izoterma Freundlich.....	197
6.3.4.3. Izoterma Temkin.....	198
6.3.5. Estimarea parametrilor termodinamici.....	199
6.4. Studii de eliberare a medicamentelor.....	201
Cap. 7: IMOBILIZAREA ENZIMELOR PE SUPORTURI SCHIMBĂTOARE DE IONI.....	205
7.1. Prepararea rășinilor schimbătoare de ioni pe bază de polimeri acrilici pentru imobilizarea de enzime.....	205
7.1.1. Reacția de aminoliză a copolimerilor reticulați.....	207
7.2. Caracterizarea schimbătorilor de ioni acrilici.....	208
7.2.1. Spectroscopia FT-IR.....	208

7.2.2. Determinarea capacității de schimb ionic.....	209
7.2.3. Gradul de umflare în apă.....	209
7.2.4. Analiza termogravimetrică.....	210
7.3. Obținerea sistemelor polimer-substanță biologic activă.....	212
7.3.1. Influența concentrației substratului asupra activității enzimaticе.....	215
7.3.2. Influența temperaturii asupra activității enzimaticе și a gradului de transformare.....	217
7.3.3. Influența pH-lui asupra activității enzimaticе.....	218
CONCLUZII.....	219
BIBLIOGRAFIE.....	224
VALORIFICAREA REZULTATELOR CERCETĂRII.....	249

Rezumatul cuprinde principalele rezultate originale. Numerotarea capitolelor, figurilor, tabelelor și ecuațiilor precum și a referințelor bibliografice corespunde cu cea din teza de doctorat.

INTRODUCERE

În ultimile decenii s-a constatat o creștere a interesului cu privire la studiile efectuate în domeniul transportului de medicamente de către polimerii sintetici, naturali sau combinații ale acestora, precum și a utilizării acestor tipuri de suporturi pentru obținerea de noi preparate enzimactice.

Combinarea celor două categorii de compuși macromoleculari urmărește obținerea unor structuri care să posede pe de o parte stabilitatea chimică și rezistența la valori extreme de pH și temperatură ale compușilor sintetici cât și caracteristicile speciale ale polimerilor naturali precum bioadezivitatea, biocompatibilitatea și biodegradabilitatea.

În ceea ce privește forma de prezentare, tehnologiile actuale permit obținerea de sisteme polimer-substanță biologic activă cu forme din cele mai diverse, de la filme, geluri și hidrogeluri, tablete sau soluții injectabile până la sisteme particulare micro- și nanometrice.

Dintre acestea, sistemele sub formă de particule posedă cea mai mare pondere datorită numeroaselor avantaje pe care le prezintă din punct de vedere al modului de administrare.

Prezenta lucrare are ca obiectiv principal prepararea de noi suporturi sub formă de microparticule, pe bază de polimeri naturali și sintetici, în vederea elaborării de sisteme cu eliberare susținută/controlată de medicamente sau pentru obținerea de noi preparate enzimactice cu aplicații în biocataliză.

Lucrarea este structurată pe șapte capitole, după cum urmează:

Capitolul 1 constituie studiul bibliografic, prezentând succint stadiul actual al cercetării și trecând în revistă principalele metode de obținere ale microparticulelor și aplicațiile biomedicale și biotehnologice la care acestea se pretează.

Capitolul 2 detaliază materialele și tehnicile experimentale utilizate pentru prepararea sistemelor polimer-principiu biologic activ, precum și metodele de analiză întrebuintate pentru caracterizarea acestora.

În Capitolele 3-7 sunt descrise contribuțiile proprii privind prepararea și caracterizarea unor sisteme sub formă de microparticule cu potențiale aplicații în medicină și biotehnologie. Astfel:

Capitolul 3 tratează obținerea și caracterizarea de sisteme polimer-medicament pe bază de glicidil metacrilat (GMA) și GMA și xantan.

Capitolul 4 prezintă obținerea și caracterizarea de sisteme polimer-medicament sub formă de particule, pe bază de glicidil metacrilat și chitosan.

Capitolul 5 descrie obținerea și caracterizarea de noi sisteme particulare pe bază de glicidil metacrilat și gelan.

Capitolul 6 descrie sisteme polimer-medicament sub formă de particule cu dimensiuni micrometrice, pe bază de schimbători de ioni acrilici și gelan.

Capitolul 7 prezintă noi preparate enzimactice, obținute prin imobilizarea α -amilazei pe rășini schimbătoare de ioni sub formă de microparticule.

Biomaterialele obținute în cadrul tezei au fost analizate din punct de vedere structural, morfologic, al rezistenței la degradare termică, al capacității de umflare în apă, precum și a capacității de reținere de solvenți.

De asemenea, capacitatea sistemelor de a reține și a elibera principii biologice active a fost studiată prin utilizarea unor medicamente hidrosolubile cum ar fi: teofilina, cloramfenicolul hemisuccinat de sodiu sau cefuroximul sare de sodiu, sau a unor enzime, ca de exemplu α -amilaza.

În final, lucrarea de doctorat este completată de o parte de Concluzii, la care se adaugă o serie de trimeri Bibliografice.

OBIECTIVE

Obiectivul principal al lucrării de doctorat îl constituie prepararea unor noi suporturi sub formă de microparticule pe bază de polimeri naturali și sintetici pentru obținerea de sisteme cu eliberare susținută/controlată de medicamente sau preparate enzimactice.

În vederea realizării acestui obiectiv principal, a fost necesară îndeplinirea unor **obiective specifice**, după cum urmează:

- ❖ Prepararea unor noi suporturi poroase microparticulate pe bază de glicidil metacrilat și polizaharide prin tehnica polimerizării în suspensie;
- ❖ Obținerea de noi rășini schimbătoare de ioni pe bază de polimeri acrilici pentru aplicații biotehnologice;
- ❖ Studiul influenței anumitor parametri asupra morfologiei și dimensiunilor microparticulelor polimere (grad de reticulare, cantitate de reticulant, viteză de agitare, tipul diluentului);
- ❖ Caracterizarea suporturilor nou preparate cu ajutorul unor tehnici moderne de analiză: spectroscopie FT-IR, microscopie electronică de baleiaj, microscopie de forță atomică, sorbție dinamică de vapori, analiză termogravimetrică, etc.;
- ❖ Obținerea unor noi sisteme cu eliberare controlată de medicamente;
- ❖ Obținerea unor noi sisteme biocatalitice prin imobilizare de enzime;
- ❖ Caracterizarea structurală, morfologică și fizico-chimică a sistemelor ce conțin principii biologice active;
- ❖ Determinarea capacității de includere/eliberare a principiilor biologice active.

CAPITOLUL 3

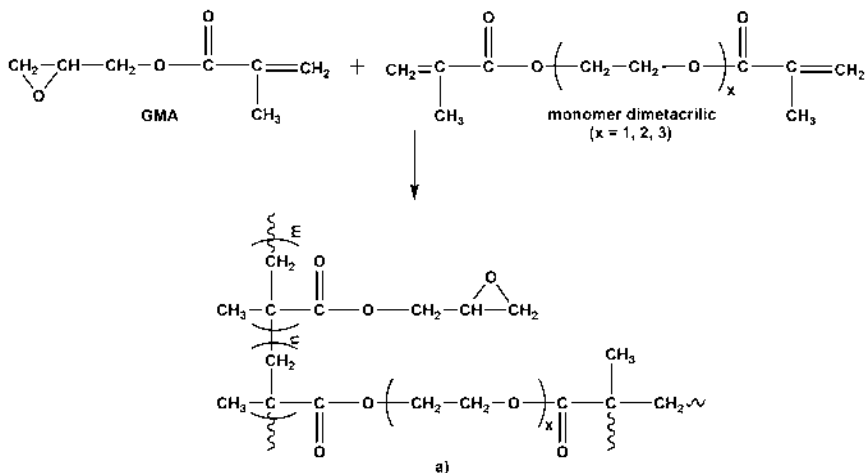
SISTEME POLIMER-MEDICAMENT PE BAZĂ DE GLICIDIL METACRILAT ȘI XANTAN

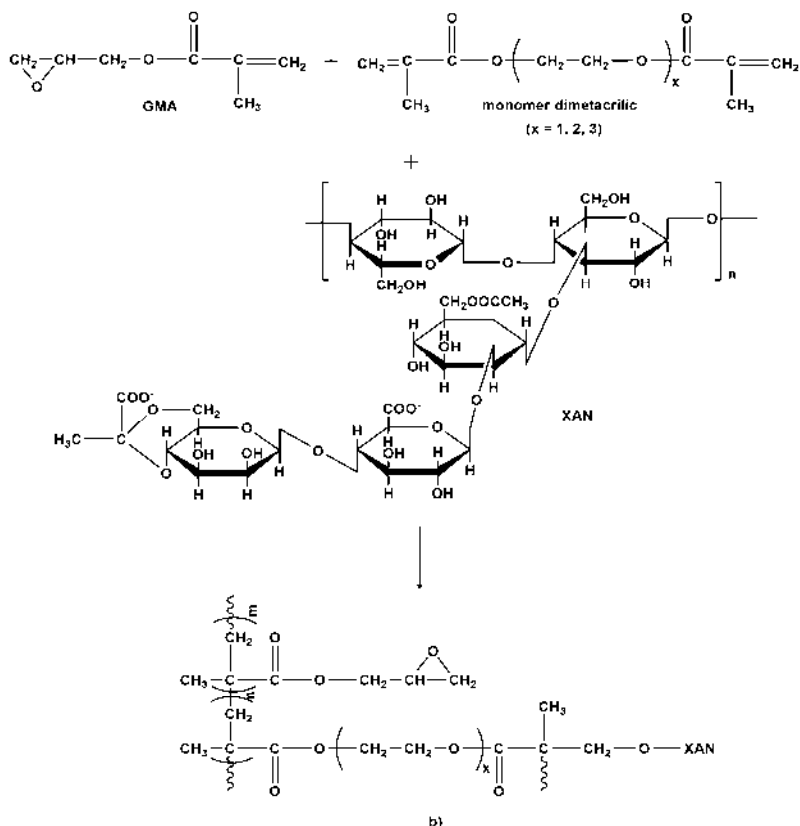
3.1. Sinteza microparticulelor pe bază de glicidil metacrilat și xantan

Prin polimerizare în suspensie apoasă s-au preparat două tipuri de rețele sub formă de microparticule:

- ❖ **Microparticule G** – obținute în urma polimerizării monomerilor metacrilici și dimetacrilici;
- ❖ **Microparticule X** – obținute prin grefarea xantanului în timpul reacției de polimerizare reticulantă dintre glicidil metacrilat și monomerii dimetacrilici.

Reacțiile implicate în obținerea celor două categorii de microparticule sunt ilustrate în Schema 2 (a) și (b):





Schema 2. Reacțiile generale de obținere a microparticulelor pe bază de glicidil metacrilat (a) și a microparticulelor pe bază de glicidil metacrilat și xantan (b)

Cele două reacții evidențiază faptul că microparticulele poroase au fost obținute printr-un proces de polimerizare radicalică reticulantă. Astfel, prin încălzirea amestecului la temperatura de 78°C, peroxidul de benzoil s-a descompus în radicali care au inițiat procesul de polimerizare radicalică dând naștere la macroradicali ce au reacționat între ei formând în final structuri tridimensionale. În cazul microparticulelor pe bază de glicidil metacrilat și xantan, alături de peroxidul de benzoil a fost introdus în sistem un al doilea inițiator radicalic corespunzător xantanului. Astfel, persulfatul de amoniu adăugat în faza apoasă a determinat formarea de macroradicali de xantan ce au reacționat ulterior fie cu macroradicali proveniți de la desfacerea legăturilor duble rămase nereacționate ale monomerilor dimetacrilici fie cu restul

macroradicalilor prezenți în sistem. S-au obținut în final rețele polimerice în care xantanul este legat covalent prin intermediul unor noi legături eterice.

Protocolul experimental respectat pentru prepararea celor două seturi de microparticule este ilustrat în Tabelul 8. Pentru obținerea de microparticule poroase s-a utilizat drept agent porogen toluenul.

Tabel 8. Protocolul experimental pentru obținerea microparticulelor G și X

Serie	Cod probă	Reticulant	Raport GMA/Reticulant (mol/mol)	Raport Mon/Xan (g/g)	Viteză de rotație r.p.m.	Diluție					
G	G ₁	EGDMA	90/10	-	360	0,5					
	G ₂	DEGDMA									
	G ₃	TEGDMA									
	G ₄	EGDMA	80/20								
	G ₅	DEGDMA									
	G ₆	TEGDMA									
	G ₇	EGDMA	70/30								
	G ₈	DEGDMA									
	G ₉	TEGDMA									
	G ₁₀	EGDMA	50/50								
	G ₁₁	DEGDMA									
	G ₁₂	TEGDMA									
X	X ₁	EGDMA	90/10	23/1							
	X ₂	DEGDMA									
	X ₃	TEGDMA									
	X ₄	EGDMA	80/20								
	X ₅	DEGDMA									
	X ₆	TEGDMA									
	X ₇	EGDMA	70/30								
	X ₈	DEGDMA									
	X ₉	TEGDMA									
	X ₁₀	EGDMA	50/50								
	X ₁₁	DEGDMA									
	X ₁₂	TEGDMA									

Randamentele de obținere a microparticulelor au avut valori cuprinse între 85 și 98%, valorile cele mai mari înregistrându-se în cazul microparticulelor în care reticulantul a fost etilenglicol dimetacrilat.

3.2. Caracterizarea structurală și morfologică a microparticulelor

3.2.1. Spectroscopia FT-IR

Spectrele FT-IR ale glicidil metacrilatului și ale celor trei reticulanti precum și spectrul xantanului sunt foarte bine cunoscute din literatură [254]. În urma analizelor efectuate s-a putut observa un profil similar al spectrelor pentru cele două seturi de microparticule. Astfel, au fost analizate spectrele pentru probele G_1 și X_1 , reticulate cu etilenglicol dimetacrilat (EGDMA) (Figura 53).

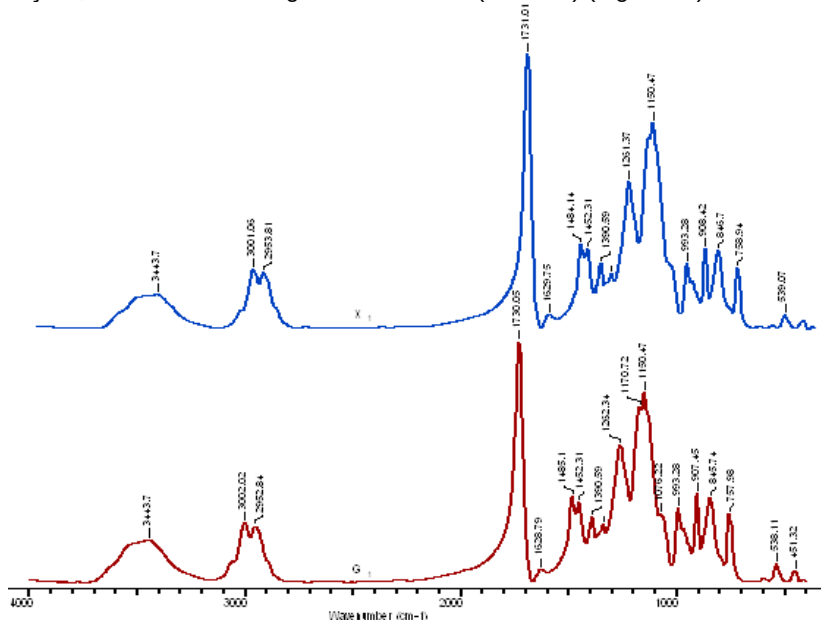


Figura 53. Spectrele FT-IR ale microparticulelor G_1 și X_1

În cazul microparticulelor G_1 , spectrele FT-IR au pus în evidență prezența benzilor de absorbție specifice atât pentru glicidil metacrilat cât și pentru reticulant, după cum urmează: benzile de absorbție de la $3002,02\text{ cm}^{-1}$ și $2952,84\text{ cm}^{-1}$ corespund vibrațiilor de întindere specifice grupărilor $>\text{CH}-$; apariția unei benzi la numărul de undă $1730,75\text{ cm}^{-1}$ este caracteristică grupărilor esterice prezente atât în structura GMA cât și a reticulantului; benzile de absorbție de la $1485,10$ și $1452,31\text{ cm}^{-1}$ indică prezența grupelor metilenice în structură; benzile de absorbție de la $1262,37$ și $1150,47\text{ cm}^{-1}$ sunt specifice legăturilor eterice ($\text{C}-\text{O}-\text{C}$); iar banda de la $907,45\text{ cm}^{-1}$ este caracteristică grupărilor epoxi prezente în structura glicidil metacrilatului.

În cazul microparticulelor X se poate observa o ușoară deplasare a benzilor de absorbție față de probele G , însă în general se constată o

similaritate a spectrelor. Datorită faptului că majoritatea benzilor de absorbție se suprapun pentru perechile de probe $G_1 - X_1$, pentru a evidenția prezența xantanului în structurile microparticulate s-a efectuat calculul ariilor benzilor caracteristice, cele mai importante valori fiind ilustrate în Tabelul 11.

Tabel 11. Ariile benzilor caracteristice specifice probelor G_1 și X_1

Cod probă	$A_{907\text{ cm}^{-1}}$	$A_{1630\text{ cm}^{-1}}$	$A_{1150\text{ cm}^{-1}}$	$A_{3400\text{ cm}^{-1}}$
G_1	2,88	0,80	23,37	29,96
X_1	4,89	1,00	48,28	37,94

Pe baza datelor obținute se pot concluziona următoarele:

- în toate cazurile ariile benzilor corespunzătoare microparticulelor X sunt mai mari comparativ cu ariile benzilor microparticulelor G;
- se poate observa în cazul microparticulelor X o creștere a ariei de la 907 cm^{-1} , acest lucru datorându-se faptului că xantanul joacă rol nu numai de participant la reacție ci și de stabilizator de suspensie, având o acțiune protectoare asupra grupărilor epoxidice și împiedicând deschiderea lor în timpul reacției;
- pentru probele X se observă o creștere a ariei de la 1150 cm^{-1} , corespunzătoare legăturilor eterice, ceea ce confirmă mecanismul de reacție propus în Schema 2 (b);
- în cazul microparticulelor X valoarea considerabil mai mari ale ariei benzii de absorbție de la 3400 cm^{-1} este datorată aportului de grupe hidroxilice ale xantanului.

Același comportament de constată și în cazul particulelor reticulate cu dietilenglicol dimetacrilat (DEGDMA) și trietilenglicol dimetacrilat (TEGDMA).

3.2.2. Microscopia electronică de baleiaj (SEM)

Una dintre principalele metode de caracterizare morfologică a particulelor o constituie microscopia electronică de baleiaj cu ajutorul căreia se pot investiga forma, dimensiunile și caracteristicile interne și de suprafață ale probelor.

Figurile 54, 55 și 56 ilustrează comparativ micrografiile probelor G_1 și X_1 , G_2 și X_2 și respectiv G_3 și X_3 atât din punct de vedere al diferențelor de suprafață cât și a structurilor interne.

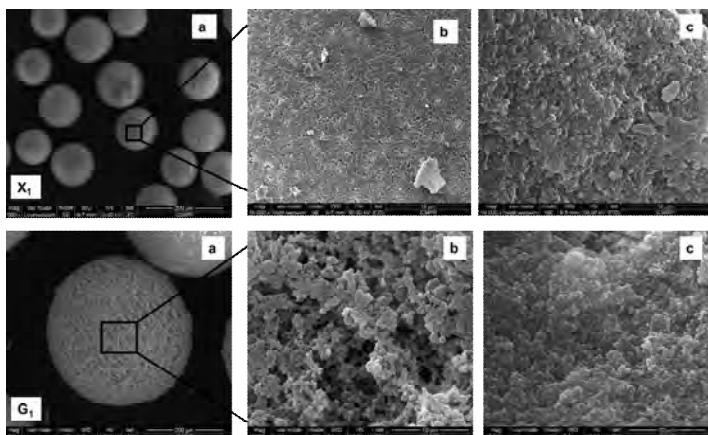


Figura 54. Micrografiile probelor G_1 și X_1 : a și b) detaliu de suprafață; c) detaliu al structurii interne a microparticulelor

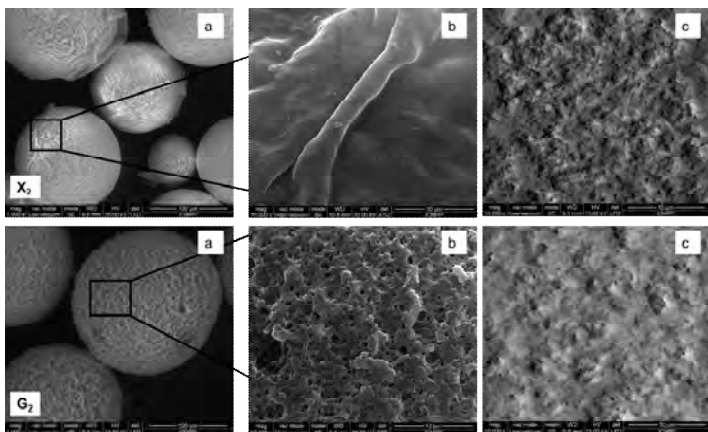


Figura 55. Micrografiile probelor G_2 și X_2 : a și b) detaliu de suprafață; c) detaliu al structurii interne a microparticulelor

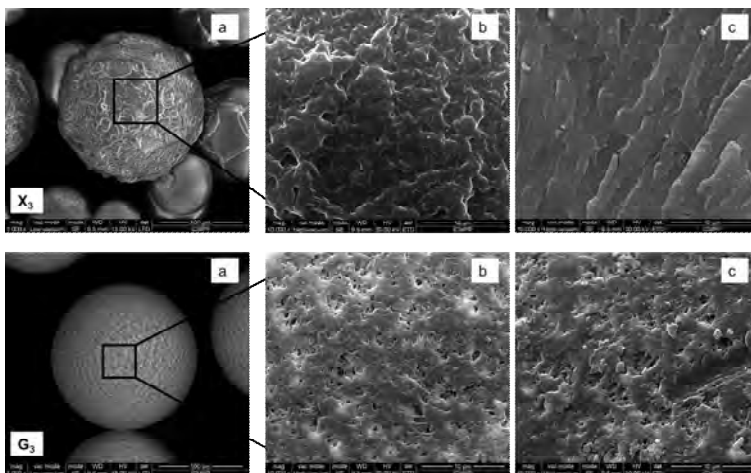


Figura 56. Micrografiile probelor G_3 și X_3 : a și b) detaliu de suprafață; c) detaliu al structurii interne a microparticulelor

Microscopia electronică de baleiaj evidențiază faptul că microparticulele G și X se caracterizează prin morfologii poroase, formă sferică, bine definită și dimensiuni micrometrice. Diferențele ce apar între morfologiile suprafețelor celor două seturi de probe (cu și fără xantan) indică faptul că polizaharida reacționează cu monomerii metacrilici formând o nouă structură polimeră reticulată, respectând mecanismul propus anterior. Din micrografii se observă că introducerea xantanului în sistem conduce la formarea unor structuri tridimensionale ce prezintă pe suprafață un număr mai mare de pori însă cu dimensiuni mai mici.

Structurile interne ale microparticulelor G și X relevă ușoare diferențe între cele două seturi de probe, iar pentru probele X , micrografiile ilustrează o diferență între structura internă și cea externă, această neuniformitate datorându-se faptului că macroradicalii de xantan prezenți în sistem atacă în special legăturile duble nereacționate ale monomerilor dimetacrilici legându-se preponderent la suprafața și în straturile superficiale ale microparticulelor.

Prin modificarea regimului hidrodinamic în cazul probelor G_1 și X_1 , mai exact prin creșterea vitezei de rotație de la 360 r.p.m. la 450 și respectiv 600 r.p.m., se constată o descreștere a dimensiunilor particulelor, dar și o scădere a stabilității mecanice (Figura 58).

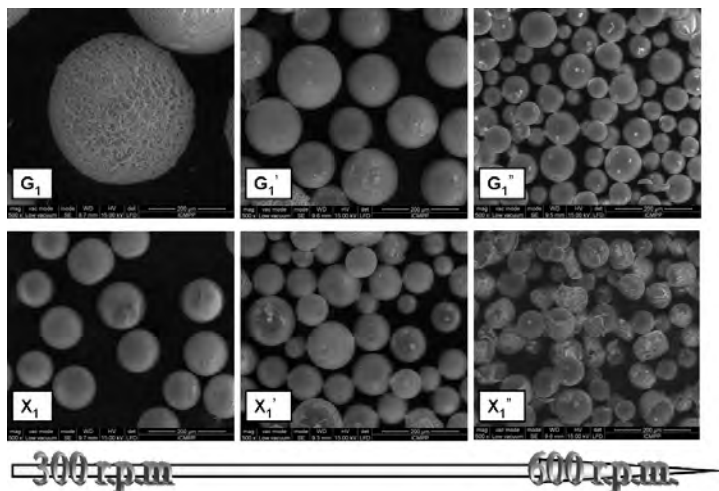


Figura 58. Influența vitezei de rotație asupra morfologiei particulelor

Influența naturii reticulantului asupra caracteristicilor morfologice ale probelor G_1 , G_2 , G_3 și respectiv X_1 , X_2 , și X_3 este evidențiată în Figurile 54-56. Prin creșterea lanțului polimeric al reticulantului, în cazul microparticulelor X se constată obținerea unor particule cu suprafețe din ce în ce mai rugoase, acest lucru fiind datorat complexității proceselor de reticulare însoțite, în cazul dietilenglicol dimetacrilatului și în special a trietilenglicol dimetacrilatului, de numeroase procese de ciclizare internă [32].

3.2.3. Microscopie de forță atomică

Diferențele de morfologie dintre cele două seturi de microparticule au fost evaluate cu ajutorul microscopiei de forță atomică.

Micrografiile prezentate în Figurile 62, 63 și 64 vin în acord cu analiza SEM, confirmând deosebirile existente între microparticulele pe bază de GMA și cele pe bază de GMA și XAN.

S-a constatat că prezența xantanului în structură conduce la o scădere a rugozității precum și a dimensiunilor porilor de pe suprafață (Tabel 12).

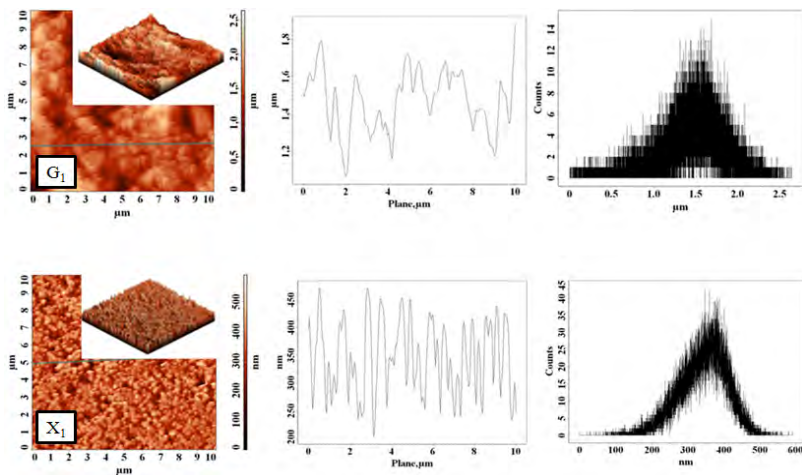


Figura 62. Imagini AFM pentru probele G_1 și X_1

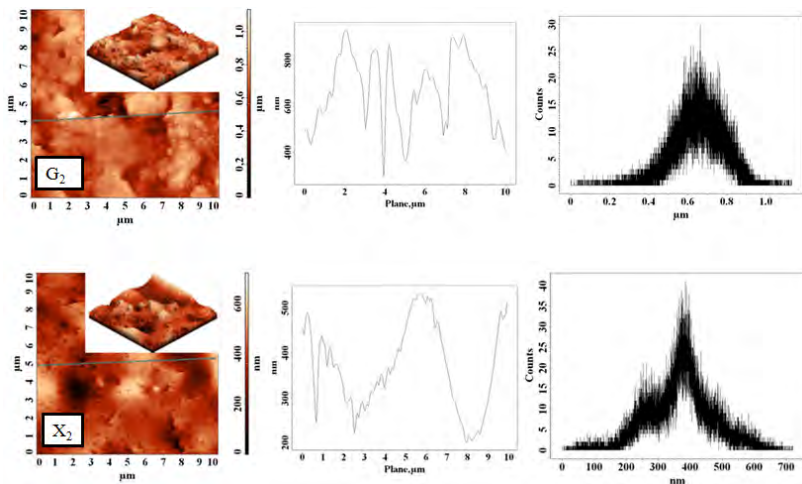


Figura 63. Imagini AFM pentru probele G_2 și X_2

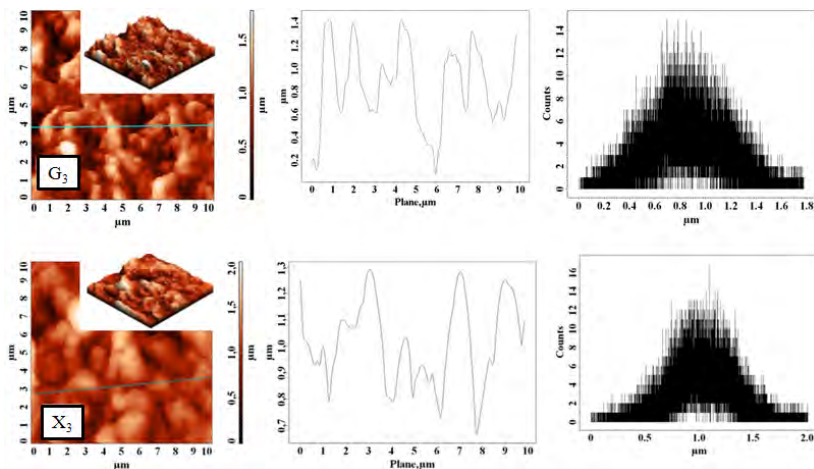


Figura 64. Imagini AFM pentru probele G_3 și X_3

Informațiile obținute din AFM au fost prelucrate utilizând programul NT-MDT NOVA, cu ajutorul căruia s-au calculat parametrii caracteristici suprafeței microparticulelor (Tabel 12) cum ar fi: rugozitatea medie (S_a), rădăcina medie pătrată a rugozității (S_q), asimetria distribuției înălțimilor pe suprafață (S_{sk}) și excesul înălțimilor de pe suprafață (S_{ku}).

Tabel 12. Parametrii specifici caracteristicilor de suprafață ale microparticulelor G și X determinați cu ajutorul analizei AFM

Cod probă	S_a (nm)	S_q (nm)	S_{sk}	S_{ku}	D_{med} (nm)
G_1	273,48	354,72	-0,545	0,778	431
G_2	99,36	126,57	-0,393	0,713	353
G_3	240,53	297,83	-0,043	0,298	340
X_1	52,29	65,22	-0,414	0,146	157
X_2	75,45	98,46	-0,057	0,433	275
X_3	227,27	287,03	-0,038	0,247	329

Valorile negative calculate pentru parametrul S_{sk} indică obținerea unor microparticule poroase, în timp ce valorile S_{ku} mai mici de 3 sugerează obținerea unor structuri cu suprafețe neregulate și cu numeroase asperități.

Forma și dimensiunile porilor au fost investigate prin determinarea factorilor de formă și elongație (Tabel 13). Astfel, cei doi parametri au fost calculați cu ajutorul ecuațiilor 37 și 38:

$$f_{forma} = \frac{4 \cdot \pi \cdot A}{1.064P^2} \quad (37)$$

$$f_{elongatie} = \frac{D_{min}}{D_{max}} \quad (38)$$

unde: A – aria porilor, P – perimetrul porilor, D_{min} – diametrul minim Feret, D_{max} – diametrul maxim Feret.

Tabel 13. Valorile factorilor de formă și de elongație

Cod probă	f_{forma}	$f_{elongatie}$
G₁	0,501	0,174
G₂	0,482	0,222
G₃	0,460	0,172
X₁	0,198	0,248
X₂	0,537	0,251
X₃	0,658	0,179

În urma calculelor efectuate, cei doi factori prezintă valori cuprinse în intervalele 0,198 – 0,658 și respectiv 0,172 – 0,251 relevând prezența pe suprafață a unor pori cu formă eliptică și contur neregulat [270].

3.2.4. Distribuția dimensională a microparticulelor

Dimensiunile particulelor și distribuția lor dimensională a fost analizată cu ajutorul difractometriei cu radiație laser. Figura 65 evidențiază o descreștere a dimensiunilor și a polidispersității dimensionale pentru microparticulele X în comparație cu microparticulele G, acest lucru fiind datorat prezenței în structură a polizaharidei. Datorită vâscozității ridicate a xantanului chiar și la temperaturi mai înalte, acesta îndeplinește în timpul procesului de sinteză rolul de stabilizator al sistemului de reacție asigurând în final o polidispersitate scăzută și dimensiuni mai mici ale perlelor.

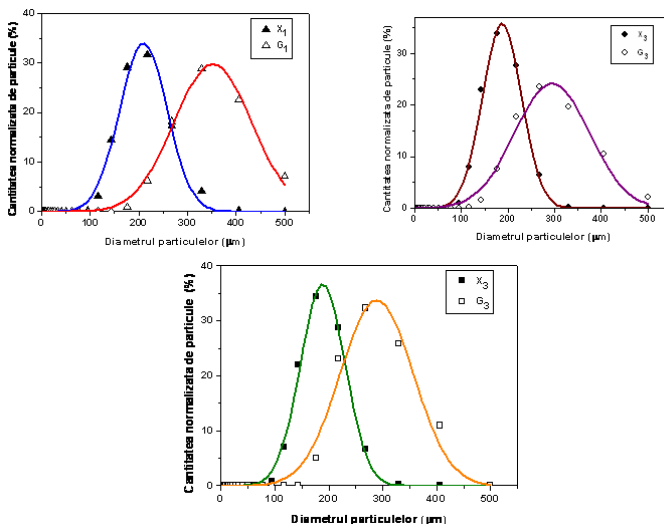


Figura 65. Distribuția dimensională a microparticulelor $G_1, X_1; G_2, X_2$ și G_3, X_3

3.2.5. Metode de caracterizare a structurilor poroase

Pentru microparticulele pe bază de glicidil metacrilat și xantan atât porozitatea cât și volumul porilor au fost calculate din densitățile specifice și respectiv aparente cu ajutorul relațiilor 39 și 40:

$$P = 100 \bullet \left(1 - \frac{\rho_{ap}}{\rho_{sp}} \right) \% \quad (39)$$

$$VP = \frac{1}{\rho_{ap}} - \frac{1}{\rho_{sp}} (mlg^{-1}) \quad (40)$$

În cazul suprafeței specifice, aceasta s-a determinat prin metoda BET cu ajutorul curbelor de sorbție-desorbție obținute prin metoda sorbției dinamice de vapori.

Deoarece obiectivul acestei lucrări a fost acela de a sintetiza noi suporturi pentru reținerea de principii active, iar cele mai bune rezultate au fost obținute pentru microparticulele pe bază de glicidil metacrilat și pe bază de glicidil metacrilat și xantan cu un raport molar între GMA și reticulant de 90:10, în Tabelul 14 sunt ilustrate valorile obținute pentru seturile de probe $G_1 - X_1, G_2 - X_2$ și respectiv $G_3 - X_3$.

Tabel 14. Morfologia structurilor poroase

Codul probei	VP (mL/g)	P (%)	S _{BET} (m ² /g)
G ₁	0,598	44,32	69
G ₂	0,524	41,01	49
G ₃	0,450	35,28	31
X ₁	0,425	35,63	129
X ₂	0,233	22,37	50
X ₃	0,176	17,68	44

În cazul morfologiei structurilor poroase, principalii factori de influență sunt:

- tipul monomerilor;
- concentrația de monomeri;
- tipul agentului porogen;
- cantitatea de agent porogen utilizată.

Atât în cazul microparticulelor G cât și al microparticulelor X se observă o descreștere a porozității și a volumului porilor odată cu creșterea catenei reticulantului. Tabelul 14 evidențiază o porozitate mai mare obținută în cazul probelor G₁ și X₁, ce descrește progresiv odată cu creșterea lanțului dimetacrilic al reticulantului. Acest comportament este datorat complexității mecanismelor de polimerizare ce includ reacții inter- și intramoleculare precum și reacții de ciclizare ce pot să apară chiar din primele stadii ale procesului de copolimerizare. Prin creșterea lanțului monomerului dimetacrilic de la etilenglicol la dietilenglicol și în final la trietilenglicol dimetacrilat are loc o creștere a flexibilității lanțului polimeric ceea ce conduce la un număr mai mare de reacții de ciclizare în timpul procesului de sinteză. Aceste fenomene determină formarea unor structuri mult mai dense și mai compacte caracterizate printr-o porozitate mai scăzută și un volum al porilor mai mic.

Pentru microparticulele pe bază de xantan, prezența acestuia în structură conduce la o descreștere a porozității și la o creștere a suprafeței specifice. Obținerea unor suprafețe specifice mai mari este datorată faptului că microparticulele X posedă un număr mai mare de pori cu dimensiuni mici comparativ cu microparticulele G.

3.2.6. Sorbția dinamică de vapori

Sorbția dinamică de vapori reprezintă o metodă extrem de simplă de determinare a izotermelor de sorbție-desorbție pentru diverse tipuri de materiale, forma izotermelor fiind în strânsă corelație cu dimensiunile și caracteristicile structurale ale materialelor [272].

Figura 67 prezintă curbele de histerezis pentru probele G și X obținute la temperatura de 25°C utilizând modelul cinetic BET, bazat pe ecuația de calcul 41:

$$W = \frac{W_m \bullet C \bullet RH}{(1 - RH) \bullet (1 - RH + C \bullet RH)} \quad (41)$$

unde: W – cantitatea de apă absorbită; W_m – cantitatea de apă ce formează un monostrat; C – constanta de sorbție; RH – umiditatea relativă.

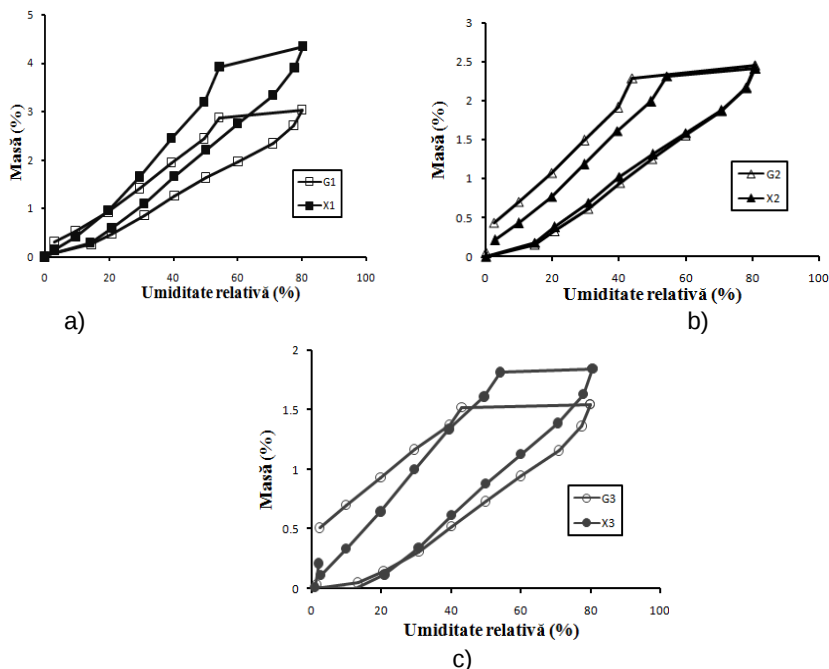


Figura 67. Izotermele de sorbție-desorbție specifice microparticulelor G și X: a) G_1 , X_1 ; b) G_2 , X_2 ; c) G_3 , X_3

Conform clasificării IUPAC, izotermele de sorbție-desorbție pot fi asociate curbelor de tip V specifice materialelor hidrofobe sau slab hidrofile ce prezintă capacitate scăzută de sorbție la valori mici ale umidității relative și interacții slabe între sorbent și moleculele de apă. De asemenea, acest tip de izoterme este caracteristic structurilor poroase, cu pori interconectați, ce prezintă histerezis de tip H_2 între ciclurile de sorbție-desorbție [264, 273].

3.3. Obținerea sistemelor polimer-medicament

Pentru obținerea sistemelor polimer-principiu biologic activ, ca medicament model s-a ales teofilina, iar ca metodă de reținere a substanței active includerea în rețeaua polimeră. În urma rezultatelor obținute din analizele structurale și morfologice efectuate pe cele două seturi de particule, suporturile G_1 și X_1 au demonstrat a fi potrivite pentru reținerea și eliberarea controlată a medicamentului.

Prezența teofilinei în structurile microparticulate a fost evidențiată cu ajutorul spectroscopiei de absorbție în infraroșu, iar eficiența de încapsulare pentru cele două sisteme a fost determinată prin calculul conținutului de N_2 cu ajutorul analizei elementale cantitativă.

De asemenea, sistemele particulate notate G_1 TPH și X_1 TPH au fost analizate prin microscopie electronică de baleiaj și microscopie de forță atomică.

Capacitatea sistemelor de a elibera principiul activ a fost studiată atât la un pH de 1,2 cât și la un pH de 7,4, cele patru curbe de eliberare fiind ilustrate în Figura 76. În condiții de pH = 7,4 se constată o capacitate de eliberare mai bună datorată relaxării lanțurilor polimerice și a unui grad de umflare mai crescut în soluția tampon fosfat.

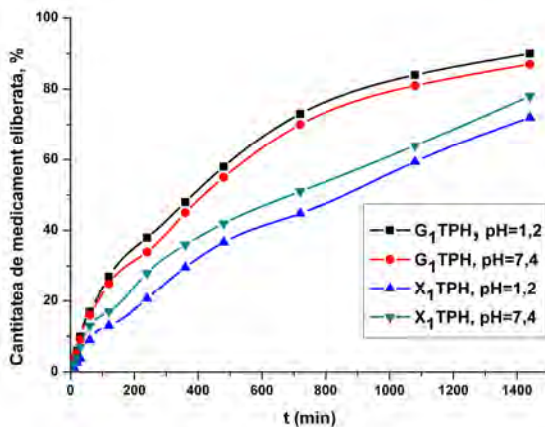


Figura 76. Curbele de eliberare pentru probele G_1 TPH și X_1 TPH la pH = 1,2 și pH = 7,4

Analiza cineticii de eliberare a teofilinei din microparticulele G și X a fost efectuată cu ajutorul a patru modele matematice: modelul de ordin I, modelul Korsmeyer-Peppas, modelul Higuchi și modelul Baker-Lonsdale [277].

Spre exemplificare, în Figura 78 sunt reprezentate cineticele de eliberare a teofilinei studiate cu ajutorul modelelor matematice Korsmeyer-Peppas și Higuchi.

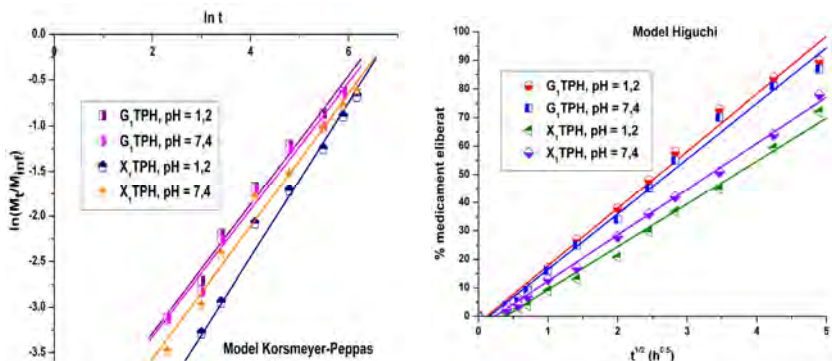


Figura 78. Cineticele de eliberare specifice microparticulelor G și X utilizând modelul Korsmeyer-Peppas și modelul Higuchi

Se cunoaște din literatură că procesul de eliberare a medicamentelor este dependent de o serie de factori cum ar fi: proprietățile fizico-chimice ale microparticulelor, metoda de preparare și dimensiunea microparticulelor [278].

Valorile parametrilor cinetici ale procesului de eliberare a teofilinei din microparticulele G și X sunt prezentate în Tabelul 19.

Tabel 19. Parametrii cinetici ai procesului de eliberare

Cod probă	Model de ordin I		Model Higuchi		Model Korsmeyer-Peppas			Model Baker-Lonsdale	
	k_1 (h ⁻¹)	R ²	k_H (h ^{-1/2})	R ²	k_r (min ⁻ⁿ)	n	R ²	k_{BL}	R ²
G ₁ TPH, pH = 1,2	0,097	0,998	20,17	0,995	0,0091	0,709	0,993	0,016	0,994
G ₁ TPH, pH = 7,4	0,087	0,997	19,49	0,995	0,0089	0,700	0,989	0,015	0,993
X ₁ TPH, pH = 1,2	0,051	0,998	15,13	0,994	0,0028	0,811	0,993	0,008	0,994
X ₁ TPH, pH = 7,4	0,059	0,995	16,19	0,997	0,0065	0,732	0,992	0,010	0,996

Din evaluarea constantelor de viteză pentru toate cele 4 modele aplicate se poate observa că viteza de eliberare a teofilinei din microparticulele X₁ este

mai mică decât cea pentru microparticulele G_1 . Acest fenomen poate fi explicat prin prezența xantanului în structura microparticulelor X_1 care poate interacționa cu teofilina prin intermediul interacțiunilor fizice de tipul legăturilor de hidrogen sau a legăturilor ionice. În cazul microparticulelor G_1 medicamentul este reținut numai în porii rețelei reticulate și din acest motiv poate fi eliberat mai repede. Exponentul difuzional, n , are valori mai mari decât 0,43 indicând faptul că mecanismul de eliberare a teofilinei este controlat atât de difuzie cât și de fenomenul de relaxare a lanțurilor polimerice. Deoarece valorile lui n sunt mai mici de 0,85 rezultă că microparticulele se umflă în mediul de eliberare dar nu prezintă fenomene de eroziune sau de dezintegrare.

CAPITOLUL 4

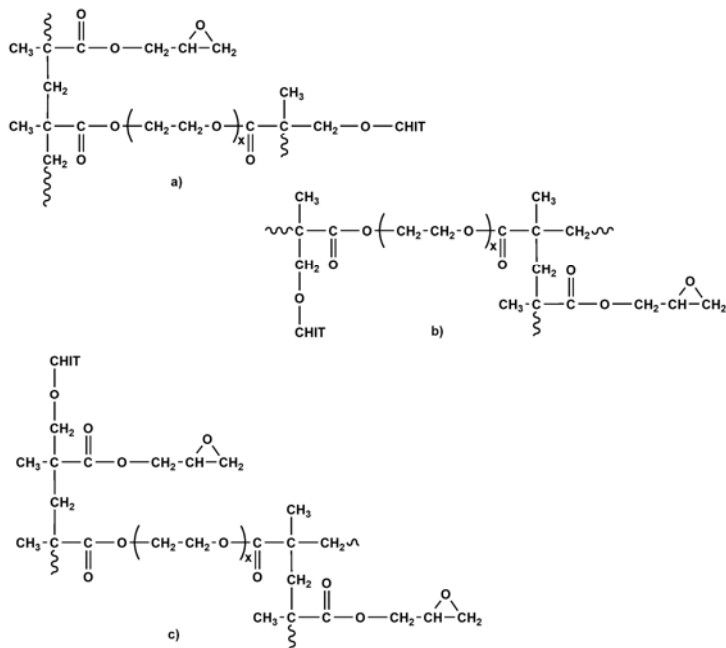
SISTEME POLIMER-MEDICAMENT PE BAZĂ DE GLICIDIL METACRILAT ȘI CHITOSAN

Utilizând metoda polimerizării în suspensie au fost preparate o serie de suporturi pe bază de glicidil metacrilat și chitosan respectând protocolul prezentat în Tabelul 20.

Tabel 20. Protocolul experimental pentru sinteza microparticulelor pe bază de GMA și CHIT

Cod probă	Reticulant	Raport GMA/Reticulant (mol/mol)	Raport Mon/CHIT (g/g)	Agent porogen	Viteză de rotație r.p.m.	Diluție
C ₁	EGDMA	90/10	23/1	Toluen	360	0,5
C ₂	DEGDMA					
C ₃	TEGDMA					

Mecanismul de reacție este similar cu cel întâlnit în cazul microparticulelor X (Schema 4), constatându-se și în acest caz mai multe posibilități de grefare a polizaharidei pe lanțurile rețelei polimere (Schema 5).



Schema 5. Posibilități de grefare a chitosanului pe rețeaua polimeră

Spre deosebire de microparticulele pe bază de glicidil metacrilat și xantan, unde s-au obținut randamente mai mari comparativ cu microparticulele pe bază de polimeri sintetici, în cazul microparticulelor C, în urma reacțiilor de copolimerizare s-au determinat o serie de randamente cuprinse între 60 și 85%. Aceste valori mai mici ale randamentului pot fi datorate apariției unor reacții secundare cu formare de compuși solubili în mediul de reacție care sunt îndepărtați în timpul purificării microparticulelor.

4.2. Caracterizarea structurală și morfologică a microparticulelor pe bază de glicidil metacrilat și chitosan

4.2.2. Conținutul de grupe epoxi

Determinarea conținutului de grupe epoxi pentru microparticulele pe bază de glicidil metacrilat și chitosan s-a realizat utilizând metoda titrimetrică HCl-dioxan și metoda regresiei liniare cu ajutorul spectroscopiei FT-IR. În Tabelul 22 sunt prezentate valorile grupelor funcționale obținute prin cele două metode de caracterizare alături de valorile teoretice specifice microparticulelor C.

Tabel 22. Determinarea grupelor epoxi prin titrare și spectroscopie FT-IR

Codul probei	% grupe epoxi		
	teoretic	titrare	FT-IR
C ₁	25,10	20,25	24,51
C ₂	24,37	18,01	21,69
C ₃	23,69	15,29	17,83

Din tabel se pot remarca ușoare diferențe între valorile determinate prin calcul matematic din ecuațiile curbelor de calibrare și valorile teoretice pentru fiecare probă în parte. Aceste diferențe se datorează deschiderii unui număr redus de cicluri epoxidice în timpul procesului de polimerizare, deschidere cauzată de mediul apos și temperatura ridicată la care se lucrează. Utilizarea metodei titrimetrică conduce la obținerea unor valori inferioare comparativ cu cele teoretice. Chiar și la un conținut mic de reticulant (10%), particulele se caracterizează printr-o rigiditate a lanțurilor polimerice ce nu permite pătrunderea în interior a acidului clorhidric. Deși microparticulele C prezintă un conținut mai ridicat în grupe epoxi comparativ cu microparticulele G, și în acest caz se constată că metoda titrimetrică poate fi utilă pentru estimarea grupelor epoxi de pe suprafață și din straturile superficiale în vederea unor eventuale reacții de modificare sau pentru reținerea unor substanțe biologic active.

4.2.4. Microscopia electronică de baleiaj

Caracteristicile morfologice ale microparticulelor pe bază de glicidil metacrilat și chitosan au fost studiate cu ajutorul microscopiei electronice de baleiaj. Figura 80 prezintă micrografiile specifice probelor C₁, C₂ și C₃, imaginile SEM pentru microparticulele G fiind ilustrate în Subcapitolul 3.2.2.

Analiza SEM relevă obținerea unor structuri poroase microparticulate, cu o formă sferică bine definită. Prin comparație cu micrografiile probelor G₁, G₂ și G₃ ilustrate în Figurile 54, 55 și respectiv 56, microparticulele C se caracterizează prin morfologii diferite, datorate reacțiilor de îmbinare a chitosanului pe lanțurile polimerice.

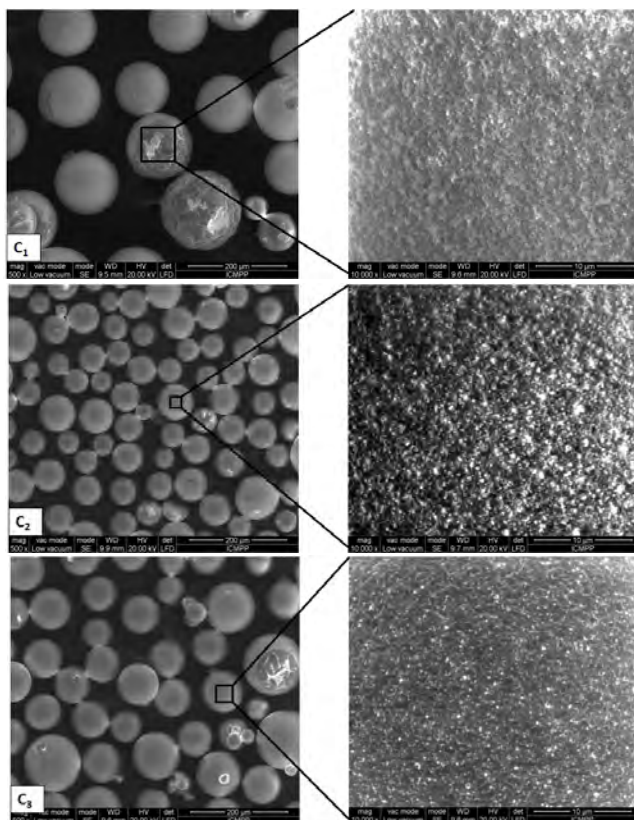


Figura 80. Micrografii SEM pentru probele C₁, C₂ și C₃

4.3. Obținerea sistemelor polimer-medicament

În cazul microparticulelor C, capacitatea suporturilor macroporoase de a reține și a elibera principii active a fost evaluată utilizând ca medicament model cloramfenicol hemisuccinat de sodiu. Influența medicamentului asupra morfologiei particulelor poroase a fost pusă în evidență prin intermediul microscopiei electronice de baleiaj. Micrografiile SEM, prezentate în Figura 85 evidențiază structura poroasă a microparticulelor polimere. De asemenea, imaginile relevă obținerea unor particule caracterizate printr-o formă sferică, bine definită și cu diametre de ordin micrometric.

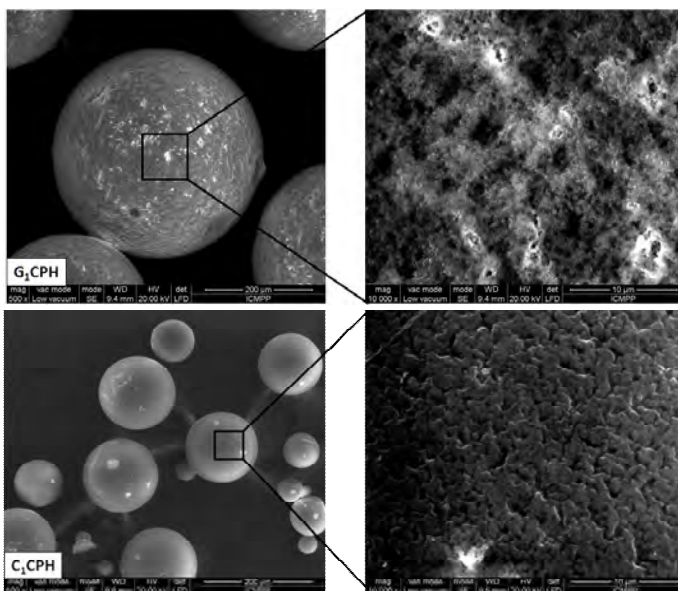


Figura 85. Micrografiile SEM pentru probele G₁CPH și C₁CPH

Prin calcularea conținutului de clor din analiza elementală s-a putut determina o eficiență de încapsulare a CPH de 37% pentru proba G₁CPH și 42% pentru proba C₁CPH. Ca și în cazul sistemelor X-teofilină, valoarea ușor mai ridicată a eficienței de încapsulare pentru proba C₁CPH este datorată prezenței chitosanului în structura microparticulelor, știut fiind faptul că chitosanul este o polizaharidă cationică ce poate interacționa cu medicamentul prin intermediul legăturilor ionice. Curbele de eliberare ale medicamentului la pH = 1,2 și 7,4 sunt prezentate în Figura 87.

Din analiza valorilor parametrilor cinetici ai procesului de eliberare a cloramfenicolului hemisuccinat de sodiu din microparticulele G₁CPH și C₁CPH se pot trage următoarele concluzii:

- ◆ eliberarea medicamentului din microparticulele C₁CPH se realizează cu viteze mai mici decât în cazul microparticulelor G₁CPH datorită prezenței polizaharidei în structura microparticulelor C ce determină formarea de interacțiuni ionice, puternice, între medicament și suport.
- ◆ exponentul difuzional, n , determinat prin metoda Korsmeyer-Peppas are valori cuprinse între 0,640 și 0,831 indicând faptul că mecanismul de eliberare al CPH este controlat atât de difuzie cât și de fenomenul de relaxare a lanțurilor polimerice.

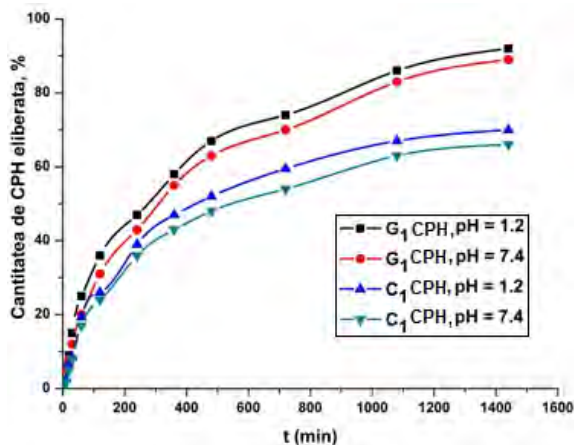


Figura 87. Curbele de eliberare pentru probele G₁CPH și C₁CPH la pH = 1,2 și pH = 7,4

CAPITOLUL 5

SISTEME POLIMER-MEDICAMENT PE BAZĂ DE GLICIDIL METACRILAT ȘI GELAN

5.1. Sinteza microparticulelor pe bază de glicidil metacrilat și gelan

Microparticulele polimere pe bază de glicidil metacrilat și gelan s-au obținut prin polimerizare în suspensie apoasă. Astfel, s-au preparat trei seturi de microparticule poroase, după cum urmează:

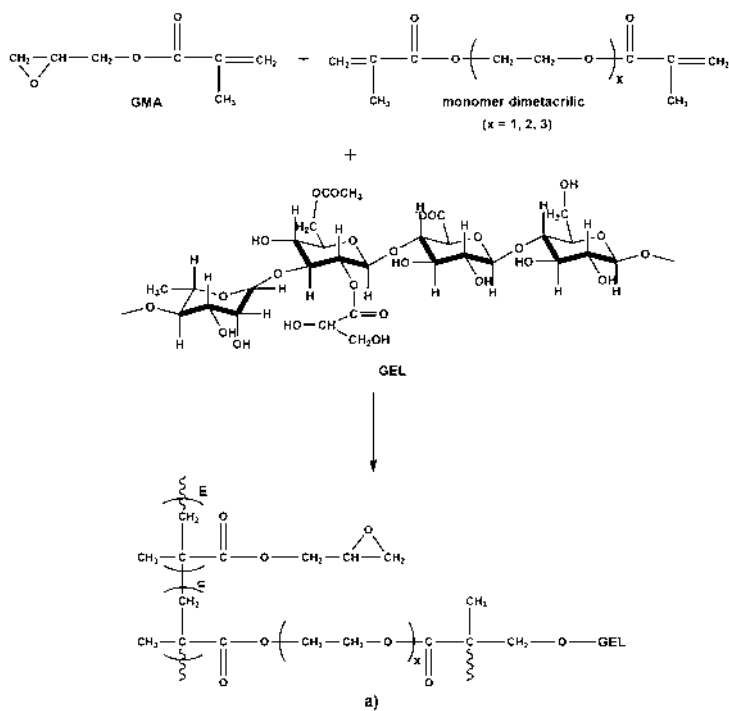
- un prim set obținut prin reticularea GMA cu cei trei monomeri dimetacrilici notat G_x (x = 1, 2, 3);
- un al doilea set obținut prin grefarea gelanului la macroradicalii obținuți prin scindarea dublelor legături în timpul procesului de copolimerizare, notat GG_x (x = 1, 2, 3);
- un al treilea set obținut prin grefarea gelanului la grupele epoxi aflate pe suprafața microparticulelor, după procesul de copolimerizare, notat GG_x (x = 4, 5, 6).

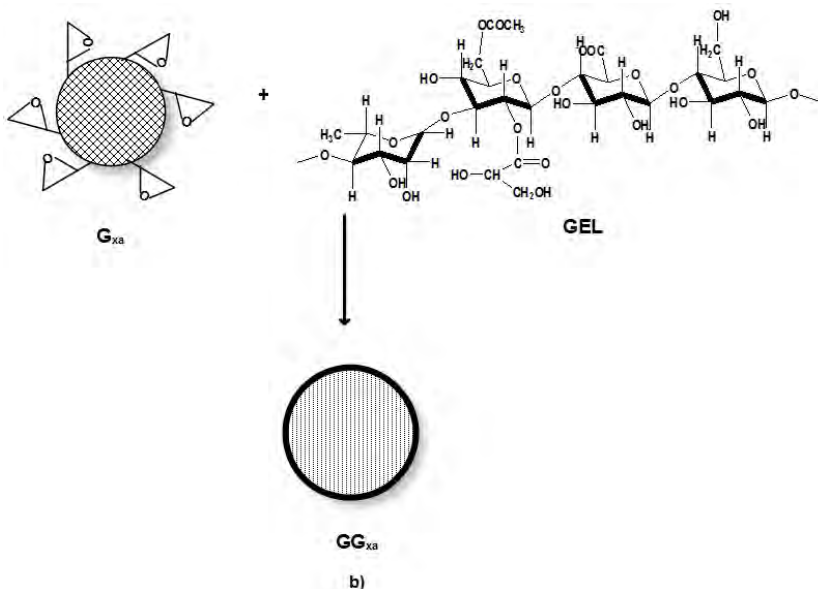
Programul experimental respectat pentru obținerea microparticulelor poroase este ilustrat în Tabelul 33.

Tabel 33. Program experimental pentru obținerea microparticulelor pe bază de GMA și GEL

Serie	Cod probă	Reticulan t	Raport GMA/Reti culant (mol/mol)	Raport Mon/G EL(g/g)	Raport particule/ GEL (g/g)	Agent porogen	Viteză de rotație r.p.m.	Diluție
G	G _{1a} G _{2a} G _{3a}	EGDMA DEGDMA TEGDMA	90/10	-	-	Acetat de n-butil	360	0,5
GG	GG _{1a} GG _{2a} GG _{3a}	EGDMA DEGDMA TEGDMA	90/10	1/23	-			
	GG _{4a} GG _{5a} GG _{6a}	EGDMA DEGDMA TEGDMA	90/10	-	1/1			

Reacțiile generale de obținere a suporturilor poroase pe bază de GMA și GEL sunt prezentate în Schema 6.





Schema 6. Reacțiile generale de obținere a suporturilor poroase a) grefarea gelanului prin scindarea dubelor legături în timpul sintezei; b) grefarea gelanului pe suprafața particulelor prin deschiderea ciclurilor epoxi

5.2. Caracterizarea structurală și morfologică a microparticulelor

5.2.1. Spectroscopia FT-IR

Caracterizarea structurală a celor trei tipuri de microparticule polimere s-a efectuat prin spectroscopie de absorbție în infraroșu.

Figura 90 prezintă spectrele FT-IR pentru probele G_{1a} , GG_{1a} și GG_{4a} , reticulate cu etilenglicol dimetacrilat. Apariția unor noi benzi de absorbție la 1637,47, 1541,03, 1845,77 și 1870,84 cm^{-1} în spectrul probei GG_{1a} demonstrează grefarea gelanului pe lanțurile macromoleculare în timpul reacției de copolimerizare.

Acoperirea microparticulelor G_{1a} cu un strat de polizaharidă, prin grefarea la grupele epoxi, conduce la obținerea probei GG_{4a} , al cărui spectru evidențiază apariția unor noi benzi de absorbție la numerele de undă de 1580,57, 1981,74, 2278,75 și 2391,59 cm^{-1} , ce sunt specifice gelanului.

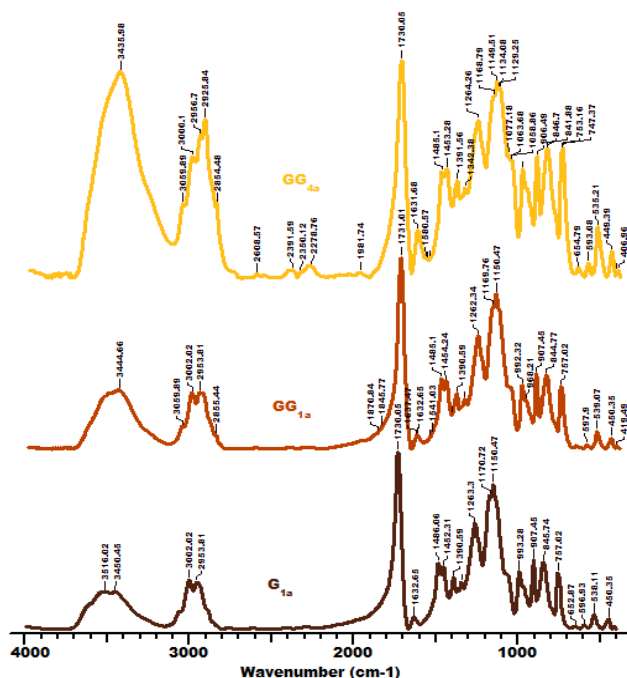


Figura 90. Spectrele FT-IR ale probelor G_{1a}, GG_{1a} și GG_{4a}

5.2.5. Distribuția dimensională a microparticulelor

Influența gelanului asupra dimensiunilor particulelor este evidențiată în Figura 97.

Se constă obținerea unor particule cu dimensiuni mai mici în cazul probelor în care gelanul a fost grefat pe lanțurile macromoleculare în timpul procesului de copolimerizare și a unor particule cu dimensiuni ușor mai mari pentru cazul în care gelanul a fost grefat la ciclurile epoxi de pe suprafața microparticulelor. Diametrele medii ale microparticulelor variază după cum urmează:

- ❖ G_{1a} – 171 μm; GG_{1a} – 142 μm; GG_{4a} – 183 μm;
- ❖ G_{2a} – 169 μm; GG_{2a} – 150 μm; GG_{5a} – 185 μm;
- ❖ G_{3a} – 166 μm; GG_{3a} – 153 μm; GG_{6a} – 185 μm.

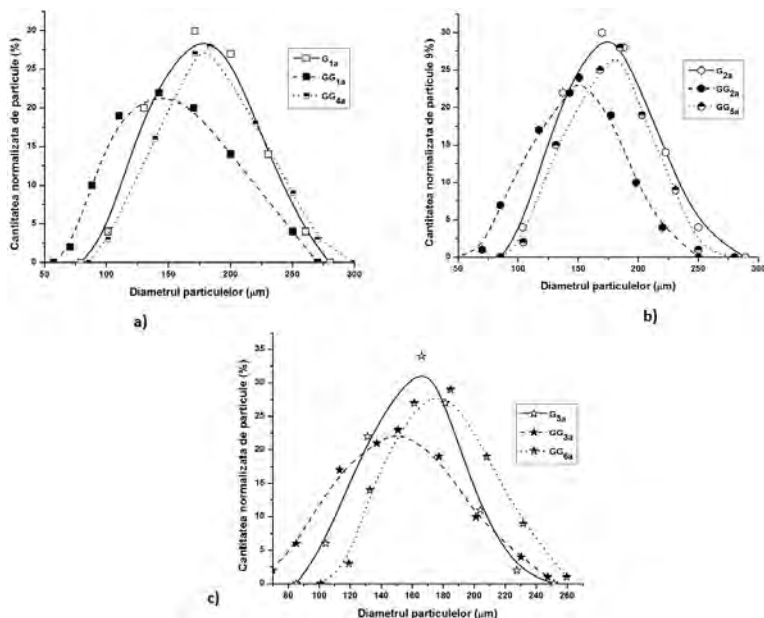


Figura 97. Distribuția dimensională a microparticulelor polimerice

Diametrele mai mici obținute în cazul probelor GG_{1a}, GG_{2a} și GG_{3a} în comparație cu probele G_{1a}, G_{2a} și G_{3a} sunt o consecință a introducerii în sistem a gelanului ce joacă și rol de stabilizator alături de soluția de poli(alcool vinilic), iar diametrele mai mari corespunzătoare probelor GG_{4a}, GG_{5a} și GG_{6a} sunt datorate stratului de polizaharidă ce acoperă microparticulele G.

5.3. Obținerea sistemelor polimer-medicament

Pentru obținerea sistemelor cu eliberare susținută/controlată de medicamente microparticulele au fost încărcate prin difuzie cu cefuroxim sare de sodiu (CFR), antibiotic din clasa cefalosporinelor de a II-a generație, utilizat în tratarea diferitelor infecții, dar și în stadiul inițial al bolii Lyme. Cantitatea de medicament de suporturile poroase s-a determinat prin spectroscopie UV-VIS din curba etalon, valorile obținute fiind trecute în Tabelul 40.

Tabel 40. Cantitatea de cefuroxim sare de sodiu încărcată prin difuzie

Codul probei	CFR (mg/g)
G _{1a}	70,07
G _{2a}	69,38
G _{3a}	109,45
GG _{1a}	130,38
GG _{2a}	100,38
GG _{3a}	144,14
GG _{4a}	107,03
GG _{5a}	103,93
GG _{6a}	135,50

Deoarece cel mai bun randament de reținere s-a obținut pentru microparticulele G_{3a}, GG_{3a} și GG_{6a}, studiile de eliberare ale principiul activ s-au efectuat pentru aceste probe atât la un pH de 1,2 cât și la un pH de 7,4. Curbele de eliberare sunt prezentate în Figura 103.

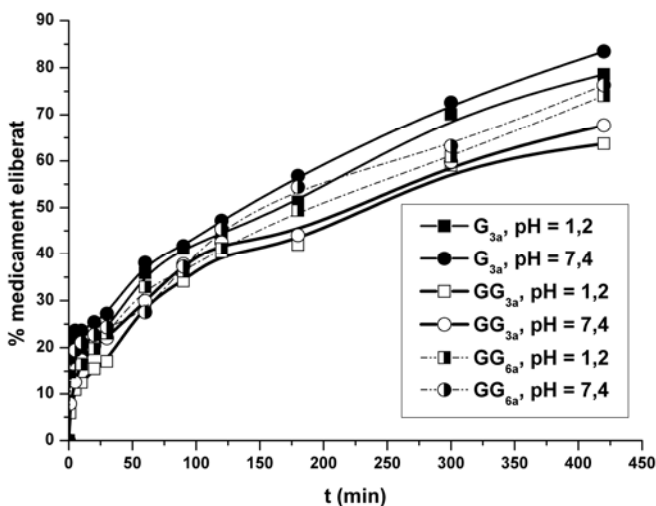


Figura 103. Curbele de eliberare pentru probele G_{3a}, GG_{3a} și GG_{6a} la pH = 1,2 și pH = 7,4

Din evaluarea constantelor de viteză s-a observat că viteza de eliberare a cefuroximului sare de sodiu din microparticulele GG_{3a} și GG_{6a} este mai mică decât cea pentru microparticulele G_{3a}. Acest fenomen poate fi explicat prin prezența gelanului în structura microparticulelor care poate interacționa cu medicamentul atât prin interacțiuni fizice de tipul legăturilor de hidrogen cât și prin legături ionice. Exponentul difuzional, n , obținut prin aplicarea modelului Korsmeyer-Peppas are valori cuprinse între 0,279 și 0,435 indicând faptul că mecanismul de eliberare a cefuroximului sare de sodiu este controlat printr-un proces de difuzie.

CAPITOLUL 6

SISTEME POLIMER-MEDICAMENT PE BAZĂ DE SCHIMBĂTORI DE IONI ACRILICI ȘI GELAN

6.1. Sinteza microparticulelor pe bază de schimbătoare de ioni acrilici și gelan

Sinteza microparticulelor s-a realizat în două etape, după cum urmează:

- obținerea schimbătorului de ioni acrilic (microparticule EGHH) prin reacția de aminoliză cu hidrat de hidrazină a copolimerilor pe bază de acrilat de etil-acrilonitril-etilenglicol dimetacrilat (AE-AN-EGDMA), cu obținerea unor microparticule de culoare roșu-carmin datorită apariției unor grupări cromofore între două grupări hidrazidice de pe lanțurile vecine. Copolimerul AE-AN-EGDMA sub formă de microparticule a fost obținut prin tehnica polimerizării în suspensie;
- acoperirea microparticulelor EGHH cu un strat de polimer natural prin reacția dintre schimbătorul de ioni acrilic în formă OH și gelan (microparticule EGHH-GII).

Reprezentarea schematică a reacțiilor care au loc în cele două etape ale procesului de sinteză a microparticulelor este prezentată în Figurile 108 și 109.

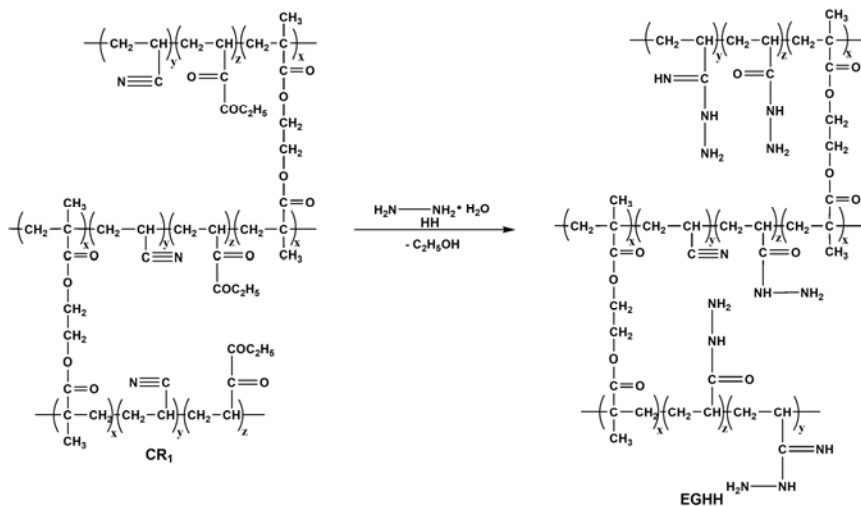


Figura 108. Reacția de obținere a microparticulelor EGHH

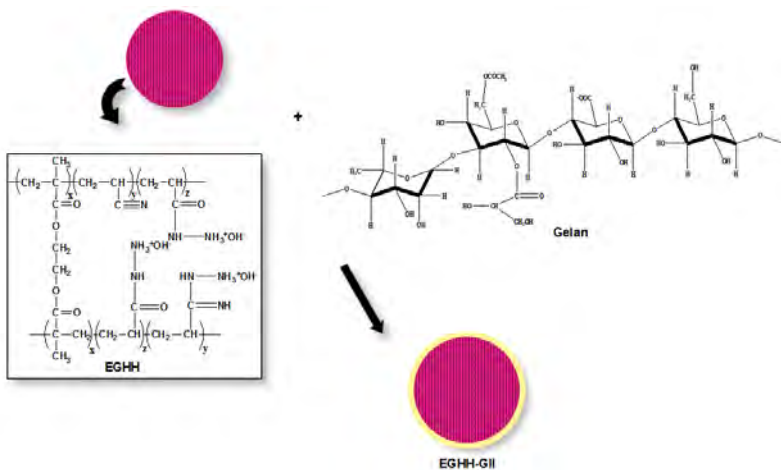


Figura 109. Reacția de obținere a microparticulelor EGHH-GII

În urma reacției de obținere a microparticulelor EGHH-GII s-a constatat că 75% din cantitatea de gelatin introdusă în reacție a reacționat cu schimbătorul de ioni acrilic.

6.2. Caracterizarea structurală și morfologică a microparticulelor

6.2.1. Spectroscopia FT-IR

Spectroscopia FT-IR a fost utilizată pentru a obține informații cu privire la natura interacțiilor care se stabilesc între schimbătorul de ioni și polizaharidă (Figura 110).

Analizând spectrul schimbătorului de ioni acrilic EGHH se constată existența următoarelor benzi de absorbție:

- 3450-3300 cm^{-1} corespunzătoare vibrațiilor de valență ale legăturii NH primare și secundare, simetrice și asimetrice;
- 2925,84 și 2854,48 cm^{-1} specifice vibrațiilor de întindere ale grupelor CH și CH_2 ;
- 2368,45 cm^{-1} caracteristice vibrațiilor grupelor $\text{C}\equiv\text{N}$;
- 1664,47 cm^{-1} corespunzătoare vibrației de forfecare ale grupelor aminice;
- 1561,28 cm^{-1} specifice vibrației legăturilor $\text{C}=\text{C}$, dar și vibrației grupării NH_3^+ .

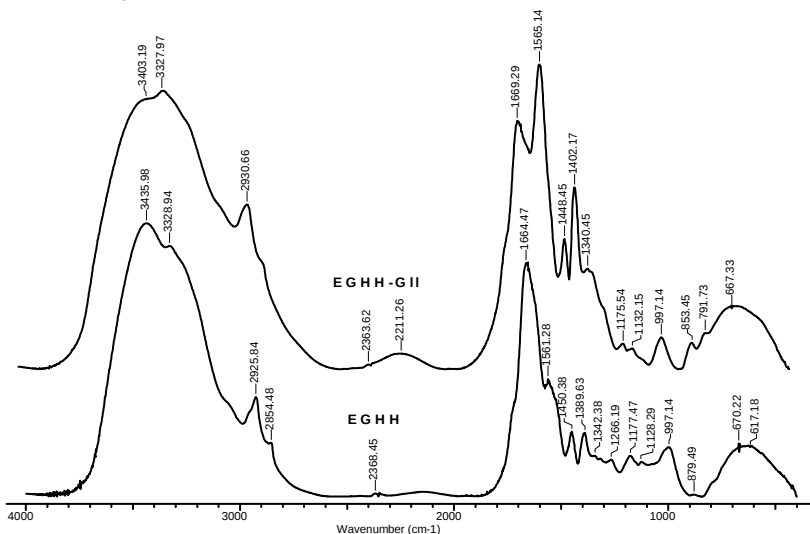


Figura 110. Spectrele FT-IR ale microparticulelor EGHH și EGHH-GII

În spectrul microparticulelor EGHH-GII se observă deplasări ale benzilor de absorbție dar și apariția unor benzi noi, în special cele de la 1555,14 și 1402,17 cm^{-1} caracteristice vibrațiilor de întindere simetrice și asimetrice ale grupeii COO^- specifice gelanului, demonstrându-se faptul că gelanul

reacționează cu schimbătorul de ioni în principal prin intermediul interacțiunilor ionice, fără a se exclude însă posibilitatea existenței și a altor tipuri de interacțiuni fizice.

6.2.2. Microscopia electronică de baleiaj și microscopia de forță atomică

Caracteristicile morfologice ale microparticulelor pe bază de schimbători de ioni și gelan sunt prezentate în Figura 111.

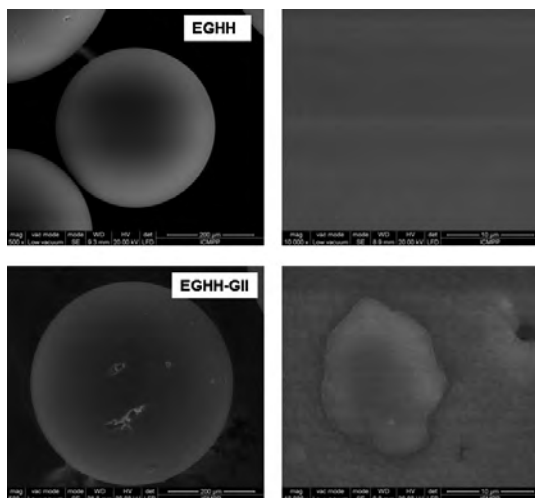


Figura 111. Micrografii SEM pentru probele EGHH și EGHH-GII

Microparticulele EGHH sunt caracterizate prin suprafețe netede, formă sferică bine definită și dimensiuni cuprinse între 200-500 μm . Microparticulele EGHH-GII prezintă suprafețe rugoase, cu pori care atestă formarea unui strat de complex interpolimeric la suprafața microparticulelor EGHH, datorită interacțiunii dintre grupele NH_3^+ ce aparțin schimbătorului de ioni și grupele COO^- de pe catena gelanului. Pentru studiile de absorbție și eliberare a medicamentului au fost luate în considerare microparticulele cu diametrul situat în intervalul 200-300 μm .

Morfologia suprafețelor microparticulelor EGHH și EGHH-GII examinată cu ajutorul analizei AFM este prezentată în Figura 112.

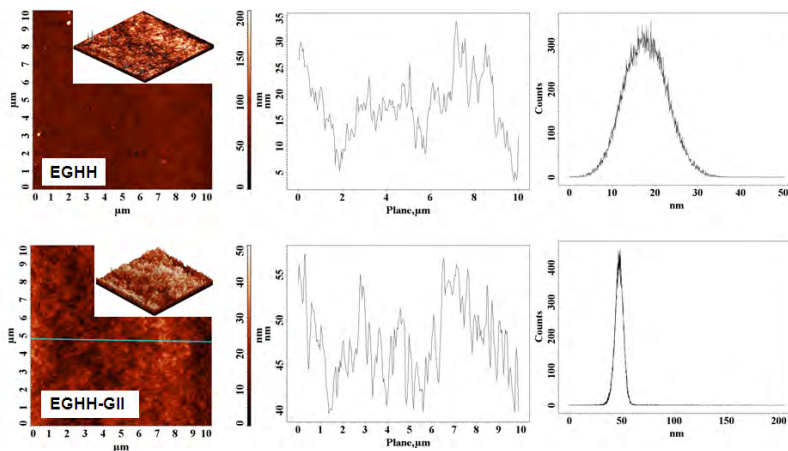


Figura 112. Imagini AFM pentru microparticulele EGHH și EGHH-GII

Rugozitatea microparticulelor crește de la 5,008 nm (microparticulele EGHH) la 5,308 nm (microparticulele EGHH-GII) demonstrând astfel formarea stratului de complex interpolimeric la suprafața microparticulelor EGHH.

6.3. Studii de adsorbție a medicamentelor

Capacitatea de reținere și de eliberare a celor două suporturi a fost evaluată utilizând un medicament hidrosolubil și anume sarea de sodiu a cefuroximului (CFR).

6.3.1. Influența concentrației soluției apoase de medicament

Prin studiul influenței concentrației soluției CFR asupra procesului de adsorbție a acestuia pe microparticulele EGHH și EGHH-GII s-a constatat o creștere a vitezei de adsorbție odată cu creșterea concentrației (Figura 114), cea mai mare cantitate de medicament adsorbită fiind observată în cazul microparticulelor EGHH-GII.

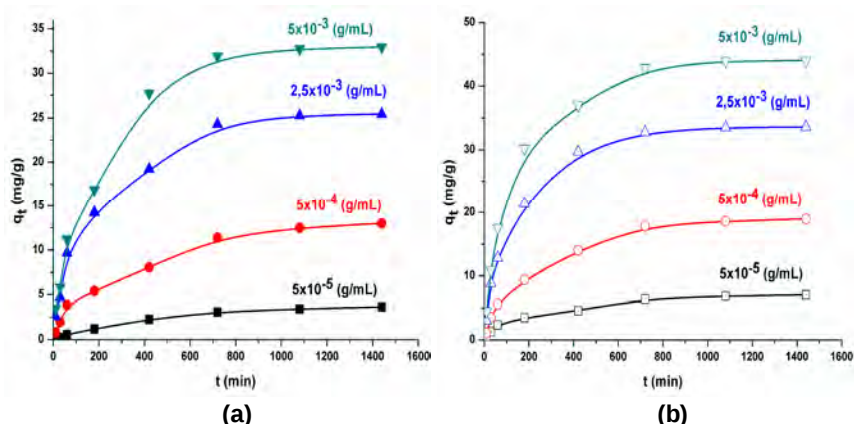


Figura 114. Efectul concentrației soluției de medicament asupra capacității de adsorbție în cazul microparticulelor EGHH (a) și EGHH-GII (b) la 298K

6.3.3. Cinetica de adsorbție

Pentru a explica mecanismul de adsorbție a CFR pe microparticulele EGHH și EGHH-GII s-au utilizat următoarele modele matematice: modelul cinetic de ordinul I (modelul Lagergren), modelul cinetic de ordin II (modelul Ho), modelul Elovich și modelul difuziei intraparticulă Weber-Morris.

6.3.3.1. Modelul cinetic de ordinul I

Forma liniară a modelului cinetic de ordinul I este dată de ecuația:

$$\log(q_e - q_t) = \log q_e - \frac{k_1}{2,303} \cdot t \quad (47)$$

unde: q_e = cantitatea de medicament la echilibru (mg/g); q_t = cantitatea de medicament la momentul t (mg/g); k_1 = constanta de viteză corespunzătoare cineticii de ordinul I (min^{-1}).

Din reprezentarea liniară $\log (q_e - q_t)$ funcție de t (Figura 116) s-au obținut valorile pentru k_1 și $q_{e(\text{calc})}$ ca fiind panta și respectiv interceptul cu ordonata.

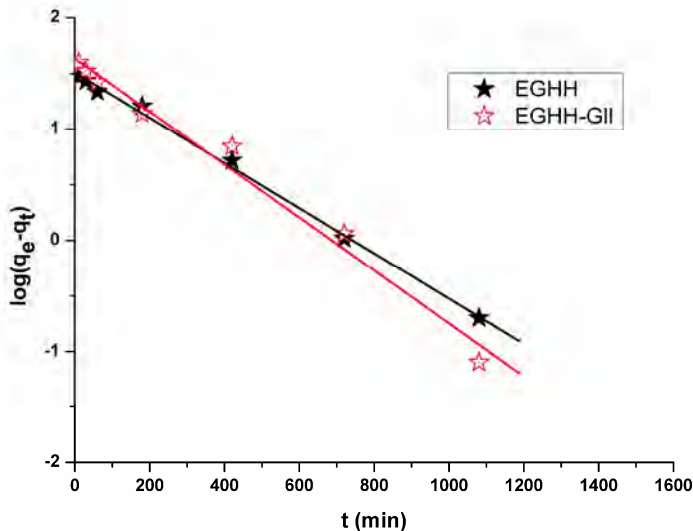


Figura 116. Modelul cinetic de ordinul I în cazul adsorbției CFR pe microparticulele EGHH și EGHH-GII la 298K și $C_{CFR} = 5 \times 10^{-3}$ g/mL

Valorile teoretice $q_{e(calc)}$ (Tabelul 44) estimate cu ajutorul modelului cinetic de ordinul I sunt foarte apropiate de valorile experimentale pentru toate concentrațiile soluțiilor de medicament la cele trei temperaturi luate în lucru. Aceste rezultate sugerează faptul că adsorbția CFR pe microparticulele EGHH și EGHH-GII este de natură fizică, ceea ce implică interacțiuni de natură electrostatică între adsorbent și adsorbat. Coeficienții de corelație (0,991- 0,999) au valori ridicate indicând faptul că procesul de adsorbție a CFR respectă modelul cinetic de ordinul I.

Tabel 44. Parametrii corespunzători modelului cinetic de ordinul I în cazul adsorbției CFR pe microparticulele EGHH și EGHH-GII

C _{CFR} (g/ml)		EGHH			EGHH-GII		
		298K	303K	313K	298K	303K	313K
5x10 ⁻⁵	q _{e,exp} (mg/g)	3,64	5,07	6,37	7,02	8,24	10,15
	q _{e,calc} (mg/g)	3,77	4,87	5,83	6,62	7,88	9,72
	k ₁ (x10 ³ min ⁻¹)	2,65	3,11	3,22	3,22	3,29	4,26
	R ²	0,999	0,997	0,995	0,993	0,994	0,994
5x10 ⁻⁴	q _{e,exp} (mg/g)	13,01	16,58	23,24	18,95	21,34	25,76
	q _{e,calc} (mg/g)	12,60	15,35	23,74	18,13	21,14	26,20
	k ₁ (x10 ³ min ⁻¹)	2,88	3,52	4,77	3,66	4,88	5,07
	R ²	0,993	0,997	0,994	0,997	0,996	0,996
2,5x10 ⁻³	q _{e,exp} (mg/g)	25,44	34,73	45,84	33,6	40,57	47,67
	q _{e,calc} (mg/g)	24,97	33,97	45,52	31,75	41,10	46,99
	k ₁ (x10 ³ min ⁻¹)	4,38	4,63	4,91	5,37	5,48	5,89
	R ²	0,993	0,999	0,996	0,998	0,996	0,996
5x10 ⁻³	q _{e,exp} (mg/g)	32,94	44,78	57,35	44,00	49,30	60,2
	q _{e,calc} (mg/g)	32,31	45,15	57,09	43,11	48,77	59,33
	k ₁ (x10 ³ min ⁻¹)	4,68	5,18	5,76	5,48	5,57	5,94
	R ²	0,999	0,998	0,997	0,991	0,995	0,999

6.3.3.4. Modelul difuziei intraparticulă Weber-Morris

Modelul difuziei intraparticulă Weber-Morris este reprezentat de următoarea expresie matematică:

$$q_t = K_{id} \cdot t^{1/2} + C_i \quad (50)$$

unde: K_{id} este constanta de viteză corespunzătoare difuziei (g/mg·min^{1/2}) și C_i este o constantă care dă informații despre grosimea stratului limită.

Reprezentarea grafică q_t funcție de $t^{1/2}$ permite calcularea constantei de viteză K_{id} și a constantei C_i ca fiind panta și respectiv interceptul cu ordonata. În cazul în care reprezentarea grafică a modelului difuziei intraparticulă reprezintă o dreaptă ce trece prin origine atunci adsorbția este controlată exclusiv de difuzia intraparticulă. Dacă reprezentarea grafică a acestui model prezintă mai multe porțiuni liniare înseamnă că procesul de adsorbție poate avea două sau mai multe etape [316].

În Figura 119 este reprezentat modelul difuziei intraparticulă în cazul adsorbției CFR pe microparticulele EGHH și EGHH-GII la 298K și $C_{CFR} = 5 \times 10^{-3}$ g/ml.

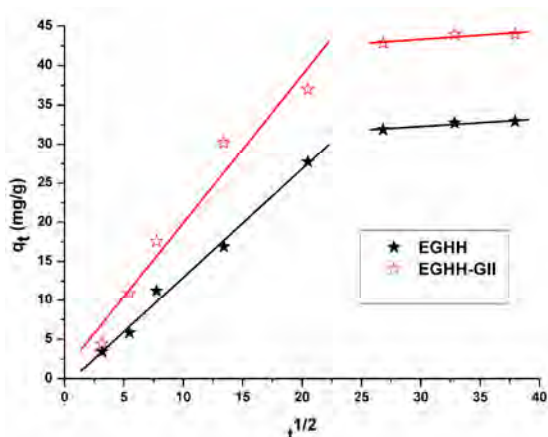


Figura 119. Reprezentarea grafică a modelului difuziei intraparticulă Weber-Morris

După cum se poate observa din Figura 119, procesul de adsorbție studiat are două etape: (1) adsorbția rapidă pe suprafața exterioară sau treaptă de adsorbție instantanee și (2) adsorbția treptată cu atingerea echilibrului. Valorile paramerilor corespunzătoare modelului de difuzie intraparticulă și coeficienții de corelație sunt prezentate în Tabelul 47.

Tabel 47. Valorile constantelor K_{id} , C_i și coeficienții de corelație calculați în cazul adsorbției CFR pe microparticulele EGHH și EGHH-GII

C_{CFR} (g/ml)		EGHH			EGHH-GII		
		298K	303K	313K	298K	303K	313K
5×10^{-5}	K_{i2} (mg/(g·min ^{-1/2}))	0,051	0,046	0,054	0,056	0,074	0,037
	C_2	1,736	3,341	4,374	4,919	5,505	8,767
	R^2	0,996	0,987	0,978	0,985	0,969	0,965
5×10^{-4}	K_{i2} (mg/(g·min ^{-1/2}))	0,146	0,109	0,077	0,101	0,064	0,071
	C_2	7,553	12,515	20,418	15,187	18,989	23,175
	R^2	0,987	0,984	0,938	0,987	0,937	0,933
$2,5 \times 10^{-3}$	K_{i2} (mg/(g·min ^{-1/2}))	0,105	0,106	0,132	0,029	0,084	0,053
	C_2	21,572	30,855	41,002	32,524	37,484	45,721
	R^2	0,947	0,957	0,938	0,926	0,927	0,938
5×10^{-3}	K_{i2} (mg/(g·min ^{-1/2}))	0,095	0,091	0,102	0,106	0,068	0,087
	C_2	29,435	41,449	53,630	40,148	46,812	57,049
	R^2	0,958	0,948	0,921	0,916	0,944	0,924

Valorile C_i cresc odată cu creșterea concentrației inițiale a soluției de medicament, ceea ce indică o creștere a grosimii stratului limită de la interfața microparticule-soluția de medicament. Cu toate acestea, graficul nu trece prin origine ceea ce se poate datora diferenței dintre viteza de transfer de masă în stadiul inițial și cea din stadiul final de adsorbție. Pe baza acestor rezultate se poate concluziona că difuzia intraparticulă nu este singura etapă care limitează viteza de adsorbție.

6.3.4. Izotermele de adsorbție

Izotermele de adsorbție oferă informații asupra distribuției moleculelor de adsorbat între faza lichidă și cea solidă atunci când procesul de adsorbție atinge starea de echilibru. Pentru a descrie caracteristicile echilibrului de adsorbție a CFR pe microparticulele EGHH și EGHH-GII s-au utilizat trei modele de echilibru și anume: Langmuir, Freundlich și Temkin.

Tabel 48. Parametrii modelelor de adsorbție Langmuir, Freundlich, Temkin și coeficienții de corelație calculați în cazul adsorbției CFR pe microparticulele EGHH și EGHH-GII la cele trei temperaturi studiate.

Model		EGHH			EGHH-GII		
		298	303	313	298	303	313
Langmuir	q_m (mg/g)	36,26	49,43	62,74	46,27	52,06	62,81
	K_L (L/g)	1,542	1,636	1,942	2,349	2,721	3,271
	R_L	0,115	0,109	0,093	0,078	0,068	0,058
	R^2	0,994	0,994	0,995	0,992	0,996	0,994
Freundlich	K_F (L/g)	0,641	1,060	1,298	2,069	2,457	3,649
	$1/n$	0,507	0,467	0,466	0,365	0,362	0,342
	R^2	0,991	0,995	0,991	0,995	0,996	0,997
Temkin	b_T (kJ/mol)	0,396	0,298	0,242	0,342	0,304	0,274
	a_T (L/mg)	0,029	0,032	0,038	0,062	0,065	0,969
	R^2	0,989	0,985	0,990	0,987	0,991	0,989

Valorile cantităților maxime de adsorbție q_m pentru toate cele trei temperaturi studiate sunt apropiate de valorile obținute experimental în studiile cinetice. De asemenea, se observă o creștere a capacității de saturație cu creșterea temperaturii, ceea ce reflectă o mai bună accesibilitate la centrele active de adsorbție. Valorile K_L sunt mai mari în cazul microparticulelor EGHH-GII decât în cazul microparticulelor EGHH, indicând astfel o afinitate mai mare a acestor microparticule pentru CFR, care este în concordanță cu capacitatea de adsorbție mai mare obținută în cazul microparticulelor EGHH-GII.

Valorile obținute pentru coeficienții de corelație (R^2) au fost cuprinse în intervalul 0,992-0,996 indicând faptul că izoterma Langmuir descrie destul de bine datele experimentale.

6.4. Studii de eliberare a medicamentelor

Capacitatea microparticulelor EGHH și EGHH-GII de a elibera principiul activ a fost studiată atât la un pH de 1,2 cât și la un pH de 7,4, curbele de eliberare fiind prezentate în Figura 124.

Analiza cineticii de eliberare a sării de sodiu a cefuroximului din microparticulele EGHH și EGHH-GII a fost efectuată cu ajutorul modelelor matematice prezentate în capitolele anterioare.

Evaluând parametrii cinetici ai eliberării s-a observat că viteza de eliberare a CFR din microparticulele EGHH-GII este mai mică decât cea pentru microparticulele EGHH, sugerând interacțiuni mai puternice între microparticulele EGHH-GII și CFR.

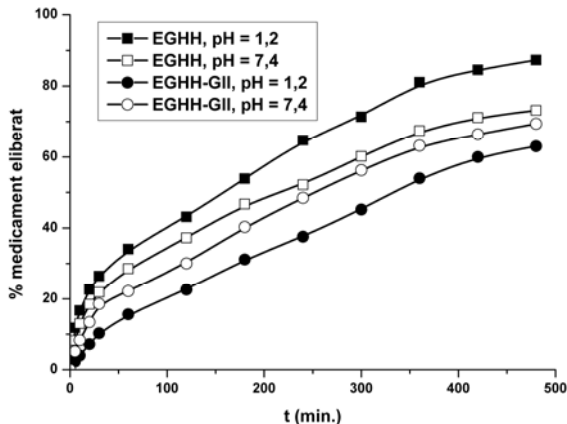


Figura 124. Curbele de eliberare pentru probele EGHH și EGHH-GII la pH = 1,2 și pH = 7,4

Exponentul difuzional, n , obținut prin aplicarea modelului Korsmeyer-Peppas are valori cuprinse între 0,447 și 0,710 indicând faptul că procesul de eliberare a CFR este controlat de difuzie, mecanismul fiind perturbat de fenomenul de relaxare a lanțurilor polimere.

CAPITOLUL 7

IMOBILIZAREA ENZIMELOR PE SUPORTURI SCHIMBĂTOARE DE IONI

Caracterizarea celor două suporturi microparticulate schimbătoare de ioni au fost caracterizate prin spectroscopie FT-IR, analiză termogravimetrică, capacitate de schimb ionic și respectiv grad de umflare. În urma analizelor efectuate reiese că suporturile se caracterizează prin stabilitate termică relativ scăzută, până la temperatura de 47°C și un grad de umflare ridicat de 664% și respectiv 2040%.

7.3. Obținerea sistemelor polimer-substanță biologic activă

Pentru prepararea celor două sisteme polimer-enzimă s-a ales ca metodă de imobilizare legarea pe suport solid a α -amilazei. Prin această tehnică de lucru s-au obținut în final două sisteme notate SI₁TETA-AMIL și SI₂EDA-AMIL.

Procesul de imobilizare a avut loc printr-un mecanism combinat de legare fizică (absorbție în porii microparticulelor) și legare ionică, conform Figurii 130.

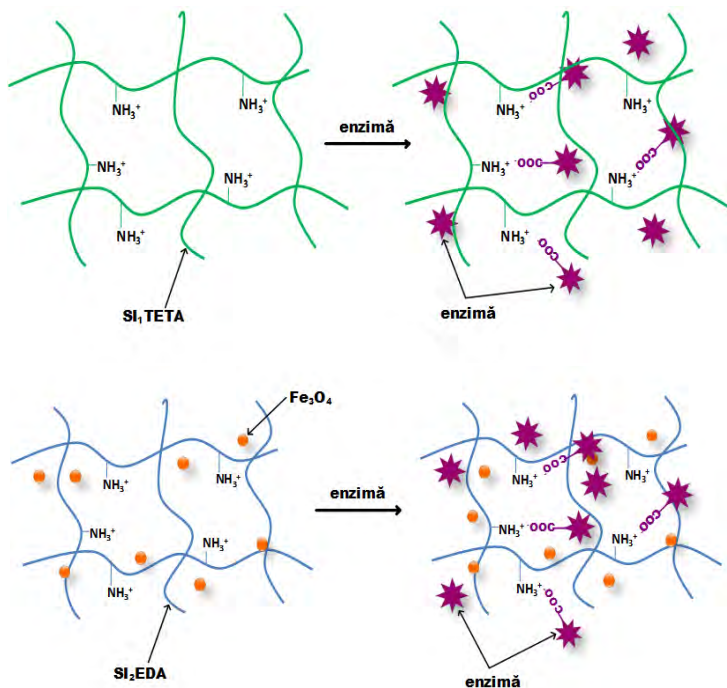


Figura 130. Procesul de imobilizare a α -amilazei pe schimbătorii de ioni

Influența concentrației enzimă asupra procesului de imobilizare s-a evaluat prin prepararea a patru soluții de enzimă având concentrații cuprinse între 2,49 mg/ml și 9,91 mg/ml.

Concentrația în proteină a enzimă libere precum și cantitatea de proteină legată pe suporturile acrilice în urma proceselor de imobilizare s-au determinat prin metoda Lowry [251]. Astfel, după cum era de așteptat, creșterea concentrației de enzimă a condus la o creștere proporțională a cantității de proteină prezentă în soluțiile de α -amilază. Acest comportament a determinat o creștere semnificativă a randamentului de legare a proteinei pe suporturile acrilice conform Figurii 131.

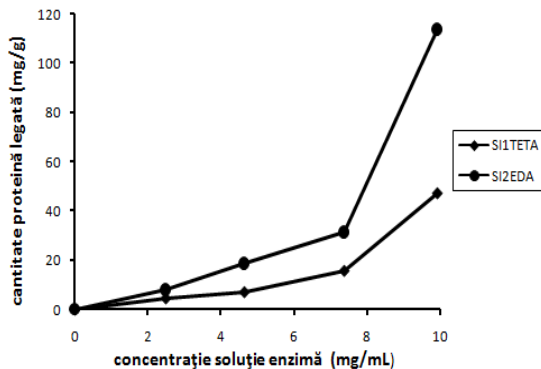


Figura 131. Influența concentrației soluției de enzimă asupra cantității de proteină legată

Pentru prepararea celor două sisteme polimer-enzimă s-a optat pentru utilizarea unei soluții de enzimă de concentrație 9,91 mg/ml la care s-a obținut cantitatea de proteină legată maximă.

Caracteristicile preparatelor enzimatiche sunt ilustrate în Tabelul 54:

Tabel 54. Caracteristicile enzimatiche ale sistemelor SI₁TETA-AMIL și SI₂EDA-AMIL

Probă	Activitate enzimatică UI		Randament de imobilizare (β) %	Grad de transformare (α) %
	Enzimă solubilă	Enzimă imobilizată		
SI ₁ TETA-AMIL	3,86	2,61	67,61	2,4
SI ₂ EDA-AMIL	3,86	3,91	101,29	3,5

Din tabel se observă că în cazul sistemului SI2EDA-AMIL, activitatea enzimatică este mai mare în comparație cu cea a enzimei libere. Acest lucru dovedește faptul că, în unele condiții, procesul de imobilizare este însoțit și de un proces de purificare, fiind un proces selectiv.

7.3.1. Influența concentrației substratului asupra activității enzimatiche

Dependența activității enzimatiche de concentrația soluției de substrat este prezentată în Figura 132.

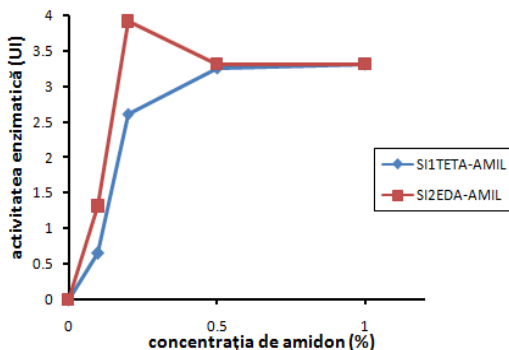


Figura 132. Dependența activității enzimatică a celor două sisteme de concentrația substratului

În urma studiilor efectuate, prin creșterea concentrației soluției de amidon s-a observat un comportament diferit pentru cele două suporturi acrilice. Astfel, în cazul suportului SI₁TETA s-a constatat o creștere a activității enzimatică odată cu creșterea concentrației suportului de la 0,1% la 0,2%, 0,5% și respectiv 1%, în timp ce pentru suportul acrilic SI₂EDA s-a constatat atingerea unei valori maxime la o concentrație de 0,2%, urmată de o scădere a activității pentru soluțiile de amidon de 0,5% și 1%. Scăderea activității enzimatică a α -amilazei la concentrații mai mari de amidon sugerează apariția unui proces de inhibare a enzimei datorită concentrației mari de zahăr.

7.3.2. Influența temperaturii asupra activității enzimatică și a gradului de transformare

Influența temperaturii asupra caracteristicilor preparatelor enzimatică s-a evaluat prin efectuarea proceselor de hidroliză la trei temperaturi diferite și anume 25°C, 35°C și respectiv 40°C. În urma investigațiilor efectuate se constată obținerea unei activități enzimatică mai bune pentru ambele sisteme la temperatura de 40°C. Figura 134 relevă o creștere a procesului de hidroliză a substratului ce rezultă în final în obținerea unor cantități mai mari de zahăr.

Din figură se poate observa o influență relativ scăzută a temperaturii asupra gradului de transformare, în special în cazul preparatului enzimatic SI1TETA-AMIL, unde acesta variază de la 44,9% la temperatura de 25°C la 46,7% la temperatura de 40°C.

În cazul sistemului SI2EDA-AMIL se constată o creștere ceva mai mare a gradului de transformare, astfel valorile cresc de la 41,8% la temperatura de 25°C la 50% pentru temperatura de 40°C

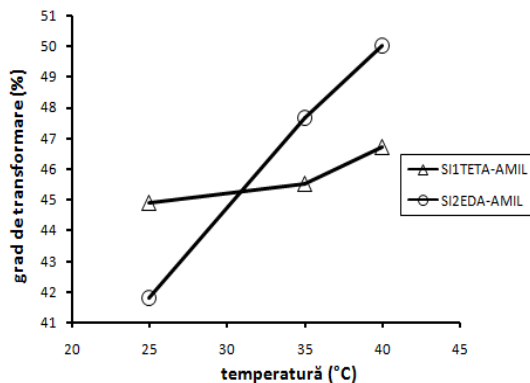


Figura 134. Influența temperaturii asupra gradului de transformare a amidonului

7.3.3. Influența pH-lui asupra activității enzimactice

Influența pH-lui asupra activității enzimactice a celor două preparate s-a studiat la trei valori de pH diferite, mai precis la pH = 5; 5,6 și respectiv 6,5. Și în acest caz procesele de hidroliză au avut loc timp de o oră pentru SI₂EDA-AMIL și respectiv trei ore pentru SI₁TETA-AMIL.

Dependența activității enzimactice funcție de pH este ilustrată în Figura 135.

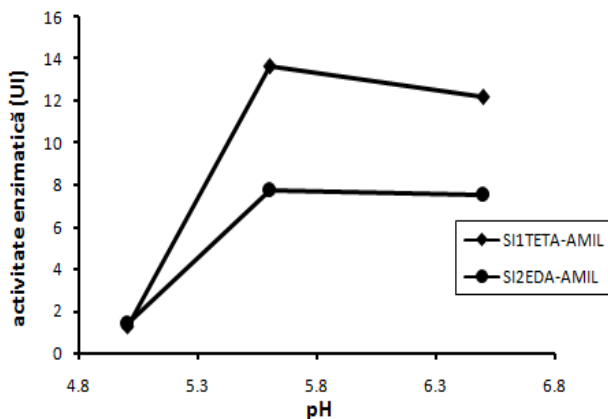


Figura 135. Dependența activității enzimactice funcție de pH

Se observă din Figura 135 că modificarea pH-ului soluțiilor de substrat conduce la valori diferite ale activității enzimactice a preparatelor, activitatea enzimatică având valoare maximă la pH = 5,6.

CONCLUZII

Lucrarea de doctorat a avut ca obiectiv obținerea de noi suporturi sub formă de microparticule, pe bază de polimeri naturali și sintetici, care să prezinte capacitatea de a reține și a elibera substanțe biologic active, cum ar fi: medicamente sau enzime.

Prin tehnica polimerizării în suspensie apoasă, cunoscută sub denumirea de polimerizare radicalică reticulantă, s-au preparat particule cu dimensiuni micrometrice, cu structură poroasă și neporoasă.

În urma cercetărilor efectuate, ce au fost împărțite pe cele cinci capitole ce constituie partea de Contribuții proprii a tezei, se pot trasa o serie de concluzii, după cum urmează:

I. S-au preparat trei seturi de microparticule poroase utilizând ca agent porogen toluenul: unul pe bază de glicidil metacrilat, notat microparticule G; unul pe bază de glicidil metacrilat și xantan (microparticule X); și respectiv unul pe bază de glicidil metacrilat și chitosan (microparticule C). Cele trei tipuri de microparticule au fost reticulate cu trei compuși dimetacrilici, și anume: etilenglicol dimetacrilat, dietilenglicol dimetacrilat și trietilenglicol dimetacrilat.

- grefarea celor două polizaharide pe lanțurile macromoleculare a condus la formarea unor structuri poroase, caracterizate prin porozitate și volum al porilor mai mici în comparație cu microparticulele pe bază de polimeri sintetici;

- utilizând ca metodă de analiză sorbția dinamică de vapori, s-a determinat o suprafață specifică mai mare pentru microparticulele cu polizaharide în structură față de cele fără polizaharide;

- microscopia electronică de baleiaj a evidențiat formarea unor particule cu formă sferică, bine definită și structură poroasă;

- prin microscopie de forță atomică s-a determinat o rugozitate a suprafețelor mai mare pentru microparticulele G comparativ cu microparticulele cu xantan și respectiv chitosan;

- microparticulele X și C se caracterizează printr-o temperatură de degradare și energie de activare mai scăzute pe toate treptele de degradare față de microparticulele G;

- atât gradul de umflare cât și capacitatea de reținere de solvenți au înregistrat valori mai mari pentru microparticulele X și C, datorită caracterului hidrofil al polizaharidelor;

- creșterea vitezei de rotație de la 360 rot/min la 450 rot/min și respectiv 600 rot/min pentru microparticulele reticulate cu EGDMA în raport molar GMA:EGDMA = 90/10 conduce la formarea unor particule cu forme neregulate și stabilitate mecanică redusă;

- pentru toate tipurile de microparticule, izotermele sorbție-desorbție obținute prin metoda DVS pot fi asociate unor curbe de tip V, specifice materialelor hidrofobe sau slab hidrofile;

- cele trei tipuri de suporturi microparticulate au dovedit capacitate de a reține și a elibera principii biologice active (teofilină și cloramfenicol hemisuccinat de sodiu);

- interacțiile ionice ce se stabilesc între cele două suporturi cu polizaharide și moleculele de medicament conduc la o eficiență mai bună de încărcare în comparație cu microparticulele ce nu prezintă polizaharide în structură. Aceste interacții conduc la o eliberare susținută a medicamentelor atât în pH acid cât și în pH bazic;

II. S-au preparat două seturi de microparticule poroase utilizând ca agent porogen acetatul de n-butil: unul obținut prin reticularea glicidil metacrilatului cu cei trei compuși dimetacrilici menționați anterior (G_a); și unul pe bază de glicidil metacrilat și gelan (GG_a). În cazul microparticulelor cu polizaharidă, gelanul a fost introdus în structură prin două metode și anume: (1) prin grefarea radicalilor de gelan pe lanțurile macromoleculare, la dubbele legături, în timpul reacției de copolimerizare; (2) prin acoperirea microparticulelor pe bază de polimeri sintetici (G_a) cu un strat de polizaharidă prin grefarea gelanului la grupele epoxi de pe suprafață.

- grad de umflare și capacitate de reținere a apei mai mari s-au obținut în cazul microparticulelor cu polizaharide, cunoscut fiind faptul că gelanul prezintă un caracter hidrofil;

- microparticulele cu gelan grefat în timpul sintezei se caracterizează printr-o suprafață specifică mare, în timp ce microparticulele acoperite cu gelan posedă o suprafață specifică semnificativ mai mică;

- microscopia electronică de baleiaj confirmă obținerea unor particule cu dimensiuni micrometrice, structură poroasă și formă sferică, iar microscopia de forță atomică relevă obținerea unei rugozități mai mici pentru microparticulele cu gelan;

- suporturile poroase s-au dovedit capabile de a reține și a elibera prin difuzie sarea de sodiu a cefuroximului;

- sistemele polimer-medicament cu gelan prezintă o eficiență de încărcare a medicamentului mai mare însă o viteză de eliberare mai scăzută datorită interacțiunilor de natură ionică ce se stabilesc între suport și medicament;

- studiile cinetice au evidențiat o viteză lentă de eliberare, atât în pH acid cât și în pH bazic, sugerând potențiale utilizări ale suporturilor pentru prepararea sistemelor polimer-medicament de tip retard;

III. S-au preparat două tipuri de microparticule pe bază de schimbători de ioni acrilici și gelan, notate EGHH și respectiv EGHH-GII.

- din analiza SEM s-a observat că microparticulele EGHH sunt caracterizate prin suprafețe netede, formă sferică și dimensiuni cuprinse între 200-500 μm , în timp ce microparticulele EGHH-GII prezintă suprafețe rugoase, cu pori ce atestă depunerea stratului de polizaharidă la suprafață și formarea unui complex interpolimeric datorită interacțiunilor dintre grupele NH_3^+ ale schimbătorului de ioni și grupele COO^- de pe catena gelanului;

- suporturile polimerice s-au dovedit capabile de a reține și a elibera principii biologice active (cefuroxim sare de sodiu);

- creșterea concentrației soluției de cefuroxim sare de sodiu și a temperaturii conduc la o creștere a capacității de adsorbție a suporturilor pe bază de schimbători de ioni;

- microparticulele EGHH-GII prezintă o capacitate crescută de adsorbție a medicamentului datorită prezenței în structura lor a gelanului;

- pentru a studia procesul de adsorbție a sării de sodiu a cefuroximului s-au luat în considerare două aspecte fizico-chimice: cinetica și echilibrul de adsorbție;

- pentru a explica mecanismul cineticii de sorbție a medicamentului de către microparticulele pe bază de schimbători de ioni cu și fără polizaharidă grefată s-au utilizat 4 modele matematice: modelul Lagergren, modelul Ho, modelul Elovich și modelul difuziei intraparticulă Weber-Morris;

- valorile teoretice $q_{e(\text{calc})}$ estimate cu ajutorul modelului cinetic de ordinul I indică faptul că adsorbția CFR pe cele două tipuri de microparticulele este de natură fizică, ceea ce implică interacțiuni de natură electrostatică între adsorbent și adsorbat;

- modelul difuziei intraparticulă Weber-Morris indică faptul că adsorbția medicamentului pe cele două suporturi are loc în două etape: o adsorbție rapidă pe suprafața exterioară (treaptă de adsorbție instantanee), urmată de o adsorbție treptată până la atingerea echilibrului;

- pentru a obține informații cu privire la distribuția moleculelor de adsorbat între faza lichidă și cea solidă, atunci când procesul de sorbție atinge starea de echilibru s-au utilizat trei tipuri de izoterme de echilibru: Langmuir, Freundlich și Temkin;

- izotermele de adsorbție demonstrează că reținerea medicamentului pe suporturi are loc conform unei adsorbții monostrat;

- cineticele de eliberare reflectă faptul că mecanismul de eliberare a medicamentului este controlat atât de difuzie cât și de fenomenul de relaxare a lanțurilor polimerice.

IV. S-au obținut două tipuri de preparate enzimactice prin legarea ionică a α -amilazei pe rășini acrilice schimbătoare de ioni, sub formă de microparticule.

- suporturile acrilice se caracterizează prin capacitate mare de umflare în apă, în special microparticulele SI_2EDA ;
- creșterea concentrației soluției de enzimă până la 1% a determinat o creștere semnificativă a cantității de proteină legată pe suporturile acrilice;
- în cazul preparatului $SI_1TETA-AMIL$, creșterea concentrației de substrat determină o creștere a activității enzimatică, cu atingerea unui maxim la o soluție de amidon de 1%;
- activitatea enzimatică a preparatului $SI_2EDA-AMIL$ atinge un maxim la o concentrație a substratului de 0,2%, urmată de o scădere a acesteia prin creșterea în continuare a cantității de amidon din soluție. Acest comportament este datorat cantității ridicate de zahăr din sistem ce poate inhiba activitatea enzimatică a α -amilazei;
- gradul de transformare ($\beta\%$), crește odată cu temperatura și atinge o valoare maximă la temperatură de 40°C, și de asemenea, crește în timp atingând un maxim la 3 ore de la începutul reacției pentru sistemul $SI_1TETA-AMIL$ și la o oră de la începutul reacției pentru sistemul $SI_2EDA-AMIL$;
- activitatea enzimatică optimă pentru ambele sisteme a fost atinsă la un pH de 5,6.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

- [32] C. D. Vlad (Ed.), [Co] polimeri reticulați obținuți prin polimerizare în suspensie, Editura PIM, Iași, 2008.
- [131] S. Vasiliu, I. Bunia, S. Racovita, V. Neagu, Adsorption of cefotaxime sodium salt on polymer coated ion exchange resin microparticles: Kinetics, equilibrium and thermodynamic studies, Carbohydrate Polymers 85, 376–387, 2011.
- [151] P. Brodelius, K. Mosbach, Immobilization techniques for cells/organelles from Methods in enzymology, K. Mosbach (Ed.), Academic Press, London, 173-454, 1987.
- [154] The Working Party on immobilized Biocatalysts within The European Federation of Biotechnology, Guidelines for the characterization of immobilized biocatalysts, Enzyme Microb. Technol. 5 (4), 304-307, 1983.
- [171] S. Akgol, J. Kacar, S. Ozkara, H. Yavuz, A. Denizli, M. Y. Arica, Immobilization of catalase via adsorption onto L-histidine grafted functional PHEMA based membrane, J. Mol. Catal. B: Enzym. 15 (4-6), 197-206, 2001.
- [270] M. Makarem, M. Haddad Sabzevar, A. Haerian Ardakani, Investigation on the Effect of Atmosphere on the Pores of Sintered Astaloy CrM Steel, IJE TRANSACTIONS A: Basics 26 (7), 721-728, 2013.

[309] S. Racovita, S. Vasiliu, M. Popa, Sorption isotherms and kinetics of cefotaxime sodium salt on chitosan-polybetaine complexes, *Rev. Roum. Chim.* 57 (2), 115-120, 2012.

[310] E. Caliskan, S. Gokturk, Adsorption Characteristics of Sulfamethoxazole and Metronidazole on Activated Carbon, *Separ. Sci. Technol.* 45, 244-255, 2010.

VALORIFICAREA REZULTATELOR CERCETĂRII

PARTICIPĂRI LA MANIFESTĂRI NAȚIONALE ȘI INTERNAȚIONALE

1. M. A. Lungan, Ș. Racoviță, S. Vasiliu, M. Popa, D. Cașcaval, *Microparticules polymeres porteuses d'antibiotiques: synthese et caracterization*, **Septième Colloque Franco-Roumain de Chimie Appliquée**, 27 – 29 Juin 2012, Bacău, Roumanie.

2. M. A. Lungan, Ș. Racoviță, S. Vasiliu, M. Popa, *Acrylic microparticles for the release of biologically active molecules*, **2^{ème} Colloque Franco-Roumain de Chimie Médicinale**, 03-05 octobre 2012, Iași, Roumanie.

3. M. A. Lungan, S. Vasiliu, Ș. Racoviță, I. Plesca, M. Popa, *New polymeric materials with therapeutic applications*, **2^{ème} Colloque Franco-Roumain de Chimie Médicinale**, 03-05 octobre 2012, Iași, Roumanie.

4. M. A. Lungan, M. Popa, F. Doroftei, G. Hitruc, Ș. Racoviță, S. Vasiliu, *Design of microparticulate systems with special architecture based on glycidyl methacrylate*, „**Alexandru Ioan Cuza**” **University Days**, Iași 31 october-2 november 2013.

5. M. A. Lungan, M. Popa, Ș. Racoviță, S. Vasiliu, *Sisteme sub forma de microparticule poroase pe baza de glicidil metacrilat si xantan*, **Zilele Universității Apolonia Congresul International Pregatim viitorul promovand excelenta Sectiunea: Repere în medicină avansată. Nanoparticule în medicină și biologie**, 27 februarie-1 martie 2014, Iași-Romania.

6. M. A. Lungan, M. Popa, , S. Vasiliu, Ș. Racoviță, J. Desbrieres, *Development and evaluation of novel microparticles based on methacrylic monomers and polysaccharides as drug delivery systems*, **15th International Conference „ Polymers and Organic Chemistry”**, 10-13 iunie, Timișoara, Romania.

7. M. A. Lungan, M. Popa, Ș. Racoviță, Ion Bunia, S. Vasiliu, L. Ochiuz, *Microparticules à base de complexes interpolymères pour libération contrôlée d'antibiotiques*, **Xième Colloque Franco-Roumain sur les Polymères**, 27-29 august 2014, Pitești, Roumanie.

8. Ș. Racoviță, S. Vasiliu, M. A. Lungan, M. Popa, I. Bunia, D. Dirtu, *Design of new drug delivery systems based on ion exchangers*, **3^{ème} Colloque Franco-Roumain de Chimie Médicinale**, 30-31 octobre 2014, Iași, Roumanie.

LUCRĂRI PUBLICATE SAU TRIMISE SPRE PUBLICARE

I. Articole

1. M. A. Lungan, M. Popa, J. Desbrieres, Ș. Racoviță, S. Vasiliu, *Complex microparticulate systems based on glycidyl methacrylate and xanthan*, Carbohydrate Polymers, 104, 213-222, 2014;
2. M. A. Lungan, M. Popa, Ș. Racoviță, G. Hitruc, F. Doroftei, J. Desbrieres, S. Vasiliu, *Surface characterization and drug release from porous microparticles based on methacrylic monomers and polysaccharides*, Carbohydrate Polymers, trimis spre publicare.
2. M. A. Lungan, M. Popa, Ș. Racoviță, S. Vasiliu and M. Drobotă, *Design of porous microparticles for biomedical applications*, trimis spre publicare.

Sunt în curs de finalizare a redactării manuscrisele a încă două lucrări.

II. Capitole de cărți

1. S. Vasiliu, C. Doina Vlad, Ș. Racoviță, M. A. Lungan, L. Eva, R. Munteanu, *Polymeric Nanoparticles for Drug Delivery to the Brain*, în: Polymeric Nanomedicine, M. Popa, C. V. Uglea (Eds.), Bentham Science Publishers, ISBN 978-1-60805-628-6, 340-414, 2013.
2. S. Vasiliu, Ș. Racoviță, M. A. Lungan, J. Desbrieres, M. Popa, *Microbial exopolysaccharides for biomedical applications*, în: Unfolding the Biopolymer Landscape, Bentham Science Publishers, acceptat spre publicare.
3. S. Vasiliu, V. Celan, Ș. Racoviță, C. D. Vlad, M. A. Lungan, M. Popa, *Ion exchangers – an open window for the development of advanced materials with pharmaceutical and medical applications*, în: Nanobiomaterials for Intelligent Medical Devices, A. Tiwari, H. Kobayashi, A.P.F. Turner (Eds.), Wiley Scrivener Publishing LLC, acceptat spre publicare.

III. Cărți:

1. S. Vasiliu, M. A. Lungan, C. D. Vlad, Ș. Racoviță, I. Pleșca, M. Popa, *Materiale acrilice și metacrilice. Aplicații în medicină și biotehnologie*, Vol. 1, Editura Pim, ISBN 978-606-13-1614-4, 276 pagini, 2013.

PROIECTE DE CERCETARE

Design of microparticulate systems with special arhitecture – a new opportunity for development of advanced materials with biomedical applications, Proiect Schimb Interacademic, Universitatea Tehnică „Gheorghe Asachi” din Iași – Institutul de Chimie Macromoleculară „Petru Poni” din Iași – Institut des Sciences Analytiques et de Physico-Chimie pour l'Environnement et les Materiux, Pau, France, 1 ianuarie 2014 – 31 decembrie 2015.