

**UNIVERSITATEA TEHNICĂ
„GHEORGHE ASACHI” DIN IAȘI**
**Școala Doctorală a Facultății de Inginerie Chimică și
Protecția Mediului „CRISTOFOR SIMIONESCU”**



Noi sisteme polimer-principii active cu eliberare controlată

- REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT -

Conducător de doctorat:

Prof. univ. em. dr. ing. Ionel Marcel Popa

Doctorand

Ing. Chim. Irina-Paula Merlușcă

IAȘI, 2018

UNIVERSITATEA TEHNICĂ "GHEORGHE ASACHI" DIN IASI
RECTORATUL

Către _____

Vă facem cunoscut că, în ziua de _____ la ora _____ în _____, va avea loc susținerea publică a tezei de doctorat intitulată: "**Noi sisteme polimer-principii active cu eliberare controlată**" elaborată de domnișoara inginer Irina-Paula Merlușcă în vederea conferirii titlului științific de doctor.

Comisia de doctorat este alcătuită din:

- | | |
|---|------------------------|
| 1. Hurduc Nicolae, prof. univ. dr. ing.,
Universitatea Tehnică „Gheorghe Asachi” din Iași | președinte |
| 2. Popa Ionel Marcel, prof. univ. em. dr. ing.,
Universitatea Tehnică „Gheorghe Asachi” din Iași | conducător de doctorat |
| 3. Profire Lenuța, prof. univ. dr. farm.,
Universitatea de Medicină și Farmacie „Grigore T. Popa” din Iași | referent oficial |
| 4. Vereștiuc Liliana, prof. univ. dr. ing.,
Universitatea de Medicină și Farmacie „Grigore T. Popa” din Iași | referent oficial |
| 5. Popa Marcel, prof. univ. em. dr. ing.,
Universitatea Tehnică „Gheorghe Asachi” din Iași | referent oficial |

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

RECTOR,

Prof.univ.dr.ing. 



Secretar universitate,


Ing.Cristina Nagi

Mulțumiri

Țin să mulțumesc, în primul rând, conducătorului de doctorat, domnul Prof. univ. em. dr. ing. Ionel Marcel Popa pentru pentru încrederea, sfaturile, îndrumarea deosebit de meticuloasă, consultanța științifică și răbdarea arătată în perioada de pregătire a doctoratului.

Deosebite mulțumiri pe această cale membrilor din comisia de analiză a tezei de doctorat pentru aprecierile asupra acestei lucrări.

Alese gânduri de mulțumire și recunoștință se îndreaptă către doamnele CS III dr. ing. Mihaela Sillion, Conf. dr. ing. Gabriela Lisa, Prof. dr. ing. Constanța Ibănescu și către doamnul Șef lucr. dr. Petru Plămădeală pentru sprijinul acordat în realizarea experimentelor și pentru sfaturile de specialitate.

Mulțumesc colegilor și întregului colectiv al Catedrei de Chimie - Fizică din cadrul Facultății de Inginerie Chimică și Protecția Mediului pentru colaborare și încurajări.

În cele din urmă, aș vrea să mulțumesc familiei mele pentru dragostea și suportul constant, și lor le dedic această teză.

Irina-Paula Merlușcă

CUPRINS

LISTĂ DE ABREVIERI.....	7
INTRODUCERE.....	9
CONSIDERAȚII TEORETICE.....	12
I. SISTEME CU ELIBERARE CONTROLATĂ DE MEDICAMENTE.....	12
I.1. Definiție. Avantaje și dezavantaje.....	12
I.2. Moduri de administrare.....	13
I.3. Clasificarea sistemelor de eliberare controlată în funcție de tipul mecanismului de transport al medicamentelor.....	15
I.3.1. Sisteme de eliberare controlate de difuzie.....	15
I.3.2. Sisteme de eliberare controlate de eroziune.....	17
I.3.3. Sisteme de eliberare controlate de umflare.....	18
I.4. Modele matematice care descriu eliberarea controlată de principii biologice active.....	19
I.4.1. Cinetica de ordin 0.....	20
I.4.2. Cinetica de ordin unu.....	20
I.4.3. Ecuația Noyes și Whitney.....	20
I.4.4. Modelul Hixson-Crowell.....	21
I.4.5. Modelul Higuchi.....	21
I.4.6. Modelele Ritger-Peppas și Korsmeyer-Peppas.....	22
I.5. Hidrogelurile.....	23
I.5.1. Factori determinanți în eliberarea controlată a medicamentelor din matrici hidrofile.....	25
I.5.1.1. Medicament.....	25
I.5.1.1.1. Masă molară și difuzivitate.....	25
I.5.1.1.2. Solubilitatea medicamentelor.....	26
I.5.1.1.3. Doză.....	26
I.5.1.1.4. Mărimea particulei de medicament și forma sa.....	27
I.5.1.2. Polimerul.....	27
I.5.1.2.1. Tipul de polimer.....	27
I.5.1.2.2. Masa molară.....	28
I.5.1.2.3. Concentrația polimerului.....	28
I.5.1.2.4. Amestecurile de polimeri.....	28
I.5.1.2.5. Dimensiunea particulei de polimer.....	28
I.5.1.3. Variabilele de formulare.....	29
I.5.1.3.1. Geometria formulărilor.....	29
I.5.1.3.2. Excipienți/aditivi.....	29

II. POLIMERI, COMPLECȘI POLIMERICI UTILIZAȚI PENTRU OBTINEREA SISTEMELOR CU ELIBERARE CONTROLATĂ A MEDICAMENTELOR.....	30
II.1. Polimeri.....	30
II.1.1. Chitosanul.....	30
II.1.2. Poli (alcoolul vinilic).....	37
II.1.3. Xantanul.....	40
II.2. Complecși polimerici.....	43
II.2.1. Chitosan-Poli (alcool vinilic).....	43
II.2.2. Xantan-Chitosan.....	46
PARTEA EXPERIMENTALĂ. CONTRIBUȚII PERSONALE.....	51
III. MATERIALE ȘI METODE.....	51
III.1 Materiale utilizate în studiul experimental.....	51
III.2. Metode de caracterizare.....	56
III.2.1. Caracterizarea structurală.....	56
III.2.1.1 Spectroscopia IR cu transformată Fourier (FTIR) și cu Transformată Fourier prin Reflexie Totală Atenuată (FTIR-ATR)	56
III.2.2. Metode de analiză termică.....	57
III.2.2.1. Analiza termogravimetrică (TGA)	57
III.2.2.2. Analiza de calorimetrie diferențială (DSC)	57
III.2.3. Metode de analiză a suprafeței.....	58
III.2.3.1. Microscopie electronică de baleiaj (SEM)	58
III.2.3.2. Metoda unghiului de contact.....	58
III.2.4. Metode de analiză mecanică.....	59
III.2.4.1. Măsurători reologice.....	59
III.2.4.2. Evaluarea parametrilor de curgere și compresibilitate.....	60
III.2.4.3. Analiza mecanică.....	62
III.2.5. Metode de evaluare <i>in vitro</i> a sistemelor obținute.....	63
III.2.5.1. Teste de umflare.....	63
III.2.5.2. Studii <i>in vitro</i> de eliberare a principiilor active.....	64
III.2.5.3. Teste de citotoxicitate.....	67
III.2.5.4. Comportarea antimicrobiană.....	69
III.2.6. Teste <i>in vivo</i> pe șobolani.....	70
III.2.6.1. Evaluarea greutatei corporale a animalelor.....	70
III.2.6.2. Determinarea conținutului de apă din materiile fecale.....	70
III.2.6.3. Determinarea parametrilor biochimici.....	71
III.2.6.4. Studiul histopatologic.....	71

IV. SISTEME CHITOSAN-POLI (ALCOOL VINILIC) CU NEOMICINĂ.....	73
IV.1. Prepararea filmelor pe bază de Cs, PVA și Ne.....	73
IV.2. Caracterizarea fizico-chimică, mecanică și biologică.....	74
IV.2.1. Spectroscopia FTIR-ATR.....	74
IV.2.2. Analiza termică.....	76
IV.2.3. Microscopie SEM.....	80
IV.2.4. Determinarea unghiului de contact și a energiei libere la suprafață.....	82
IV.2.5. Proprietăți mecanice.....	84
IV.2.6. Activitatea antibacteriană.....	85
IV.3. Concluzii.....	87
V. SISTEME CHITOSAN-POLI (ALCOOL VINILIC) CU NEOMICINĂ ȘI/SAU NISTATINĂ.....	88
V.1. Prepararea filmelor Cs-PVA, Cs-PVA-Ne, Cs-PVA-Nis , Cs-PVA-Ne-Nis.....	89
V.2. Caracterizarea fizico-chimică, mecanică și biologică.....	89
V.2.1. Microscopie SEM.....	90
V.2.2. Determinarea unghiului de contact și a energiei libere la suprafață.....	91
V.2.3. Proprietăți mecanice.....	93
V.2.4. Cinetica eliberării <i>in vitro</i> a Ne și Nis din filmele Cs-PVA.....	94
V.2.5. Evaluarea viabilității celulare.....	96
V.3. Concluzii.....	98
VI. SISTEME XANTAN-CHITOSAN-NEOMICINĂ PENTRU ADMINISTRARE ORALĂ.....	99
VI.1. Prepararea hidrogelurilor Xa-Cs-Ne 50%.....	99
VI.2. Caracterizarea fizico-chimică, mecanică și biologică.....	100
VI.2.1. Spectroscopia FTIR.....	101
VI.2.2. Microscopie SEM.....	102
VI.2.3. Determinarea parametrilor de curgere și compresibilitate ai amestecului.....	104
VI.2.4. Studii de umflare.....	104
VI.2.5. Cinetica eliberării <i>in vitro</i> a Ne din complexul Xa-Cs-Ne 50%.....	105
VI.2.6. Evaluarea greutateii corporale a șobolanilor în urma administrării complexului.....	107
VI.2.7. Determinarea conținutului de apă din materiile fecale.....	107
VI.2.8. Determinarea parametrilor biochimici.....	108
VI.2.9. Studiul histopatologic.....	109
VI.3. Concluzii.....	112
VII. SISTEME XANTAN-CHITOSAN-NEOMICINĂ PENTRU	

ADMINISTRARE TOPICĂ.....	114
VII.1. Prepararea hidrogelurilor Xa-Cs-Ne.....	114
VII.2. Caracterizarea fizico-chimică, mecanică și biologică.....	115
VII.2.1. Analiza termică.....	115
VII.2.2. Teste reologice.....	119
VII.2.3. Cinetica eliberării <i>in vitro</i> a Ne din complexul Xa-Cs-Ne.....	126
VII.2.4. Evaluarea viabilității celulare.....	129
VII.2.5. Activitatea antibacteriană.....	129
VII.3. Concluzii.....	131
CONCLUZII GENERALE.....	132
ACTIVITATEA ȘTIINȚIFICĂ.....	136
BIBLIOGRAFIE.....	138

Notă: Rezumatul lucrării prezintă rezultatele și concluziile la studiile întreprinse. La redactarea rezumatului s-au păstrat, pentru capitole, subcapitole, ecuații, figuri și tabele, notațiile folosite în textul tezei de doctorat.

INTRODUCERE

Oamenii și medicina sunt inseparabili din cele mai vechi timpuri. Cu toate că formele fizice ale medicamentelor nu s-au schimbat radical, atitudinea oamenilor față de medicamente s-a schimbat odată cu trecerea timpului. Astfel, au fost dezvoltate și sunt în curs de dezvoltare noi sisteme cu eliberare controlată de medicamente, pentru a depăși limitarea impusă de sistemele convenționale. Astăzi, aproximativ șaiszeci de milioane de pacienți beneficiază de sisteme avansate de eliberare de medicamente, primind doze mai sigure și mai eficiente de medicamente de care au nevoie, pentru a lupta împotriva unei varietăți de afecțiuni, inclusiv împotriva acelorora ce amenință viața.

În ciuda utilizării la scară largă a antibioticelor infecțiile microbiene reprezintă unele din cauzele principale de spitalizare și mortalitate. Eșecul clinic al terapiei cu antibiotice este datorat biodisponibilității scăzute, penetrării slabe la locul infecției, efectelor secundare și rezistenței microorganismelor la antibiotice.

Studiile întreprinse în cadrul acestei teze au ca scop optimizarea proprietăților terapeutice ale unor antibiotice (neomicină și nistatină), făcându-le mult mai eficiente și nu în ultimul rând cât mai puțin toxice pentru organism.

Cunoscută fiind utilizarea lor cu succes la fabricarea sistemelor cu eliberare controlată de medicamente, în cercetarea efectuată s-a optat pentru alegerea hidrogelurilor, datorită proprietăților versatile și unice ale acestora. Hidrogelurile, rețele polimerice, hidrofile, tridimensionale, se caracterizează prin porozitate, deformabilitate, biocompatibilitate, biodegradabilitate și implică o gamă largă de constituenți, metode flexibile de sinteză, obținerea caracteristicilor fizice dorite și o varietate de forme fizice (tablete, microparticule, nanoparticule și filme).

Prezenta lucrare propune și realizează, obținerea și caracterizarea unor sisteme cu eliberare controlată pe bază de hidrogeluri și antibiotice care au ca scop prevenirea eventualelor infecții de la nivelul pielii și tractului gastro-intestinal.

Teza de doctorat intitulată ***Noi sisteme polimer-principii active cu eliberare controlată*** este structurată în două părți principale ce cuprind șapte capitole. Prima parte - Considerații teoretice - reprezintă un studiu de literatură privind sistemele cu eliberare controlată de medicamente și polimerii utilizați în obținerea acestora. Partea a II-a - Partea experimentală. Contribuții personale - cuprinde contribuțiile privind sinteza și caracterizarea suporturilor polimerice dar și a sistemelor polimer-medicament. Lucrarea se extinde pe 153 pagini și cuprinde 23 tabele, 58 figuri, 25 ecuații și 180 referințe bibliografice.

Capitolul I prezintă un studiu detaliat de literatură cu informații generale despre sistemele cu eliberare controlată de medicamente, diferitele căi utilizate pentru administrarea acestora, mecanismele care descriu eliberarea medicamentelor încorporate în suporturile polimerice și modelele matematice aplicate care folosesc matematica în mod descriptiv și care pot oferi informații generale în legătură cu profilul de eliberare al diferitelor principii active. De asemenea, prezintă avantajele utilizării hidrogelurilor în proiectarea acestor sisteme cât și factorii determinanți în eliberarea controlată a medicamentelor din matrici hidrofile.

În **capitolul II** sunt prezentate structura și proprietățile polimerilor utilizați în obținerea sistemelor cu eliberare controlată de medicamente. De asemenea, este făcută o prezentare succintă a unor sisteme polimer-medicament obținute pe bază de complecși polimerici similari, cu cei utilizați în lucrarea de față.

Capitolul III este dedicat părții experimentale în care sunt specificate materialele utilizate și metodologia de caracterizare a suporturilor polimerice și a sistemelor polimer-medicament obținute.

Capitolul IV cuprinde prepararea filmelor pe bază de chitosan, poli (alcool vinilic) și neomicină, influența proporției între polimeri și a adaosului de medicament asupra proprietăților fizico-chimice (analiză structurală, analiză termică, morfologie, hidrofilie), mecanice și biologice (activitate antibacteriană). La fel ca și filmele sintetizate în capitolul următor, acestea sunt recomandate ca pansamente cu rol în protecția și vindecarea rănilor.

Capitolul V descrie obținerea filmelor pe bază de chitosan, poli (alcool vinilic), neomicină sau/și nistatină utilizând plastifiantii glicerol și polietilenglicol 400. În cadrul acestui capitol s-a investigat influența introducerii celui de-al doilea medicament, asupra morfologiei, hidrofiliei, proprietăților mecanice și capacității de eliberare a medicamentelor, din sistemele sintetizate. În final au fost efectuate teste de viabilitate celulară.

Capitolul VI prezintă obținerea complecșilor pe bază de xantan, chitosan și neomicină ca și potențiale sisteme pentru administrare orală. A fost studiată influența încorporării medicamentului în suporturile xantan-chitosan prin studii de spectroscopie FTIR și microscopie electronică de baleiaj (SEM). S-au determinat parametrii de curgere și compresibilitate ai amestecului și au fost efectuate studii de umflare și eliberare *in vitro* a medicamentului din comprimate, în condiții similare mediului gastric și intestinal. În urma studiilor *in vivo* pe șobolani, au fost determinați parametrii biochimici și realizată interpretarea preparatelor histologice permanente obținute.

Capitolul VII prezintă obținerea sistemelor pe bază de xantan, chitosan și neomicină și testarea acestora în eventualitatea utilizării ca și potențiale sisteme cu administrare topică. A fost studiată influența concentrației de medicament prin studii de analiză termică, teste de reologie, studii de eliberare *in vitro* a medicamentului, la pH-ul pielii. Au fost determinate viabilitatea celulară și activitatea antibacteriană a sistemelor obținute.

În finalul tezei sunt prezentate **concluziile generale, activitatea științifică și referințele bibliografice.**

IV. SISTEME CHITOSAN-POLI (ALCOOL VINILIC) CU NEOMICINĂ

În domeniul îngrijirii și gestionării rănilor, pansamentele au fost pe larg investigate, de la cele tradiționale precum bandajele naturale și sintetice, vată și tifon, la cele moderne precum hidrocoloizi, algiinați, hidrogeluri, etc, cu o serie de avantaje și dezavantaje (*Li și colab., 2013; Kiseliuviene și colab., 2016; Kamoun și colab., 2017*).

Hidrogelurile prezintă proprietăți avantajoase pentru pacienți ce le recomandă în utilizarea ca și pansamente cu rol în protecția și vindecarea rănilor. Între acestea sunt confortul la utilizare și alinarea imediată a durerii, în comparație cu sistemele tradiționale; conținutul ridicat în apă al acestora conferă un efect calmant și răcoritor asupra zonei rănite. De asemenea hidrogelurile sunt lipsite de adezivitate; faptul că nu se lipesc de rană facilitează schimbarea pansamentului cu minimă durere și disconfort pentru pacient. Transparența hidrogelurilor este un avantaj suplimentar față de materialele tradiționale deoarece vindecarea rănilor poate fi monitorizată în mod constant, fără înlăturarea pansamentului (*Madaghiele și colab., 2014*). Mai mult decât atât structura tridimensională a hidrogelurilor permite utilizarea lor ca și sisteme cu eliberare de medicamente (*Kiseliuviene și colab., 2016*).

Acest capitol este destinat studiului preparării filmelor Cs-PVA-Ne utilizând trei rapoarte diferite ale polimerilor și caracterizării acestora. S-a urmărit prin studiile efectuate, determinarea influenței procentului în PVA, cât și a adăugării medicamentului, asupra proprietăților filmelor obținute.

IV.1. Prepararea filmelor pe bază de Cs, PVA și Ne

Soluția de Cs (1% w/v) a fost preparată prin dizolvarea acestuia în soluție 10% acid acetic glacial, la temperatura camerei, cu agitare continuă timp de 24 de ore. Soluția de PVA (10% w/v) a fost obținută prin amestecarea PVA în apă distilată cu ajutorul unui agitator magnetic, la temperatura de 90 °C timp de 2 ore până la obținerea unei soluții clare. Cele două soluții au fost amestecate împreună, sub agitare continuă timp de 30 de minute, pentru formarea unor amestecuri omogene în trei rapoarte diferite 3:1, 1:1, 1:3 v/v (3Cs-PVA, Cs-PVA, Cs-3PVA). Bulele de aer au fost eliminate prin lăsarea amestecurilor la temperatura camerei timp de 2 ore. Filmele au fost obținute prin turnarea unor cantități determinate de amestec în plăci Petri. Înainte de caracterizare acestea au fost lăsate la temperatura camerei timp de 72 ore pentru uscare. Filmele încărcate cu medicament (1% w/v) (3Cs-PVA-Ne, Cs-PVA-Ne, Cs-3PVA-Ne) au fost preparate prin adăugarea medicamentului la amestecul polimeric, sub agitare continuă. Tabelul 8 prezintă compoziția filmelor obținute. Atât filmele încărcate cu medicament cât și cele fără medicament au fost transparente și lipsite de bule de aer.

Tabelul 8. Compoziția filmelor preparate

Probă	Cs (g)	PVA (g)	Ne (g)
3Cs-PVA	0,75	2,50	
3Cs-PVA-Ne	0,75	2,50	1,00
Cs-PVA	0,50	5,00	
Cs-PVA-Ne	0,50	5,00	1,00

Cs-3PVA	0,25	7,50	
Cs-3PVA-Ne	0,25	7,50	1,00

IV.2. Caracterizarea fizico-chimică, mecanică și biologică

Caracterizarea tuturor filmelor s-a făcut din punct de vedere structural, a stabilității termice, morfologiei și hidrofilicității acestora, proprietăților mecanice cât și a celor antibacteriene.

IV.2.1. Spectroscopia FTIR-ATR

Figura 20 prezintă spectrele de absorbție FTIR-ATR ale filmelor fără și cu medicament, în regiunea 600 cm^{-1} - 1800 cm^{-1} . Aceste spectre prezintă picurile caracteristice pentru Cs și PVA. Interacțiunea medicamentului cu amestecul polimeric conduce la deplasarea unor picuri la numere de undă mai mici și o scădere a intensității benzilor.

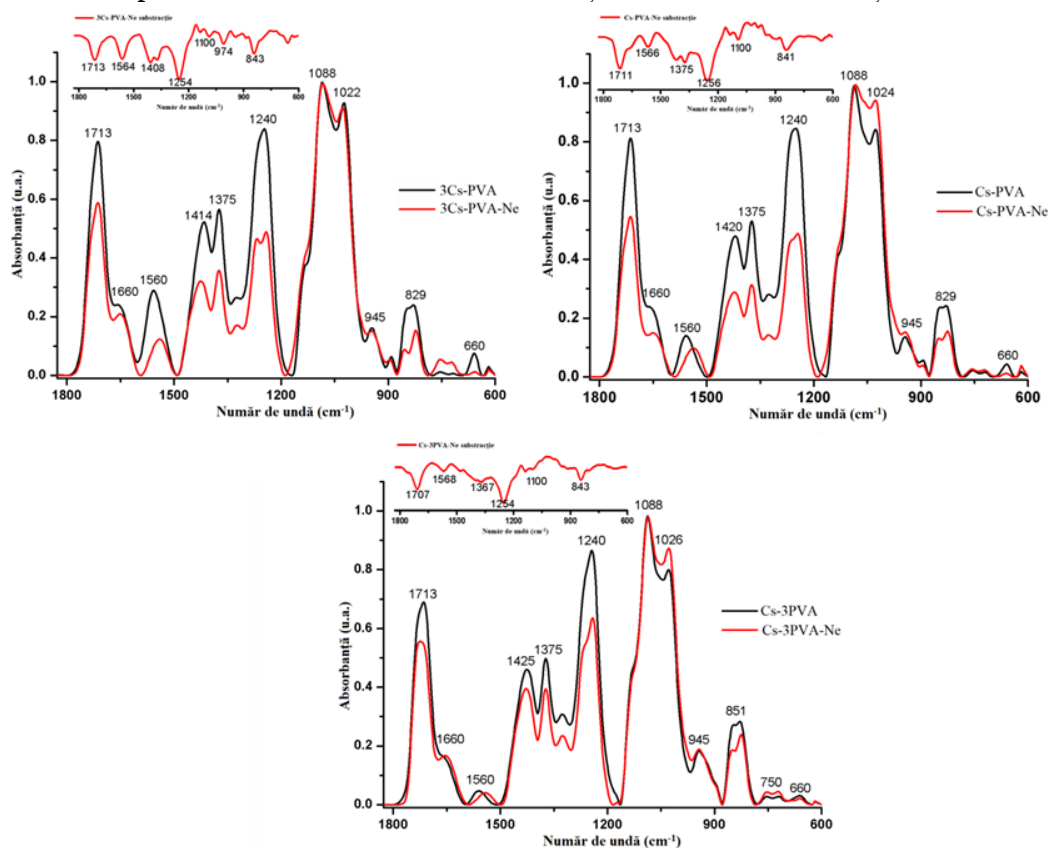


Figura 20. Spectrele FTIR pentru complexii (a) 3Cs-PVA și 3Cs-PVA-Ne (b) Cs-PVA și Cs-PVA-Ne (c) Cs-3PVA și Cs-3PVA-Ne

Astfel, banda de la 1713 cm^{-1} corespunde vibrației de întindere a ($\text{C}=\text{O}$) datorită absorbției grupelor acetat reziduale ale PVA (PVA a fost preparat din hidroliza poliacetatului de vinil) (*Costa Jr și colab., 2009*). Banda de la 1660 cm^{-1} este caracteristică amidei I a Cs, prin urmare este mai intensă la proba cu conținut mai ridicat în Cs (3Cs-PVA), și după interacțiunea cu Ne devine mai accentuată. Picul de la $\sim 1560\text{ cm}^{-1}$ se datorează deformării simetrice a NH_3^+ rezultat din ionizarea grupărilor amino primare ale Cs în mediul acid. Acest pic se suprapune cu vibrația de întindere a ($\text{C}-\text{N}$) (amida II) a Cs (*Costa Jr și colab., 2009*).

Prezența acestei benzi este de așteptat, dacă luăm în considerare faptul că formarea complexului are loc prin interacțiunea electrostatică între grupările pozitive ale Cs sau Ne și grupările negative ale PVA. Intensitatea sa scade cu creșterea conținutului de PVA. Acest pic este de asemenea deplasat la un număr de undă mai mic după adăugarea medicamentului, demonstrând interacțiunile puternice între aceste macromolecule. Un comportament similar a fost observat în literatura de specialitate atunci când glicerolul, nanoparticule de argint sau diferite medicamente au fost adăugate în complexul Cs-PVA (*Liang și colab., 2009a; Abdelgawad și colab., 2014*).

Benzile de absorbție din regiunea 1400 cm^{-1} - 1300 cm^{-1} sunt atribuite deformării de vibrație în plan și în afara planului a (C-H) din grupările -CH, -CH₂ și -CH₃ ale PVA, Cs și respectiv Ne (*Agnihotri și colab., 2012; Abdelgawad și colab., 2014*). Picul de la $\sim 1240\text{ cm}^{-1}$ corespunde vibrației de deformare a (N-H), care se suprapune cu vibrația de întindere a (C-N) (amida III) și a (O-H) din Cs (*Wang și colab., 2005*). Un nou pic apare la 1100 cm^{-1} , și poate fi atribuit frecvențelor grupei eterice a Ne. Banda de la 1088 cm^{-1} - 1024 cm^{-1} este atribuită vibrației de întindere a (C-O) a grupărilor eterice din scheletul polizaharidelor (*Hashemnia și colab., 2015*). Vibrația datorată rotirii (C-H) în spectrul PVA este observată la 850 cm^{-1} . Banda cristalin-sensibilă a Cs, corespunzătoare valorii 660 cm^{-1} a scăzut în intensitate în cazul filmelor conținând medicament, fapt ce demonstrează că, cristalizarea acestuia a fost modificată în procesul de amestecare (*Wang și colab., 2005*).

Interacțiunea dintre Cs, PVA și Ne are loc prin formarea legăturilor de hidrogen sau prin legăturile ionice dintre partenerii care poartă sarcini de semn opus.

IV.2.2. Analiza termică

Analiza termogravimetrică a fost utilizată în scopul evaluării stabilității termice și determinării temperaturii de descompunere a filmelor cu și fără medicament.

Tabelul 9. Caracteristicile termogravimetice ale filmelor

Proba	Etapă	T _{onset} (°C)	T _{peak} (°C)	T _{endset} (°C)	W %	Reziduu %
3Cs-PVA	I	45,07	56,8	80,8	5,49	16,10
	II	112,4	128,9	157,5	5,34	
	III	251,1	302,9	373,6	62,70	
	IV	425,6	439,7	470,2	10,37	
3Cs-PVA-Ne	I	50,8	85,6	102,4	7,42	18,50
	II	141,4	160,1	186,9	6,83	
	III	231,3	251,9	284,8	40,35	
	IV	397,4	429,8	466,5	26,90	
Cs-PVA	I	54,7	72,9	90,8	4,83	10,11
	II	122,0	140,1	161,9	4,70	
	III	248,1	310,3	356,9	56,51	
	IV	393,3	406,1	417,4	8,76	
	V	417,4	451,2	477,6	15,09	
Cs-PVA-Ne	I	58,9	83,6	117,8	7,45	15,08
	II	117,8	167,0	198,8	3,92	
	III	239,6	258,6	275,6	26,43	
	IV	275,6	328,5	354,6	18,69	
	V	419,9	430,9	494,3	28,43	
Cs-3PVA	I	49,1	81,7	111,1	5,36	10,08

	II	111,1	149,4	169,0	2,63	
	III	274,2	319,5	375,4	61,41	
	IV	419,3	445,3	456,8	14,39	
	V	456,8	537,2	602,8	6,13	
Cs-3PVA-Ne	I	67,1	85,18	125,9	5,26	14,50
	II	125,9	156,7	239,3	1,13	
	III	239,3	252,1	265,9	27,40	
	IV	321,7	336,6	410,4	20,55	
	V	410,4	441,3	465,1	31,16	

T_{onset} - temperatura la care începe degradarea în fiecare etapă; T_{peak} - temperatura la care viteza de degradare este maximă; T_{endset} - temperatura la care se încheie procesul de degradare din fiecare etapă; $W\%$ - pierderea procentuală de masă din fiecare etapă; **Reziduu** – cantitatea de reziduu de la finalul procesului de încălzire de la temperatura de 700°C.

Curbele termogravimetrice înregistrate în intervalul de temperatura 25 °C - 700 °C, prezentate în figura 21 au fost utilizate pentru evaluarea principalilor parametri ce caracterizează procesul de degradare. Acești parametri sunt prezentați în tabelul de mai sus. Din analiza acestora se poate observa că descompunerea are loc în patru etape succesive în cazul amestecurilor 3Cs-PVA și cinci etape successive în cazul amesturilor Cs-PVA și Cs-3PVA. Prima etapă de degradare corespunde unei pierderi de masă de 4,83% - 7,45% și este atribuită evaporării apei adsorbite la suprafața probelor. Intervalul de temperatură în care are loc este cuprins între 45,07 °C și 125,9 °C. Etapele doi, trei, patru, cinci apar în intervalul de temperatură 111,1 °C - 239,3 °C, 231,3 °C - 375,4 °C , 425,6 °C - 470,2 °C și respectiv 410,4 °C - 602,8 °C. Al treilea interval de degradare corespunde cu pierderea de masă cea mai mare (26,43% - 62,70%) și este atribuită dehidroxilării PVA și degradării Cs (dehidratare pirolitică și depolimerizare structură polizaharidică) având ca rezultat formarea de apă, carbon, dioxid de carbon, metan și amoniac (*Pereira și colab., 2015*).

Temperaturile maxime de descompunere în cazul filmelor fără medicament, pentru prima și a doua etapă de degradare sunt mai mici decât a filmelor cu medicament. Stabilitatea termică a filmelor fără medicament este mai mare în comparație cu a filmelor cu medicament, atunci cand nu se iau în considerare etapele de eliminare a apei. O creștere a stabilității termice este de asemenea observată odată cu creșterea conținutului în PVA. Masa pierdută a fost mai mică în cazul tuturor filmelor conținând medicament, comparativ cu filmele fără medicament. Acest lucru confirmă includerea medicamentelor în filmele pe bază de Cs și PVA (*Merlușcă și colab., 2017*).

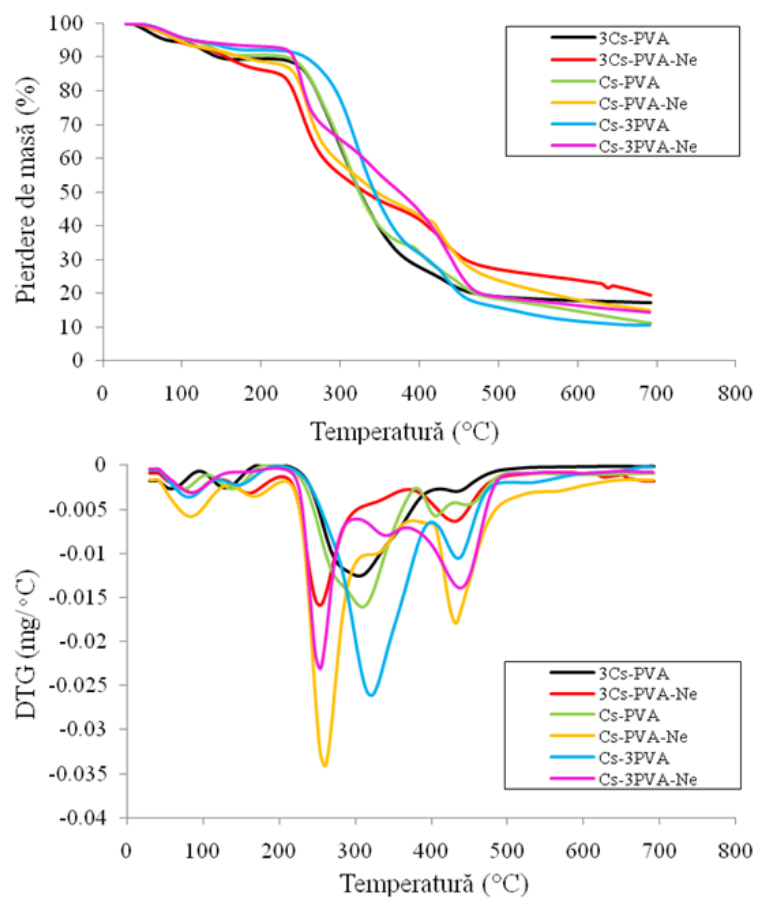


Figura 21. Curbele (a) TG și (b) DTG pentru complexii 3Cs-PVA, Cs-PVA, Cs-3PVA, 3Cs-PVA-Ne, Cs-PVA-Ne și Cs-3PVA-Ne

Tabelul 10. Parametrii calorimetrici determinați în urma interpretării curbelor DSC ale complexșilor și precursorilor

Proba	T _g (°C)	Pic 1				Pic 2				Pic 3			
		T _{onset} (°C)	T _{peak} (°C)	T _{endset} (°C)	ΔH (J/g)	T _{onset} (°C)	T _{peak} (°C)	T _{endset} (°C)	ΔH (J/g)	T _{onset} (°C)	T _{peak} (°C)	T _{endset} (°C)	ΔH (J/g)
3Cs-PVA	72,58	33,48	68,92	96,37	145,83	111,56	130,12	150,71	8,06	164,97	184,62	196,29	9,52
3Cs-PVA- Ne	68,95	48,6	83,65	125,54	196,78								
Cs-PVA	71,30	40,66	74,70	102,60	171,86	122,50	138,94	153,77	3,23	167,00	186,43	198,51	12,05
Cs-PVA- Ne	67,42	43,38	78,72	114,91	136,48	175,34	190,41	198,49	7,83				
Cs-3PVA	69,63	38,39	84,35	121,66	79,57	173,63	187,66	198,71	13,12				
Cs-3PVA- Ne	69,23	48,09	81,17	115,06	113,57	183,85	192,23	198,48	3,60				

T_g – temperatură de tranziție vitrosă, considerată Midpoint pe curba înregistrată pe cea de a doua încălzire; T_{onset} - temperatura onset a fiecărui început de etapă; T_{peak} - temperatura la care viteza de degradare este maximă; T_{endset} - temperatura endset a fiecărui final de etapă; ΔH - entalpia de evaporare.

DSC reprezintă o metodă de caracterizare fizică folosită pentru a studia comportamentul termic al materialelor. Termogramele DSC furnizează informații despre posibilele interacțiuni polimer-medicament în urma analizei unor parametri precum apariția, modificarea sau dispariția unor picuri, punct de topire și suprafața relativă a picului (Szekalska și colab., 2017).

Curbele DSC înregistrate în intervalul de temperatură 25 °C - 200 °C relevă pentru filmele fără și cu medicament, un prim pic în jurul valorii 75 °C și un al doilea pic observat în intervalul 130,12 °C - 192,23 °C. Acestea sunt deplasate la dreapta pe măsură ce crește concentrația de PVA. De asemenea, picurile prezintă o tendință de deplasare la dreapta în cazul filmelor încărcate cu medicament (Merlușcă și colab., 2017). Valorile entalpiilor de evaporare sunt în general mai scăzute pentru formulările cu conținut mai ridicat de PVA. Au fost evidențiate de asemenea temperaturile de tranziție sticloasă atât pentru pentru filmele fără, dar și cele cu medicament. Valorile obținute sunt prezentate în tabelul 10 și sunt în jurul temperaturii de aproximativ 70 °C.

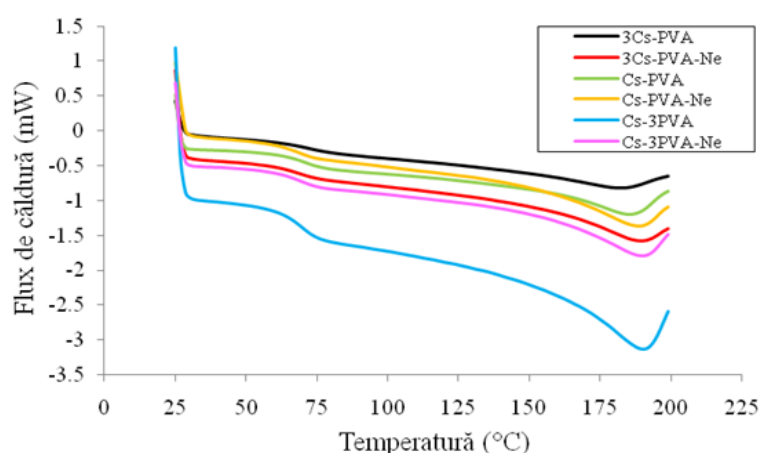
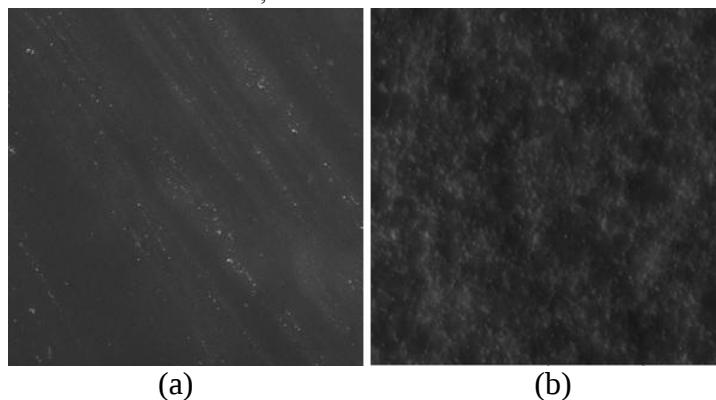


Figura 22. Curbele DSC pentru complexii: 3Cs-PVA, Cs-PVA, Cs-3PVA, 3Cs-PVA-Ne, Cs-PVA-Ne și Cs-3PVA-Ne

IV.2.3. Microscopie SEM

O mai bună înțelegere a caracteristicilor structurale și mecanice poate fi oferită de SEM (Deepak și colab., 2015). Figura 23 prezintă caracteristicile morfologice ale suprafețelor filmelor fără medicament și cu medicament.



(a)

(b)

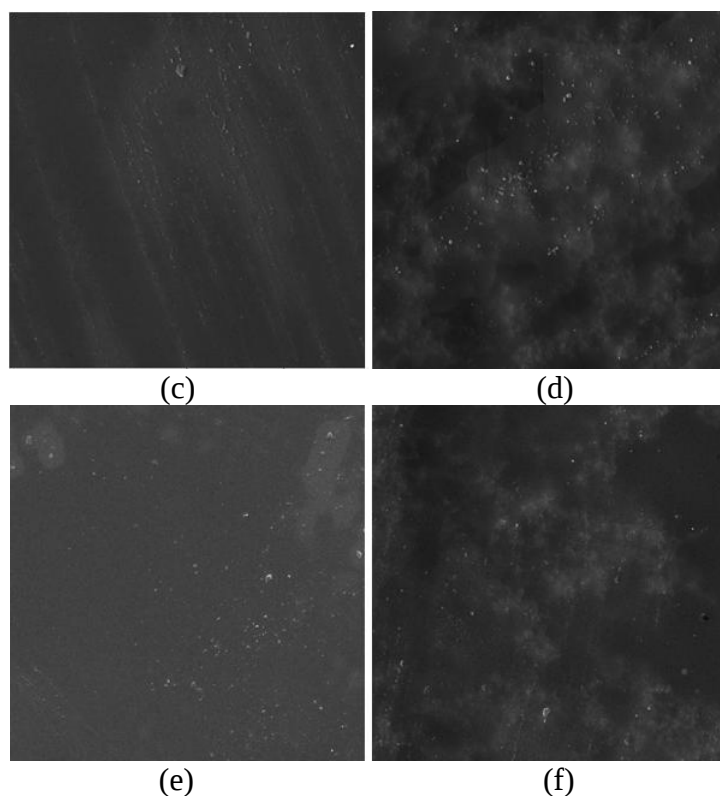


Figura 23. Micrografii SEM pentru filmele (a) 3Cs-PVA, (b) 3Cs-PVA-Ne, (c) Cs-PVA, (d) Cs-PVA-Ne, (e) Cs-3PVA și (f) Cs-3PVA-Ne aspect general, magnitudine - 20 μm

Imaginile SEM corespunzătoare filmelor fără medicament relevă pentru acestea o suprafață netedă și omogenă cu dungi albe. Acestea sunt cu atât mai vizibile cu cât conținutul de Cs în compoziția filmelor este mai ridicat. Suprafețele filmelor sunt continue și fără pori, rezultat al distribuției uniforme a moleculelor de Cs și PVA în interiorul filmelor.

Imaginile SEM corespunzătoare filmelor cu medicament relevă în cazul acestora o structură mai puțin ordonată, cu pori. Dungile albe sunt absente în cazul filmelor cu medicament (Merlușcă și colab., 2017).

IV.2.4. Determinarea unghiului de contact și a energiei libere la suprafață

Hidrofilicitatea de suprafață și în masă a materialelor sunt parametri foarte importanți care influențează comportamentul lor biologic (Bahrami și colab., 2003).

Unghiurile de contact în cazul tuturor filmelor conținând medicament au avut valori mai scăzute decât unghiurile de contact ale filmelor fără medicament, sugerând faptul că adăugarea medicamentului a crescut hidrofilia acestora. Valoarea unghiurilor de contact s-a situat sub valoarea de 90° , indicând astfel pentru acestea o suprafață hidrofilă. De asemenea, o creștere în hidrofilia filmelor este observată pe măsură ce crește conținutul de PVA în amestec (Merlușcă și colab., 2017). Valorile unghiurilor de contact sunt ilustrate în figura 24 și tabelul 11.

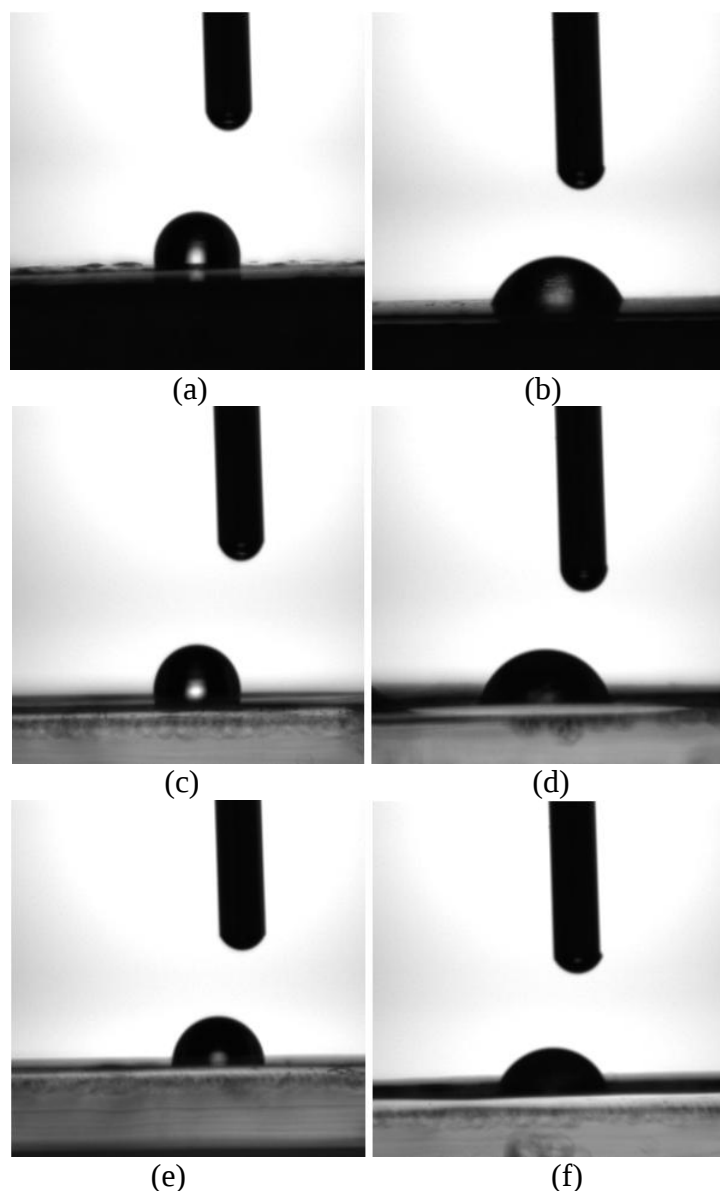


Figura 24. Imagini preluate de pe suprafețele filmelor: (a) 3Cs-PVA, (b) 3Cs-PVA-Ne, (c) Cs-PVA, (d) Cs-PVA-Ne, (e) Cs-3PVA și (f) Cs-3PVA-Ne

Cu ajutorul valorilor unghiului de contact se pot calcula o serie de parametrii ce caracterizează suprafața filmelor: energia liberă a suprafeței, tensiunea interfacială solid-lichid, lucrul de adeziune. Valorile acestor mărimi se regăsesc în tabelul 11.

Tabelul 11. Parametrii ce caracterizează suprafața filmelor studiate

Probă	θ (°)	W_a (mN/m)	γ_{sv} (mN/m)	γ_{sv}^p (mN/m)	γ_{sv}^d (mN/m)	γ_{SL} (mN/m)
3Cs-PVA	107,96	50,35	67,35	2,96	64,39	40,64
3Cs-PVA-Ne	67,64	100,49	34,68	24,08	10,60	6,99
Cs-PVA	97,64	63,12	44,37	0,004	44,36	54,05
Cs-PVA-Ne	59,41	109,84	42,23	34,54	7,69	5,19
Cs-3PVA	85,65	78,32	43,86	1,51	42,35	38,34
Cs-3PVA-Ne	51,59	118,03	54,95	52,54	2,41	9,72

θ - unghi de contact cu apa; W_a - lucrul de adeziune; γ_{sv} - energia liberă de suprafață; γ_{sv}^p - componenta polară; γ_{sv}^d - componenta dispersă; γ_{sl} - tensiunea interfacială solid lichid.

Din acest tabel se poate observa faptul că energia liberă a suprafeței filmelor (γ_{sv}), ce reprezintă suma componentelor polare (γ_{sv}^p) și disperse (γ_{sv}^d), are valori situate în intervalul 34,68 mN/m - 67,35 mN/m pentru toate filmele sintetizate. Componentele polare (γ_{sv}^p), includ două tipuri de interacții dipol-dipol și dipol-dipol indus și au valori mai mici în cazul filmelor fără medicament, iar componentele disperse (γ_{sv}^d) sunt reprezentate de interacțiile Van der Waals (Mittal, 2002) și au valori mai mici în cazul filmelor ce conțin medicament. De asemenea, creșterea unghiului de contact în cazul filmelor cu medicament, duce la o scădere a lucrului de adeziune (W_a) și o creștere a energiei interfaciale solid/lichid (γ_{sl}) a acestora.

IV.2.5. Proprietăți mecanice

Elasticitatea și rezistența filmelor sunt esențiale pentru protejarea suprafețelor rănilor de factorii externi (Kouchak și colab., 2014).

Figura 25 reprezintă variația rezistenței la rupere, rezistenței maxime, elongației și modulului Young pentru filmele încărcate și fără medicament, în funcție de procentul de PVA în compoziția acestora.

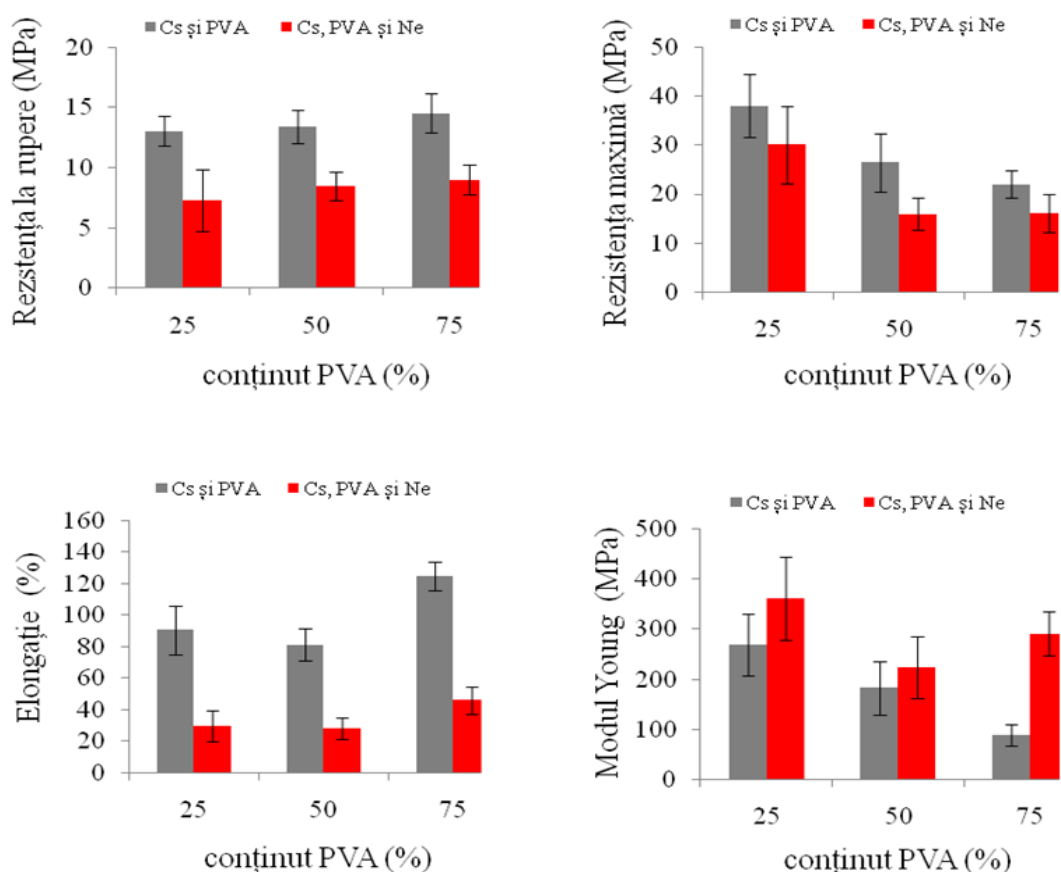


Figura 25. Proprietățile mecanice ale filmelor fără și cu medicament: rezistența la rupere, rezistența maximă, elongația la rupere și modulul Young

După cum se poate observa în figura 25 odată cu creșterea conținutului de PVA s-a evidențiat o creștere a rezistenței la rupere și o descreștere a rezistenței maxime atât în cazul filmelor cu medicament, cât și a celor fără medicament. În ceea ce privește elongația, aceasta scade în prima fază, apoi crește, pe măsura creșterii procentului de PVA în compoziția filmelor. Modulul Young, descrește odată cu creșterea conținutului de PVA.

Adaosul de medicament a făcut filmele mai fragile și mai puțin flexibile. Aceste modificări s-au datorat probabil Ne care prezintă o structură amorfă și hidrofilă (Merlușcă și colab., 2017). Proprietățile mecanice slabe se pot datora de asemenea dezorganizării structurale și discontinuității filmelor conținând Cs și PVA, cauzate de încorporarea medicamentului (Kouchak și colab., 2014).

IV.2.6. Activitatea antibacteriană

Figura 26 și tabelul 12 prezintă diametrele zonelor de inhibiție ale filmelor cu și fără medicament, în cazul tulpinilor *Staphylococcus aureus* și *Escherichia coli*.

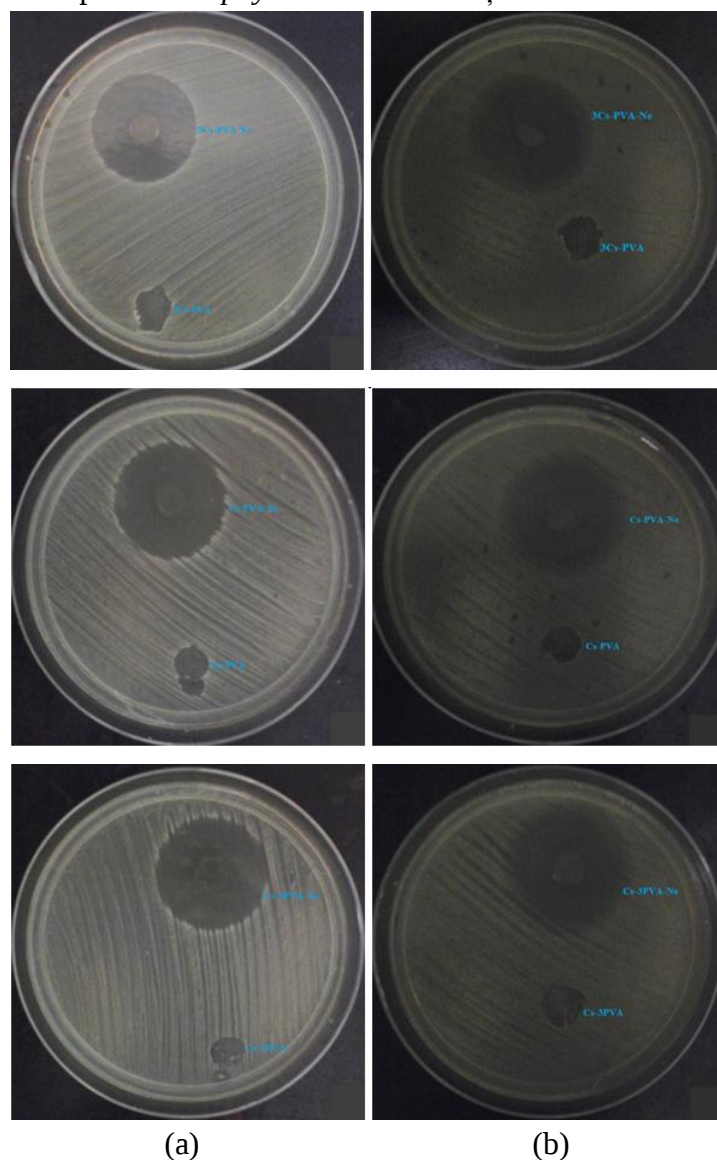


Figura 26. Zona de inhibiție în cazul tulpinilor (a) *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 și (b) *Escherichia coli* ATCC 25922

Tabelul 12. Activitatea antibacteriană a filmelor cu și fără medicament

Probă	Diametrul zonei de inhibiție (mm)	
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922
3Cs-PVA	10,00 ± 0,00	9,33 ± 0,57
3Cs-PVA-Ne	27,66 ± 0,57	29,33 ± 0,57
Cs-PVA	9,66 ± 0,57	9,66 ± 0,57
Cs-PVA-Ne	28,33 ± 0,57	30,66 ± 0,57
Cs-3PVA	10,33 ± 0,57	10,00 ± 1,00
Cs-3PVA-Ne	29,66 ± 0,57	31,33 ± 0,57

În ceea ce privește filmele fără medicament acestea au prezentat diametre ale zonelor de inhibiție comparabile în cazul celor două tipuri de bacterii.

Activitatea antibacteriană a filmelor încărcate cu medicament a fost evident mai mare comparativ cu a filmelor fără medicament. Un diametru mai mare al zonelor de inhibiție pentru filmele încărcate cu medicament a fost înregistrat în cazul bacteriilor Gram-pozitive (*Staphylococcus aureus*) și mai scăzut în cazul celor gram-negative (*Escherichia coli*). De asemenea s-au constatat creșteri ale diametrelor zonelor de inhibiție pe măsura creșterii procentului de PVA în compoziția filmelor (Merlușcă și colab., 2017).

IV.3. Concluzii

În acest studiu s-au preparat filme pe bază de Cs și PVA în 3 rapoarte diferite 3:1, 1:1, 1:3 v/v. O parte dintre acestea au fost încărcate cu medicament 1%.

Rezultatele analizelor FTIR, precum și rezultatele analizelor termogravimetrice au confirmat prezența Ne în filmele obținute cât și interacțiunea între Cs, PVA și Ne. Aceasta poate avea loc prin formarea legăturilor de hidrogen, sau prin formarea legăturilor ionice între partenerii care poartă sarcini de semn opus.

Din măsurătorile unghiurilor de contact s-a observat o creștere a gradului de hidrofilie pentru filmele încărcate cu medicament comparativ cu filmele fără medicament.

Micrografiile SEM au relevat o suprafață mai puțin ordonată cu pori mari în cazul filmelor încărcate cu medicament, comparativ cu cele fără medicament care au prezentat o suprafață continuă fără pori.

Rezultatele testelor mecanice obținute pentru filmele cu medicament arată că acestea sunt potrivite pentru utilizarea ca și pansamente cu rol în protecția și vindecarea rănilor, deoarece valorile rezistenței și elongației se încadrează în intervalele furnizate de literatură.

Filmele încărcate cu medicament au prezentat o activitate antibacteriană superioară (~30.00 mm) comparativ cu filmele fără medicament (~10.00 mm). Inhibiția bacteriană în cazul testelor pe *Staphylococcus aureus* a fost mai mare decât în cazul testelor pe *Escherichia coli*.

Mai mult decât atât, un procent crescut de PVA în compoziția filmelor pare să îmbunătățească toate aceste proprietăți.

Datorită proprietăților fizico-chimice, a caracteristicilor mecanice și a excelentelor proprietăți antibacteriene, filmele cu Ne sunt recomandate în utilizarea lor ca și pansamente cu rol în protecția și vindecarea rănilor.

V. SISTEME CHITOSAN-POLI (ALCOOL VINILIC) CU NEOMICINĂ ȘI/SAU NISTATINĂ

Marea majoritate a studiilor recente au fost focusate pe dezvoltarea de sisteme bioactive ca și pansamente pentru răni, sisteme care includ materiale ce joacă un rol activ în protecția și vindecarea acestora (*Straccia și colab., 2015*).

Un sistem ideal trebuie să protejeze rana de infecțiile secundare, să creeze și să mențină un mediu umed, să absoarbă exudatele, să reducă necroza suprafeței plăgii, să stimuleze factorii de creștere și de asemenea să fie elastic, biocompatibil și degradabil (*Kamoun și colab., 2015; Kokabi și colab., 2007*). Hidrogelurile prezintă caracteristici unice care pot îndeplini cerințele esențiale ale pansamentelor ideale (*Kokabi și colab., 2007*).

Combinarea antibioticelor este o strategie promițătoare de creștere a eficienței tratamentului și de control al rezistenței la acestea. Atunci când medicamentele sunt combinate, efectele lor asupra celulelor pot fi amplificate sau slăbite, deoarece medicamentele pot prezenta interacțiuni sinergice sau antagoniste (*Bollenbach, 2015*).

Sulfatul de neomicină a fost descoperit de Waksman și Lechevalier în anul 1949. Acesta este produs de către actinomicetele *Streptomyces Fradiae* prin fermentație naturală și reprezintă un complex de antibiotice aminoglicozidice dintre care neomicina B (framicetina), este produsul cu cea mai mare concentrație și activitate (*Huidobro și colab., 2009; Hanko și Rohrer, 2007*).

Nistatina a fost descoperită în anul 1949 de către Brown și Hazen în probe de sol conținând o tulpină de *Streptomyces noursei* (*Khatry Sirish și colab., 2010; Packiaraj și colab., 2017*). Nistatina este un amestec de macrolide polienice similare din punct de vedere structural, dintre care nistatina A1 este componentul principal (*de Planque și colab., 2006*).

Acest capitol este destinat studiului preparării și caracterizării filmelor pe bază de Cs și PVA cu Ne și/sau Nis încorporată. S-a urmărit prin studiile efectuate asupra filmelor determinarea influenței adăugării antibioticelor individual sau în combinație asupra proprietăților materialelor obținute.

V.1. Prepararea filmelor Cs-PVA, Cs-PVA-Ne, Cs-PVA-Nis , Cs-PVA-Ne-Nis

Soluția de Cs (1% w/v) a fost obținută prin dizolvarea acestuia în soluție 1% acid acetic glacial la temperatura camerei, cu agitare continuă timp de 24 de ore. Soluția de PVA (1% w/v) a fost obținută prin amestecarea PVA în apă distilată, cu ajutorul unui agitator magnetic, la temperatura de 90 °C, timp de 2 ore până la obținerea unei soluții clare. Ne dizolvată în apă distilată a fost adăugată la soluția de PVA. Nis dispersată în amestecul de plastifianți PEG 400 : glicerol (1:1), ținută în baie de ultrasonare timp de jumătate de oră la 40 °C, a fost adăugată amestecului de polimeri cu sau fără Ne. Soluțiile au fost amestecate împreună, sub agitare continuă timp de 30 de minute pentru formarea unor amestecuri omogene. Bulele de aer au fost eliminate prin lăsarea amestecurilor la temperatura camerei timp de 2 ore. Filmele au fost obținute prin turnarea unor cantități determinate de amestec în plăci Petri. Înainte de caracterizare acestea au fost lăsate la temperatura camerei pentru

uscare. Au fost preparate filme cu Ne și Nis separat, filme conținând combinația acestora și filme fără medicament. Compoziția filmelor este prezentată în tabelul 13.

Tabelul 13. Compoziția filmelor preparate

Denumire	Cs (g)	PVA (g)	Ne (g)	Nis (g)	PEG 400 (ml)	Gly (ml)
Cs-PVA	0,50	0,50	-	-	1	1
Cs-PVA-Nis	0,50	0,50	-	0,10	1	1
Cs-PVA-Ne	0,50	0,50	0,10	-	1	1
Cs-PVA- Nis-Ne	0,50	0,50	0,10	0,10	1	1

V.2. Caracterizarea fizico-chimică, mecanică și biologică

Caracterizarea tuturor filmelor s-a făcut din punct de vedere al morfologiei, hidrofiliei și proprietăților mecanice. Comportamentul de eliberare *in vitro* a Ne și Nis din acestea a fost investigat în soluție tampon fosfat pH 7,4 cu 10% Gly. În final, au fost realizate teste de viabilitate celulară pentru filmele fără medicament și filmele conținând ambele tipuri de medicament.

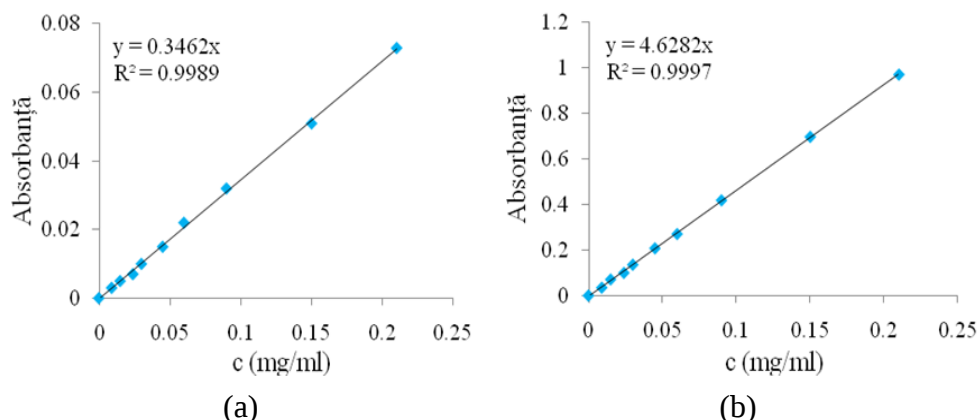


Figura 27. Reprezentarea grafică a curbei etalon pentru (a) Ne și (b) Nis în soluție tampon fosfat pH 7,4 cu 10% Gly

Cantitatea de medicament eliberată a fost determinată folosind curbele de etalonare trasate la $\lambda = 570$ nm pentru soluții de Ne de concentrații cunoscute și respectiv $\lambda = 307$ nm pentru soluții de Nis de concentrații cunoscute. Ecuatiile curbelor de etalonare pentru Ne (23) și Nis (24) sunt următoarele:

$$A = 0,3462 \times c \quad (23)$$

$$A = 4,6282 \times c \quad (24)$$

unde:

A - absorbanta;

c - concentrația soluțiilor exprimată în mg/ml.

V.2.1. Microscopie SEM

Imaginile SEM au fost utilizate pentru o mai bună elucidare a structurii interne a filmelor. Figura 28 prezintă caracteristicile morfologice ale secțiunilor filmelor cu și fără medicament.

După cum se poate observa în figura 28, secțiunea transversală a filmului Cs-PVA a prezentat o morfologie compactă și omogenă, sugerând o miscibilitate bună și omogenitate între componentele acestuia. În cazul filmelor conținând Nis, particulele nesolubilizate de medicament de culoare albă pot fi văzute răspândite în secțiunea transversală a acestora. O morfologie compactă și omogenă cu câteva cavități, prezintă și filmele încărcate cu Ne.

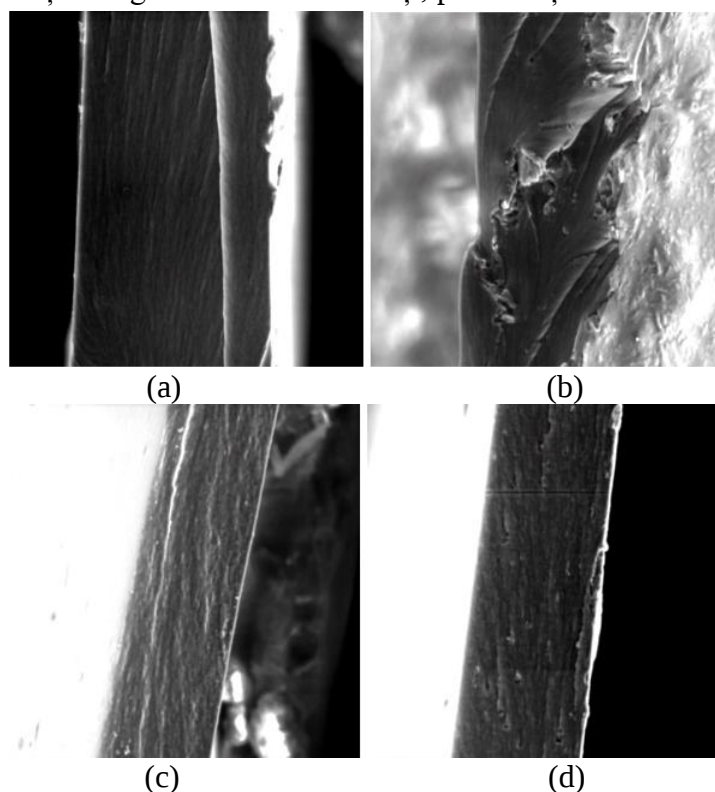


Figura 28. Micrografii SEM pentru filmele (a) Cs-PVA, (b) Cs-PVA-Nis (c) Cs-PVA-Ne (d) Cs-PVA-Nis-Ne - secțiune, magnitudine - 50 μm

Imaginile SEM corespunzătoare filmelor cu ambele tipuri de medicamente relevă pentru acestea o morfologie compactă și omogenă cu câteva cavități și particule de Nis, semn că nu a fost dizolvată întreaga cantitate de medicament. Secțiunile transversale ale filmelor confirmă o bună încorporare a medicamentelor în matricea polimerică.

V.2.2. Determinarea unghiului de contact și a energiei libere la suprafață

Proprietăți precum adsorbția proteinelor, adeziunea sau activarea plachetelor, coagularea sângelui, adeziunea celulară și bacteriană, sunt influențate de comportamentul la udare al biomaterialelor (Dos Santos și colab., 2017).

Conform cu figura 29 și tabelul 14 filmele fără medicament sunt ușor hidrofobe, având o valoare a unghiului de contact peste 90 °, în timp ce filmele încărcate cu medicament sunt hidrofile valorile unghiurilor de contact situându-se sub 90 °. Valorile unghiurilor de

contact scad odată cu introducerea medicamentelor, datorită caracterului polar al acestora. Valoarea cea mai scăzută, după cum era de așteptat, s-a înregistrat în cazul filmelor conținând ambele medicamente.

În acord cu valorile unghiurilor de contact se va observa o capacitate mai mare de eliberare a medicamentelor în cazul filmelor conținând ambele tipuri de medicament, în comparație cu filmele conținând un singur tip de medicament.

Udarea poate deci influența eliberarea medicamentelor, o eliberare mai rapidă putând preveni adeziunea inițială a microorganismelor (Otto și colab., 2008).

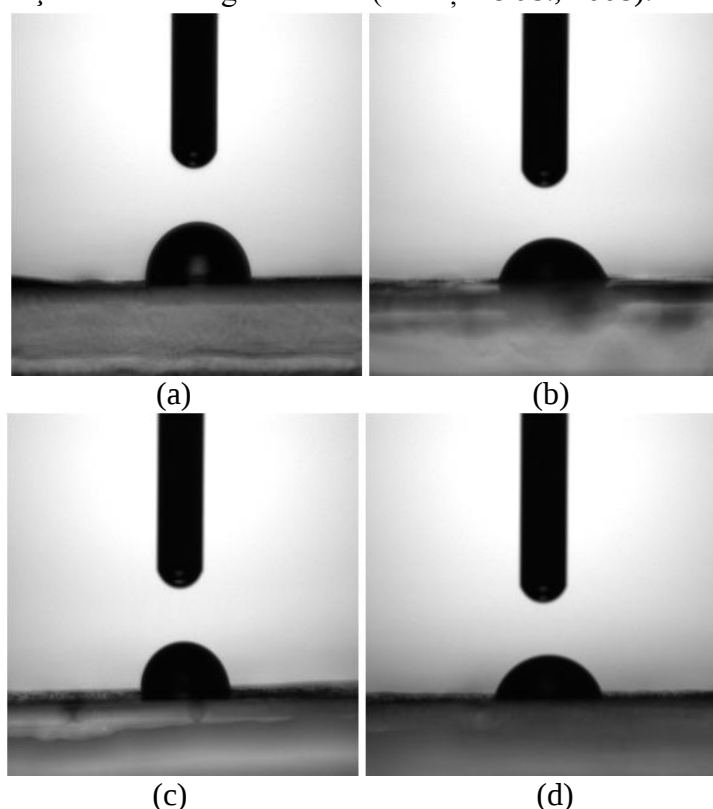


Figura 29. Imagini preluate de pe suprafețele filmelor: (a) Cs-PVA, (b) Cs-PVA-Nis, (c) Cs-PVA-Ne, (d) Cs-PVA-Nis-Ne

Energia liberă la suprafață a fost determinată prin măsurarea unghiului de contact cu apă bidistilată și etilen glicol. Pe baza acestor valori s-au calculat parametrii ce caracterizează suprafața solidului și capacitatea de absorbție a acestuia (hidrofilia): energia liberă a suprafeței, tensiunea interfacială solid-lichid, lucrul de adeziune (tabelul 14).

Tabelul 14. Parametrii ce caracterizează suprafața filmelor studiate

Probă	θ (°)	W_a (mN/m)	γ_{sv} (mN/m)	γ_{sv}^p (mN/m)	γ_{sv}^d (mN/m)	γ_{SL} (mN/m)
Cs-PVA	90,91	71,63	23,51	4,77	18,74	24,67
Cs-PVA-Nis	67,89	100,19	46,32	46,21	0,11	18,92
Cs-PVA-Ne	87,03	76,56	20,43	11,92	8,50	16,66
Cs-PVA-Nis-Ne	59,56	109,68	42,45	35,56	6,88	5,56

θ - unghi de contact cu apa; W_a - lucrul de adeziune; γ_{sv} - energia liberă de suprafață; γ_{sv}^p - componenta polară; γ_{sv}^d - componenta dispersă; γ_{sl} - tensiunea interfacială solid lichid.

V.2.3. Proprietăți mecanice

Proprietățile mecanice ale filmelor sunt prezentate în figura 30.

Grosimea filmelor uscate s-a situat în intervalul 80 μm - 100 μm .

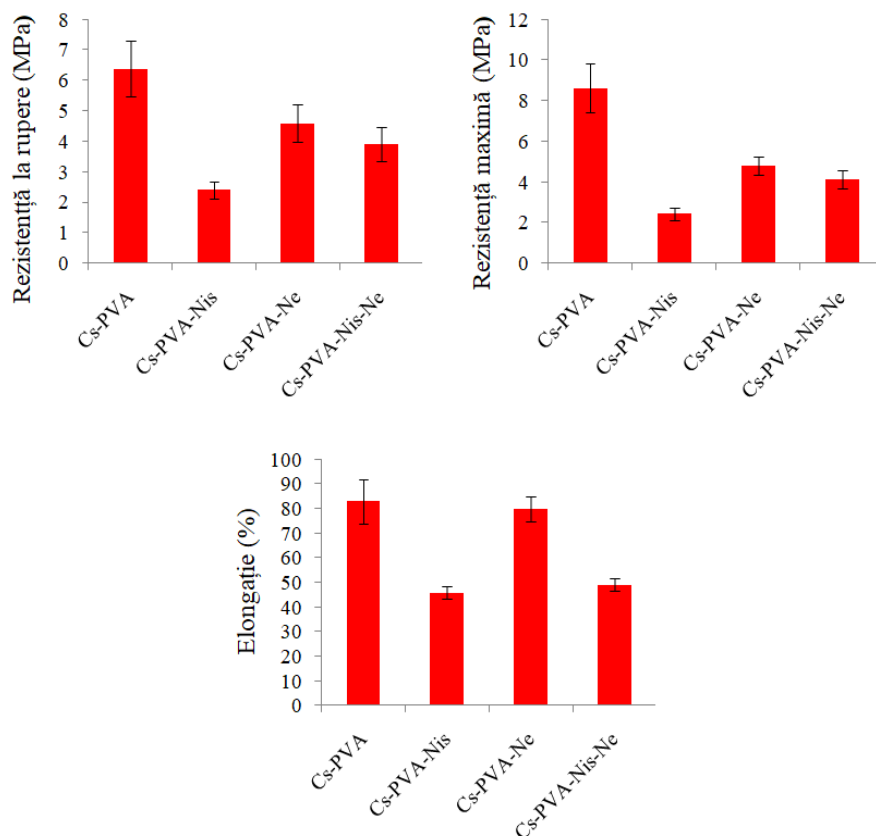


Figura 30. Proprietățile mecanice ale filmelor fără și cu medicament: rezistența la rupere, rezistența maximă și elongația

Compartiv cu controlul Cs-PVA, încorporarea atât a Ne cât și a Nis individual, a condus la o scădere a rezistenței și elongației filmelor. Proprietățile mecanice slabe se pot datora atât naturii hidrofile a celor două medicamente cât și dezorganizării structurale și discontinuității filmelor pe bază de Cs și PVA, cauzate de încorporarea medicamentelor. Scăderea mult mai pronunțată a acestor parametrii în cazul filmelor conținând Nis este probabil rezultatul solubilizării incomplete a particulelor de medicament. Filmele conținând ambele tipuri de medicament prezintă valori intermediare între filmele cu un singur medicament.

V.2.4. Cinetica eliberării in vitro a Ne și Nis din filmele Cs-PVA

Figura 31 prezintă curbele de eliberare a Ne și Nis din filmele Cs-PVA încărcate cu medicament.

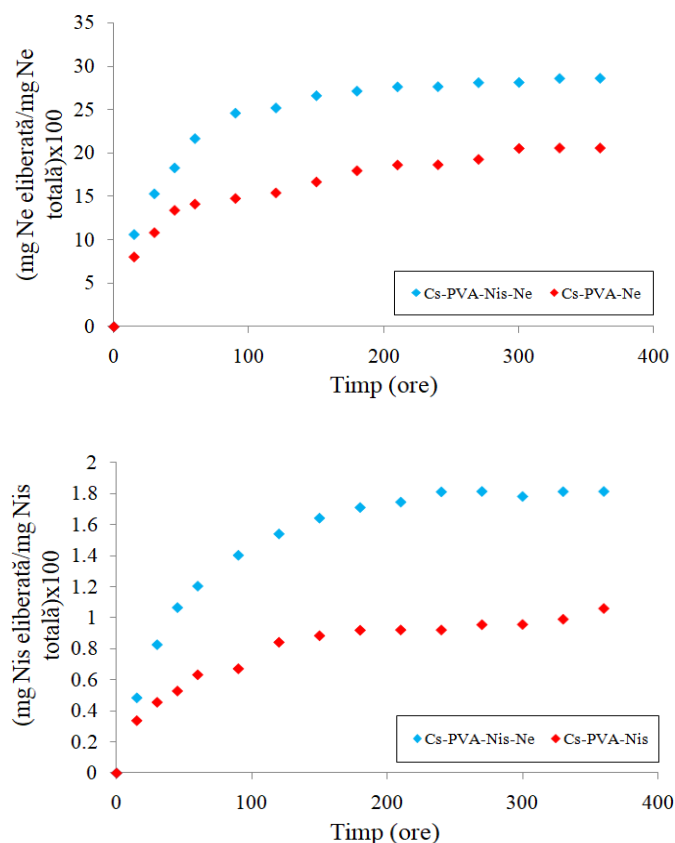


Figura 31. Curbele de eliberare *in vitro* a Ne și Nis din filmele Cs-PVA

Comparând rezultatele obținute la eliberarea simultană cu cele obținute la eliberarea individuală se observă o creștere a procentului de medicament eliberat în cazul filmelor cu eliberare simultană. Astfel 28,63% Ne din filmul cu eliberare simultană Cs-PVA-Ne-Nis a fost eliberată la sfârșitul celor 360 minute comparativ cu 20,63% din filmul cu eliberare individuală Cs-PVA-Ne. În cazul Nis procentele înregistrate au fost 1,81% pentru filmele Cs-PVA-Ne-Nis și respectiv 1,06% pentru filmele Cs-PVA-Nis. Se observă o eliberare rapidă („burst release”) în primele 150 minute cu 26,62% Ne și 1,64% Nis în cazul filmelor Cs-PVA-Ne-Nis, conținând ambele tipuri de medicament și 16,71% Ne, respectiv 0,88% Nis în cazul filmelor Cs-PVA-Ne și Cs-PVA-Nis, cu un singur medicament. De la 150 minute la 360 minute cantitatea de medicament eliberată crește lent și constant. Prin urmare prezența ambelor medicamente în filmele Cs-PVA conduce la o capacitate de eliberare mai bună.

Pentru a putea obține informații asupra mecanismului de eliberare al medicamentelor în intervalul de timp 0 minute - 150 minute și respectiv 150 minute - 360 minute, a fost aplicat modelul cinetic Ritger și Peppas discutat anterior în capitolul I.

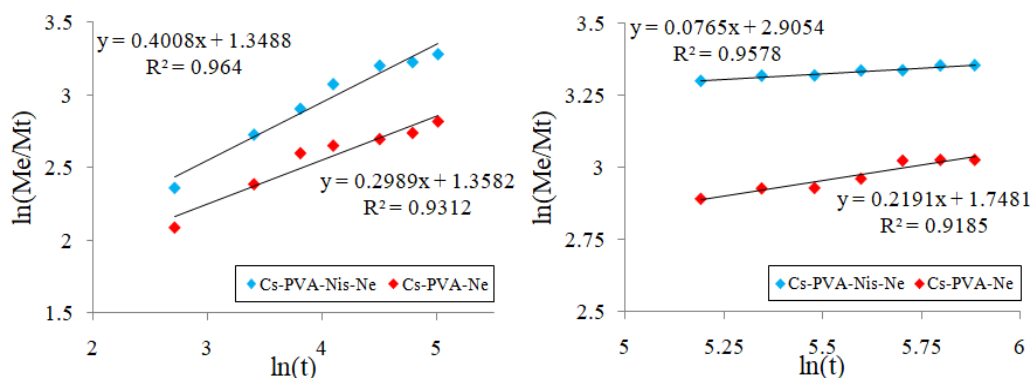


Figura 32. Cinetica de eliberare a Ne din filmele Cs-PVA-Nis-Ne și Cs-PVA-Ne (a) 0 minute -150 minute și (b) 150 minute - 360 minute

Valorile lui n obținute la eliberarea Ne atât în cazul filmelor Cs-PVA-Nis-Ne cât și al filmelor Cs-PVA-Ne, pentru ambele intervale de timp, sunt sub valoarea lui 0,5 indicând un proces de difuzie de tip Fickian.

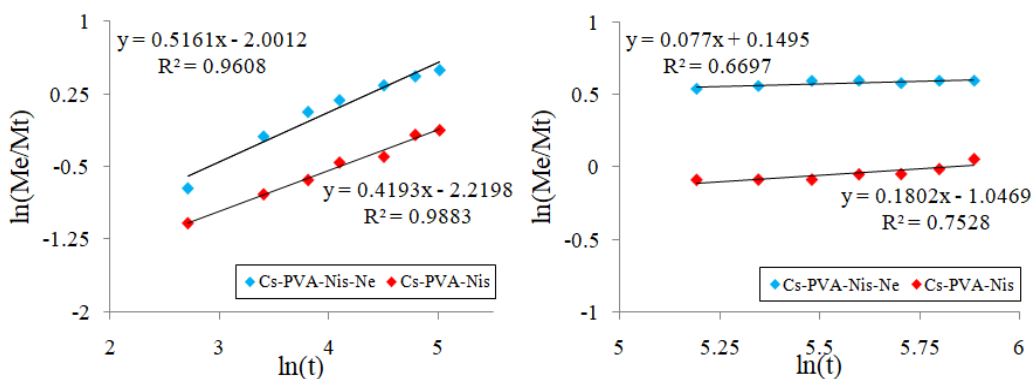


Figura 33. Cinetica de eliberare a Nis din filmele Cs-PVA-Nis-Ne și Cs-PVA-Nis (a) 0 minute -150 minute și (b) 150 minute -360 minute

Valorile lui n , înregistrate la eliberarea Nis în intervalul 0 minute - 150 minute, sunt 0,51 pentru pentru filmele Cs-PVA-Nis-Ne, indicând un proces de difuzie de tip non-Fickian și 0,41 pentru filmele Cs-PVA-Nis, indicând un proces de difuzie de tip Fickian. Pentru intervalul 150 minute - 360 minute acestea se situează sub valoarea 0,5 și sunt caracteristice unui proces difuzie de tip Fickian.

V.2.5. Evaluarea viabilității celulare

Conform ISO 10993-5:2009, procente ale viabilități celulare de peste 80%, caracterizează materialele non-citotoxice, intervalul 80% - 60% corespunde unei citotoxicități reduse, intervalul 60% - 40% unei citotoxicități moderate, iar valorile sub 40%, unei citotoxicități ridicate a produsului testat.

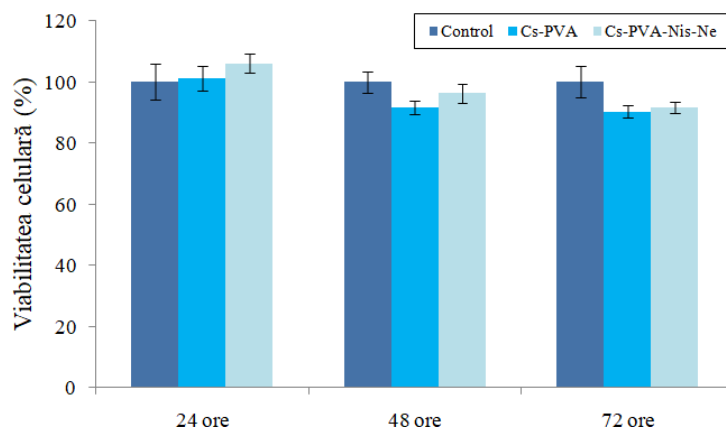
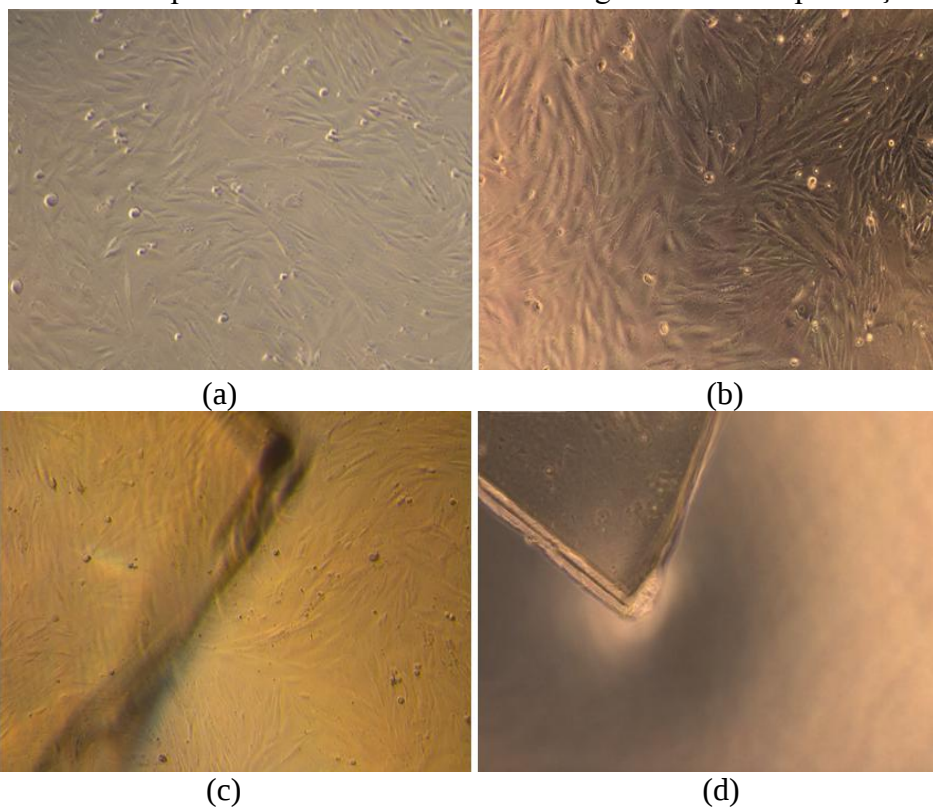


Figura 34. Viabilitatea celulară a loturilor Control, Cs-PVA și Cs-PVA-Nis-Ne

Din analiza datelor obținute prin tehnica MTT se constată o viabilitate celulară mult peste 80%, indicând biocompatibilitatea filmelor. O tendință de descreștere în timp a viabilității celulare este observată pentru filmele Cs-PVA și Cs-PVA-Nis-Ne, aceasta fiind mai pronunțată în cazul celor din urmă.

Observațiile efectuate mai sus, sunt confirmate și de imaginile obținute cu ajutorul microscopului inversat prin care a fost analizată morfologia celulelor în prezența filmelor.



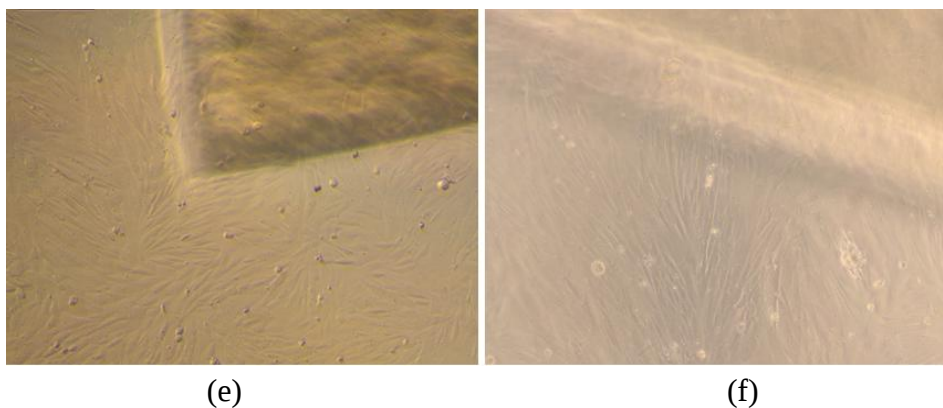


Figura 35. Vizualizarea celulelor la 48 și 72 ore pentru control (a) și (b), probele Cs-PVA (c) și (d), probele Cs-PVA-Nis-Ne (e) și (f)

Din figura 35 se poate constata faptul că celulele prezintă o morfologie normală, specifică fibroblaștilor, sunt întinse pe substrat, iar în unele zone există o tendință de populare a filmelor.

V.3. Concluzii

Au fost obținute sisteme tip filme pe bază de Cs-PVA încărcate cu două medicamente antimicrobiene, Ne și Nis separat și prin combinarea acestora.

Morfologia lor a fost pusă în evidență prin microscopie electronică de baleiaj, metodă prin care s-a observat că filmele obținute au structură compactă și omogenă, cu câteva particule de medicament nedizolvate, în cazul filmelor conținând Nis, respectiv câteva cavități în cazul filmelor conținând Ne.

Din măsurătorile unghiurilor de contact s-a observat o creștere a gradului de hidrofilie pentru filmele încărcate cu medicament comparativ cu filmele fără medicament, ordinea fiind următoarea $\text{Cs-PVA} < \text{Cs-PVA-Ne} < \text{Cs-PVA-Nis} < \text{Cs-PVA-Nis-Ne}$.

Deși încorporarea Ne și/sau Nis în filmele Cs-PVA a avut ca rezultat scăderea rezistenței și elongației filmelor, rezultatele obținute recomandă utilizarea lor ca și pansamente cu rol în protecția și vindecarea rănilor.

Modul de eliberare al medicamentelor din suporturi este caracteristic sistemelor difuzionale, implicând un “burst effect” inițial, urmat de o eliberare lentă și continuă până la 6 ore, cu procente de medicament eliberat mai mari în cazul eliberării simultane comparativ cu eliberarea individuală.

Testul de citotoxicitate încadrează filmele conținând ambele tipuri de medicament în categoria celor lipsite de toxicitate.

Aceste rezultate arată avantajele încorporării simultane a Ne și Nis în filmele de Cs-PVA, în eventualitatea aplicării lor ca și pansamente cu rol în protecția și vindecarea rănilor.

VI. SISTEME XANTAN-CHITOSAN-NEOMICINĂ PENTRU ADMINISTRARE ORALĂ

În cazul mamiferelor, tratamentul cu antibiotice este adesea asociat cu descreșterea numărului microorganismelor benefice și creșterea numărului microorganismelor potențial dăunătoare. Sulfatul de neomicină, un antibiotic non-absorbabil, cu spectru larg de acțiune, utilizat frecvent la sterilizarea GIT, reduce populația bacteriilor intestinale aerobe. Distrugerea sau tulburarea homeostaziei microbiene intestinale de către antibiotice, slăbește bariera intestinală conducând în cele din urmă la creșterea permeabilității intestinale. În plus, sulfatul de neomicină poate produce o serie de efecte adverse asupra fiziologiei, morfologiei și histologiei GIT (*Bose și colab., 2013*).

După cum s-a menționat deja în capitolul II, complexul xanthan-chitosan reprezintă o alternativă foarte bună pentru obținerea sistemelor cu eliberare controlată de medicamente pentru administrare orală, datorită faptului că produșii rezultați în timpul degradării sunt metabolizi netoxici, complexul prezentând o înaltă rezistență enzimatică în GIT (*Argin și colab., 2014*).

Scopul acestui studiu este încorporarea Ne în suportul Xa-Cs, caracterizarea sistemului nou format și evaluarea efectului benefic al încorporării medicamentului în suportul polimeric.

V.I. Prepararea hidrogelurilor Xa-Cs-Ne 50%

Soluția de Cs ($c = 0,65\%$, w/v) a fost preparată dizolvând 6,5 g Cs în 300 ml soluție HCl 0,1 N. Această soluție a fost neutralizată apoi cu NaOH 0,1 N. La soluția obținută s-a adăugat apă bidistilată până la un volum de 1000 ml și un pH 6 - 6,2. Soluția de Xa ($c = 0,65\%$, w/v) a fost preparată dizolvând 6,5 g Xa în 1000 ml apă bidistilată. Soluția de Ne (10%, w/v) a fost obținută dizolvând 5 g Ne în 50 ml apă bidistilată.

Pentru prepararea suportului polimeric mai întâi a avut loc sonicarea soluției de Xa având masa egală cu 132 g. Soluția a fost picurată apoi cu pompa peristaltică la un debit de 3 ml/min în 60 ml soluție Cs sub agitare magnetică lentă. Perlele de gel formate au fost menținute sub agitare magnetică slabă 30 minute pentru maturare, după care au fost filtrate pe o sită, spălate cu apă distilată de 3 ori până la pH 6,5 - 7 și apoi liofilizate. După spălare hidrogelurile de Xa-Cs s-au prezentat sub formă de perle stabile cu diametrul de cca 3 mm (*Dumitriu și colab., 1997*).

Pentru prepararea complexului Xa-Cs-Ne 50% (conținând 50% medicament), 0,5 g perle liofilizate de Xa-Cs, au fost aduse în 5 ml soluție de Ne (10%, w/v). Difuzia completă a soluției de Ne în suportul polimeric a avut loc prin amestecare timp de 15 de minute.

VI.2. Caracterizarea fizico-chimică, mecanică și biologică

Au fost investigate interacțiunile între amestecul polimeric și medicament, cu ajutorul spectroscopiei FTIR, iar morfologia hidrogelurilor a fost analizată prin microscopie SEM. De asemenea, au fost determinați parametrii de curgere și compresibilitate ai amestecului Xa-Cs-Ne 50%. Determinarea gradului maxim de umflare al comprimatelor și studiile de eliberare in

vitro a Ne din comprimate, au fost realizate în medii de pH similare mediului fiziologic gastro-intestinal (pH 2 pentru mediul gastric și pH 7,2 pentru mediul intestinal).

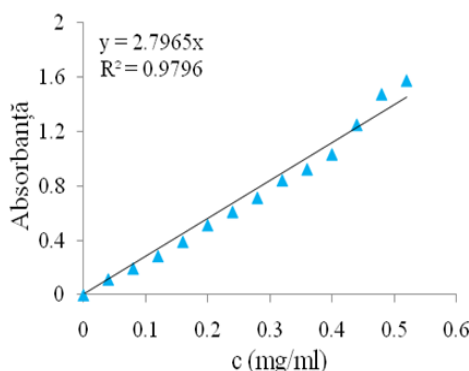


Figura 36. Curba de etalonare pentru Ne la pH 2 și pH 7,2

Cantitatea de Ne a fost determinată spectrofotometric la lungimea de undă $\lambda = 570$ nm, pe baza curbei de etalonare trasată cu soluții de Ne de concentrații cunoscute în domeniul 0,04 mg/ml - 0,52 mg/ml la pH 1,5 și la pH 7,2.

$$A = 2,7965 \times c \quad (25)$$

unde:

- A este absorbanta;
- c este concentrația soluțiilor exprimată în mg/ml.

Ecuația este valabilă pentru ambele valori de pH.

Testele *in vivo* au fost efectuate pe șobolani Wistar, iar doza de medicament administrată a fost de 50 mg pudră Ne/100 g corp șobolan sau echivalentul acesteia în complecși. A fost evaluată greutatea corporală a șobolanilor în ziua 10 de tratament, iar în ziua 14 determinat conținutul de apă în materiile fecale. Dozarea concentrațiilor serice ale parametrilor biochimici investigați, s-a realizat prin metoda spectrofotometrică, iar fragmente din organele recoltate de la șobolani au fost prelucrate utilizând tehnica preparatelor permanente.

VI.2.1. Spectroscopia FTIR

Analiza spectrală FTIR presupune identificarea benzilor de absorbție care corespund vibrațiilor grupelor funcționale din molecule, în domeniul 400 cm^{-1} - 4000 cm^{-1} .

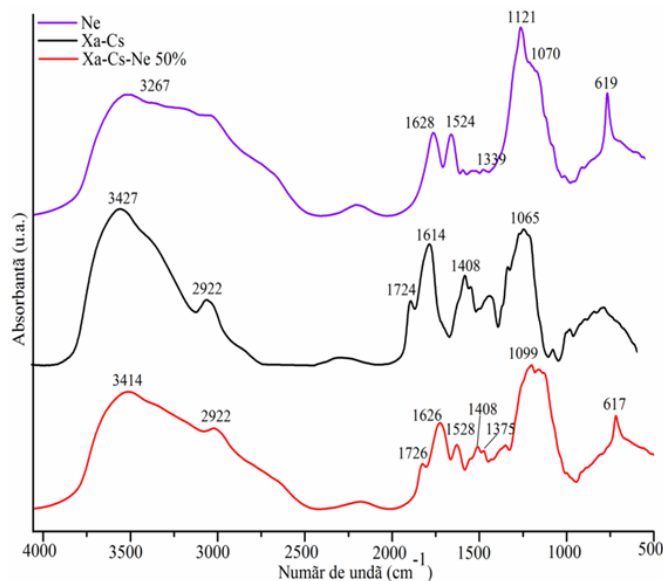


Figura 37. Spectrele FTIR pentru Ne, complexul Xa-Cs și Xa-Cs-Ne 50%

Spectrul FTIR (figura 37) prezintă caracteristicile benzilor de absorbție pentru Ne, Xa-Cs și Xa-Cs-Ne 50%. În cazul Ne, banda de la 3267 cm^{-1} apare datorită vibrației grupării O-H conjugate cu N-H și C-H aromatic, banda de la 1339 cm^{-1} corespunde legăturii C-N, banda de la 1070 cm^{-1} corespunde legăturii C-O, iar banda de la 1524 cm^{-1} legăturii -C-C- (Rastogi și colab., 2012). Benzile de la 1628 cm^{-1} și 1121 cm^{-1} corespund legăturii N-H și respectiv frecvenței grupărilor eter. Banda din jurul valorii 619 cm^{-1} poate fi atribuită legăturii N-H din afara planului din Ne (Hashemnia și colab., 2015).

În complexul polimeric Xa-Cs, Xa este recunoscut prin picul corespunzător numărului de undă 1065 cm^{-1} (legătura C-O din gruparea alcool), 2922 cm^{-1} (alungirea C-H) și 3427 cm^{-1} (alungirea -OH), iar Cs pentru banda de absorbție caracteristică numărului de undă 1614 cm^{-1} (NH_2) (Novac, 2009). Picul corespunzător numărului de undă 1654 cm^{-1} din Cs pur, datorat grupării amidei I deacetilate nu se mai observă, datorită interacțiunii intermoleculare între Xa și Cs. Gruparea COOH a Xa disociază, anionul COO^- format interacționând electrostatic cu gruparea amino protonată a Cs, cu formarea complexului polielectrolitic (Thakur și colab., 2013). Banda de la 1408 cm^{-1} arată interacțiunea grupării NH_3^+ a Cs cu gruparea COO^- a Xa (Aelenei și colab., 2009). Complexarea celor doi polimeri nu a afectat comportamentul grupării esterice, care a prezentat o absorbție mai slabă în jurul valorii 1724 cm^{-1} (Popa și colab., 2010).

În spectrele complexelor Xa-Cs-Ne 50% s-a observat că se regăsesc benzile caracteristice pentru medicament, respectiv polimeri. Benzile localizate în regiunea 3200 cm^{-1} - 3500 cm^{-1} sunt atenuate datorită formării legăturilor de hidrogen între cei doi polimeri și Ne.

VI.2.2. Microscopie SEM

Figura 38 prezintă caracteristicile morfologice ale sferelor de hidrogel Xa-Cs și respectiv ale complexului Xa-Cs-Ne 50%.

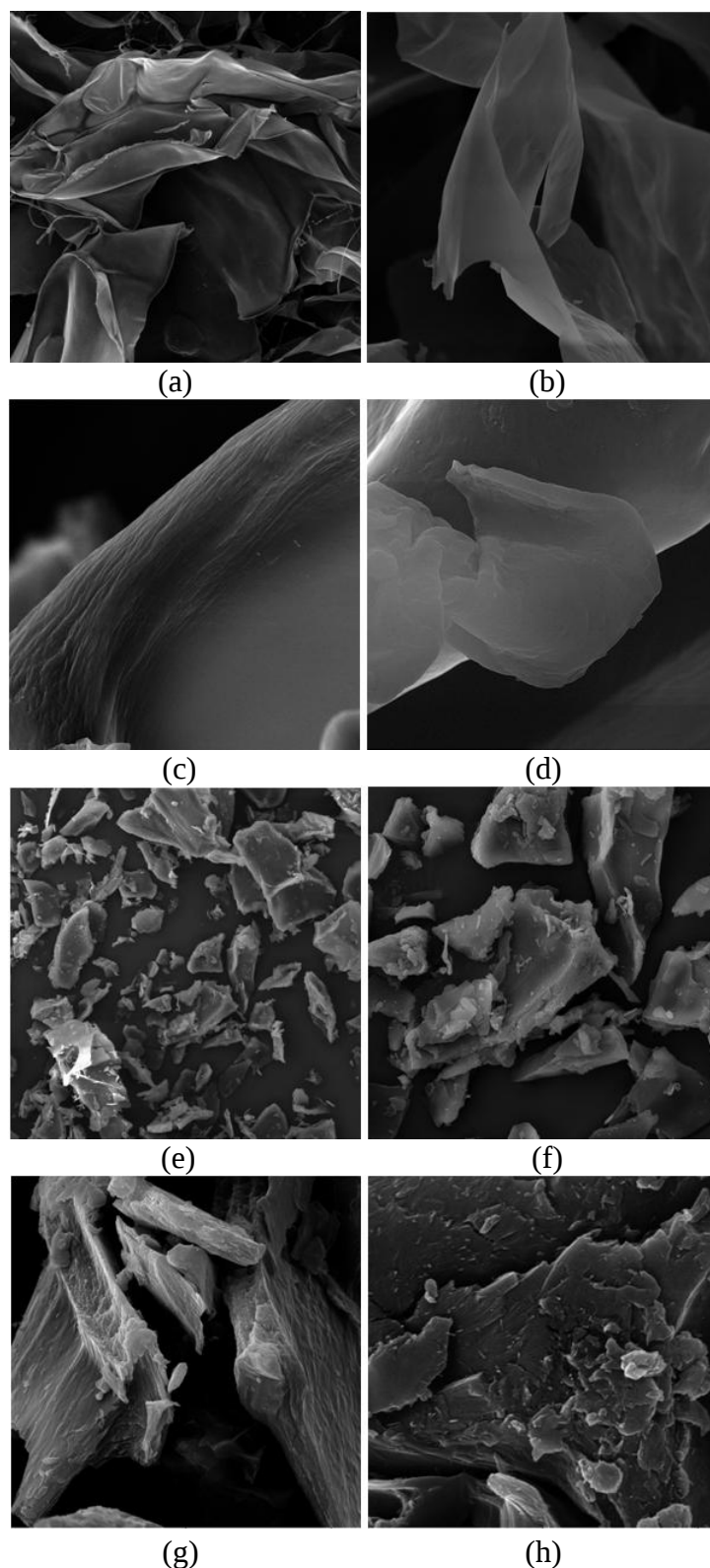


Figura 38. Micrografii SEM pentru sferele Xa-Cs: (a) aspect general, magnitudine - 1 mm, (b) aspect general, magnitudine - 100 μm , (c) secțiune, magnitudine - 50 μm , (d) aspect general, magnitudine - 5 μm și Xa-Cs-Ne 50%: (e) aspect general, magnitudine - 200 μm , (f) aspect general, magnitudine - 50 μm , (g) aspect general, magnitudine - 20 μm , (h) aspect general, magnitudine - 5 μm

Imaginile SEM, ne relevă o structură generală a sferelor Xa-Cs poroasă, cu falduri (magnitudine 1 mm). Structura poroasă a determinat capacitatea de umflare a sferelor și încorporarea unei cantități mari de medicament. La magnitudine de 100 μm , complexul polimeric apare sub forma unor foițe subțiri, iar la magnitudinea de 5 μm , se observă că suprafața exterioară a acestora prezintă uniformitate. În secțiune sferele prezintă o structură fibrilară, rezultatul complexării polielectrolitice între lanțurile de Xa și Cs.

Aspectul general al complexului Xa-Cs-Ne 50% obținut prin difuzia medicamentului în complexul polimeric, prezintă o structură neuniformă cu un aspect ușor friabil. Așa cum poate fi observat din microfotografii, particule distincte de medicament sunt adsorbite la suprafața complexului.

VI.2.3. Determinarea parametrilor de curgere și compresibilitate ai amestecului

Valorile parametrilor de curgere și compresibilitate, obținute în cazul amestecului Xa-Cs-Ne 50%, sunt prezentate în tabelul 15.

Tabelul 15. Parametrii de curgere și compresibilitate ai amestecului Xa-Cs-Ne 50%:

Densitate probă netasată (g/ml)	Grosime probă netasată (ml/g)	Densitate probă tasată (g/ml)	Indicele Carr	Indicele Haussner	Unghiul de repaus
$0,36 \pm 0,00$	$2,77 \pm 0,00$	$0,48 \pm 0,00$	$26,31 \pm 0,59$	$1,36 \pm 0,01$	$35,55 \pm 0,97$

În proiectarea, formularea și menținerea calității oricărui produs farmaceutic, proprietățile micrometrice sunt unele din cele mai importante aspecte care trebuie luate în considerație. Indicele Carr și indicele Haussner sunt indicatori ai proprietăților de curgere, iar rezultatele înregistrate pentru aceștia în cazul amestecului nostru arată o capacitate de curgere la limita dintre acceptabil și slab (*Walke și colab., 2014; Ashwini și colab., 2014*). Conform rezultatelor obținute, valoarea unghiului de repaus s-a încadrat în intervalul 30 - 40, arătând pentru amestecul testat proprietăți de curgere acceptabile (*Singh și colab., 2014*).

VI.2.4. Studii de umflare

Comportamentul la umflare reprezintă un parametru important care influențează direct cinetica de eliberare, în mod special când aceasta este controlată de difuzie (*Di Martino și colab., 2017*).

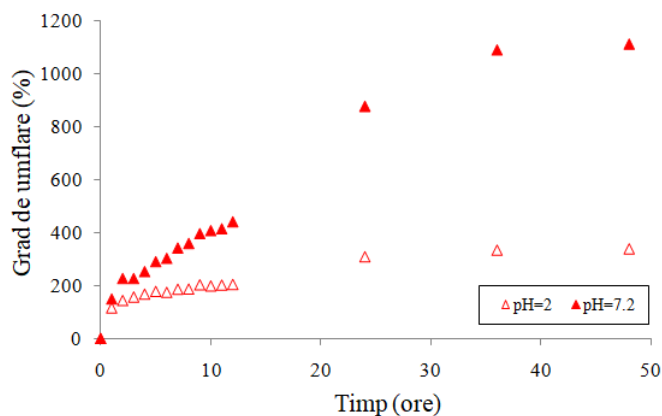


Figura 39. Comportamentul la umflare al comprimatelor Xa-Cs-Ne 50%, la pH 2 și pH 7,2

Figura 39 relevă un comportament dinamic la umflare al tabletelor Xa-Cs-Ne 50%, atât în mediu bazic cât și în mediu acid. Comportamentul la umflare este puternic influențat de pH-ul mediului. După cum se poate vedea, comprimatele Xa-Cs-Ne 50% în mediul bazic rețin o cantitate de lichid mult mai mare față de cea reținută de comprimate în mediul acid, gradul de umflare fiind 1150% la pH 7,2 și respectiv 220% la pH 2. Echilibrul la umflare este atins după 48 ore pentru ambele medii (Merlușcă și colab., 2016).

VI.2.5. Cinetica eliberării *in vitro* a Ne din complexul Xa-Cs-Ne 50%

Comportamentul la eliberarea *in vitro* a Ne din complexul Xa-Cs-Ne 50%, a fost studiat în condiții similare mediului intestinal (pH 7,2) și mediului gastric (pH 2).

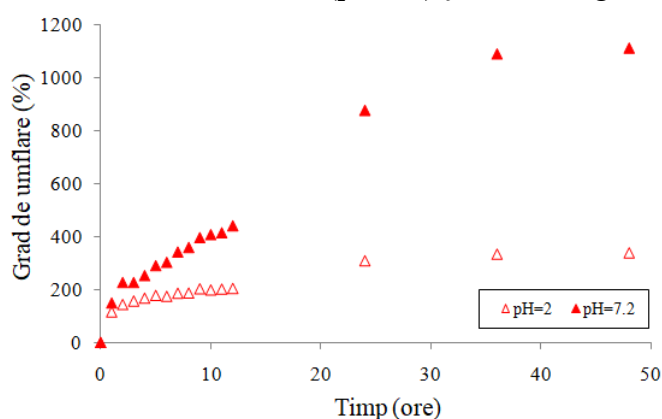


Figura 40. Curbele de eliberare *in vitro* a Ne din complexii Xa-Cs-Ne 50% la pH 2 și pH 7,2

Curbele de eliberare *in vitro* a Ne din comprimate, indică un comportament diferit la eliberare în mediul simulat intestinal, față de mediul simulat gastric. În primele ore de eluție în ambele medii, Ne a fost eliberată din matrici cu o viteză mai mare atât datorită medicamentului adsorbit la suprafața matricilor cât și datorită umflării mai rapide a acestora. După această etapă Ne rămasă în comprimate continuă să fie eliberată din matrici pe o perioadă de timp mai mare de 24 de ore, cu viteză mică. Comportamentul diferit în mediu acid față de mediul bazic este rezultatul umflării mai reduse a comprimatelor cât și degradării acestora și este caracterizat de o viteză de eliberare mai mică în primele ore. Atât în mediu acid, cât și mediu bazic se poate observa faptul că sistemele polimer - medicament au eliberat maximul de Ne în aproximativ 24 ore.

Pentru investigarea mecanismului de eliberare *in vitro* a Ne din hidrogelurile Xa-Cs-Ne 50%, la pH 7,2 și pH 2, a fost aplicat modelul cinetic Ritger și Peppas.

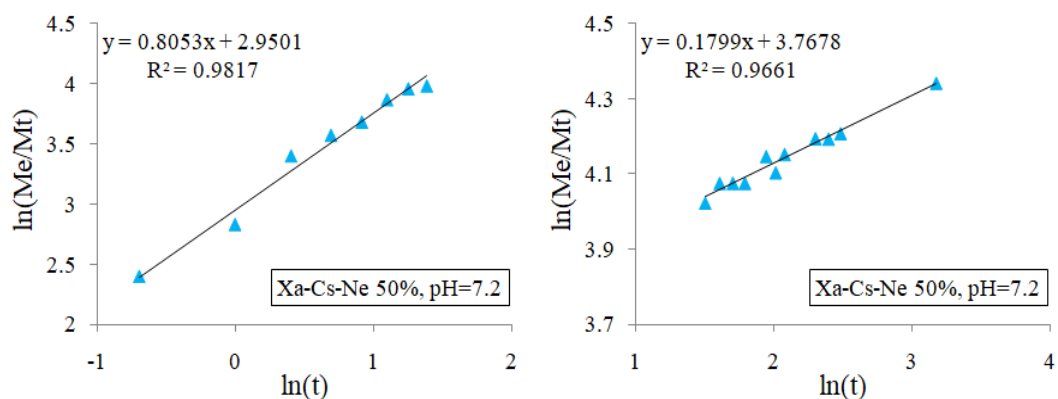


Figura 41. Cinetica de eliberare a Ne din hidrogelurile Xa-Cs-Ne 50%, la pH 7,2, (a) 0 ore - 4 ore și (b) 4 ore - 24 ore

Din datele experimentale, valorile lui n obținute pentru eliberarea Ne în mediu bazic sunt 0,8 pentru intervalul 0 ore - 4 ore, caracteristică unui proces de difuzie non-Fickian și 0,17 pentru intervalul 4 ore - 24 ore, caracteristică unui proces de difuzie Fickian.

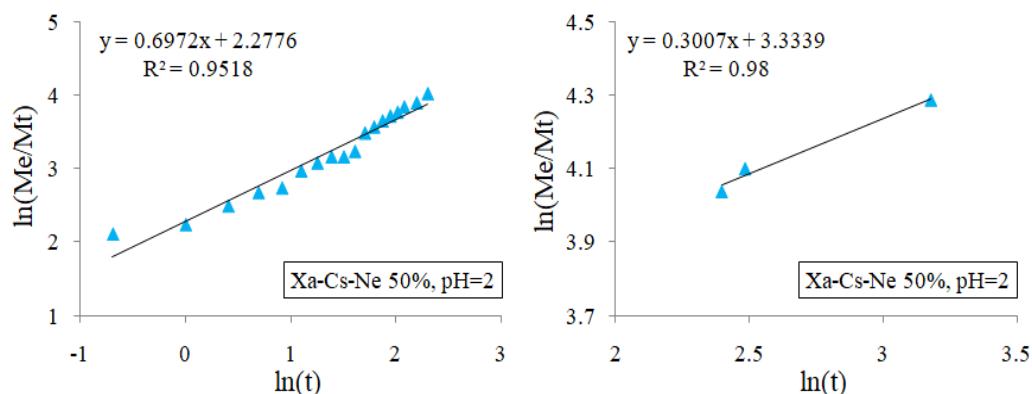


Figura 42. Cinetica de eliberare a Ne din hidrogelurile Xa-Cs-Ne 50%, la pH 2 (a) 0 ore - 10 ore și (b) 10 ore - 24 ore

Pentru cinetica de eliberarea a Ne în mediu acid se observă că valorile lui n sunt 0,69 pentru intervalul 0 ore - 10 ore, caracteristică unui proces de difuzie non-Fickian și 0,3 pentru intervalul 4 ore - 24 ore, caracteristică unui proces de difuzie Fickian.

VI.2.6. Evaluarea greutății corporale a șobolanilor în urma administrării complexului

În tabelul 16 este prezentată valoarea greutății câștigate de fiecare grup după 10 zile de la administrarea tratamentului și deviația standard.

Tabelul 16. Valoarea greutății câștigate de fiecare grup și deviația standard

Grup	Control	Ne	Xa-Cs-Ne 50%
Greutate câștigată (ziua 0 - ziua 10)	48,33 ± 14,37	21,67 ± 12,11	40,83 ± 13,19

S-a observat o creștere mai redusă a greutății șobolanilor tratați cu Ne, în comparație cu lotul control și lotul căruia i-a fost administrat complexul Xa-Cs-Ne 50%.

VI.2.7. Determinarea conținutului de apă din materiile fecale

Aproape toate tratamentele cu antibiotice conduc la o serie de simptome clinice, administrarea acestora fiind cel mai frecvent asociată cu diaree (*Bose și colab., 2013*). Examinarea fizică a materiilor fecale, relevă în lotul animalelor tratate cu antibiotic, un conținut crescut în apă comparativ cu lotul martor și lotul tratat cu Xa-Cs-Ne 50%.

Tabelul 17. Conținutul de apă în materiile fecale și deviația standard

Grup	Control	Ne	Xa-Cs-Ne 50%
Conținut apă în materiile fecale (%) (ziua 14)	58,3 ± 5,61	67,5 ± 4,05	63,9 ± 6,79

VI.2.8. Determinarea parametrilor biochimici

Valorile parametrilor biochimici sunt prezentate în tabelul 18. Este binecunoscut faptul că, creatinina, ureea, acidul uric sunt indicatori ai funcției renale, iar proteina C-reactivă un marker al inflamației organismului (*Bose și colab., 2013; Ali și Saeed, 2012; Kalsait și colab., 2011*).

Tabelul 18. Valorile parametrilor biochimici și deviația standard

Grup	Control	Ne	Xa-Cs-Ne 50%
Creatinină (mg/dl)	0,52 ± 0,03	0,60 ± 0,02	0,58 ± 0,02
Uree (mg/dl)	36,00 ± 1,10	59,30 ± 2,01	41,80 ± 2,41
Acid uric (mg/dl)	1,92 ± 0,29	2,86 ± 0,298	2,03 ± 0,29
Crp (mg/l)	0,013 ± 0,008	0,283 ± 0,040	0,027 ± 0,010

La finalul studiului, evaluarea nivelului seric al creatininei evidențiază următoarele aspecte: creatinina serică a crescut ușor în lotul tratat cu Ne (0,60 mg/dl) și Xa-Cs-Ne 50%, (0,58 mg/dl) comparativ cu lotul martor (0,52 mg/dl), fără a se înregistra însă diferențe majore între loturile studiate.

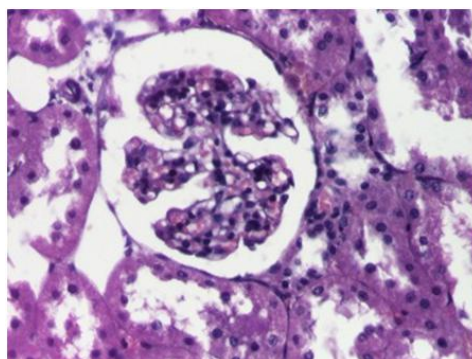
Animalele tratate cu Ne prezintă creșteri ale ureei serice la sfârșitul celor 14 zile de tratament (59,3 mg/dl). Același aspect se observă și la lotul de animale tratat cu Xa-Cs-Ne 50% (41,8 mg/dl), însă coadministrarea complexului polimeric cu Ne tinde să amelioreze valoarea parametrului biochimic.

Lotul tratat cu Ne prezintă un nivel mediu crescut al acidului uric (2,86 mg/dl) comparativ cu lotul martor (1,92 mg/dl) și lotul tratat cu Xa-Cs-Ne 50% (2,03 mg/dl). Valori apropiate de cele normale au fost găsite în lotul tratat cu Xa-Cs-Ne 50%.

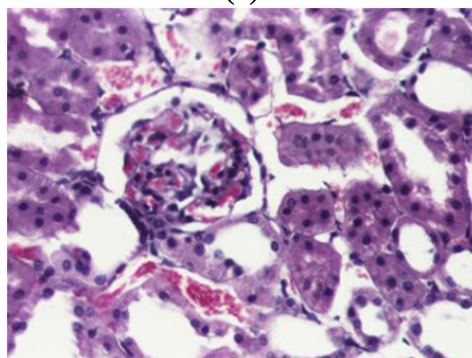
De asemenea, se remarcă la lotul tratat cu Ne un nivel mediu foarte ridicat al proteinei C-reactive (0,283 mg/l), comparativ cu lotul martor (0,013 mg/l) și lotul tratat cu Xa-Cs-Ne 50% (0,027 mg/l). Valori apropiate de cele normale au fost găsite în lotul tratat cu Xa-Cs-Ne 50% (*Merlușcă și colab., 2016*).

VI.2.9. Studiul histopatologic

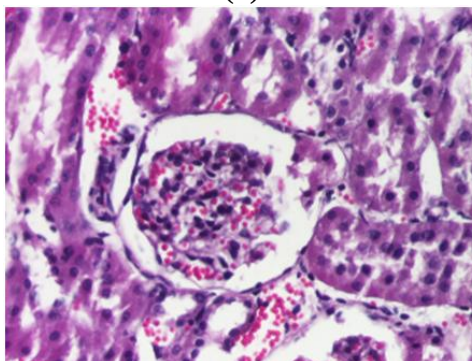
Examinările histologice ale secțiunilor de rinichi relevă aspecte normale în grupul control și congestie renală în grupul tratat cu Ne și Xa-Cs-Ne 50%.



(a)



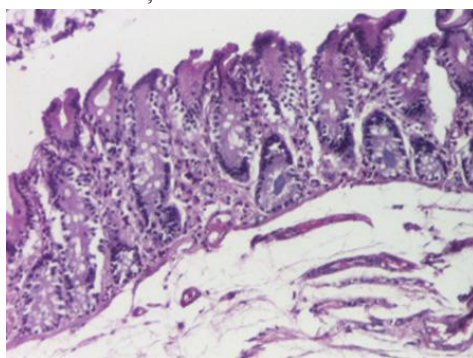
(b)



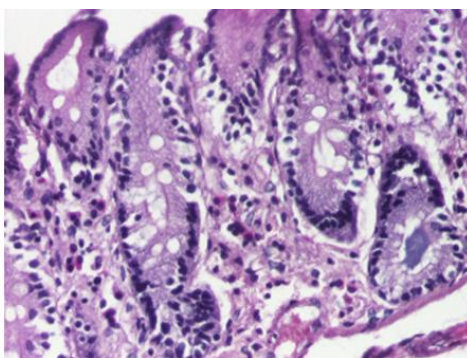
(c)

Figura 43. (a) Lot Control, aspect normal (x 200), (b) Lot tratat cu Ne, congestie renală (x 200), (c) Lot tratat cu Xa-Cs-Ne 50%, congestie renală (x 200)

În concordanță cu rezultatele prezentate în figura 44, secțiunile colonului șobolanilor din grupul control, au arătat o structură histologică normală pentru mucoasă, submucoasă, muscularis mucosae și seroasă.



(a)



(b)

Figura 44. Lot Control, (a) aspect normal (x 100), (b) aspect normal (x 200)

Grupul tratat cu Ne a fost asociat cu distrugerea arhitecturii, creșterea numărului de celule caliciforme, cripte aberante, distrugerea epiteliului, inflamație în lamina propria și submucoasă (figura 45).

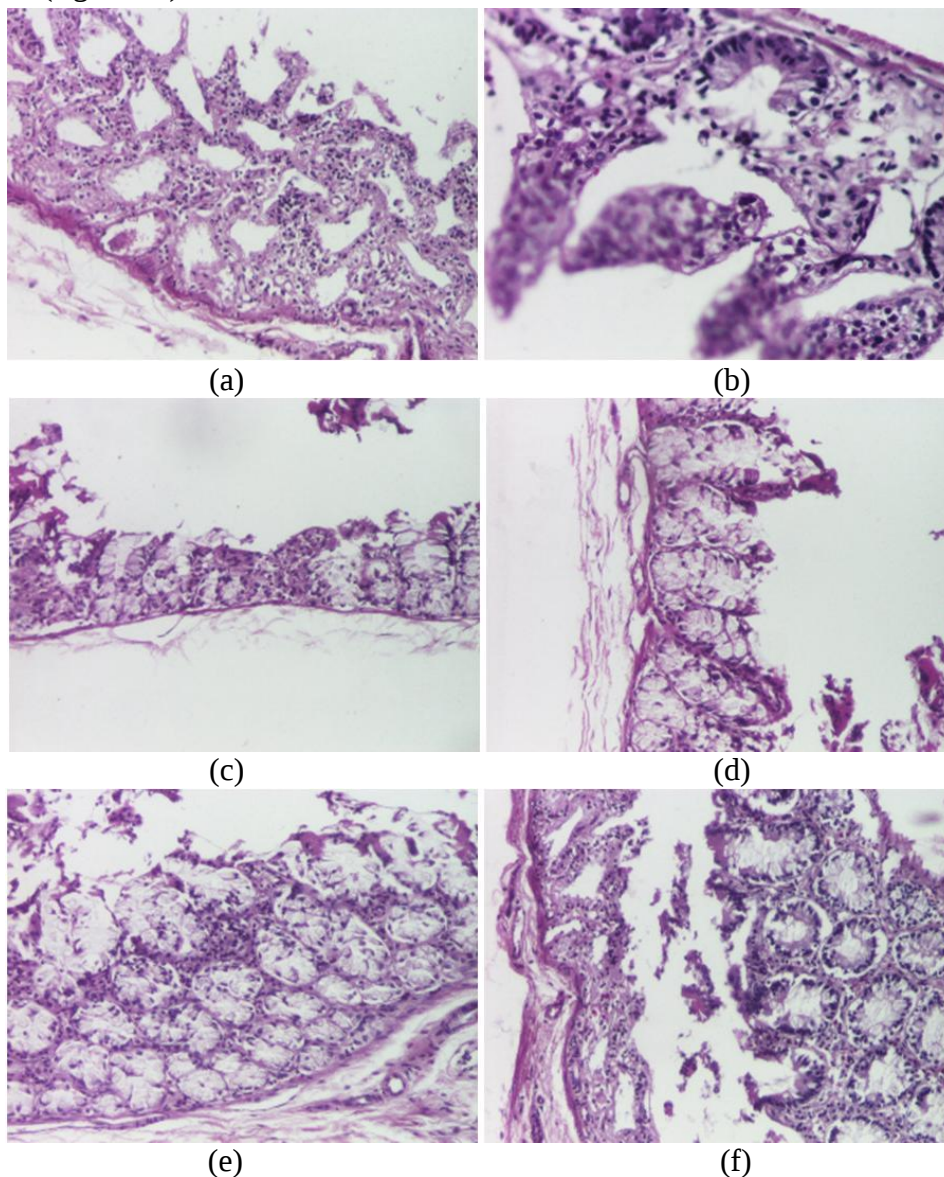


Figura 45. Lot tratat cu Ne: (a) cripte aberante și mici (x 100), (b) distrugerea epiteliului și reducerea criptelor (x 200), (c) distrugerea arhitecturii (x 100), (d) creșterea numărului de celule caliciforme (x 100), (e) inflamație în lamina propria și submucoasă (x 100), (f) distrugerea completă a epiteliului mucoasei (x 100)

Examinarea histologică a secțiunilor de colon a șobolanilor din grupul tratat cu Xa-Cs-Ne 50% a arătat o creștere a numărului de celule caliciforme și rare elemente inflamatorii în lamina propria și submucoasă (figura 46) (Merlușcă și colab., 2016).

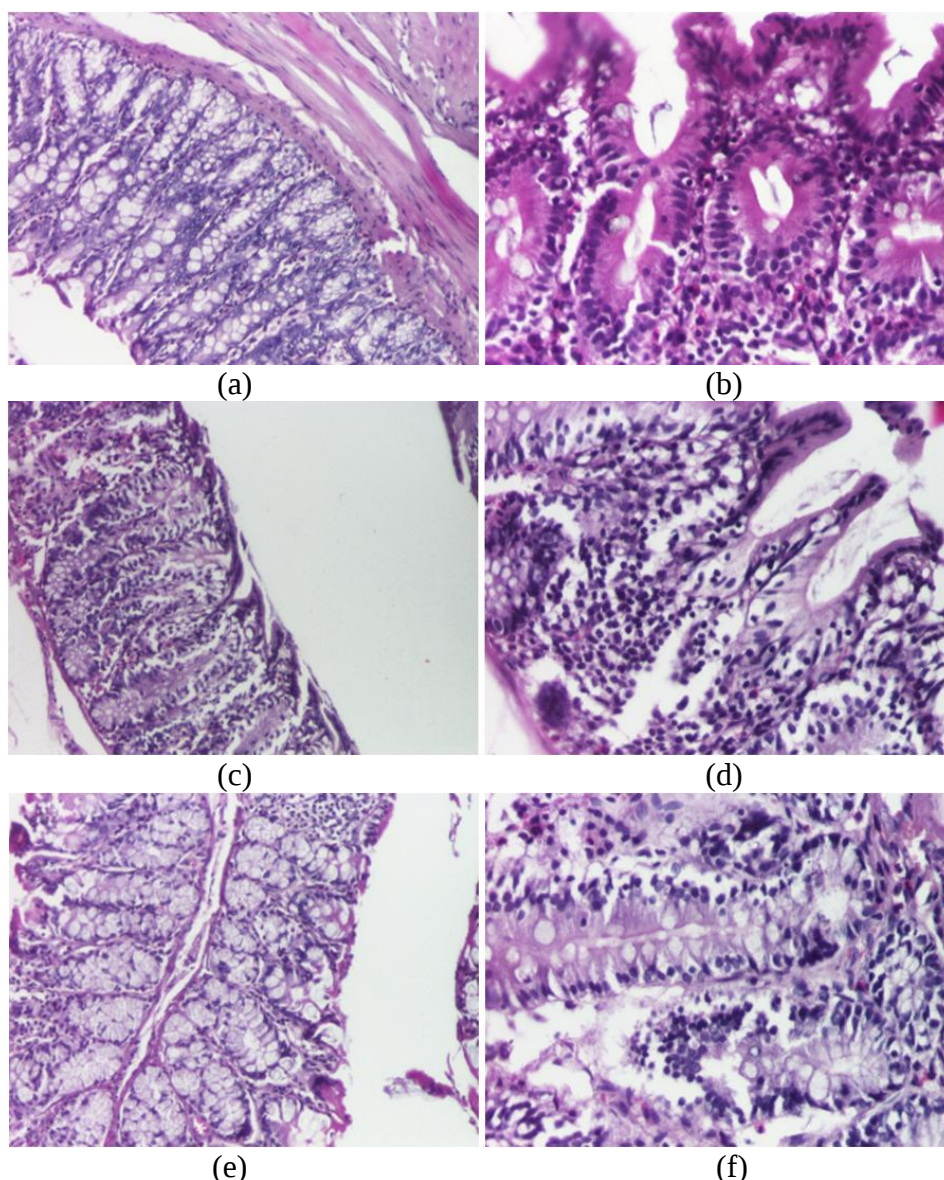


Figura 46. Lot tratat cu Xa-Cs-Ne 50%: (a) pătura mucoasă (x 100), (b) inflamație în lamina propria și submucoasă (x 200), (c) inflamație în lamina propria și submucoasă (x 100), (d) inflamație în lamina propria și submucoasă (x 200), (e) creșterea numărului celulelor caliciforme (x 100), (f) creșterea numărului celulelor caliciforme (x 200)

VI.2.3. Concluzii

A fost preparat complexul Xa-Cs utilizând metoda de gelifiere ionotropă polielectrolitică, iar pe baza acestuia complexul Xa-Cs-Ne 50% a fost obținut prin difuzia soluției de medicament în matricea polimerică.

Spectrele FTIR obținute au confirmat prezența în complexii Xa-Cs-Ne 50%, a medicamentului, precum și formarea legăturilor de hidrogen între complexul polimeric și Ne.

Aspectul general al complexului Xa-Cs-Ne 50% obținut prin difuzia medicamentului în complexul polimeric, a prezentat o structură neuniformă, cu un aspect friabil și particule distincte de medicament pe suprafața complexului.

A fost studiat comportamentul la umflare al complexilor Xa-Cs-Ne 50%, în medii de pH similare mediului fiziologic gastro-intestinal (pH 2 pentru mediul gastric acid și pH 7,2 pentru mediul slab alcalin intestinal). Comprimatele Xa-Cs-Ne 50%, în mediul bazic au reținut o cantitate de lichid mai mare față de cea reținută de comprimate în mediul acid.

Studiile de eliberare *in vitro* din comprimatele Xa-Cs-Ne 50%, atât în mediu bazic cât și în mediu acid au evidențiat că sistemele au eliberat maximul de Ne după aproximativ 24 ore indiferent de pH-ul mediului de dizolvare.

Studiile *in vivo* relevă în cazul administrării Ne în complex, o ameliorare a parametrilor biochimici (creatinină, uree, acid uric, proteina C-reactivă), precum și a modificărilor histologice ale colonului, comparativ cu administrarea liberă a medicamentului.

VII. SISTEME XANTAN-CHITOSAN-NEOMICINĂ PENTRU ADMINISTRARE TOPICĂ

Produsele topice sunt clase importante de sisteme de administrare a medicamentelor, iar utilizarea lor în terapie a devenit tot mai răspândită. Eficiența terapeutică a unei formulări topice depinde atât de natura vehiculului, cât și de proprietățile fizico-chimice ale substanței active. Formulările care au la bază geluri preparate prin utilizarea de diferiți polimeri sunt recomandate pentru optimizarea formulărilor topice conținând medicamente. Gelurile au o bună vâscozitate, o bioaderență satisfăcătoare și sunt lipsite de iritabilitate sau sensibilitate la administrare. Un grad mai mare de permeație a pielii a fost observat la geluri decât la celelalte vehicule, cum ar fi cremele și unguentele (Özcan și colab., 2009).

Chitosanul și xantanul au fost studiați anterior ca și excipienți în industria farmaceutică pentru diferite forme de dozare și s-au dovedit a avea caracteristici superioare (Özcan și colab., 2009; Benny și colab., 2014).

În ceea ce privește tratamentul local cu antibiotice, acesta reprezintă unul din cele mai importante aspecte în ceea ce privește îngrijirea rănilor în scopul prevenirii infecțiilor (Shukr și Metwally, 2013). Mai multe studii clinice au arătat că diferite antibiotice între care și sulfatul de neomicină, pot fi administrate topic pentru a eradica eficient bacteriile (Kiaee și colab., 2016).

Scopul cercetării noastre a fost acela de a formula și evalua hidrogeluri pe bază de Xa, Cs și Ne, cu potențiale aplicații în îngrijirea rănilor.

VII.1. Prepararea hidrogelurilor Xa-Cs-Ne

Obținerea sferelor Xa-Cs și Xa-Cs-Ne 50% este relatată în capitolul VI.

Pentru prepararea complexului Xa-Cs-Ne având diferite concentrații a medicamentului, 0,5 g perle liofilizate de Xa-Cs au fost adăugate în soluții de Ne de diferite concentrații, conform tabelului 19. Difuzia completă a soluției de Ne în suportul polimeric a avut loc prin amestecare, timp de 15 de minute. Complexul polimer-medicament rezultat a fost apoi liofilizat. Pentru acest studiu hidrogelurile au fost considerate 7% substanță uscată în apă.

Tabelul 19. Compoziția hidrogelurilor preparate

Probă	Xa-Cs (g)	Ne (g)	apă (ml)
Xa-Cs-Ne 50%	0,50	0,50	5
Xa-Cs-Ne 40%	0,50	0,33	5
Xa-Cs-Ne 30%	0,50	0,21	5
Xa-Cs-Ne 20%	0,50	0,12	5
Xa-Cs-Ne 10%	0,50	0,05	5

VII.2. Caracterizarea fizico-chimică, mecanică și biologică

Pentru caracterizarea hidrogelurilor Xa-Cs cu Ne încorporată s-a utilizat analiza termică și testele reologice. Teste de eliberare *in vitro* a Ne din complexii Xa-Cs-Ne au fost realizate de asemenea, utilizând metoda dializei descrisă anterior în capitolul III. Curba etalon în soluție tampon fosfat pH 5,5 utilizată, a fost identică cu aceea obținută în tampon fosfat pH 2 și pH 7,2. Această curbă este prezentată în figura 35. Viabilitatea celulară a fost determinată pe o linie celulară de fibroblaști din derm uman cu ajutorul metodei contactului indirect iar activitatea antimicrobiană a fost evaluată prin metoda difuziei în agar.

VII.2.1. Analiza termică

Din punctul de vedere al relației structură-proprietăți și în același timp pentru a evidenția mecanismul interacțiunii polimer-medicament, determinarea proprietăților termice este importantă (Popa și colab., 2008; Drăgan și colab., 1998).

Tabelul 20. Caracteristicile termogravimetice ale complexilor și precursorilor

Proba	Etapă	T _{onset} (°C)	T _{peak} (°C)	T _{endset} (°C)	W %	Reziduu %
Xa-Cs-Ne 10%	I	53,6	72,0	108,3	8,18	
	II	217,4	236,1	272,6	12,35	21,19
	III	272,6	297,4	332,0	58,28	
Xa-Cs-Ne 20%	I	54,1	71,3	111,3	7,18	
	II	222,0	234,8	274,2	17,17	27,47
	III	274,2	287,8	356,1	48,18	
Xa-Cs-Ne 30%	I	56,9	80,6	127,7	9,53	
	II	220,4	237,0	259,8	17,36	16,88
	III	259,8	267,5	351,2	56,23	
Xa-Cs-Ne 40%	I	64,0	82,9	147,1	7,32	
	II	223,7	236,9	259,1	17,26	37,42
	III	259,1	266,3	417,5	38,00	
Xa-Cs-Ne 50%	I	58,6	84,7	135,3	9,85	
	II	223,7	237,6	272,4	24,29	32,21
	III	272,4	262,9	363,4	33,65	
Ne	I	58,7	86,7	150,6	7,33	
	II	223,7	234,5	241,2	14,76	35,56
	III	267,2	284,1	309,5	42,35	
Xa -Cs	I	49,7	77,8	119,1	12,54	
	II	253,3	294,7	327,2	62,17	25,29

T_{onset} - temperatura la care începe degradarea în fiecare etapă; T_{peak} - temperatura la care viteza de degradare este maximă; T_{endset} - temperatura la care se încheie procesul de degradare din fiecare etapă; W% - pierderea

procentuală de masă din fiecare etapă; **Reziduu** - cantitatea de reziduu de la finalul procesului de încălzire de la temperatura de 700 °C.

Figura 47 prezintă curbele termogravimetrice (TG), respectiv termogravimetrice derivate (DTG), ale complexului polimeric, medicamentului și diferitelor formulări obținute pe baza acestora. În acord cu termogramele obținute, se poate observa că degradarea termică are loc în două sau trei etape. Procesul de degradare a prezentat două sau trei picuri la care viteza de descompunere este maximă. Prima etapă de degradare corespunde unei pierderi de masă de 7,18% - 12,54% și este atribuită evaporării apei adsorbite la suprafața probelor. Aceasta are loc în intervalul de temperatură 49,7 °C - 150,6 °C și furnizează date asupra umidității probelor. A doua etapă apare în intervalul de temperatură de 217,4 °C - 274,2 °C și este atribuită unei deshidratări ulterioare, dar și deacetilării probelor. Pentru probele investigate ultima etapă de degradare are loc în intervalul de temperatură 253,3 °C - 417,5 °C și probabil în această etapă are loc depolimerizarea. Degradarea termică a Ne are loc în trei etape cu o pierdere de masă de aproximativ 64,44%. Pierdere semnificativă de masă asociată descompunerii Ne se datorează pierderii grupărilor –OH și –NH₂ sub formă de apă și a unui eventual amestec format din amoniac și N₂ (Szaniszló, 2013). Picul caracteristic celei de a doua etape de degradare a Ne ce apare în jurul temperaturii de 235 °C apare și în cazul complexșilor Xa-Cs-Ne, fiind cu atât mai intens cu cât crește cantitatea de Ne.

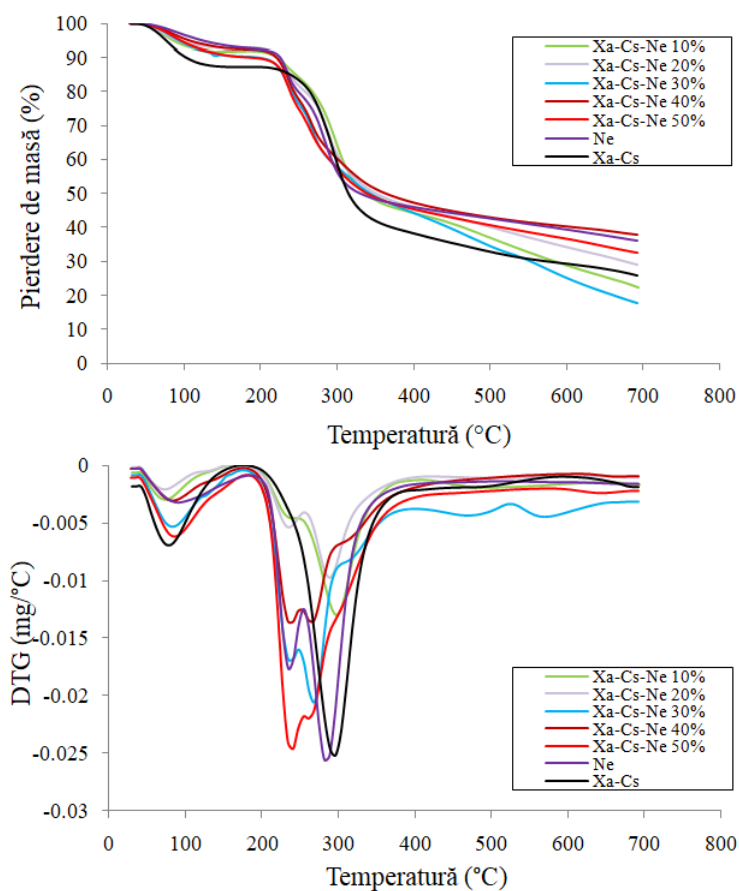


Figura 47. Curbele TG și DTG pentru complexșii Xa-Cs-Ne și precursorii lor

Analiza DSC este utilizată cu scopul de a determina punctul de topire, modificările de cristalinitate, precum și reacțiile ce au loc între medicament și sistemul polimeric (*Verma și colab., 2012*). Un rol important în ceea ce privește comportamentul de eliberare al medicamentului îl are starea fizică a apei (*Horn și colab., 2015*).

Curbele DSC înregistrate în intervalul de temperatură 25 °C - 180 °C prezintă pentru medicament, complex polimeric și complexii polimer-medicament, un pic în jurul valorii 85 °C. Pentru complexii polimer-medicament apare tendința separării unui al doilea pic care este observat în intervalul 140,3 °C - 151,9 °C, acesta fiind deplasat la dreapta odată cu creșterea concentrației de medicament.

Tabelul 21. Parametrii calorimetrici determinați în urma interpretării curbelor DSC ale complexșilor și precursorilor

Proba	Pic 1				Pic 2			
	T _{onset} (°C)	T _{peak} (°C)	T _{endset} (°C)	ΔH (J/g)	T _{onset} (°C)	T _{peak} (°C)	T _{endset} (°C)	ΔH (J/g)
Xa-Cs-Ne 10%	40,5	82,6	127,6	170,10	131,0	140,3	158,1	2,41
Xa-Cs-Ne 20%	37,0	82,0	127,9	185,22	132,5	140,8	153,6	7,66
Xa-Cs-Ne 30%	43,7	85,9	135,4	146,29	140,2	147,9	159,6	7,10
Xa-Cs-Ne 40%	39,4	86,7	137,8	146,68	141,9	150,6	163,2	7,09
Xa-Cs-Ne 50%	38,2	84,4	138,7	156,06	143,2	151,9	165,5	3,28
Ne	45,6	84,7	162,2	208,38				
Xa -Cs	38,7	87,3	151,1	351,27				

T_g – temperatura de tranziție vitrosă, considerată Midpoint pe curba înregistrată pe cea de a doua încălzire; T_{onset} - temperatura onset a fiecărei început de etapă; T_{peak} - temperatura la care viteza de degradare este maximă; T_{endset} - temperatura endset a fiecărei final de etapă; ΔH - entalpia de evaporare.

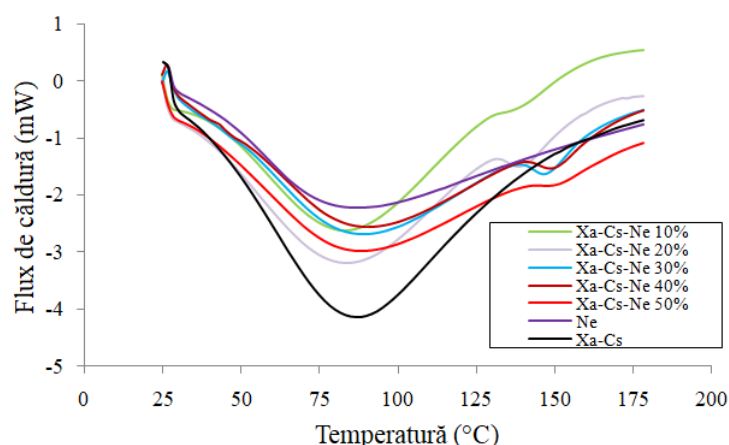


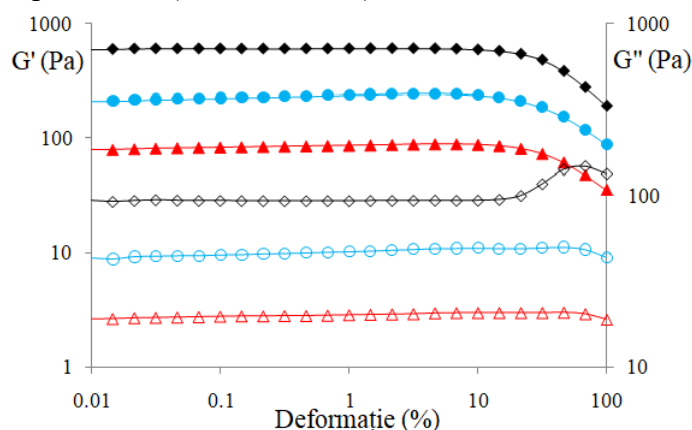
Figura 48. Curbele DSC pentru complexii Xa-Cs-Ne și precursorii lor

Valorile entalpiilor de evaporare sunt în general mai scăzute pentru formulările cu conținut mai ridicat de medicament. Entalpiile de evaporare în cazul celui de-al doilea pic

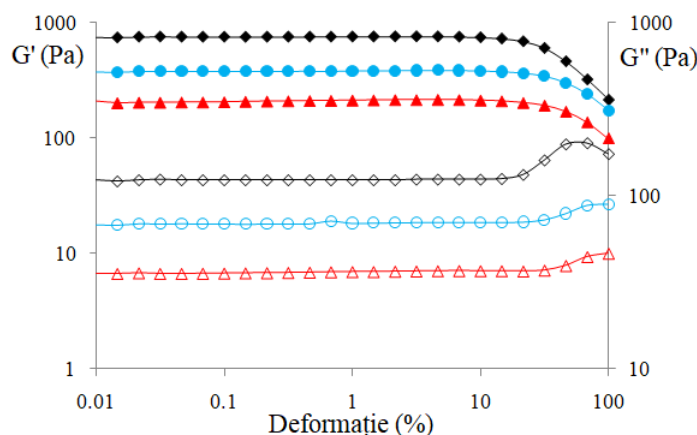
variază într-un domeniu restrâns de valori, conducând la ideea că este necesară aproximativ aceeași energie pentru evaporare.

VII.2.2. Teste reologice

Testul de baleiaj de amplitudine a fost efectuat în vederea stabilirii limitelor domeniului vâscoelastic liniar, precum și obținerii de informații privind stabilitatea structurală și mecanică a hidrogelurilor. Acest test s-a efectuat utilizând o frecvență constantă (10 rad/s) și variind amplitudinea (0,01% - 100%).



(a)



(b)

Figura 49. Baleiajul de amplitudine pentru probele dispersate în apă (a) și tampon fosfat (b): carouri pline și goale pentru G' și G'' (Xa-Cs), cercuri pline și goale pentru G' și G'' (Xa-Cs-Ne 30%), triunghiuri pline și goale pentru G' și G'' (Xa-Cs-Ne 50%)

Pentru toate sistemele studiate s-au evidențiat structuri stabile pentru o gamă largă de deformații (figura 49). Valori mai ridicate ale modulilor dinamici și limite mai extinse ale domeniului vâscoelastic liniar se pot observa pentru hidrogelurile dispersate în soluțiile tampon (figura 49b) comparativ cu hidrogelurile dispersate în apă (figura 49a), care pot fi explicate prin natura ionică a sistemelor. În ambele medii de dispersie, adăugarea medicamentului a condus la scăderea modulilor dinamici, dar a avut un efect nesemnificativ asupra stabilității structurale a hidrogelurilor. S-au determinat limitele domeniilor

vâscoelastice liniare pentru toate probele analizate, atât în termeni de deformare (0,5% - 5%), cât și de efort de forfecare (1 Pa - 19 Pa).

În testele de baleiaj de frecvență, s-au înregistrat valorile modulului de acumulare (G'), modulului de curgere (G'') și ale vâscozității complexe (η^*) atunci când a fost aplicată o deformare cu amplitudine constantă în domeniul vâscoelastic liniar. Frecvența oscilației a fost variată între 0,1 rad/s și 100 rad/s. Spectrele mecanice ale hidrogelurilor permit o diferențiere clară între gelurile moi și cele puternice (Martinez-Ruvalcaba și colab., 2007). În general, gelurile puternice au moduli dinamici independenți de frecvență, în timp ce dependența pronunțată de frecvență a modurilor dinamici este caracteristică gelurilor moi. După cum era de așteptat, hidrogelurile Xa-Cs și Xa-Cs-Ne cu $G' > G''$ au o structură de gel moale și o dependență semnificativă a celor doi moduli dinamici de frecvență. Pentru toate hidrogelurile, valorile G' determinate la frecvența $\omega = 0,1$ rad/s sunt mult mai mari de 10 Pa sugerând o stabilitate structurală foarte bună în ambele medii de dispersie (Ibănescu și colab., 2010).

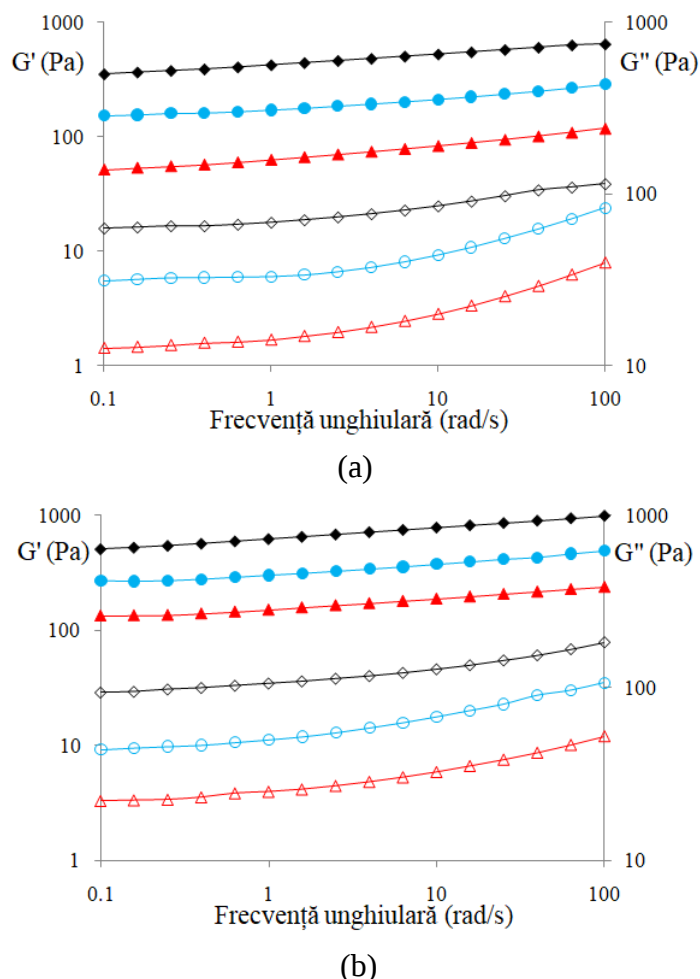
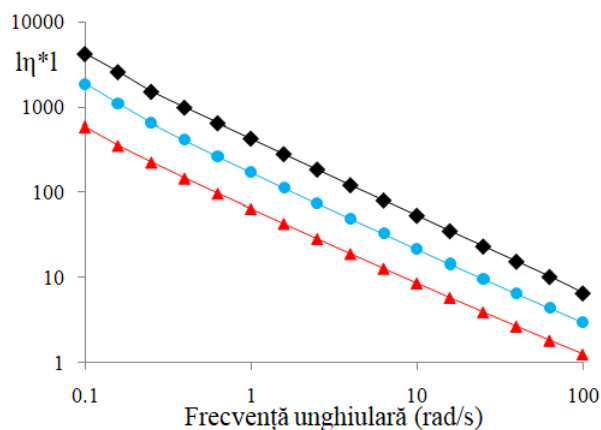


Figura 50. Baleiajul de frecvență pentru probele dispersate în apă (a) și tampon fosfat (b): carouri pline și goale pentru G' și G'' (Xa-Cs), cercuri pline și goale pentru G' și G'' (Xa-Cs-Ne 30%), triunghiuri pline și goale pentru G' și G'' (Xa-Cs-Ne 50%)

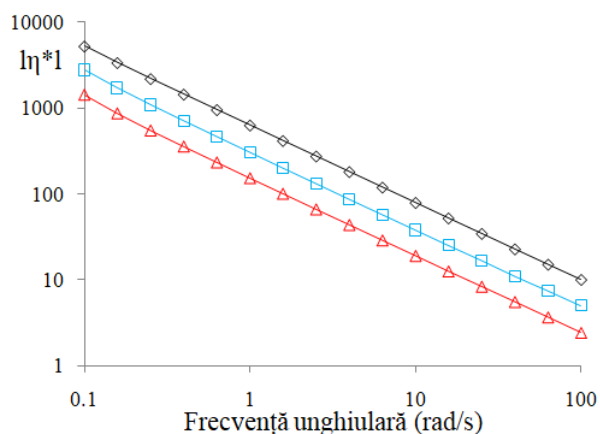
Valorile modurilor dinamici au fost mai mari pentru hidrogelurile dispersate în tampon fosfat (figura 50b), în timp ce influența adăugării de Ne a fost mai pronunțată atunci când apa a fost

folosită ca mediu de dispersie (diferențe mai mari între moduli) (figura 50a). Creșterea concentrației de Ne a determinat o scădere a rezistenței hidrogelurilor (o micșorare a valorilor G'), gelurile devenind mai moi, dar având încă o structură stabilă. Variația elasticității hidrogelurilor poate rezulta dintr-o scădere a numărului de interacțiuni și întrepătrunderi între lanțurile polimerului, cauzate de prezența Ne.

Dependența vâscozității complexe de frecvență (figura 51) pentru toate hidrogelurile analizate scoate în evidență un comportament pseudoplastic (shear thinning behavior).



(a)



(b)

Figura 51. Dependența vâscozității complexe de frecvență ($l\eta^*1$) pentru probele dispersate în apă (a) și în tampon fosfat (b) carouri pline și goale (Xa-Cs), cercuri pline și goale (Xa-Cs-Ne 30%), triunghiuri pline și goale (Xa-Cs-Ne 50%)

După cum se observă în figura 51, valorile vâscozității complexe scad cu creșterea frecvenței pentru toate hidrogelurile. În plus, imobilizarea Ne conduce la o scădere a valorilor vâscozității complexe.

Testele de stabilitate în timp au fost efectuate la frecvență constantă ($\omega = 10$ rad/s) și amplitudine constantă (în limitele domeniului vâscoelastic liniar pentru fiecare probă), pentru a estima stabilitatea structurală și integritatea hidrogelurilor preparate. Aceste teste evidențiază faptul că hidrogelurile sunt stabile atât în apă cât și în tampon fosfat (figura 52).

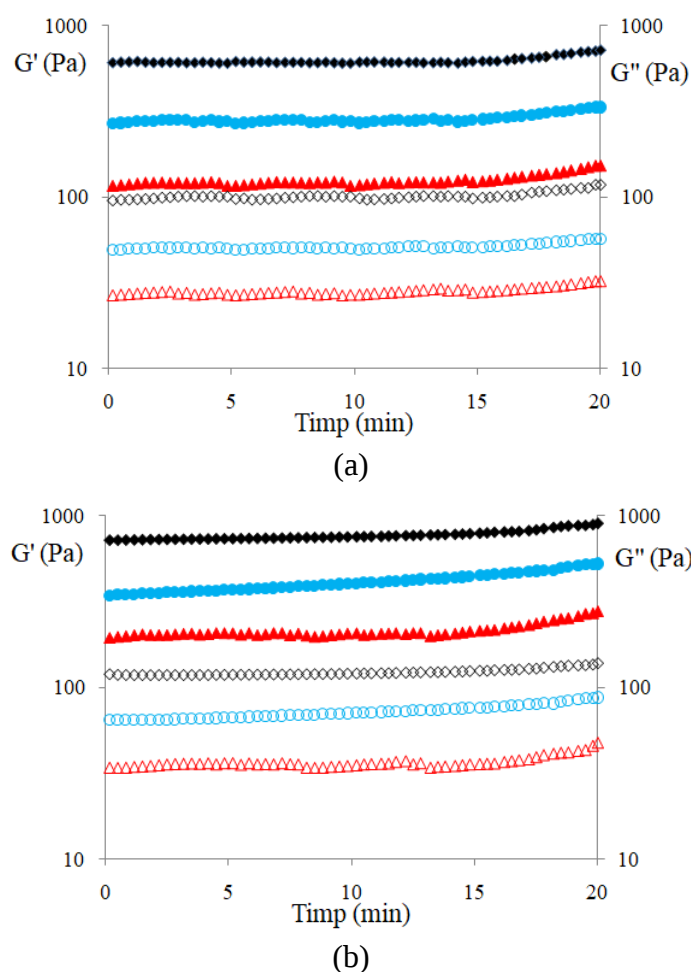


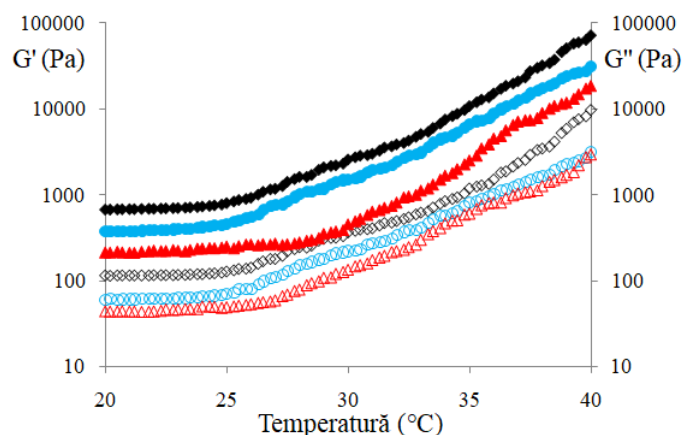
Figura 52. Testele de stabilitate în timp pentru probele dispersate în apă (a) și tampon fosfat (b): carouri pline și goale pentru G' și G'' (Xa-Cs), cercuri pline și goale pentru G' și G'' (Xa-Cs-Ne 30%), triunghiuri pline și goale pentru G' și G'' (Xa-Cs-Ne 50%)

Mai mult decât atât, aceeași influență a mediului de dispersie este observată ca și în testele reologice anterioare: modulii dinamici și prin urmare, rezistența gelurilor, sunt puțin mai mari în sistemele dispersate în tampon fosfat, la pH 5,5. Prin adăugarea de Ne, gelurile au devenit mai moi și mai catifelte, recomandând astfel aplicarea lor ca și produse farmaceutice cu aplicație topică. Pentru unele sisteme, s-a observat o creștere ușoară a valorilor modulilor dinamici în timp. Acest lucru poate fi explicat prin efectul de relaxare și prin posibilele efecte de evaporare ale apei care conduc la concentrarea hidrogelului.

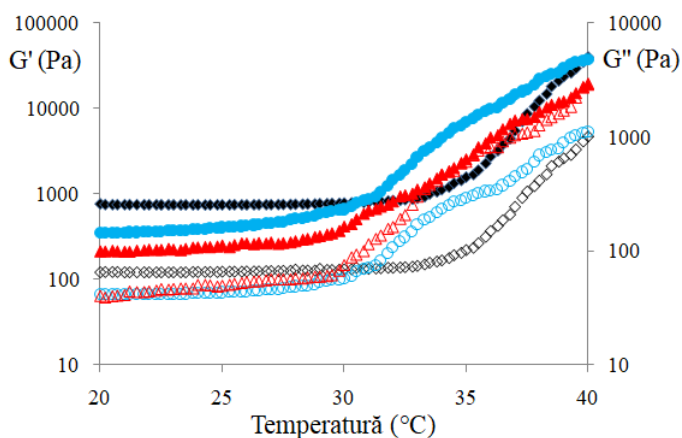
Testele dinamice de baleiaj de temperatură au fost realizate după echilibrarea temperaturii la 20 °C. Probele au fost încălzite cu 0,5 °C /min în domeniul de temperatură 20 °C - 40 °C, la o frecvență constantă de 10 rad/s și o deformare constantă în limitele domeniului vâscoelastic liniar (0,5% - 5% pentru toate probele). Variația modulilor dinamici în funcție de temperatură este prezentată în figura 53.

Pentru hidrogelurile dispersate în apă, s-a observat o creștere a valorii G' (tăria gelului) cu mai mult de două ordine de mărime atunci când temperatura a depășit 25°C (figura 53a). Structura gelului nu a fost perturbată, dar se poate presupune o creștere a mobilității moleculelor de apă permițând astfel asocierea directă a segmentelor hidrofobe ale Xa și Cs (Taherian și colab., 2017). Acest efect a fost vizibil la temperaturi mai mari în cazul

hidrogelurilor dispersate în tampon fosfat (figura 53b), fapt ce demonstrează încă o dată influența mediului de dispersie ionic asupra proprietăților gelurilor.



(a)

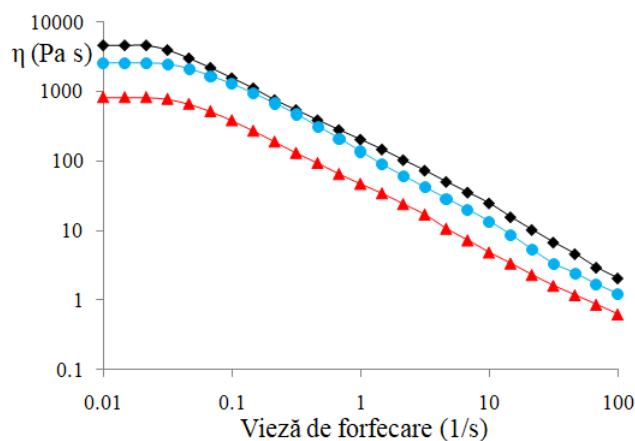


(b)

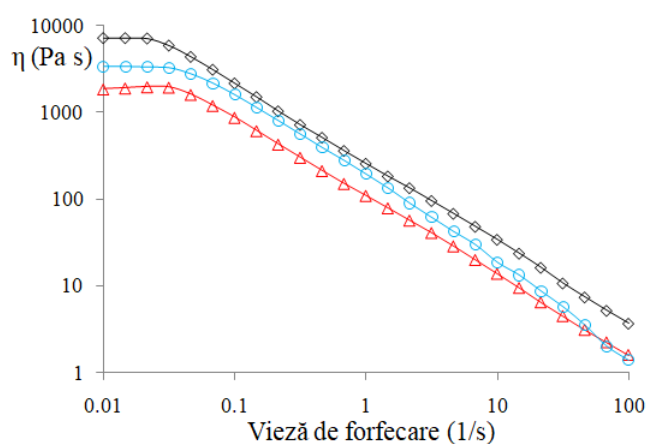
Figura 53. Dependența de temperatură a modurilor dinamici G' and G'' pentru probele dispersate în apă (a) și tampon fosfat (b): carouri pline și goale pentru G' și G'' (Xa-Cs), cercuri pline și goale pentru G' și G'' (Xa-Cs-Ne 30%), triunghiuri pline și goale pentru G' și G'' (Xa-Cs-Ne 50%)

Utilizând apa ca mediu de dispersie, medicamentul adăugat a avut același efect, evidențiat și în testele anterioare, hidrogelurile devenind mai moi. Pentru hidrogelurile dispersate în tampon fosfat adăugarea Ne le-a făcut mai rezistente la temperatură mai ridicată probabil datorită efectului unor interacțiuni electrostatice mai puternice.

Curbele de curgere la 25 °C au fost înregistrate pentru hidrogelurile Xa-Cs, Xa-Cs-Ne 30% și Xa-Cs-Ne 50%. Figura 54 prezintă variația vâscozității dinamice cu viteza de forfecare atât în apă, cât și în tampon fosfat.



(a)



(b)

Figura 54. Curbele de curgere pentru probele dispersate în apă (a) și tampon fosfat (b): carouri pline și goale (Xa-Cs), cercuri pline și goale (Xa-Cs-Ne 30%), triunghiuri pline și goale (Xa-Cs-Ne 50%)

În toate sistemele studiate lanțurile macromoleculare sunt încolăcite, iar creșterea vitezei de forfecare a determinat o desfacere a acestor lanțuri și o scădere a vâscozității. Mai mult decât atât, la viteze de forfecare mici se observă o regiune newtoniană caracterizată de o vâscozitate constantă (η_0 - vâscozitatea la forfecare zero). Acest comportament ar putea fi explicat prin apariția unui echilibru între ruperea legăturilor datorită vitezei de forfecare și formarea altor legături noi.

Valorile vâscozității la forfecare zero au fost influențate de natura mediilor de dispersie și de conținutul de Ne din probele studiate (tabelul 22).

Tabelul 22. Valorile vâscozității la forfecare zero ale hidrogelurilor (modelul Carreau-Yasuda)

Probă	η_0 (Pa s)	
	apă	tampon fosfat
Xa-Cs	31665	7479,1
Xa-Cs-Ne 30%	2582,5	3653,6
Xa-Cs-Ne 50%	898,38	2032,4

La viteze de forfecare mari, desfacerea întrepătrunderilor dintre lanțurile macromoleculare predomină în comparație cu formarea de legături noi și moleculele se aliniază pe direcția de curgere, de aceea vâscozitatea scade cu creșterea vitezei de forfecare. Pentru toate hidrogelurile analizate se observă un comportament pseudoplastic la viteze de forfecare mai mari de $0,03 \text{ s}^{-1}$. Hidrogelurile dispersate în apă sunt caracterizate de valori mici ale vâscozității la viteze de forfecare mari datorită scăderii numărului de interacțiuni fizice dintre lanțurile macromoleculare. Încapsularea unei cantități mai mari de Ne în aceste probe poate provoca o destructurare a hidrogelului determinând apariția unor valori mici ale vâscozității. Mai mult, deoarece conținutul de Ne a crescut, în sistem pot apărea reorganizări ale interacțiunilor intermoleculare și/sau intramoleculare. De asemenea, comportamentul pseudoplastic poate fi datorat unei creșteri a frecării hidrodinamice dintre lanțurile macromoleculare și unei reorganizări a interacțiunilor hidrofobe, ambele induse de prezența Ne.

VII.2.3. Cinetica eliberării *in vitro* a Ne din complexul Xa-Cs-Ne

Coeficientul de partiție al medicamentului între faza polimerică și cea apoasă, precum și difuzia medicamentului prin membrana de dializă sunt forțele motrice pentru viteza de eliberare a medicamentului din rețeaua de hidrogel. Săculeții din membrană de dializă au reținut nanoparticulele de hidrogel și au permis difuzia liberă a medicamentului în mediul de eliberare (Mehrotra și Pandit, 2015).

Profilul de eliberare *in vitro* al hidrogelurilor conținând medicament a fost determinat utilizând soluție tampon fosfat pH 5,5 (pH-ul pielii).

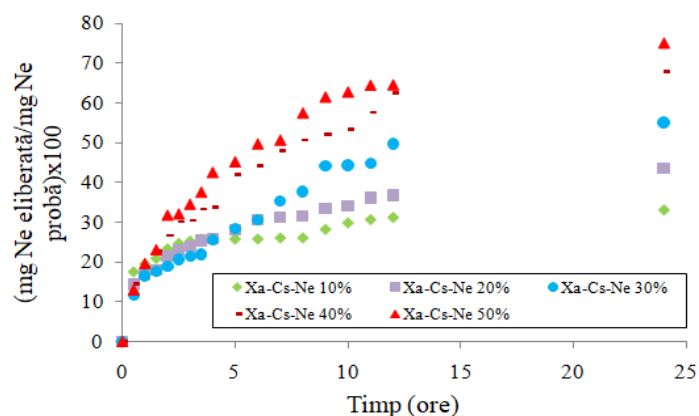
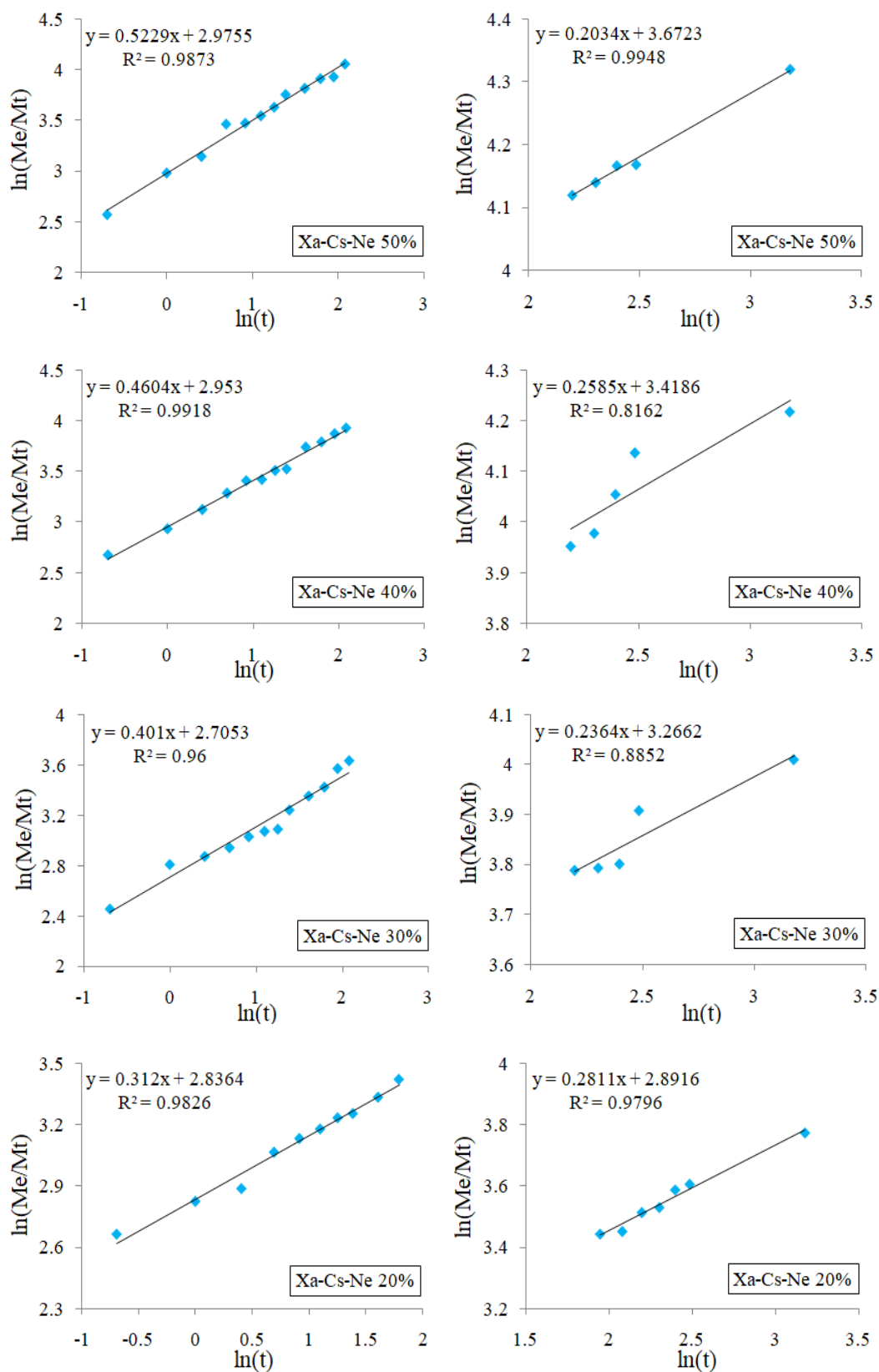


Figura 55. Curba de eliberare *in vitro* a Ne din hidrogelurile Xa-Cs-Ne, la pH 5,5

Hidrogelurile Xa-Cs-Ne au prezentat o eliberare inițială, rapidă a medicamentului în primele ore, urmată de o eliberare susținută mai lentă și continuă până la 24 ore. Eliberarea rapidă inițială s-a datorat medicamentului de la suprafață, în timp ce eliberarea mai lentă s-a datorat difuziei medicamentului încorporat. Procentul de medicament eliberat din formulările studiate a variat în intervalul 39,66% - 83,89%, iar acesta a crescut pe măsură ce cantitatea de complex polimeric în sistem a scăzut. Toate cele cinci sisteme polimer-medicament au eliberat maximul de Ne în aproximativ 24 ore.

Parametrii difuzionali au fost determinați aplicând ecuația Ritger și Peppas discutată anterior în capitolul I.



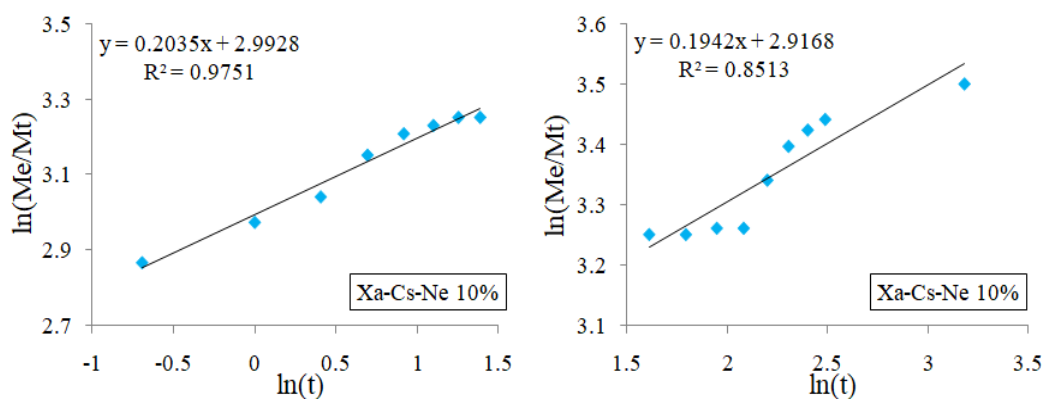


Figura 56. Cinetica de eliberare a Ne din hidrogelurile Xa-Cs-Ne, la pH 5,5, pentru cele 2 intervale de timp

Valorile lui n obținute pentru eliberarea Ne din hidrogelurile Xa-Cs-Ne la pH 5,5, sunt sub valoarea lui 0,5 atât pentru primul interval (0 ore - 8 ore Xa-Cs-Ne 40%, Xa-Cs-Ne 50%, 0 ore - 6 ore Xa-Cs-Ne 20% și 0 ore - 4 ore Xa-Cs-Ne 10%) cât și pentru al doilea interval de timp (8 ore - 24 ore Xa-Cs-Ne 50%, Xa-Cs-Ne 40%, Xa-Cs-Ne 50%, 6 ore - 24 ore Xa-Cs-Ne 20% și 4 ore - 24 ore Xa-Cs-Ne 10%) și sunt caracteristice unui proces de difuzie Fickian. Excepție face valoarea lui n obținută pentru eliberarea Ne din hidrogelurile Xa-Cs-Ne 50%, în intervalul 0 ore - 8 ore, aceasta având valoarea 0,52 și fiind caracteristică unui proces de difuzie non-Fickian.

VII.2.4. Evaluarea viabilității celulare

Determinarea citotoxicității este esențială, deoarece în timpul aplicării, hidrogelurile intră în contact direct cu celulele (*Bellini și colab., 2015*) În figura 57 sunt prezentate rezultatele testului de citotoxicitate pentru loturile martor, Xa-Cs-Ne 30%, Xa-Cs-Ne 50%, la diferite intervale de timp. Analizând datele obținute se poate observa în cazul celor trei loturi testate o viabilitate celulară de peste 80%, indicând astfel că hidrogelurile sunt biocompatibile. Se constată o tendință de descreștere în timp a viabilității celulare pentru loturile Xa-Cs-Ne. De asemenea, o tendință de descreștere a viabilității se observă și pe măsură ce concentrația în complexul polimeric scade, iar concentrația în Ne crește.

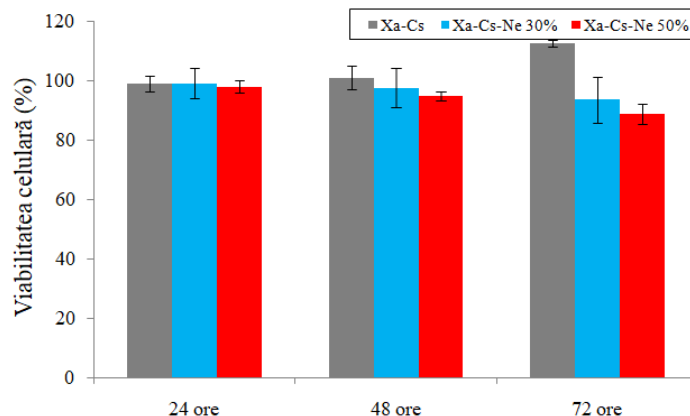


Figura 57. Viabilitatea celulară a loturilor Xa-Cs, Xa-Cs-Ne 30% și Xa-Cs-Ne 50%

VII.2.5. Activitatea antibacteriană

Figura 58 și tabelul 23 prezintă activitatea antibacteriană a Xa-Cs, Xa-Cs-Ne 50% și Ne pe tulpinile de *Staphylococcus aureus* și *Escherichia coli*.

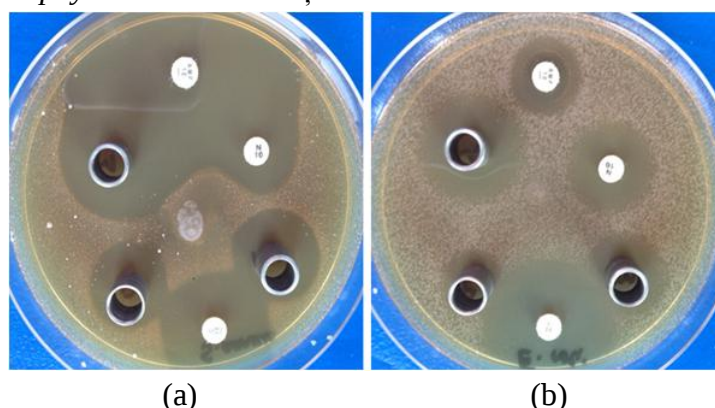


Figura 58. Zona de inhibiție a Xa-Cs, Xa-Cs-Ne 50% și Ne în cazul tulpinilor (a) *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 și (b) *Escherichia coli* ATCC 25922

Tabelul 23. Activitatea antibacteriană a compușilor testați

Suspensie/Control pozitiv	Diametrul zonei de inhibiție (mm)	
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922
Xa-Cs (20 μg/cilindru)	18,33 ± 0,57	13,00 ± 1,00
Ne (20 μg/cilindru)	26,33 ± 0,57	24,33 ± 0,57
Xa-Cs-Ne 50% (40 μg/cilindru)	22,66 ± 0,57	20,66 ± 0,57
Ampicilină (25 μg/disc)	30,33 ± 0,57	18,66 ± 0,57
Cloramfenicol (30 μg/disc)	29,00 ± 0,00	30,33 ± 0,57
Neomicină (30 μg/disc)	21,00 ± 1,00	21,33 ± 0,57

După cum se poate observa în tabelul 23, toate probele au fost eficiente atunci când au fost testate pe tulpinile de *Staphylococcus aureus* și *Escherichia coli*. În ciuda efectului sinergetic cunoscut al Ne și Cs, cea mai mare zonă de inhibiție a fost înregistrată pentru Ne, consecință a faptului că medicamentul nu a fost eliberat complet după 24 de ore din complexul polimeric Xa-Cs. Hidrogelurile Xa-Cs-Ne 50% au dezvoltat zone de inhibiție mai mari decât a hidrogelurilor Xa-Cs. Efectul antimicrobian al Cs se datorează naturii sale cationice. Interacțiunea între grupările amino ale Cs cu componentii anionici ai microorganismelor (lipopolizaharide, acid teicoic, etc), este considerată a fi responsabilă de activitatea antimicrobiană (Malinowska-Panczyk și colab., 2015). În ceea ce privește eficiența împotriva bacteriilor, toate probele au arătat activitate inferioară pe *Escherichia Coli* prin comparație cu *Staphylococcus aureus*, care a fost mai mult sensibilă.

VII.3. Concluzii

Hidrogeluri pe bază de Xa, Cs și Ne, au fost preparate și testate în eventualitatea utilizării acestora ca și produse dermatologice.

Rezultatele furnizate de analiza termică au confirmat includerea medicamentului în hidrogeluri, picul caracteristic celei de a doua etape de degradare a Ne ce apare în jurul

temperaturii de 235 °C fiind prezent și în cazul complexilor Xa-Cs-Ne, cu atât mai intens cu cât crește cantitatea de Ne.

Hidrogelurile Xa-Cs și Xa-Cs-Ne au fost caracterizate din punct de vedere reologic utilizând ambele tipuri de teste reologice-oscilatorii și rotaționale. Hidrogelurile analizate prezintă o structură stabilă, caracteristică pentru gelurile fizice slabe cu modulii dinamici dependenți de frecvența și G' mai mare decât G'' pe întreg domeniul experimental. S-a urmărit influența mediului de dispersie, a conținutului de medicament precum și a temperaturii, asupra structurii hidrogelurilor. Valori mai ridicate ale modulilor dinamici au fost obținute pentru hidrogelurile dispersate în tampon fosfat comparativ cu cele dispersate în apă, datorită creșterii tăriei ionice care modifică structura internă a hidrogelului. Creșterea concentrației de Ne a dus la o scădere a valorilor modulilor dinamici, obținându-se astfel geluri mai moi cu un aspect mai catifelat, ușor de etalat pe piele, potrivite pentru utilizarea lor în creme și unguente cu aplicație dermală. Pentru toate probele s-a observat un comportament pseudoplastic, o condiție necesară pentru o mulțime de aplicații biomedicale. Structura și proprietățile finale a acestor hidrogeluri au fost puternic influențate de o serie de factori: compoziția hidrogelului, conținut în principiu activ, mediu de dispersie și temperatură. Pentru aplicații specifice, în scopul preparării hidrogelurilor cu proprietățile dorite trebuie luate în considerație toate interacțiunile dintre acești factori.

Testele *in vitro* relevă faptul că hidrogelurile pot susține eliberarea medicamentului o perioadă de 24 ore, acesta fiind eliberat din hidrogelurile Xa-Cs printr-un mecanism Fickian, excepție făcând prima etapă de eliberare a Ne din hidrogelurile Xa-Cs-Ne 50% pentru care mecanismul este de tip non-Fickian.

În cazul hidrogelurilor testate se observă o viabilitate celulară de peste 80%, indicând o bună biocompatibilitate a acestora. Non-citotoxicitatea le validează ca și potențiale sisteme cu eliberare controlată.

Testele antimicrobiene, confirmă eliberarea medicamentului în timp. Hidrogelurile demonstrează o eficiență inhibiție bacteriană atunci când sunt testate pe culturi de *Staphylococcus aureus* și *Escherichia coli*.

CONCLUZII GENERALE

În ultimele decenii, o gamă variată de sisteme cu eliberare controlată de medicamente pe bază de polimeri a fost dezvoltată, ca un nou mijloc de control al eliberării de medicamente, temporală sau distributivă (specifică locului). Sistemele cu eliberare controlată de medicamente oferă numeroase avantaje comparativ cu sistemele convenționale, cum ar fi eficiența îmbunătățită și toxicitatea redusă. Lucrarea de față, prezintă rezultate proprii privind obținerea unor sisteme cu eliberare controlată pe bază de hidrogeluri și două medicamente antimicrobiene, cu potențial rol în prevenirea sau tratarea infecțiilor la nivelul pielii sau intestinului.

Rezultatele obținute pe parcursul cercetării au permis formularea următoarelor concluzii:

1. Au fost sintetizate trei seturi de filme pe bază de Cs și PVA cu Ne încorporată, variind concentrațiile între polimeri, în scopul obținerii de potențiale pansamente cu rol în protecția și vindecarea rănilor.

Sistemele sintetizate au fost caracterizate prin spectroscopie IR, analiză termică, microscopie SEM. Rezultatele analizelor FTIR, precum și rezultatele analizelor termice au confirmat prezența medicamentului în sistemele obținute cât și interacțiunea acestuia cu complexul polimeric, în timp ce rezultatele analizelor SEM au elucidat caracteristicile morfologice pe suprafață a filmelor sintetizate, respectiv o suprafață mai puțin ordonată cu pori.

Caracterul hidrofil/hidrofob al suprafețelor filmelor sintetizate a fost pus în evidență prin măsurători ale unghiului de contact static, folosind metoda picăturii de lichid. Datele experimentale au arătat în cazul filmelor încărcate cu medicament, valori ale unghiurilor de contact sub 90°, indicând astfel pentru acestea o suprafață hidrofilă. De asemenea, o creștere a hidrofiliei filmelor este observată pe măsura creșterii conținutului de PVA în amestec.

Proprietățile mecanice au fost puse în evidență prin realizarea de teste prin întinderea uniaxială a probelor până la rupere, sub acțiunea unei tensiuni. Rezultatele relevă faptul că există diferențe semnificative între filmele fără medicament și încărcate cu medicament, cele din urmă fiind mai fragile și mai puțin flexibile. În schimb, pe măsura creșterii procentului de PVA în compoziția filmelor elongația și rezistența acestora crește, iar Modulul Young descrește.

Activitatea antibacteriană a filmelor a fost testată contra speciilor *Staphylococcus aureus* și *Escherichia coli*, infecțiile rănilor cu aceste tipuri de bacterii fiind între cele mai răspândite. Activitatea antibacteriană înregistrată a fost semnificativ mai mare în cazul filmelor cu medicament comparativ cu filmele fără medicament. Un diametru al zonei de inhibiție ușor crescut a fost observat în cazul tulpinilor *Staphylococcus aureus* în comparație cu *Escherichia coli*.

2. Au fost obținute sisteme tip filme pe bază de Cs și PVA încărcate cu două medicamente antimicrobiene, Ne și Nis separat și prin combinarea acestora.

Microscopia SEM a evidențiat o structură compactă și omogenă, cu câteva particule de medicament nedizolvate în cazul filmelor conținând Nis, respectiv câteva cavități în cazul filmelor conținând Ne.

Analiza sistemelor polimer-medicament obținute sub formă de filme, a probat creșterea hidrofiliei sistemelor determinată de prezența medicamentelor. O creștere mai mare a hidrofiliei filmelor a fost înregistrată în cazul filmelor conținând Nis și Ne, datorită concentrației crescute de medicament.

Deși încorporarea Ne și/sau Nis în filmele Cs-PVA a avut ca rezultat micșorarea rezistenței și elongației filmelor, rezultatele obținute recomandă utilizarea lor ca și pansamente cu rol în protecția și vindecarea rănilor.

Comportamentul la eliberare al medicamentelor din suporturile polimerice este caracteristic sistemelor difuzionale implicând un “burst effect” inițial, urmat de o eliberare mai lentă, până la 6 ore, sugerând potențiale aplicații ale filmelor în transportul medicamentelor în cazul infecțiilor pielii. O capacitate îmbunătățită de eliberare este remarcată în cazul filmelor conținând ambele tipuri de medicament.

Testele de citotoxicitate încadrează filmele conținând ambele tipuri de medicament în categoria celor lipsite de toxicitate.

3. A fost preparat complexul Xa-Cs utilizând metoda de pregelifiere ionotropă polielectrolitică. Încorporarea medicamentului în acest sistem a fost realizată prin difuzia soluției de medicament în complexul polimeric. Hidrogelurile Xa-Cs-Ne 50% au fost testate în eventualitatea utilizării acestora ca și comprimate pentru administrare orală, cu potențial rol în tratarea infecțiilor intestinale.

Analiza de spectroscopie FTIR a confirmat prezența medicamentului încorporat în sistemul Xa-Cs, iar microscopia SEM a evidențiat particule distincte de medicament la suprafața complexului polimeric.

Comprimatele obținute pe baza amestecului Xa-Cs-Ne 50% au prezentat capacitate diferită de retenție a apei, în funcție de pH-ul mediului: în mediul bazic au reținut o cantitate de lichid mult mai mare față de cea reținută în mediul acid, gradul de umflare fiind 1150% la pH 7,2, respectiv 220% la pH 2. Echilibrul la umflare a fost atins după 48 ore pentru ambele medii.

Difuzia medicamentului în comprimate s-a datorat umflării acestora în mediile de eliberare (mediu simulat gastric și mediu simulat intestinal). Eliberarea a fost dependentă de pH, iar modelul propus pentru cinetica de eliberare a fost cel descris de Ritger și Peppas. Valorile exponenților difuzionali indică, că medicamentul este eliberat din hidrogelurile Xa-Cs-Ne 50% printr-un mecanism non-Fickian în primul interval de timp și printr-un mecanism Fickian în al doilea interval de timp.

Rezultatele favorabile obținute în urma studiilor *in vivo* recomandă utilizarea sistemului Xa-Cs-Ne 50% ca și protector împotriva efectelor adverse induse de administrarea Ne. O ameliorare a parametrilor biochimici (creatinină, uree, acid uric, Crp), precum și a modificărilor histologice ale colonului, a fost observată la administrarea medicamentului în combinație cu polimerul, comparativ cu administrarea doar a medicamentului.

4. Formulările Xa-Cs-Ne având diferite concentrații ale polimerului și medicamentului au fost testate în eventualitatea utilizării acestora ca și hidrogeluri cu potențial rol în tratarea infecțiilor pielii.

Din punct de vedere termic, picul caracteristic celei de a doua etape de degradare a Ne ce apare în jurul temperaturii de 235 °C apare și în cazul complexelor Xa-Cs-Ne, fiind cu atât mai intens cu cât crește cantitatea de medicament. Rezultatele furnizate de analiza termică confirmă astfel includerea medicamentului în hidrogeluri.

Caracterizarea a inclus și un studiu reologic al hidrogelurilor cu și fără medicament. Hidrogelurile analizate prezintă o structură stabilă, caracteristică pentru gelurile fizice slabe cu modulii dinamici dependenți de frecvență și G' mai mare decât G'' pe întreg domeniul experimental. S-a urmărit influența mediului de dispersie și a conținutului de medicament, asupra structurii și proprietăților hidrogelurilor și s-a demonstrat că au fost puternic dependente de acești factori. Valori mai ridicate ale modulilor dinamici au fost obținute pentru hidrogelurile dispersate în tampon fosfat comparativ cu cele dispersate în apă, datorită creșterii tăriei ionice care modifică structura internă a hidrogelului. Creșterea concentrației de Ne a dus la o scădere a valorilor modulilor dinamici, obținându-se astfel geluri mai moi cu un aspect mai catifelat, ușor de etalat pe piele, potrivite pentru utilizarea lor în creme și unguente

cu aplicație dermală. Pentru toate probele s-a observat un comportament pseudoplastic, o condiție necesară pentru o mulțime de aplicații biomedicale.

Studiile de eliberare *in vitro* a Ne din hidrogeluri au evidențiat un proces care are loc în două etape: prima etapă, caracterizată de o eliberare rapidă pentru primele 12 ore, urmată de o a doua etapă cu o viteză de eliberare mică până la 24 ore. Mecanismul de transport și eliberare a medicamentului este guvernat de procesul de difuzie Fikian pentru toate sistemele, excepție făcând sistemele Xa-Cs-Ne 50% pentru intervalul de timp 0 ore - 8 ore.

Analiza comportamentului fizico-chimic și mecanic al hidrogelurilor a fost completată de analiza din punct de vedere biologic, luând în considerare scopul aplicativ al acestora. Astfel, alături de lipsa efectului citotoxic demonstrat în raport cu celulele primare de tipul fibroblaștilor, hidrogelurile obținute au prezentat o eficientă inhibiție bacteriană atunci când au fost testate pe culturi de *Escherichia coli* și *Staphylococcus aureus*.

Rezultatele obținute în prezenta lucrare reprezintă o contribuție importantă în domeniul sistemelor cu eliberare controlată de medicamente, având ca aplicații domenii importante și anume cel al prevenirii sau tratării infecțiilor de la nivelul pielii, respectiv cel al prevenirii sau tratării infecțiilor de la nivelul intestinului.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

Abdelgawad A.M., Hudson S.M., Rojas O.J., (2014), *Antimicrobial wound dressing nanofiber mats from multicomponent (chitosan/silver-NPs/polyvinyl alcohol) systems*, Carbohydrate Polymers, 100, 166-178.

Aelenei N., Popa M.I., Novac O., Lisa G., Balaita L., (2009), *Tannic acid incorporation in chitosan-based microparticles and in vitro controlled release*, Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 20 (5), 1095-1102.

Ali N.A.M., Saeed S.Z., (2012), *Nephro-Protective Effect of Punica granatum in Gentamicin-Induced Nephrotoxicity in Rats*, Medical Journal of Babylon, 9 (1), 220-228.

Argin S., Kofinas P., Martin Lo Y., (2014), *The cell release kinetics and the swelling behavior of physically crosslinked xanthan-chitosan hydrogels in simulated gastrointestinal conditions*, Food Hydrocolloids, 40, 138-144.

Ashwini V., Suryaprakash Reddy C., Sathya Keerthi Pani P.C., Rushi Kumar Reddy D., (2014), *Dissolution Enhancement of Aceclofenac by Solid Dispersion Technique Using Starch Phosphate As Polymer*, International Bulletin of Drug Research, 4 (7), 53-65.

Bahrami S.B., Kordestani S.S., Mirzadeh H., Mansoori P., (2003), *Poly (vinyl alcohol) - chitosan blends: preparation, mechanical and physical properties*, Iranian Polymer Journal, 12 (2), 139-146.

Bellini M.Z., Oliva-Neto P., Moraes Â.M., (2015), *Properties of films obtained from biopolymers of different origins for skin lesions therapy*, Brazilian Archives of Biology and Technology, 58 (2), 289-299.

Benny I.S., Gunasekar V., Ponnusami V., (2014), *Review on Application of Xanthan Gum in Drug Delivery*, International Journal of PharmTech Research, 6 (4), 1322-1326.

Bollenbach T., (2015), *Antimicrobial interactions: mechanisms and implications for drug discovery and resistance evolution*, Current Opinion in Microbiology, 27, 1-9.

Bose S., Han K.W., Lee M.J., Kim H., (2013), *Intestinal Protective Effects of Herbal-Based Formulations in Rats against Neomycin Insult*, Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 161278.

Costa Jr E.S., Barbosa-Stancioli E.F., Mansur A.A.P., Vasconcelos W.L., Mansur H.S., (2009), *Preparation and characterization of chitosan/poly(vinyl alcohol) chemically crosslinked blends for biomedical applications*, Carbohydrate Polymers, 76, 472-481.

Deepak K., Saraswati M., Ravindra C., Gani R., (2015), *Preparation and Characterization of Binary Blend Films Containing Chitosan and Vanillin*, American Journal of Advanced Drug Delivery, 3 (2), 181-195.

de Planque M.R.R., Mendes G.P., Zagnoni M., Sandison M.E., Fisher K.H., Berry R.M., Watts A., Morgan H., (2006), *Controlled delivery of membrane proteins to artificial lipid bilayers by nystatin-ergosterol modulated vesicle fusion*, IEE Proceedings - Nanobiotechnology, 153 (2), 21-30.

Di Martino A., Kucharczyk P., Capakova Z., Humpolicek P., Sedlarik V., (2017), *Chitosan-based nanocomplexes for simultaneous loading, burst reduction and controlled release of doxorubicin and 5-fluorouracil*, International Journal of Biological Macromolecules, 102, 613-624.

Dos Santos V., Brandalise R.N., Savaris M., (2017), *Biomaterials: Characteristics and properties*, în C.P. Bergmann (Series Ed.), Engineering of biomaterials, Topics in Mining, Metallurgy and Materials Engineering, Springer, Cham, 5-15.

Drăgan S., Dranca I., Ghimici L., Cristea M., Funduianu Gh., Lupascu T., (1998), *Thermal behaviour of some cationic polyelectrolytes and electrolyte complexes*, European Polymer Journal, 34, 733-737.

Dumitriu S., Chornet E., Vidal P., Polyionic insoluble hydrogels comprising xanthan and chitosan, US Patent 5620706A, 1997.

Hanko V.P., Rohrer J.S., (2007), *Determination of neomycin sulfate and impurities using high-performance anion-exchange chromatography with integrated pulsed amperometric detection*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 43 (1), 131-141.

Hashemnia S., Mokhtari Z., Tashkhourian J., Moosavi-Movahedi A.A., (2015), *Effect of covalent attachment of neomycin on conformational and aggregation properties of catalase*, Indian Journal of Biochemistry and Biophysics, 52, 189-195.

Horn M.M., Martins V.C.A., Plepis A.M., (2015), *Influence of collagen addition on the thermal and morphological properties of chitosan/xanthan hydrogels*, International Journal of Biological Macromolecules, 80, 225-230.

Huidobro A.L., Garcia A., Barbas C., (2009), *Rapid analytical procedure for neomycin determination in ointments by CE with direct UV detection*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 49, 1303-1307.

Ibănescu C., Danu M., Nanu A., Lungu M., Simionescu B.C., (2010), *Stability of disperse systems estimated using rheological oscillatory shear tests*, Revue Roumaine de Chimie, 55 (11-12), 933-940.

Kalsait R.P., Khedekar P.B., Saoji A.N., (2011), Bhusari K.P., *Role of C-Reactive Protein in the Development of Atherosclerosis in Diet-induced Lipidemia in Albino Rats*, Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 10, 41-45.

Kamoun E.A., Chen X., Eldin M.S.M., Kenawy E.S., (2015), *Crosslinked poly(vinyl alcohol) hydrogels for wound dressing applications: A review of remarkably blended polymers*, Arabian Journal of Chemistry, 8, 1-14.

Kamoun E.A., Kenawy E.R.S., Chen X., (2017), *A review on polymeric hydrogel membranes for wound dressing applications: PVA-based hydrogel dressings*, Journal of Advanced Research, 8 (3), 217-233.

Khatry Sirish S., Shastri N., Sadanandam M., (2010), *Novel drug delivery systems for antifungal therapy*, International Journal of Pharmacy, 2 (4), 6-9.

Kiaee G., Etaat M., Kiaee B., Kiaei S., Javar H.A., (2016), *Multilayered Controlled Released Topical Patch Containing Tetracycline for Wound Dressing*, Journal of In Silico & In Vitro Pharmacology, 2.

Kiseliovienė S., Baniukaitienė O., Harkavenko V., Babenko N.A., Liesienė J., (2016), *Cellulose hydrogel sheets for wound dressings*, Cellulose Chemistry and Technology, 50 (9-10), 915-923.

Kokabi M., Sirousazar M., Hassan Z.M., (2007), *PVA-clay nanocomposite hydrogels for wound dressing*, European Polymer Journal, 43 (3), 773-781.

Kouchak M., Ameri A., Naseri B., Kargar Boldaji S., (2014), *Chitosan and polyvinyl alcohol composite films containing nitrofurazone: preparation and evaluation*, Iranian Journal of Basic Medical Sciences, 17 (1), 14-20.

Li C., Fu R., Yu C., Li Z., Guan H., Hu D., Zhao D., Lu L., (2013), *Silver nanoparticle/chitosan oligosaccharide/poly(vinyl alcohol) nanofibers as wound dressings: a preclinical study*, International Journal of Nanomedicine, 8, 4131-4145.

Liang S., Huang Q., Liu L., Yam K.L., (2009a), *Microstructure and molecular interaction in glycerol plasticized chitosan/poly (vinyl alcohol) blending films*, Macromolecular Chemistry and Physics, 210, 832-839.

Malinowska-Panczyk E., Staroszczyk H., Gottfried K., Kolodziejaska I., Wojtasz-Pajak A., (2015), *Antimicrobial properties of chitosan solutions, chitosan films and gelatin-chitosan films*, Polimery, 60 (11-12), 735-741.

Martinez-Ruvalcaba A., Chornet E., Rodrigue D., (2007), *Viscoelastic properties of dispersed chitosan/xanthan hydrogels*, Carbohydrate Polymers, 67, 586-595.

Mehrotra A., Pandit J.K., (2015), *Preparation and Characterization and Biodistribution Studies of Lomustine Loaded PLGA Nanoparticles by Interfacial Deposition Method*, Journal of Nanomedicine & Nanotechnology, 6, 328.

Merlușcă I.P., Mătiuț D.S., Lisă G., Silion M., Grădinaru L., Oprea Ș., Popa I.M., (2017), *Preparation and characterization of chitosan-poly(vinyl alcohol)-neomycin sulfate films*, Polymer Bulletin, 1-16. <https://doi.org/10.1007/s00289-017-2246-1>.

Merlușcă I.P., Plămădeală P., Gîrbea C., Popa I.M., (2016), *Xanthan-chitosan complex as a potential protector against injurious effects of neomycin*, Cellulose Chemistry and Technology, 50 (5-6), 505-506.

Mittal K.L., (2002), *Contact Angle, Wettability and Adhesion*, Vol. 2, VSP, Utrecht, Boston.

Novac O., (2009), *Suporturi polizaharidice cuplate cu medicamente utilizate în scopuri biomedicale* - teză de doctorat, Universitatea Tehnică Gheorghe Asachi, Iași.

Otto D.P., Vosloo H.C.M., Liebenberg W., de Villiers M.M., (2008), *Development of microporous drug-releasing films cast from artificial nanosized latexes of poly(styrenecomethyl methacrylate) or poly(styrene-co-ethyl methacrylate)*, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 69, 1121-1134.

Özcan İ., Abacı Ö., Uztan A.H., Aksu B., Boyacıoğlu H., Güneri T., Özer Ö., (2009), *Enhanced Topical Delivery of Terbinafine Hydrochloride with Chitosan Hydrogels*, AAPS PharmSciTech, 10 (3), 1024-1031.

Packiaraj J.M., Venkateswaran C.S., Mohamed P.S., Janakiraman K., (2017), *Formulation and Evaluation of Nystatin Vaginal Tablet*, Der Pharmacia Sinica, 8 (1), 1-10.

Pereira V.A., de Arruda I.N.Q., Stefani R., (2015), *Active chitosan/PVA films with anthocyanins from Brassica oleraceae (Red Cabbage) as Time-Temperature Indicators for application in intelligent food packaging*, Food Hydrocolloids, 43, 180-188.

Popa M.I., Lisa G., Aelenei N., (2008), *Thermogravimetric characterization of chitosan/alginate microparticles loaded with different drugs*, Polymer Bulletin, 61 (4), 481-490.

Popa N., Novac O., Profire L., Lupușoru C.E., Popa M.I., (2010), *Hydrogels based on chitosan-xanthan for controlled release of theophylline*, Journal of materials science: Materials in medicine, 21, 1241-1248.

Shukr M.H., Metwally G.F., (2013), *Evaluation of Topical Gel Bases Formulated with Various Essential Oils for Antibacterial Activity against Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus*, Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 12 (6), 877-884.

Singh H.P., Kaur A., Kaur I., (2014), *Formulation and evaluation of effervescent floating tablet of famotidine with natural polymer chitosan*, Asian Pacific Journal of Public Health, 1 (4), 517-523.

Straccia M.C., d'Ayala G.G., Romano I., Oliva A., Laurienzo P., (2015), *Alginate Hydrogels Coated with Chitosan for Wound Dressing*, Marine Drugs, 13, 2890-2908.

Szaniszló B., (2013), *Studiu analitic al unor antibiotice aminoglicozidice - teză de doctorat*, Universitatea de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu”, Cluj-Napoca.

Szekalska M., Sosnowska K., Zakrzaska A., Kasacka I., Lewandowska A., Winnicka K., (2017), *The influence of chitosan cross-linking on the properties of alginate microparticles with metformin hydrochloride-in vitro and in vivo evaluation*, Molecules, 22 (1), 182.

Verma M.V.S., Kaushal A.M., Garg A., Garg S., (2004), *Factors Affecting Mechanism and Kinetics of Drug Release from Matrix-Based Oral Controlled Drug Delivery Systems*, American Journal of Drug Delivery, 2 (1), 43-57.

Walke S., Srivastava G., Nikalje M., Doshi J., Kumar R., Ravetkar S., Doshi P., (2014), *Physicochemical and Functional Characterization of Chitosan Prepared From Shrimp Shells and Investigation of Its Antibacterial, Antioxidant and Tetanus Toxoid Entrapment Efficiency*, International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research, 26 (2), 215-225.

Wang Q., Du Y., Fan L., (2005), *Properties of Chitosan/Poly(vinyl alcohol) Films for Drug-Controlled Release*, Journal of Applied Polymer Science, 96 (3), 808-813.

Activitatea științifică

Publicații:

1. Xanthan-chitosan complex as a potential protector against injurious effects of neomycin, Irina Paula Merlușcă, Petru Plămădeală, Cătălina Gîrbea, Ionel Marcel Popa, Cellulose Chemistry and Technology, 2016, 50 (5-6), 505-506 (IF: 0,833)
2. Preparation and characterization of chitosan–poly(vinyl alcohol)–neomycin sulfate films Irina Paula Merlușcă, Doina Simona Mătiuț, Gabriela Lisă, Mihaela Silion, Luiza Grădinaru, Ștefan Oprea, Ionel Marcel Popa, Polymer Bulletin, 2017, 1-16. <https://doi.org/10.1007/s00289-017-2246-1> (IF = 1,430)
3. Neomycin-loaded xanthan-chitosan hydrogels for topical applications, Irina Paula Merlușcă, Constanța Ibănescu, Cristina Tuchiluş, Maricel Danu, Leonard Ionuț Atanase, Ionel Marcel Popa, International Journal of Polymeric Materials (în curs de revizuire).

Prezentări orale:

1. Eliberarea controlată a neomicinei din suportul polimeric xantan-chitosan, Irina Paula Merlușcă, Ionel Marcel Popa, Congresul Internațional al Universității „Apollonia” din Iași - “Pregătim viitorul promovând excelența”, 26 februarie - 1 martie 2015, Iași.
2. The rheological properties of some hydrogel formulations, Irina Paula Merlușcă, Constanța Ibănescu, Maricel Danu, Ionel Marcel Popa, Congresul Internațional al Universității „Apollonia” din Iași - Pregătim viitorul promovând excelența, 2 martie - 5 martie 2017, Iași.

Postere:

1. Xanthan-chitosan hydrogels for topical delivery of neomycin sulphate, Irina-Paula Merlușcă, Gabriela Lisă, Maria Butnaru, Simona Dunca, Maricel Danu, Ionel Marcel Popa, Congresul Internațional al Universității „Apollonia” din Iași - Pregătim viitorul promovând excelența, 2 martie - 5 martie 2017, Iași.
2. Synthesis and characterization of chitosan/PVA antimicrobial films, Irina-Paula Merlușcă, Doina Simona Mătiuț, Luiza Grădinaru, Ștefan Oprea, Ionel Marcel Popa, al 9-lea Congres Național cu Participare Internațională și a 35-a Sesiune Științifică Anuală a Societății Române de Biologie Celulară, 7 iunie - 11 iunie 2017, Iași.
3. Chitosan-polyvinyl alcohol hydrogels, for controlled, localized antimicrobial drugs co-delivery, Irina-Paula Merlușcă, Mihaela Sillion, Gabriela Lisă, Ionel Marcel Popa, Congresul Internațional al Universității „Apollonia” din Iași - Pregătim viitorul promovând excelența, 1 martie - 4 martie 2018, Iași.