

**UNIVERSITATEA TEHNICĂ “GHEORGHE ASACHI” DIN IAȘI
FACULTATEA DE INGINERIE CHIMICĂ ȘI PROTECȚIA MEDIULUI
în cotutelă cu
UNIVERSITATEA “ALEXANDRU IOAN CUZA” DIN IAȘI
FACULTATEA DE CHIMIE**



Andor Toni CIGU

**NANOCAPSULE ȘI NANOPARTICULE POLIMERE,
TRANSPORTATORI DE COMPUȘI BIOLOGICI CU APLICAȚII ÎN
STOMATOLOGIE
Rezumatul tezei de doctorat**

Conducători de doctorat:

Prof. univ. *em. dr. ing. dr. h. c.* **Marcel POPA**

Prof. univ. *em. dr.* **Valeriu ȘUNEL**

**IAȘI
2017**

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

Către _____

Vă facem cunoscut că în ziua de 3 aprilie 2017 la ora 10.00, în Sala de Consiliu a Facultății de Inginerie Chimică și Protecția Mediului va avea loc susținerea publică a tezei de doctorat intitulată:

**NANOCAPSULE ȘI NANOPARTICULE POLIMERE, TRANSPORTATORI DE
COMPUȘI BIOLOGICI CU APLICAȚII ÎN STOMATOLOGIE**

elaborată de domnul **Cigu Andor Toni** în vederea conferirii titlului științific de doctor.

Comisia de doctorat este alcătuită din:

- | | |
|--|---|
| 1. MĂLUȚAN Teodor , Prof. univ. dr. ing.,
Universitatea Tehnică "Gheorghe Asachi" din Iași | <i>Președinte</i> |
| 2. POPA Marcel , Prof. univ. em. dr. ing. dr. h. c.,
Universitatea Tehnică "Gheorghe Asachi" din Iași | <i>Conducător de doctorat</i> |
| 3. ȘUNEL Valeriu , Prof. univ. em. dr., Universitatea
"Alexandru Ioan Cuza" din Iași | <i>Conducător de doctorat în
cotutelă</i> |
| 4. DESBRIÈRES Jacques , Prof. univ. dr. ing. dr. h. c.,
Université de Pau des Pays de l'Adour, Franța | <i>Referent oficial</i> |
| 5. BÂRSĂ Mihail-Lucian , Prof. univ. dr., Universitatea
"Alexandru Ioan Cuza" din Iași | <i>Referent oficial</i> |
| 6. OCHIUZ Lăcrămioara , Conf. univ. dr. farm.,
Universitatea de Medicină și Farmacie "Grigore T.
Popa" din Iași | <i>Referent oficial</i> |

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

RECTOR
Prof. univ. dr. ing. **DAN CAȘCAVAL**



Secretar Universitate,
Ing. Cristina Nagîț

Mulțumiri

La finalul acestei etape de pregătire științifică dedic această teză și doresc să adresez mulțumiri tuturor persoanelor care mi-au fost aproape.

*Cu deosebită recunoștință și alese sentimente de considerație, doresc să mulțumesc coordonatorului științific al lucrării, domnului profesor univ. em. dr. ing. dr. h. c. **Marcel POPA**, pentru încrederea acordată prin faptul că m-a acceptat ca doctorand, pentru îndrumarea competentă și de înaltă ținută morală și științifică, pentru sugestiile și indicațiile prețioase fără de care această lucrare nu s-ar fi realizat și pentru faptul că mi-a fost, cu atâta răbdare și entuziasm molipsitor, conducător de doctorat.*

*În egală măsură, cu deosebită recunoștință și alese sentimente de considerație doresc să mulțumesc domnului profesor univ. em. dr. **Valeriu ȘUNEL**, conducător științific în cotutelă pentru încrederea pe care a avut-o în mine, pentru modelul de conduită morală și științifică, pentru sfaturile și sprijinul științific acordat, pentru îndrumarea pe toată perioada pregătirii mele din cadrul studiilor doctorale și pentru contribuția pe care a adus-o la formarea mea profesională.*

*Mulțumesc în mod special **Membrilor comisiei** care m-au onorat cu acceptarea propunerii de a-mi analiza și aprecia conținutul tezei de doctorat, manifestând interes și competență pentru subiectul abordat.*

*În mod special aduc mulțumiri d-nei șef. lucrări dr. **Corina Cheptea**, de la Universitatea de Medicină și Farmacie "Grigore T. Popa" din Iași, d-nei C.S. dr. ing. **Silvia Vasiliu**, de la Institutul de Chimie Macromoleculară "Petru Poni" din Iași pentru colaborarea la articolele realizate.*

De asemenea, dar nu în ultimul rând, mulțumesc familiei, tuturor prietenilor și colegilor care m-au sprijinit și susținut pe tot parcursul derulării stagiului de doctorat.

Mulțumesc lui Dumnezeu, că a făcut posibilă această clipă!

CUPRINS

INTRODUCERE	3
STUDIU BIBLIOGRAFIC	12
CAPITOLUL I. BOALA PARODONTALĂ – CONSIDERAȚII GENERALE	13
I.1. Aspecte introductive	3
I.2. Clasificarea bolilor parodontale	3
I.3. Factori favorizanți în apariția și evoluția bolii parodontale	5
I.3.1. Organisme asociate bolilor parodontale	5
I.3.2. Boli asociative care pot influența evoluția afecțiunii parodontale	7
I.4. Diferențe între parodontita marginală cronică și cea agresivă	9
I.4.1. Modificări legate de vârstă	9
I.4.2. Starea generală de sănătate ca indicator în parodontitele agresive sau cronice	20
I.4.3. Ritmul de evoluție în cele două tipuri de parodontite	20
I.5. Teste moderne de diagnostic al afecțiunii parodontale	21
I.5.1. Metoda culturilor bacteriene patogene	21
I.5.2. Tehnici folosind fragmente specifice de ADN	21
I.5.3. Examen radiologice	21
I.5.4. Testarea cu biomarkeri	23
I.6. Tehnici și tratament în patologia parodontală	24
I.6.1. Posibilități de control în inflamația parodontală	24
I.6.1.1. Agenți antiadezivi	24
I.6.1.2. Agenți antiseplici	25
I.6.1.3. Agenți antiinflamatori	25
I.6.1.3.1. Antioxidanți	26
I.6.1.3.2. Extracte botanice	26
I.6.2. Regenerarea țesutului moale și a țesutului dur	26
I.6.3. Tehnici moderne de modulare ale terapiilor și terapeuticele invazive	29
I.6.3.1. Sistemul medical ONE Plasma (One Plasma Medycal System)	29
I.6.3.2. Oxigenoterapia. Laserterapia și Ozonoterapia	30
I.6.3.3. Produse stomatologice inovative	31
CAPITOLUL II. ÎNDAZOLI	34
II.1. Metode de preparare	34
II.1.1. Folosind drept materie primă acidul o-hidrazinocinamic	34
II.1.2. Tratarea o-toluidinei cu acidul azotos	34
II.1.3. Tratarea clorurilor acide cu esterii ai acidului furan-2-carboxilic	35
II.1.4. Încălzirea fenilhidrazinei cu o-aminobenzaldehidă	35
II.1.5. Tratarea 2-fluoro-5-benzaldehidei cu hidrazină	36
II.1.6. Reacția dintre aldehida salicilică și hidrazină	36
II.1.7. Acțiunea hidrazinei asupra pentafluorobenzaldehidei	36
II.1.8. Tratarea acizilor aromatici halogenați cu clorură de tionil	37
II.1.9. Din baze Schiff și carbonat de sodiu	37
II.1.10. Din oxime și sulfocloruri	38
II.1.11. Din 2-clorobenzonitril și hidrazină	38
II.1.12. Tratarea acidului 2-cloro-5-nitrobenzoic cu hidrazină	39
II.1.13. Din imide ale acizilor carboxilici	39
II.1.14. Din azide prin transpoziție Curtius	40
II.1.15. Reacția ciclohexanonei cu formiatul de etil	40
II.2. Proprietăți	41

II.2.1. Tautomeria indazolului și a unor derivați	241
II.2.2. Reacții la ambele nuclee constituente ai structurii indazolului	243
II.2.2.1. Formarea de săruri cu acizi și baze	244
II.2.2.2. Hidrogenarea	244
II.2.2.3. Oxidarea	245
II.2.3. Reacții la grupa imino	246
II.2.3.1. Reacția cu halogeno-derivați alifatici	246
II.2.3.2. Reacția cu halogenuri și anhidride acide	247
II.2.3.3. Reacția cu epoxizi	247
II.2.3.4. Reacția de cianoetilare	248
II.2.3.6. Reacția cu fenilizocianat	249
II.2.3.7. Reacția cu monocloroacetatul de etil	249
II.2.3.8. Reacția cu formaldehida și amine secundare	249
II.2.3.9. Reacția cu derivați halogenați aromatici	250
II.2.4. Reacții în inelul aril	250
II.2.4.1. Substituția nucleofilă	250
II.2.4.2. Substituția electrofilă	251
II.2.4.2.1. Reacția de nitrare	251
II.2.4.2.2. Reacția de halogenare	251
II.2.4.2.3. Reacția de sulfonare	252
CAPITOLUL III. MICRO/NANOPARTICULE ȘI MICRO/NANOCAPSULE POLIMERE	253
III. 1. Generalități	253
III.2. Clasificarea sistemelor polimere particulare	254
III. 3. Metode de obținere a micro/nanoparticulelor polimere	259
III.3.1. Metode fizice	260
III.3.1.1. Extruderea	260
III.3.1.2. Pulverizare-uscare (spray-drying)	260
III.3.1.3. Pulverizare-congelare (spray-chilling) și pulverizare-răcire (spray cooling)	261
III.3.1.4. Procedul în pat fluidizat	261
III.3.1.5. Coacervarea soluțiilor de polimeri	262
III.3.2. Metode chimice de obținere a particulelor polimerice	263
III.3.2.1. Metode de obținere pornind de la monomeri	263
III.3.2.2. Metode de obținere pornind de la polimeri preformați	266
III.4. Aplicații biomedicale ale sistemelor micro/nanoparticulate	268
REZULTATE PROPRII	272
Obiectivele lucrării	273
CAPITOLUL IV. MATERIALE. TEHNICI DE SINTEZĂ. TEHNICI DE INVESTIGARE	275
IV.1. Materiale	275
IV.2. Tehnici de sinteză a principiilor biologice active	279
IV.2.1. Esterul etilic al acidului 5-nitroindazol-1-il-formic (I)	279
IV.2.2. 5-Nitro-1H-indazol-1-carbohidrazidă (II)	279
IV.2.3. 5-Nitro-N'-benziliden-1H-indazol-1-carbohidrazidă (III)	280
IV.2.4. 5-Nitro-N'-(2-nitrobenziliden)-1H-indazol-1-carbohidrazidă (IV)	280
IV.2.5. 5-Nitro-N'-(4-nitrobenziliden)-1H-indazol-1-carbohidrazidă (V)	280
IV.2.6. 5-Nitro-N'-(2-hidroxibenziliden)-1H-indazol-1-carbohidrazidă (VI)	281
IV.2.7. 5-Nitro-N-(4-oxo-2-feniltiazolidin-3-il)-1H-indazol-1-carboxamidă (VII)	281
IV.2.8. 5-Nitro-N-[4-oxo-2-(o-nitrofeniltiazolidin)-3-il]-1H-indazol-1-carboxamidă (VIII)	281
IV.2.9. 5-Nitro-N-[4-oxo-2-(p-nitrofeniltiazolidin)-3-il]-1H-indazol-1-carboxamidă (IX)	282
IV.2.10. 5-Nitro-N-[4-oxo-2-(o-hidroxifeniltiazolidin)-3-il]-1H-indazol-1-carboxamidă (X)	282

IV.2.11. Esterul metilic al acidului 4-(5'-nitroindazol-1'-il-sulfonil)-fenoxiacetic (XI).....	83
IV.2.12. Esterul metilic al acidului 2-cloro-4-(5'-nitroindazol-1'-il-sulfonil)-fenoxiacetic (XII).....	83
IV.2.13. Esterul metilic al acidului 2-metil-4-(5'-nitroindazol-1'-il-sulfonil)-fenoxiacetic (XIII).....	84
IV.2.14. Esterul metilic al acidului 2-metoxi-4-(5'-nitroindazol-1'-il-sulfonil)-fenoxiacetic (XIV).....	84
IV.2.15. 7-(5'-Nitroindazol-1'-il-acetamidil)-cefalosporină sodată (XV).....	84
IV.3. Tehnici de obținere a nanocapsulelor și microparticulelor.....	85
IV.3.1. Prepararea nanoparticulelor și nanocapsulelor de tip complex polielectrolitic.....	85
IV.3.2. Prepararea microparticulelor pe bază de glicidil metacrilat (tip G) și a microparticulelor pe bază de glicidil metacrilat și chitosan (tip C).....	86
IV.4. Tehnici de investigare.....	88
IV.4.1. Spectroscopie în infraroșu (FTIR).....	88
IV.4.2. Spectroscopie de rezonanță magnetică nucleară.....	89
IV.4.3. Analiză elementală cantitativă.....	89
IV.4.4. Determinarea punctelor de topire.....	89
IV.4.5. Caracterizarea dimensională a nanocapsulelor și nanocapsulelor.....	89
IV.4.6. Determinarea potențialului zeta.....	90
IV.4.7. Caracterizarea nanoparticulelor și nanocapsulelor prin microscopie electronică de baleiaj.....	91
IV.4.8. Analiza suprafeței particulelor prin AFM.....	92
IV.4.9. Determinarea suprafeței specifice (S _p).....	92
IV.4.10. Determinarea capacității de reținere a apei (gradul de umflare).....	93
IV.4.11. Determinarea conținutului de medicament imobilizat în nanoparticule și nanocapsule.....	93
IV.4.12. Studiul adsorbției 7-NAC în particule de tip G și C.....	94
IV.4.13. Cinetica eliberării in vitro a principiilor active sintetizate.....	96
IV.4.14. Cinetica eliberării in vitro a 7-NAC.....	98
IV.4.15. Determinarea toxicității acute a sistemelor conținând principii active sintetizate.....	98
IV.4.16. Determinarea activității antimicrobiene.....	99
CAPITOLUL V. SINTEZA UNOR NOI DERIVAȚI AI INDAZOLULUI.....	100
V.1. Sinteza și caracterizarea esterului etilic al acidului 5-nitroindazol-1-il-formic (I).....	100
V.2. Sinteza și caracterizarea 5-nitro-1 H-indazol-1-carbohidrazidei (II).....	103
V.3. Sinteza unor hidrazidone ale 5-nitro-1H-indazol-1-carbohidrazidei (III-VI).....	106
V.4. Sinteza unor 5-nitro-N-(4-oxo-2-ariltiazolidin-3-il)-1H-indazol-1-carboxamide (VII-X).....	117
V.5. Esteri metilici ai acizilor 4-(5'-nitroindazol-1'-il-sulfonil)-R-fenoxiacetici (XI-XIV).....	121
V.6. Sinteza unei cefalosporine β-lactamice derivată de la 5-nitroindazol (XV).....	126
CAPITOLUL VI. STUDIUL PROPRIETĂȚILOR BIOLOGICE ALE UNORA DINTRE DERIVAȚII INDAZOLICI SINTETIZAȚI.....	133
VI.1. Evaluarea toxicității compușilor (I – XV) folosind animale de experiență.....	133
VI.2. Activitatea antifungică a 5-nitro-N'-ariliden-1H-indazol-1-carbohidrazidelor (III – VI).....	134
VI.3. Activitatea antimicrobiană a derivaților de 5-nitro-N-(4-oxo-2-ariltiazolidin-3-il)-1H-indazol-1-carboxamidelor (VII – X) și a esterilor metilici ai acizilor 4-(5'-nitroindazol-1'-il-sulfonil)-R-fenoxiacetici (XI – XIV).....	137
VI.4. Activitatea antimicrobiană a 7-(5'-nitroindazol-1'-il-acetamidil)-cefalosporinei sodice (XV).....	139
CAPITOLUL VII. NANOPARTICULE ȘI NANOCAPSULE PE BAZĂ DE COMPLEXI POLIELECTROLITICI PURTĂTOARE DE NOI 5-NITROINDAZOL TIAZOLIDINE POTENȚIAL UTILIZABILE PENTRU TRATAREA UNOR INFECȚII ORALE.....	142
VII.1. Obținerea unor nanoparticule și nanocapsule pe bază de complex polielectrolitic.....	143
VII.2. Caracterizarea nanoparticulelor și nanocapsulelor pe bază de complex polielectrolitic.....	144
VII.2.1. Caracterizarea nanoparticulelor și nanocapsulelor din punct de vedere dimensional și morfologic.....	145
VII.2.2. Caracterizarea nanocapsulelor și nanocapsulelor din punct de vedere al stabilității în suspensii apoase.....	148

VII.2.3. Caracterizarea nanoparticulelor și nanocapsulelor din punct de vedere al capacității de a încărca principii active.....	149
VII.2.4. Caracterizarea sistemelor nanoparticulate din punct de vedere al toxicității.....	151
VII.2.5. Caracterizarea sistemelor nanoparticulate din punct de vedere al activității antibacteriene.....	152
CAPITOLUL VIII. MICROPARTICULE POLIMERICE POROASE ÎNCĂRCATE CU 7-(5'-NITROINDAZOL-1'-IL-ACETAMIDIL)-CEFALOSPORINĂ SODATĂ.....	158
VIII.1. Obținerea și caracterizarea sistemelor polimer-cefalosporine.....	160
VIII.1.1. Caracterizarea morfologică a microparticulelor.....	162
VIII.1.2. Studii de adsorbție a derivatului de cefalosporină (7-NAC).....	163
VIII.1.2.1. Influența concentrației soluției apoase de 7-NAC și a timpului de contact.....	164
VIII.1.2.2. Influența temperaturii.....	165
VIII.1.2.3. Influența pH-ului și a raportului microparticule:7-NAC asupra capacității de adsorbție a derivatului de cefalosporină.....	166
VIII.1.2.4. Influența raportului dintre GMA și reticulant și a naturii reticulantului asupra capacității de adsorbție a 7-NAC.....	168
VIII.1.3. Studii cinetice de adsorbție.....	170
VIII.1.3.1. Modelul Lagergren (Modelul cinetic de ordinul I).....	170
VIII.1.3.2. Modelul Ho (Modelul cinetic de ordinul II).....	172
VIII.1.3.3. Modelul difuziei intraparticulă Weber-Morris.....	174
VIII.1.4. Izotermele de adsorbție.....	177
VIII.1.4.1. Izoterme cu doi parametri.....	177
VIII.1.4.1.1. Izoterma Langmuir.....	177
VIII.1.4.1.2. Izoterma Freundlich.....	179
VIII.1.4.1.3. Izoterma Dubinin-Radushkevich.....	181
VIII.1.4.1.3. Izoterma Temkin.....	183
VIII.1.4.2. Izoterme cu trei parametri.....	185
VIII.1.4.2.1. Izoterma Sips.....	185
VIII.1.4.2.2. Izoterma Redlich-Peterson.....	187
VIII.1.4.2.3. Izoterma Khan.....	188
VIII.1.4.2.4. Izoterma Toth.....	190
VIII.1.5. Determinarea parametrilor termodinamici.....	192
VIII.1.6. Energia de activare.....	194
VIII.2. Studii de eliberare a derivatului de cefalosporină 7-NAC din microparticule poroase.....	195
VIII.2.1. Modelul Higuchi.....	197
VIII.2.2. Modelul Korsmeyer-Peppas.....	198
CONCLUZII.....	200
BIBLIOGRAFIE.....	206

INTRODUCERE

Parodontita constituie faza evolutivă și/sau complicația gingivitei, și afectează în prezent toate grupele de vârstă. În placa subgingivală au fost identificate peste 500 specii bacteriene care constituie o nișă ecologică complexă. Sub influența unor factori locali sau sistemici, unele bacterii din biofilmul dentar subgingival devin agenții etiologici primari ai bolii parodontale. Eșecul eliminării acestor bacterii este asociat cu progresia bolii și un răspuns slab la tratament. Astfel, agenții patogeni parodontali produc numeroși factori de virulență care facilitează colonizarea zonelor subgingivale și rezistență la mecanismele de apărare ale gazdei, conducând în final la distrugerea țesuturilor de susținere a dinților.

Având în vedere natura infecțioasă a parodontitei și a limitelor terapiei mecanice, folosirea anumitor compuși cu activitate biologică și în special a antibioticelor este justificată în anumite forme de boală. Terapia medicamentoasă clasică se dovedește însă adeseori ineficientă în cazul bolilor sistemului stomatognat, și în special al bolii parodontale (parodontopatia) din cauza distribuției nediscriminatorii a principiului biologic activ, toxicității sistemice ridicate (îndeosebi în cazul antitumoralelor), hidrofobității crescute sau permeabilității slabe a țesuturilor. O cale de a elimina sau diminua aceste efecte adverse o constituie administrarea țintită, locală adeseori, utilizând formulări complexe capabile să asigure o eliberare controlată și prelungită (spre exemplu, la joncțiunile dentogingivale). Studiile recente sunt orientate către înglobarea principiilor active în micro/nanostructuri polimere. Comparativ cu alți coloizi utilizați în aplicații stomatologice, astfel de transportatori de medicamente prezintă o serie de avantaje: stabilitate mai bună în fluidele biologice, stabilitate ridicată la stocare timp îndelungat, preparare facilă prin tehnici foarte variate, producere relativ ușoară la scară chiar industrială, bună reproductibilitate, bun control al cantității de medicament încapsulat, eliberare controlată a principiului activ inclus sau încapsulat.

Motivația alegerii acestei teme de cercetare rezidă din necesitatea de a realiza noi formulări – constând pe de o parte în noi compuși cu activitate antibacteriană și pe de altă parte în asocierea lor cu transportori micro/nanoparticuli de natură polimeră – cu potențiale aplicații în tratarea bolii parodontale, care să diminueze riscul unor efecte secundare nedorite, constituind o alternativă la tratamentul antibacterian al cavității orale, având ca efect prevenirea sau ameliorarea semnificativă a bolii parodontale.

În prezenta teză de doctorat sunt expuse, în consecință, cercetările întreprinse de autor în scopul sintezei și caracterizării unor noi derivați cu structură indazolică, studiul proprietăților lor biologice, realizarea unor noi formulări pe baza acestor principii active constând în includerea/încapsularea în micro/nanostructuri polimere, cu potențiale aplicații în stomatologie. Este vizată astfel evitarea, întârzierea sau chiar eliminarea procesului de degradare de natură patologică a țesuturilor organice din cavitatea orală afectate de paradontoză (îndeosebi a celor moi) și chiar refacerea acestora.

Teza este organizată în opt capitole, îmbinând studiul bibliografic reprezentat de primele trei capitole, cu rezultatele proprii ale cercetării conturate în următoarele cinci capitole. Lucrarea se întinde pe 220 pagini, conține 77 figuri, 39 tabele, 15 scheme de reacție, 40 relații de calcul și se încheie cu o listă de 360 trimiteri bibliografice.

În rezumat au fost păstrate numerele corespunzătoare capitolelor, subcapitolelor, paragrafelor, figurilor, tabelelor, schemelor de reacție, relațiilor de calcul, trimiterilor bibliografice, utilizate în teza de doctorat extinsă. Sunt prezentate, selectiv, o parte dintre rezultatele cercetării, considerante relevante pentru lucrare.

OBIECTIVELE LUCRĂRII

Obiectivul general al lucrării îl constituie realizarea unor *noi formulări de principii active cu potențiale aplicații în stomatologie*, vizând în principal refacerea țesuturilor organice din cavitatea orală afectate de paradontoză, îndeosebi a celor moi, evitând, întârziind sau eliminând procesul de degradare de natură patologică al acestora.

Pentru realizarea acestui deziderat, activitatea de cercetare a vizat două direcții, constituind **obiective specifice**:

- Sinteza, caracterizarea fizico-chimică și din punct de vedere al activității biologice a unor noi compuși derivați din indazol, cu potențial în efectuarea de tratamente stomatologice;
- Obținerea și caracterizarea fizico-chimică și morfologică a unor noi tipuri de micro- și nanoparticule (capsule) utilizabile ca purtători ai principiilor active sintetizate;
- Obținerea de sisteme micro/nanoparticulate realizate prin includerea noilor principii biologice active în micro/nanoparticulele (capsulele) obținute și caracterizarea acestora din punct de vedere al capacității de includere și eliberare *in vitro* a principiului activ.

Rezolvarea obiectivelor amintite a presupus o serie de **obiective operaționale**, și anume:

- Studiul bibliografic aprofundat, actualizat, pentru stabilirea a noi tipuri de derivați indazolici urmând a fi sintetizați, de interes în tratarea unor afecțiuni ale cavității orale;
- Studiul bibliografic privind tehnicile de obținere a micro/nanoparticulelor (capsulelor) polimere și selectarea celor mai adecvate pentru scopul lucrării;
- Elaborarea metodelor de sinteză a noilor derivați indazolici și a tehnicilor de caracterizare fizico-chimică;
- Studiul activității antimicrobiene a noilor derivați indazolici comparativ cu medicamente clasice și selectarea în vederea includerii ulterioare în micro/nanoparticule (capsule) a celor mai eficienți;
- Selectarea polimerilor adecvați pentru includerea noilor principii biologice active și elaborarea metodelor de obținere a micro/nanoparticulelor (capsulelor) pe baza acestora;
- Elaborarea tehnicilor de obținere a sistemelor micro/nanoparticulate polimer-principiu biologic activ și selectarea tehnicilor de caracterizare a acestora din punct de vedere fizico-chimic și morfologic;
- Studiul capacității de absorbție a unor principii biologice active nou sintetizate în microparticule poroase;
- Evidențierea proprietăților antimicrobiene ale noilor principii biologice active;
- Studiul procesului de eliberare *in vitro* a noilor principii biologice active din suporturile micro/nanoparticulate în care au fost incluse.

CAPITOLUL V

SINTEZA UNOR NOI DERIVAȚI AI INDAZOLULUI

O clasă importantă de heterociclici o constituie aceea a azolilor care sunt compuși cu caracter aromatic, cu ciclu de cinci atomi, în structură simplă sau condensată cu nucleu benzenic, având în heterociclu unul sau doi atomi de azot.

Indazolul, un reprezentant al clasei azolilor, prezintă în structură doi atomi de azot în poziție adiacentă (1, 2) incluși într-un heterociclu de cinci atomi condensat cu un nucleu benzenic.

Cercetările noastre au fost întreprinse în scopul sintezei și caracterizării unor noi derivați cu structură indazolică, clarificarea mecanismelor reacțiilor abordate, cât și cu scopul de a le studia unele proprietăți biologice, în vederea unei eventuale utilizări în diferite domenii medicale.

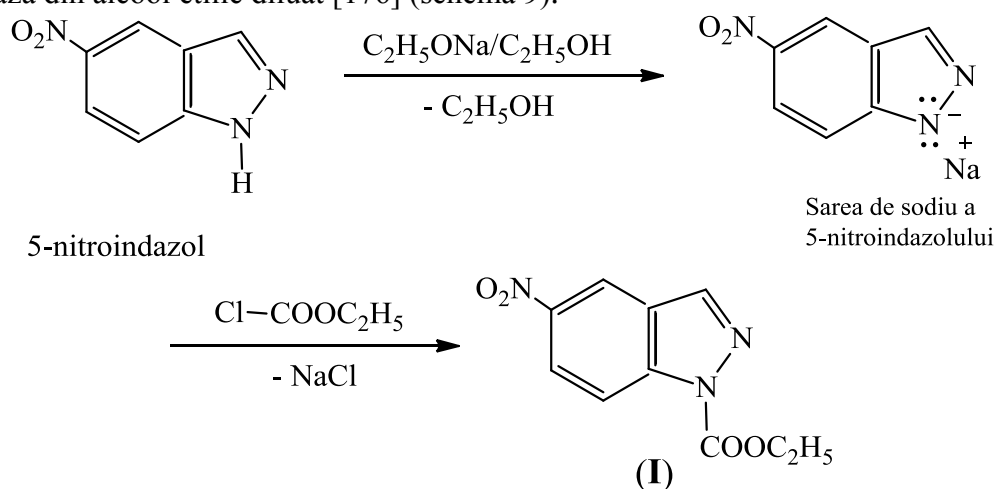
În atenția noastră a fost și înglobarea acestor principii active în nanostructuri polimere urmărind atât reducerea toxicității lor cât și creșterea acțiunii retard a sistemului polimer-principiu activ.

V.1. Sinteza și caracterizarea esterului etilic al acidului 5-nitroindazol-1-il-formic (I)

Este cunoscut faptul că nucleul indazolic se poate constitui parte integrantă a unor medicamente cu acțiune farmacodinamică destul de variată: antimicrobiană [161], antiinflamatoare [162-164], analgezică [165, 166], antivirală [167, 168], citostatică [169-172], antifungică [173], antimalarică [174], anti-HIV [175].

Cercetările noastre s-au bazat pe aceste date și ele ne-au condus spre obținerea unor derivați ai 5-nitroindazolului care să contribuie la suplimentarea gamei de produși noi, biologic activi.

Inițial se pleacă de la sarea de sodiu a 5-nitroindazolului, care la rândul său se obține, după un protocol cunoscut în literatură [151], prin refluxarea unui amestec de 5-nitroindazol în soluție etanolică conținând etoxid de sodiu. În continuare, derivatul sodat izolat se tratează cu cloroformat de etil, în mediu de alcool absolut și amestecul de reacție se supune refluxării, timp de 60-70 minute. După separarea clorurii de sodiu rezultată din reacție, la cald, concentrarea soluției etanolice conduce la esterul etilic al acidului 5-nitroindazolil-1-formic (I) care, se precipită prin turnare în apă și gheață. După filtrare la vid se usucă și se recrystalizează din alcool etilic diluat [176] (schema 9).



Schema 9. Sinteza esterului etilic al acidului 5-nitroindazol-1-il-formic (I).

Compusul (**I**) a fost caracterizat prin proprietăți fizice, analiză chimică elementală și spectrală (FT-IR, ^1H -RMN).

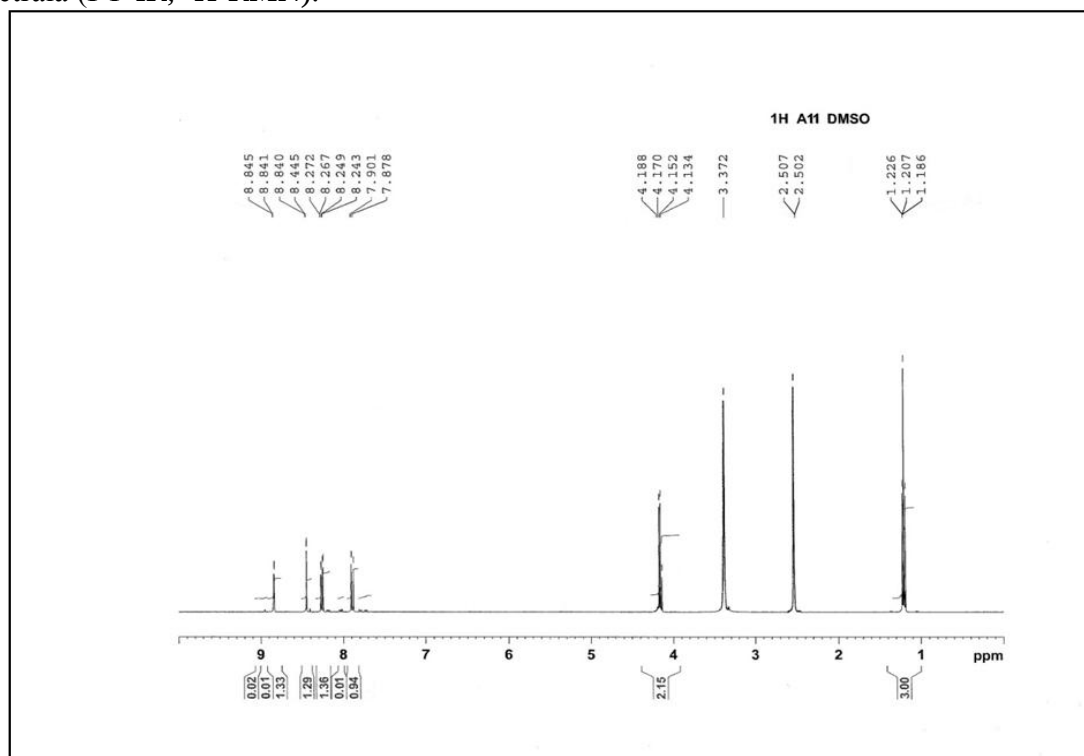
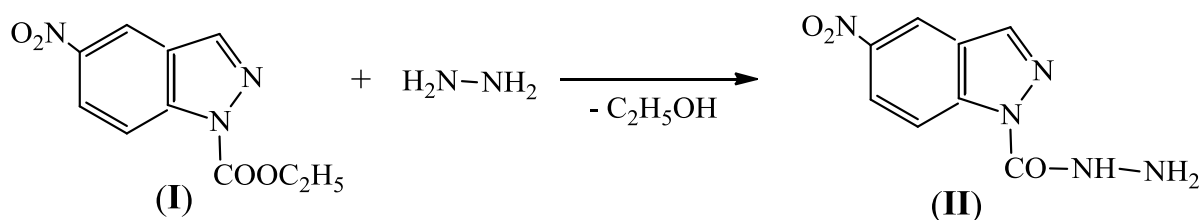


Figura 23. Spectrul ^1H -RMN al esterului etilic al acidului 5-nitroindazol-1-il-formic (**I**)

V.2. Sinteza și caracterizarea 5-nitro-1H-indazol-1-carbohidrazidei (**II**).

Numeroase studii de literatură acordă compușilor cu această structură un spațiu amplu, datorită interesului pe care-l prezintă, în special din punct de vedere practic, datorită activității lor farmacologice sau altor proprietăți aplicative [179-195].

Ținând seama de aceste rezultate ne-am propus să sintetizăm 5-nitro-1H-indazol-1-carbohidrazida (**II**) și anume prin tratarea esterului etilic al acidului 5-nitroindazol-1-il-formic (**I**) cu hidrat de hidrazină în alcool etilic, la temperatura camerei, rezultând un produs care, după recristalizare din alcool etilic se topește într-un interval mic de temperatură [176] (schema 10).



Schema 10. Sinteza 5-nitro-1H-indazol-1-carbohidrazidei (**II**).

Hidrazida (**II**) a fost caracterizată prin proprietăți fizice, analiză elementală și spectrală (FT-IR, ^1H -RMN).

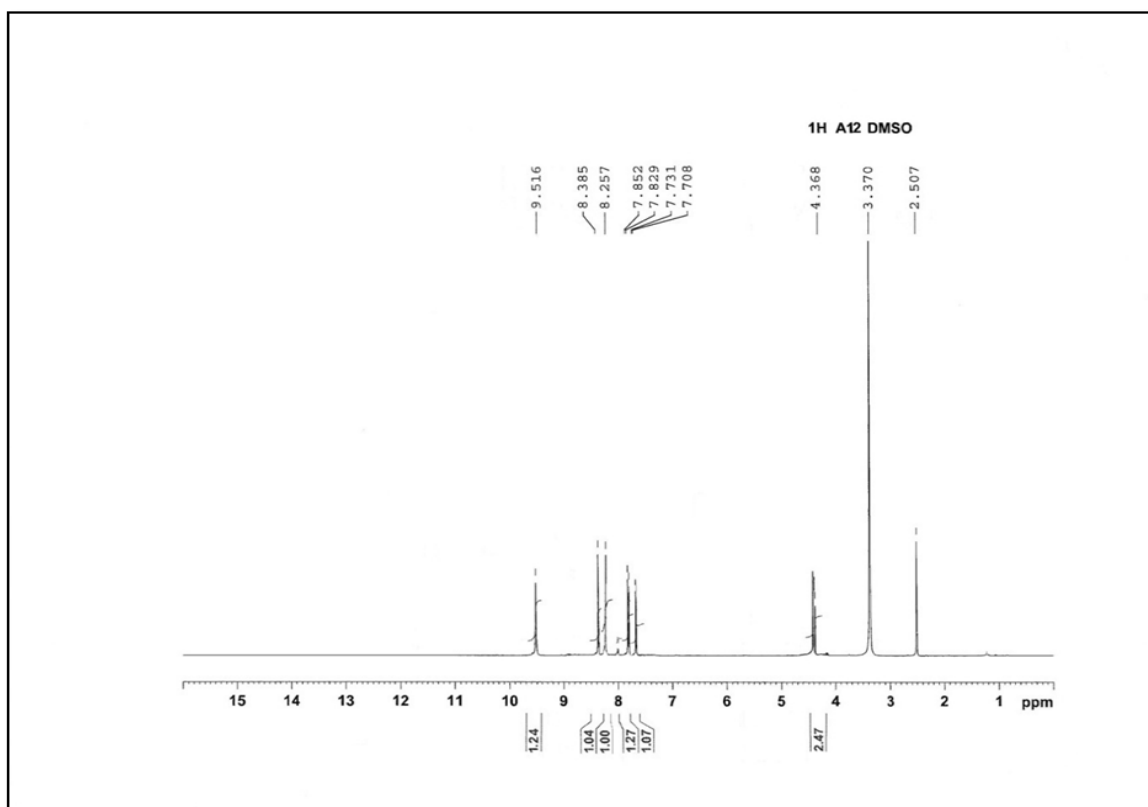


Figura 25. Spectrul ^1H -RMN al 5-nitro-1H-indazol-1-carbohidrazidei (**II**).

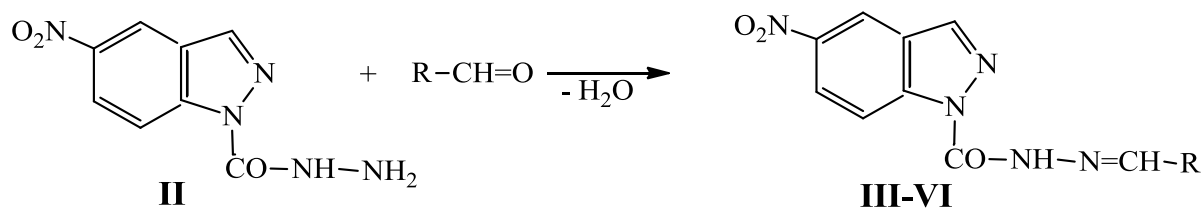
V.3. Sinteza unor hidrazidone ale 5-nitro-1H-indazol-1-carbohidrazidei (**III-VI**)

Dezvoltarea cercetării hidrazidonelor (hidrazonelor) a demonstrat o gamă largă de proprietăți biologice cum sunt: antibacteriene [195-201], inhibitori ai monoaminooxidazei A și B [201], antifungice [202, 203], antiinflamatoare [199, 204, 205], analgezice [206], antitumorale [207-209], anti-HIV [210] și antiangiogenice [211].

Hidrazidonele au fost semnalate în literatură [212-215] și pentru activitatea lor tuberculostatică, activitate considerată de autori, ca fiind generată de prezența în moleculă a grupării, $\equiv\text{C}-\text{NH}-\text{N}=\text{CH}-$.

Ținând cont de aceste date și în ideea potențării uneia sau alteia din acțiunile amintite, s-a intervenit asupra 5-nitro-1H-indazol-1-carbohidrazidei (**II**), căreia, i-au fost aduse modificări structurale prin înlocuirea atomilor de hidrogen de la azotul terminal din gruparea hidrazinică cu restul ariliden nesubstituit, fie substituit cu gruparea nitro în poziția orto, para sau gruparea hidroxil în poziția orto.

Astfel, 5-nitro-1H-indazol-1-carbohidrazida (**II**) a fost condensată cu aldehida benzoică, o- și p-nitrobenzoică, aldehida salicilică, obținându-se seria corespunzătoare de patru hidrazidone noi (**III-VI**) [176], sintezele urmând schema de reacție 11, dată mai jos:



III R = - C₆H₅ ; IV R = - C₆H₄ - NO₂(o); V R = - C₆H₄ - NO₂(p); VI R = - C₆H₄ - OH(o)

Schema 11. Hidrazidone (**III-VI**) preparate din 5-nitro-1H-indazol-1-carbohidrazidă.

Folosind un model matematic 3^2 factorial s-a optimizat reacția de sinteză a hidrazidonelor, obținând randamente superioare [176].

Compuși (III-VI) au fost caracterizați prin proprietăți fizice, analize elementale și spectrale (FT-IR, ^1H -RMN).

Figura 27 ilustrează, spre exemplificare, spectrul ^1H -RMN al 5-nitro-N'-benziliden-1H-indazol-1-carbohidrazidei (III).

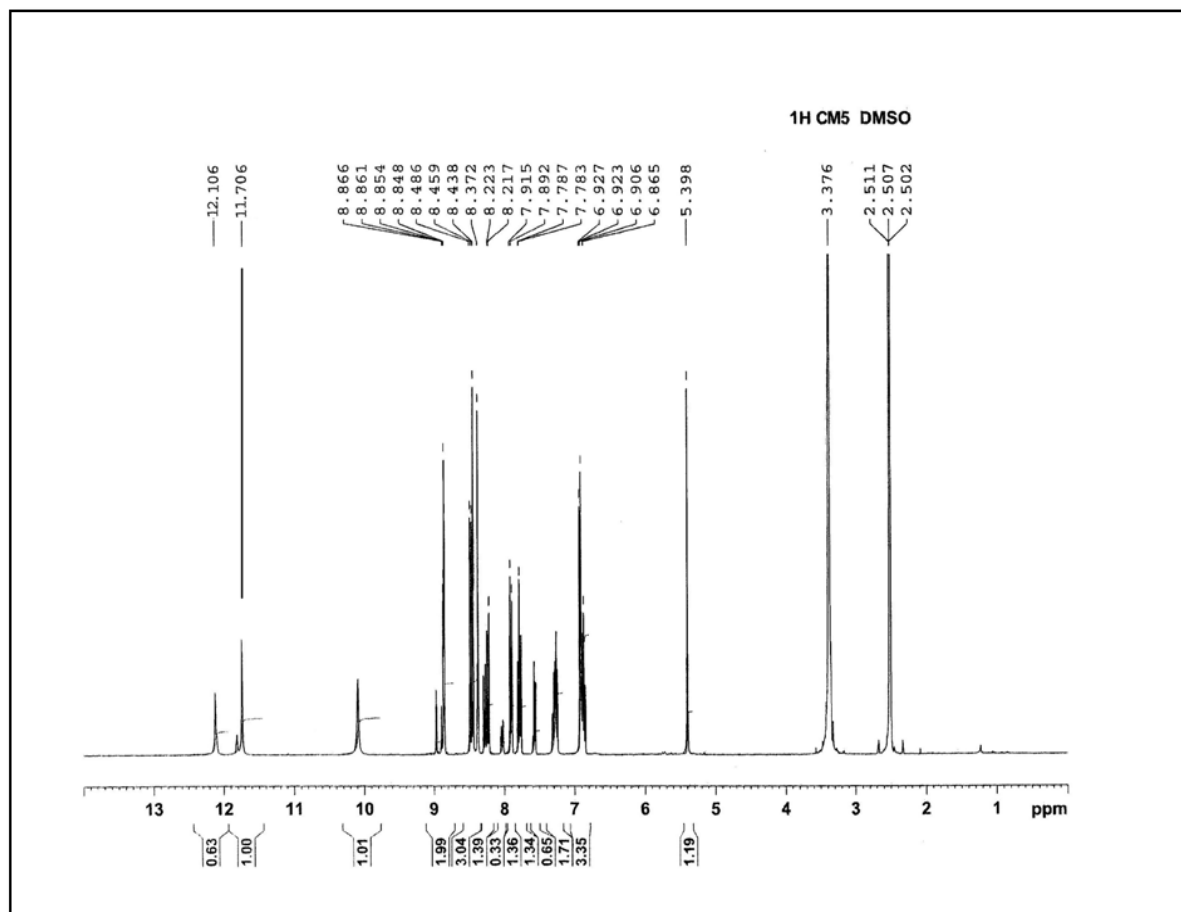


Figura 27. Spectrul ^1H -RMN al 5-nitro-N'-benziliden-1H-indazol-1-carbohidrazidei (III)

V.4. Sinteza unor 5-nitro-N-(4-oxo-2-ariltiazolidin-3-il)-1H-indazol-1-carboxamide (VII-X)

Tiazolidinele sunt cunoscute mai ales pentru utilitatea lor terapeutică, structura acestora fiind regăsită în produse folosite în diverse patologii.

Structuri tiazolidinice apar ca agenți farmacofori în medicamente cu acțiune antimicrobiană [231- 233], tuberculostatică [234], anticanceroasă [220, 235], antivirală [236], antioxidantă [237], agonistă [238].

În baza acestor date, am abordat ideea potrivit căreia, legând un rest 4-oxo-tiazolidinic în structura 5-nitroindazolului se obțin produse cu proprietăți biologice mai performante, ele fiind generate, în acest caz, de întregul sistem heterociclic.

În continuarea studiului reactivității chimice a 5-nitro-1H-indazol-1-carbohidrazidelor (III-VI) am efectuat reacția acestora cu acidul tioglicolic, în dioxan anhidru, în prezența clorurii de zinc anhidre, drept agent deshidratant.

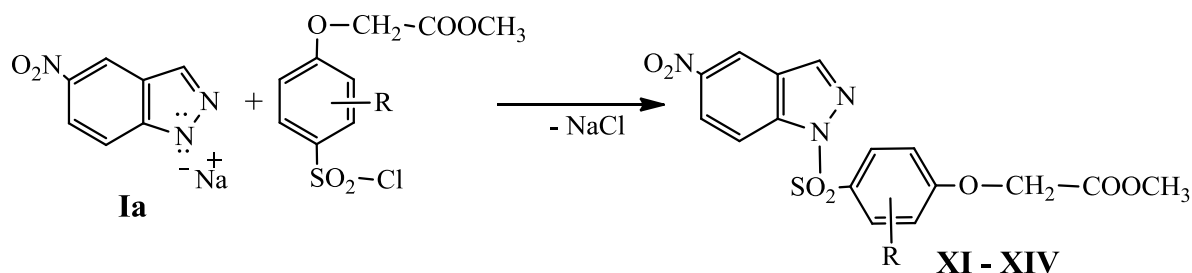
V.5. Esteri metilici ai acizilor 4-(5'-nitroindazol-1'-il-sulfonil)-R-fenoxiacetici (XI-XIV)

În cadrul cercetărilor noastre am considerat interesant obținerea de noi derivați indazolici care să conțină în structura lor grupa sulfonil, cunoscută fiind utilizarea acestora în practica terapeutică ca medicamente antihelmintice [242], antimicrobiene [243-245], antiinflamatoare [246, 247], antimalarice [248], antitumorale [249, 250], anti-HIV [251], analgezice [246, 252], antireumatice [253], antifungice [254].

Acțiunea sulfonelor este bine cunoscută și în terapia curentă împotriva bacilului tuberculozei [255, 256], acțiune superioară atunci când sulfonele sunt asociate cu sterptomcina [257].

Ținând seama de aceste rezultate ne-am propus să studiem comportarea sării de sodiu a 5-nitroindazolului (**I_a**) în reacție cu diverse sulfocloruri ale esterilor metilici ai acizilor fenoxiacetici-R-substituiți.

Noi am obținut esterii metilici ai acizilor 4-(5'-nitroindazol-1'-il-sulfonil)-R-fenoxiacetici (**XI-XIV**) prin reacția directă a sării de sodiu a 5-nitroindazolului (**I_a**) cu 4-clorosulfonil-fenoxiacetat de metil, 2-cloro-4-clorosulfonil-fenoxiacetat de metil, 2-metil-4-clorosulfonil-fenoxiacetat de metil și 2-metoxi-4-clorosulfonil-fenoxiacetat de metil, conform schemei 5.



XI R = -H; XII R = -Cl (orto); XIII R = -CH₃(orto); XIV R = -OCH₃(orto)

Schema 13. Reacția de obținere a esterilor 5-nitroindazol-sulfonil-fenoxiacetici (**XI-XIV**)

Folosirea 5-nitroindazolului sub formă de sare de sodiu drept centru nucleofil a permis separarea rapidă a compușilor din mediul de reacție, acetona, sub formă de cristale incolor care, după purificare, prezintă puncte de topire nete.

Derivații (**IX-XIV**) au fost caracterizați prin proprietăți fizice, analiză elementală și spectrală (FT-IR, ¹H-RMN).

Figura 32 ilustrează, spre exemplificare spectrul ¹H-RMN al esterului (**XII**).

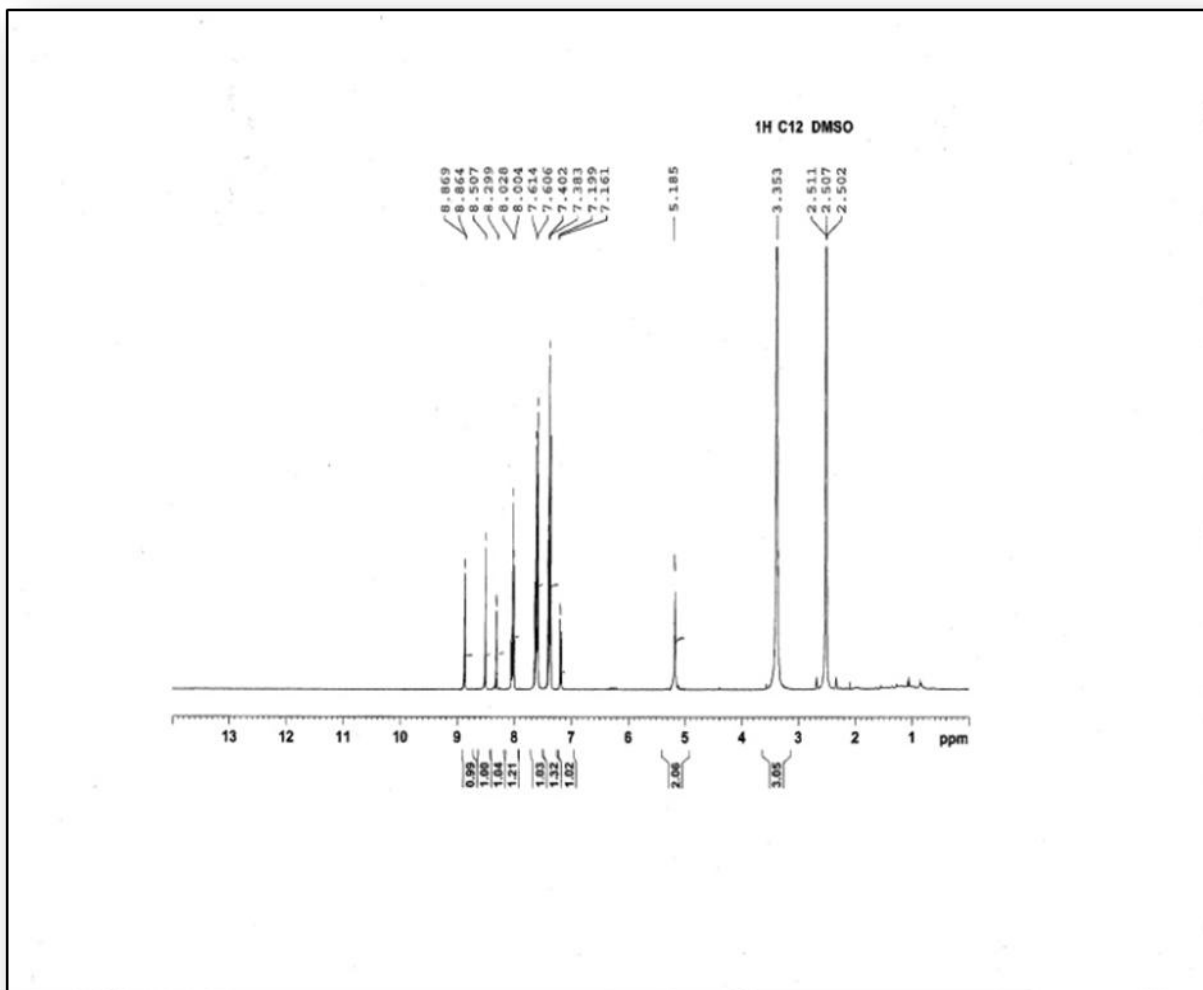


Figura 32. Spectrul ^1H -RMN al esterului metilic al acidului 2-cloro-4-(5'-nitroindazol-1'-il-sulfonyl)-fenoxiacetic (**XII**).

V.6. Sinteza unei cefalosporine β -lactamice derivată de la 5-nitroindazol (**XV**)

O literatură vastă se ocupă de acilarea acidului 7-aminodezacetoxicefalosporanic în vederea formării legăturii peptidice necesare obținerii cefalosporinelor noi. Aceasta se realizează în prezența unui solvent inert folosind anhidride, cloruri acide, acizi carboxilici activați cu dicitlohexilcarbodiimidă, cetene, tioesteri, polifenoli sau alți agenți acilanți utilizați în mod curent în sinteze peptidice [261, 264, 268 - 273].

Anhidridele mixte, ca forme activate ale acizilor carboxilici au cucerit un loc primordial în sinteza peptidică, remarcându-se și prin faptul că ele nu provoacă racemizare în cursul acilării.

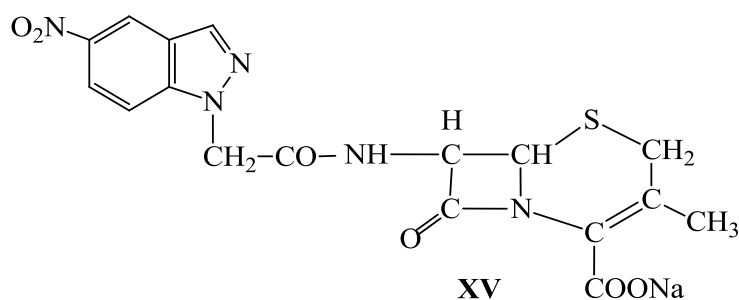
În cercetările noastre folosirea acestei metode ne-a permis acilarea acidului 7-aminodezacetoxicefalosporanic cu acidul 5-nitroindazol-1-il-acetic și obținerea, cu randament bun, a unei cefalosporine semisintetice noi, din clasa indazolului.

Inițial a fost sintetizată sarea de sodiu a 5-nitroindazolului (**Ia**) [151], prin dizolvarea la cald a 5-nitroindazolului în soluție alcoolică conținând etoxid de sodiu care, tratată cu monocloroacetatul de sodiu a condus la sarea de sodiu a acidului 5-nitroindazol-1-il-acetic (**XVa**) [151, 156] (schema 13).



După terminarea reacției de cuplare, diclorometanul se îndepărtează sub vid, la 25-30°C, iar reziduul de distilare se dizolvă în soluție saturată de bicarbonat de sodiu când cefalosporina trece în soluția alcalină sub formă de sare de sodiu. Acidulând soluția bicarbonată până la pH = 1,5 – 2, în prezența acetatului de butil, cefalosporina acidă trece în stratul organic, de unde se izolează sub formă de sare de sodiu (**XV**) prin precipitare cu acetat de sodiu anhidru sau etilhexanoat de sodiu [274] (schema 14).





Schema 14. Reacțiile de obținere a 7-(5'-nitroindazol-1'-il-acetamidil)-cefalosporinei sodice (**XV**).

Cefalosporina (**XV**) se caracterizează prin următoarele proprietăți fizice: microcristale albe, stabile la temperatura camerei, miros caracteristic de antibiotic, solubilă la rece în dimetilsulfoxid, dimetilformamidă, acetonitril, apă.

Structura antibioticului (**XV**) a fost stabilită prin analiză elementală și spectrală (FT-IR, ^1H -RMN).

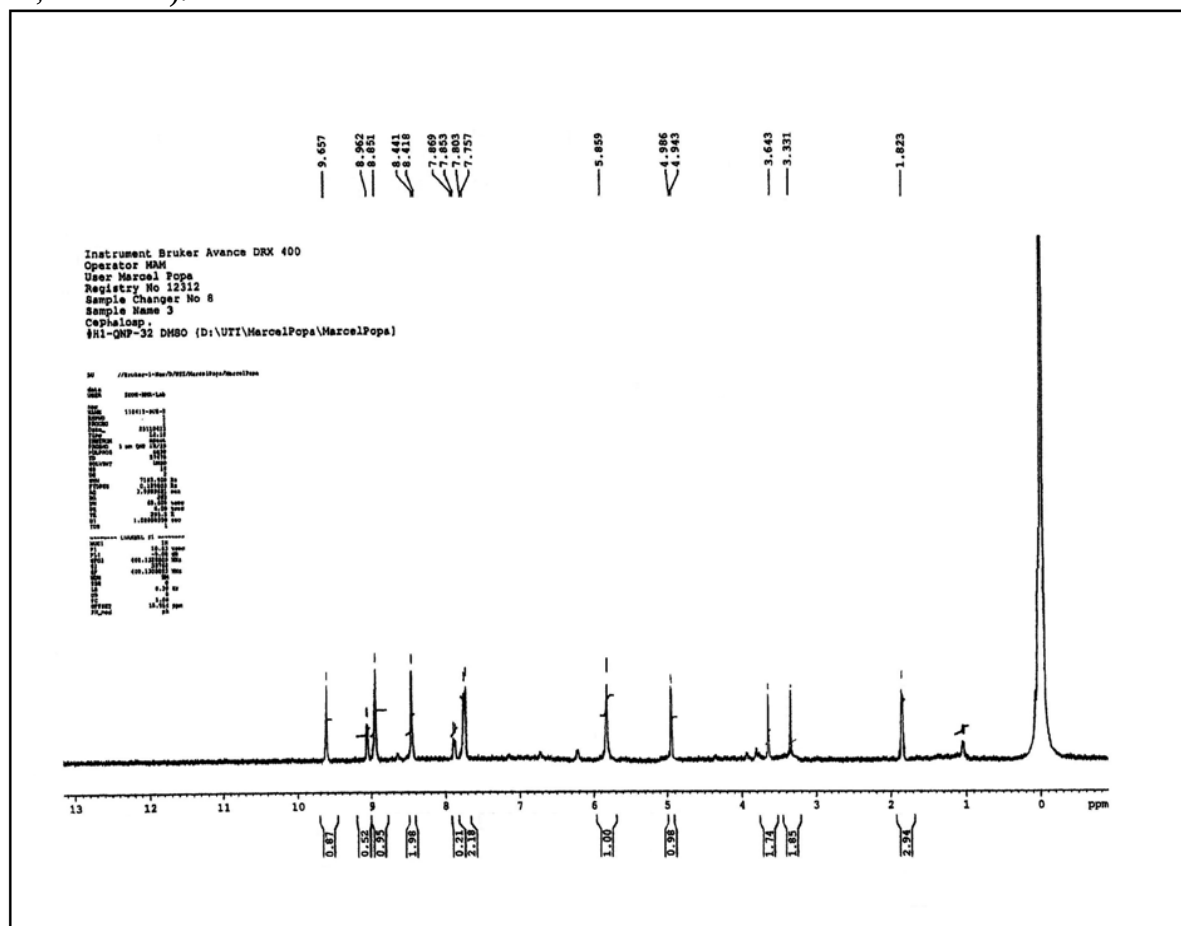


Figura 34. Spectrul ^1H -RMN al 7-(5'-nitroindazol-1'-il-acetamidil)-cefalosporinei sodice (**XV**).

CAPITOLUL VI

STUDIUL PROPRIETĂȚILOR BIOLOGICE ALE UNORA DINTRE DERIVAȚII INDAZOLICI SINTETIZAȚI

Testările pe animale de experiență folosite în scop științific s-au efectuat în baza Ordonanței nr. 37/2002 din 30/01/2002 publicată în Monitorul Oficial, Partea I nr. 95 din 02/02/2002.

VI.1. Evaluarea toxicității compușilor (I – XV) folosind animale de experiență

S-a determinat DL₅₀ folosind metoda Spearman-Kärber [277], iar rezultatele obținute sunt trecute în tabelul 16.

Tabel 16. Valorile DL₅₀ (mg/kg corp) pentru derivații indazolici (I – XV)

Compusul	DL ₅₀ (mg/kg corp)			
	24 ore	48 ore	7 zile	Media
1	2	3	4	5
I	3450	3450	3320	3406
II	2850	2850	2810	2836
III	1384	1384	1340	1369
IV	1070	1070	1060	1066
V	1135	1135	1125	1131
VI	1620	1620	1600	1613
VII	1100	1100	1090	1096
VIII	1120	1120	1105	1115
IX	1310	1310	1295	1305
X	1585	1585	1542	1570
XI	1265	1265	1260	1263
XII	994	994	990	992
XIII	1460	1460	1450	1456
XIV	1630	1630	1620	1626
XV	400	400	381	393

Determinările toxicologice efectuate asupra derivaților indazolici (I – XV) prezintă valori DL₅₀ care îi recomandă screening-ului de laborator.

VI.2. Activitatea antifungică a 5-nitro-N'-ariliden-1H-indazol-1-carbohidrazidelor (III – VI)

S-a cercetat comportarea față de sușe microbiene a patru 5-nitro-N'-ariliden-1H-indazol-1-carbohidrazide noi ce conțin în moleculă gruparea bioactivă,
 $\equiv\text{C}-\text{NH}-\text{N}=\text{CH}-$.

La determinarea acțiunii antifungice a substanțelor sintetizate (III – VI), au fost utilizați următorii fungi test: *Aspergillius niger*, *Aspergillius flavus*, *Fusarium S.P.* și *Trichophyton S.P.*

Rezultatele acțiunii substanțelor testate sunt indicate în tabelul 17.

- Hidrazidonele V și VI au acțiune evidentă asupra speciilor de *Fusarium S.P.* și *Trichophyton S.P.*, probabil datorită restului p-nitrofenil și o-hidroxifenil din structura acestora, fapt care concordă cu unele date din literatură privind derivații hidrazonici [278-280].

- Se apreciază că spectrul antifungic depinde, în general, de natura și poziția grupărilor grefate pe nucleul fenilic din structura 5-nitro-N'-ariliden-1H-indazol-1-carbohidrazidelor testate.

Tabel 17. Spectrul antifungic al 5-nitro-N'-ariliden-1H-indazol-1-carbohidrazidelor (III – VI)

Compusul	Nr. ore temosta- tare	<i>Trichobryon S.P.</i>			<i>Aspergillus niger</i>			<i>Aspergillus flavus</i>			<i>Fusarium S.P.</i>		
		1 mg/mL	0,5 mg/mL	0,25 mg/mL	1 mg/mL	0,5 mg/mL	0,25 mg/mL	1 mg/mL	0,5 mg/mL	0,25 mg/mL	1 mg/mL	0,5 mg/mL	0,25 mg/mL
III	24	+	+	+	+	+	+	+	+	++	+	+	+
	48	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	72	-+	-+	-+	+	+	+	+	+	+	-+	-+	+
	96	+	-+	+	++	+	+	+	++	++	-+	+	+
	120	-+	-+	-+	++	++	++	++	++	++	+	+	-+
IV	24	-+	-+	-+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	48	-+	-	-	+	+	+	++	++	++	-	-	-
	72	+	-+	+	+	++	+	++	++	++	-	-	-+
	96	+	+	+	++	+	+	++	++	++	+	-+	+
	120	+	+	-+	++	++	++	++	++	++	-+	-+	-+
V	24	-+	-	-	+	+	+	++	++	++	-	-	-
	48	-+	-	-	+	+	+	++	++	++	-	-	-
	72	-+	-	-	++	+	+	++	++	++	-	-	-+
	96	-	-+	-	+	+	+	++	++	++	-	-	-+
	120	-	-	-	++	++	++	++	++	++	-	-	-+
VI	24	-	-	-	++	++	++	++	++	++	-	-	-
	48	-	-	-	++	+	+	++	++	++	-	-	-
	72	-	-	-	+	+	++	++	++	++	-	-	-
	96	-	-	-	++	++	++	++	++	++	-	-	-
	120	-	-	-	++	++	++	++	++	++	-	-	-

- Lipsă de dezvoltare
- + Dezvoltare moderată
+ Dezvoltare normală
++ Dezvoltare abundentă.

VI.3. Activitatea antimicrobiană a derivaților de 5-nitro-N-(4-oxo-2-ariltiazolidin-3-il)-1H-indazol-1-carboxamidelor (VII – X) și a esterilor metilici ai acizilor 4-(5'-nitroindazol-1'-il-sulfonil)-R-fenoxiacetici (XI – XIV)

Testările s-au efectuat pe următoarele sușe microbiene: *Staphylococcus aureus* (ATCC-25923), *Bacillus subtilis* (ATCC-6638), *Bacillus aureus* (ATCC-10876), *Escherichia coli* (ATCC-25922) și *Salmonella enteritidis* (P1131) din bacterioteca Laboratorului de Microbiologie, sector Epidemiologic a Institutului de Sănătate Publică din Iași în conformitate cu normele internaționale NCCLS elaborate în USA, anul 2000 [282]. Efectul antibacterian al acestora s-a stabilit prin diametrul zonei de inhibiție conform metodei difuzimetrice Kirby-Bauer [283], kanamicina fiind substanța activă de referință (tabelul 18).

Tabel 18. Activitatea antimicrobiană a 5-nitroindazol-4-oxo-ariltiazolidin-carboxamidelor (VII – X) [239] și a esterilor 5-nitroindazol-sulfonil-fenoxiacetici (XI – XIV) la concentrația de 1000 µg/disc.

Compusul	Diametrul zonei de inhibiție (mm)				
	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. enteritidis</i>
VII	7 – 8	18 – 19	19 – 20	11 – 12	16 – 17
VIII	8 – 9	19 – 20	18 – 19	14 – 15	18 – 19
IX	6 – 7	21 – 22	20 – 21	13 – 14	19 – 20
X	7 – 8	25 – 26	23 – 24	15 – 16	19 – 20
XI	17 – 18	5 – 6	6 – 7	12 – 13	4 – 5
XII	18 – 19	6 – 7	8 – 9	14 – 15	7 – 8
XIII	20 – 21	8 – 9	10 – 11	16 – 17	6 – 7
XIV	22 – 23	9 – 10	12 – 13	19 – 20	9 – 10
Kanamicină	31 – 32	27 – 28	30 – 31	29 – 30	28 – 29

Comparând spectrul antimicrobian al fiecăruia dintre noii compuși sintetizați (VII – XIV) cu al kanamicinei, se deduce că acesta este inferior substanței de referință și depinde de natura și poziția substituenților existenți în nucleul fenilic (VII – X), respectiv în restul fenoxiacetic (XI – XIV).

VI.4. Activitatea antimicrobiană a 7-(5'-nitroindazol-1'-il-acetamidil)-cefalosporinei sodice (XV)

Activitatea antimicrobiană a cefalosporinei β-lactamice (XV) s-a testat pe tulpinile microbiene provenite din colecția Institutului Cantacuzino București, cum sunt: *Streptococcus pneumoniae* – ATTC 46619, *Staphylococcus aureus* – ATCC 25923 (germeni gram pozitivi) și *Klebsiella pneumoniae* – C82, *Pseudomonas aeruginosa* – ATCC 27853, *Escherichia coli* – ATCC 25922 (germeni gram negativi) comparativ cu cefalexina, antibiotic de referință cu importantă eficacitate clinică [274]. S-a aplicat metoda difuzimetrică Kirby-Bauer [283], conform căreia citirile s-au înregistrat după 24 de ore (tabelul 19).

Tabel 19. Activitatea antimicrobiană și concentrația minimă inhibitorie (CMI) a cefalosporinei (XV)

Compusul	Diametrul zonei de inhibiție (mm)				
	<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
XV	9 – 10	–	20 – 21	18 – 19	8 – 9
Cefalexin	20 – 21	–	22 – 23	32 – 33	23 – 24
XV	CMI (µg/mL)				
	52	–	14	12	54

Examinând datele din tabel se remarcă efectul antibacterian destul de puternic al cefalosporinei (XV) asupra tulpinii *Streptococcus pneumoniae*, comparabil cu cefalexina și un efect moderat asupra tulpinii *Staphylococcus aureus*.

Se poate afirma că cefalosporina de semisinteză (XV) prezintă eficacitate antimicrobiană apreciabilă asupra unor germeni gram pozitivi, eficacitate susținută prin grefarea restului de acid 5-nitroindazol-1-il-acetic drept catenă laterală, la gruparea aminică a acidului 7-aminodezacetoxicefalosporanic.

CAPITOLUL VII

NANOPARTICULE ȘI NANOCAPSULE PE BAZĂ DE COMPLECȘI POLIELECTROLITICI PURTĂTOARE DE NOI 5-NITROINDAZOL TIAZOLIDINE POTENȚIAL UTILIZABILE PENTRU TRATAREA UNOR INFECȚII ORALE

Terapia medicamentoasă clasică se dovedește adeseori inefficientă datorită distribuției nediscriminatorii a principiului biologic activ, toxicității sistemice ridicate (îndeosebi în cazul antitumoralelor), hidrofobității crescute sau permeabilității slabe a țesuturilor. O cale de a surmonta aceste efecte adverse o constituie administrarea ținută, locală adeseori, utilizând formulări complexe capabile să asigure o eliberare controlată și prelungită. Pe lângă aceste caracteristici, o formulare ideală trebuie să manifeste și o bună retenție la locul aplicării. Acest ultim deziderat poate fi îndeplinit utilizând formulări bioadezive [285].

Nanotehnologia oferă oportunitatea de obținere a unor astfel de sisteme, utilizabile ca suport pentru încărcarea medicamentelor, până în prezent fiind raportate mai multe tipuri de nanoparticule/nanocapsule utilizabile în acest scop.

Comparativ cu alți coloizi utilizați în aplicații stomatologice, micro/nanoparticulele polimere prezintă o serie de avantaje, precum: stabilitate mai bună în fluidele biologice, stabilitate ridicată la stocare timp îndelungat, preparare facilă prin tehnici foarte variate, producere relativ ușoară la scară chiar industrială, bună reproductibilitate, bun control al cantității de medicament încapsulat, eliberare controlată a principiului activ inclus sau încapsulat. În această categorie intră particulele pline (sfere), capabile de a încărca principiul activ în matricea polimeră (obișnuit cu caracter de hidrogel), precum și cele cu caracter vezicular – capsule –, capabile de a include/încapsula principiul activ în miezul lor, protejat de o membrană. Evident, comparativ cu micro/nanosferele, capsulele sunt preferate datorită capacității lor de încărcare cu cantități mai mari de principiu activ.

Pornind de la aceste considerente, abordarea noastră în obținerea nanocapsulelor ca suport pentru încapsularea unor principii active sintetizate constă în realizarea de complecși interpolimerici pornind de la un amestec de polimeri cu caracter ionic diferit, respectiv un polication și un polianion.

VII.1. Obținerea unor nanoparticule și nanocapsule pe bază de complex polielectrolitic

Metoda utilizată pentru obținerea acestui tip de nanoparticule/capsule este inspirată din literatură, fiind propusă pentru prima dată în lucrarea lui Fessi ș.a. [157]; metodei inițiale i-au fost aduse mici modificări care au avut ca efect ameliorarea sa, în sensul obținerii de particule mai mici și cu polidispersitate mai redusă.

Principiul este următorul: într-o primă fază se obțin nanoparticule al căror miez este format din principiul activ, eventual dizolvat într-o fază organică. Miezul este protejat de o membrană formată dintr-un polielectrolit (Eudragit) ce precipită din faza organică în care se află dizolvat împreună cu principiul activ, la contactul cu apa. Consolidarea membranei și asigurarea astfel a unui înveliș stabil mecanic, respectiv formarea nanocapsulelor finale se face prin complexarea polielectrolitului ce alcătuiește membrana, cu un alt polielectrolit de semn contrar, rezultând astfel un complex polielectrolitic de cele mai multe ori cu caracter de hidrogel, ușor de penetrat de către lichidele fiziologice, în esență soluții apoase.

În studiul nostru am selectat ca polimer sintetic cationic Eudragit E100, care este permeabil și cu capacitate de umflare în medii apoase cu pH peste 5. Principiul activ care va forma miezul nanoparticulelor și nanocapsulelor, respectiv două dintre tiazolidinele sintetizate selectate pe baza activității lor antimicrobiene mai ridicate, a fost dizolvat într-un vehicul uleios (desigur, nemiscibil cu apa), respectiv Miglyol 840.

Crearea unei membrane stabile a fost realizată prin depunerea în suprafața nanoparticulelor acoperite cu Eudragit, a unui polianion cu care formează complexul polielectrolitic, respectiv alginatul de sodiu, deoarece asigură ca efect secundar creșterea mucoadezivității particulelor la membrane biologice, ceea ce constituie o caracteristică importantă pentru aplicația noastră.

VII.2.1. Caracterizarea nanoparticulelor și nanocapsulelor din punct de vedere dimensional și morfologic

Caracterizarea a inclus stabilirea diametrului mediu și al polidispersității dimensionale, realizată prin analiză dispersiei de fascicul laser. Au fost analizate probe de nanocapsule înainte de realizarea complexului polielectrolitic, după complexarea cu alginat precum și nanocapsule încărcate cu principiile active nou sintetizate. În figura 35, 36 și 37 sunt prezentate câteva dintre rezultatele obținute. Diametrul mediu al nanocapsulelor acoperit doar de Eudragit, înainte de complexarea ionică cu alginatul de sodiu este de aprox. 121 nm.

	Diam. (nm)	% Number	Width (nm)
Z-Average (d.nm): 153,7	Peak 1: 120,9	100,0	38,47
Pdl: 0,084	Peak 2: 0,000	0,0	0,000
Intercept: 0,962	Peak 3: 0,000	0,0	0,000
Result quality Good			

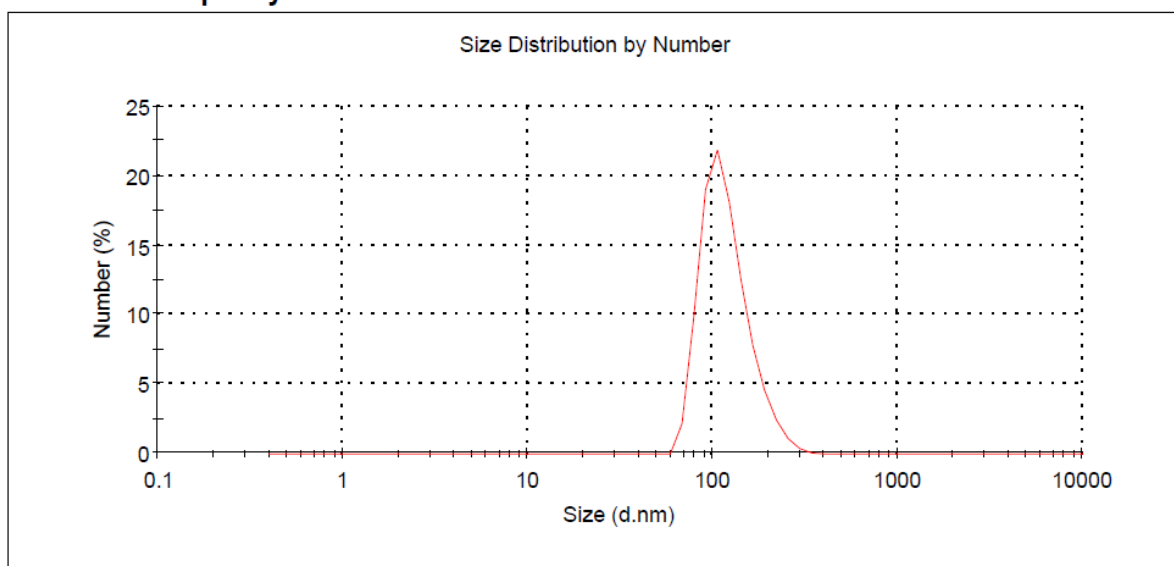


Figura 35. Valoarea diametrului mediu și curba de polidispersitate pentru nanocapsule de Eudragit nestabilizate prin complexare ionică

Curba de polidispersitate este monomodală, cu un maxim proeminent la 121 nm, relevând o distribuție destul de îngustă a valorilor diametrelor nanoparticulelor (figura 35). Acoperirea nanoparticulelor cu polianionul de alginat de sodiu are ca efect, evident, creșterea valorii medii a particulelor rezultate, spre 155,5 nm. Polidispersitatea nanocapsulelor astfel obținute se păstrează destul de îngustă, deși mai largă decât în cazul nanocapsulelor necomplexate. Ponderea particulelor cu diametrul mediu scade ușor atingând 17% din totalul acestora.

Includerea în nanocapsule a principiului activ (N-[(4-oxo-2-(p-nitrofenil)-1,3-tiazolidin)]-formamidil]-5-nitroindazol) dizolvat în Miglyol conduce la creșterea ușoară a diametrului mediu (158 nm), precum și la creșterea procentului corespunzător acestei valori către 20 % (figura 37).

Valorile diametrului mediu, indicelui de polidispersitate, potențialului și deviației zeta sunt centralizate în tabelul 20.

Informații suplimentare privind forma, dimensiunea și morfologia particulelor au fost obținute prin microscopie electronică de baleiaj. Spre exemplificare, în figura 38 este prezentată fotografia corespunzătoare nanocapsulelor cu membrana de tip complex polielectrolitic.

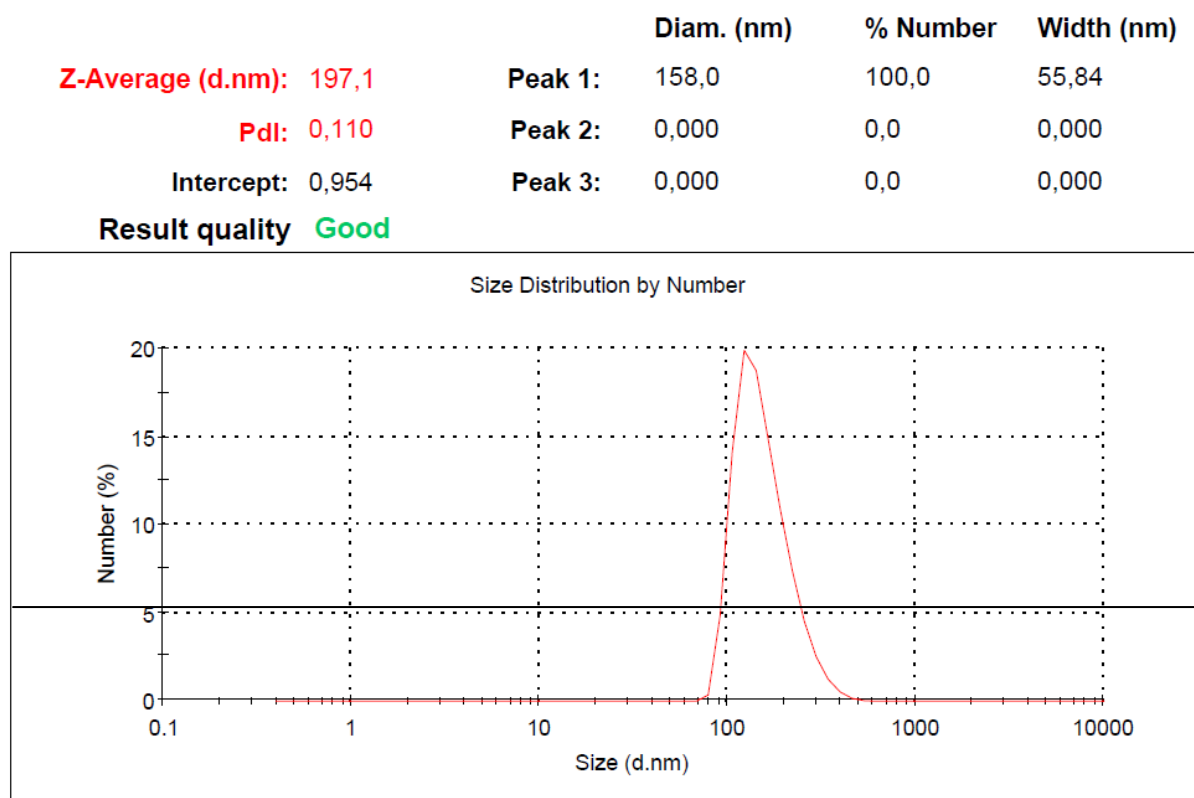


Figura 37. Valoarea diametrului mediu și curba de polidispersitate pentru nanocapsule de Eudragit stabilizate prin complexare ionică cu alginat de sodiu, încărcate cu 5-Nitro-N-[4-oxo-2-(p-nitrofeniltiazolidin)-3-il]-1H-indazol-1-carboxamidă (IX)

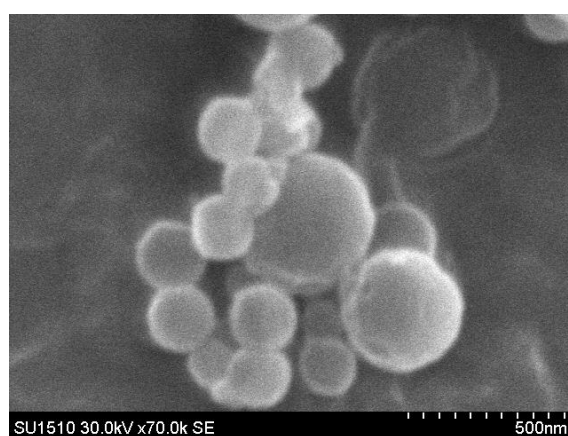


Figura 38. Fotografie de microscopie electronică de baleiaj pentru nanocapsule cu membrană de tip complex polielectrolitic

Trebuie remarcat faptul că diametrul particulelor, așa cum relevă fotografia din figura 38, este în bună concordanță cu valorile masurate prin difracție laser. Se observă, de

asemenea, caracterul ușor polidisperse al acestora, dar și faptul că predomină populația de particule cu diametrul în jurul valorii de 150 nm.

VII.2.2. Caracterizarea nanocapsulelor și nanocapsulelor din punct de vedere al stabilității în suspensii apoase

În scopul administrării nanoparticulelor și nanocapsulelor prin injectare locală la nivelul pungii parodontale, suspensiile acestora în medii apoase (ser fiziologic) trebuie să fie stabile, pentru a nu se produce sedimentarea și înfundarea acului seringii, care are diametru foarte mic. Evaluarea stabilității suspensiilor apoase de particule solide se face, în principiu, prin determinarea potențialului zeta (tabelul 20).

Tabel 20. Valoarea diametrului mediu, a indicelui de polidispersitate și a potențialului zeta pentru cele trei tipuri de nanocapsule

Proba	Diametrul mediu (nm)	Indicele de polidispersitate	Potențialul zeta (mV)	Deviația zeta (mV)
Nanoparticule neacoperite cu alginat de sodiu (Eudragit în suprafață)	121	0.143	52,0	6.81
Nanocapsule acoperite cu alginat de sodiu (cu membrană de complex polielectrolitic)	155,5	0.237	- 45.4	7.78
Nanocapsule cu membrană de complex polielectrolitic încărcate cu 5-Nitro-N-[4-oxo-2-(p-nitrofeniltiazolidin)-3-il]-1H-indazol-1-carboxamidă (IX)	158	0.216	-	-

Pentru particulele acoperite doar cu Eudragit, valoarea potențialului zeta este pozitivă datorită caracterului de polication al polimerului (52,0 Mv). Complexarea cu alginat determină schimbarea valorii acestuia, care devine negativă datorită caracterului de polianion al polizaharidului (- 45,4 Mv). Stabilitatea celor două tipuri de suspensii este atestată de valoarea absolută ridicată a potențialului zeta corespunzător. În Figura 39, este prezentată curba specifică de potențial zeta pentru nanocapsulele acoperite doar cu Eudragit.

	Mean (mV)	Area (%)	Width (mV)
Zeta Potential (mV): 52,0	Peak 1: 52,0	100,0	6,52
Zeta Deviation (mV): 6,52	Peak 2: 0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 0,0515	Peak 3: 0,00	0,0	0,00
Result quality Good			

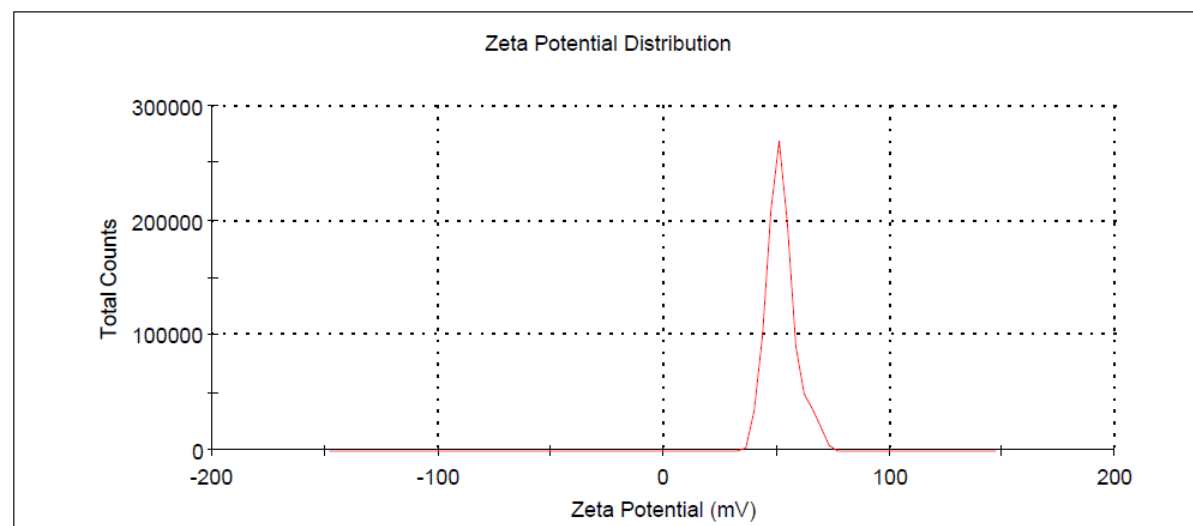


Figura 39. Curba specifică pentru potențialul zeta al nanoparticulelor cu Eudragit în suprafață.

VII.2.3. Caracterizarea nanoparticulelor și nanocapsulelor din punct de vedere al capacității de a încărca principii active

Pentru a verifica abilitatea nanocapsulelor obținute de a încărca principii active, un prim test a constatat în încapsularea unui compus ce, poate fi vizualizat prin microscopie de fluorescență - Roșu Nil. Fotografiiile realizate sunt prezentate în figura 40.

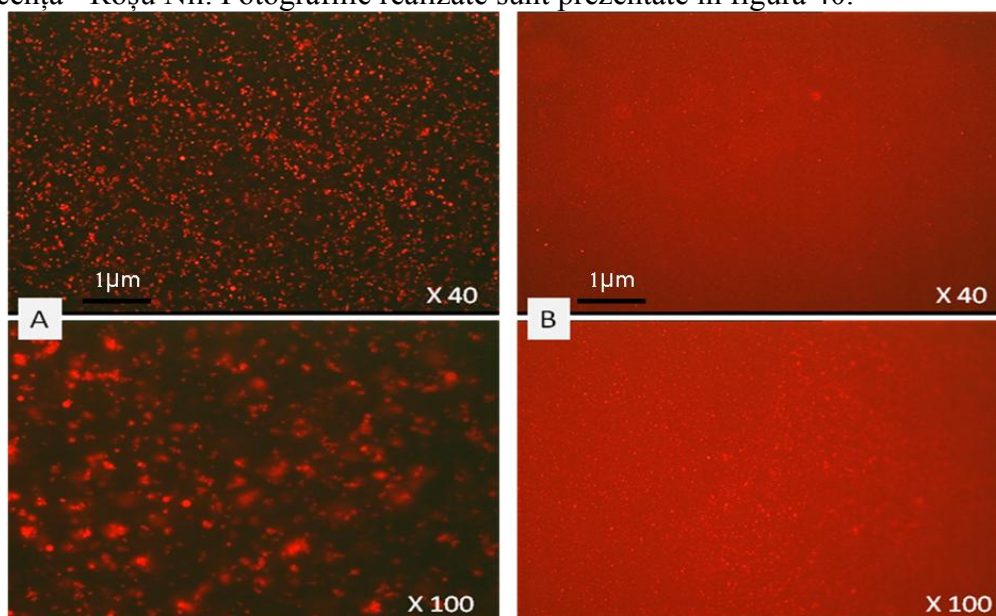


Figura 40. Microscopie de fluorescență (magnificație 40 x și 100 x) pe suspensii diluate (A) și concentrate (B) de nanocapsule de tip complex polielectrolitic încărcate cu Roșu Nil, suspendate în soluție tampon fosfat pH 7.2

Particulele încărcate prezintă colorația roșie specifică marker-ului, fiind evidențiate atât în suspensiile diluate (a) cât și în cele concentrate. Este probată astfel capacitatea

nanocapsulelor de tip complex polielectrolitic de a încărca compuși micromoleculari. Au fost selectați în acest scop 5-Nitro-N-[4-oxo-2-(*p*-nitrofeniltiazolidin)-3-il]-1H-indazol-1-carboxamidă **(IX)** și 5-Nitro-N-[4-oxo-2-(*o*-nitrofeniltiazolidin)-3-il]-1H-indazol-1-carboxamidă **(X)** care au dovedit activitatea antimicrobiană cea mai ridicată.

Tabelul 21 relevă eficiența de încărcare a principiilor active sintetizate, în sistemele polimerice.

Tabel 21. Eficiența de încărcare a nanocapsulelor cu tiazolidine.

Tipul de sistem polimeric	Principiu activ	Eficiența de încărcare (%)
Nanoparticule cu Eudragit E100 în suprafață	5-Nitro-N-[4-oxo-2-(<i>p</i> -nitrofeniltiazolidin)-3-il]-1H-indazol-1-carboxamidă (IX)	98
Nanoparticule pe bază de Eudragit E100 acoperite cu alginat		89
Nanoparticule cu Eudragit E100 în suprafață	5-Nitro-N-[4-oxo-2-(<i>o</i> -nitrofeniltiazolidin)-3-il]-1H-indazol-1-carboxamidă (X)	95
Nanocapsule pe bază de Eudragit E100 acoperite cu alginat		91

VII.2.4. Caracterizarea sistemelor nanoparticulate din punct de vedere al toxicității

Sistemele polimer-medicament fac parte din categoria largă a biomaterialelor, lucrând în interior sau în contact cu organismul. Aplicațiile oricăror biomateriale sunt în strînsă corelație cu posibilele efecte toxice determinate în organisme animale. Prin urmare, posibilele efecte nocive ale acestora trebuie bine cunoscute înainte de a fi administrate, indiferent pe ce cale. Una din proprietățile foarte importante, care restrânge mult domeniul biomaterialelor o constituie toxicitatea acută.

Pentru tiazolidinele selectate în scopul încărcării în nanocapsule, ca și pentru sistemele nanoparticulate realizate prin încapsulare, toxicitatea acută fost evaluată prin determinarea dozei letale 50 (DL50) la șoareci. Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelul 22.

Tabel 22. Toxicitatea acută a tiazolidinelor IX și X și a sistemelor nanoparticulate realizate prin încapsulare

Probă	DL 50 (mg/kg)			
	24 ore	48 ore	7 zile	Valoare medie
5-Nitro-N-[4-oxo-2-(<i>p</i> -nitrofeniltiazolidin)-3-il]-1H-indazol-1-carboxamidă (IX) încărcat în nanoparticule cu Eudragit în suprafață	4715	4715	4690	4706
5-Nitro-N-[4-oxo-2-(<i>o</i> -nitrofeniltiazolidin)-3-il]-1H-indazol-1-carboxamidă (X) încapsulat în nanocapsule cu membrană de complex polielectrolitic	4850	4800	4800	4810
5-Nitro-N-[4-oxo-2-(<i>o</i> -nitrofeniltiazolidin)-3-il]-1H-indazol-1-carboxamidă (X) încărcat	5020	5020	5080	5040

în nanoparticule cu Eudragit în suprafață				
5-Nitro-N-[4-oxo-2-(<i>o</i> -nitrofeniltiazolidin)-3-il]-1H-indazol-1-carboxamidă (X) încapsulat în nanocapsule cu membrană de complex polielectrolitic	5000	5000	5000	5000

Testele pe animale au fost efectuate respectând standardele de etică menționate în Declarația de la Helsinki din 1975, revizuită în 2000, precum și legislația națională.

Încadrarea unui compus într-un anumit domeniu de toxicitate se face conform *scalei de toxicitate Hodge și Sterner* [304]. Nanocapsulele încărcate cu cele două tiazolidine sunt practic netoxice, cu valori foarte apropiate ale DL50.

Este evident că încapsularea tiazolidinelor în sistemele polimerice are ca efect o reducere substanțială a toxicității datorată aportului polizaharidelor selectate pentru studiu tocmai datorită caracterului lor biocompatibil, netoxic.

VII.2.5. Caracterizarea sistemelor nanoparticulate din punct de vedere al activității antibacteriene

Activitatea antimicrobiană a tiazolidinelor, fie în stare liberă fie încapsulate în sistemele polimerice obținute, a fost evaluată în conformitate cu standardele internaționale NCCLS (40) pe diferite tulpini bacteriene (Tabelul 23). Activitatea s-a evaluat prin măsurarea diametrului zonei de inhibiție, doar dimensiunile peste 16 mm fiind considerate activitate antimicrobiană. Pentru comparație s-a utilizat un medicament model, kanamicina.

Tabel 23. Diametrul zonei de inhibiție a creșterii sușelor bacteriene în cazul utilizării tiazolidinelor IX și X în stare liberă sau încapsulată

Compus	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. enteritidis</i>	<i>S. mutans</i>	<i>A. actinomyces comitans</i>
5-Nitro-N-[4-oxo-2-(<i>p</i> -nitrofeniltiazolidin)-3-il]-1H-indazol-1-carboxamidă (IX) încapsulat în nanocapsule cu membrană de complex polielectrolitic	9-10	23-24	22-23	15-16	20-21	24-25	25-26
5-Nitro-N-[4-oxo-2-(<i>o</i> -nitrofeniltiazolidin)-3-il]-1H-indazol-1-carboxamidă (X) încapsulat în nanoparticule cu membrană de complex polielectrolitic	10-11	25-26	23-24	16-17	23-24	26-27	25-26
Kanamycină	31-32	27-28	30-31	29-30	28-29	32-33	33-34

Ambele sisteme polimer-medicament au demonstrat a avea o bună activitate împotriva dezvoltării suşelor de *B. subtilis*, *B. cereus*, *S. Enteritidis*, *S. mutans* şi *A. Actinomycetem comitans*, moderat eficiente împotriva dezvoltării tulpinelor de *E. Coli*; ele nu prezintă activitate antimicrobiană în cazul dezvoltării tulpinelor de *S. aureus*. S-a observat faptul că tulpinile microbiene de *B. cereus*, *B. subtilis* şi *S. enteritidis* sunt mai sensibile la prezenţa grupărilor substituente -NO₂ şi -OH din cele două tiazolidine, în comparaţie cu alte tiazolidine sintetizate în prezenta lucrare, ce prezintă substituenţi de alt tip.

Se constată că eficienţa antibacteriană pare să se îmbunătăţească prin încapsularea principiilor active în nanocapsulele polielectrolitice. În comparaţie cu kanamicina (medicament model), tiazolidinele încapsulate prezintă activitate biologică mai redusă, dar cu avantajele corespunzătoare ale sistemelor de eliberare a medicamentelor (toxicitate redusă, eliberare prelungită, etc.).

VII.2.6. Studiul cinetic al eliberării principiilor active din nanoparticule şi nanocapsule

Principiile active nou sintetizate sunt practic insolubile în apă, astfel încât pentru studiul cineticii de eliberare *in vitro* s-a utilizat un amestec format din mediul apos (soluţie tampon fosfat) şi un lichid neapos drept cosolvent. Astfel de amestecuri, chiar dacă nu au corespondent în nici un fluid fiziologic, sunt utilizate deseori pentru studii pur teoretice [305].

Tiazolinele IX şi X nu sunt solubile în apă, foarte puţin solubile în PBS dar solubile în amestecuri ale apei cu dimetilsulfoxid, dimetiformamidă şi N-metil-2-pirolidonă. În consecinţă, pentru a simula un mediu de eliberare pentru produşii noştri greu solubili, s-a selectat un amestec apă - N-metil-2-pirolidonă. Acesta din urmă este un solvent aprotic, miscibil cu apa, dar care a fost raportat ca având ca efect creşterea solubilităţii în apă şi a permeabilităţii mai multor medicamente [306]. Toxicitatea sa coborâtă la nivelul cavităţii orale, cât şi la administrare parenterală, permite folosirea în formulări ce impun sterilizarea termică, astfel încât compusul devine foarte atractiv pentru îmbunătăţirea solubilităţii în domeniul farmaceutic [307, 308].

Curbele cinetice ale procesului de eliberare sunt prezentate în figurile 41 şi 42. Întreaga cantitate din prima tiazolidină încărcată în nanocapsulele acoperite cu complexul Eudragit/alginat s-a regăsit în mediul de eliberare după 72 de ore (analiza UV-Vis nearătând urme de medicament după 72 ore de extracţie în amestec PBS pH 7,2 / N-metil-2-pirolidonă) în timp ce din nanoparticule cu Eudragit E100 în suprafaţă, întreaga cantitate de tiazolidină a fost expulzată după doar 46 de ore (figura 41).

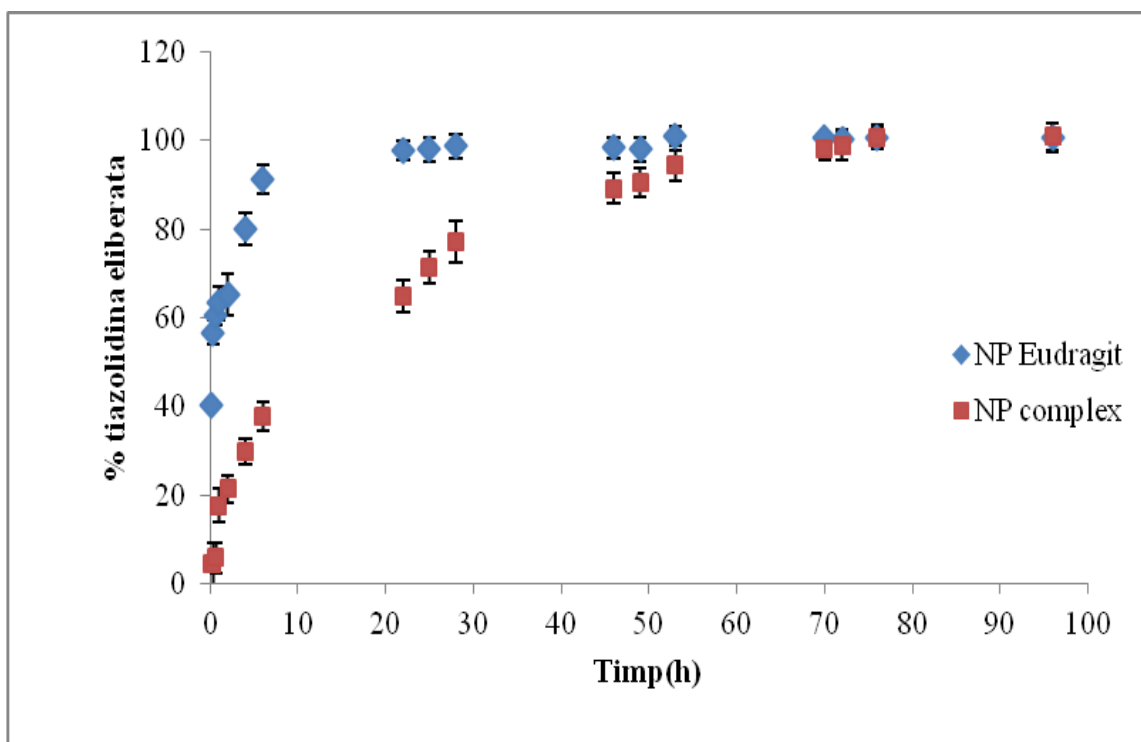


Figura 41. Cinetica procesului de eliberare a 5-Nitro-N-[4-oxo-2-(*p*-nitrofeniltiazolidin)-3-il]-1H-indazol-1-carboxamidă (**IX**) din cele două tipuri de nanoparticule și nanocapsule (exprimată ca eficiență a eliberării).

Aproximativ 95% din cantitatea celei de a doua tiazolidine a fost eliberată după 66 de ore din nanoparticule cu Eudragit în suprafață și după 70 de ore din nanocapsulele acoperite cu complex polielectrolitic (figura 42).

Pentru ambele tiazolidine, indiferent de tipul de nanocapsule în care au fost încărcate, procesul de eliberare decurge cu un "burst effect", mai puțin pronunțat însă în cazul 5-Nitro-N-[4-oxo-2-(*o*-nitrofeniltiazolidin)-3-il]-1H-indazol-1-carboxamidă (**X**) care se eliberează din nanocapsulele acoperite de complex polielectrolitic. Tiazolidina manifestă un proces mai lent de eliberare, posibil datorită solubilității sale mai reduse în mediul de eliberare simulat. Foarte important este însă faptul că eliberarea sa din nanocapsulele acoperite cu complex interpolimeric sugerează o cinetică de ordin "zero", evoluția în timp a procesului fiind practic liniară pe intervalul 3 – 70 ore. Este un aspect important, fiindcă acest comportament apropie sistemul nostru de cele cu comportare ideală.

Eliberarea tiazolidinelor din nanoparticulele cu Eudragit în suprafață se realizează mai rapid. Efectul poate fi determinat de grosimea membranei care acoperă particula. Nanocapsulele acoperite cu complexul polielectrolitic au o membrană evident mai groasă, care întârzie difuzia, pe de o parte a mediului de eliberare înspre interiorul capsulei, pe de altă parte a produsului biologic activ, cu moleculă mare, din miez spre exteriorul capsulei.

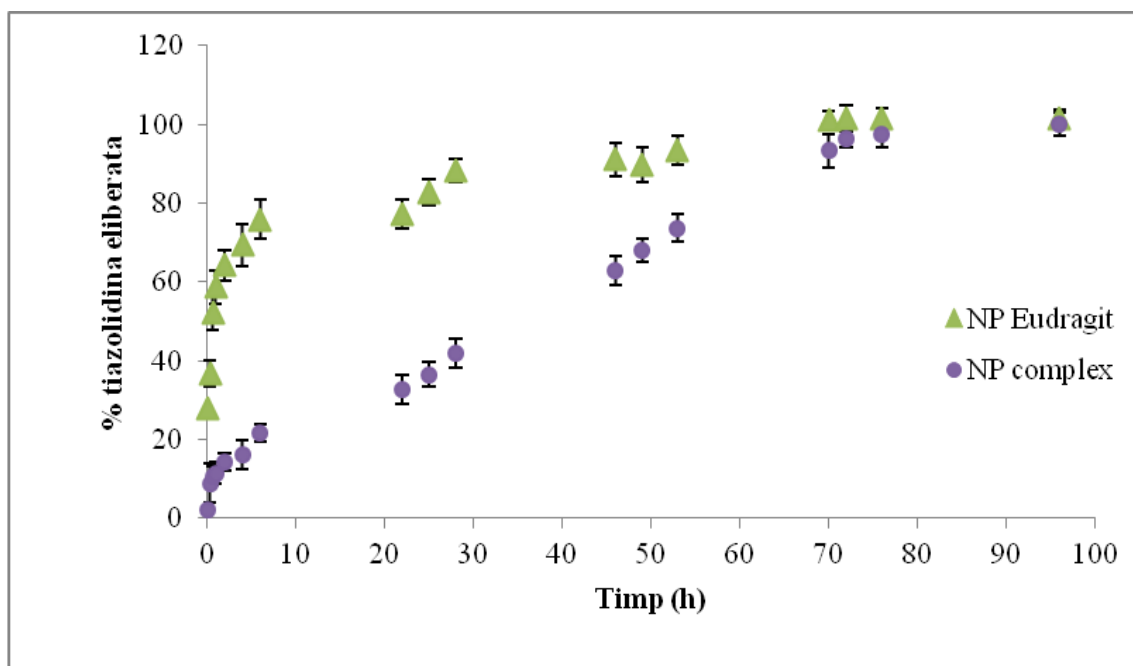


Figura 42. Cinetica procesului de eliberare a 5-Nitro-N-[4-oxo-2-(o-nitrofeniltiazolidin)-3-il]-1H-indazol-1-carboxamidă (**X**) din cele două tipuri de nanoparticule și nanocapsule (exprimată ca eficiență a eliberării).

Studiul efectuat conduce la concluzia că noile sisteme nanoparticulate pot constitui o alternativă la tratamentul antibacterian al cavității orale, ce poate preveni sau ameliora boala parodontală.

CAPITOLUL VIII

MICROPARTICULE POLIMERICE POROASE ÎNCĂRCATE CU 7-(5'-NITROINDAZOL-1'-IL-ACETAMIDIL)-CEFALOSPORINĂ SODATĂ

În general, scopul administrării de medicamente constă în prevenirea îmbolnăvirilor, ameliorarea unor simptome și vindecarea atât a unor boli cu acțiune locală prin aplicarea de soluții sau unguente cât și a bolilor cu acțiune generală prin administrare sistemică, de exemplu antibiotice. Antibioticele β -lactamice (peniciline, cefalosporine, carbapenemi, monobactame) reprezintă o clasă de medicamente cu utilizare foarte largă în terapia infecțiilor bacteriene [309].

Cefalosporinele sunt antibiotice care au ca nucleu de bază acidul 7-amino cefalosporanic, ce cuprinde în structura sa un inel dihidrotiazinic condensat cu un inel beta-lactamic (Figura 43).

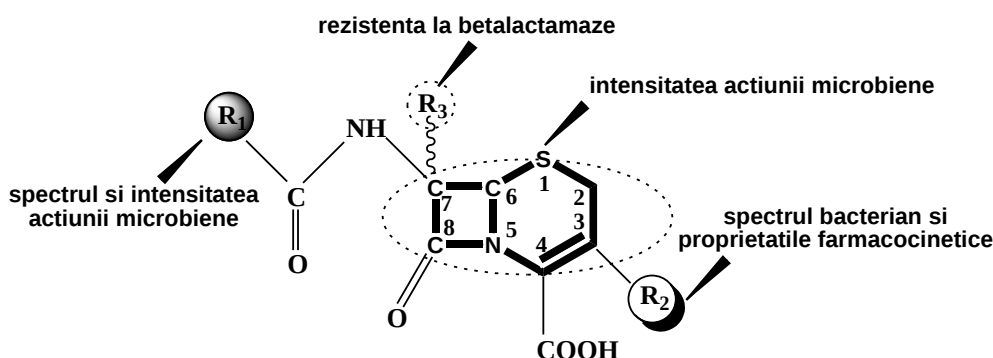


Figura 43. Structura chimică a unei cefalosporine

Activitatea antimicrobiană a cefalosporinelor se caracterizează prin toxicitatea selectivă a acestora față de microorganismele care produc infecția [319-322]. În funcție de spectrul activității antimicrobiene și a ordinii cronologice de obținere a lor se întâlnesc 5 tipuri de cefalosporine (generația 1 – 5).

În prezenta lucrare ne-am propus încapsularea unei cefalosporine noi, sintetizate în cadrul cercetărilor proprii, respectiv 7-NAC.

VIII.1. Obținerea și caracterizarea sistemelor polimer-cefalosporine

Cu ajutorul tehnicii de polimerizare în suspensie s-au obținut 4 tipuri de suporturi polimerice poroase sub formă de microparticule ale căror caracteristici sunt prezentate în Tabelul 24.

Tabel 24. Caracteristici ale suporturilor polimerice utilizate la obținerea de sisteme polimer-medicament

Cod	Compoziție	Diametru (D) (μm)	Grad de umflare (%)	Suprafața specifică S_p^* (m^2/g)
G ₁	GMA:EGDMA-90:10 (mol/mol)	316	88,35	69
G ₂	GMA:EGDMA-80:20 (mol/mol)	243	79,63	58
C ₁	90:10 (mol/mol) GMA:EGDMA + CH	136	162,23	160
C ₂	80:20 (mol/mol) GMA:EGDMA + CH	124	149,15	132

Se cunoaște din literatură că principiile biologice active pot fi incluse prin două metode [328 - 332]:

- prin dizolvarea sau dispersia medicamentului în soluția de polimer, în timpul sintezei microparticulelor;
- prin imersarea microparticulelor formate în soluția principiului biologic activ.

Pentru includerea 7-NAC în microparticule s-a optat pentru varianta a doua, prezența principiului biologic activ inclus fiind pusă în evidență prin spectroscopia FT-IR (Figura 44).

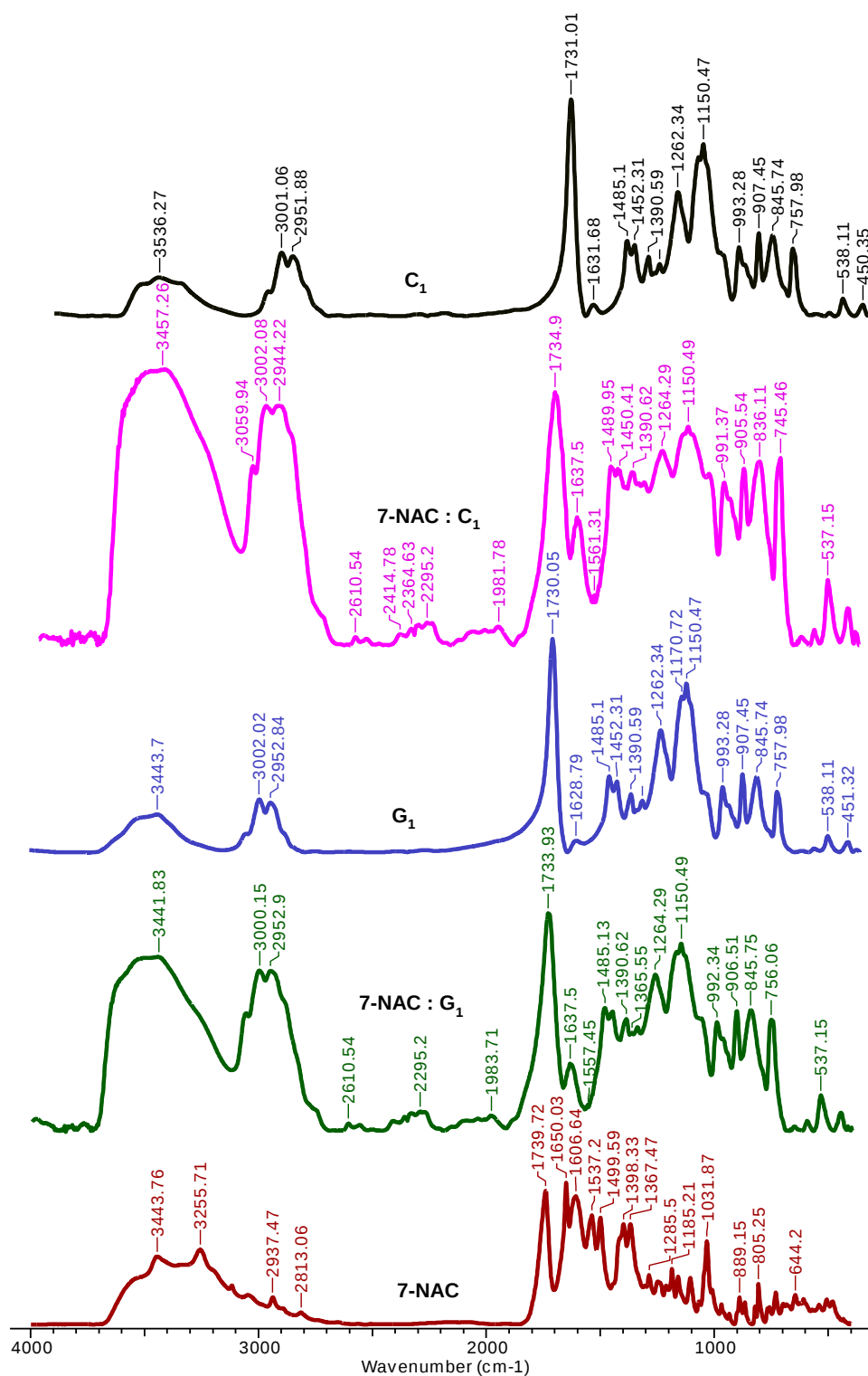


Figura 44. Spectrele FT-IR pentru: 7-NAC, G₁, 7-NAC:G₁, C₁ și 7-NAC:C₁

Prezența principiului biologic activ în structura microparticulelor poroase este evidențiată atât prin apariția unor benzi noi la numărul de undă 1557 cm^{-1} și respectiv 1561 cm^{-1} atribuite vibrației grupei COOH din 7-NAC cât și prin deplasarea benzii de absorbție de la 1730 cm^{-1} către frecvențe mai mari (1734 și 1735 cm^{-1}).

VIII.1.1. Caracterizarea morfologică a microparticulelor

Una dintre metodele de caracterizare a microparticulelor din punct de vedere morfologic este microscopia electronică de baleiaj, cu ajutorul căreia se poate observa forma, dimensiunea și structura generală a microparticulelor (Figura 45).

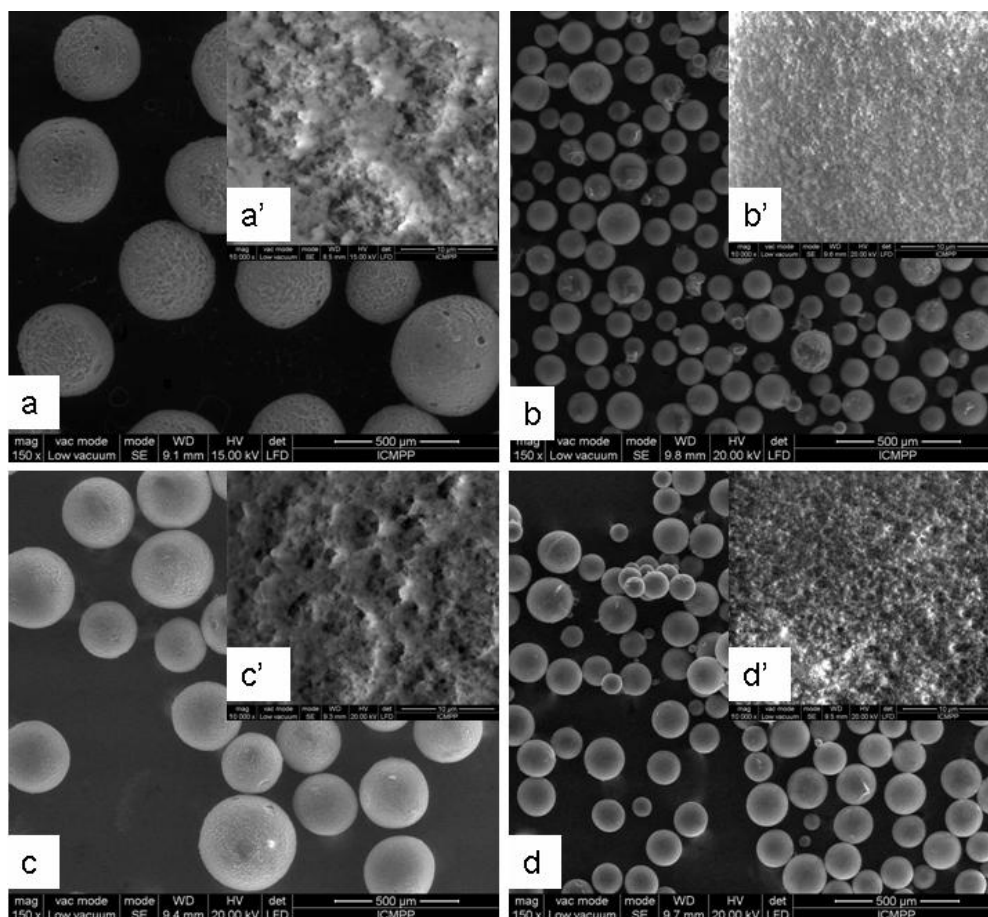


Figura 45. Micrografiile SEM pentru : (a) G_1 ; (b) C_1 ; (c) 7-NAC: G_1 ; (d) 7-NAC: C_1 ; (a, b, c, d) vedere de ansamblu a microparticulelor; (a', b', c', d') detalii ale suprafeței microparticulelor

De asemenea, topografia suprafeței pentru microparticulele de tip G și C și pentru sistemele polimer-medicament a fost evaluată cu ajutorul microscopiei de forță atomică (Figura 46).

Se poate observa că adsorbția 7-NAC pe microparticulele G_1 și C_1 nu determină modificări în ceea ce privește forma și structura poroasă a microparticulelor. Totuși, adsorbția 7-NAC pe microparticulele poroase determină o scădere a rugozității microparticulelor precum și o scădere a diametrului porilor.

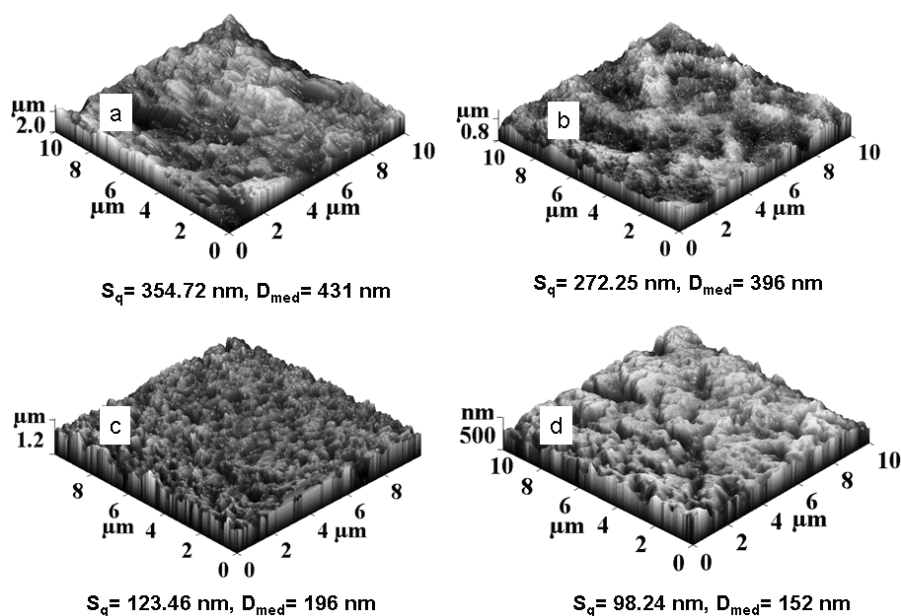


Figura 46. Imagini AFM (3-D) of: (a) G_1 ; (b) 7-NAC: G_1 ; (c) C_1 ; (d) 7-NAC: C_1

VIII.1.2. Studii de adsorbție a derivatului de cefalosporină (7-NAC)

În scopul de a crea un sistem cu eliberare controlată/susținută a principiilor biologice active adecvat este necesar să se găsească condițiile optime pentru adsorbția 7-NAC pe suportul macromolecular. Din acest motiv, s-a studiat influența a diferiți parametri (pH, concentrația inițială a 7-NAC, temperatură, timp de contact, raportul dintre microparticule și 7-NAC, natura reticulantului, raportul dintre GMA și reticulant) asupra procesului de adsorbție a 7-NAC.

VIII.1.2.1. Influența concentrației soluției apoase de 7-NAC și a timpului de contact

În Figura 47 este ilustrată variația cantității maxime a derivatului de cefalosporină adsorbită, la echilibru în funcție de concentrație.

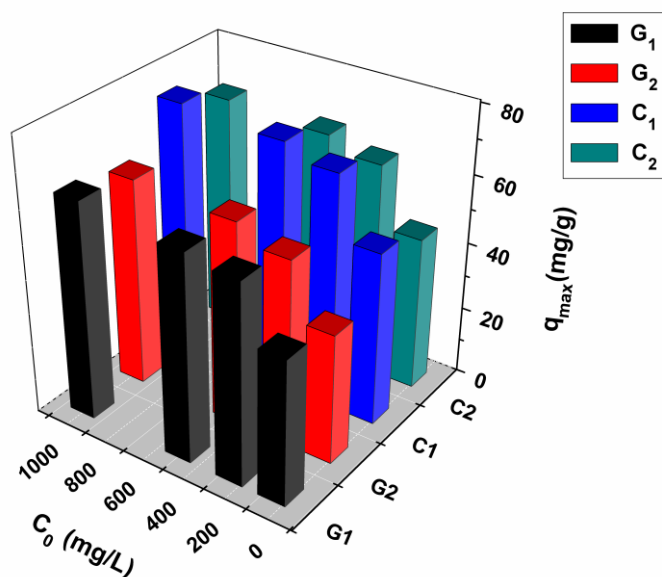


Figura 47. Influența concentrației soluției 7-NAC asupra capacității de adsorbție pe microparticulele de tip G și C la temperatura de 298K

Din figură se constată o creștere a cantității de 7-NAC adsorbit odată cu creșterea concentrației acestuia în soluția de încărcare. Variația cantității de 7-NAC adsorbite pe cele patru tipuri de microparticule respectă următoarea ordine: $C_1 > C_2 > G_1 > G_2$. Creșterea cantității de 7-NAC adsorbită pe microparticulele de tip C se poate pune pe seama prezenței chitosanului din structura microparticulelor, care determină creșterea hidrofiliei microparticulelor de tip C comparativ cu microparticulele de tip G. De asemenea, chitosanul conține în structura sa grupări aminice care pot interacționa cu grupele carboxilice ale 7-NAC prin intermediul legăturilor ionice.

Timpul de contact dintre 7-NAC și microparticule până la atingerea stării de echilibru este 720 minute pentru microparticulele de tip G și 600 minute pentru cele de tip C (Figura 48). Peste aceste valori ale timpului de contact cantitatea de 7-NAC adsorbită rămâne constantă. Perioadă mai scurtă de timp pentru atingerea echilibrului indică o mai bună afinitate a microparticulelor C pentru derivatul de cefalosporină comparativ cu microparticulele G, confirmând concluzia anterioară

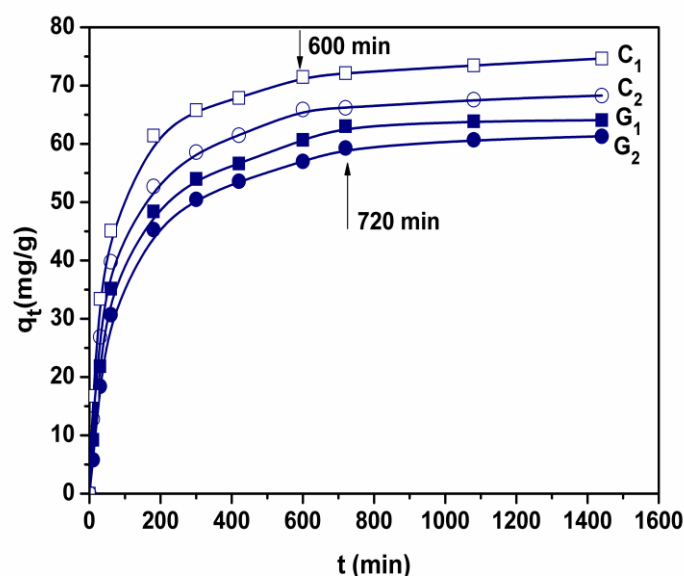


Figura 48. Influența timpului de contact asupra procesului de adsorbție a 7-NAC ($C_{7\text{-NAC}} = 1000 \text{ mg/g}$, $T=298\text{K}$)

VIII.1.2.2. Influența temperaturii

Studiile de adsorbție ale derivatului de cefalosporină pe microparticulele de tip G și C s-au realizat la trei temperaturi diferite: 298, 303 și 313K. În Figura 49 este prezentată influența temperaturii asupra capacității de adsorbție a 7-NAC pe microparticulele G_1 , G_2 , C_1 și C_2 pentru concentrația $C_{7\text{-NAC}} = 1000 \text{ mg/L}$.

Se constată faptul că, adsorbția 7-NAC pe microparticulele de tip G și C este favorizată de temperaturi ridicate. Creșterea temperaturii conduce atât la umflarea microparticulelor cât și la creșterea vitezei de difuzie, facilitând astfel transportul moleculelor 7-NAC pe suprafața și în porii interni ai adsorbantului [333].

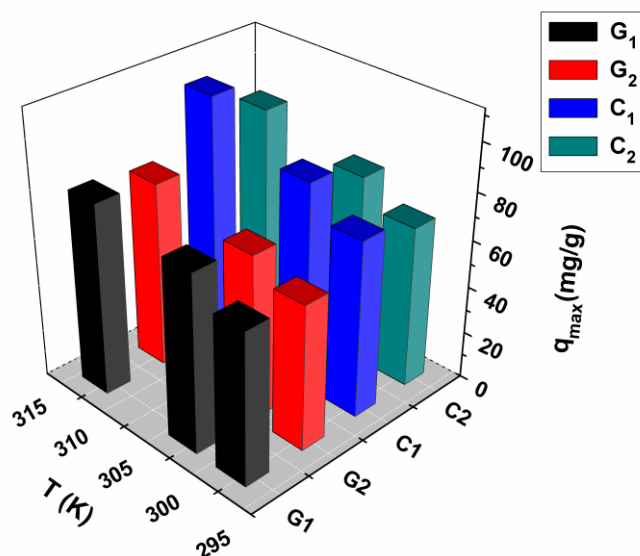


Figura 49. Influența temperaturii asupra capacității de adsorbție a 7-NAC pe microparticulele G₁, G₂, C₁ și C₂ (C_{7-NAC} = 1000 mg/g)

VIII.1.2.3. Influența pH-ului și a raportului microparticule:7-NAC asupra capacității de adsorbție a derivatului de cefalosporină

PH-ul joacă un rol important în întreg procesul de adsorbție influențând atât solubilitatea principiului biologic activ cât și gradul de disociere a grupelor funcționale situate pe suprafața adsorbantului. Din Figura 50 se observă că pH-ul are o influență scăzută în cazul microparticulelor G, aceasta fiind mult mai relevantă pentru microparticulele C. În mediu acid (pH = 3 - 4.5), grupele funcționale de pe suprafața microparticulelor C provenite de la chitosanul grefat (NH₂) sunt protonate având posibilitatea să interacționeze cu moleculele de 7-NAC prin intermediul legăturilor ionice. Atunci când valoarea pH-ului crește are loc o deprotonare a acestor grupe funcționale conducând în final la scăderea cantității de 7-NAC adsorbite. În cazul microparticulelor G și C pH-ul optim pentru adsorbția 7-NAC este 4,5.

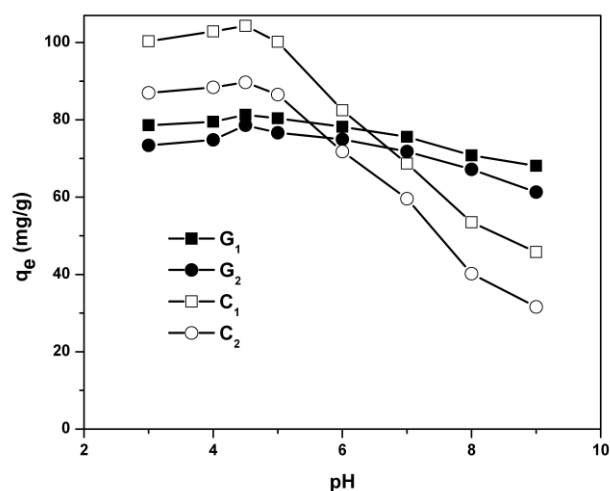


Figura 50. Influența pH-ului asupra capacității de reținere a 7-NAC pe microparticulele G₁, G₂, C₁ și C₂ (C_{7-NAC} = 1000 mg/g, T = 313K)

VIII.1.2.4. Influența raportului dintre GMA și reticulant și a naturii reticulantului asupra capacității de adsorbție a 7-NAC

Influența raportului GMA: reticulant (mol/mol) și a naturii reticulantului asupra capacității de adsorbție a 7-NAC este ilustrată în Figurile 61 și 62.

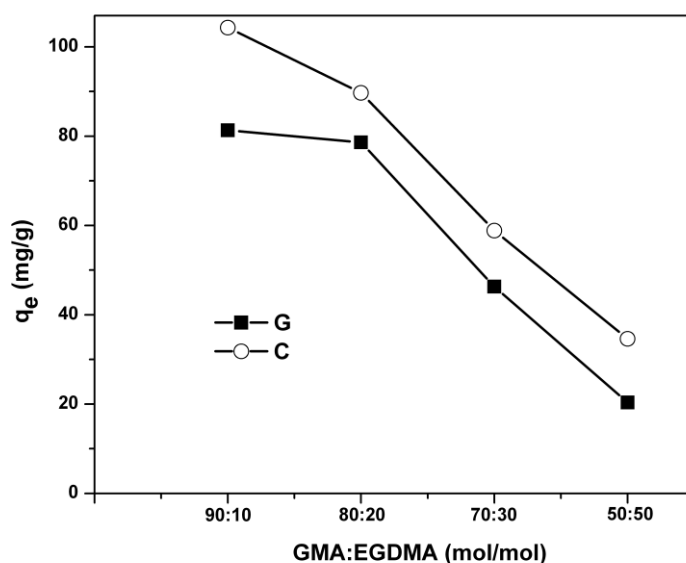


Figura 61. Influența raportului GMA:EGDMA (mol/mol) asupra capacității de reținere a 7-NAC pe microparticulele G, și C ($C_{7\text{-NAC}} = 1000 \text{ mg/g}$, $T = 313\text{K}$, $\text{pH} = 4,5$, microparticule:7-NAC = 2:1 g/g)

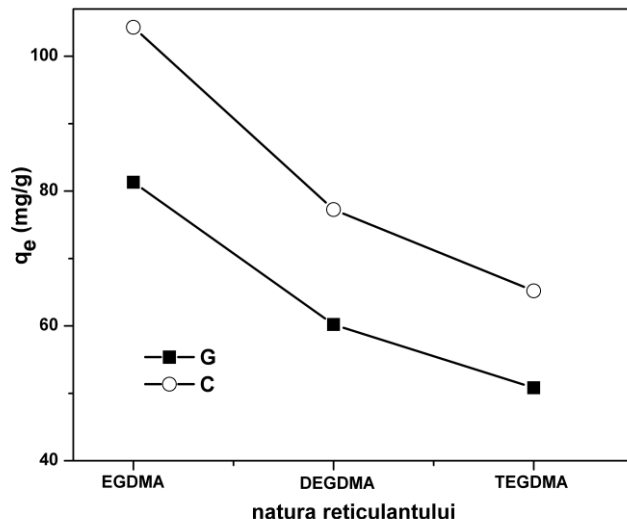


Figura 62. Influența naturii reticulantului asupra capacității de reținere a 7-NAC pe microparticulele G și C ($C_{7\text{-NAC}} = 1000 \text{ mg/g}$, $T = 313\text{K}$, $\text{pH} = 4,5$, microparticule:7-NAC = 2:1 g/g, GMA:reticulant = 90:10 mol/mol)

Creșterea cantității de reticulant (EGDMA, DEGDMA și TEGDMA) și natura chimică a reticulantului (în sensul modificării numărului de unități de etilen glicol) determină o scădere a capacității de adsorbție a 7-NAC. Această comportare poate fi pusă pe seama complexității mecanismului de polimerizare reticulantă, care include reacții intra și intermoleculare dar și reacții de ciclizare conducând în final la obținerea de microparticule cu structuri compacte, suprafețe specifice mici și hidrofilie redusă. *Creșterea cantității de*

reticulant conduce la o rigidizare a rețelei polimere prin creșterea numărului de punți de reticulare având ca rezultat scăderea capacității de adsorbție a suporturilor macromoleculare.

Evaluarea procesului de adsorbție a 7-NAC pe cele patru tipuri de microparticule s-a realizat atât din punct de vedere cinetic cât și a echilibrului de adsorbție.

VIII.1.3. Studii cinetice de adsorbție

Mecanismul de adsorbție a 7-NAC pe microparticulele G_1 , G_2 , C_1 și C_2 a putut fi explicat cu ajutorul a trei modele cinetice: modelul Lagergren (modelul cinetic de ordinul I), modelul Ho (modelul cinetic de ordin II) și modelul difuziei intraparticulă Weber-Morris. Interpretarea datelor cinetice s-a realizat pentru $C_{7-NAC} = 1000$ mg/L, aceasta fiind concentrația pentru care s-a determinat cea mai mare cantitate de derivat de cefalosporină reținută. Pentru o interpretare cât mai exactă a datelor experimentale s-a folosit în cazul modelelor Lagergren și Ho tehnica de regresie neliniară iar pentru modelul Weber-Morris s-a utilizat tehnica fitării liniare. Pentru a măsura gradul de filtrare a datelor experimentale după modelele teoretice s-au utilizat două funcții statistice de eroare și anume: factorul de corelație R^2 și testul neliniar χ^2 care se calculează conform relației:

$$\chi^2 = \sum \frac{(q_{\text{măsurat}} - q_{\text{calculat}})^2}{q_{\text{calculat}}} \quad (17)$$

unde $q_{\text{măsurat}}$ și q_{calculat} reprezintă capacitățile de adsorbție obținute din datele experimentale și respectiv cea calculată din datele teoretice ale modelului studiat [334].

S-a constatat că modelul Lagergren nu descrie procesul de adsorbție a 7-NAC. Modelul cinetic de ordinul II (Ho) descrie destul de bine datele experimentale.

Cel mai adecvat s-a dovedit modelul Weber-Morris, rezultatele obținute fiind prezentate mai jos.

VIII.1.3.3. Modelul difuziei intraparticulă Weber-Morris

Pentru a identifica mecanismul specific de adsorbție s-a utilizat modelul Weber-Morris care este descris de ecuația [337]:

$$q_t = k_{id} \cdot t^{1/2} + C_i \quad (20)$$

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

Din reprezentarea grafică q_t funcție de $t^{1/2}$ se poate calcula valoarea constantelor K_{id} și C_i ca fiind panta și respectiv interceptul cu ordonata.

Adsorbția este controlată exclusiv de difuzia intra-particulă atunci când reprezentarea grafică a modelului Weber-Morris reprezintă o dreaptă ce trece prin origine. În cazul în care reprezentarea grafică a modelului difuziei intra-particulă prezintă mai multe porțiuni liniare atunci procesul de adsorbție poate avea două sau mai multe etape [338].

În Figura 65 este reprezentat modelul Weber-Morris în cazul adsorbției 7-NAC pe microparticulele de tip G și C la temperatura de 313 K.

Așa cum se poate observa, procesul de adsorbție studiat are trei etape:

- (1) adsorbția rapidă pe suprafața adsorbantului sau treapta de adsorbție instantanee;
- (2) adsorbția treptată unde probabil etapa determinantă de viteză este difuzia intra-particulă;
- (3) etapa finală de echilibru datorată concentrației scăzute de 7-NAC din faza lichidă, precum și a numărului mai mic de centri activi disponibili.

Valorile parametrilor corespunzători modelului Weber-Morris și a factorului de corelație R^2 sunt prezentate în Tabelul 27.

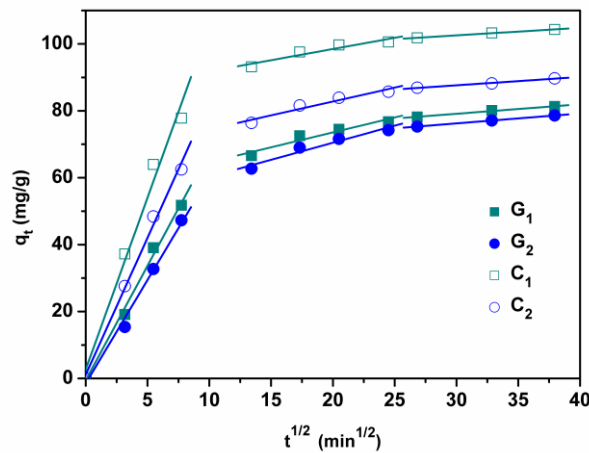


Figura 65. Reprezentarea grafică a modelului Weber-Morris în cazul adsorbției 7-NAC pe microparticulele G_1 , G_2 , C_1 și C_2

Valorile C_{i2} cresc cu creșterea temperaturii, ceea ce indică creșterea grosimii stratului limită și scăderea transferului de masă extern, adică creșterea transferului de masă intern. De asemenea, se observă că valorile C_{i2} cresc în următoarea ordine: $C_1 > C_2 > G_1 > G_2$ ceea ce confirmă că cel mai bun adsorbant este microparticula C_1 .

Tabel 27. Valorile parametrilor modelului Weber-Morris în cazul adsorbției 7-NAC pe microparticulele G_1 , G_2 , C_1 și C_2

Cod probă	Parametrii modelului Weber-Morris	Temperatura (K)		
		298	303	313
G_1	K_{i2} (mg/(g·min ^{1/2}))	0,892	0,902	0,919
	C_{i2}	37,038	48,506	55,714
	R^2	0,995	0,996	0,994
G_2	K_{i2} (mg/(g·min ^{1/2}))	1,020	1,049	1,118
	C_{i2}	31,733	38,886	50,064
	R^2	0,993	0,995	0,995
C_1	K_{i2} (mg/(g·min ^{1/2}))	0,670	0,685	0,806
	C_{i2}	51,146	66,776	85,090
	R^2	0,994	0,994	0,993
C_2	K_{i2} (mg/(g·min ^{1/2}))	0,830	0,845	0,921
	C_{i2}	43,020	52,907	66,196
	R^2	0,993	0,993	0,994

Pe baza acestor rezultate se poate concluziona că difuzia intra-particulă nu este singurul proces care influențează viteza de adsorbție.

Știind că mecanismul de adsorbție a diferiților adsorbați poate fi explicat fie de difuzia prin film fie de difuzia prin pori, atunci pentru a evalua mecanismul de difuzie s-a aplicat un model bazat pe legea lui Fick [339]. Mecanismul de difuzie prin film poate fi exprimat prin următoarea ecuație:

$$\ln(1-F) = \ln\left(\frac{6}{\pi^2}\right) - \left(\frac{D_f}{r_0^2}\right) \cdot \pi^2 \cdot t \quad (21)$$

unde D_f este coeficientul de difuzie prin film (cm²s⁻¹), F este raportul dintre cantitatea de derivat de cefalosporină la momentul t și cantitatea de derivat de cefalosporină la echilibru

($F = \frac{q_t}{q_e}$), r_0 raza microparticulelor cu geometrie sferică [r_0 (G_1) = 158 μ m, r_0 (G_2) = 121,5 μ m, r_0 (C_1) = 68 μ m, r_0 (C_2) = 62 μ m]. Valoarea coeficientului de difuzie prin film s-a determinat din panta (P_i) a reprezentării liniare $\ln(1-F)$ funcție de t .

$$D_f = -\frac{P_i \cdot r_0^2}{\pi^2} \quad (22)$$

Mecanismul de difuzie prin pori este exprimat de ecuația liniară:

$$F = \frac{6}{r_0} \left(-\frac{D_p \cdot t}{\pi} \right)^{1/2} \quad (23)$$

unde D_p este coeficientul de difuzie prin pori (cm^2s^{-1}) și se obține din panta (P_{ii}) a reprezentării liniare F funcție de $t^{1/2}$ conform relației:

$$D_p = \frac{P_{ii}^2 \pi r_0^2}{36} \quad (24)$$

În Tabelul 28 sunt prezentate valorile D_f și D_p ale microparticulelor poroase la cele trei temperaturi: 298K, 303K și 313K.

Tabel 28. Valorile coeficienților de difuzie D_f și D_p

Cod probă	Coeficienții de difuzie	Temperatura (K)		
		298	303	313
G₁	$D_f \times 10^{-9} (\text{cm}^2\text{s}^{-1})$	1,438	1,459	1,491
	$D_p \times 10^{-12} (\text{cm}^2\text{s}^{-1})$	1,296	1,564	1,819
G₂	$D_f \times 10^{-9} (\text{cm}^2\text{s}^{-1})$	0,808	0,837	0,853
	$D_p \times 10^{-12} (\text{cm}^2\text{s}^{-1})$	1,068	1,245	1,302
C₁	$D_f \times 10^{-9} (\text{cm}^2\text{s}^{-1})$	0,416	0,473	0,488
	$D_p \times 10^{-12} (\text{cm}^2\text{s}^{-1})$	0,255	0,357	0,451
C₂	$D_f \times 10^{-9} (\text{cm}^2\text{s}^{-1})$	0,289	0,303	0,314
	$D_p \times 10^{-12} (\text{cm}^2\text{s}^{-1})$	0,229	0,294	0,352

Atunci când difuzia prin film este procesul ce influențează viteza, coeficientul de difuzie D_f are valori cuprinse în intervalul 10^{-6} - $10^{-8} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$ [340]. Dacă difuzia prin pori este procesul care influențează viteza de adsorbție atunci valorile coeficientului de difuzie D_p sunt cuprinse în intervalul 10^{-11} - $10^{-13} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$ [341]. În acest studiu, analiza datelor experimentale arată că valorile coeficienților de difuzie prin film și prin pori sunt de ordinul 10^{-9} și respectiv $10^{-12} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$, ceea ce indică că adsorbția derivatului de cefalosporină 7-NAC pe microparticulele G_1 , G_2 , C_1 și C_2 a fost controlată atât de mecanismul difuziei prin film cât și a difuziei prin pori. De asemenea, se observă că valorile coeficienților D_f și D_p cresc cu creșterea temperaturii și a razei microparticulelor sferice.

VIII.1.4. Izotermele de adsorbție

Cunoașterea modului de interacțiune dintre un adsorbat (faza lichidă) și un adsorbant (faza solidă) este crucială pentru evaluarea și obținerea unui sistem eficient. Pentru descrierea caracteristicilor echilibrului de adsorbție a 7-NAC pe microparticulele de tip G și C s-au utilizat patru izoterme cu doi parametri (Langmuir, Freundlich, Temkin și Dubinin-Radushkevich) și patru izoterme cu trei parametri (Sips, Redlich-Peterson, Khan și Toth). Dintre acestea, izoterma Langmuir descrie cel mai bine procesul, în cele ce urmează discutându-se doar acestea.

VIII.1.4.1.1. Izoterma Langmuir

Izoterma Langmuir este utilizată în mod frecvent pentru a descrie procesul de adsorbție pe diferiți adsorbanti [342, 343]. Acest model pornește de la ipoteza că adsorbția are loc în monostrat la un număr finit de centre specifice de adsorbție. Izoterma Langmuir este descrisă de ecuația:

$$q_e = \frac{q_m K_L C_e}{1 + K_L C_e} \quad (25)$$

unde: q_e reprezintă cantitatea de 7-NAC sorbit la echilibru (mg/g); q_m reprezintă cantitatea maximă adsorbită (mg/g); C_e este concentrația de 7-NAC în soluție la echilibru iar K_L este constanta Langmuir (L/g) care reflectă afinitatea dintre adsorbat și adsorbant. În anul 1974, Weber și Chakrovot [344] au introdus constanta de echilibru R_L pentru a pune în evidență dacă un anumit sistem de adsorbție este “favorabil sau nefavorabil”. Constanta R_L se poate calcula conform relației:

$$R_L = \frac{1}{1 + K_L \cdot C_0} \quad (26)$$

unde C_0 este concentrația inițială. Adsorbția este considerată favorabilă în cazul în care valoarea R_L este cuprinsă în intervalul 0 și 1 ($0 < R_L < 1$). Pentru valori $R_L > 1$ adsorbția este nefavorabilă, când $R_L = 0$ adsorbția este ireversibilă iar dacă $R_L = 1$ atunci adsorbția este liniară.

În Figura 66 sunt reprezentate grafic fitările neliniare ale izotermei Langmuir în cazul adsorbției derivatului de cefalosporină pe microparticulele G_1 , G_2 , C_1 și C_2 .

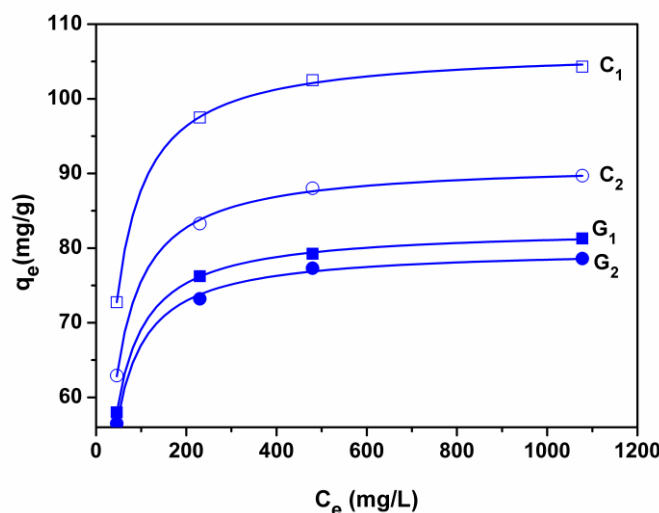


Figura 66. Izotermele de adsorbție Langmuir pentru microparticulele G_1 , G_2 , C_1 , și C_2

Valorile parametrilor izotermei Langmuir pentru toate cele trei temperaturi studiate, a factorului de corelație R^2 și a testului neliniar χ^2 sunt prezentate în Tabelul 28. Toate valorile R_L prezentate în Tabelul 28 au fost calculate pentru soluțiile de 7-NAC cuprinse în intervalul de concentrație 50 – 1000 mg/L.

Din analiza parametrilor izotermei Langmuir se pot trage următoarele concluzii:

- valorile cantității maxime adsorbite, q_m determinate utilizând modelul Langmuir sunt apropiate de valorile experimentale prezentate în Tabelul 28;
- capacitatea de saturație crește cu creșterea temperaturii, ceea ce reflectă o mai bună accesibilitate la centrul de adsorbție de pe suprafața microparticulelor;
- valoarea cea mai mare a constantei Langmuir, K_L s-a obținut în cazul microparticulelor C_1 , ceea ce demonstrează o capacitate mai mare de adsorbție a derivatului de cefalosporină comparativ cu celelalte microparticule;
- valorile K_L cresc cu creșterea temperaturii indicând o eficiență mai mare a adsorbției derivatului de cefalosporină la temperaturi mai ridicate;
- în cadrul celor două seturi de microparticule G_1 și C_1 respectiv G_2 și C_2 valorile K_L scad cu creșterea diametrului microparticulei [D_p (G_1) = 316 μm , D_p (C_1) = 136 μm , D_p

(G_2) = 243 μm , D_p (C_2) = 124 μm], sugerând că microparticulele cu dimensiuni mici tind să aibă o capacitate mai mare pentru adsorbția derivatului de cefalosporină.

Tabel 28. Valorile parametrilor izotermei Langmuir în cazul adsorbției 7-NAC pe microparticulele G_1 , G_2 , C_1 și C_2

4Cod probă	Parametrii modelului Langmuir	Temperatura (K)		
		298	303	313
G_1	q_m (mg/g)	64,956	76,669	82,653
	$K_L \times 10^2$ (L/mg)	3,844	4,310	5,117
	R_L	0,025-0,342	0,023-0,317	0,019-0,281
	R^2	0,996	0,999	0,999
	χ^2	0,564	0,155	0,025
G_2	q_m (mg/g)	62,814	71,803	80,054
	$K_L \times 10^2$ (L/mg)	3,491	3,886	4,565
	R_L	0,028-0,364	0,025-0,340	0,021-0,305
	R^2	0,996	0,999	0,998
	χ^2	0,751	0,072	0,244
C_1	q_m (mg/g)	76,138	89,263	106,325
	$K_L \times 10^2$ (L/mg)	4,361	4,986	6,026
	R_L	0,022-0,314	0,020-0,286	0,016-0,249
	R^2	0,999	0,999	0,999
	χ^2	0,126	0,063	0,158
C_2	q_m (mg/g)	70,035	80,832	91,216
	$K_L \times 10^2$ (L/mg)	3,955	4,406	5,318
	R_L	0,025-0,336	0,022-0,312	0,018-0,273
	R^2	0,999	0,999	0,998
	χ^2	0,127	0,106	0,348

- valorile R_L calculate la 298, 303 și 313K pentru toate concentrațiile soluției de 7-NAC au fost cuprinse între 0 și 1, ceea ce indică faptul că procesul de adsorbție este favorabil în condițiile de lucru studiate;
- pentru fiecare tip de microparticulă valoarea R_L scade cu creșterea temperaturii, sugerând o creștere a afinității între 7-NAC și microparticule la temperaturi ridicate;
- valorile mari obținute pentru factorul de corelație (0,996-0,999) și valorile mici pentru χ^2 (0,025-0,751) arată ca modelul Langmuir descrie destul de bine adsorbția derivatului de cefalosporină 7-NAC pe microparticulele G_1 , G_2 , C_1 și C_2 .

VIII.1.5. Determinarea parametrilor termodinamici

Pentru a descrie comportamentul termodinamic al sistemelor studiate au fost calculați parametrii termodinamici: energia liberă Gibbs (ΔG), variațiile de entalpie (ΔH) și entropie (ΔS).

Valorile ΔH și ΔS s-au calculat din ecuația Van't Hoff:

$$\ln K = \frac{\Delta S}{R} - \frac{\Delta H}{RT} \quad (35)$$

unde K este constanta de echilibru, care poate fi obținută din izotermele Langmuir pentru diferite temperaturi [354].

Reprezentarea liniară a ecuației Van't Hoff este prezentată în Figura 73.

În Tabelul 36 sunt prezentate valorile ΔH , ΔS obținute din panta și interceptul cu ordonata a reprezentării liniare a ecuației Van't Hoff precum și valorile ΔG calculate conform ecuației termodinamice:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (36)$$

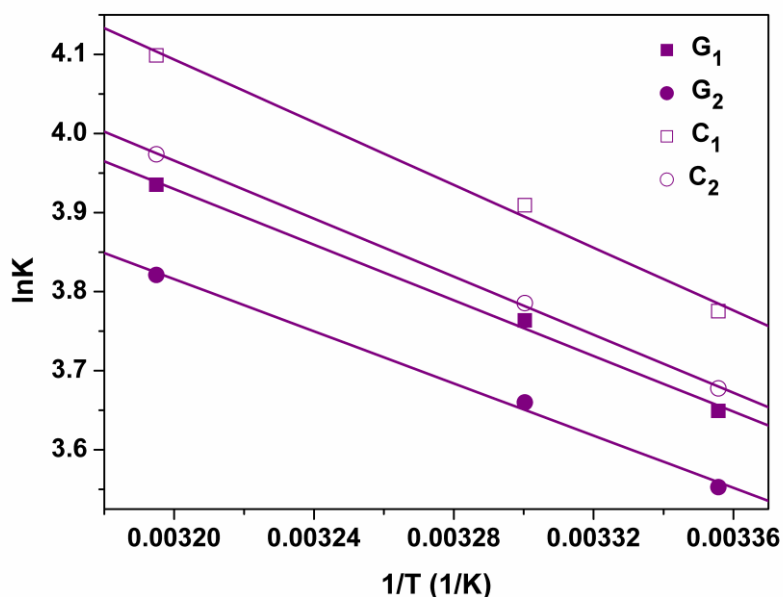


Figura 73. Reprezentarea grafică a $\ln K$ în funcție de $1/T$ în vederea estimării parametrilor termodinamici în cazul adsorbției 7-NAC pe microparticulele G_1 , G_2 , C_1 și C_2 .

Tabel 36. Parametrii termodinamici pentru adsorbția 7-NAC pe microparticulele G_1 , G_2 , C_1 și C_2 la diferite temperaturi

Cod probă	ΔH (kJ/mol)	ΔS (J/mol)	ΔG (kJ/mol)			R^2
			298 K	303 K	313 K	
G_1	14,623	79,466	-9,058	-9,455	-10,250	0,998
G_2	13,713	75,607	-8,818	-9,196	-9,952	0,997
C_1	16,484	86,782	-9,377	-9,811	-10,679	0,999
C_2	15,246	81,758	-9,118	-9,526	-10,344	0,998

Se observă că valorile ΔH cuprinse între 13,713- 16,484 kJ/mol și respectiv valorile ΔG cuprinse între -10,679 și - 8,818 kJ/mol indică faptul că interacțiunile dintre microparticulele G_1 , G_2 , C_1 și C_2 și derivatul de cefalosporină sunt de natură fizică.

Valorile negative ale lui ΔG arată că procesul de adsorbție a 7-NAC pe microparticulelor G_1 , G_2 , C_1 și C_2 la toate temperaturile este spontan și favorabil din punct de vedere termodinamic. De asemenea, valorile negative ale lui ΔG descresc cu creșterea temperaturii ceea ce demonstrează că adsorbția derivatului de cefalosporină este favorabilă la temperaturi mai ridicate. Valorile pozitive ale lui ΔH indică că procesul de adsorbție studiat este endotermic. Afinitatea microparticulelor G_1 , G_2 , C_1 și C_2 pentru derivatul de cefalosporină este reflectată de valoarea pozitivă a lui ΔS . Valorile pozitive ale lui ΔS reflectă de asemenea o redistribuire a energie între adsorbant și 7-NAC. Deoarece $\Delta H > 0$ și $\Delta S > 0$ adsorbția are loc spontan la toate temperaturile.

VIII.1.6. Energia de activare

Informații cu privire la natura procesului de adsorbție care poate fi fizică sau chimică se pot obține calculând energia de activare (E_a). Se știe din datele de literatură că în cazul când procesul de adsorbție este un proces de natură fizică atunci energia de activare este mică (5-40 kJ/mol) în timp ce în cazul când procesul de adsorbție este un proces chimic, energia de activare are valori mai ridicate (40-800 kJ/mol) [356].

Energia de activare se calculează utilizând forma liniară a ecuației lui Arrhenius [357]:

$$\ln k_2 = \ln A - \frac{E_a}{RT} \quad (38)$$

Din reprezentarea liniară $\ln k_2$ funcție de $1/T$ (Figura 74) s-au obținut valorile pentru E_a și A ca fiind panta și respectiv interceptul cu ordonata, valori ce sunt prezentate în Tabelul 37.

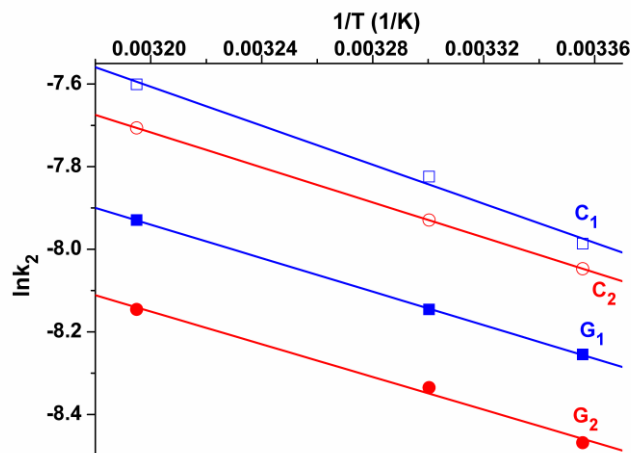


Figura 74. Reprezentarea grafică $\ln k_2$ funcție de $1/T$ pentru determinarea energiei de activare în cazul adsorbției 7-NAC pe microparticulele G_1 , G_2 , C_1 și C_2

Tabel 37. Valorile E_a și A calculați conform ecuației lui Arrhenius

	G_1	G_2	C_1	C_2
E_a (kJ/mol)	16,854	16,454	19,629	17,621
A	0,234	0,162	0,950	0,393

Din Tabelul 37 se observă că valorile energiei de activare sunt cuprinse în intervalul 16,454 - 19,629 kJ/mol ceea ce confirmă că procesul de adsorbție a derivatului de cefalosporină 7-NAC pe microparticulele G_1 , G_2 , C_1 și C_2 este de natură fizică. De asemenea, valoarea pozitivă a energiei de activare sugerează că creșterea temperaturii favorizează adsorbția derivatului de cefalosporină și deci acest proces este de natură endotermă. Atât valorile pentru energia de activare cât și pentru factorul pre-exponențial cresc în ordinea: $G_2 < G_1 < C_2 < C_1$.

VIII.2. Studii de eliberare a derivatului de cefalosporină 7-NAC din microparticule poroase

Pentru studiile de eliberare au fost selectate sistemele polimer-principiu biologic activ pe bază de microparticule G_1 și C_1 , deoarece acestea au manifestat cea mai mare capacitate de adsorbție a 7-NAC.

Studiile de eliberare a derivatului de cefalosporină 7-NAC din sistemele 7-NAC: G_1 și 7-NAC: C_1 au fost realizate atât la un pH de 1,2 cât și la un pH de 7,4 iar în Figura 75 sunt ilustrate curbele de eliberare a principiului biologic activ.

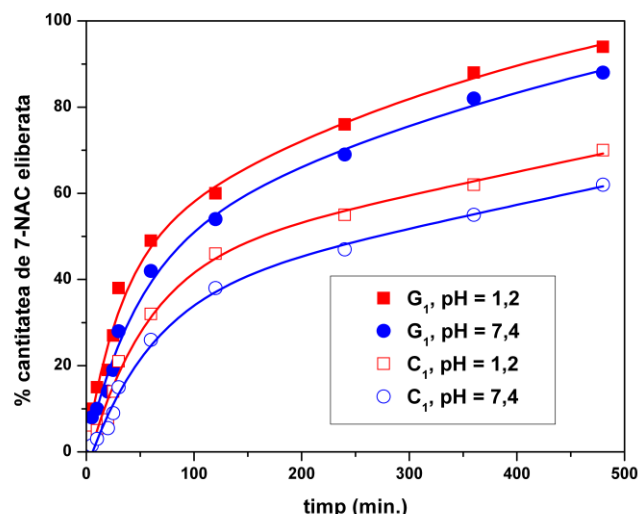


Figura 75. Curbele de eliberare a 7-NAC din microparticulele G₁ și C₁ la pH = 1,2 și pH = 7,4

Din reprezentarea grafică se observă că eliberarea 7-NAC din microparticulele G₁ are loc în două trepte. Prima treaptă, care are loc cu o viteză mai mare poate fi atribuită eliberării derivatului de cefalosporină de pe suprafața microparticulelor. A doua treaptă caracterizată de o viteză mai mică de eliberare a 7-NAC este atribuită umflării rețelei polimerice și difuziei simultane a cefalosporinei din porii microparticulelor. De asemenea, se observă că procesul de eliberare din microparticulele G₁ este foarte puțin afectat de pH-ul mediului de eliberare.

În cazul microparticulelor C₁, eliberarea este mai rapidă în soluția tampon ce simulează sucul gastric decât în soluția tampon fosfat, acest fenomen fiind explicat prin faptul că la pH = 1,2 microparticulele C₁ prezintă un grad de umflare mai mare decât în pH = 7,4 probabil datorită prezenței chitosanului în structura acestora.

Interpretarea cineticii de eliberare a derivatului de cefalosporină din microparticulele G₁ și C₁ s-a realizat utilizând trei modele matematice (Higuchi, Korsmeyer-Peppas și Baker-Lonsdale). Modelul Higuchi, conceput inițial pentru sisteme plane și apoi extins pentru sisteme cu diferite geometrii și structuri poroase [359], descrie destul de bine procesul de eliberare.

Din considerente de spațiu însă, în cele ce urmează va fi discutat doar modelul Korsmeyer-Peppas, care pe lângă faptul că s-a dovedit cel mai adecvat, permite și obținerea unor informații suplimentare.

VIII.2.2. Modelul Korsmeyer-Peppas

În 1983 Korsmeyer și colaboratorii săi [360] au propus o relație matematică ce poate fi utilizată la eliberarea medicamentelor din sisteme polimerice:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k_r \cdot t^n \quad (40)$$

unde, $\frac{M_t}{M_\infty}$ este procentul de medicament eliberat la timpul t ; k_r reprezintă constanta caracteristică a interacțiunii medicament-polimer și n este exponentul difuzional caracteristic mecanismului de eliberare.

Modelul este completat ulterior de Peppas, devenind modelul de studiu cinetic de eliberare cel mai utilizat în prezent.

Valoarea lui n se utilizează pentru a caracteriza mecanismul de eliberare. În cazul microparticulelor valorile parametrului n sunt prezentate în Tabelul 38.

Tabel 38. Interpretarea mecanismelor de eliberare în cazul microparticulelor

n	Mecanismul de eliberare
0,43	mecanism de difuzie de tip Fick
$0,43 < n < 0,85$	mecanism de difuzie anormală sau non-Fickiană
$n > 0,85$	mecanismul de eliberare este controlat de fenomenul de relaxare a lanțurilor polimere

Curbele cineticii de eliberare utilizând modelul Korsmeyer-Peppas sunt prezentate în Figura 77.

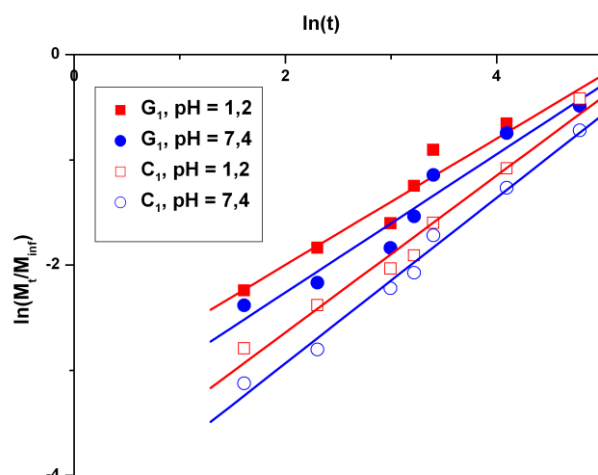


Figura 77. Cinetica de eliberare a 7-NAC din microparticulele G_1 și C_1 utilizând modelul Korsmeyer-Peppas

Valorile parametrilor cinetici calculați utilizând cele trei modele matematice în cazul procesului de eliberare a 7-NAC din microparticulele G_1 și C_1 sunt prezentate în Tabelul 39.

Tabel 39. Parametrii cinetici ai procesului de eliberare a 7-NAC din microparticulele G_1 și C_1

Cod probă	Model Higuchi		Model Korsmeyer-Peppas		
	$k_H (h^{-1/2})$	R^2	$k_r (min^{-n})$	n	R^2
$G_1, pH = 1,2$	4,32	0,979	0,0408	0,601	0,974
$G_1, pH = 7,4$	4,28	0,986	0,0280	0,657	0,975
$C_1, pH = 1,2$	3,51	0,977	0,0161	0,745	0,988
$C_1, pH = 7,4$	3,21	0,85	0,0110	0,787	0,994

Analizând valorile parametrilor cinetici ale proceselor de eliberare pentru derivatul de cefalosporină prezentate în Tabelul 17 se pot trage următoarele concluzii:

- (1) viteza de eliberare a 7-NAC din microparticulele C_1 este mai mică decât cea corespunzătoare microparticulelor G_1 , sugerând faptul că în cazul sistemului 7-NAC: C_1 apar interacțiuni mult mai puternice între cei doi parteneri. Acestea s-ar putea datora prezenței chitosanului care are în structura sa grupări aminice capabile să formeze legături ionice cu grupele carboxilat ce provin de la 7-NAC;
- (2) datorită faptului că valorile exponentului difuzional, n , din ecuația Korsmeyer-Peppas sunt cuprinse între 0,601-0,787 se poate afirma că mecanismul de eliberare este unul complex fiind caracteristic unei difuzii anormale sau non-Fickiană, sugerând că transportul 7-NAC este controlat atât de difuzie cât și de procesul de umflare.

CONCLUZII

Cercetările abordate în cadrul tezei de doctorat cuprind două direcții distincte: principalele etape care intervin în sinteza noilor derivați indazolici cu activitate biologică cât mai specifică și administrarea lor în noi formulări polimere ce diminuează riscul unor efecte secundare nedorite și asigură eliberarea susținută a principiului biologic activ.

Se deduc următoarele:

1. S-a realizat un studiu de literatură asupra consecințelor maladii parodontale, evidențierea principalelor tendințe de cercetare în clasa derivaților indazolici și în domeniul nanoparticulelor polimere.

2. S-a preparat esterul etilic al acidului 5-nitroindazol-1-il-formic folosind ca reactanți sarea de sodiu a 5-nitroindazolului și cloroformiatul de etil, în soluție etanolică. Calea abordată a permis ca produsul finit să se obțină într-un timp de contact scurt și cu randament avantajos.

3. S-a sintetizat 5-nitro-1H-indazol-1-carbohidrazida prin reacția dintre N-etilcarboxilat-5-nitroindazol și hidrat de hidrazină în soluție etanolică, la temperatura camerei. Produsul s-a obținut cu randament superior și puritate ridicată.

4. S-a preparat o serie de patru noi hidrazidone prin reacția de condensare a 5-nitro-1H-indazol-1-carbohidrazidei cu diverse aldehide aromatice nesubstituie sau substituie, pentru a putea evalua comparativ, influența grupelor substituente asupra activității antifungice a 5-nitro-N'-ariliden-1H-indazol-1-carbohidrazidelor sintetizate.

5. Folosind un model matematic 3^2 factorial s-a optimizat reacția de sinteză a hidrazidonelor derivate de la 5-nitro-1H-indazol-1-carbohidrazidă.

6. Hidrazidonele au fost ciclizate la 5-nitro-N-(4-oxo-2-ariltiazolidin-3-il)-1H-indazol-1-carboxamide, sub acțiunea acidului tioglicolic, în dioxan anhidru și în prezența clorurii de zinc anhidre drept agent deshidratant. Grupele substituente ($-\text{NO}_2$ și $-\text{OH}$) ale nucleului fenilic din poziția 3 sunt considerate factori cu rol determinant în activitatea antibacteriană a tiazolidinelor sintetizate.

7. Prin condensarea sării de sodiu a 5-nitroindazolului cu sulfoclorurile esterilor metilici ai acizilor fenoxiacetici-R-substituiți în prezența acetonei, au fost obținuți 4 noi esteri metilici ai acizilor 4-(5'-nitroindazol-1'-il-sulfonil)-R-fenoxiacetici, cu potențială acțiune antimicrobiană.

8. Folosind acidul 5-nitroindazol-1-il-acetic drept agent acilant al acidului 7-aminodezacetoxicefalosporanic, prin metoda anhidridelor mixte – partenerul activant fiind clorura de pivaloil – s-a preparat o cefalosporină semisintetică nouă, cu efect antibacterian apropiat de al cefalexinei.

9. Produșii sintetizați au fost caracterizați prin analiză elementală (C, H, N, Cl, S) și spectrală (FT-IR, ^1H -RMN).

10. Compușilor sintetizați (**I-XV**) li s-a determinat gradul de toxicitate, rezultând valori care îi recomandă screening-ului de laborator.

11. Lucrarea conține căile de investigare a acțiunii biologice presupuse pentru unii dintre compușii sintetizați.

a) S-a studiat activitatea antifungică a 5-nitro-N'-ariliden-1H-indazol-1-carbohidrazidelor (**III-VI**), constatându-se că cei mai sensibili germeni test au fost *Trichophyton S.P.* și *Fusarium S.P.*

b) Au fost testați, din punct de vedere al activității antimicrobiene, un număr de 9 compuși cum sunt: 5-nitro-N-(4-oxo-2-ariltiazolidin-3-il)-1H-indazol-1-carboxamidele (**VII-X**), esterii metilici ai acizilor 4-(5'-nitroindazol-1'-il-sulfonil)-R-fenoxiacetici (**XI-XIV**) comparativ cu kanamicină și 7-(5'-nitroindazol-1'-acetamidil)-cefalosporina sodică (**XV**), comparativ cu cefalexina.

În cazul compușilor (VII-X) mai sensibile s-au dovedit sușele microbiene *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Salmonella enteritidis*, în timp ce produșii (XI-XIV) sunt activi față de *Staphylococcus aureus* și *Escherichia coli*. Pentru ambele serii de compuși considerăm că activitatea antimicrobiană este influențată de natura și poziția substituenților existenți în nucleul fenilic din structurile tiazolidinelor (VII-X), respectiv din restul fenoxiacetic al sulfonelor (XI-XIV).

Cefalosporina semisintetică (XV) prezintă efect antimicrobian semnificativ asupra tulpinii *Streptococcus pneumoniae*, activitate susținută de prezența restului de acid 5-nitroindazol-1-il-acetic drept catenă laterală a acidului 7-aminodezacetoxicefalosporanic.

c) Rezultatele testărilor substanțelor biologic active (III-XV) sunt foarte promițătoare și ele prezintă interes terapeutic.

12. În cursul cercetărilor au fost sintetizați și caracterizați 15 derivați indazolici nedescrși în literatură.

a – Esterul etilic al acidului 5-nitroindazol-1-il-formic (I)

b – 5-Nitro-1H-indazol-1-carbohidrazidă (II)

c – 5-Nitro-N'-benziliden-1H-indazol-1-carbohidrazidă (III)

d – 5-Nitro-N'-(2-nitrobenziliden)-1H-indazol-1-carbohidrazidă (IV)

e – 5-Nitro-N'-(4-nitrobenziliden)-1H-indazol-1-carbohidrazidă (V)

f – 5-Nitro-N'-(2-hidroxibenziliden)-1H-indazol-1-carbohidrazidă (VI)

g – 5-Nitro-N-(4-oxo-2-feniltiazolidin-3-il)-1H-indazol-1-carboxamidă (VII)

h – 5-Nitro-N-[4-oxo-2-(o-nitrofeniltiazolidin)-3-il]-1H-indazol-1-carboxamidă

(VIII)

i – 5-Nitro-N-[4-oxo-2-(p-nitrofeniltiazolidin)-3-il]-1H-indazol-1-carboxamidă (IX)

j – 5-Nitro-N-[4-oxo-2-(o-hidroxifeniltiazolidin)-3-il]-1H-indazol-1-carboxamidă (X)

k – Esterul metilic al acidului 4-(5'-nitroindazol-1'-il-sulfonil)-fenoxiacetic (XI)

l – Esterul metilic al acidului 2-cloro-4-(5'-nitroindazol-1'-il-sulfonil)-fenoxiacetic

(XII)

m – Esterul metilic al acidului 2-metil-4-(5'-nitroindazol-1'-il-sulfonil)-fenoxiacetic

(XIII)

n – Esterul metilic al acidului 2-metoxi-4-(5'-nitroindazol-1'-il-sulfonil)-fenoxiacetic

(XIV)

o – 7-(5'-Nitroindazol-1'-il-acetamidil)-cefalosporină sodată (XV).

13. Au fost obținute și caracterizate două categorii de nanocapsule pe bază de polimer sintetic (Eudragit) respectiv de complex interpolimeric (Eudragit/alginat), morfologia celor din urmă fiind de tip miez/manta.

14. Diametrul particulelor sintetizate este de ordin submicronic, respectiv 121 nm pentru primul tip de nanocapsule, 155 nm pentru cele de tip miez/manta și ușor mai ridicat (158 nm) pentru nanocapsulele de al doilea tip încărcate cu noile principii active sintetizate; polidispersitatea dimensională a nanocapsulelor este foarte îngustă.

15. Suspensiile apoase de nanocapsule prezintă foarte bună stabilitate atestată de valorile ridicate ale potențialului zeta (52 mV) pentru primul tip, respectiv -45,4 mV (pentru cel de al doilea).

16. Nanocapsulele de ambele tipuri prezintă eficacitate ridicată de încărcare a principiilor biologic active de tip tiazolidone, în toate cazurile de peste 90 %, ușor mai ridicată pentru nanocapsulele pe bază doar de polimer sintetic.

17. Eliberarea tiazolidonelor din nanocapsule decurge cu un “burst effect” în primele 3 ore ale procesului, după care acesta evoluează conform unei cinetici, practic de ordin “zero”.

18. Eficacitatea eliberării principiilor active încapsulate este de aproximativ 95 % pentru ambele tipuri de nanocapsule, diferind durată după care se atinge această valoare.

19. Complexul polielectrolitic format între nanocapsulele pe bază de Eudragit cu cationi în suprafață și alginatul anionic determină o eliberare mai lentă și într-un timp mai îndelungat a principiilor active înglobate, explicabilă prin bariera suplimentară indusă de mantaua de complex în procesul de transport al medicamentului.

20. Dimensiunea redusă a nanopurtătorilor de principii active face posibilă administrarea lor sub formă de suspensii în lichide fiziologice prin injectare direct la locul afecțiunii, avantajul față de administrarea directă a principiului activ fiind eliberarea îndelungată și asigurarea unei concentrații locale constante.

21. Au fost obținute și caracterizate două categorii de microparticule poroase pe bază de comonomeri acrilici (glicidil metacrilat și oligomeri de etilenglicol dimetacrilat) respectiv comonomeri acrilici și chitosan, prin copolimerizare reticulantă în suspensie.

22. Microparticulele obținute au capacitatea diferită de reținere a apei, mai ridicată în cazul celor acoperite cu polizaharid, determinată pe de o parte de hidrofilia acestuia, cât și de suprafața lor specifică mai mare, practic dublă față de cele neacoperite cu chitosan.

23. Microparticulele prezintă capacitate ridicată de adsorbție a derivatului de cefalosporină (7-NAC) sintetizat, solubil în apă, care crește cu creșterea temperaturii, cu creșterea concentrației principiului activ din soluția în care sunt suspendate particulele, respectiv cu scăderea diametrului lor.

24. Creșterea cantității de reticulant (EGDMA, DEGDMA și TEGDMA) și natura chimică a reticulantului (în sensul modificării numărului de unități de etilen glicol) determină o scădere a capacității de adsorbție a 7-NAC, determinată de rigidizarea rețelei polimerice consecință a creșterii densității de reticulare.

25. Mecanismul de adsorbție a 7-NAC pe microparticulele poroase sintetizate, explicat cu ajutorul a trei modele cinetice, probează faptul că cel mai adecvat este modelul Weber-Morris.

26. Descrierea caracteristicilor de adsorbție a 7-NAC pe toate tipurile de particule poroase sintetizate, făcută pe baza izotermelor de adsorbție cu doi, respectiv 3 parametri, probează că izotermele Langmuir fitează cel mai bine rezultatele experimentale, că acesta este cel mai adecvat.

27. Valorile pozitive ale ΔH pentru procesul de adsorbție indică faptul că acesta este endoterm; valorile pozitive ale ΔS argumentează afinitatea microparticulelor pentru 7-NAC; valorile negative ale lui ΔG arată că procesul de adsorbție a 7-NAC pe toate microparticulele și la toate temperaturile este spontan și favorabil din punct de vedere termodinamic.

28. Valorile energiei de activare sunt reduse (în intervalul 16,454 - 19,629 kJ/mol) argumentând faptul că procesul de adsorbție a 7-NAC pe microparticule este de natură fizică, neimplicând deci interacții chimice.

29. Eliberarea 7-NAC din particule decurge cu un “burst effect” în primele două ore ale procesului, după care profilul cinetic este practic liniar, de ordin “zero”, cel puțin până la durata de 8 ore, dar cu tendința de a continua în același mod până la eliberarea totală a principiului activ.

30. Viteza de eliberare a 7-NAC din microparticulele acoperite cu chitosan este mai lentă, sugerând interacții mai puternice între parteneri; acestea ar putea fi de natură electrostatică, datorate prezenței polizaharidului ale cărui grupări aminice sunt capabile să interacționeze ionic cu grupele carboxilat din 7-NAC.

31. Mecanismul de eliberare a 7-NAC din particulele poroase este complex, fiind caracteristic unei difuzii anormale sau non-Fickiene, sugerând că transportul 7-NAC este controlat atât de difuzie cât și de procesul de umflare.

32. Prin caracteristicile lor fizico-chimice și morfologice, prin capacitatea lor de a elibera susținut 7-NAC (concluzia putând fi extinsă și la alte principii active hidrosolubile) pe

o durată relativ mare, microparticulele poroase obținute sunt candidați potențiali la utilizarea în tratarea bolii parodontale, după efectuarea unui screening de laborator detaliat.

Perspective

Cercetările efectuate în cadrul prezentei teze de doctorat se impun a fi continuate, deschizând mai multe perspective.

1. Utilizarea nanocapsulelor pe bază de polimer sintetic (Eudragit), respectiv complex interpolimeric (Eudragit/alginat), ca nanotransportator al 7-NAC.

2. Efectuarea de studii *in vivo* cu respectarea normelor de etică deontologică pe animale de experiență, respectiv pe voluntari umani.

3. Realizarea unui dispozitiv de tip “gutieră transportor”(GT), având un design simplu prevăzut cu rezervoare în care se poate stoca o cantitate binecunoscută de suspensie de microparticule poroase (ce nu pot fi administrate prin injectare), conținând la rândul lor o cantitate exact dozată de 7-NAC.

Dispozitivul este prezentat în figura de mai jos.



Figura: GT (gutiera transportor)

Faptul dovedit că principiul activ este eliberat susținut pe un interval de minimum 8 ore, face posibilă purtarea dispozitivului de către pacientul uman pe timpul nopții, când nu produce disconfort, putând fi îndepărtat ușor prin dezinserare pe timpul zilei. Devine posibilă astfel reîncărcarea cu microparticule purtătoare de principiu activ și reutilizarea dispozitivului în noaptea următoare prin repoziționare pe dinții afectați de boala parodontală, procesul putând fi repetat până la obținerea efectului dorit. Solicitarea acestora va fi doar prin acțiunea mecanică a GT, fiind de asemenea pasivă datorită materialului nesolicitant din care este confecționată.

Scopul menținerii în cavitatea orală a dispozitivului este acela de a constitui un suport pentru substanță activă cu efect asupra țesuturilor de susținere afectate, având drept rol de a tona zona afectată prin efectul trigger al 7-NAC. Aplicarea, detașarea de pe unitățile odontoparodontale și îndepărtarea se face cu ușurință, manevrele putând fiind efectuate în fața oglinzii, ca reper pentru stabilitate și menținere.

BIBLIOGRAFIE (selectivă)

151. Cheptea, C., Șunel, V., Stan, C., Dorohoi, D.O., Rev. Roum. Chim., **57**, 229 (2012).
156. Cheptea, C., Șunel, V., Desbrieres, J., Popa, M., J. Heterocycl. Chem., **50**, 366 (2013).
157. Fessi, H., Puisieux, F., Devissaguet, J.P., Ammoury, N., Benita, S., Int. J. Pharm. **55**, R1–R4 (1989).
161. Rodriguez, J., Gerpe, A., Aguirre, G., Kemmerling, U., Pino, O.E., Aran, V., Maya, J.D., Gonzalez, M., Cerecetto, N., Eur. J. Med. Chem., **44**, 1545 (2009).
162. Duval, D., Boulourd, M., Rault, S., Bioorg. Med. Chem. Lett., **11**, 1153 (2001).
163. Caron, S., Vazquez, E., Org. Process Res. Dev., **5**, 587 (2001).
164. Chakrabarty, M., Kundu, T., Arima, S., Harigaya, Y., Tetrahedron, **64**, 6711 (2008).
165. Neidlein, R., Tauber, J., Pharm. Zhalles, **107**, 430 (1968).
166. Kawakubo, H., Fukuzaki, K., Sone, T., Chem. Pharm. Bull., **35**, 2292 (1987).
167. Garuti, L., Roberti, M., Cermelli, C., Bioorg. Med. Chem. Lett., **9**, 2525 (1999).
168. Gudmundsson, K.S., Tidwell, J., Lippa, N., J. Med. Chem., **43**, 2464 (2000).
169. Maggio, B., Raimondi, M.V., Raffa, D., Plescia, F., Cascioferro, S., Plescia, S., Tolomeo, M., Cristina, A., Pipitone, R.M., Grimaudo, S., Daidone, G., Eur. J. Med. Chem., **46**, 168 (2011).
170. Fanciulli, M., Valentini, A., Bruno, T., Citro, G., Zupi, G., Floridi, A., Oncol. Res., **8**, 111 (1996).
171. Yakaiah, T., Lingaiah, P., Narsaiah, B., Shireesha, B., Kumar, A., Gururaj, S., Parthasarathy, T., Sridhar, B., Bioorg. Med. Chem. Lett., **17**, 3445 (2007).
172. Lindgren, E.B., Brito, M., Vasconcelos, R.A., Moraes, O., Montenegro, C., Yoneda, D., Leal, Z., Eur. J. Med. Chem., **86**, 12 (2014).
173. Bouillon, I., Zajicek, J., Pudelova, N., Krchnak, V., J. Org. Chem., **21**, 9027 (2008).
174. Alho, M., Sanchez, N.R., Ruiz, N.J., Escario, A., Barrio, G., Fernandez, R.A., Aran, V., J. Med. Chem., **4**, 78 (2009).
175. Sun, J.H., Teleha, A.C., Yan, S.J., Rodgers, D.J., Nugiel, A.D., J. Org. Chem., **62**, 5627 (1997).
176. **Cigu, T.A.**, Nechifor, C.D., Șunel, V., Dorohoi, D.O., Cheptea, C., Rev. Roum. Chim., **59**, 739 (2014).
177. Budeanu, C.H., Budeanu, E., Ciugureanu, C., An. Șt. "Al. I. Cuza" Iași, S.Ic, **13**, 157 (1967).
178. Matei, I., Comăniță, E., Bul. Inst. Polit., Iași, S.Ic, **13** (17), 269 (1967).
179. Șunel, V., Băsu, C., Oniscu, C., Șoldea, C., Roum. Biotechnol. Lett., **5**, 393 (2000).
180. Cheptea, C., Șunel, V., Profire, L., Popa, M., Lionte, C., Bul. Inst. Polit. Iași, S.Ic, **55**(59), 89 (2009).
181. Moise, M., Șunel, V., Profire, L., Popa, M., Desbrieres, J., Peptu, C., Bul. Inst. Polit., Iași, S.Ic, **55** (59), 55 (2009).
182. Stănculescu, R., Moise, M., Șunel, V., Dorohoi, D.O., Bul. Inst. Polit., Iași, S.Ic, **56** (60), 135 (2010).
183. Goodman, M., J. Org. Chem., **52**, 53371 (1987).
184. Șunel, V., Ciugureanu, C., Budeanu, C.H., Rev. Chim., **7**, 855 (1986).
185. Șunel, V., Popa, M., Desbrieres, J., Profire, L., Pintilie, O., Lionte, C., Molecules, **13**, 177 (2008).
186. Remli, m., Condom, R., Guedji, R., Bull. Soc. Chim. France, **6**, 864 (1986).
187. Tutoveanu, M., Bul. Inst. Polit., Iași, S.Ic, **18**, (22), 103 (1972).
188. Salawu, O., Abdulsalam, A.O., Der. Pharm. Chem., **3**, 298 (2011).
189. Annelkovic, K., Sladic, D., Bacchi, A., Pelizzzi, G., Filipovic, N., Bojkovic, M., Trans. Med. Chem., **30**, 243 (2005).
190. Haack, T., Fattori, R., Napoletano, M., Pellacini, F., Frunza, G., Raffaini, G., Ganazzoli, F., Bioorg. Med. Chem., **13**, 4425 (2005).
191. Turan G., Altinop, M.D., Ozdemir, A., Mohsen, A., Kaplancikli, Z.A., J. Enz. Inhib. Med. Chem., **26**, 782 (2012).
192. Moise, M., Șunel, V., Profire, L., Popa, M., Desbrieres, J., Peptu, C., Molecules, **14**, 162 (2009).
193. Todeschini, A.R., Miranda, A.I., Silva, C., Parrini, S.C., Barrierio, E., Eur. J. Med. Chem., **33**, 189 (1998).
194. Mohareb, R.M., Fleita, D.N., Sakka, O.K., Molecules, **16**, 16 (2011).
195. Assar, F., Zelenin, K.N., Lesiouskaya, E., Bezant, I., Chakchir, B.A., Pharm. Chem., **36**, 598 (2002).
196. Rollas, S., Gulerman, N., Erdeniz, H., Farmaco, **57**, 171 (2002).
197. Upodhyay, A., Srivastava, S.K., Srivastava, S.D., Eur. J. Med. Chem., **45**, 3541 (2010).
198. Sriram, D., Yogeeswari, P., Devakaram, R.V., Bioorg. Med. Chem., **14**, 3113 (2006).
199. Khan, S.A., Eur. J. Med. Chem., **43**, 2040 (2008).
200. Babahan, I., Coban, E.P., Biyic, H., Int. J. Sci. Technol., **7**, 26 (2013).
201. Rati, K.P., Senthil, R.A., Med. Chem., **11**, 1551 (2016).
202. Vicini, P., Zoni, F., Cozzini, P., Doytchinova, I., Eur. J. Med. Chem., **37**, 553 (2002).
203. Schenune, S., Bruno, O., Ranise, A., Bondavalli, F., Falcone, G., Filippelli, W., Rivaldi, B., Farmaco, **57**, 183 (2002).
204. Mahomed, E., Soliman, G.A., Khataibeh, M.H., Chem. Pharm. Bull., **60**, 1290 (2012).
205. Rajitha, G., Saideepa, N., Praneetha, P., Indian J. Chem., **50** B, 729 (2011).

206. Gokce, M., Utku, S., Kupeli, E., *Eur. J. Med. Chem.*, **44**, 3760 (2009).
207. Hny, I., Şahar, M., Nasser, S.M., Mahmoud, M., Mahomed, N., Natem, A., *Eur. J. Med. Chem.*, **108**, 415 (2016).
208. Liu, T., Sun, C., Xing, X., Jing, L., Tan, R., Luo, Y., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **22**, 3122 (2012).
209. Oliviera, K.N., Costa, P., Sartin, J.R., Mazzambani, I., Burger, C., Mora, C., *Bioorg. Med. Chem.*, **19**, 4295 (2011).
210. Vicini, P., Incerti, M., Colla, P.M., Loddo, R., *Eur. J. Med. Chem.*, **44**, 1801 (2009).
211. Bacque, C.V., Camare, C., Carayon, C., Bernis, C., Baltas, M., Salvayre, A.N., Belval, F.B., *Bioorg. Med. Chem.*, **24**, 3571 (2016).
212. Kamal, A., Ahmed, S.K., Reddy, K.S., Khan, M.N., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **17**, 5419 (2007).
213. Telvekar, V.N., Belubbi, A., Bairwa, V.K., Satardekar, K., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **22**, 2343 (2012).
214. Mahajan, A., Kremer, L., Louw, S., Guerardel, Y., Kibale, K., Biot, C., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **21**, 2866 (2011).
215. Shrinvas, D., Devendra, K., Sheshagiri, R.D., Negeshwar, T., Uttman, A.M., Cristian, L., Tejraj, A., Yang, K.S., *Eur. J. Med. Chem.*, **121**, 21 (2016).
220. Chepte, C., Dulcescu, M., Dorohoi, D.O., Şunel, V., Profire, L., *Dig. J. Nanomater. Bios.*, **7**, 287 (2012).
231. Dundar, O.B., Ozgen, O., Mentese, A., Altanlar, N., Atli, O., Kendi, E., Ertan, R., *Bioorg. Med. Chem.*, **15**, 6012 (2007).
232. Gouveia, L.F., Oliveira, M.B., Oliveira, B.T., Silva, M.J., Nascimento, C.S., Sena, R., Albuquerque, C.F., *Eur. J. Med. Chem.*, **44**, 2038 (2009).
233. Suaad, M.N., *J. S. Chem. Soc.*, **18**, 893 (2014).
234. Karali, N., Giirsoy, A., Kandemirli, F., Shvets, N., Kaynak, B.F., Orbey, S., Kavalishyn, V., Dimoglo, A., *Bioorg. Med. Chem.*, **15**, 5888 (2007).
235. Lu-Yan, L., Wang, Z., Dalton, T.J., Miller, D., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **17**, 4113 (2007).
236. Basu, K.N., Waffo, B.A., Talele, T., Basu, A., Chen, Y., Kiiciikgiizel, G., *Front. Bio. Sci.*, **13**, 3857 (2008).
237. Bayram, F.E., Sipahi, H., Acar, E.T., Ulugol, R.K., Buran, K., Akgun, N., *Eur. J. Med. Chem.*, **114**, 337 (2016).
238. Silva, E.F., Silva, E.P., Franca, P.H., Silva, N., Barreto, E.D., Silva, E.B., Ferreira, R.S., Gatto, C., Mareira, D.R., Siqueira, J.L., Mendonca, F.B., Lima, M.C., Bartoluzzi, J.H., Scotti, M.T., Scotti, L., Meneghetti, M.R., Aquino, T.M., Arango, J.X., *Bioorg. Med. Chem.*, **24**, 4228 (2016).
239. Cigu, T., Holban, M., Şunel, V., Lionte, C., Popa, M., Desbrieres, J., Chepte, C., XI^{ème} Colloque Franco-Roumain sur les Polymères, Piteşti, 27-29 août 2014.
242. Helmy, M., Fahmy, Z., *Exp. Parasitol.*, **119**, 125 (2008).
243. Moise, M., Şunel, V., Profire, L., Popa, M., Lionte, C., *Farmacia*, **16**, 283 (2008).
244. Mondal, S., Mondal, S.M., Mondal, T.K., Sinha, C., *J. Molec. Str.*, **1127**, 557 (2017).
245. Fiori, A., Nakahata, D., Cuin, A., Lustri, W.R., Corbi, P., *Polyhedron*, **121**, 172 (2017).
246. Schaaf, G., Mukherjee, S., Waterson, A., *Tetrahedron Lett.*, **50**, 1928 (2009).
247. Shankar, B., Lavey, B.J., Zhom, G., Spitler, J.A., Tong, L., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **15**, 4417 (2005).
248. Dominguez, J., Leon, C., Rodriguez, J., Gamboa, N., Gut, J., Rosenthal, P., *Eur. J. Med. Chem.*, **44**, 1457 (2009).
249. Van Kat, C., Verkade, J., *J. Mol. Catalysis*, **272**, 233 (2007).
250. Qui, H.Y., Wang, P.F., Li, Z., Ma, J.T., Wang, X., Yang, Y.H., Zhu, H.L., *Pharm. Res.*, **104**, 86 (2016).
251. Silvestri, R., Artico, M., Regina, G.I., *Farmaco*, **59**, 201 (2004).
252. Biswas, K., Aya, T., Chen, J., Numan, J., Hungate, R., Kumar, G., Arik, L., Haung, M., Loeloft, R., Johnson, E., Askew, B., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **18**, 4764 (2008).
253. Yamashita, D.S., Dodds, R.A., *Pharm. Des.*, **6**, 1 (2000).
254. Sondhia, S., Rajput, S., Varma, R.K., Kumar, A., *App. Soil. Ec.*, **105**, 196 (2016).
255. Bîrcă, D., Chiriţă, C., Demetrescu, C., Mavrodin, G., *Studii şi Cercet. Chim., Bucureşti*, **14**, 83 (1965).
256. Naidu, K.M., Nagesh, H.N., Singh, M., Siriram, D., Sekhar, K., Yogeeswari, P., *J. Med. Chem.*, **92**, 415 (2015).
257. Centrone, C., Lowary, T., *Bioorg. Med. Chem.*, **12**, 5495 (2004).
261. Sassiver, M., Lewis, A., *Appl. Microbiol.*, **13**, 163 (1970).
264. Kanafani, Z.A., Carey, G.R., *Future Microbiol.*, **4**, 25 (2009).
268. Pintilie, O., Moise, M., Profire, L., Şunel, V., *Farmacia*, **5**, 61 (2006).
269. Şunel, V., Băsu, C., Maftai, D., Popa, M., Diaconu, E., Şoldea, C., *Acta Pharm.*, **51**, 35 (2001).
270. Jarrahpour, A., Shekarirriz, M., Taslimi, A., *Molecules*, **9**, 29 (2004).
271. Heinisch, L., Wittmann, S., Stolber, T., Berg, A., *J. Med. Chem.*, **45**, 3032 (2002).
272. Biasi, F., Tarsia, P., Cosentini, R., Valenti, R., *Curt. Opin. Pulm. Med.*, **10**, 189 (2004).
274. Cigu, A.T., Vasiliu, S., Racoviţă, S., Lionte, C., Şunel, V., Popa, M., Chepte, C., *Eur. Polym. J.*, **82**, 132 (2016).

277. Kärber, S., *Envir. Sci. Technol.*, **12**, 417 (1978).
278. Buu-Hoi, N.P., Xuong, N.D., *Compt. rend.*, **238**, 295 (1954).
279. Budeanu, C.H., Rusu, G., Cojocaru, Z., Nistor, C., *Rev. Med. Chir. Soc. Med. Nat., Iași*, **4**, 605 (1976).
280. Budeanu, C.H., Rusu, G., Cojocaru, Z., Nistor, C., *Bull. Inst. Polit., Iași, S.IIc*, **22** (26), 68 (1976).
282. National Committee for Clinical Laboratory Standards, NCCLS, Approval Standard Document M2-A7, Vilanova, P.A., USA (2000).
283. Kirby-Bauer, *Envirom. Sci. Technol.*, **11**, 714 (1977).
285. Pattnaik, S., Panigrahi, L., Murthy, R. S. *Curr Drug Deliv*, **4**, 303 (2007).
304. Hodge, H.C., Sterner, J.H. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* **10**, 93 (1949).
305. Gowthamarajan, K., Singh, S. K., *Dissolut Technol*, **17**, 24 (2010).
306. Sanghvi, R., Narazaki, R., Machatha, S. G., Yalkowsky, S. H. *AAPS PharmSciTech*, **9**, 366 (2008).
307. Jouyban, A., Fakhree, M. A. A., Shayanfar, A. *J Pharm Pharmaceut Sci*, **13**, 524 (2010).
308. Kalepu, S., Nekkanti, V. *Acta Pharm Sin B*, **5**, 442 (2015).
309. Feng, H., Ding, J., Zhu, D., Liu, X., Xu, X., Zhang, Y., Zhang, S., Wang, D.C., Liu, W. *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 14964 (2014).
319. Chifiriuc, C.M., Grumazescu, A.M., Saviuc, C., Croitoru, C., Mihaiescu, D.E. Lazar V. *Int. J. Pharm.* **436**, 201 (2012).
320. Kanafani, Z.A., Corey, G.R. *Future Microbiol.* **4**, 25 (2009).
321. Liu, W., Neidert, M.C., Groen, R.J.M., Woernle, C.M., Grundmann, H.. *Clin. Neurol. Neusurg.* **116**, 13-19 (2014).
322. Xiao, J.M., Feng, L., Zhou, L.S., Gao, H.Z., Zhang, Y.L., Yang, K.W. *Eur. J. Med. Chem.* **59**, 150 (2013).
328. Popa, N., Novac, O., Profire, L., Hitcu, D., Popa, M.I. *Turk. J. Chem.* **34**, 255 (2010).
329. Dhoka, M.V., Nimbalkar, U.A., Pande, A.. *Int. J. Pharm. Tech. Res.* **3(1)**, 411 (2011).
330. Mohseni, M., Gilani, K., Mortazavi, S.A.. *Iranian J. Pharm. Res.* **14(1)**, 27 (2015).
331. Vasiliu, S., Bunia, I., Racovita, S., Neagu, V. *Carbohydr. Polym.* **85**, 376 (2011).
332. Cadinoiu, A.N., Peptu, C.A., Fache, B., Chailan, J.F., Popa, M.. *J. Microencapsul.* **32(4)**, 381 (2015).
333. Wang, L., Wang, A.. *Chem. Eng. J.* **143**, 43 (2008).
334. Arshadi, M., Amiri, M.J., Mousavi, S. *Water Resour. Ind.* **6**, 1 (2014).
337. Sarici-Ozdemir, C., Onal, Y. *Desalination*, **251**, 146 (2010).
338. Srivastava, Y.C., Swamy, M.M., Mall, I.D., Prasad, B., Mishra, I.M.. *Colloid and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **272**, 89 (2006).
339. Niboua, D., Mekatel, H., Amokranea, S., Barkatb, M., Trari, M.. *J. Hazardous Materials*, **173**, 637 (2010).
340. Michelson, L.D., Gideon, P.G., Pace, E.G., Kutal, L.H.. *US Department Industry water research and technology Bull*, **74** (1975).
341. Mckay, G., Poots, V.J.P.. *J. Chem. Technol. Biotech.*, **30**, 279 (1980).
342. Chen, A.H., Huang, Y.Y.. *J. Hazardous Materials*, **177**, 668 (2010).
343. Wawrzekiewicz, M., Hubicki, Z. *Chemical Engineering J.*, **157**, 29 (2010).
344. Weber, T.W., Chakravot R.K.. *AiChE Journal*, **20**, 228 (1974).
354. Hefne, J.A., Mekhemer, W.K., Alandis, N.M., Aldayel, O.A., Alajyan, T.. *Int. J. Phys. Sci.*, **3**, 281 (2008).
356. Wu, C.H.. *J. Hazard. Mater.* **144**, 93 (2007).
357. Hasan, M., Ahmad, A.L., Hameed, B.H.. *Chem. Eng. J.* **136**, 164 (2008).
359. Grassi, M., Grassi, G.. *Current Drug Delivery* **2**, 97-116 (2005).
360. Korsmeyer, R.W., Gurny, R., Doelker, E., Buri, P., Peppas, N.A.. *Int. J. Pharm.* **15**, 25 (1983).

ACTIVITATE ȘTIINȚIFICĂ

A. Articole publicate în reviste cotate ISI:

1. **Cigu, T.A.**, Vasiliu, S., Racovita, S., Lionte, C., Sunel, V., Popa, M., Cheptea, C. (2016), *Adsorption and release studies of new cephalosporin from chitosan-g-poly(glycidyl methacrylate) microparticles*, Europ. Pol. J. **82**, 132–152 (2016), (IF 3,485)
2. **Cigu, T.A.**, Nechifor, C.D., Sunel, V., Dorohoi, D.O., Cheptea, C., *Optimization Reaction for Obtaining New Hydrazidones with Biological Action*, Rev. Roum. Chim. **59** (9), 739-747 (2014), (IF 0,311).
3. **Cigu, T.A.**, Holban, M.N., Cadinoiu A.N., Șunel, V., Lionte, C., Popa, M., Desbrieres, J., Cheptea, C., *Polyelectrolyte complex based nanocapsules encapsulating novel 5-nitroindazole thiazolidines for the treatment of oral bacterial infections*, Mat. Plastice, (IF 0,903) (acceptat spre publicare).

B. Comunicări la manifestări științifice internaționale:

4. Vasiliu, S., **Cigu, T.A.**, Racovita, S., Sunel, V., Cheptea, C., Popa, M. *Design and release studies of new cephalosporin from chitosan-g-poly(glycidyl methacrylate) microparticles*, XII-ème Colloque Franco-Roumain sur les Polymères, Sophia Antipolis, France, 5-7 September, 2016.
5. **Cigu, T.A.**, Martin, P., Cheptea, C., Lionte, C., Popa, M., Sunel, V. *New amide derivatives of 5-nitroindazole-1-yl formic acid with cytostatic potential*, Bioheterocycles, XVI International Conference on Heterocycles in Bioorganic Chemistry, Metz, France, 7-11 June 2015.
6. **Cigu, T.A.**, Holban, M., Șunel, V., Lionte, C., Popa, M., Desbrieres, J., Cheptea C. *Nouvelles Tiazolidines Dérivées de 5-Nitroindazole Incluses dans des Nanoparticules Polymeres : Synthèse et Activité Antibactérienne*, XIème Colloque Franco-Roumain sur les Polymères 2014, Pitesti, Roumanie, 27-29 août 2014 (Poster 25).

C. Comunicări la manifestări științifice naționale:

7. **Cigu, T.A.**, Vasiliu, S., Racoviță, Ș., Șunel, V., Covalciuc, E., Baranov, N., Popa, M. *Microparticule pe bază de chitosan modificat pentru eliberarea controlată a unei noi cefalosporine de sinteză*, Sesiunea științifică anuală, Institutul de Cercetări „Academician Ioan Hăulică”, Iași, 26-28 octombrie 2016.
8. Rata, D.M., Burlui, V., Cadinoiu, A.N., Mihalache, G., **Cigu, T.A.**, Popa, M. *Eliberarea secvențială a unor principii active din biocompozite cu potențiale aplicații în stomatologie*, Sesiunea Științifică de Toamnă a Academiei Oamenilor de Știință din România, 24-26 septembrie, Iași, 2015.
9. Racovita, S., Vasiliu, S., **Cigu, T.A.**, Cheptea, C., Sunel, V., Popa, M. *Evaluation of adsorption characteristics of new cephalosporin onto porous microparticles* “Alexandru Ioan Cuza” University Days, Iași, 29 – 31 October 2015
10. Racovita, S., Vasiliu, S., **Cigu, T.A.**, Gușoasa, I., Popa, M. *Studiul interacțiunii unor noi sisteme polimere cu compuși biologici activi*, Zilele Universității “Apollonia”, 26 februarie – 1 martie, Iași, 2015
11. Holban, M., Folescu, E., **Cigu, T.A.**, Cheptea, C., Popa, M., Sunel, V. *Noi tiazolidine nanoencapsulate pentru tratamentul infecțiilor bacteriene la nivel oral* Congresul Internațional “Pregătim viitorul promovând excelența”, Universitatea „Apollonia” din Iași, 26 februarie – 1 martie 2015.
12. **Cigu, T.A.**, Popa, M., Șunel V. *Nanoparticule și nanocapsule polimere transportatori de compuși biologici cu aplicații în boala parodontală*, Congresul internațional „Pregătim viitorul promovând excelența”, Universitatea „Apollonia” din Iași, 27 februarie – 1 martie 2014.

Factorul de impact al articolelor publicate în revistele cotate ISI este preluat din Journal Citation Report - Web of Science Thomson Reuters, ediția 2015.