



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



Nanoparticule polimere – vectori pentru transportul la țintă al medicamentelor

- Rezumatul tezei de doctorat -

Inginer chimist Liana Alupei

Conducător științific

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

Iași – 2016

Către

Vă facem cunoscut că, în ziua de 30.05.2016 la ora 11.00 în sala de consiliu a Facultății de Inginerie Chimică și Protecția Mediului , va avea loc susținerea publică a tezei de doctorat intitulată:

**"NANOPARTICULE POLIMERE – VECTORI PENTRU TRANSPORTUL LA ȚINTĂ AL
MEDICAMENTELOR"**

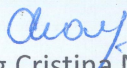
elaborată de doamna inginer **ALUPEI LIANA** în vederea conferirii titlului științific de doctor.

Comisia de doctorat este alcătuită din:

- | | |
|---|------------------------|
| 1. Prof. dr. ing. Curteanu Silvia, Universitatea Tehnică "Gheorghe Asachi" din Iași | președinte |
| 2. Prof. em. dr. ing. dr. h. c. Popa Marcel, "Gheorghe Asachi" din Iași | conducător de doctorat |
| 3. Prof. dr. ing. Desbrières Jacques, Université de Pau et des Pays de l'Adour, Franța | referent oficial |
| 4. Prof. dr. ing. Iovă Horia, Universitatea "Politehnica" din București | referent oficial |
| 5. Conf. dr. farm. Ochiz Lăcrămioara, Univestitatea de Medicină și Farmacie
"Grigore T. Popa" din Iași | referent oficial |

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


Prof. univ. dr. ing. **DAN CAȘCAVAL**

Secretar universitate,

Ing. Cristina Nagiț

Mulțumiri

Datorez deosebită recunoștință domnului profesor dr. ing. Marcel Popa care prin sprijinul moral și profesionalismul îndrumării științifice oferite, a făcut posibilă finalizarea prezentei teze de doctorat.

Mulțumiri dintre cele mai alese doresc să adresez domnului profesor dr. ing. Jacques Desbrieres pentru promptitudine, calitate și acuratețe a răspunsurilor și sugestiilor acordate cu privire la unele dintre cele mai complexe provocări științifice apărute pe parcursul activității de cercetare.

În mod deosebit doresc să mulțumesc referenților distinsei comisii prezidată de doamna profesor dr. ing. Silvia Curteanu.

Pentru că au făcut mai ușor de depășit momentele dificile întâmpinate pe parcursul statutului de doctorand, le mulțumesc prietenilor și colegilor.

Cuprins

Introducere	1
Capitolul 1. Studiu bibliografic	5
1.1. Sisteme pentru transportul dirijat al medicamentelor. Noțiunea de eliberare “la țintă” a principiilor active. Tipuri de eliberare la țintă.....	5
1.2. Tipuri de sisteme de transport/vectori pentru eliberarea pricipiilor active. Clasificare în funcție de modul de eliberare al medicamentului.....	15
1.3. Polimeri utilizați pentru obținerea sistemelor de transport a medicamentelor.....	22
1.3.1. Polimeri naturali.....	24
1.3.1.1. Proteinele.....	24
1.3.1.2. Polizaharidele.....	25
1.3.1.3. Polizaharide modificate. Derivați de polizaharide.....	27
1.3.2. Polimeri sintetici.....	33
1.4. Nanoparticule pentru transportul la țintă al medicamentelor.....	36
1.4.1. Aspecte generale.....	36
1.4.2. Avantaje și clasificare.....	37
1.4.3. Metode de obținere.....	38
1.4.3.1. Nanoparticule pe bază de polimeri.....	38
1.4.3.2. Nanoparticule polimere magnetice.....	42
1.4.4. Metode de caracterizare a nanoparticulelor.....	49
1.4.5. Mecanismul și cinetica de eliberare a medicamentelor din particule polimerice – modele matematice.....	55
1.5. Aplicații în domeniul biomedical.....	65
Rezultate originale	73
Capitolul 2. Materiale, tehnici experimentale și metode de caracterizare	77
2.1. Materiale și reactivi.....	77
2.2. Tehnici de sinteză/obținere.....	85
2.2.1. Obținerea chitosanului modificat cu acid folic.....	85
2.2.2. Obținerea chitosanului modificat cu glucoză/maltoză.....	86
2.2.3. Obținerea magnetitei.....	87

2.2.4. Obținerea nanoparticulelor pe bază de CS-FA.....	87
2.2.5. Funcționalizarea nanoparticulelor cu fluoresceină.....	88
2.2.6. Obținerea nanoparticulelor pe bază de CS-maltoză.....	88
2.2.7. Obținerea nanoparticulelor magnetice pe bază de CS-maltoză.....	89
2.3. Metode de caracterizare.....	90
2.3.1. Caracterizarea structurală.....	90
2.3.1.1. Spectroscopia în Infraroșu cu Transformată Fourier.....	90
2.3.1.2. Rezonanța Magnetică și Nucleară.....	90
2.3.1.3. Difrakția de raze X.....	91
2.3.1.4. Spectroscopia UV-Vis	91
2.3.2. Caracterizare morfologică.....	92
2.3.2.1. Microscopie electronică de baleiaj.....	92
2.3.2.2. Microscopie electronică de transmisie.....	92
2.3.2.3. Microscopie de forță atomică.....	92
2.3.2.4. Analiza dimensională a particulelor prin difractometrie laser.....	93
2.3.3. Caracterizarea termică - Analiza termogravimetrică.....	93
2.3.4. Proprietăți fizico-chimice.....	93
2.3.4.1. Potențial zeta.....	93
2.3.4.2. Magnetometrie cu probă vibrantă.....	93
2.3.4.3. Analiza comportamentului la umflare.....	94
2.3.4.4. Capacitatea de includere a principiilor active.....	94
2.3.4.5. Capacitatea de eliberare a principiilor active.....	95
2.3.5. Caracteristici de biomaterial.....	96
2.3.5.1. Citotoxicitate.....	97
2.3.5.2. Hemocompatibilitate.....	97
2.3.5.3. Biodistribuție.....	98
Capitolul 3. Sinteza și caracterizarea unor derivați de chitosan.....	101
3.1. Derivatul de CS cu acid folic.....	102
3.1.1. Caracterizare structurală.....	105
3.1.1.1. Caracterizare prin FT-IR.....	105
3.1.1.2. Caracterizare prin RMN.....	108

3.1.2. Determinarea gradului de funcționalizare prin spectroscopie UV-VIS.....	110
3.1.3. Cristalinitate (X R D).....	111
3.1.4. Caracterizare termica (TG).....	112
3.2. Derivatul de CS cu glucoză/maltoză.....	113
3.2.1. Caracterizare prin FT-IR.....	116
3.2.2. Caracterizare prin RMN.....	118
Capitolul 4. Sisteme nanoparticulate polimer-medicament pe baza derivatului de chitosan cu acid folic.....	123
4.1. Caracterizarea structurală a nanoparticulelor prin FT-IR.....	126
4.2. Caracterizarea morfologică a nanoparticulelor.....	127
4.2.1. Microscopia electronică de baleiaj.....	127
4.2.2. Microscopia electronică de transmisie.....	130
4.2.3. Determinarea diametrului mediu prin difractometrie laser.....	131
4.2.4. Determinarea stabilității suspensiilor apoase prin evaluarea potențialului zeta.....	132
4.3. Caracterizarea termică a nanoparticulelor - analiza termogravimetrică	134
4.4. Proprietăți de umflare în medii apoase.....	137
4.5. Evaluarea caracteristicilor de biomaterial.....	138
4.5.1. Evaluarea citotoxicității.....	138
4.5.2. Evaluarea hemocompatibilității.....	139
4.5.3. Analiza citofluorimetrică.....	141
4.6. Studiul capacității de încărcare cu medicament.....	142
4.7. Studiul cineticii de eliberare a medicamentului.....	143
Capitolul 5. Sisteme particulate polimer - medicament pe baza derivatului de chitosan cu maltoză.....	149
5.1. Caracterizarea structurală prin FT-IR.....	153
5.2. Caracterizarea morfologică.....	153
5.2.1. Microscopia electronică de baleiaj.....	154
5.2.2. Microscopie de forță atomică.....	156
5.2.3. Determinarea diametrului mediu prin difractometrie laser și a potențialului zeta.....	157
5.3. Capacitatea de umflare în medii apoase.....	158
5.4. Caracteristici de biomaterial.....	160

5.4.1. Hemocompatibilitate.....	160
5.5. Capacitatea de includere/eliberare a levofloxacinului.....	161
5.5.1. Cinetica de încărcare a levofloxacinului.....	161
5.5.2. Cinetica de eliberare a levofloxacinului.....	164
Capitolul 6. Sisteme nanoparticulate magnetice polimer-medicament pe bază de chitosan modificat cu maltoză.....	169
6.1. Caracterizarea structurală a nanoparticulelor prin FT-IR.....	172
6.2. Caracterizarea morfologică a nanoparticulelor.....	173
6.2.1. Caracterizare prin microscopie SEM și TEM.....	173
6.2.2. Caracterizare prin microscopie de forță atomică.....	177
6.3. Proprietăți fizico-chimice ale nanoparticulelor.....	178
6.3.1. Caracterizarea termică.....	178
6.3.2. Proprietati magnetice.....	182
6.3.3. Determinarea stabilității suspensiilor apoase de nanoparticule.....	184
6.3.4. Comportarea la umflare în medii apoase.....	185
6.4. Caracteristici de biomaterial.....	186
6.4.1. Citotoxicitate.....	186
6.4.2. Hemocompatibilitate.....	187
6.5. Capacitatea de includere/eliberare a 5-fluorouracilului.....	188
6.5.1. Cinetica de includere a 5-fluorouracilului.....	188
6.5.2. Cinetica de eliberare a 5-fluorouracilului.....	189
Concluzii generale.....	195
Referințe bibliografice.....	205
Valorificarea rezultatelor.....	237

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

Introducere

Implicată în proiectarea, obținerea, caracterizarea și utilizarea materialelor la scară nanometrică, nanotehnologia este știința ale cărei aplicații au revoluționat domeniul biomedical al ultimilor 30 de ani. Situată la punctul de convergență al unor discipline precum chimia, fizica, biologia și știința materialelor, nanotehnologia reunește abilități necesare în diagnosticare, imagistică sau terapie.

În domeniul sistemelor cu eliberare controlată de medicamente, nanotehnologia înregistrează progrese remarcabile apelând la diversele formulări ale biomaterialelor în transportul, localizarea și eliberarea într-o manieră controlată din punct de vedere temporal și al dozei optime. Prin utilizarea nanoparticulelor polimere în acest scop, eficiența de încărcare, viteza de eliberare și distribuția principiului activ pot fi controlate în vederea atingerii indicelui terapeutic adecvat.

Dintre polimerii cu potențial în obținerea sistemelor de transport nanoparticulate, polizaharidele prezintă însemnătate ca urmare a abundenței naturale, a caracterului biocompatibil, biodegradabil, bioadeziv, precum și a numeroaselor posibilități de modificare chimică.

Posibilitatea de vectorizare a nanoparticulele polimere (la nivel celular, de țesut sau organe) prin atașarea la suprafață sau includerea în interior a unor entități de direcționare, constituie una dintre cele mai atractive caracteristici cu efecte pozitive asupra limitărilor impuse de nonspecificitatea și caracterul toxic al medicamentelor față de țesuturile neafectate.

Aplicațiile principale care apelează la acest tip de vectori implică terapia țintită anticancer prin identificarea receptorilor specifici de la nivelul membranei celulelor tumorale de către liganzii de direcționare complementari, precum și localizarea unor infecții de natură bacteriană sau virală prin recunoașterea proteinelor membranare adecvate.

Lucrarea prezintă propune obținerea și caracterizarea unor noi nanoparticule polimere pe bază de derivați de chitosan pentru transportul dirijat și eliberarea controlată a medicamentelor în cazul unor afecțiuni particulare precum cancerul și infecțiile provocate de *Escherichia coli*.

Teza de doctorat este structurată pe șase capitole după cum urmează:

Capitolul 1 rezumă stadiul actual al cunoașterii prezentând tipurile principale de direcționare la țintă a sistemelor de transport de medicamente, clasele de vectori utilizate în eliberarea principiilor active și polimerii întrebunțați în prepararea acestora. În cadrul aceluiași capitol sunt alocate secțiuni speciale descrierii concise a avantajelor utilizării nanoparticulelor în acest scop, evidențiind metodele de obținere și caracterizare ale acestora. Finalul capitolului tratează

principalele modelele cinetice de eliberare a substanței active din sistemele particulate și aplicațiile în domeniul biomedical.

Capitolul 2 constă într-o prezentare detaliată a materialelor și metodelor utilizate în sinteza derivaților de chitosan precum și în prepararea sistemelor polimer-medicament, urmată de descrierea metodelor de analiză și caracterizare folosite.

Partea de contribuții proprii a tezei de doctorat se extinde pe parcursul capitolelor 3-6 în modul următor:

Capitolul 3 descrie sinteza și caracterizarea unor derivați de chitosan cu acid folic, glucoză și maltoză cu rol de liganzi de recunoaștere în terapia țintită, precum și de inducere a unor proprietăți noi polizaharidei native.

Capitolul 4 tratează amănunțit obținerea și caracterizarea structurală, morfologică și din punct de vedere al proprietăților de biomaterial a sistemelor nanoparticulate polimer-medicament pe baza derivatului de chitosan cu acid folic.

În cadrul capitolului 5 este prezentată prepararea și caracterizarea sistemelor polimer-medicament sub formă de nanoparticule pe baza derivatului de chitosan cu maltoză.

Capitolul 6 încheie seria contribuțiilor originale prin expunerea detaliată a obținerii și caracterizării sistemelor nanoparticulate magnetice polimer-medicament pe bază de chitosan modificat cu maltoză.

Suporturile polimere obținute au fost caracterizate din punct de vedere al capacității de încărcare și eliberarea a principiilor active utilizând medicamente hidrosolubile precum 5-Fluorouracil și Levofloxacin.

Partea de Concluzii generale întregește teza de doctorat urmând ca secțiunea de Referințe bibliografice să însumeze lista de lucrări științifice, majoritatea de dată recentă, care au constituit baza elaborării lucrării prezente.

Oviectivele lucrării

Obiectivul general al tezei de doctorat îl constituie *obținerea și caracterizarea unor noi nanoparticule polimere pe bază de derivați de chitosan pentru transportul dirijat și eliberarea controlată a medicamentelor în cazul unor afecțiuni specifice precum cancerul și infecțiile provocate de *Escherichia coli**. Pentru îndeplinirea obiectivului principal s-a impus realizarea unor obiective specifice, astfel:

- Sinteza unor derivați de chitosan prin legarea chimică la grupele amino a unor mono-, dizaharide sau acid folic, ca liganzi de direcționare pe catena principală a polimerului.
- Caracterizarea structurală a derivaților obținuți prin metode moderne de analiză precum: spectroscopie FT-IR, spectroscopie RMN sau difractometrie cu raze X.
- Obținerea și caracterizarea fizico-chimică a unui nou tip de nanoparticule pe bază de chitosan funcționalizat cu acid folic prin tehnica emulsiei inverse cu dublă reticulare, pentru transportul activ al medicamentelor antitumorale.
- Obținerea și caracterizarea fizico-chimică a unor noi nanoparticule polimere pe baza derivatului de chitosan cu maltoză prin emulsie inversă cu dublă reticulare pentru tratamentul împotriva *Escherichia coli*.
- Obținerea și caracterizarea fizico-chimică a unor noi nanoparticule polimere hibride pe baza derivatului de chitosan cu mono- sau dizaharide și magnetită prin emulsie inversă cu dublă reticulare pentru dirijarea fizică a acestora prin intermediul unui câmp magnetic exterior la nivelul tumorilor.
- Caracterizarea nanoparticulelor obținute din punct de vedere al capacității de includere/eliberare a principiilor active și al caracteristicilor de biomaterial.

Capitolul 3

Sinteza și caracterizarea unor derivați de chitosan

Prin modificarea chimică a chitosanului se pot obține derivați cu noi funcții care se pretează preparării nanoparticulelor cu proprietăți fizico-chimice (formă, diametru, sarcină de suprafață, capacitate de încărcare și eliberare a principiilor active) și biomedicale (transport la țintă, timp de circulație îmbunătățit, mucoadezivitate, citotoxicitate) îmbunătățite față de polizaharida inițială.[311]

3.1. Derivatul de CS cu acid folic

Conform literaturii de specialitate, pentru obținerea derivatului de chitosan cu acid folic pot fi abordate două metode, ambele implicând reacția de condensare mediată de carbodiimide între grupele aminice primare ale chitosanului și gruparea carboxilică din poziția γ a acidului folic cu formarea unei noi legături amidice. În urma studiului comparativ al eficienței de funcționalizare a chitosanului cu acid folic, s-a optat pentru utilizarea metodei directe de obținere corespunzătoare schemei de reacție următoare (fig.49).

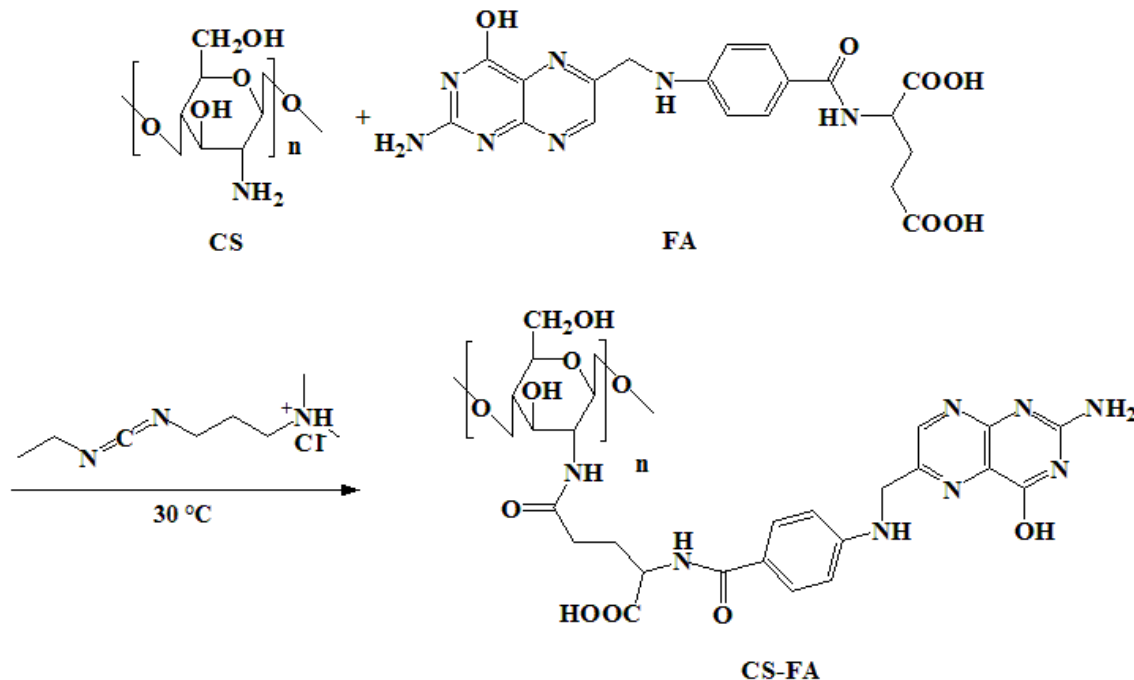


Figura 49. Schema reacției de obținere a folatului de chitosan într-o singură etapă
S-au utilizat două rapoarte molare $-NH_2/FA$, 3/1 și 1/1.

3.1.1. Caracterizare structurală

3.1.1.2. Caracterizare prin RMN

Legarea acidului folic pe lanțurile de chitosan este justificată de apariția peakurilor specifice de la 7,7 ppm și 6,8 ppm atribuite protonilor inelului aromatic, H6-H9 respectiv H7-H8, prezenți în structura FA. După cum se poate observa (fig. 51), aceste semnale lipsesc din spectrul chitosanului simplu. Deși conjugarea acidului folic pe lanțurile de chitosan a dus la suprapunerea unor semnale vibraționale similare (fapt explicat și prin influența solventului și a interacțiunilor dintre reactanți), se pot observa semnalele caracteristice acidului la 8,7 ppm aparținând protonului inelului pterin (H3) precum și la 8,12, 6,97, 2,49 ppm corespunzătoare H10, H5 respectiv H14. În intervalul 3,1-3,9 ppm din spectrul conjugatului se pot remarca semnalele de rezonanță ale protonii carbonilor unității glucozamino a chitosanului.[302,304]

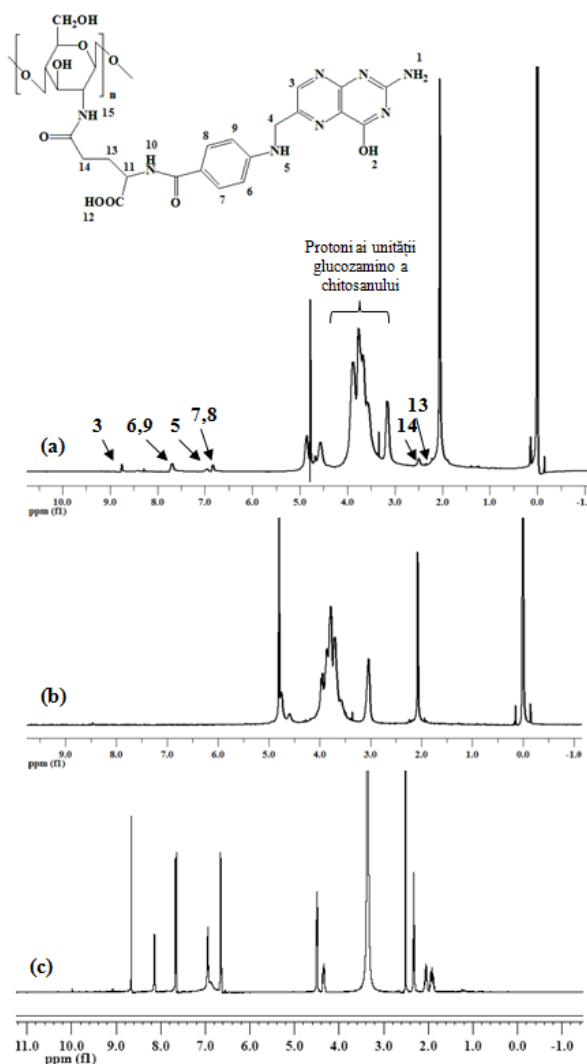


Figura 51. Spectrele ^1H RMN ale (a) CS-FA (raport molar $-\text{NH}_2/\text{FA} = 3/1$), (b) CS și (c) FA

3.1.2. Determinarea gradului de funcționalizare prin spectroscopie UV-VIS

În vederea evaluării gradului de funcționalizare al folașilor de chitosan s-a recurs la metoda spectroscopiei UV-Vis. Aceasta a presupus construirea unei curbe de calibrare a acidului folic la lungimea de undă maximă $\lambda = 285 \text{ nm}$ pe baza căreia a fost calculată cantitatea de FA legată pe CS. Pentru fiecare derivat obținut prin cele două metode propuse, au fost preparate soluții în acid acetic 1% de aceeași concentrație ($2 \cdot 10^{-5} \text{ g/mL}$) pentru care au fost citite absorbanțele la 285 nm. Ținând cont de valorile absorbanțelor și a concentrației utilizate, pe baza ecuației dreptei au fost calculate următoarele grade de funcționalizare prezentate în tabelul 10.

Tabelul 10. Gradul de funcționalizare al folașilor de chitosan

Metoda de obținere	Raportul molar utilizat ($-\text{NH}_2/\text{FA}$)	Gradul de funcționalizare (%)
Directă	3/1	3,3
	1/1	6,4
Metoda esterului intermediar FA-NHS	3/1	2

3.1.3. Cristalinitate (X R D)

Spectroscopia de raze X permite, de asemenea, obținerea unor informații indirecte privind realizarea derivatului de chitosan. Chitosanul este un polimer semicristalin, difractograma corespunzătoare prezentând peakuri caracteristice de intensitate ridicată la $2\theta = 10.416$ și 19.832 (fig. 52). Acidul folic este, de asemenea, un compus cristalizabil, ce prezintă o difractogramă cu peak-uri de intensitate ridicată, caracteristice, la $2\theta = 5,43$ și 19.832 , și de intensitate mai coborâtă la $2\theta = 13,095$ și $16,38$.

Difractogramele corespunzătoare celor doi derivați, caracterizați de grade de transformare diferite, prezintă alura corespunzătoare celei a chitosanului, dar cu o ușoară deplasare a peakurilor de maximă intensitate, precum și cu modificarea raportului dintre acestea.

Comparând difractogramele derivaților obținuți în cele două rapoarte molare (fig. 52), putem observa creșterea intensității peak-ului de la $2\theta = 9,95$ în cazul compusului cu grad de conversie mai ridicat ($-\text{NH}_2/\text{FA} = 1/1$). Acest aspect poate fi explicat prin contribuția acidului folic ce se regăsește într-o proporție mai ridicată decât în cazul compusului 3/1. În plus, derivatul 1/1 prezintă ușoare deplasări spre valori mai mici ale 2θ față de chitosanul nemodificat, evident, din aceeași cauză.

Astfel, peak-urile caracteristice chitosanului scad în intensitate ca un efect al scăderii cantității de polizaharidă din componența derivatului.

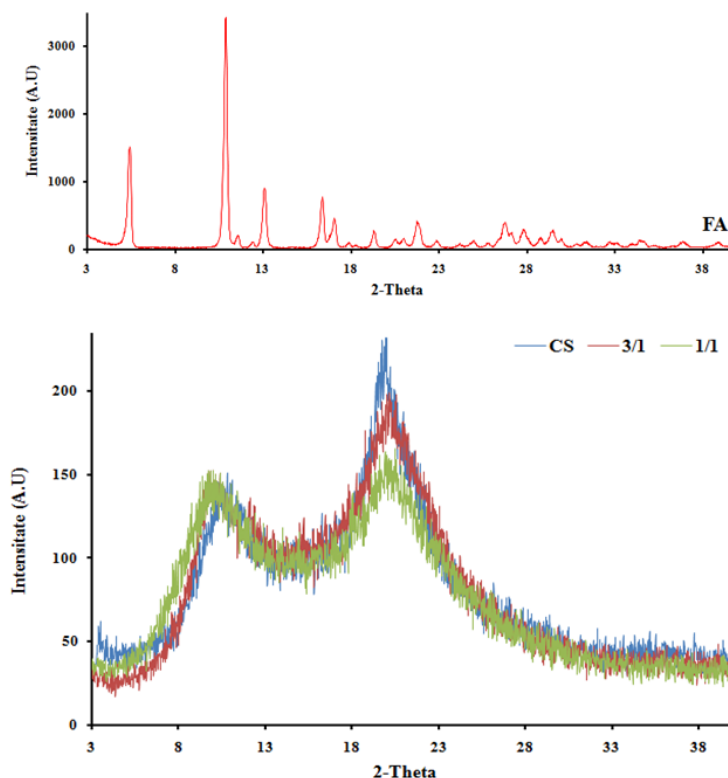


Figura 52. Difractograme XRD pentru acidul folic, chitosanul nativ și derivații obținuți la rapoartele molare $-\text{NH}_2/\text{FA} = 3/1$ și $1/1$

3.2. Derivatul de CS cu glucoză/maltoză

Secțiunea prezintă propune modificarea chimică a chitosanului prin legarea substituenților hidrofilici de glucoză sau maltoză la grupele aminice primare prin reacții de aminare reductivă (fig. 54). Se urmăresc prin aceasta următoarele:

- îmbunătățirea solubilității chitosanului în medii de pH slab acid sau neutru care va duce la facilitarea preparării nanoparticulelor prin tehnica emulsiei inverse cu dublă reticulare;
- îmbunătățirea activităților antimicrobiene și antioxidative ale chitosanului nativ;
- obținere nanoparticulelor cu suprafață hidrofilă pentru îmbunătățirea timpului de retenție și a stabilității acestora în fluide biologice;
- glucoza și maltoza pot juca rol de liganzi pentru recunoașterea de către unii receptori celulari membranari, ajutând astfel la direcționarea activă a nanoparticulelor obținute din derivații chitosanului cu aceștia.

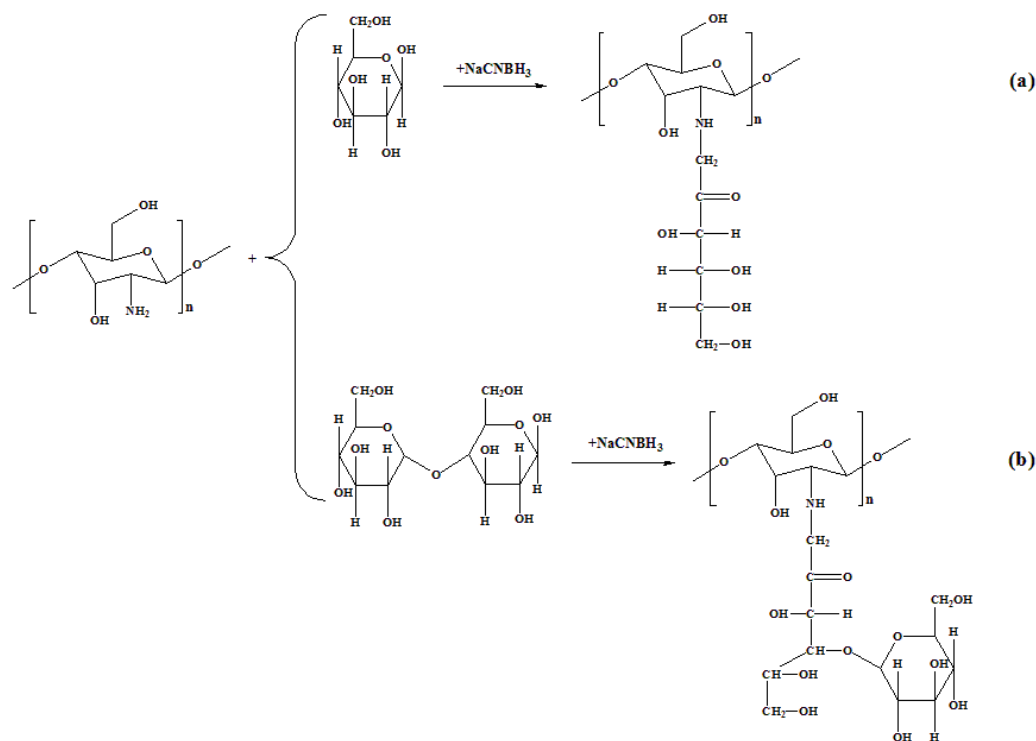


Figura 54. Schema reacțiilor de obținere a derivatului de chitosan cu glucoză (a) și maltoză (b)

În urma analizei gradelor de funcționalizare ale compuşilor sintetizați s-au înregistrat valori de sub 3% pentru cazul utilizării glucozei cu rol de substituent, rezultatele determinându-ne să continuăm cu utilizarea derivaților pe bază de maltoză în vederea obținerii nanoparticulelor ulterioare.

3.2.1. Caracterizare prin FT-IR

a) Caracterizarea derivatului de chitosan cu maltoză

Rapoartele molare utilizate au fost $-\text{NH}_2/\text{maltoză}$: 1/0,7, 1/1, 1/1,5 și 1/3. Pentru exemplificare, în figura 56 au fost selectate spectrele chitosanului și ale rapoartelor molare extreme.

Gruparea aminică secundară care se formează odată cu derivatul de chitosan nu poate fi evidențiată deoarece semnalul acesteia din intervalul $3300 - 3400 \text{ cm}^{-1}$ se suprapune cu benzile largi ale vibrațiilor de întindere ale grupelor $-\text{OH}$ prezente atât în CS cât și în maltoză. Deși profilele spectrelor CS și al CS modificat sunt similare, se pot observa în spectrele derivaților (foarte pronunțat în cazul raportului molar 1/3) lărgiri ale benzilor de absorbție din intervalul $3300 - 3600 \text{ cm}^{-1}$ explicate prin aportul crescut de grupe $-\text{OH}$ datorat maltozei, implicate în multiple legături de H de diferite lungimi și tării.[337]

Tabelul 11. Deplasări ale numerelor de undă caracteristice derivaților comparativ cu cele ale chitosanului nativ.

Compus	Absorbție caracteristică legăturii amidice (cm ⁻¹)	Vibrații de deformare ale grupelor metilenice (cm ⁻¹)	Vibrații de întindere ale legăturilor eterice (cm ⁻¹)	Vibrații specifice ciclurilor zaharidice (cm ⁻¹)
CS	1659,65	1261,31 – 1422,42	1078,14 – 1155,29	896,85 – 1033,18
1/0,7	1662,51	1262,36 – 1455,23	1076,24 – 1158,21	894,93 – 1027,05
1/3	1656,78	1261,39 – 1459,09	1077,2 – 1151,46	890 – 1028,98

O dovadă în plus a modificării cu maltoză o reprezintă reducerea intensității benzilor de absorbție (ca urmare a diminuării numărului acestora) de la 1599,86 cm⁻¹ atribuită vibrațiilor de forfecare N-H din gruparea aminică primară a chitosanului.[338]

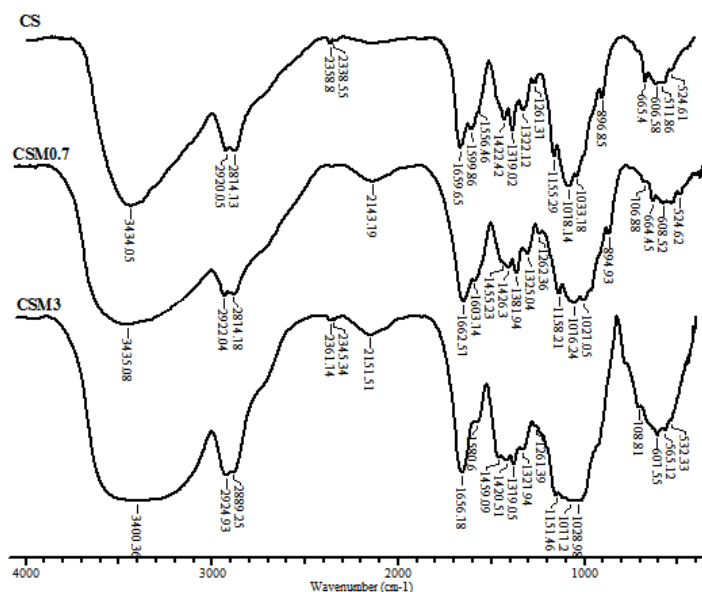


Figura 56. Spectrele FT-IR comparative ale chitosanului (CS) și ale rapoartelor molare $\text{-NH}_2/\text{maltoză}$: 1/0,7 (CSM0.7) respectiv 1/3 (CSM3)

3.2.2. Caracterizare RMN

Spectrele înregistrate pentru derivații preparați oferă informații utile în determinarea gradului de substituție al chitosanului iar pentru exemplificare s-a ales raportul molar $\text{NH}_2/\text{maltoză} = 1/0,7$ (CSM0.7). Din figura 58, conținând spectrele chitosanului, maltozei și raportului menționat anterior, se pot identifica următoarele semnale caracteristice:

- **în spectrul chitosanului nemodificat**, peak-ul de la 3,13 ppm aparține carbonului C-2 al inelului glucopiranozic;
- de asemenea, în intervalul 3,58 – 3,83 ppm se regăsesc semnalele protonilor carbonilor C-3, C-4, C-5 și C-6;
- semnalul de la 4,53 ppm este caracteristic azotului unității N-acetilglucozamină în timp ce dubletul de la 4,81 și 4,83 ppm aparține protonilor unității glucozamină;[339]
- **în spectrul chitosanului modificat** semnalul de la 3,12 pm aparține protonului poziției C-2 din inelul glucopiranozic;
- la 5,01 ppm putem observa peak-ul pentru unitatea substituită;
- dubletul de la 4,95 și 4,97 ppm este atribuit anomerului β al maltozei (prezent în proporție de 61% comparativ cu anomerul α , conform lucrării raportate de Rosund, în bună concordanță cu analiza prezentă a spectrului maltozei - Malt);[340]

Pe baza observațiilor anterioare putem determina gradul de substituție al chitosanului ca fiind raportul între valoarea integralei semnalului pentru anomerul β și abundența acestuia:

$$\frac{I_{anomer\beta}}{A_{anomer\beta}} = \frac{0,08}{0,61} = 0,13, \text{ însemnând } 13\% \text{ unități substituite de maltoză.}$$

Deoarece valoarea este foarte apropiată de cea a integralei de la 5,01 ppm, $I = 0,11$ (însemnând 11%), putem considera o valoare a gradului de funcționalizarea a chitosanului de 12%. Respectând același protocol și pentru spectrele celorlalți derivați, se obțin următoarele grade de funcționalizare: 23% ($-\text{NH}_2/\text{maltoză} = 1/1$), 24% ($-\text{NH}_2/\text{maltoză} = 1/1,5$) și 48% ($-\text{NH}_2/\text{maltoză} = 1/3$).

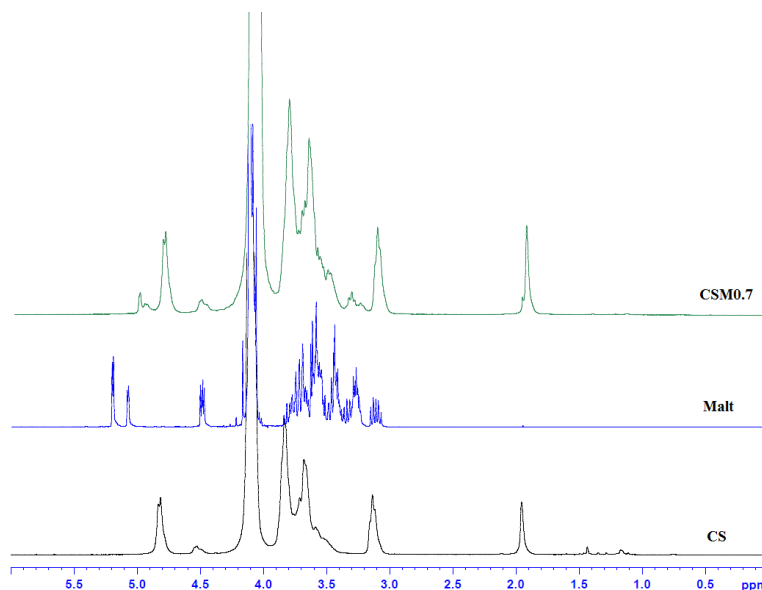


Figura 58. Spectrele ^1H RMN ale CS, maltozei și derivatului CSM0.7

Capitolul 4

Sisteme nanoparticulate polimer-medicament pe baza derivatului de chitosan cu acid folic

Capitolul prezent tratează prepararea și caracterizarea de noi sisteme nanoparticulate polimer-medicament pe bază derivatului de chitosan funcționalizat cu acid folic (CS-FA) prin metoda emulsiei inverse cu dublă reticulare pentru vectorizarea nanoparticulelor purtătoare de substanțe chemoterapeutice la nivelul tumorilor.

Procesul de coreticulare ionică și covalentă care a stat la baza formării rețelei polimere a nanoparticulelor este propus în figura 60.

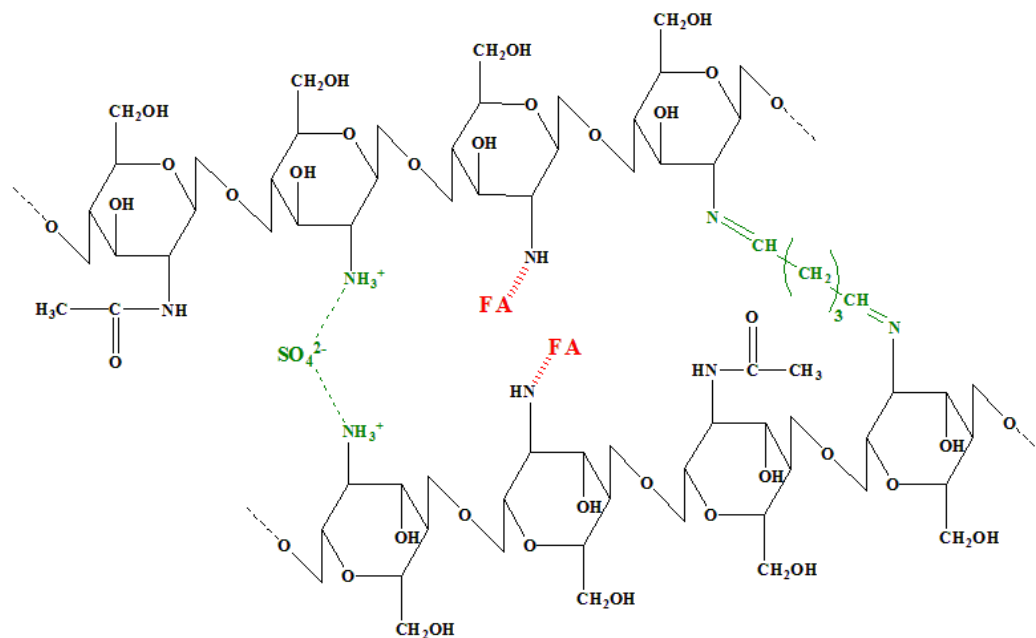


Figura 60. Reprezentarea schematică a reacțiilor de reticulare ionică (Na_2SO_4) și covalentă (AG) ale derivatului CS-FA în formarea nanoparticulelor; FA – reprezintă acidul folic legat chimic pe lanțurile de chitosan

Protocolul experimental respectat pentru prepararea nanoparticulelor este ilustrat în tabelul 12.

Tabelul 12. Protocolul experimental pentru prepararea nanoparticulelor*

Cod	Derivat CS-FA	Conc. sol. polimer (%)	–NH ₃ ⁺ /Na ₂ SO ₄ (mol/mol)	–NH ₃ ⁺ /AG (mol/mol)	Timp reticulare ionică (min)	Timp reticulare covalentă (min)	Vit. ultra- turax (rpm)			
A ₁	3/1	0,5	1/0,4	1/0,1	10	60	10000			
A ₂					60					
A ₃					120					
A ₄					180					
B ₁	1/1	0,5	1/0,4	1/0,19	60					
B ₂					120					
B ₃		0,5	1/0,8		60					
B ₄					120					
C ₁	3/1	0.5	1/3.15	1/0.16	60	60	15000			
C ₂			1/2.18	1/0.13						
C ₃			1/1.44	1/0.11						
C ₄		0.3	1/2.18	1/0.13						
C ₅		0.7	1/2.18	1/0.13						
D ₁	1/1	0.5	1/3.15	1/0.17						

* $-\text{NH}_3^+$ reprezintă grupele amoniu cuaternizate din derivatul de chitosan cu acid folic disponibile reticulării;

În protocolul experimental s-au utilizat pentru toate tipurile de particule aceleași cantități de surfactant Tween80 și Span80, 2% (masic), pentru fazele apoasă respectiv organică.

De asemenea, viteza de agitare a reactorului de sinteză a rămas constantă, 500 rpm.

4.1. Caracterizarea structurală a nanoparticulelor prin FT-IR

Pentru a pune în evidență formarea rețelei polimere prin cele două tipuri de reticulare, a fost necesară analiza structurală a nanoparticulelor prin spectroscopie de absorbție în infraroșu. Au fost înregistrate spectrele FT-IR pentru toate tipurile de nanoparticule prezentate în protocolul experimental însă deoarece în urma analizei acestora s-a constatat că acestea prezintă profil similar, spre exemplificare s-au ales doar spectrele probelor C₁ și D₁ care diferă prin gradul de funcționalizare al derivatului de plecare.

Conform figurii 61, se poate observa că spectrele FT-IR sunt foarte asemănătoare cu ușoare deplasări ale benzilor de absorbție și probează realizarea celor două tipuri de reacții. Benzile de

absorbție specifice legăturilor iminice $-C=N-$ rezultate în urma reticulării covalente între grupele amino ale derivatului și grupele carbonil ale aldehydei glutarice sunt prezente la numerele de undă $1636,53\text{ cm}^{-1}$ în cazul probei C_1 și $1634,6\text{ cm}^{-1}$ pentru D_1 . Semnalele de absorbție pronunțate de la $619,12$ și $618,16\text{ cm}^{-1}$ sunt atribuite legăturilor realizate prin reticulare ionică între anionii sulfat din Na_2SO_4 și cationii amoniu ai folatului de chitosan.

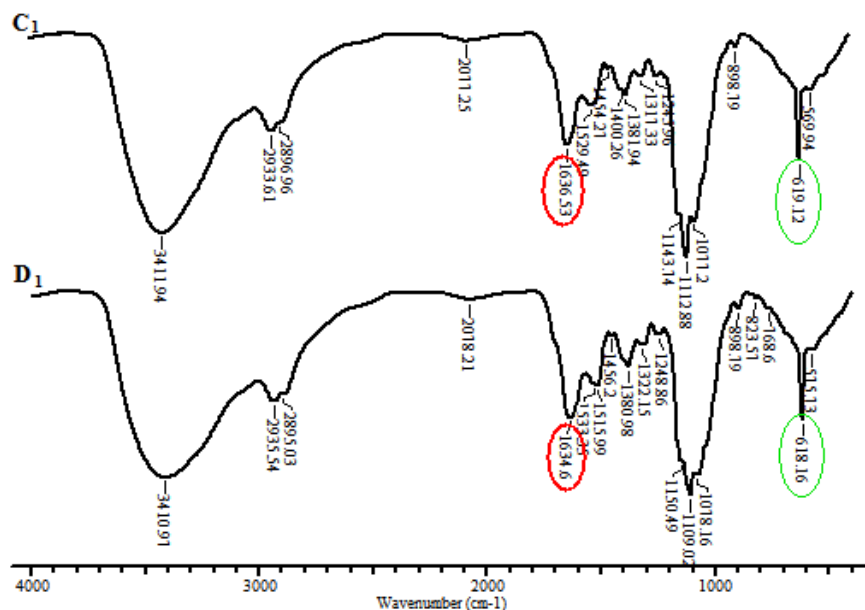


Figura 61. Spectrele FT-IR ale nanoparticulelor C_1 și D_1

4.2. Caracterizarea morfologică a nanoparticulelor

4.2.1. Microscopia electronică de baleiaj

Conform protocolului experimental (tab. 12), parametrii variați în obținerea nanoparticulelor au dus la diferențe morfologice semnificative observabile în micrografiile SEM din figura 63 comparativ cu setul anterior de imagini. Pentru probele $C_1 - C_3$ a fost menținută constantă concentrația soluției de polimer (0,5%), modificându-se raportul molar NH_3^+ /reticulant. În cazul particulelor de tip C_1 au fost utilizate cele mai mari cantități de Na_2SO_4 și AG, acestea scăzând în ordinea $C_1 - C_2 - C_3$. Se constată astfel că odată cu scăderea cantității de reticulant crește tendința de aglomerare, lucru explicat de scăderea densității de reticulare a matricii polimere (C_3). Pentru setul de probe C_2, C_4, C_5 în care raportul polimer/reticulant a fost menținut constant, modificarea concentrației soluției de polimer a dus la următoarele observații. Diametrul particulelor crește cu concentrația soluției de polimer, fiind mai ridicat la proba C_5 , efect raportat și în alte lucrări.[352]

Prin creșterea concentrației soluției de polimer, crește vâscozitatea acesteia determinând formarea unor picături mai mari în momentul emulsionării, care intră în procesul de reticulare în prezența agenților reticulanti. La soluții mai diluate (C_4), forma particulelor nu mai este la fel de bine conturată, efect al unei reticulări mai slabe. În cazul particulelor C_5 unde concentrația soluției de polimer a crescut la 0,7% se observă o ușoară creștere a polidispersității dimensionale și o scădere a tendinței de aglomerare. Între particulele C_1 și D_1 în cazul cărora s-a utilizat aceeași concentrație a soluției de polimer precum și același volum de soluție de reticulant se poate observa o creștere ușoară a diametrului mediu al particulelor D_1 , aspect ce poate fi explicat prin valoarea mai mare a gradului de funcționalizare al CS. Acesta determină reducerea ușoară a numărului de grupe aminice care pot participa la reticulare, și deci scăderea densității de reticulare a particulelor cu consecințe asupra diametrului acestora. Ca o concluzie valabilă pentru toate probele setului $C_1 - D_1$, creșterea vitezei de agitare a ultraturaxului a influențat considerabil dimensiunile medii ale particulelor.

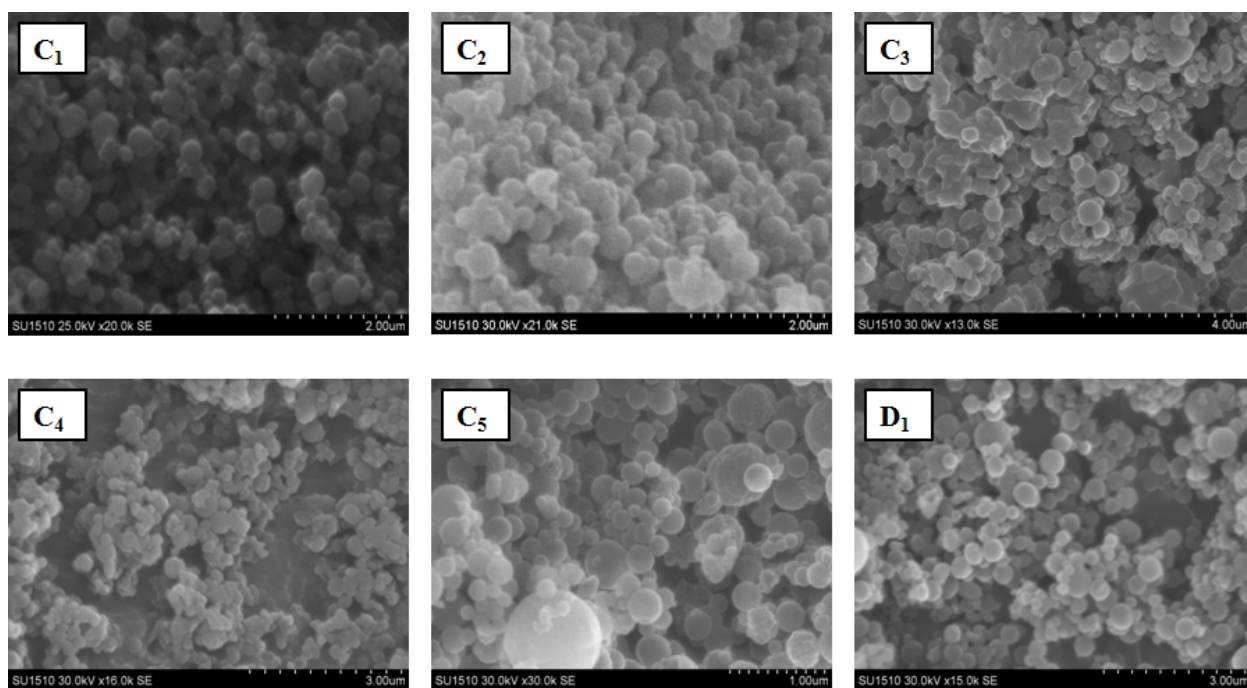


Figura 63. Micrografii SEM ale probelor C_1 , C_2 , C_3 , C_4 , C_5 , D_1 .

4.2.4. Determinarea stabilității suspensiilor apoase prin evaluarea potențialului zeta

Potențialul Zeta (ζ) reprezintă o altă caracteristică importantă în determinarea performanțelor nanoparticulelor. Valoarea potențialului ζ constituie o măsură a mărimii repulsiilor sau atracțiilor de sarcină sau electrostatice dintre particule, fiind unul dintre factorii hotărâtori ai stabilității acestora. Determinarea valorii parametrului aduce o perspectivă clară asupra cauzelor dispersării, aglomerării

sau floculării putând fi folosită pentru îmbunătățirea formulării dispersiilor, emulsiilor sau suspensiilor.[353]

Pentru particule cu dimensiuni suficient de mici, o valoare absolută mare a potențialului ζ va sugera stabilitate, adică dispersia de nanoparticule va rezista agregării. Atunci când potențialul este scăzut, forțele de atracție le depășesc pe cele de repulsie iar dispersia va fi destabilizată apărând flocularea. În figura 66 sunt prezentate distribuțiile mobilităților particulelor C_1 , C_2 , C_3 , C_4 , C_5 și D_1 dispersate în mediu apos iar tabelul 13 rezumă valorile parametrilor înregistrați în urma măsurătorilor. Conform literaturii de specialitate, valorile înregistrate pentru potențialul ζ încadrează nanosuspensiile noastre în categoria coloizilor cu instabilitate incipientă.[354]

Tabelul 13. Valorile potențialului Zeta pentru particulele obținute.

Proba	Potențial ζ (mV)	Frecvență (Hz)	Mobilitate (cm ² /Vs) x e-004
C_1	+13,07	42,02	1.019
C_2	+18,78	60,39	1,465
C_3	+16,58	53,31	1,293
C_4	+14,26	45,85	1,112
C_5	+16,73	53,78	1,304
D_1	+11.74	54,08	1,311

4.5. Evaluarea caracteristicilor de biomaterial

Deoarece utilizarea nanoparticulelor preparate presupune ca acestea să intre în contact cu mediul fiziologic, este neapărată investigarea caracteristicilor lor de biomaterial.

4.5.1. Evaluarea citotoxicității

Determinarea viabilității celulare este una dintre cele mai utilizate analize în vederea evaluării citotoxicității biomaterialelor. Au fost supuse analizei de citotoxicitate toate probele seriei C_1 - D_1 pentru care viabilitățile celulare au înregistrat valori destul de ridicate. Pentru reprezentare s-au ales probele C_1 și C_5 .

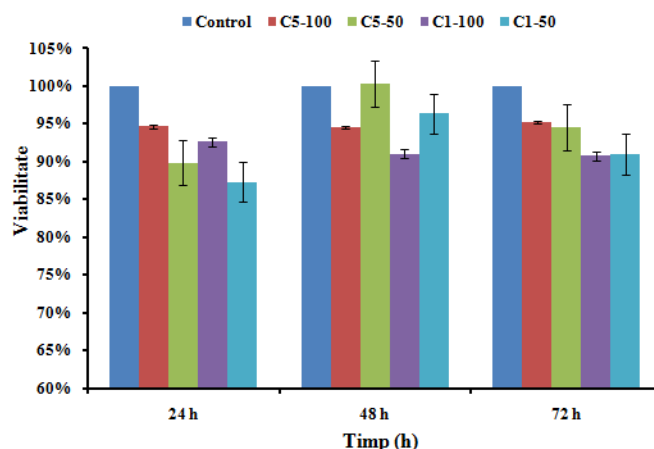


Figura 69. Reprezentarea grafică a viabilității celulare pentru probele C_1 și C_5 înregistrate la 24, 48 și 72 ore

Valorile viabilității celulare înregistrate pentru cele două concentrații sunt redată în figura 69, și probează încadrarea particulelor analizate în categoria celor lipsite de toxicitate.[356] Deși proba C_5 prezintă cele mai ridicate valori, se poate observa că și proba C_1 a înregistrat valori apropiate. De remarcat faptul că nanoparticulele nu numai că păstrează viabilitatea celulară la valori ridicate, dar permit și proliferarea lor, dovedită de creșterea ușoară a viabilității celulare în timp (evident în cazul probei C_5 la 48 ore pentru concentrația de 50 $\mu\text{g/mL}$).

4.5.2. Evaluarea hemocompatibilității

Hemoliza reprezintă dezintegrarea globulelor roșii din sânge cu eliberarea hemoglobinei și a altor compuși interni în fluidul înconjurător. În cazul în care această dezintegrare se produce la un număr semnificativ de globule roșii, se pot produce stări patologice periculoase în organism. Prin urmare, toate produsele biomedicale concepute pentru a fi administrate pe cale intravenoasă trebuie evaluate pentru stabilirea potențialului hemolitic.[357]

S-a observat că procentul de hemoliză crește odată cu creșterea concentrației de nanoparticule. O probă se consideră hemolitică dacă procentul de hemoliză depășește 5%.[359] După cum se poate observa din grafic (fig. 70), procentul hemolitic a fost mai mic de 5% doar pentru două din concentrațiile testate, și anume 100 $\mu\text{g/mL}$ și 200 $\mu\text{g/mL}$, pentru toate cele trei determinări. Pentru concentrația 400 $\mu\text{g/mL}$ procentul hemolitic depășește valoarea de 5% pentru toate determinările.

Figura 70 reprezintă comparativ valorile pentru probele care au înregistrat potențialului hemolitic cel mai scăzut, și anume probele C_1 și C_3 . Proba C_3 a fost selectată ca referință datorită valorii celei mai mici, însă prin comparație, proba C_1 manifestă valori apropiate.

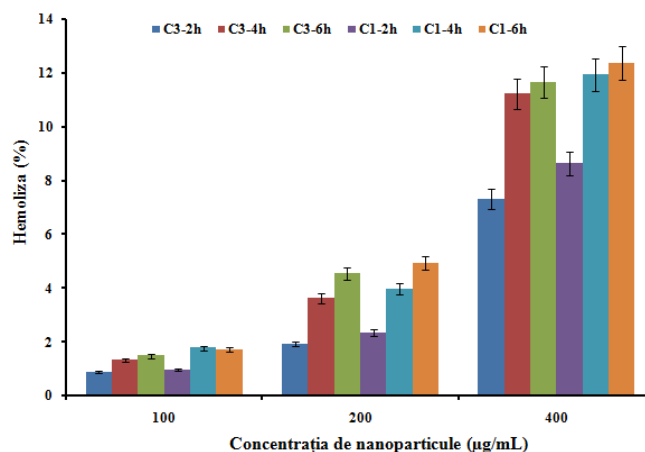


Figura 70. Procentul de hemoliză după 2, 4 și 6 ore de la expunere în prezența probelor C₁ și C₃

Rezultatele testelor de hemoliză efectuate pe nanoparticulele selectate au dovedit că acestea sunt adecvate pentru administrarea sistemică atât timp cât concentrația lor în sânge este mai mică de 200 μg/mL.

4.5.3. Analiza citofluorimetrică

Pentru a testa capacitatea nanoparticulelor funcționalizate de a se fixa pe celulele tumorale, în măsură mai mare decât cele nefuncționalizate, a fost efectuat un experiment constând în plasarea acestora (proba C₅) pe o cultură de celule tumorale A549, evaluându-se măsura în care acestea se orientează spre celule, comparativ cu nanoparticulele nefuncționalizate (nanoparticule martor din chitosan simplu obținute prin aceeași tehnică a coreticulării în emulsie inversă). Histogramele obținute (colorate arbitrar) sunt prezentate în figura 71.

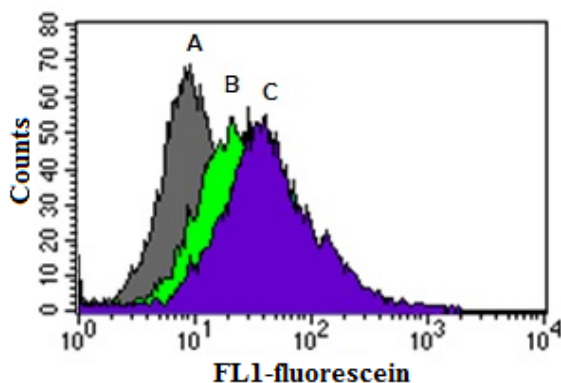


Figura 71. Histogramele de fluorescență reprezentative pentru celulele A549 martor (A), celulele tratate timp de 48 ore cu nanoparticule martor marcate cu fluoresceină (B) și celulele tratate timp de 48 ore cu nanoparticule tip C₅ marcate cu fluoresceină (C).

Se constată că nanoparticulele pe bază de CS-FA, marcate fluorescent, sunt captate în mai mare proporție (cu aprox. 26 % în plus) de către celulele tumorale, după 48 ore de incubare. Experimentul demonstrează astfel că scopul cercetării a fost atins, în sensul că particulele de chitosan funcționalizat cu acid folic au capacitatea mai ridicată de orientare și fixare la peretele celulelor tumorale.

4.6. Studiul capacității de încărcare cu medicament

Deoarece scopul preparării nanoparticulelor este acela de a le utiliza pentru transportul dirijat de principii active la nivelul celulelor tumorale, pentru obținerea sistemelor polimer-medicament a fost utilizat 5-fluorouracilul (5-FU), un antimetabolit al analogilor pirimidinei.

În tabelul 16 pot fi observate cantitățile de medicament reținut de suporturile polimere în procesul de încărcare precum și eficiențele de încărcare ale acestora.

Tabelul 16. Cantitățile de medicament reținut și eficiențele de încărcare

Cod probă	mg 5-FU/g nanoparticule	Eficiența de încărcare (%)
C ₁	137,8	16,8
C ₂	135,5	16,02
C ₃	112,3	15,34
C ₄	100,5	12,42
C ₅	103,05	13,7

Corelând gradele de umflare ale probelor (discutate anterior) cu cantitățile de medicament reținut de suporturi, se constată un comportament surprinzător deoarece era de așteptat ca acestea să crească în aceeași ordine. Contrar așteptărilor, deși cantitățile de medicament nu variază semnificativ, este evidentă o scădere ușoară a acestora odată cu creșterea raportului polimer/reticulant (diminuarea cantității de reticulant). O posibilă explicație ar putea fi aceea că după atingerea echilibrului de umflare, o parte din moleculele de medicament părăsesc rețeaua polimeră umflată cu o mai mare ușurință în cazul suporturilor cu densitate de reticulare mai mică. Aceasta ar putea fi explicația pentru care proba C₁ a reținut cea mai mare cantitate de 5-FU.

4.7. Studiul cineticii de eliberare a medicamentului

Pentru studiul procesului de eliberare a medicamentului a fost ales drept exemplu reprezentativ proba C₁ care a reținut cea mai mare cantitate de 5-FU, întrunește caracteristicilor morfologice și

dimensionale optime precum și o bună dispersabilitate în medii apoase, și caracteristici de biomaterial adecvate.

Deoarece utilizarea nanoparticulelor presupune administrarea acestora sub formă de suspensie injectabilă în proximitatea tumorilor, s-a efectuat studiul cineticii de eliberare la pH-ul similar mediului acestora. Profilul cineticii de eliberare este în consecință reprezentat în figura 72.

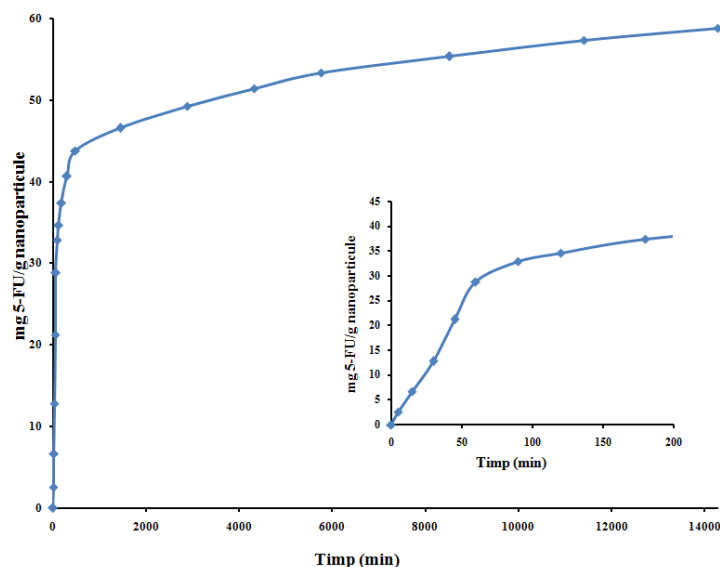


Figura 72. Curba cinetică de eliberare a 5-FU din particulele de tip C₁ (tampon fosfat, pH = 6.7, T = 37 °C)

Comportamentul la eliberare este tipic sistemelor difuzionale, prezentând un „burst effect” caracteristic, nu foarte pronunțat, urmat de o fază de eliberare mai lentă. Prima fază a procesului de eliberare este determinată, evident, de eliberarea moleculelor de medicament adsorbite în suprafața nanoparticulelor, care se petrece în prima oră a procesului. Ulterior se instalează o cinetică lentă, tipică sistemelor difuzionale. După 230 ore, cantitatea de 5-FU eliberată din nanoparticule ajunge la aproximativ 60 mg/g particule, acestea manifestând tendință de eliberare în continuare a medicamentului.

Analiza cineticii de eliberare a 5-FU din proba C₁ a fost efectuată pe baza modelului matematic Korsmeyer-Peppas. Prelucrarea datelor cinetice experimentale pe intervalul 0 - 200 minute a permis calculul exponentului difuzional ca fiind $n = 0,803$.

Această valoare ($0,5 < n < 1,0$) sugerează o difuzie anormală, non-fickiană, procesul de transport al medicamentului prin matricea polimeră fiind guvernat atât de procese de difuzie cât și de umflare.[362,363]

Capitolul 5

Sisteme particulare polimer - medicament pe baza derivatului de chitosan cu maltoză

În cadrul capitolului curent este prezentată obținerea, caracterizarea structurală, morfologică și din punct de vedere al proprietăților de biomaterial a sistemelor polimer-medicament obținute pe baza chitosanului modificat cu maltoză care au ca scop transportul dirijat al antibioticelor în cazul infecțiilor cu *Escherichia coli*. Ne propunem în acest sens modul de administrare sub formă de suspensie apoasă, intravens, pentru cazurile avansate de infecții când *E. coli* poate trece în torrentul sangvin provocând septicemie. Considerăm importantă în acest caz eliberarea unei doze șoc în primele momente, direct la țintă, urmată de o eliberare ulterioară mai lentă, vizând în acest fel evitarea absorbției medicamentului (așa cum se întâmplă în cazul administrării soluțiilor injectabile) în zonele neafectate.

Programul experimental elaborat pentru obținerea nanoparticulelor este prezentat în tabelul 17.

Tabelul 17. Parametrii variați în cadrul protocolului experimental de obținere a nanoparticulelor.*

Cod probă	Concentrația soluției de polimer (%)	Raport -NH ₃ ⁺ /Na ₂ SO ₄ (mol/mol)	Raport -NH ₃ ⁺ /AG (mol/mol)	Timp de reticulare ionică (min)	Timp de reticulare covalentă (min)
CM1	0,5	1/4,9	1/0,2	60	90
CM2				120	150
CM3		1/6,46	1/0,23		
CM4	0,3				
CM5	0,8				

*- NH_3^+ reprezintă grupele amoniu cuaternizate din chitosanul modificat cu maltoză, disponibile procesului de reticulare.

Pentru toate tipurile de particule prezentate în protocolul experimental s-a utilizat același raport fază apoasă/fază organică = 1/4 (volumic), același procent de surfactant - 2% (masic) din faza apoasă, respectiv organică și aceeași viteză a ultraturaxului (15000 rpm).

5.1. Caracterizarea structurală prin FT-IR

În figura 76 pot fi observate cele două spectre ale precursorului derivat de chitosan cu maltoză și a probei CM3 aleasă pentru exemplificarea reacției de reticulare. Așadar, deoarece benzile de absorbție caracteristice chitosanului modificat au fost identificate și descrise în detaliu în capitolul 3, în cele ce urmează vor fi explicitate doar benzile din spectrul nanoparticulelor. În urma analizei spectrului probei CM3 se pot observa următoarele:

➤ apariția a două benzi noi de absorbție spre deosebire de spectrul derivatului de chitosan la numerele de undă $1637,5\text{ cm}^{-1}$ și $619,12\text{ cm}^{-1}$ dovedesc formarea legăturilor iminice (-C=N-) respectiv a celor ionice prin intermediul -SO_4^{2-}

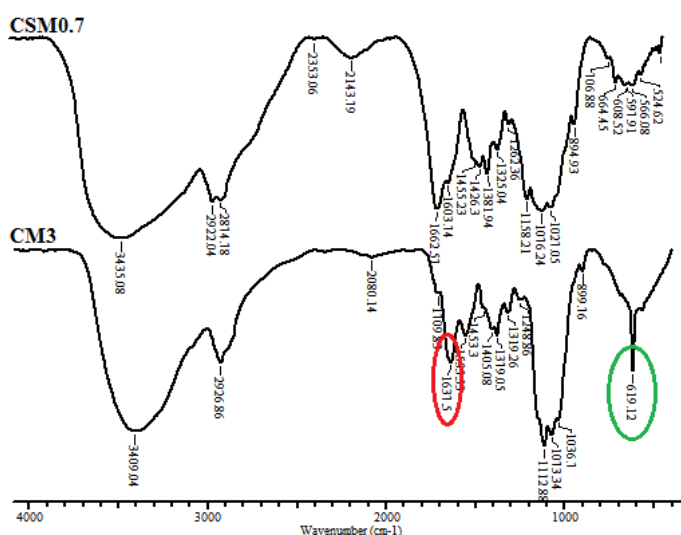


Figura 76. Spectrele FT-IR ale nanoparticulelor de tip CM3 și derivatului (CSM0.7) din care au fost obținute.

5.2. Caracterizarea morfologică

Conform prococoului experimental (tab. 17), o serie de parametri au fost variați în procesul de obținere a nanoparticulelor conducând la diferențe sesizabile în ceea ce privește aspectul, polidispersitatea, tendința de aglomerare și diametrul mediu al acestora.

5.2.1. Microscopia electronică de baleiaj

Figura 77 ilustrează micrografiile specifice celor 5 probe obținute conform programului experimental. Diferențele morfologice observate în urma analizei SEM duc la următoarele observații:

- folosirea rapoartelor polimer/reticulant de 1/4,9 și 1/0,2 (ionic, respectiv covalent) în cazul probei CM1 asociate cu timpii de reticulare de 60 și 90 de minute a dus la formarea unor aglomerate, acest lucru indicând faptul că reticularea a fost insuficientă;

- creșterea timpului de reticulare la 120, respectiv 150 minute cu menținerea constantă a rapoartelor de reticulare (CM2) îmbunătățește ușor aspectul particulelor însă tendința de aglomerare se menține încă foarte ridicată;
- în cazul probei CM3, scăderea rapoartelor $-\text{NH}_3^+/\text{Na}_2\text{SO}_4$ și $-\text{NH}_3^+/\text{AG}$ la 1/6,46, respectiv 1/0,23 a determinat obținerea unor particule cu formă sferică bine conturată, suprafață netedă și tendință foarte slabă de aglomerare, având diametrul mediu de 150 – 300 nm.
- scăderea concentrației soluției de polimer de la 0,5% la 0,3% în cazul probei CM4 cu păstrarea constantă a celorlalți parametri a alterat morfologia nanoparticulelor crescându-le polidispersitatea și tendința de aglomerare (comportament observat și în cazul particulelor studiate în capitolul anterior pentru diluții ale fazei apoase).
- creșterea concentrației fazei apoase la 0,8% pentru proba CM5 generează nanoparticule foarte polidisperse cu diametru cuprins în intervalul 200-1000 nm. O explicație poate fi aceea că prin creșterea vâscozității soluției de polimer, picăturile formate în etapa de emulsie sunt mai mari, doar o parte din ele putând fi sparte prin ultraturaxare.

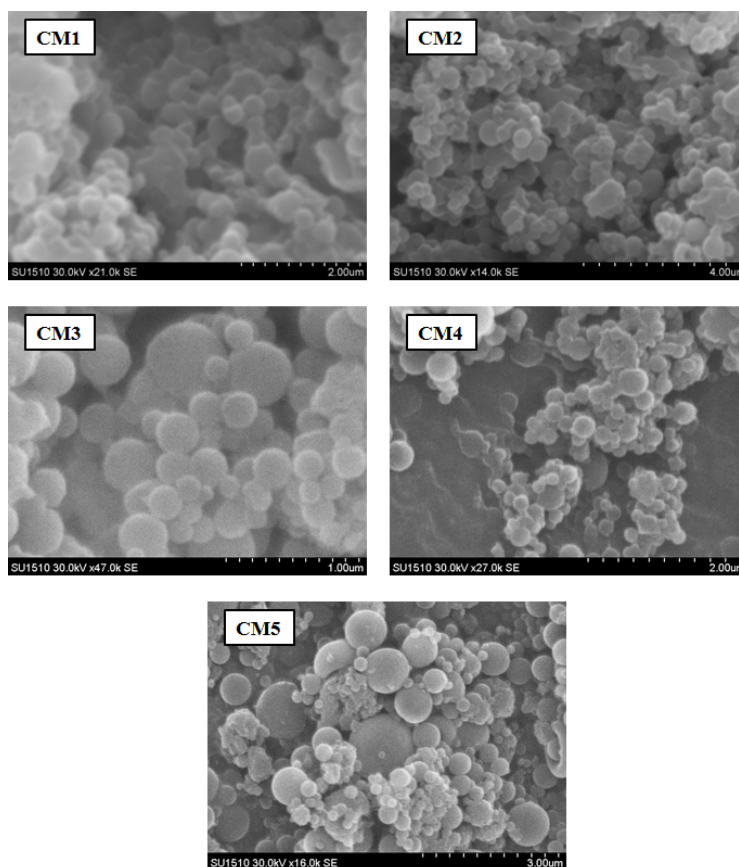


Figura 77. Fotografii SEM ale probelor CM1, CM2, CM3, CM4 și CM5

5.2.3. Determinarea diametrului mediu prin difractometrie laser și a potențialului zeta

Curbele diferențiale de distribuție granulometrică ale probelor CM3, CM4 și CM5 prezentate în figura 79 evidențiază valorile medii ale diametrului nanoparticulelor care se dovedesc în bună concordanță cu datele SEM. Se constată și de aici influența concentrației soluției de polimer și anume că odată cu creșterea valorii acesteia în ordinea CM4, CM3, CM5, valorile diametrelor medii înregistrate urmează aceeași tendință crescătoare: 128 nm, 165 nm, respectiv 420 nm.

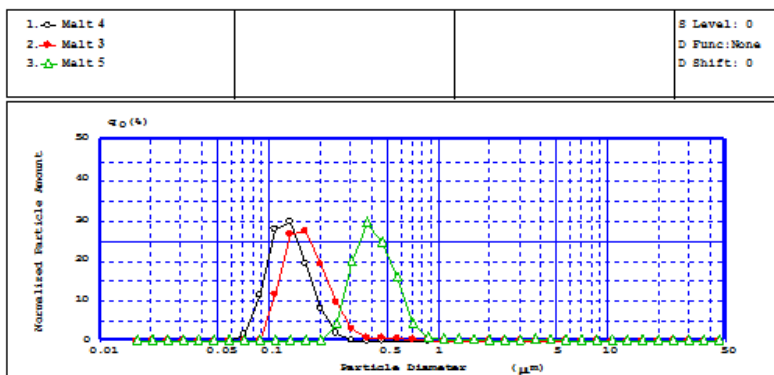


Figura 79. Curbele de polidispersitate dimensională ale nanoparticulelor CM3, CM4 și CM5 determinate prin difractometrie laser

5.4. Caracteristici de biomaterial

5.4.1. Hemocompatibilitate

Potențialul hemolitic al probelor CM3, CM4 și CM5 a fost evaluat pentru concentrații cuprinse între 100 – 400 $\mu\text{g/mL}$ utilizând o metodă spectrofotometrică. Rezultatele testului de hemoliză pentru proba reprezentativă CM3 ale cărei rezultate sunt reprezentate în figura 81.

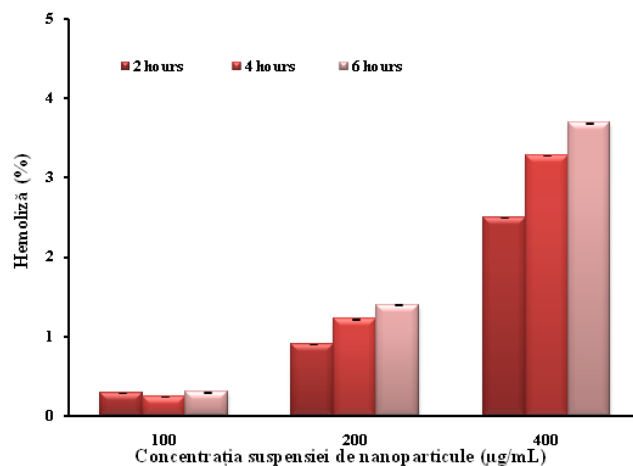


Figura 81. Procentul de hemoliză după 2, 4 și 6 ore de la expunere în prezența probei CM3

Este evident din grafic faptul că procentul de hemoliză este sub 5% pentru toate concentrațiile (100, 200 și 400 $\mu\text{g/mL}$) și timpii la care au fost determinate valorile. Rezultatele sugerează că proba CM3 este utilizabilă pentru administrări intravenoase atunci când concentrația în sânge nu depășește 400 $\mu\text{g/mL}$.

5.5. Capacitatea de includere/eliberare a levofloxacinului

În selectarea medicamentului model s-a avut în vedere caracterul de hidrogel al suporturilor nanoparticulate precum și procesul difuzional de încărcare/eliberare, ambele presupunând utilizarea unui compus hidrosolubil. Levofloxacinul este un antibiotic din familia fluorochinolonei cu spectru larg de acțiune în tratamentul infecțiilor bacteriene printre care și *E. coli*.

5.5.1. Cinetica de încărcare a levofloxacinului

Includerea levofloxacinului în suporturile polimere s-a realizat prin difuzie cantitatea de medicament reținută în particule a fost stabilită prin diferență determinând concentrația de levofloxacin rămasă în supernatant după centrifugarea probelor, pe baza curbei de calibrare construită anterior. Valorile cantităților de levofloxacin reținute pe suporturi sunt prezentate în tabelul 19 pentru probele analizate.

Tabelul 19. Cantitatea de medicament reținută pe suporturile studiate

Cod probă	mg de medicament reținut/g nanoparticule
CM3	148,71
CM4	135
CM5	215,53

În continuare, pentru proba CM3 considerată optimă s-a studiat influența concentrației soluției de medicament asupra cantității de levofloxacin reținută pe particule. S-au utilizat în acest scop trei concentrații diferite ale soluțiilor de medicament: 25 mg/mL, 30 mg/mL și 50 mg/mL, parametrii temperatură și timp de încărcare rămânând constanți, respectiv 28 – 30 °C și 24 ore. S-au determinat astfel cantitățile prezentate în tabelul 20.

Tabelul 20. Cantitatea de medicament reținută pe suport funcție de concentrația soluției de medicament

Proba	Cantitatea reținută (mg/g probă) pentru soluția de 25 mg/mL	Cantitatea reținută (mg/g probă) pentru soluția de 30 mg/mL	Cantitatea reținută (mg/g probă) pentru soluția de 50 mg/mL
CM3	148,71	234,15	351,22

După cum se poate observa din datele prezentate în tabelul 20, cantitatea de medicament reținută pe suporturi este influențată de concentrația soluției de medicament în care acestea au fost imersate, conform așteptărilor. Procesul de încărcare fiind guvernat de difuzie, conform legii lui Fick, gradientul de concentrație joacă un rol hotărâtor, determinând intensificarea transferului de medicament dinspre soluție spre interiorul rețelei polimere. Ca urmare, cantitatea de medicament inclus crește cu creșterea concentrației sale în soluție.

5.5.2. Cinetica de eliberare a levofloxacinului

Conform literaturii de specialitate, levofloxacinul poate fi administrat atât sub formă de tablete și soluții orale cât și sub formă de premix injectabil.[375] Se cunoaște că în cazul administrării obișnuite orale, cea mai mare cantitate de medicament este metabolizată prematur, în timpul transportului, până la atingerea zonei țintă. Această modalitate este inefficientă determinând pierderi de medicament și necesitatea administrărilor frecvente pentru atingerea indicelui terapeutic optim.

Studiul prezent propune administrarea levofloxacinului în tratamentul infecțiilor cu bacterii *E. coli* localizate în sânge prin intermediul sistemelor de transport nanoparticulate dirijate de maltoză. Pentru aceasta s-a studiat modul de eliberare al Levofloxacinului în mediu de tampon fosfat de pH = 7,4, la temperatura de 37 °C. Datele obținute sunt prezentate în tabelele 21 și 22.

Tabelul 21. Cantitatea de levofloxacin eliberată din sistem în tampon fosfat, pH = 7,4.

Cantitate de medicament eliberată din sistemul polimeric CM3 (mg levofloxacin/g sistem)	
Timp (min)	Tampon fosfat pH = 7,4
5	91,37
15	115,19

30	126,55
60	127,68
180	130,07
480	132,76
1440	148,38
2880	150,2
Total eliberat	70% din cantitatea înglobată

Testul efectuat în mediu de pH = 7,4 debutează cu eliberarea unei cantități de 91,37 mg levofloxacin corespunzătoare primelor 5 minute. Administrate în fluxul sangvin (al cărui pH este simulat în acest caz) sub formă de suspensie apoasă, nanoparticulele purtătoare de levofloxacin ar putea localiza foarte repede bacteriile *E. coli* prin intermediul maltozei de la suprafață, administrând în primele 15 minute o doză șoc acestora urmând ca mai apoi să elibereze restul de medicament pe o durată de până la 1440 - 2880 minute. Comparativ cu premixul injectabil, sistemele propuse prezintă avantajul localizării medicamentului exact la zona dorită fără pierderi în zonele neafectate. De asemenea, în sistemele particulate se poate încărca o cantitate mai mică de medicament deoarece acesta va ajunge direct la țintă îndeplinind funcția dorită.

Capitolul 6

Sisteme nanoparticulate magnetice polimer-medicament pe bază de chitosan modificat cu maltoză

Capitolul prezent propune obținerea și caracterizarea structurală, morfologică și din punct de vedere al proprietăților fizico-chimice și de biomaterial a nanoparticulelor polimere magnetice pe bază de magnetită și chitosan modificat cu maltoză pentru transportul activ prin flux sangvin al medicamentelor antitumorale la nivelul celulelor canceroase.

Programul experimental urmărit pentru obținerea nanoparticulelor hibride este prezentat în tabelul 23.

Tabelul 23. Programul experimental utilizat în prepararea nanoparticulelor *

Cod probă	Derivat CS/malt	Sol polimer (%)	CSM/Fe ₃ O ₄ (g/g)	-NH ₃ ⁺ /Na ₂ SO ₄ (mol/mol)	-NH ₃ ⁺ /AG (mol/mol)	Retic. ionică (min)	Retic. cov. (min)	
MG.1	CSM3	0,5	1/1	1/12,6	1/0,85	60	90	
MG.1.1						120	150	
MG.2	CSM1.5						60	90
MG.2.1								
MG.2.2			1/0,7					
MG.3	CSM0.7		1/1	1/7,2	1/0,26	120	150	
MG.3.1			1/0,7					
MG.3.2		0,8						
MG.3.3		0,3	1/0,5					
MG.3.4		0,5						

*-NH₃⁺ reprezintă grupele amoniu cuaternizate din derivatul de chitosan capabile de a participa la procesul de reticulare.

Pentru toate tipurile de particule prezentate în protocolul experimental a fost utilizat același raport fază apoasă/fază organică = 1/4 (vol), același procent de surfactant, 2% (masic) din faza apoasă (polimer + magnetită), respectiv organică și aceeași viteză a ultraturaxului (15000 rpm).

Concentrația suspensiei apoase de magnetită a fost determinată prin uscarea la pond constant a unui volum cunoscut, valoarea obținută fiind de 5,7%.

6.1. Caracterizarea structurală a nanoparticulelor prin FT-IR

Spectrele FT-IR înregistrate pentru particulele polimere magnetice confirmă formarea structurii propuse prin prezența benzii de la $\nu = 1632,68 \text{ cm}^{-1}$ corespunzătoare vibrațiilor de întindere ale legăturii iminice —C=N— rezultată în urma reticulării covalente, și a benzii de absorbție de la $617,2 \text{ cm}^{-1}$ care este caracteristică reticulării ionice prin grupele sulfat (—SO_4^{2-}). Prezența materialului magnetic în structura nanoparticulelor compozite este argumentată prin apariția semnalului de la numărul de undă $585,37 \text{ cm}^{-1}$ corespunzător legăturilor Fe-O/Fe-O-Fe din magnetită (Fe_3O_4).[385]

6.2. Caracterizarea morfologică a nanoparticulelor

6.2.1. Caracterizare prin microscopie SEM și TEM

Reducerea gradului de funcționalizare a CS cu maltoză la 12% în cazul derivatului CSM0.7, a dus la morfologie îmbunătățită care poate fi observată în figura 87. Interpretarea microgرافیilor SEM ale nanoparticulelor polimere magnetice în acest caz a condus la următoarele concluzii:

- în cazul probei MG.3 pentru care raportul masic polimer/ Fe_3O_4 utilizat a fost de 1/1, iar concentrația soluției de polimer a fost de 0.5%, se observă apariția unor aglomerate în suprafața nanoparticulelor explicată prin prezența unei cantități însemnate de magnetită neinclusă în matricea polimeră, care destabilizează particulele. Acest comportament a fost intuit încă din etapele de spălare/purificare a nanoparticulelor compozite;
- scăderea cantității de Fe_3O_4 (prin creșterea raportului polimer/ Fe_3O_4) din particulele compozite a dus la obținerea unor nanoparticule bine individualizate, cu formă sferică bine conturată (cazul probelor MG.3.1 și MG.3.2);
- menținerea constantă a raportului polimer/ Fe_3O_4 și creșterea concentrației soluției de polimer de la 0.5% la 0.8% a dus la o creștere a diametrului mediu al nanoparticulelor de la 300-500 nm în cazul probei MG.3.1, la 700-1500 nm în cazul probei MG.3.2;
- la modificarea raportului polimer/ Fe_3O_4 de la 1/0.7 la 1/0.5 (în cazul probelor MG.3.1 și MG.3.4), nu se mai observă o diferență semnificativă pentru forma nanoparticulelor ci doar o scădere ușoară a diametrului mediu de la 300-500 la respectiv 200-400; efectul este determinat, evident, de volumul mai redus al magnetitei prezentă în compoziția nanoparticulelor.
- în cazul probelor MG.3.3, MG.3.4, menținerea constantă a raportului polimer/ Fe_3O_4 la 1/0.5 și diluarea soluției de polimer la 0.3% (MG.3.3) a dus la alterarea formei particulelor cu obținerea de aglomerate.

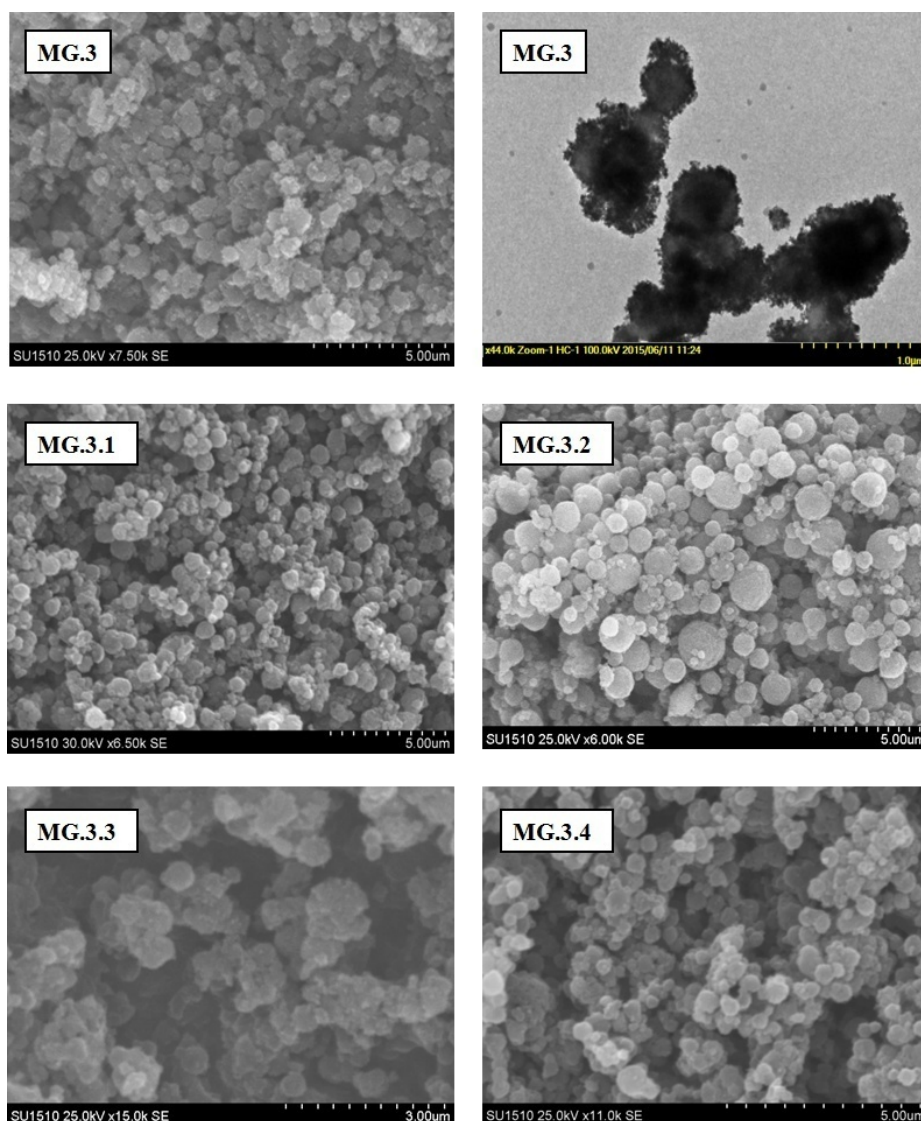


Figura 87. Imagini SEM pentru probele MG.3, MG.3.1, MG.2.2, MG.3.2, MG.3.3 și MG.3.4

6.2.2. Caracterizare prin microscopie de forță atomică

Pentru a pune în evidență o dată în plus înglobarea materialului magnetic în matricea polimeră, nanoparticulele hibride au fost analizate din punct de vedere morfologic și prin microscopie de forță atomică. Înregistrarea imaginilor topografice și de fază oferă informații asupra morfologiei de suprafață a materialului compozit iar criosecțiunile aduc dovezi asupra structurii interne. În scop ilustrativ s-a ales proba MG.3.1 care din analizele SEM a dovedit dimensiune optimă din punct de vedere al aplicației vizate. Analiza imaginilor stocate (fig. 88) a dus la următoarele concluzii:

- imaginea topografică (a) indică prezența unor particule cu formă sferică bine definită având diametrul mediu de aproximativ 450 nm, valoare în acord cu datele obținute prin SEM;

- contrastul de fază de la suprafața particulelor polimere, evidențiat în imaginea de fază (b), demonstrează existența unei fracții de material magnetic neinclus în nanoparticule, fixat în suprafața lor. Regiunile închise la culoare reprezintă particulele magnetice mult mai rigide decât polimerul.
- imaginile (c) și (d) reprezintă morfologia criosecțiunilor probei la rezoluția de $2 \times 2 \mu\text{m}$;
- imaginea de fază (d) obținută în paralel cu imaginea topografică (c) certifică apariția unui contrast de fază în particulele hibride. Faptul argumentează prezența materialului magnetic sub formă de aglomerate în interiorul matricei polimere. Din nou, regiunile de culoare închisă reprezintă materialul magnetic mai rigid decât polimerul.

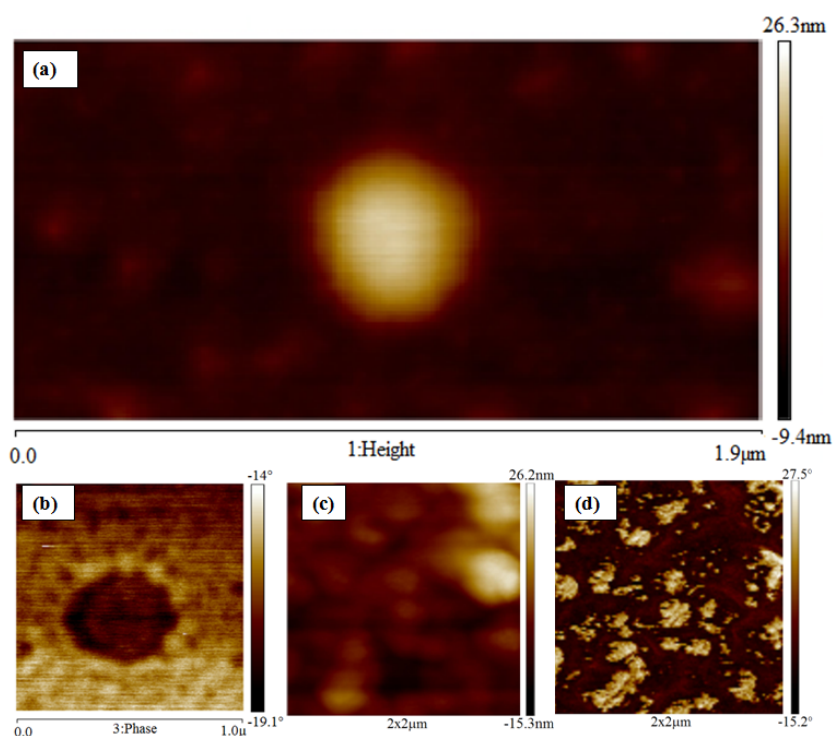


Figura 88. Imagini AFM ale probei MG.3.1; (a) imagine topografică; (b) imagine de fază; (c) criosecțiune topografică; (d) criosecțiune de fază;

6.3. Proprietăți fizico-chimice ale nanoparticulelor

6.3.1. Caracterizarea termică

Analiza termogravimetrică a nanoparticulelor polimere magnetice a fost realizată din două motive. În primul rând s-a dorit simularea procesului de sterilizare termică necesar în cazul materialelor cu aplicații biomedicale și în al doilea rând s-a dorit evaluarea conținutului de magnetită inclusă în matricea polimeră funcție de raportul polimer/magnetită utilizat în procesul de obținere. Comportarea termică în condiții izoterme a probelor a fost analizată în aer, prin menținerea

acestora la temperatură constantă, respectiv 120 °C timp de 40 de minute, pentru a simula modul în care se realizează sterilizarea materialelor. S-a continuat apoi încălzirea cu viteza de 10 °C/min până la 700 °C.

Pierderile procentuale de masă de la temperaturi mai mari de 120 °C au fost comparate în tabelul 24 cu cele obținute din curbele înregistrate în condiții dinamice în intervalul de temperatură 25 – 700 °C, cu viteza de 10 °C/min. S-au constatat variații ale procentului de masă pierdută în limita a $\pm 2\%$. Rezultatele obținute indică faptul că materialele analizate au o foarte bună stabilitate termică astfel încât pot fi supuse procesului de sterilizare în condiții de siguranță la temperatura de 120 °C timp de 40 minute.

Tabelul 24. Rezultatele testelor de rezistență termică în condiții izoterme și dinamice

Proba/Condiții	MG.3.1	MG.3.2	MG.3.3	MG.3.4
	Pierdere procentuală de masă la temperaturi mai mari de 120 °C			
10 °C/min (25 - 700 °C)	48.98	51.85	52.30	54.37
10 °C/min (25 - 120 °C) 40 min (120 °C) 10 °C/min (120 - 700 °C)	50.86	51.34	54.29	56.00
Reziduu* (%)	49,14	48,66	45,71	44

* Reziduu corespunde procesului de simulare a sterilizării termice.

În urma analizei termice (fig. 90) s-a observat că toate probele prezintă trei trepte de degradare, cantitatea de reziduu fiind cuprinsă între 46,28 – 53,91%. Prima treaptă de degradare decurge în intervalul 45,95 – 114,71 °C când se produce o pierdere de masă cuprinsă între 8,55 – 12,9% corespunzătoare eliminării apei puternic fixată în matricea polimeră și a compușilor volatili din particule. A doua treaptă are loc în intervalul 212,4 - 289 °C fiind însoțită de pierderi de masă de 13,21 – 16,27%, ce caracterizează începutul degradării inelelor zaharidice din catena de baza a derivatului de CS. Principala etapă de degradare, a treia, are loc în intervalul 274,8 – 451,35 °C, cu maxime ale pierderilor de masă (22,62 – 28,11%) corespunzătoare degradării matricii polimere.

Se poate observa că masa de reziduu variază conform așteptărilor: cu cât raportul polimer/ Fe_3O_4 utilizat în sinteză este mai mic (cantitatea de Fe_3O_4 crește), cu atât reziduul la degradare este mai mare (MG.3.1 și MG.3.2). Creșterea concentrației soluției de polimer (cu menținerea aceleiași cantități de magnetită) a dus la includerea unei mase mai mari de magnetită în picăturile de o vâscozitate și deci dimensiune mai mare formate în etapa de emulsionare a fazelor și stabilizare prin reticulare ionică (MG.3.2. și MG.3.4).

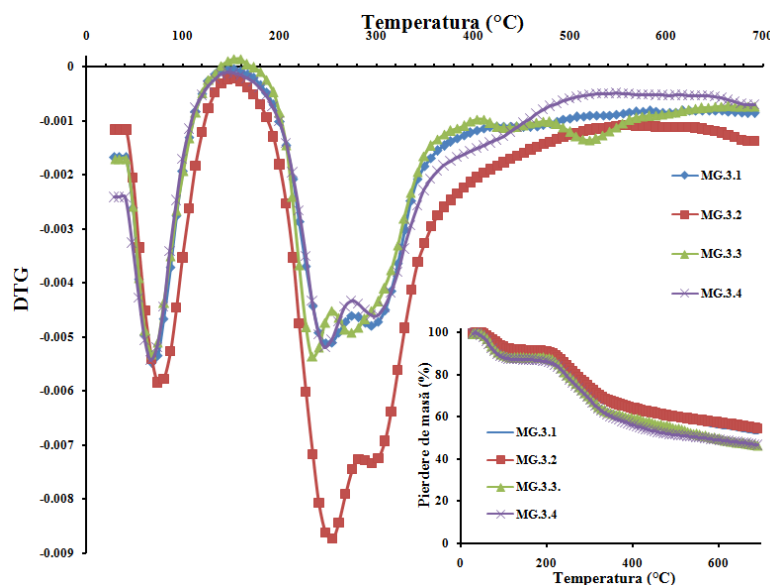


Figura 90. Curbele TG și DTG ale nanoparticulelor polimerice magnetice MG.3.1, MG.3.2, MG.3.3 și MG.3.4

6.3.2. Proprietăți magnetice

În figura 91 sunt reprezentate curbele de magnetizație ale magnetitei simple precum și ale probelor MG.3, MG.3.1 și MG.3.3, determinate prin VSM la temperatura camerei. După cum se poate observa, în toate cele patru cazuri curbele de magnetizație nu prezintă histerezis la aplicarea unui câmp magnetic exterior. Atât coercitivitatea (H_c) cât și remanența (M_r) sunt zero, fapt ce demonstrează superparamagnetismul nanoparticulelor.[386] Determinând valorile magnetizațiilor de saturație (M_s) pentru fiecare probă, se înregistrează $M_s = 65.6$ emu/g pentru Fe_3O_4 , $M_s = 29.32$ emu/g pentru proba MG.3, și valorile 22 emu/g și 20 emu/g pentru MG.3.1 respectiv MG.3.3. Analiza comparativă a valorilor magnetizației de saturație argumentează o dată în plus faptul că matricea polimeră a înglobat cu succes materialul magnetic. Se poate observa că valoarea cea mai ridicată a magnetizației este înregistrată pentru magnetita simplă, aceasta scăzând odată cu creșterea raportului polimer/ Fe_3O_4 (de la 1/1 în cazul probei MG.3, la 1/0.5 în cazul probei MG.3.3) utilizat în protocolul de obținere.

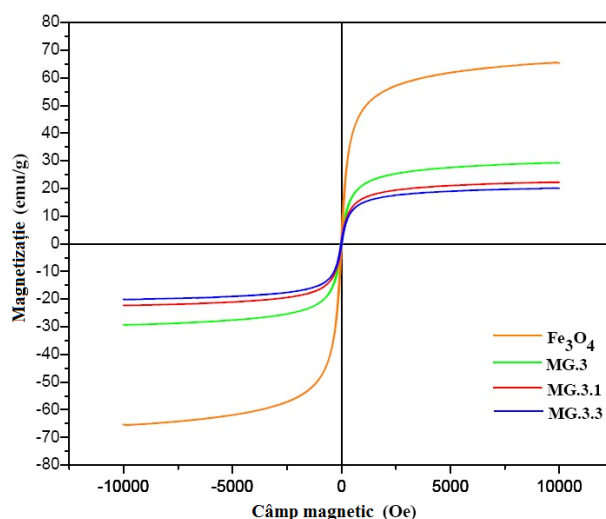


Figura 91. Curbele de magnetizație ale magnetitei și probelor MG.3, MG.3.1 și MG.3.3

6.3.3. Determinarea stabilității suspensiilor apoase de nanoparticule

Deoarece una din motivațiile modificării chitosanului cu maltoză a fost aceea de a-i crește hidrofilia, și de aici stabilitatea nanoparticulelor obținute din acestea (prezentând în suprafața lor segmentele hidrofile de dizaharidă) în medii apoase, s-a considerat importantă determinarea potențialului Zeta al suporturilor hibride preparate. Astfel, valorile înregistrate pentru două probe selectate din punct de vedere al caracteristicilor morfologice favorabile sunt prezentate în tabelul următor:

Tabelul 26. Valorile potențialului ζ al probelor MG.3.1 și MG.3.2.

Proba	Potențial Zeta (mV)
MG.3.1	- 52,43
MG.3.2	- 54,56

Valoarea absolută ridicată a potențialului ζ (cuprinsă între ± 40 și ± 60 mV) situează nanoparticulele analizate în categoria celor cu stabilitate bună,[373] demonstrând ipoteza inițială.

6.4. Caracteristici de biomaterial

6.4.1. Citotoxicitate

Testele de evaluare a viabilității celulare au fost realizate pe probele MG.3.1, MG.3.2, MG.3.3 și MG.3.4 utilizând celule fibroblaste. Exemplificarea comportamentului celulelor în prezența suporturilor nanoparticulate compozite este realizată pentru proba MG.3.1 în figura 94.

Valorile viabilității celulare înregistrate pentru cele două concentrații--care încadrează suporturile analizate în categoria celor cu toxicitate scăzută--sunt evidențiate în figura 94.[356]

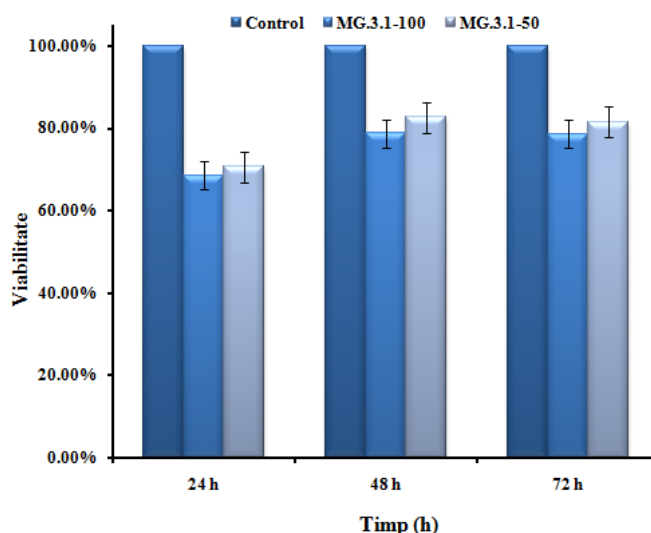


Figura 94. Viabilitatea celulară a fibroblastelor în prezența probei MG.3.1 înregistrată la 24, 48 și 72h

6.4.2. Hemocompatibilitate

Deoarece se dorește administrarea prin injecție a nanoparticulelor sub formă de suspensie în ser fiziologic, cunoșterea modului de interacțiune al acestora cu entitățile biologice componente ale sângelui este necesară pentru a evita apariția reacțiilor secundare precum hemoliza. Astfel, a fost evaluat potențialul hemolitic al probelor MG.3.1, MG.3.2, MG.3.3 și MG.3.4, valorile rezultatelor obținute dovedindu-se a fi similare pentru toate probele analizate, nemanifestând diferențe semnificative. S-a ales în mod aleator pentru reprezentarea rezultatelor proba MG.3.1 al cărei potențial hemolitic determinat spectrofotometric, evaluat pentru concentrații cuprinse între 100 și 400 $\mu\text{g/mL}$, este prezentat în figura 95. Rezultatele reprezintă media a trei determinări diferite pentru fiecare concentrație.

Se constată că procentul hemolitic crește odată cu creșterea concentrației de nanoparticule. Cu toate acestea, valoarea procentului este mai mică de 5% pentru toate concentrațiile testate (100, 200 și 400 $\mu\text{g/mL}$) și toți timpii de analizat. Nanoparticulele magnetice prezintă un procent de hemoliză apropiat de limita de 5%, pe care însă nu o depășesc. Rezultatele sugerează astfel că proba MG.3.1 este potrivită administrării prin injecție intravenoasă dacă concentrația în sânge nu depășește 400 $\mu\text{g/mL}$.

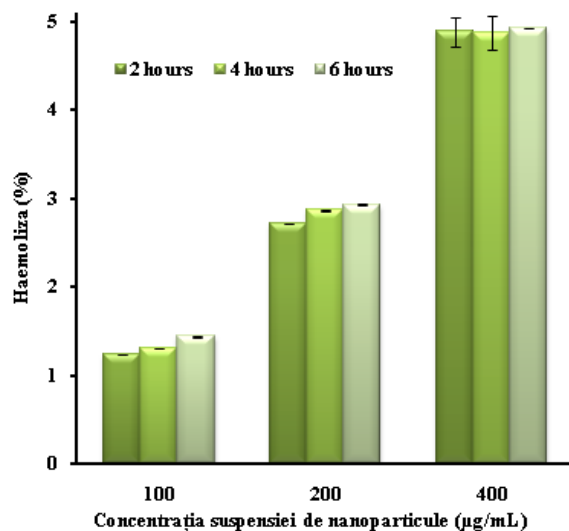


Figura 95. Procentul de hemoliză după 2, 4 și 6 ore de la expunerea în prezența nanoparticulelor de tip MG.3.1

6.5. Capacitatea de includere/eliberare a 5-fluorouracilului

6.5.1. Cinetica de includere a 5-fluorouracilului

Pentru studiul comportamentului la încărcare cu principiu activ a suporturilor polimere magnetice oținute a fost ales ca medicament antitumoral model 5-Fluorouracilul (5-FU).

S-a dovedit că procesul de încărcare a particulelor cu 5-FU în mediu apos urmează coportamentul probelor la umflare, cantitatea de medicament reținută de particule depinzând de raportul polimer/magnetită utilizat. S-a determinat astfel ca probele analizate (MG.3.1, MG.3.2, MG.3.3, MG.3.4) au reținut după 24 de ore între 46,5-72,6 mg 5-FU/g nanoparticule.

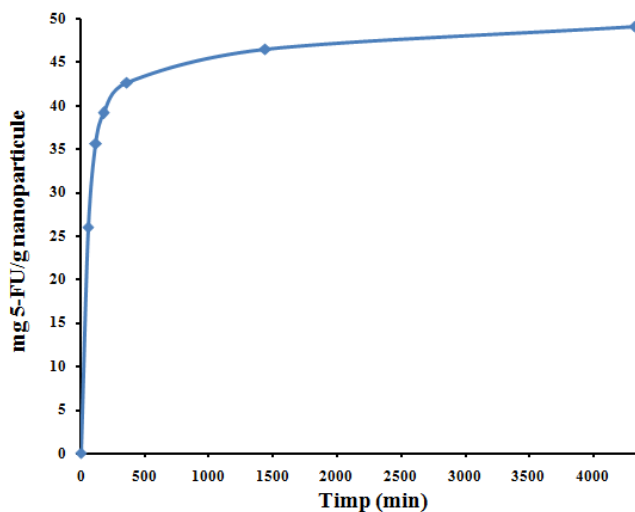


Figura 96. cinetica de încărcare a 5-FU în particulele de tip MG.3.1 în apă bidistilată

Figura 96 prezintă cinetica de încărcare a probei MG.3.1 (selectată aleator) până la 72 ore când este atins maximul cantității de medicament înglobat, respectiv 49,12 mg 5-FU/g nanoparticule.

6.5.2. Cinetica de eliberare a 5-fluorouracilului

Pentru a analiza capacitatea de eliberare a medicamentului din suportul polimeric, probele au fost supuse analizei în mediu de pH = 6,7 (similar zonelor tumorale) la temperatura de 37 °C.

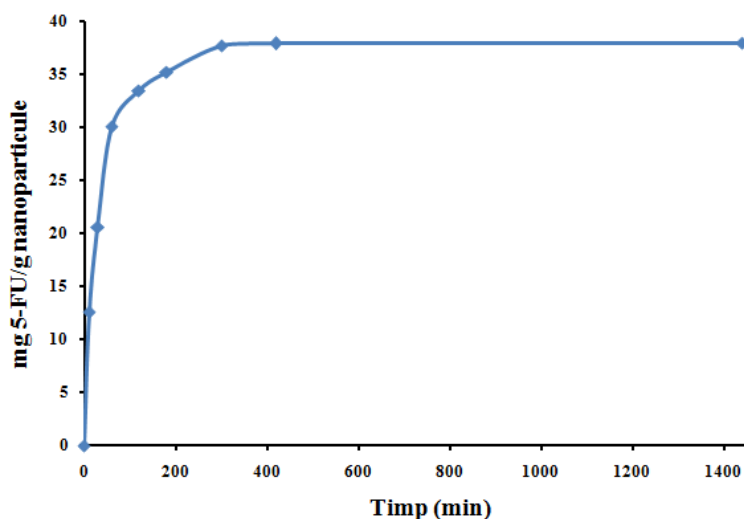


Figura 97. Cinetica de eliberare a 5-FU din particulele de tip MG.3.1 în tampon fosfat, pH = 6.7, T = 37 °C

În ceea ce privește procesul de eliberare a substanței active din particulele hibride (fig. 95), se constată o primă fază rapidă în primele 300 minute “burst effect” explicată prin eliberarea medicamentului adsorbit în suprafața și absorbit în straturile superficiale ale particulelor, urmată de o fază lentă (caracterizată de o eliberare constantă) până la 1440 minute când atinge maximul eliberat, de 81,14% din cantitatea reținută.

Analiza cineticii de eliberare a fost realizată pe baza modelului matematic Korsmeyer-Peppas. În urma prelucrării datelor cineticii de eliberare, s-a obținut ecuația:

$$y = 0,408x - 0,985,$$

din care s-au determinat parametrii $k = 0.103$, $n = 0.408$ și $R^2 = 0.966$.

Valoarea exponentului n ce caracterizează mecanismul de eliberare, destul de apropiată de 0,5, indică un mecanism de transport/eliberare dominat, practic, de difuzie.[362,363]

Concluzii generale

Teza de doctorat a avut ca obiectiv principal obținerea unor noi suporturi polimere nanoparticulate, pe baza unor derivați de chitosan, cu rol de vectori în transportul la țintă a medicamentelor. Afecțiunile vizate în acest studiu au fost cancerul și infecțiile generate de bacteria *Escherichia coli* în sânge. În cazul cancerului au fost abordate două tehnici de direcționare activă, prima presupunând dirijarea nanoparticulelor prin intermediul acidului folic cu rol de ligand de direcționare recunoscut de receptorii membranari ai celulelor canceroase (ex. canecul ovarian), în timp ce a doua tehnică a presupus dirijarea nanoparticulelor polimere magnetice prin intermediul unui câmp magnetic exterior până la zona tumorii. În cazul infecției bacteriene, transportul sistemelor nanoparticulate a fost proiectat a fi realizat prin intermediul fragmentelor de maltoză de la suprafața vectorilor, capabile de a lega o proteină membranară specifică celulelor țintă.

Modificarea chimică a chitosanului cu acid folic și maltoză s-a realizat prin reacții chimice la gupele aminice primare ale polizaharidei formând compuși cu noi proprietăți care au stat la baza obținerii suporturilor polimere ulterioare.

Tehnica aplicată în prepararea noilor nanoparticule a fost emulsia inversă cu dublă reticulare - ionică și covalentă. Reticularea majoritară, cea ionică, a permis menținerea caracterului biocompatibil al particulelor în timp ce reticularea covalentă, în proporție mult mai redusă, a asigurat stabilitatea mecanică necesară.

Contribuțiile proprii ale lucrării, structurate în patru capitole, au dus la formularea unui set de concluzii după cum urmează:

1. S-au obținut doi derivați de chitosan prin modificarea chimică a acestuia cu acid folic și maltoză în diverse rapoarte molare.

- analiza structurală a derivaților CS-FA prin spectroscopie FT-IR a indicat legarea chimică a acidului pe lanțurile polizaharidei argumentată de deplasarea benzilor de absorbție caracteristice chitosanului și, de asemenea de apariția unor noi (aspect mult mai bine evidențiat în cazul raportului molar CS/FA = 1/1).
- caracterizarea derivaților prin spectroscopie ^1H RMN a relevat prezența acidului folic în structura noului compus prin apariția peakurilor specifice protonilor inelelor aromatice, care lipsesc în structura chitosanului nativ.
- analiza spectrală UV-VIS a permis determinarea gradului de funcționalizarea a derivaților sintetizați, observându-se creșterea acestuia odată cu scăderea raportului molar CS/FA.

- dovadă indirectă a transformării chitosanului a fost adusă de spectroscopia de raze X, care evidențiază în difractogramele compușilor ușoare deplasări ale peakurilor de maximă intensitate precum și modificarea raportului acestora.
- în cazul derivaților de chitosan cu maltoză, spectroscopia FT-IR aduce dovezi clare asupra funcționalizării prin lărgirea benzii de absorbție din intervalul $3300\text{--}3600\text{ cm}^{-1}$ justificată de aportul crescut de grupe --OH din maltoză implicate în multiple legături de H.
- în plus, spre deosebire de spectrul CS simplu, în spectrul derivaților apar deplasări ale benzilor de absorbție.
- spectroscopia ^1H RMN a permis calculul gradului de funcționalizare al produșilor preparați, acesta dovedindu-se dependent de raportul molar $\text{--NH}_2/\text{maltoză}$.

2. S-au obținut 6 tipuri de nanoparticule polimere pe baza derivaților CS-FA prin metoda emulsiei inverse cu dublă reticulare. Reticularea majoritară a fost cea ionică realizată între grupele aminice libere ale derivatului și ionii sulfat din Na_2SO_4 în timp ce reticularea covalentă (cu rol de stabilizare mecanică) a avut loc prin intermediul aldehidei glutarice.

- caracterizarea structurală prin spectroscopie FT-IR a nanoparticulelor a pus în evidență realizarea celor două tipuri de reticulare prin prezența benzilor de absorbție caracteristice fiecăreia.
- caracterizarea morfologică prin microscopie electronică de baleiaj confirmă obținerea unor particule cu formă sferică și dimensiuni submicronice, potrivite aplicației vizate.
- difractometria cu radiație laser pe probele $C_1 - D_1$ a evidențiat aspectul monomodal al curbelor de distribuție granulometrică, cu polidispersitate relativ îngustă și diametrul mediu al nanoparticulelor cuprins între $100 - 300\text{ nm}$, rezultate în acord cu cele înregistrate prin microscopie electronică.
- stabilitatea suspensiilor apoase de nanoparticule, importantă pentru potențiala lor administrare injectabilă, a fost studiată prin determinarea potențialului ζ ale cărui valori încadrează nanoparticulele în categoria coloizilor cu instabilitate incipientă; se constată că stabilitatea suspensiilor crește (valoarea absolută a potențialul Zeta crește) cu cât cantitatea de reticulant este mai mică, deoarece rămân mai multe grupe aminice libere ce determină forțe de respingere mai intense între particule.
- testul de viabilitate celulară exemplificat pe probele C_5 și C_1 demonstrează lipsa de toxicitate a nanoparticulelor.

- rezultatele testelor de hemoliză pe nanoparticulele de tip C_1 și C_3 au dovedit că acestea sunt potrivite pentru administrarea sistemică atât timp cât concentrația lor în sânge este mai mică de 200 $\mu\text{g/mL}$.
- analiza citofluorimetrică a demonstrat capacitatea mai ridicată a nanoparticulelor pe bază de chitosan funcționalizat cu acid folic de orientare și fixare la peretele celulelor tumorale de tip A549.
- nanoparticulele obținute s-au dovedit a avea capacitate de reținere a 5-FU prin proces difuzional.
- modelarea matematică a datelor cinetice de eliberare a permis calculul exponentului difuzional n a cărui valoare indică un transport al medicamentului guvernat atât de difuzie cât și de umflare.

3. S-au preparat 5 tipuri de nanoparticule pe bază de chitosan modificat cu maltoză prin procedeul emulsiei inverse cu dublă reticulare, utilizându-se aceiași reticulanți ca în cazul anterior.

- analiza structurală FT-IR a pus în evidență realizarea cu succes a celor două tipuri de reticulare prin apariția de noi benzi de absorbție caracteristice.
- analiza SEM a nanoparticulelor a demonstrat influența raportului polimer/reticulant și a timpilor de reticulare asupra caracteristicilor morfologice.
- microscopia de forță atomică a validat datele obținute din SEM cu privire la forma și dimensiunea medie a particulelor.
- curbele diferențiale de distribuție granulometrică, monomodale, sunt în acord cu dimensiunea particulelor evaluată prin microscopie atomică, scoțând în evidență influența concentrației soluției de polimer.
- valoarea absolută ridicată a potențialului Zeta înregistrat pentru proba CM3 duce la concluzia că ipoteza inițială legată de îmbunătățirea stabilității particulelor obținute din polimeri cu hidrofilie crescută, este valabilă.
- rezultatele testului de hemocompatibilitate sugerează că nanoparticulele sunt utilizabile pentru administrări intravenoase atunci când concentrația în sânge nu depășește 400 $\mu\text{g/mL}$.
- nanoparticulele prezintă capacitate bună de încărcare a levofloxacinului prin difuzie, cantitatea reținută fiind dependentă de concentrația soluției de polimer utilizată în protocolul de obținere a sportului.

- studiul influenței concentrației de medicament a demonstrat că odată cu creșterea concentrației soluției de medicament, crește și cantitatea reținută de suport, consecință evidentă a unui comportament fickian.
- modul de eliberare a medicamentului din suporturi este caracteristic sistemelor difuzionale implicând un “burst effect” inițial urmat de o eliberare pe parcursul a 24 ore, sugerând potențiale aplicații ale sistemelor în transportul medicamentelor în cazul infecțiilor cu *E. coli* în sânge.

4. Au fost obținute 5 tipuri de nanoparticule polimere magnetice pe bază de magnetită și chitosan modificat cu maltoză prin procedeul emulsiei inverse cu dublă reticulare descris anterior, pentru transportul dirijat al medicamentelor antitumorale în terapia cancerului.

- prin spectroscopia de absorbție FT-IR au fost evidențiate, prin apariția benzilor caracteristice, cele două tipuri de reticulări precum și prezența materialului magnetic în structura rețelei polimere.
- caracterizarea morfologică prin microscopie SEM a demonstrat ineficiența utilizării derivaților de chitosan-maltoză cu grad de funcționalizare ridicat ($> 12\%$) determinată de volumul mare al substituentului care implică împiedicări sterice ce nu permit reticularea.
- microscopia de forță atomică a pus în evidență, prin criosecțiunile topografică și de fază, includerea materialului magnetic în rețeaua reticulată a nanoparticulelor.
- simularea procesului termic de sterilizare a nanoparticulelor a dovedit buna stabilitate termică a suporturilor.
- curbele de magnetizație înregistrate prin VSM pentru particulele analizate demonstrează includerea materialului magnetic în matricea polimeră și superparamagnetismul nanoparticulelor hibride, prin valorile nule ale H_r și H_c .
- valorile absolute ridicate ale potențialului ζ indică o stabilitate bună a suspensiilor apoase de nanoparticule.
- testul de citotoxicitate încadrează nanoparticulele în categoria celor cu toxicitate scăzută.
- procentul hemolitic inferior valorii de 5% recomandă utilizarea intravenoasă a suspensiilor de nanoparticule atunci când concentrația în sânge nu depășește 400 $\mu\text{g/mL}$.
- suporturile prezintă capacitate de a reține și elibera susținut 5-FU, valoarea exponentului n sugerând un transport dominat de procese de difuzie și, recomandând sistemele pentru posibile aplicații în terapia țintită a cancerului.

5. Rezultatele obținute argumentează faptul că obiectivele tezei de doctorat au fost îndeplinite și că nanosistemele realizate au potențial de utilizare în terapia țintită a unor afecțiuni de natură cancerigenă sau determinate de infecții cu *E. coli*. Se impune, desigur, în viitor realizarea testelor *in vitro* a acestora și ulterior a screeningului de laborator și a pacienților umani pentru validarea lor.

Bibliografie selectivă

[49] Y. Zhong, F. Meng, C. Deng, Z. Zhong, "Ligand-directed active tumor-targeting polymeric nanoparticles for cancer chemotherapy," *Biomacromolecules*, vol. 15, no. 6, pp. 1955–1969, 2014.

[94] D. J.A. Crommelin, W. E. Hennink, G. Storm, "Drug targeting systems and applications to parenteral drug delivery," in *Drug delivery and targeting for pharmacists and pharmaceutical scientist*, A. M. Hillery, A.W. Lloyd, J. Swarbrick, Eds.: Taylor and Francis, 2005, pp. 105-130.

[134] M. Guan, Y. Zhou, Q. L. Zhu, Y. Liu, et al., "N-trimethyl chitosan nanoparticle-encapsulated lactosyl-norcantharidin for liver cancer therapy with high targeting efficacy," *Nanomedicine*, vol. 8, no. 7, pp. 1172–1181, 2012.

[159] J. R. Joshi, R. P. Patel, "Role of biodegradable polymers in drug delivery," *Int J Curr Pharm Res*, vol. 4, no. 4, pp. 74-81, 2012.

[183] A. C. Fonseca, P. Ferreira, R. A. Cordeiro, P. V. Mendonça, et al., "Drug delivery systems for predictive medicine: Polymers as tools for advanced application," in *New strategies to advance pre/diabetes care: integrative approach by PPPM*, Mahmood S. Mozaffari, Ed.: Springer, 2013, pp. 399-455.

[218] A. Hervaultab, N. T. K. Thanh, "Magnetic nanoparticle-based therapeutic agents for thermochemotherapy treatment of cancer," *Nanoscale*, vol. 6, no. 20, pp. 11553-11573, 2014.

[257] N. Kamaly, B. Yameen, J. Wu, O. C. Farokhzad, "Degradable controlled-release polymers and polymeric nanoparticles: mechanisms of controlling drug release," *Chem Rev*, vol. 116, no. 4, pp. 2602–2663, 2015.

[275] R. Subbiah, M. Veerapandian, K. S. Yun, "Nanoparticles: functionalization and multifunctional applications in biomedical sciences," *Curr Med Chem*, vol. 17, no. 36, pp. 4559-4577, 2010.

- [293] C. Muller, R. Schibli, "Folic acid conjugates for nuclear imaging of folate receptor–positive cancer," *J Nucl Med*, vol. 52, no. 1, pp. 1–4, 2011.
- [311] Y. Zambito, "Nanoparticles based on chitosan derivatives," in *Advances in biomaterials science and biomedical applications*, Rosario Pignatello, Ed.: InTech, 2013, ch. 9, pp. 243–263.
- [346] M. D. Blanco, C. Teijón, R. M. Olmo, J. M. Teijón, "Targeted nanoparticles for cancer therapy," in *Recent advances in novel drug carrier systems*, Ali Demir Sezer, Ed.: InTech, 2012, ch. 9, pp. 241–278.
- [383] J. Chomoucka, J. Drbohlavova, D. Huska, V. Adam, et al., "Magnetic nanoparticles and targeted drug delivering," *Pharmacological Research*, vol. 62, no. 2, pp. 144–149, 2010.

Valorificarea rezultatelor

- **Articole apărute în reviste cotate ISI**

“Carbohydrate Based Nanoparticles for Drug Delivery Across Biological Barriers”

Catalina Anisoara Peptu, Lacramioara Ochiuz, Liana Alupei, Cristian Peptu, and Marcel Popa

- **Articole trimise spre publicare în reviste cotate ISI**

“New folic acid-chitosan derivatives based nanoparticles – Potential applications in cancer therapy”

Liana Alupei, Gabriela Lisa, Andreea Butnariu, Jacques Desbrieres, Anca Niculina Cadinoiu, Catalina Anisoara Peptu, Gabriela Calin, Marcel Popa

“New hybrid magnetic nanoparticles based on chitosan-maltose derivative for antitumor drug delivery

Liana Alupei, Catalina Anisoara Peptu, Andreea-Maria Lungan, Jacques Desbrieres, Ovidiu Chiscan, Sadia Radji, Marcel Popa

- **1 articol în curs de redactare**
- **Participări la manifestări naționale și internaționale**
 - Comunicări orale

“Nanoparticule pe bază de chitosan modificat – vectori pentru medicamente”

Liana Alupei, Marcel Popa

Congresul Internațional “PREGĂTIM VIITORUL PROMOVÂND EXCELENȚA”, 26 februarie – 1 martie 2015, Iași.

“Noi particule polimere magnetice pentru transportul dirijat al medicamentelor antitumorale”

Liana Alupei, Gabriela Călin, Cătălina Anișoara Peptu, Marcel Popa.

Congresul Internațional “PREGĂTIM VIITORUL PROMOVÂND EXCELENȚA”, 3 – 5 martie 2016, Iași.

- Poster

”Dérivés de chitosane pour cibler des nanoparticules vers les cellules cancéreuses

L. Alupei, M. Popa, J. Desbrieres

XIème Colloque Franco-Roumain sur les Polymères, Pitești, 27–29 août 2014

“ Fluorescent carbon dots embedded in chitosan nanoparticles for medical imaging ”

L. Alupei, C.S. Stan, M. Popa, C. A. Peptu.

2nd International Conference on Chemical Engineering, Iași, November 5-8, 2014.