





UNIVERSITATEA TEHNICĂ "GHEORGHE ASACHI" DIN IAȘI, ȘCOALA DOCTORALĂ A FACULTĂȚII DE INGINERIE CHIMICĂ ȘI PROTECȚIA MEDIULUI "CRISTOFOR SIMIONESCU,, UNIVERSITATEA HAUTE-ALSACE -TEZĂ ÎN COTUTELĂ-

Biomateriale pe bază de polizaharide modificate, micro/nanoparticule și sub formă de film, pentru eliberarea controlată a principiilor active

-Rezumatul Tezei de doctorat-

Conducători științifici Prof. *em*. dr. ing. *dr. h. c*. Marcel Popa Prof. dr. Christelle Delaite

> Doctorand: Ing. dipl. Corina-Lenuța Savin

Iaşi 2018

UNIVERSITATEA TEHNICĂ "GHEORGHE ASACHI" DIN IAȘI

RECTORATUL

Către

Vă facem cunoscut că, în ziua de 07.09.2018 la ora 10 în sala de consiliu a Facultății de Inginerie Chimică și Protecția Mediului "CRISTOFOR SIMIONESCU", va avea loc susținerea publică a tezei de doctorat intitulată:

" BIOMATERIALE PE BAZĂ DE POLIZAHARIDE MODIFICATE, MICRO/NANOPARTICULE ȘI SUB FORMĂ DE FILM, PENTRU ELIBERAREA CONTROLATĂ A PRINCIPIILOR ACTIVE"

elaborată de doamna / domnul SAVIN CORINA-LENUȚA în vederea conferirii titlului științific de doctor.

Comisia de doctorat este alcătuită din:

Volf Irina, prof. univ. dr. ing., Universitatea Tehnică "Gheorghe Asachi" Iași președinte
 Popa Marcel, prof. univ. em. dr. ing. *dr.h.c.*, Universitatea Tehnică "Gheorghe Asachi" Iași conducător de Doctorat
 Delaite Christelle, prof. univ. dr., Universitatea Haute-Alsace Mulhouse conducător de

 3. Delaite Christelle, prof. univ. dr., Universitatea Haute-Alsace Mulhouse
 conducător de

 Doctorat
 Conducător de

4. Desbrieres Jacques, prof. univ. dr. ing., Universitatea Pau Et Des Pays De L'Adourreferent oficial5. Iovu Horia, prof. univ. dr. ing., Universitatea Politehnică din Bucureștireferent oficial

6. Popa Ionel Marcel, prof. univ. dr. ing., Universitatea Tehnică "Gheorghe Asachi" Iași referent oficial

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

RECTOR, Prof. univ.dr.ing. DAN CAŞCAVAL

Secretar universitate, Ing. Cristina Nagît

Teza de doctorat a fost realizată cu sprijinul financiar al proiectelor:

Sisteme inovative de eliberare controlata sub formă de particule pentru țintirea segmentului posterior ocular "OCULOMAT" (PN-II-PT-PCCA-2013-4)

National Scholarship Programme of the Slovak Republic for the Support of Mobility of Students, PhD Students, University Teachers, Researchers and Artists (Grant Agreement No.: 18428).

Mulțumiri din suflet...

Pe parcursul desfășurării lucrărilor din cadrul tezei, un drum pe de o parte sinuos și dificil, datorită asumării unui traseu complex pe de altă parte însă, frumos cercetarea fiind una dintre marile aventuri ale umanității, am beneficiat de prezența providențială, în momentele cheie, a unor oameni minunați care prin încurajări, sugestii și critici, binevenite, au contribuit, m-au susținut și ajutat la elaborarea și finalizarea acestui demers științific, pe această cale, doresc să le adresez mulțumiri.

Sunt sincere mulțumirile pe care le datorez astfel, în primul rând, domnului profesor Marcel Popa, în calitate de conducător științific al acestei teze de doctorat, pentru profesionalismul, efortul depus și răbdarea de care a dat dovadă în îndrumarea mea științifică pe toată perioada anilor de cercetare, pentru viziunea pe care mi-a inspirat-o asupra a ceea ce înseamnă cercetarea științifică în domeniul polimerilor. Sunt numeroase momentele în care am realizat rolul de "catalizator" al înțelegerii pe care prezența și îndrumarea sa de excepție l-a avut pentru mine.

De asemenea, aș dori să mulțumesc **doamnei profesor Christelle Delaite**, pentru oportunitatea pe care mi-a oferit-o de a realiza o parte din experimente, sub atenta sa îndrumare, în cadrul Laboratorului de Fotochimie și Inginerie Macromoleculară din cadrul Universității Haute-Alsace, din Mulhouse.

Cu deosebit respect aș dori să mulțumesc membrilor comisiei, **doamnei prof. dr. ing.** Irina Volf, domnul prof.dr.ing. Jacques Debrieres, domnul prof. dr. ing. Horia Iovu și domnul prof.dr. Ionel Marcel Popa pentru atenția și exigența profesională acordate prin recenzarea lucrării.

De asemenea, în mod deosebit doresc să îi mulțumesc al doamnei **șef lucrări dr. bioing. Cătălina Peptu**, înainte de toate pentru relația noastră de prietenie, pentru răbdarea, înțelepciunea, sprijinul permanent și încrederea pe care mi le-a acordat în acești ani, știind când să mă dojenească pentru a mă îndrepta pe drumul cel bun, dar și când să mă aprecieze, de îndată ce observa că nu mai întrevăd finalul mult dorit.

Această teză de doctorat nu ar fi fost completă fără ajutorul esențial și necondiționat al **domnului dr. bioing. Cristian Peptu**, pe acestă cale doresc să îi mulțumesc pentru sprijinul și răbdarea infinită de care a dat dovadă, pentru faptul că mi-a îndrumat inegalabil pașii în sensul "schimbării" și formării mele ca cercetător.

Expresie a celor mai alese gânduri de înaltă considerație, doresc să mulțumesc pentru sprijinul și îndrumarea accordată în cadrul stagiului de mobilitate Erasmus în cadrul Laboratorului de Fotochimie și Inginerie Macromoleculară din cadrul Universității Haute-Alsace, din Mulhouse, **domnului profesor Gérard Riess**.

Domnului dr.ing. Cornel Stan vreau să-i mulțumesc pentru încrederea, suportul și sfaturile oferite.

Tuturor colegilor și prietenilor mei, care prin sprijinul lor mi-au fost alături de-a lungul acestor ani, le adresez recunoștința mea. În special prietenei mele, Liana Alupei, îi ofer toată afecțiunea mea pentru că mi-a fost alături și m-a încurajat în toți acești ani. Prietenei mele, Camelia Tincu vreau să-i mulțumesc pentru anii de prietenie, sprijinul, încurajările și gândurile bune oferite în momentele dificile de pe parcursul doctoratului și nu numai. Mulțumesc în mod special colegii mele Petronela Horlescu, pentru sprijin, optimism și momentele de veselie oferite care m-au încurajat și ajutat în ultima perioadă.

În mod deosebit țin să le mulțumesc **mamei și tatălui meu** că m-au creascut independentă, cu înțelegere și răbdare, pentru susținerea, înțelegerea și liniștea pe care mi leau acordat pe parcursul acestor ani de studiu, consider cuvintele insuficiente pentru a le arăta toata dragostea mea.

Îi mulțumesc logodnicului meu, **Ovidiu**, pentru răbdarea, devotamentul, încrederea pe care o avut-o în mine, iubirea și dăruirea necondiționate pe care mi le-a dăruit. Mătușii mele, **Lenuța**, și unchiului mei, **Cătălin**, le dăruiesc pentru totdeauna dragostea și devotamentul meu.

În cele din urmă doresc să dedic aceste realizări tuturor celor care au avut încredere în mine, celor care m-au îndrumat, încurajat și m-au sprijinit le ofer cele mai bune gânduri și recunoștința mea.

Cuprins	Pag.
Listă de Abrevieri	10
Introducere	12
PARTEA I. STUDIU BIBLIOGRAFIC	14
Capitolul 1. Biomateriale – noțiuni generale	14
1.1. Biomateriale pe bază de polimeri naturali, sintetici și derivați ai acestora	18
1.1.1. Polimeri naturali	21
1.1.2. Derivați ai polizaharidelor	24
1.1.3. Polimeri sintetici	31
Capitolul 2. Sisteme cu eliberare controlată	35
2.1. Aspecte generale	35
2.2. Principiile generale ale eliberarii controlate de medicamente	37
2.2.1. Eliberarea controlată a principiilor biologic active	37
2.3. Clasificarea sistemelor polimerice vectori de eliberare controlată a principiilor	42
active	
2.4. Materiale polimere utilizate pentru obținerea sistemelor cu eliberare controlată	45
2.5. Tipuri de mecanisme și cinetica de eliberare a principiilor active din sistemele	47
polimere cu eliberare controlată – modele matematice	
2.5.1. Mecanisme de eliberare a medicamentelor din sistemele polimere cu	47
eliberare controlată	
2.5.2. Modele cinetice	53
Capitolul 3. Hidrogeluri (geluri) pentru transportul la țintă al medicamentelor	58
3.1. Aspecte generale	58
3.2. Clasificare, metode de obținere și caracterizare hidrogeluri/geluri	60
3.3. Stadiul actual al cercetărilor în domeniul biomedical	77
Capitolul 4. Micro/nanoparticule pentru transportul la țintă al medicamentelor	83
4.1. Micro/Nanoparticule polimere pentru eliberarea controlată de principii active	83
4.1.1. Aspecte generale. Avantaje și clasificare	83
4.1.2. Metode de obținere și caracterizare	93
4.1.2.1. Metode de obținere	93
4.1.2.2. Metode de caracterizarea a nanoparticulelor	97
4.1.3. Stadiul actual al cercetărilor în domeniul biomedical	99
PARTEA II. REZULTATE ORIGINALE	113

Capitolul 5. Materiale, tehnici experimentale și de caracterizare	114
5.1. Materiale și reactivi	114
5.2. Tehnici de sinteză/obținere	125
5.2.1. Sinteză poliglobalidă (PGL)	125
5.2.2. Sinteza copolimerului copolimerului poli(etilenglicol-co-tiomaleat)	126
(PEG-SH)	
5.2.3. Sinteza rețelelor polimerice pe bază de PGL și PEG-SH prin reacția de	126
tip adiție tiol-enă	
5.2.4. Funcționalizarea chitosanului prin metoda grefării cu metacrilat de	127
poli(etilen glicol)	
5.2.5. Funcționalizarea chitosanului prin metoda grefării cu poli(etilen glicol)	128
metil eter acrilat	
5.2.6. Prepararea micro/nanoparticulelor pe bază de CS-g-poli(etilen glicol)	129
metacrilat / metil eter acrilat prin dublă reticulare în emulsie inversă	
5.3. Metode de caracterizare	131
5.3.1. Caracterizarea structurală	131
5.3.1.1. Spectroscopia în Infraroșu cu Transformată Fourier și Raman	132
5.3.1.2. Rezonanța magnetică nucleară	132
5.3.1.3. Cromatografie de permeație prin gel	132
5.3.1.4. Spectrometrie de masă	133
5.3.1.5. Analiza elementală	134
5.3.1.6. Spectofotometrie UV-Vis	134
5.3.2. Caracterizarea termică	136
5.3.2.1. Analiza termogravimetrică	136
5.3.2.2. Analiza calorimetrică prin scanare diferențială	136
5.3.3. Caracterizare morfologică	137
5.3.3.1. Microscopie electronică de baleiaj	137
5.3.3.2. Analiza dimensională a particulelor prin difractometrie laser	137
5.3.4. Studii reologice	138
5.3.5. Proprietăți fizico-chimice	139
5.3.5.1. Analiza comportamentului la umflare	139
5.3.5.2. Capacitatea de includere a principiilor biologic active	140
5.3.5.3. Capacitatea de eliberare a principiilor biologic active	141

5.3.5.4. Capacitatea de eliberare a bevacizumabului ex vivo	141
5.3.5.5. Potențial zeta	142
5.3.6. Caracteristici de biomaterial	143
5.3.6.1. Citotoxicitate	143
5.3.6.2. Hemocompatibilitate	144
5.3.6.3. Studiul efectului antiangiogenic al nanoparticulelor selectate	145
asupra unor afecțiuni ale segmentului posterior al ochiului	
5.3.6.3.1. Diabetul/Boli inflamatorii ale ochiului - model	145
experimental pe animale	
5.3.6.3.2. Ocluzia venei centrale - model experimental pe	146
5364 Studiul efectului antiangiogenic al nanoparticulelor (încărcate	148
cu bevacizumab, devametazonă, triamcinolon) asunra celulelor	140
stem induse/mezenchimale în diabet boli inflamatorii ale	
ochiului ocluzia venei centrale pentru modele animale	
Canitolul 6 Retele nolimere ne bază de noligiobalidă obținute prin reacția de	150
aditie de tin tiol-enă	120
6.1. Rezultate și discutii	150
6.1.1. Polimeri sintetizati pentru obtinerea retelelor polimere preparate prin	150
reactia de aditie de tip tiol-enă	
6.1.1.1. Sinteza si caracterizarea poliglobalidei	150
6.1.1.2. Sinteza și caracterizarea copolimerului poli(etilenglicol- <i>co</i> - tiomaleat)	154
6.1.1.3. Prepararea retelelor polimerice pe bază de PGL si PEG-SH	160
prin reacția de tip adiție tiol-enă	
6.1.1.3.1. Caracterizarea structurală a rețelelor prin FT-Raman	165
6.1.1.3.2. Analiza elementală	166
6.1.1.3.3. Spectofotometrie UV-Vis (Testul Ellman)	168
6.1.1.3.4. Studiu reologic	172
6.1.1.3.5. Caracterizare prin microscopie SEM	174
6.1.1.3.6. Analiza comportamentului la umflare	177
61137 Citotoxicitatea	182

6.1.1.3.8. Capacitatea de includere și eliberare a principiilor	184
biologic active	
6.2. Concluzii parțiale	187
Capitolul 7. Sisteme micro/nanoparticulate polimer-medicament pe bază de	189
chitosan grefat cu poli(etilen glicol) metacrilat	
7.1. Rezultate și discuții	189
7.1.1. Sinteza și caracterizarea chitosanului grefat cu metacrilat de poli(etilen	189
glicol)	
7.1.2. Prepararea micro/nanoparticulelor pe bază de CS-g-poli(etilen glicol)	197
metacrilat prin dublă reticulare în emulsie inversă	
7.1.2.1. Caracterizarea structurală a nanoparticulelor prin	198
Spectroscopia în Infraroșu cu Transformată Fourier	
7.1.2.2. Analiza de Calorimetrie Prin Scanare Diferențială	200
7.1.2.3. Caracterizare prin microscopia electronică de baleiaj SEM	201
7.1.2.4. Analiza dimensională a particulelor prin difractometrie laser	206
7.1.2.5. Comportamentul la umflare	209
7.1.2.6. Potențial zeta	213
7.1.2.7. Evaluarea caracteristicilor de biomaterial	213
7.1.2.7.1. Toxicitatea	214
7.1.2.7.2. Citotoxicitatea	214
7.1.2.7.3. Hemocompatibilitatea	215
7.1.2.8. Capacitatea de includere a principiilor biologic active	216
7.1.2.9. Capacitatea de eliberare a principiilor biologic active	219
7.1.2.10. Capacitatea de eliberare a bevacizumabului ex vivo	223
7.1.2.11. Studiul efectului antiangiogenic al nanoparticulelor selectate	224
asupra unor afecțiuni ale segmentului posterior al ochiului	
7.1.2.11.1. Diabetul/ Boli inflamatorii - model experimental pe	224
animale	
7.1.2.11.2. Ocluzia venei centrale - model experimental pe animale	227
7.1.2.11.3. Studiul efectului antiangiogenic al nanoparticulelor	228
(încărcate cu bevacizumab, dexametazonă, triamcinolone) asupra	
celulelor stem induse/mezenchimale în diabet, boli inflamatorii ale	
ochiului, ocluzia venei centrale pentru modele animale	

7.2. Concluzii parțiale	233
Capitolul 8. Sisteme micro/nanoparticulate polimer-medicament pe bază de	235
chitosan grefat cu poli(etilen glicol) metil eter acrilat	
8.1. Rezultate și discuții	235
8.1.1. Funcționalizarea chitosanului prin metoda de grefare cu poli(etilen	235
glicol) metil eter acrilat	
8.1.2. Prepararea micro/nanoparticulelor pe bază de CS-g-PEG-A prin dublă	240
reticulare în emulsie inversă	
8.1.2.1. Caracterizarea structurală a nanoparticulelor prin FT-IR	242
8.1.2.2. Caracterizarea prin microscopie SEM	244
8.1.2.3. Analiza dimensională a particulelor prin difractometrie laser	249
8.1.2.4. Analiza comportamentului la umflare	251
8.1.2.5. Capacitatea de includere a LEV	255
8.1.2.6. Capacitatea de eliberare a LEV	256
8.1.2.7. Hemocompatibilitatea	261
8.2. Concluzii parțiale	263
Concluzii generale	265
Referințe bibliografice	273
Valorificarea rezultatelor cercetării	311

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

Listă de Abrevieri

- ABS Soluție fosfat acetat
- AG Aldehida glutarică
- AMD Degenerescența maculară legată de vârstă
- BAB Bariera sânge umoare apoasă
- BRB Bariera sânge retină
- BEV Bevacizumab
- CRG Carageenan
- Colab. Colaboratorii
- CS-Chitosan
- DCM Diclormetan
- DMPA 2,2-dimetoxi-2-fenilacetofenonă
- DTNB Acid 5,5'-ditio-bis- (2-nitrobenzoic)
- DSC Analiza calorimetrică prin scanare diferențială
- FT-IR, FT-Raman Spectroscopia în Infraroșu cu Transformată Fourier și Raman
- GL Globalidă
- GlcN 2-amino-2-deoxi- β -d-glucopiranosil
- GlcNAc 2-acetamido-2-deoxi-\beta-d-glucopiranosil
- GPC Cromatografie de permeație prin gel
- HBSS Soluție tampon salină Hank
- IOL lentilelor intraoculare injectabile
- LEV Levofloxacin
- LPS lipopolizaharidă
- MALDI Spectrometrie de masă
- MP Microparticule
- MNP Micro/nanoparticule
- NP Nanoparticule
- PBS Soluție tampon fosfat
- PCL poli (ε-caprolactonă)
- PEG Poli(etilen glicol)

- PEG-A Poli(etlen glicol) metil eter acrilat
- PEGDA poli(etilen glicol) diacrilat
- PEG-MA Poli(etilen glicol) metacrilat
- PEG-SH copolimerul poli(etilenglicol-co-tiomaleat)
- PGL Poliglobalidă
- PLGA poli(d,l-lactidă-co-glicolidă)
- PMMA poli(metacrilat de metil)
- PTMP tetrakis(3-mercapto propionat de pentaeritritol)
- RPE Epiteliul pigmentar retinal
- RMN Rezonanța magnetică nucleară
- TA Triamcinolon
- TGA Caracterizarea termică Analiza termogravimetrică
- THF Tetrahidrofuran
- TPP Tripolifosfatul de sodiu
- TMA Acidul tiomalic
- SEM Microscopie electronică de baleiaj
- SALD Analiza dimensională a particulelor prin difractometrie laser

Introducere

Biomaterialele, definite în mod tradițional ca materiale utilizate în dispozitivele medicale, au fost folosite încă din antichitate, dar în ultimii ani gradul lor de complexitate s-a amplificat semnificativ. Interesul tot mai crescut al cercetătorilor a condus la progresul remarcabil al biomaterialelor cu funcții din ce în ce mai complexe utilizate în domeniul biomedical.

Biomaterialele fabricate în prezent sunt capabile să încorporeze componente biologic active. Acestea au roluri cruciale în fabricarea de dispozitive pentru screening-biologic, în studiile științifice de bază și într-o varietate de domenii non-medicale. Astfel de materiale complexe sunt deseori concepute pentru a imita un subgrup al proprietăților fizico-chimice al materialelor naturale. Din ce în ce mai mult, natura inspiră nu numai materialele, ci și mijloacele și metodele prin care sunt fabricate. Selecția unui biomaterial eficient pentru o anumită aplicație nu este un lucru banal. Aceasta necesită atât cunoașterea detaliată a proprietăților materialului, cât și o înțelegere aprofundată a modului în care corpul va răspunde la prezența sa. Realizările în domeniul biomaterialelor au la bază știinte precum chimia, fizica, biologia și știința materialelor, aplicațiile tehnice sau *"punerea în operă"* culminând cu realizările clinice.

Biomaterialele pe bază de polimeri naturali sau sintetici au fost utilizate în domeniul biomedical încă din cele mai vechi timpuri, jucând un rol important în succesul dezvoltării dispozitivelor medicale și a sistemelor de transport de medicamente care odată introduse în corpul uman sunt capabile să contribuie la îmbunătățirea calității vieții atât prin creșterea eficienței tratamentului cât și a confortului pacientului

Tehnologia modernă a sistemelor de eliberare controlată a medicamentelor datează doar de 60 de ani, evoluția acesteia desfășurându-se aproape în paralel cu dezvoltarea chimiei polimerilor. Progresele fără precedent în domeniul genomicii și al biologiei moleculare, folosirea metodelor moderne de sinteză chimică (cum ar fi chimia combinatorie) au permis dezvoltarea și sintetizarea de noi medicamente, respectiv a diverse forme de dozare adecvate sau sisteme de administrare a medicamentelor ce permit aplicarea efectivă, sigură și fiabilă a acestor compuși bioactivi către pacient. În ceea ce privește forma de prezentare, tehnologiile actuale permit obținerea de sisteme polimer-substanță biologic activă cu design foarte variat, de la filme, geluri și hidrogeluri, soluții injectabile și tablete până la sisteme particulate microși nanometrice. Dintre acestea, sistemele sub formă de hidrogeluri/particule posedă cea mai mare pondere datorită numeroaselor avantaje pe care le prezintă din punct de vedere al modului de administrare.

Teza de doctorat intitulată "*Biomateriale pe bază de polizaharide modificate, micro/nanoparticule și sub formă de film, pentru eliberarea controlată a principiilor active*" este structurată în două părți: **prima parte** (capitolele 1,2,3,4) este destinată studiului bibliografic, iar **partea a II-a** este dedicată prezentării rezultatelor originale.

Aceasta din urmă debutează cu capitolul 5, unde sunt prezentate materiale, metode și tehnici de lucru utilizate în partea originală a cercetării.

Capitolul 6 prezintă rezultatele proprii obținute în ce privește prepararea rețelelor polimerice pe bază de doi polimeri poliglobalidă și copolimerul de poli(etilenglicol) modificat cu acid tiomalic prin reacția de tip adiție tiol-enă, completat în final, de concluzii parțiale.

Capitolul 7, raportează rezultatele originale obținute referitoare la prepararea sistemelor micro/nanoparticulate pe bază de chitosan grefat cu metacrilat de poli(etilenglicol) prin tehnica de dublă reticulare în emulsie inversă; fiind încheiat de concluzii parțiale.

Capitolul 8, raportează rezultatele proprii originale obținute la prepararea micro/nanoparticulelor pe bază de chitosan grefat cu metil eter acrilat de poli(etilen glicol) prin dublă reticulare în emulsie inversă; fiind încheiat de concluzii parțiale.

Lucrarea de doctorat este completată în final, de concluzii generale și de anexe privind modul de valorificarea rezultatelor.

Teza este desfășurată pe 313 pagini, conține 139 figuri, 53 tabele și 431 referințe bibliografice.

PARTEA II. REZULTATE ORIGINALE

Obiectivele lucrării

Obiectivul general al tezei de doctorat îl constituie *obținerea și caracterizarea unor noi* sisteme polimere sub formă de geluri pe bază de poliglobalidă și sub formă de micro/nanoparticule pe bază de dervați de chitosan pentru transportul și eliberarea controlată a medicamentelor pentru o gamă variată de aplicații biomedicale, precum și al unor afecțiuni ale segmentului posterior al ochiului. Pentru îndeplinirea obiectivului principal s-a impus realizarea unor obiective specifice, astfel:

- Obținerea și caracterizarea fizico-chimică a unui nou tip de geluri pe bază de poliglobalidă și poli(etilen glicol) cu funcție de tip tiol terminală, prin reacția de adiție tiol-enă fotoinițiată, în scopul realizării unui transport activ al medicamentelor;
- Prepararea, obținerea şi caracterizarea fizico-chimică a unui nou tip de micro/nanoparticule pe bază de chitosan grefat cu poli(etilen glicol) metacrilat prin procedeul emulsiei inverse cu dublă reticulare, pentru includerea, transportul şi eliberarea unor medicamente destinate tratamentul afecțiunilor segmentului posterior al ochiului;
- Prepararea, obținerea și caracterizarea fizico-chimică a unor noi micro/nanoparticule polimere pe baza derivatului de chitosan grefat cu poli(etilen glicol) metil eter acrilat, prin emulsie inversă cu dublă reticulare, pentru transportul activ al medicamentelor destinate tratamentul afecțiunilor segmentului posterior al ochiului;

Capitolul 5. Materiale, tehnici experimentale și de caracterizare

Capitolul are ca scop discuția și prezentarea materialele utilizate, tehnicile experimentale și metodele de caracterizare utilizate în vederea *obținerii și caracterizării unor* noi sisteme polimere sub formă de geluri pe bază de poliglobalidă și sub formă de micro/nanoparticule pe bază de dervați de chitosan originale pentru transportul și eliberarea controlată de principii active pentru o gamă variată de aplicații biomedicale.

5.2.1. Sinteza poliglobalidei (PGL)

Procedeul de sinteza utilizat în obținerea poliglobalidei a avut la bază polimerizarea prin deschidere de ciclu pe cale enzimatică a monomerului de globalidă polimerul fiind preparat conform unui protocol raportat anterior [358], [261], [362].

Astfel, 5,0 g (21 mmol) globalidă împreună cu 0,11 g enzimă (Lipază) au fost adăugate într-un balon cu fund rotund de 25 ml, purjat cu argon timp de 10 minute. Apoi, balonul a fost imersat într-o baie de ulei încălzită în prealabil la 60⁰ C, timp de 4 ore. După scurgerea timpului menționat vâscozitatea amestecului de reacție a crescut, confirmând finalizarea reacției. Tetrahidrofuran a fost adăugat peste amestecul de reacție în vederea solubilizării polimerului și stopării activității enzimei. După îndepărtarea enzimei prin centrifugare, soluția de polimer a fost precipitată și spalată repetat în metanol rece. Polimerul obținut a fost separat prin centrifugare și uscat la temperatura camerei în vid, până la atingerea unei greutăți constante. Randamentul final al reacției a fost de 74 %.

5.2.2. Sinteza copolimerului poli(etilenglicol-co-tiomaleat) (PEG-SH)

Copolimerul poli(etilen glicol-*co*-tiomaleat) a fost preparat conform unui protocol raportat anterior [370]. PEG-SH a fost sintetizat prin policondensare, în masă, în prezența catalizatorului Scandium trifluorometansulfonat, [Sc(OTf)₃], la temperatură moderată (100^{0} C) și presiune redusă. Pe scurt, 20 g (33 mmol) de poli(etilen glicol) diol; 5,0 g (33 mmol) acid tiomalic și 0,16 g (0,33 mmol) [Sc (OTf)₃], au fost adăugate întru-un balon cu fund rotund de 100 ml de tip Amber. Apoi, balonul a fost imersat într-o baie de ulei încălzită în prealabil la 80^{0} C, amestecul de reacție fiind menținut în atmosferă inertă de argon sub agitare energică timp de 30 minute până când acesta a devenit transparent. Reacția de policondensare a avut loc timp de 24 ore, la temperatura de 100^{0} C și la presiune redusă, după finalizarea reacției polimerul obținut a fost solubilizat în diclormetan. În final, volumul de reacție a fost precipitat în dietil eter rece, produsul solid fiind spălat în repetate rânduri cu dietil eter. Polimerul separat

a fost uscat timp de 48 ore sub vid până la pond constant. Randamentul final al reacției a fost de 85%.

5.2.3. Sinteza rețelelor polimerice pe bază de PGL și PEG-SH prin reacția de tip adiție tiol-enă

Retelele polimerice pe bază de poliglobalidă au fost preparate prin reacția de adiție tiolenă radicalică fotoinițiată dintre PGL și PEG-SH. Materiale pe bază de poliglobalidă cu diferite concentrații (5 %, 10%, 20 %) și rapoarte molare (SH/C=C) au fost preparate prin amestecarea a diferite cantități de polimeri (PEG-SH și PGL) într-un volum de 2,4 ml tetrahidrofuran, în sticluțe de sticlă cu capac. Ulterior, o cantitate calculată (tabel 6.6) de fotoinițiator 2,2dimetoxi-2-fenilacetofenonă (DMPA în funcție de cantitatea totală a amestecului de polimeri) a fost dizolvată în tetrahidrofuran și adăugată în soluția de polimeri, după care amestecul de reactie a fost omogenizat bine cu un Vortex. Concentratia fotoinitiatorului a fost mentinută la valoarea de 0,5 % masic fată de cantitatea totală de polimeri, pe tot parcursul studiului. Reacțiile de adiție tiol-enă au fost fotoinițiate de o lampă de mercur cu presiune medie Spectramat (Ivoclar AG, Liechtenstein, cu un filtru de sticlă $\lambda = 350-550$ nm) cu o intensitate a luminii de 65 mW·cm⁻². Intensitatea luminii din pozitia probei a fost măsurată cu un aparat Nova Meter Assy de la OPHIR (Israel). Reacția a avut loc prin expunere la lumină UV timp de 25 de minute. După scurgerea timpului mentionat s-au obtinut geluri transparente. În vederea stabilirii punctului de gelifiere, fiecare probă a fost expusă luminii UV, iar punctul de gelifiere a fost determinat visual conform metodei inversiei tubului, prin întoarcerea flacoanelor de sticlă cu capul în jos și observând modificarea vâzcozității soluției. Pentru înregistrarea timpului de gelifiere a fost folosite un cronometru.

Purificarea probelor a fost realizată în două etape și anume:

- în prima etapă probele au fost imersate în THF (20:1 vol/vol) și menținute sub agitare continuă timp de 24 ore, solventul fiind schimbat de două ori în această perioadă, ulterior acestea au fost uscate peste noapte sub vid la temperatura de 50^o C;
- a doua etapă de purificare a constat în spălarea cu apă a probelor (80:1 vol/vol) timp de
 7 zile, apa fiind schimbată la un interval 8 ore zilnic, iar în final probele fiind liofilizate.

Ulterior, etapei de purificare probele au fost luate în considerare pentru caracterizare: randamentul reacției, titrarea gupelor SH cu ajutorul tesutului Ellman's, FT-IR, analiza elementală a conținutului de sulf, morfologie – SEM, comportamentul la umflare, citotoxicitate și capacitate de includere și eliberare a principiilor biologic active.

5.2.4. Funcționalizarea chitosanului prin metoda de grefare cu metacrilat de poli(etilen glicol)

Funcționalizarea chitosanului cu metacrilat de poli(etilen glicol) (CS-g-PEG-MA) a fost realizată conform unui protocol raportat anterior de *Ma și colab*. Sinteza derivatului de chitosan avut la bază reacția de tip adiție Michael [384].

Pe scurt, 8,0 g chitosan a fost dizolvat într-un volum de 800 ml soluție de acid acetic 1% într-un balon de reacție cu fund rotund de 250 ml echipat cu un condensator de reflux. Balonul cu amestecul de reacție a fost imersat într-o baie de apă încălzită în prealabil la 40° C, amestecul de reacție a fost purjat cu azot și menținut sub agitare continuă timp de 60 de minute. Ulterior, s-a adăugat în picături 24 ml poli(etilen glicol) metacrilat, corespunzător unui raport molar final de NH₂/PEG = 1/2. Reacția de adiție Michael a decurs timp de 24 ore, sub agitare continuă la 60 ° C, sub atmosferă de azot. În final, soluția de polimer obținută a fost filtrată prin centrifugare, tranvazată la rotavapor, ulterior fiind precipitată în acetonă pentru a elimina urmele de apă, a concentra soluția de polimer, și pentru a elimina PEG-MA nereacționat. Polimerul astfel obținut, a fost purificat prin spălari repetate (2-3 ori) cu metanol și acetonă, eliminarea produșilor nedoriți fiind realizată prin centrifugare (5000 rpm, timp de 5 minute). Produsul final a fost uscat la etuva cu vid timp de 48 de ore, până la greutate constantă. S-a obținut un polimer de culoare maroniu deschis.

5.2.5. Funcționalizarea chitosanului prin metoda de grefare cu poli(etilen glicol) metil eter acrilat

Modificarea chimică a chitosanului de poli(etilen glicol) metil eter acrilat (CS-g-PEG-A) a fost realizată conform unui protocolul prezentat în studiul realizat de *Han și colab*. Sinteza derivatului de chitosan avut la bază reacția de tip adiție Michael [367].

Modul de lucru este următorul: 6,0 g chitosan de masă moleculară mică a fost dizolvat într-un volum de 300 ml soluție de acid acetic 1%, într-un balon de reacție cu fund rotund de 500 ml. Balonul cu amestecul de reacție a fost imersat într-o baie de apă încălzită în prealabil la 50° C, iar soluția de chitosan a fost purjată cu azot și menținută sub agitare continuă timp de 30 de minute. Ulterior, s-a adăugat în picături un volum adecvat de CS-*g*-PEG-A, corespunzător unor rapoarte molare finale de NH₂/PEG-A - 1/0,75; 1/1; 1/1,5; 1/4. Reacția a decurs timp de 48 ore, sub agitare continuă la 50° C, sub atmosferă de azot. După finalizarea reacției, pH-ul soluției de polimer obținută a fost adus la valoarea pH=8 cu o soluție saturată de NaHCO₃. Ulterior, soluția de polimer a fost precipitată în acetonă pentru a elimina urmele de apă, a concentra soluția de polimer, precum și pentru a elimina PEG-A nereacționat. Polimerul astfel obținut, a fost spălat de 2-3 ori cu acetonă, eliminarea produșilor nedoriți fiind realizată prin centrifugare (5000 rpm, timp de 5 minute). Produsul final a fost purificat prin dializă cu apă bidistilată timp de 3 zile pentru îndepărtarea PEG nereacționat. Polimerul a fost izolat prin liofilizare.

5.2.6. Prepararea micro/nanoparticulelor pe bază de CS-g-poli(etilen glicol) metacrilat / metil eter acrilat prin dublă reticulare în emulsie inversă

Prepararea MNP pe bază de (CS-g-PEG-MA sau CS-g-PEG-A) s-a realizat prin procedeul dublei reticulări (ionică și covalentă) într-un sistem de emulsie de tip apă în ulei (w/o) [70], [385], [386]. Această tehnică a fost selecționată în principal datorită necesității obținerii unui sistem cu o toxicitate redusă, condiție obligatorie având în vedere scopul final al micro/nanoaprticulelor și anume utilizarea în domeniul biomedical cu scopul tratării unor afecțiuni ale segmentului posterior al ochiului. Sistemul de emulsie tip apă în ulei este eterogen și a decurs prin realizarea fazelor componente ale emulsiei urmată de emulsionarea lor:

- faza apoasă, formată din soluția acidă de CS-g-PEG-MA sau CS-g-PEG-MA, filtrată prin centrifugare și apoi stabilizată prin intermediul surfactantului Tween 80.
- faza organică, reprezentată de un solvent (toluen) în care a fost adaugat un tensioactiv (Span 80), pentru a elimina riscul coalescenței particulelor.
- Emulsionarea celor două faze prin agitare energică (la ultraturax)

Caracteristicile fundamentale ale procedeului de dublă reticulare care au stat la baza selecției metodei sunt următoarele:

- reticularea ionică, acesta fiind majoritară (80 %), a grupelor aminice ale derivatului de chitosan, care pot fi cuaternizate în medii ușor acide facilitând reticularea cu polianioni (tripolifosfat) Na₅P₃O₁₀ sau ioni de sulfat Na₂SO₄, conducând la obținerea de micro/nanoparticule sferice în condiții de agitare la turații mari (15.000 rpm)
- reticularea covalentă realizată cu aldehidă glutarică, care are ca scop menținerea stabilității mecanice și dimensionale a rețelei interconectate/interpenetrate formate. Cantitatea mică de aldehidă glutarică pentru acest studiu a fost stabilită în așa fel încât aceasta să reacționeze cu 20 % din grupele aminice ale amestecului.

Procesul de obținere propriu-zis, a decurs astfel. Mai întâi s-a realizat prepararea fazei apoase formată din 50 ml soluție de CS-*g*-PEG-MA sau CS-*g*-PEG-A (de concentrații prestabilite), în acid acetic 1% în care a fost adaugată o cantitate necesară calculată de surfactant (Tween 80, 2 %). Soluția de polimer fost adăugată sub formă de picături cu ajutorul

unei seringi, în faza organică constituită din 200 mL toluen și o cantitate adecvată de surfactant Span 80 (2 %), sub agitarea constantă a ultraturaxului. După scurgerea timpului de stabilizare a emulsiei (15 minute) a fost picurată soluția de reticulant ionic (soluție de Na₅P₃O₁₀ sau Na₂SO₄, de concentrație 5%), emulsia fiind ulterior transvazată într-un reactor prevăzut cu agitator mecanic de tip ancoră (500 rpm) unde a continuat procesul de reticulare ionică. După un timp prestabilit, soluția de reticulant covalent, aldehidă glutarică (AG) extrasă în toluen (c = 1,12 mg/mL) a fost adăugată în picături în vasul de reacție pentru desăvârșirea procesului de reticulare. După definitivarea acestui proces, micro/nanoparticulele obținute au fost separate din emulsie prin centrifugare la 5000 rpm timp de 1 oră. Particulele decantate au fost supuse unei purificării prin spălarea în cicluri repetate cu apă bidistilată, acetonă și hexan pentru îndepărtarea surfactanților și a excesului de reticulanți. În final particulele obținute au fost uscate la temperatura camerei.

Capitolul 6. Rețele polimere pe bază de poliglobalidă obținute prin reacția de adiție de tip tiol-enă

Capitolul are ca scop prezentarea obținerii unor rețele polimere sub formă de geluri *originale* încărcate cu principii biologic active pentru o gamă variată de aplicații biomedicale. Sunt discutate în detaliu rezultatele experimentale obținute, tehnicile experimentale și metodele de caracterizare utilizate.

6.1.1.1. Sinteza și caracterizarea poliglobalidei (PGL)

Acest subcapitol raportează prepararea rețelelor de polimeri prin intermediul reacției de adiție tiol-enă fotoinițiată, prin cuplarea dintre un poliester cu funcții alchenice, cum este PGL, cu un polimer care prezintă pe capetele catenei funcții tiolice, cum este PEG-SH. Reacția de adiție tiol-enă decurge în soluție de THF, așa cum este prezentat în schema 6.3. În mod similar, ca și alți poliesteri constând din unități monomere cu lanț alifatic lung, PGL are o hidrofobie pronunțată, făcând-o mai puțin interactivă cu mediul hidrofil.



Schema 6.1. Sinteza poliglobalidei

Justificarea utilizării PGL are la bază ideea includerii sale într-o rețea polimerică împreună cu un polimer hidrofil, cum este PEG. Calea propusă pentru obținerea PGL este polimerizarea cu deschidere de ciclu catalizată enzimatic de lipază în masă (schema 6.1). Masa moleculară medie a fost calculată utilizând atât spectrul ¹H RMN (figura 6.4), cât și cel al analizei GPC (figura 6.1). Cele două rezultate (tabelul 6.1) au fost în concordanță ambele conducând la o valoare a masei moleculare (M_n) a PGL de aproximativ 6000 g/mol. Se impune a menționa că analiza cromatografică de permeație pe gel a indicat o polidispersitate ridicată, respectiv de 3,4. Acest rezultat era de așteptat datorită particularităților polimerizării în masă cu deschidere de ciclu, utilizată pentru preparare. Conversia monomerului a atins 74%, ceea ce reprezintă o valoare ușor mai mare decât cea descrisă în literatură pentru polimerizarea cu deschidere de ciclu enzimatică în soluție de toluen [253], [358].



Figura 6.1. Analiza GPC a poliglobalidei

Tabel 6.1. Caracteristicile moleculare ale PGL

Polimer	M _n , g/mol	M _w , g/mol	Ð	M _n - din ¹ H RMN
PGL	5600	18900	3.4	6350

De asemenea, caracterizarea structurală a PGL a fost efectuată și cu ajutorul spectroscopiei FT-IR însă, spectrele din păcate, nu au prezentat modificări chimice relevante, acestea prezentând profile similare, astfel încât majoritatea benzilor de absorbție se suprapun. Figura 6.2 ilustrează spectrele FT-IR ale monomerului inițial globalidă și polimerului sintetizat PGL.



Figura 6.2. Spectre FT-IR pentru globalidă și PGL

Spectrele ¹H-RMN înregistrate oferă însă informații utile cu privire la structura chimică a polimerului obținut. După cum putem observa din figura 6.3 semnalele caracteristice protonilor din PGL sunt prezentate și marcate. Calculul masei moleculare a polimerului format a fost efectuat pe baza semnalelor protonilor b și b' cu ecuația de mai jos:

$$Mn = (b/b') \cdot M_{GL}$$
 (6.1)

Rezultatul obținut constituie o dovada clară a faptului că procesul de polimerizare a avut loc obținându-se poliglobalida.



Figura 6.3. Spectrul RMN al PGL

6.1.1.2. Sinteza și caracterizarea copolimerului poli(etilenglicol-co-tiomaleat)

Copolimerul poli(etilenglicol-*co*-tiomaleat) PEG-SH (schema 6.2) a fost preparat printr-o reacție de policondensare similară metodei raportate de Zhu și *colab*. [370]. Masa moleculară a copolimerului fost determinată prin analiza GPC (Tabelul 6.4). Caracterizarea structurală a fost efectuată deasemenea prin FT-IR, Raman, RMN și MALDI MS.



Schema 6.2. Sinteza copolimerului poli(etilenglicol-co-tiomaleat)

Tabel 6.4. Caracteristicile moleculare ale PEG-SH

Polimer	M _n , g/mol	M _w , g/mol	Ð	M _n - from NMR
PEG-SH	2400	7800	3.3	-

Spectroscopia FT-IR și FT-Raman, au permis, obținerea unor informații cu privire la grupările funcționale ale PGL și PEG-SH. Figurile 6.5 și 6.6 ilustrează spectrele FT-IR și FT-Raman ale polimerului de plecare PEG și PEG-SH, respectiv PGL sintetizat. Prin urmare, spectrele înregistrate ne-au dezvăluit apariția unei benzi caracteristice gruparii esterice (C=O) la 1731 cm⁻¹, a celei duble (C=C) la 1673 cm⁻¹, respectiv semnalul benzii specifice grupării funcționale SH la 2570 cm⁻¹, restul semnalelor benzilor de absorbție prezintă profile similare, astfel încât majoritatea se suprapun.



Figura 6.5. Spectrul FT-IR a PEG-SH



Figura 6.6. Spectrul FT-Raman a PGLsi PEG-SH

Așa cum era de așteptat în cazul unui proces de policondensare, care implică de asemenea deja oligomeri ai PEG polidisperși, s-a reușit sintetizarea unui copolimer poli(etilenglicol-*co*-tiomaleat) care prezintă totuși o polidispersitate ridicată (3,3) și un grad de policondensare mediu de 3,25.

Caracterizarea copolimerului PEG-SH a fost realizată și cu ajutorul **spectroscopiei RMN**. Spectrul ¹H-RMN înregistrat pentru produsul obținut este evidențiat în figura 6.7. Legarea acidului tiomalic pe lanțurile de PEG este justificată de apariția peakurilor specifice de la 2,27 ppm care corespund grupărilor funcționale tiolice și sugerează că acestea au fost stabile în timpul procesului de policondensare. Totodată, spectrul a evidențiat și apariția unor peakuri specifice importante la 4,27 ppm care ne confirmă că PEG a fost esterificat prin TMA. În figura 6.7 sunt prezentate picurile specifice ale protonilor ai copolimerului PEG-SH. Rezultatul obținut constituie o dovada clară a faptului că polimerul a fost modificat.



Figura 6.7. Spectrul RMN al copolimerului PEG-SH

6.1.1.3. Prepararea rețelelor polimerice pe bază de PGL și PEG-SH prin reacția de tip adiție tiol-enă

Această parte a studiului se referă la prepararea și caracterizarea de noi rețele polimere pe bază de PGL și PEG-SH prin reacția de adiție radicalică tio-enă fotoinițiată. Literatura de specialitate menționează obținerea rețelelor reticulate pe bază de PGL utilizând compuși bifuncționali tiolici cu mase moleculare mici sau oligomeri bis-tiofuncționali de PEG [261].

Originaliatatea studiului constă în adiția de tip tiol-enă polimer-polimer realizată prin mecanism radicalic folosind fotoinitiatori, în soluție de THF. Materialele polimere pe bază de PGL au fost sintetizate cu ajutorul reacției tiol-enă indusă de UV între cei doi polimeri sintetizați și anume, PGL și PEG-SH, la temperatura camerei. Reacția radicalică tiol-enă polimer-polimer care a stat la baza formării rețelelelor polimere pe bază de PGL este prezentată schematic în schema 6.3.



Schema 6.3. Reprezentarea schematică a sintezei gelurilor prin reacția radicalică tiol-enă

Pentru stabilirea parametrilor optimi de obținere a gelurilor polimerice s-a studiat influența parametrilor reacției de reticulare prin adiția tiol-enă fotoințiată asupra structurii finale și a proprietăților acestora (morfologie, grad de umflare, fracție de gel recuperată a materialelor obținute). Protocolul experimental și parametrii variați pentru prepararea probelor sunt iluistrați în tabelul 6.6.

Codul probei	Concentrația totală a polimerilor, % (w/v)	Raportul molar SH/C=C	Fractia de gel după purificarea cu THF, %	Fracția de gel după purificarea cu apă, %
G1	5	1:1	39	36
G2	10	1:1	34	33
G3	20	1:1	43	42
G4	5	1:2	25	24
G5	10	1:2	50	44
G6	20	1:2	58	50
G7	5	1:3	41	34
G8	10	1:3	50	47
G9	20	1:3	61	58
G10	5	1:4	45	42
G11	10	1:4	53	50
G12	20	1:4	60	57
G13	5	2:1	37	24
G14	10	2:1	43	40
G15	20	2:1	46	43
G16	5	3:1	36	34
G17	10	3:1	33	31
G18	20	3:1	41	39

 Tabel 6.6. Parametrii inițiali pentru sinteza gelurilor și rezultatele analizei fracției de gel recuperată

Fotoinitiatorul selectat 2,2-dimetoxi-2-fenilacetofenonă (DMPA) a fost utilizat pentru a iniția această reacție datorită eficienței sale ridicate pentru generarea de radicali reactivi [400]. O primă observație importantă necesară de menționat este aceea că, atunci când DMPA nu a participat la reacție, procesul de gelifiere nu a avut loc. De asemenea, fiecare polimer a fost testat separat în condiții de iradiere similare, cu și fără DMPA, și nu a fost observată nici în aceste cazuri producerea gelifierii.

Pentru a evidenția eficiența DMPA pentru sistemul studiat, mai întâi, a fost determinat punctul de gelifiere pentru rețele cu diferite rapoarte molare ale grupelor funcționale (SH/C=C), concentrații DMPA, precum și două volume de reacție semnificativ diferite, prin metoda inversiei tubului. Rezultatele obținute (tabelul 6.7) au evidențiat valori ale timpului de gelifiere în intervalul de timp 90 - 240 secunde, atunci când concentrația DMPA a fost de 1%, în raport cu cantitatea totală de polimeri și volumul scăzut de reacție (300 µl). Totodată, a fost observat și faptul că timpul de gelifiere a crescut de 5-10 ori mai mult atunci când volumul de reacție a fost crescut la 2,6 ml.

	Timp de gelifiere, secunde					
	Volum de reacție					
	scăzut Volum de reacție ridicat					
	(300 µL)		(2.6 mI	Ĺ)		
Raport		2,2-dimetoxi-2-	fenilacetofeno	onă		
molar	1%	1%	0.75%	0.5%	0.25%	
SH/C=C	în raport cu cantitatea totală de polimeri					
1/1	150	<u>-</u>				
1/2	210	_				
1/3	240	_				
1/4	240	_				
2/1	90	_				
3/1	150	1200	1320	1500	3000÷∞	

 Tabel 6.7. Influența concentrației fotoinițiatorului și a volumului de reacție asupra timpului de gelifiere

Experimentele testului de inversie a tubului au condus la rezultate interesante, demonstrând că, un procent masic de 0,5 % al DMPA a condus la o gelifiere relativ rapidă, menținând în același timp și o bună stabilitate a structurii de gel. Prin urmare, pentru toate studiile ulterioare, sistemele pe bază de PGL au fost preparate în prezența a 0,5% DMPA.

Astfel, au fost preparate o serie de probe, având concentrații inițiale de polimeri și rapoarte molare (SH/C=C) diferite în THF (tabelul 6.6). Toate reacțiile au condus la formarea de geluri lipicioase și transparente în stare umflată (figura 6.9 c). Toate probele de geluri, totuși, treptat și-au pierdut transparența și au devenit albe în contact cu mediul de apos în timpul celei de-a doua etapă de purificare (figura 6.9 d).



Figura 6.9. Fotografii cu privire la sinteza gelurilor înainte și după purificarea lor în THF și apă

După cele două etape de purificare, s-a observat că există o dependență între valorile obținute pentru fracțiile de gel recuperate și concentrația totală a polimerilor, cât și raportul

molar inițial (SH/C=C, tabelul 6.6). În timpul etapei de purificare a gelurilor cu THF toți produșii de reacție nereacționați, PGL precum și PEG-SH, teoretic sunt eliminați, însă rezultatele obținute în ceea ce privește procentul de gel recuperat evidențiază doar o ușoară scădere a acestuia după purificarea ulterioară a gelurilor în apă, cauza firescă fiind probabil îndepărtarea unor urme de solvent (THF) sau PEG nereacționat.

6.1.1.3.1. Caracterizarea structurală a rețelelor prin FT-Raman

Pentru a înțelege mai bine mecanismul de formare a rețelei, prezența (sau absența) grupărilor funcționale tiol sau alchenă, gelurile au fost mai întâi investigate cu ajutorul spectroscopiei Raman (figura 6.11). Spectrele au evidențiat semnale ale vibrațiilor de întindere specifice legăturii duble (C=C) la 1673 cm⁻¹, reprezentând legăturile duble nereacționate ale PGL și semnale ale vibrațiilor de întindere specifice grupării tiolice (SH) la 2570 cm⁻¹, reprezentând grupe tiol nereacționate. Se constată că semnalul benzii de întindere a grupării SH se estompează în mod clar odată cu scăderea raporturilor inițiale SH/C=C, adică cu creșterea conținutului de PGL în amestecul de reacție inițial. În plus, nici excesul de grupări tiol din amestecurile inițiale nu a condus la conversia completă a legăturilor duble. Analiza Raman a raporturilor relative dintre benzile care corespund grupelor tiol și celor alchenice a confirmat calitativ o anumită tendință a interacțiunilor tiol-enă cu formarea legăturilor C-S-C între lanțurile macromoleculare ale PGL și PEG-SH. Adiția tiol-enă poate fi confirmată și de prezența semnalului slab al benzii de la 1001 cm⁻¹ care corespunde legăturilor C-S-C.



Figura 6.11. Analiza FT-Raman a gelurilor cu diferite rapoarte molare SH/C = C

6.1.1.3.4. Studii reologice

S-a utilizat în continuare foto-reologia pentru a monitoriza evoluția *in situ* a proprietăților reologice dinamice ale gelurilor care se formează prin adiția tiol-enă fotoindusă utilizând cantități de 250 μ L de soluție THF conținând amestecuri de polimeri compuși din PEG-SH și PGL cu concentrații diferite de polimeri (5%, 10%, 20%, 40%) și fotoinitiator DMPA în cantități calculate în funcție de cantitatea de polimeri. Figura 6.15 prezintă profilul reologic *in-situ* realizat în timpul adiției tiol-enă a amestecurilor de soluții polimerice cu concentrații diferite de polimeri 2/3 (SH/C= C).



Figura 6.15. Dependența modulului de stocare G'(simboluri pline) și a modulului de pierdere G" (simboluri goale) în timp, pentru diferite concentrații \Box 5%, \triangle 10%, \diamond 20%, \bigcirc 40 % și raport molar de 1/3 (SH/C=C)

Aşa cum se poate observa din figura 6.15, la începutul procesului de gelifiere modulul de pierdere G " a prezentat valori mai mari decât ale modulului de stocare G ' fapt ce ne-a indicat un comportament de curgere lichid al amestecului de polimer. Totuși, odată cu creșterea timpului, modulul de stocare G ' a început să crească rapid, mai târziu depășindu-l pe cel de pierdere G ". Punctul de intersecție a modulelor vâscoelastice, reprezentat de linii verticale punctate în interiorul casetei din figura 6.15, indică începerea procesului de gelifiere (apariția de structuri reticulate). Pentru toate probele, procesul de gelifiere a fost finalizat complet după 25 de minute, când ambele module vâscoelastice au devenit aproape independente în timp sau au atins cel puțin 90% din valoarea lor maximă. Procesele de gelifiere, precum și cinetica de gelifiere, au fost puțin diferite în momentul în care concentrațiile de polimeri (5%, 10%, 20%, 40%) din amestecurile de polimeri au fost variate. Se poate observa, că datorită concentrației scăzute de polimer, reacția de reticulare a început după 4 minute la concentrația polimerilor de

5%. Cu toate acestea, odată cu creșterea concentrației de polimeri la 10%, timpul de gelifiere a scăzut sub 1 minut, iar mai apoi a crescut ușor, odată cu creșterea concentrației de polimeri în amestec. Creșterea ușoară la 1,2-minute sau 1,8-minute pentru concentrația de 20% și, respectiv, 40% este probabil legată de posibilitatea scăderii gradului de reticulare datorită constrângerilor crescute ale mobilității lanțurilor de polimeri, chiar dacă concentrația polimerilor a crescut. Pe baza rezultatelor obținute cu ajutorul analizei foto-reoligice putem afirma că un rol important în tăria structurală a gelurilor este jucat de concentrația totală a amestecului de polimeri.

6.1.1.3.5. Caracterizarea prin microscopie SEM

Caracteristicile mofologice ale gelurilor polimerice liofilizate au fost analizate cu ajutorul tehnicii de SEM. Gelurile preparate au fost analizate în secțiune transversală urmărind a stabili influența raportului molar SH/C=C și a concentrației totale inițiale de polimeri asupra morfologiei materialelor.

Pentru început a fost evaluată morfologia secțiunii transversale a probelor de geluri cu un raport molar SH/C=C diferit (figura 6.16).

Se poate observa că probele de geluri preparate cu exces de PEG-SH (figura 6.16 A-C) prezintă o structură macroporoasă cu pori interconectați, având dimensiunea cuprinsă între 10 și 40 µm. Structura poroasă este omogenă, dar poate fi observată și o regiune mică mai puțin poroasă. Apariția structurilor poroase este probabil legată de condițiile specifice de adiție a grupării tiolice, în particular, a conținutului ridicat de PEG-SH în rețea. Creșterea cantității de PGL în raport echimolar SH/C=C a condus la o scădere a preponderenței regiunilor poroase din geluri (figura 6.16 D-F). Astfel, în cazul raportului molar de 1/1 (SH/C=C) a fost observată apariția unor pori mari cu dimensiuni și forme neregulate. De asemenea, gelurile obținute la un raport molar de 1/4 (SH/C=C), având exces de PGL nu au prezentat morfologie poroasă, porii nemaifiind prezenți (figura 6.16 G-I).



Figura 6.16. Imaginile SEM - secțiune transversală a probelor preparate folosind rapoarte molare diferite (SH/C=C) (A, B, C - 3/1, D, E, F - 1/1 și G, H, I - 1/4) și concentrația totală de polimeri de 20 % prezentate la diferite mărimi (mărire grafică: A, D, G - 1 mm, B, E, H -0,5 mm și C, F, I - 0,05 mm).

După cum se poate observa din figura 6.17 morfologia gelurilor obținute la un raport molar de 3/1 (SH/C=C) este poroasă cu dimensiuni și forme de pori destul de regulate pentru fiecare concentrație. Materialele obținute la concentrații mai mici prezintă o dimensiune mai mare a porilor, adică aproximativ 30, 60 și 150 µm pentru gelurile obținute la concentrația totală inițială a polimerilor de 20, 10 și respectiv 5%. Așadar, mărimea porilor poate fi controlată utilizând concentrații de polimeri diferite.



Figura 6.17. Imagini SEM - secțiune transversală a probelor preparate folosind raportul molar de 3/1 (SH/C=C) și concentrații totale de polimeri diferite A,B - 20 %, C,D - 10 % and E,F - 5 %) prezentate la diverse marimi (mărire grafică: A,C,E - 0.5 mm, B, D, F - 0.3 mm)

Observarea structurii poroase susține ipoteza noastră conform căreia o anumită fază polimerică reticulată este formată în timpul procesului de adiție tiol-enă, împiedicând conversia mai mare a grupărilor tiol. O astfel de separare a fazei polimerice conduce la captarea locală a speciilor reactive și la consum, în timp ce lanțurile libere de polimeri din soluția THF nu vor fi reticulate prin adiția tiol-ene.

6.1.1.3.6. Analiza comportamentului la umflare

Materialele au fost preparate prin reticularea unui polimer hidrofil cu unul hidrofob. Prin urmare, ar fi de așteptat ca acestea să posede capacitate de a se umfla atât în medii hidrofile sau hidrofobe, capacitate care le-ar include în categoria conectorilor amfifili [403]. Comportamentele de umflare ale probelor realizate au fost studiate prin metoda gravimetrică în apă și THF prin măsurarea cantității de lichid absorbit la intervale de timp prestabilite, până la atingerea echilibrului umflării.

Toate gelurile preparate au avut o absorbție destul de scăzută a apei, cuprinsă în intervalul de 20% până la 70% (figura 6.18). Acest comportament era de așteptat să depindă de conținutul PEG-SH, polimerul hidrofil prezent în amestecul de reacție, însă cel mai bun raport de umflare în apă a fost obținut pentru probele obținute la un conținut ridicat de PEG-SH și la o concentrație inițială totală de polimeri de 20%. Cu toate acestea, dată fiind prezența PGL (polimer hidrofob) ca parte a rețelei, interacțiunea observată cu apa este o caracteristică remarcabilă.



Figura 6.18. Gradul de umflare a gelurilor în apă

Spre deosebire de comportamentul gelurilor în apă, au fost observate proprietăți foarte bune de umflare în THF, gradul de umflare a gelurilor fiind cuprins în intervalul 400-1000% (figura 6.19). Gradul de umflare a gelurilor în THF a arătat o dependență atât de raportul molar SH/C=C, cât și de concentrația inițială totală a polimerilor. Astfel, spre deosebire de apa care probabil penetrează rețeaua gelurilor numai în apropierea fazelor de PEG-SH accesibile sau sunt slab reticulate, THF-ul interacționează bine cu toate componentele rețelei, argumentând astfel natura sa hidrofobă.



Figura 6.19. Gradul de umflare a gelurilor în THF

6.1.1.3.7. Citotoxicitate

Posibilitatea utilizării materialelor pe bază de PGL pentru aplicații biomedicale a fost deasemenea investigată. În acest sens, a fost evaluată citotoxicitatea pe baza normei ISO 10993-12 a polimerilor sintetizați și utilizați la prepararea gelurilor, precum și a extractelor de gel. După cum ne așteptam, PEG-SH este un polimer puternic biocompatibil și viabilitatea celulară a fibroblastelor 3T3 tratate cu concentrații de până la 10 mg/ml a fost comparabilă cu viabilitatea celulelor martor netratate (Figura 6.22 A).



Figura 6.22. Citotoxicitatea polimerilor, utilizați la prepararea gelurilor, la 3T3 fibroblaste: A) PEG-SH, B) Extracte obținute pe bază de cantități diferite de PGL, C) PGL. Linia punctată reprezintă viabilitatea celulelor de control netratate care a fost considerată a fi de 100%. Semnificația diferențelor la nivel diferit este indicată de asteriscuri: * P > 0.05, şi respectiv *** P > 0.001.

De asemenea, PGL a fost evaluat din punct de vedere al citotoxicității. Deoarece polimerul PGL este insolubil în apă, extractul de pulbere a fost utilizat pentru evaluarea citotoxicității. În

studiul lui van der Meulen *et al.* [358] viabilitatea fibroblastelor 3T3 a scăzut cu mai mult de 1/3 în comparație cu celulele martor, dacă au fost incubate cu extracte din 0,1 g/ml de PGL.

S-au utilizat extracte din 0,2 g/ml de PGL și diluții corespunzătoare în conformitate cu ISO10993-12 (figura 6.22 B). După cum observăm din figură, extractele de 0,2 g/ml sunt deja foarte citotoxice pentru fibroblastele 3T3. Extractele de 0,1 g/ml au scăzut viabilitatea celulelor până la cca. 50%, ușor mai redus ca în studiul lui *van der Meulen et al.* [358], corespunzând astfel concentrației de inhibitorii (IC50). În plus, a fost testată și viabilitatea celulară atunci când pulberea PGL a fost adăugată direct în mediul de cultură (figura 6.25 C). La o concentrație de 10 mg/ml, viabilitatea celulelor a scăzut la aproximativ 90% corespunzând citotoxicității extractelor de aceeași concentrație.

A fost evaluată citotoxicitatea a trei probe de geluri cu rapoarte molare (SH/C=C) diferite (figura 6.23). Toate probele testate sunt considerate biocompatibile până la o concentrație de 50 mg/ml de conținut de gel solid în extracte, rezultând o viabilitate celulară mai mare de 80%. Scăderea viabilității celulelor la ~ 80% la un nivel semnificativ statistic (P > 0,001) este valabilă pentru extractele de geluri cu rapoarte molare (SH/C=C) de 1/2 și 1/1.



Figura 6.23. Citotoxicitatea extractelor de geluri pentru fibroblastele 3T3 de șoarece. Diferențele statistice semnificative sunt indicate prin asteriscuri: * P> 0,05, ** P> 0,01 si *** P> 0,001

6.1.1.3.8. Capacitatea de includere și eliberare a principiilor active

Potențialul utilizării materialelor pe bază de PGL pentru transportul de medicamente, de asemenea a fost studiat. Caracteristicile de încărcare și de eliberare a medicamentelor din materialele pe bază de PGL au fost examinate utilizând Levofloxacin (LEV), ca model de medicament. A fost investigată influența raportului molar (SH/C=C) și a concentrației inițiale totale de polimeri a gelurilor obținute asupra capacității de încărcare a medicamentului. Astfel, probe diferite au fost încărcate cu LEV din mediu de THF și, apoi, LEV eliberat într-o soluție de acetat buffer ABS (pH = 5,5) a fost monitorizat și măsurat.

Cantitatea de LEV încărcată după 48 de ore a variat între 0,32 și 0,41 mg LEV/mg gel (tabelul 6.10), însă nu a fost observată nici o diferență semnificativă în ceea ce privește influența concentrației inințială totală de polimeri sau a raportului molar (SH/C=C). Pentru a evalua eliberarea LEV, gelurile încărcate cu LEV au fost spălate cu apă pentru a înlătura THFul, uscate la etuva de vid, respectiv liofilizate înainte de a fi adăugate în mediul de eliberare. Datele cinetice din figura 6.24 sunt prezentate ca un exemplu pentru probele G3, G12 și G18. Datele experimentale obținute pentru cinetica de eliberare a LEV au evidențiat o fază rapidă care este atinsă în primele 10 ore de eliberare, urmată de o fază mai lentă (caracterizată printro eliberare constantă) până la 48 de ore.

Eliberarea susținută a LEV poate fi explicată prin faptul că medicamentul eliberat a fost absorbit în intimitatea gelului datorită umflării excelente în THF. Prin analiza influenței parametrilor de preparare asupra capacității de eliberare a gelurilor, s-a observat un comportament similar cu cel al încărcării medicamentului. Cantitatea maximă eliberată de LEV a variat între 0,22 și 0,38 mg/mg gel și nu a fost observată o diferență semnificativă între probele analizate.



Figura 6.24. a) Incărcare LEV; b) Eliberare LEV in vitro pentru probele G3,G12,G18

De asemenea, eficiența eliberării LEV pentru probele analizate au evidențiat valori cuprinse între 66 și 100% (figura 6.25), cea mai mare eficiență fiind observată pentru proba G17 și G18 care s-a dovedit a fi poroasă și care prezintă, de asemenea, o absorbție de apă ridicată. Analiza cineticii de eliberare a fost realizată pe baza modelului matematic Korsmeyer-Peppas (figura 6.26) [171].
Prelucrarea rezultatelor obținute în urma analizei cineticii experimentale pe intervalul 0 - 360 minute a permis calculul exponentului difuzional ca fiind n = 0.4811, R²=0,953. Aceasta valoare (0.5 < n < 1.0) sugerează o difuzie Fickiană, procesul de transport/eliberare al medicamentului prin matricea polimeră fiind guvernat de difuzie [171], [172], [173].



Figura 6.25. Eficiența de eliberare a LEV pentru probele G3,G12,G18



Figura 6.26. Aplicarea modelului Korsmeyer-Peppas pentru evaluarea cineticii de eliberare specifică a probei de gel G3

Capitolul 7. Sisteme micro/nanoparticulate polimer-medicament pe bază de chitosan grefat cu poli(etilen glicol) metacrilat

Capitolul are ca scop prezentarea obținerii unor sisteme polimer-medicament sub formă de micro/nanoparticule *originale* încărcate cu principii biologic active pentru tratarea unor afecțiuni ale polului posterior al ochiului. Sunt discutate în detaliu rezultatele experimentale obținute, tehnicile experimentale și metodele de caracterizare utilizate.

7.1.1. Sinteza și caracterizarea chitosanului grefat cu metacrilat de poli(etilen glicol)

Acest subcapitol raportează funcționalizarea chitosanului cu metacrilat de poli(etilen glicol) realizată conform protocolului descris detaliat în **subcapitolul 5.2.4.** Calea propusă pentru a sintetiza derivatul de CS avut la bază reacția de tip adiție Michael raportată anterior de *Ma și colab.* [384]. Reacția de funcționalizare este prezentată în schema 7.1. Justificarea utilizării CS are la bază ideea introducerii unor proprietăți noi polimerului, respectiv sistemelor de micro/nanoparticule obținute. În special, s-a dorit îmbunătățirea solubilității CS în medii apoase prin modificarea chimică a grupărilor aminice de pe catena liniară a CS prin intermediul segmentelor de PEG-MA hidrofile.



Schema 7.1. Reacția de functionalizare a chitosanului cu poli(etilen glicol) metacrilat

O primă caracterizare structurală a derivatului de CS obținut a constituit-o spectroscopia FT-IR. Spectrele FT-IR ale CS, PEG-MA, PEG-MA-g-CS sunt prezentate în figura 7.2 . Spectrul FT-IR al CS s-a evidențiat un la 3365 cm⁻¹ o bandă de absorbție puternică corespunzătoare vibrației axiale de întindere a grupărilor -OH suprapusă cu banda de întindere -NH₂ și legăturilor inter- și extra-moleculare de hidrogen ale moleculelor CS, care a scăzut în cazul derivatului de CS. Benzile de absorbție de la 1653, 1423 și 1379 cm⁻¹ sunt corespunzătoare unităților NHAc, amidei I, deformării -NH₂ și amidei III [405]. Vibrațiile de întindere caracteristice ale -C-O-C și ale structurii de polizaharidă a CS le regăsim la 1076 cm⁻¹ [406]. Semnalul proeminent al benzii de absorbție de la 1716 cm⁻¹ corespunde vibrațiilor dublei legături ale PEG-MA. Funcționalizarea chitosanului cu PEG-MA este confirmată de

apariția a două noi benzi de absorbție. Primul semnal nou care confirmă prezența PEG-MA în structura derivatului de CS se evidențiază la 1732 cm⁻¹ și este atribuit benzii de absorbție al legăturilor duble C=O din gruparea esterică -OCOR. Al doilea semnal nou a apărut la 1649 cm⁻¹ și este caracteristic nucleului glicozidic al chitosanului.



Figura 7.2. Spectrele FT-IR comparative ale CS, PEG-MA, CS-g-PEGMA

Caracterizarea structurală a CS-g-PEG-MA prin spectroscopia **RMN** a evidențiat faptul că spectrul înregistrat conține semnale ce provin din ambele structuri ale produșilor inițiali. Adiția PEG-MA la catena principală a CS este confirmată de dispariția peakurilor de la 5,6 și 6,0 ppm corespunzătoare protonilor dublei legături (CH₂ = CH) din PEG-MA. În spectrul CSg-PEG-MA se observă apariția picului de la 1,994 ppm corespunzător legăturii (-NH-CH₂-), apărute în urma grefării CS cu PEG-MA. Gradul de substituție obținut a fost de 11,2 % fiind suficient de ridicat, având în vedere intenția de a prepara micro/nanoparticule.



Figura 7.3. Spectrul ¹H RMN al a) chitosanului; b) PEG-MA; c) CS-g-PEG-MA

7.1.2. Prepararea micro/nanoparticulelor pe bază de CS-g-poli(etilen glicol) metacrilat prin dublă reticulare în emulsie inversă

Această parte a studiului se referă la prepararea și caracterizarea de noi micro/nanoaprticule (MNP) pe bază de chitosan funcționalizat cu poli(etilen glicol) metacrilat (CS-g-PEG-MA).

Prepararea MNP pe bază de CS-g-PEG-MA s-a realizat prin procedeul dublei reticulări (ionică și covalentă) într-un sistem de emulsie de tip apă în ulei (w/o) [70], [385], [386], justificarea selecției acestei tehnici a fost în principal datorită necesității obținerii unui sistem cu o toxicitate redusă, condiție obligatorie având în vedere scopul final al MNP și anume utilizarea în domeniul biomedical cu scopul tratării unor afecțiuni ale segmentului posterior al ochiului. Modul de lucru utilizat este descris detaliat în subcapitolul 5.2.6. Planul experimental cu parametrii observați pentru pregătirea MNP este prezentat în tabelul 7.3, respectiv 7.4.

 Tabel 7.3. Planul experimental pentru sinteza micro/nanoparticulelor de CS-g-PEG

 MA reticulate ionic cu tripolifosfat de sodiu.

	Conc.		Raport	Raport			Timp de		
	soluției		molar	molar			retic.	Timp de	
	de	Rap.	NH3+/	NH3+/			Ionică,	retic.	Diam.
Cod	polimer,	faze	$Na_5P_3O_{10}$,	$C_5H_8O_2$,	Tensioactivi	Viteză,	min	Covalentă	mediu,
probă	%	W/O	moli	moli	, %	rpm		, min	μm
MA-1	0.5					5.000	10		-
MA-2	0.5					5.000	30		-
MA-3	0.5					5.000	120		-
MA-4	0.5		1:1			5.000	150		-
MA-5	0.5					5.000			3.0
MA-6	0.5					9.000			2.9
MA-7	0.5					12.000			1.3
MA-8	0.5					15.000			0,5
MA-9	0.35		1:2			15.000			0,5
MA-10	0.5]	1:3			15.000			0,8
MA-11	0.75	1:4	1:2	1:1	2	15.000	60	60	1,1

Tabel 7.4. Variația parametrilor pentru sinteza micro/nanoparticulelor de CS-g-PEG-MA reticulate ionic cu sulfat de sodiu

	Conc.		Raport	Raport					
	soluției		molar	molar			Timp de		
	de	Rap.	NH3 ⁺ /	NH3 ⁺ /			retic. cu	Timp de	Diam.
Cod	polimer,	faze	Na ₂ SO ₄ ,	$C_5H_8O_2$,	Tensioactivi,	Viteză,	Na ₂ SO ₄ ,	retic. cu	mediu,
probă	%	W/O	moli	moli	%	rpm	min	AG, min	μm
MA-A	0.5					5.000	10		-
MA-B	0.5					5.000	30		-
MA-C	0.5					5.000	120		-
MA-D	0.5		1:1			5.000	150		-
MA-E	0.5					5.000			4,4
MA-F	0.5					9.000			2,6
MA-G	0.5					12.000			1,6
MA-H	0.5					15.000			1,5
MA-I	0.35		1:2			15.000			1,1
MA-J	0.5		1:3			15.000			1,3
MA-K	0.75	1:4	1:2	1:2	2	15.000	60	120	1,4

7.1.2.1. Caracterizarea structurală a nanoparticulelor prin Spectroscopia în Infraroșu cu Transformată Fourier

Spectroscopia FT-IR a MNP obținute a confirmat formarea rețelei polimere ca urmare dublei reticulări. Spectrele FT-IR au fost înregistrate pentru toate MNP obținute, acestea prezentând profil similar. După cum se poate observa din figura 7.6, spectrele celor două probe MA-8 și MA-H prezintă semnale caracteristice ale benzilor de absorbție a legăturilor corespunzătoare tipului de reticulant utilizat și confirmă formarea de legăturilor prin procesul de reticulare ionică între polianionii de tripolifosfat (891 cm⁻¹), respectiv anionii sulfat din Na₂SO₄ (636 cm⁻¹) și cationii de amoniu ai CS-*g*-PEG-MA precum și a legăturii iminice – C=N- prin procesul de reticulare covalentă între grupele aminice ale polimerilor și grupele carbonil ale aldehidei glutarice (1548 cm⁻¹) [409], [410], [411], [412], [413].



Figura 7.6. Spectrele FT-IR comparative ale CS-*g*-PEG-MA și micro/nanoparticulelor pe baza derivatului de chitosan

7.1.2.3. Caracterizare prin microscopia electronică de baleiaj SEM

O altă metodă importantă de caracterizare a MNP preparate este microscopia electronică de baleiaj, care evidențiază proprietățile morfologice și dimensionale ale particulelor. Având în vedere scopul final al particulelor și anume tratarea unor afecțiuni ale segmentului posterior, se impune ca acestea să prezinte dimensiuni submicronice, stabilitate și individualitate.

Imaginile SEM înregistrate (figura 7.9 și 7.10) evidențiază diferențe morfologice importante în funcție de parametrii variați în prepararea MNP. Prin urmare, pentru probele

MA-5÷8, respectiv MA-E÷H se constată astfel că diametrul particulelor este influențat considerabil de viteza de agitare, acesta scăzând odată cu creșterea intensității de agitare.

Pentru setul de probe MA-8, 9, 11, respectiv MA-H, I, K s-a observat că diametrul particulelor este influențat de concentrația soluției de polimer fiind mai mare în cazul probelor MA-11, respectiv MA-K, comportament raportat și în alte studii [70], [385].

După cum putem observa în cazul probelor MA-9 și I soluția de polimer fiind mai diluată forma particulelor este neregulată, fapt datorat unei reticulări mai slabe. Pentru probele MA-11 și K, creșterea concentrației soluției de polimer la 0,75 % a condus la o creștere a diametrului și a polidispersității particulelor, respectiv la o scădere a tendinței de aglomerare. În cazul particulelor MA-10 și J a fost modificat raportul polimer/reticulant ionic, fapt ce a determinat o creștere ușoară a diametrului particulelor, aspect pus pe seama creșterii densității de reticulare a matricii polimere.



Figura 7.9. Imagini SEM ale micro/nanoparticulelor optimizate reticulate ionic cu

TPP



Figura 7.10. Imagini SEM ale micro/nanoparticulelor optimizate reticulate ionic cu sulfat de sodiu

7.1.2.5. Comportamentul la umflare

O caracteristică foarte importantă a particulelor cu caracter de hidrogel o constituie capacitatea de umflare în apă, respectiv în medii fiziologice, de diferite valori ale pH-ului. În urma analizei gradului de umflare a MNP în mediu acid (acetat buffer pH=3,4) și mediu bazic (fosfat buffer , pH=7,4) după 24 ore s-au obținut rezultatele evidențiate în figurile 7.15 ; 7.16; 7.17:

- gradul de umflare al MNP reticulate cu TPP în mediu acid a avut valori cuprinse între 760% și 1100 %
- gradul de umflare al MNP reticulate cu TPP în mediu bazic a avut valori cuprinse între 582% și 674 %
- gradul de umflare al MNP reticulate cu sulfat de sodiu în mediu acid a avut valori cuprinse între 736 % și 980 %

 gradul de umflare al MNP reticulate cu sulfat de sodiu în mediu bazic a avut valori cuprinse între 461 % și 636 %

O primă constatare este aceea că pentru probele analizate valorile gradului maxim de umflare în tampon acetat ABS (pH= 3,3) sunt mai mari în comparație cu cele înregistrate în tampon fosfat (PBS, pH= 7,4). În acest caz, fiind în mediu acid, grupările aminice care nu au participat la reacțiile de reticulare devin protonate trecând în cationi amoniu, iar respingerile electrostatice care apar între macromolecule conduc la o creștere a spațiilor dintre ochiurile rețelei polimerice, deci la o retenție de apă mai mare, rezultând un grad de umflare mai ridicat. De asemenea valorile maxime ale gradului de umflare în mediu bazic sunt destul de mari.

După cum se poate observa din figura 7.16 influența vitezei de agitare și a concentrației soluției de polimer reiese clar și din rezultatele experimentale obținute în urma studiului gradului de umflare.

Creșterea concentrației soluției de polimer (figura 7.17) în ordinea MA-9, 8, 11, respectiv MA-I, H, K cu menținerea vitezei de turație constantă duce la modificări:

- deși pentru probele MA-9, respectiv MA-I a fost utilizată o concentrație a soluției de polimer mai scăzută (0,35 %), gradul de umflare este cel mai mare; reducerea cantității de polimer este corelată cu reducerea numărului de grupe aminice participante la cele două tipuri de reticulări, astfel densitatea de reticulare scăzând, însă trebuie menționat că valorile sunt apropiate de cele ale gradului maxim de umflare pentru probele MA-8, respectiv MA-H (c= 0,5 %);
- creșterea diametrului mediu al particulelor odată cu creșterea concentrației soluției de polimer a condus la o scădere a cantității de apă reținută și deci a gradului de umflare; valorile obținute pot fi puse pe baza tendinței mai mari de aglomerare a particulelor (și deci a unui grad de reticulare mai ridicat).

De asemenea, o scădere a gradului maxim de umflare odată cu creșterea cantității de TPP sau sulfat de sodiu în fapt a raportului molar TPP/grupe aminice sau sulfat de sodiu/grupe aminice a fost înregistrat și în cazul probelor MA-10 și MA-J, deci rezultatul este unul firesc datorită creșterii densității de reticulare.



Figura 7.16. Influența vitezei de agitare asupra gradului maxim de umflare al probelor MA-8 și H (15.000 rpm); 7 și G (12.000 rpm); 6 și F (9.000 rpm); 5 și E (5.000 rpm) în mediu acid



Figura 7.17. Influența concentrației de polimer asupra comportamentului la umflare al probelor MA-9 și I (0,35 %), 8 și H (0,5 %), 11 și K (0,75 %), în mediu acid (ABS)/bazic(PBS)

7.1.2.7. Evaluarea caracteristicilor de biomaterial

Având în vedere domeniul de aplicabilitate al nanoparticulelor (NP) obținute, se impune investigarea proprietăților acestora ca și biomaterial. Biocompatibilitatea este definită drept "*capacitatea unui material de produce un răspuns adecvat al gazdei într-o situație specifică*", ceea ce înseamnă că materialul utilizat trebuie să fie un produs sterilizabil, non-carcinogen, netoxic, compatibil cu sângele, impunându-se neafectarea tabloului sangvin, nemodificarea mecanismului de coagulare a sângelui, de asemenea materialul nu trebuie să provoace apariția fenomenului de respingere din partea organismului, a sedimentarii în țesuturi și a efectelor alergice, teratogene, toxice și cancerigene, [25], [416].

În următoarele subcapitole vor fi prezentate trei tipuri de teste toxicitate acută, citotoxicitatea pe celule de tip osteoblaste, respectiv hemocompatibilitate care dovedesc caracteristicile de biomaterial al nanoparticulelor.

7.1.2.7.1. Toxicitatea

In ceea ce privește sinteza NP, selecția polimerilor, a tipului de reticulanți și etapele de purificare au fost realizate cu strictețe pentru a exclude efectele toxice posibil date de acestea. NP au fost analizate în primul rând din punct de vedere al gradului de toxicitate. Ca model experimental s-au utilizat șoareci, care au fost monitorizați timp de 7 zile în ceea ce privește comportamentul acestora și efectele adverse. Analiza toxicității s-a efectuat prin metoda Spearman-Kărber. Pentru acest studiu a fost evaluată proba MA-8, toxicitatea fiind evaluată prin valoarea DL₅₀. Valoarea determinată pentru DL₅₀ a fost de 4922 mg/kg, ceea ce ne indică faptul că particulele sunt practic netoxice și pot fi utilizate în aplicații biomedicale.

7.1.2.7.2. Citotoxicitatea

Testul colorimetric de citotoxicitate, MTT a fost efectuat pe linii de culturi celulare de tip osteoblaste la intervale de 24, 48, respectiv 72 ore, fiind în concordanță cu rezultatele obținute prin testul DL50, respectiv probând încă o dată că particulele prezintă o toxicitate redusă. Se poate afirma că NP nu sunt citotoxice, datorită proliferării normale a celulelelor în prezența acestora, când se formează un monostrat celular dens după 5 zile de cultură. Observăm din figura 7.18 b, c, că viabilitatea celulară mărită în comparație cu proba martor este probată de evidența proliferarea a celulelelor (figura 7.18 a), fiind de 100 %.

Faptul că celulele au proliferat denotă că particulele supuse testului pe culturi de celulele nu sunt toxice.



Figua 7.18. Evaluarea morfologiei celulelor osteoblaste pentru 5 zile în prezența a 5 mg/ml de particule de CS-g-PEG-MA

7.1.2.7.3. Hemocompatibilitatea

Nanoparticulele obținute prin diferite metode, cu dimensiuni cuprinse între 200 si 400 nm sunt hemocompatibile pentru concentrații mai mici de 50 μ g/ml [418], [419]. Potențialul hemolitic al NP-CS-*g*-PEG-MA a fost evaluat și pentru concentrații cuprinse între 100 si 400 μ g/ml, cu ajutorul unei metode specrofotometrice. Rezultatele testelor de hemoliză sunt prezentate în figura 7.19 fiind exprimate ca media ± SD (n = 3).



Figura 7.19. Procentul de hemoliză după 2, 4 si 6 ore de expunere la NP

În conformitate cu studiile raportate dacă procentul hemolizei este mai mic decat 5% atunci proba analizată este considerată hemocompatibilă [420]. Pentru toate concentrațiile testate a fost obținut un procent al hemolizei mai mic de 5% (figura 7.19) ceea ce indică faptul că NP preparate sunt hemocompatibile și pot fi administrate intraocular/intravenos.

7.1.2.8. Capacitatea de includere a principiilor active

Luând în considerare scopul utilizării MNP ca posibil sistem de transport de medicamente pentru tratarea unor afecțiuni ale polului posterior al ochiului, a fost studiat potențialul acestora de încărcare/eliberare de medicamente. Selecția tipului de medicament a depins de caracterul de hidrogel al MNP, respectiv de principiul de difuzie pentru încapsulare/eliberare.

Un prim medicament utilizat pentru încărcarea MNP a fost levofloxacinul (LEV), antibiotic cu un spectru larg antibacterian, care face parte din clasa fluorochinolonelor fiind utilizat în principal pentru tratarea infecțiilor antibacteriene [428].

Un al doilea medicament utilizat a fost bevacizumabul (BEV), care este molecula "părinte" a ranibizumabului, un anticorp monoclonal care a fost autorizat în 2004 pentru tratamentul chimioterapic al cancerului colorectal metastatic [421], în 2006 pentru cancer pulmonar celular [422], iar în 2009 pentru glioblastomul multiform [423].

În ultimii ani, medicamentul a fost folosit cu succes și în oftalmologie, injecțiile intravenoase și intraoculare cu BEV au fost utilizate pentru tratamentul unei game variate de tulburări oculare, cum ar fi degenerescența maculară legată de vârstă (AMD); ocluzia venei retiniene centrale (CRVO) etc. [424], [425], [426], [427].

Procesul de încărcare/eliberare a medicamentului a fost realizat prin mecanismdifuzional. Cantitatea de LEV încărcată după 72 h a variat între 0,7 și 0,8 mg /mg particule pentru probele reticulate ionic cu TPP, respectiv 0,55 mg și 0,67 mg/mg particule în cazul probelor reticulate ionic cu Na₂SO₄, eficiența de încărcare prezentând valori ridicate. Diferențele valorilor cantităților de LEV incluse în ambele tipuri de sisteme sunt mai scăzute în cazul utilizării Na₂SO₄ ca reticulant, deci putem afirma natura reticulantului influențează procesul de încărcare a particulelor, o posibilă explicație fiind tendința de aglomerare, fapt datorat unei reticulări mai slabe. Datele experimentale obținute sunt în concordanță cu rezultatele obținute pentru gradul maxim de umflare discutate anterior, cantitățile de medicament variind în funcție de acesta.

În urma analizei morfologice și a acestor rezultate a fost selectată proba MA-8 pentru includerea bevacizumabului, cantitatea încapsulată în 30 mg probă fiind de 0,327 mg/mg particule BEV și o eficiență bună de 39 %. Cinetica procesulor de încărcare a medicamentelor model este prezentată în figura 7.20.



Figura 7.20. Cinetica de încărcare a LEV și BEV în particulele MA-8 și H

7.1.2.9. Capacitatea de eliberare a principiilor active

Evaluarea capacității de eliberarea a medicamentelor din sistemele particulate, s-a realizat în mediu bazic pH=7,4, la temperatura de 37 °C. Spre exemplificare sunt evidențiate, profilul curbelor cineticii de eliberare, cantitatea de medicament eliberată și eficiența de eliberare a probelor MA-8 și H în figurile 7.21; 7.22.

În ceea ce privește procesul de eliberare a LEV din paticulele MA-8 și MA-H (figura 7.21 a) s-a observat o fază mai rapidă care este atinsă în primele 10 ore de eliberare, urmată de o fază mai lentă (caracterizată printr-o eliberare constantă) până la 120 de ore când se atinge maximul cantității de medicament eliberat, de 78,12 % în cazul probei MA-H, respectiv 59,31 % pentru proba MA-8 din cantitatea reținută (figura 7.21 b). În cazul analizei procesului de eliberare a probei MA-8 încărcată cu BEV (figura 7.22 a) au fost observate două faze de eliberare, o primă fază mai rapidă care este atinsă în primele 30 minute (30 %), umată de o a doua fază de eliberare mai lentă (caracterizată printr-o eliberare constantă) până la 583 ore când când s-a atins maximul de 99 % din cantitatea de medicament reținută (figura 7.22 b). Analiza cineticii de eliberare a fost realizată pe baza modelului matematic Korsmeyer-Peppas (figurile 7.23; 7.24; 7.25).



Figura 7.21. Capacitatea probei MA-8 și H de a) eliberare a LEV b) eficiența de eliberare a LEV



Figura 7.22. Capacitatea probei MA-8 de a) eliberare a BEV b) eficiența de eliberare a BEV



Figura 7.23. Determinarea valorii parametrilor modelului Korsmeyer-Peppas pentru evaluarea cineticii de eliberare specifică a LEV din nanoparticulele MA-8



Figura 7.24. Determinarea valorii parametrilor modelului Korsmeyer-Peppas pentru evaluarea cineticii de eliberare a LEV din nanoparticulele MA-H



Figura 7.25. Determinarea valorilor modelului Korsmeyer-Peppas pentru evaluarea cineticii de eliberare a BEV din nanoparticulele MA-8

În urma analizei datelor cinetice experimentale pentru intervalul $0 \div 300$ minute, a fost posibil calculul exponentului difuzional.

Ecuațiile obținute în urma prelucrării datelor cineticii de eliberare sunt următoarele:

- $y = 0,4967 \cdot x 1,7476$, din care s-au determinat parametrii k = 0.23, n = 0.4967 și $R^2 = 0.9851$.
- y = $0.5023 \cdot x 1.7476$, din care s-au determinat parametrii k = 0.127, n = 0.5023 și R² = 0.9968.
- $y = 0,4968 \cdot x 3,8964$, din care s-au determinat parametrii k = 0.053, n = 0.4968 și $R^2 = 0.9853$.

Este cunoscut faptul că valoarea lui *n* pentru o difuzie normala Fickiană este 0.5 < n < 1.0. Putem afirma că în cazul nostru pentru toate cele trei probe analizate avem o difuzie Fickiană procesul de transport al medicamentului prin matricea polimeră fiind guvernat de difuzie [171], [172], [173].

Capitolul 8. Sisteme micro/nanoparticulate polimer-medicament pe bază de chitosan grefat cu poli(etilen glicol) metil eter acrilat

Capitolul are ca scop prezentarea obținerii unor sisteme polimer-medicament sub formă de MNP *originale* încărcate cu principii biologic active pentru tratarea unor afecțiuni ale polului posterior al ochiului. Sunt discutate în detaliu rezultatele experimentale obținute, tehnicile experimentale și metodele de caracterizare utilizate.

8.1.1 Funcționalizarea chitosanului prin metoda de grefare cu poli(etilen glicol) metil eter acrilat

Modificarea chimică a chitosanului de poli(etilen glicol) metil eter acrilat (CS-g-PEG-A) a fost realizată conform unui protocolul prezentat în studiul realizat de *Han și colaboratorii săi*. Modul de lucru a fost prezentat în detaliu în subcapitolul 5.2.5. Sinteza derivatului de chitosan avut la bază reacția de tip adiție Michael [367]. Reacția de grefare este prezentată în schema 8.1. Și în acest caz justificarea utilizării CS și PEG-A are la bază ideea introducerii unor proprietăți noi polimerului, respectiv îmbunătățirea solubilității chitosanului în medii apoase slab acide prin introducerea pe catena liniară a chitosanului a segmentelor de PEG-A hidrofile.

Schema 8.1. Reacția de functionalizare a chitosanului cu poli(etilen glicol) metil eter

acrilat

O confirmare a funcționalizării chitosanului cu PEG-A a fost obținută prin caracterizarea structurală a derivatului prin Spectroscopia FT-IR. Spre exemplificare sunt ilustrate spectrele FT-IR ale CS, PEG-A, PEG-A-g-CS (raport molar 1:1) în figura 8.1 și tabelul 8.1 Spectrul FT-IR al CS fiind descris în detaliu anterior, ne-am axat pe descrierea spectrelor FT-IR PEG-A, respectiv CS-g-PEG-A. Spectrul FT-IR al PEG-A prezintă următoarele semnale caracteristice: unul proeminent al benzii de absorbție de la 1722 cm⁻¹ care este corespunzător vibrațiilor dublei legături, la 2862 cm⁻¹ apariția unui semnal intens caracteristic benzii de absorbție ale grupărilor CH, respectiv la 3435 cm⁻¹ observă vibrațiile axiale de întindere ale grupărilor OH ale PEG-A. Modificarea chitosanului cu poli(etilen glicol) metil eter acrilat este validată de apariția a benzilor de absorbție de la 1720 și 1654 cm⁻¹.

De asemenea, în spectrul CS-*g*-PEG-A benzile de absorbție corespunzătoare vibrațiilor de întindere ale grupărilor hidroxil, amino și amidă ale chitosanului sunt deplasate ușor, semnalul benzii de absorbție de la 1720 cm⁻¹ redus datorită participării la reacție, este ascociat legăturilor duble C=C din PEG-A, iar banda de absorbție de la 1654 cm⁻¹ este specifică vibrațiilor de deformare ale grupărilor aminice acetilate corespunzătoare chitosanului.



Figura 8.1. Spectrele FT-IR comparative ale CS, PEG-A, CS-g-PEGA

Caracterizarea copolimerului CS-g-PEG-A a fost realizată și cu ajutorul **spectroscopiei RMN**. S-a urmărit influența a diferite rapoarte molare chitosan/acrilat de poli(etilen glicol) metil eter (1:0,5; 1:0,75; 1:1) asupra gradului de substitutie realizat. Spre exemplificare în figura 8.3 (a, b, c) sunt prezentate spectrele ¹H RMN care confirmă realizarea grefării polizaharidului.

Pentru CS-g-PEG-A, în comparatie cu CS, picurile corespunzătoare protonilor – COOCH₂CH₂– și –NH–CH₂CH₂–COO– apar la 4.33 ppm și respectiv la 2.60 ppm. Semnalul clar de la 3.37 ppm corespunde protonilor grupării –OCH₃ din unitatea structurală a poli(etilen glicolului). Semnalele protonilor metilenici ai poli(etilen glicolului) se suprapun cu cele ale protonilor H₃, H₄, H₅ si H₆ al unităti glucozaminice.

Calculul gradului de substituție (tabel 8.2) a fost realizat utilizand valoarea intensității picului protonilor –COOCH₂– (4.33 ppm) și cea a picului protonilor din gruparea acetilat –CH₃ (2.00 ppm) specifică resturilor de chitină.

 Nr. crt
 Raport molar (CS:PEG-A)
 Grad de substituție, %

 1
 1:0,5
 5,5

 2
 1:0,75
 15,2

 3
 1:1
 16,5

Tabel 8.2. Valori ale gradului de substituție CS-g-PEG-A

Valoarea gradului de grefare cea mai ridicată de 16,5 %, fiind atinsă în cazul în care raportul molar chitosan/acrilat de poli(etilen glicol) metil eter a fost de 1:1. Important este însă faptul că, pentru copolimerul grefat la raportul molar de 1:1 între componente, s-a reuşit solubilizarea sa completă în apă ceea ce a confirmat ipoteza noastră de plecare și a permis concluzia că grefatul a fost optimizat din acest punct de vedere.



Figura 8.2. Spectrele ¹H RMN al a) chitosanului; b) PEG-A; c) CS-g-PEG-A

8.1.2. Prepararea micro/nanoparticulelor pe bază de CS-g-PEG-A prin dublă reticulare în emulsie inversă

Pentru prepararea MNP pe baza de CS-g-PEG-A s-a respectat același procedeu a emulsiei inverse cu dublă reticulare descrisă în **subcapitolul 5.2.6**. De asemenea, și în acest caz, ulterior etapelor de purificare probele de MNP au fost luate în considerare pentru stabilirea unor caracteristici precum: diametru și polidispersitate; morfologie; comportament de umflare, încărcare și eliberare de medicament, hemocompatibilitate, test de toxicitate și citotoxicitate. Protocoalele experimentale cu parametrii observați pentru pregătirea micro/nanoparticulelor sunt prezentate în tabelul 8.3 și 8.4.

Tabel 8.3. Variația parametrilor pentru sinteza micro/nanoparticulelor de (CS-g-PEG-A) reticulate ionic cu tripolifosfat de sodiu.

			Raport	Raport			Timp de		
		Rapo	molar	molar			reticulare	Timp de	
	Concentrați	rt	NH3 ⁺ /	NH3 ⁺ /			Ionică,	reticulare	Diam.
Cod	a soluției de	faze	Na5P3O10,	C5H8O2,	Tensioactivi,	Viteză,	min	Covalentă,	mediu,
probă	polimer, %	W/O	moli	moli	%	rpm		min	μm
A1	0.5					5.000	10		-
A2	0.5					5.000	30		-
A3	0.5					5.000	120		-
A4	0.5		1:1			5.000	150		-
A5	0.5					5.000			3,0
A6	0.5					9.000			1,7
A7	0.5					12.000			0,97
A8	0.5					15.000			0,96
A9	0.35		1:2			15.000			0,5
A10	0.5		1:3			15.000			0,60
A11	0.75	1:4	1:2	1:1	2	15.000	60	60	1,3

Tabel 8.4. Variația parametrilor pentru sinteza micro/nanoparticulelor de (CS-g-PEG-A) reticulate ionic cu sulfat de sodiu

	Carrie		Raport	Raport			T. 1		
	Conc.	_	molar	molar			Timp de		
	soluției de	Raport	$NH_3^+/$	$NH_3^+/$			retic. cu	Timp de	Diam.
Cod	polimer,	faze	Na ₂ SO ₄ ,	$C_5H_8O_2$,	Tensioactivi,	Viteză,	Na ₂ SO ₄ ,	retic. cu	mediu,
probă	%	W/O	moli	moli	%	rpm	min	AG, min	μm
B1	0.5					5.000	10		-
B2	0.5					5.000	30		-
B3	0.5					5.000	120		-
B4	0.5	Ι	1:2			5.000	150		-
B5	0.5	Ι				5.000			2,7
B6	0.5					9.000			1,6
B7	0.5					12.000			0,78
B8	0.5					15.000			0,6
B9	0.35	T	1:4			15.000			0,6
B10	0.5	Ι	1:5			15.000			0,7
B11	0.75	1:4	1:4	1:1	2	15.000	60	60	1,5

8.1.2.1. Caracterizarea structurală a nanoparticulelor prin FT-IR

MNP preparate au fost caracterizate prin FT-IR, care a demonstrat formarea rețelei polimere prin intermediul dublei reticulări. Au fost înregistrate spectre FT-IR pentru toate MNP obținute, însă acestea au prezentat un profil similar, motiv pentru care au fost alese reprezentative doar spectrele FT-IR înregistrate pentru două probe A8 și B8, diferența între acestea fiind natura reticulantului ionic. Din spectrele celor două probe evidențiate de figura 8.3 se observă semnalele corespunzătoare benzilor de absorbție ce corespund naturii reticulatului ionic folosit, ceea ce demonstrează formarea de legăturilor prin procesul de reticulare ionică între polianionii de tripolifosfat (896 cm⁻¹), respectiv anionii sulfat din Na₂SO₄ (617 cm⁻¹) și cationii de amoniu ai CS-g-PEG-A și a legături iminice (1568 cm⁻¹) prin procesul de reticulare covalentă între grupele aminice ale polimerilor și grupele carbonil ale aldehidei glutarice [409], [410], [411], [412], [413], [367].



Figura 8.3. Spectrele FT-IR comparative ale CS-g-PEGA și NPs probe A8, B8

8.1.2.2. Caracterizarea prin microscopie SEM

Caracterizarea din punct de vedere morfologic a MNP a fost realizată prin microscopie electronică de baleiaj. Din imaginile SEM înregistrate (figura 8.5 și 8.6) se constată diferențe importante morfologice și în ceea ce privește dimensiunile particulelor acestea fiind dependente de parametrii variați în prepararea acestora. Prin urmare, pentru probele A-5÷8, respectiv B-5÷8, concentrația soluției de polimer (0,5%), respectiv raportul polimer/reticulant au fost menținute constante, modificându-se viteza de agitare de la 5,000 la 15.000 rpm/min. Se remarcă astfel că viteza de agitare are o influență destul de însemnată asupra dimensiunii particulelor aceasta fiind invers proporțională cu viteza de agitare. În cazul eșantioanelor A-8, 9, 11, respectiv B-8, 9, 11, concentrația soluției de polimer a variat de la 0,35 % la 0,75 %, restul parametrilor fiind menținuți constanți. Și în acest caz sa observat o creștere a diametrului de la 0,5 nm la 1,3 µm pentru probele A-8, 9, 11, respectiv de la 0,6 nm la 1,5 µm în cazul probelor B-8, 9, 11. Deci, se poate afirma că diamentrul particulelor este clar influențat de concentrația soluției de polimer, acesta fiind mai ridicat în cazul probelor A-11, respectiv B-11, comportament datorat creșterii vâscozității soluției care conduce la formarea de picături mai mari, fapt prezentat și de alte studii [70], [385]. Odată cu creșterea concentrației soluției de polimer la 0,75 %, s-a observat o creșterea considerabilă a diametrului mediu și a polidispersității particulelor, dar și o scădere a tendinței de aglomerare.



Figura 8.5. Imagini SEM ale MNP optimizate reticulate ionic cu TPP



Figura 8.6. Imagini SEM ale micro/nanoparticulelor optimizate reticulate ionic cu sulfat de sodiu

8.1.2.4. Analiza comportamentului la umflare

Studiul comportamentului la umflare a condus către rezultate interesante, valorile obținute pentru gradul maxim de umflare fiind într-o bună corelație cu parametrii procesului de obținere a micro/nanoparticuleleor. Gradul maxim de umflare al particulelor în medii apoase este evident dependent de natura arhitecturii interne a rețelei polimere nou formată. Caracterul hidrofil al micro/nanoparticulelor poate oferi informații importante în preconizarea comportamentului acestora la încărcarea/eliberarea medicamentului prin proces difuzional.

Analiza comportamentului la umflare a micro/nanoparticulelor în mediu acid (pH=3,4) și bazic (pH= 7,4) după 24 ore a condus la următoarele rezultate evidențiate în figurile 8.10; 8.11; 8.12:

- gradul de umflare al MNP reticulate cu TPP în mediu acid a avut valori cuprinse între 700% și 1150 %
- gradul de umflare al MNP reticulate cu TPP în mediu bazic a avut valori cuprinse între 511% și 670 %
- gradul de umflare al MNP reticulate cu sulfat de sodiu în mediu acid a avut valori cuprinse între 864 % și 1225 %
- gradul de umflare al MNP reticulate cu sulfat de sodiu în mediu bazic a avut valori cuprinse între 732 % și 804 %

După o primă analiză a datelor experimentale obținute din studiul gradului de umflare pun în evidență faptul că: valorile gradului maxim de umflare în soluția tampon acetat ABS (pH=3,3) sunt mai crescute față de cele înregistrate în soluția tampon fosfat (PBS, pH=7,4), respectiv influența concentrației soluției de polimer, a vitezei de agitare și a raportului polimer/reticulant ionic.

Modificarea concentrației soluției de polimer cu menținerea constantă a vitezei de agitare și a raportului polimer/reticulant ionic conduce la următoarele concluzii:

- deși pentru probele A9, B9 a fost utilizată o concentrație a soluției de polimer scazută (0,35 %), gradul de umflare prezintă valorile cele mai ridicate, ca urmare a reținerii apei în aglomeratele polimere formate (care este evidentă doar în cazul probei B9) și a gradului de reticulare a rețelei care în acest caz este mai mic;
- odată cu creșterea diametrului mediu al particulelor, respectiv a concentrației soluției de polimer a condus la o scădere a cantității de apă reținută (A-8 și 11, B-8 și 11) și deci a gradului de umflare, valoarile obținute pot fi puse pe baza unei împachetări mai bune a legăturilor chimice dintre moleculele polimerilor pentru obținerea rețelei, absorbția de apă fiind invers proporțională cu gradul de reticulare al probei.

Un efect similar este înregistrat și în cazul probelor A-10 și B-10, la care s-a constatat o scădere a gradului maxim de umflare odată cu creșterea cantității de TPP sau sulfat de sodiu în fapt a raportului molar TPP/grupe aminice sau sulfat de sodiu/grupe aminice, consecință logică a creșterii densității de reticulare a rețelei.

În cazul setului de probe A-5÷11 valorile gradului maxim de umflare în mediu bazic sunt inferioare celor atinse în mediu acid, comparativ cu valorile eșantioanleor B-5÷11, unde valorile sunt destul de apropiate de cele din mediu acid, acestea fiind dependente de natura reticulantului utilizat și a faptului că majoritatea grupărilor aminice ale chitosanului sunt deprotonate deci, prin urmare, se formează legături de hidrogen în rețeaua polimeră nou formată.



Figura 8.10. Influența concentrației asupra gradului maxim de umflare în mediu acid (ABS, pH=3,4) și bazic (PBS, pH=7,4) pentru sistemele de particule reticulate ionic cu TPP (A) și sulfat (B): A9, B9 (0,35%); A8, B8 (0,5%); A11, B11 (0,75 %)



Figura 8.11. Influența vitezei de agitare asupra gradului maxim de umflare în mediu acid (ABS, pH=3,4) și bazic (PBS, pH=7,4) pentru sistemele de particule reticulate ionic cu TPP (A) și sulfat (B): A5,B5 (5.000 rpm); A6,B6 (9.000 rpm); A7,B7 (12.000 rpm); A8,B8 (15.000 rpm)

4.2.8.5. Capacitatea de includere a LEV

Studiul capacității de includere a principiilor active a MNP a fost realizat utilizând ca medicament model LEV.

Încărcarea LEV în MNP a fost realizată prin difuzie, și s-a constatat că acestea au reușit după 72 h să încapsuleze între $0,48 \div 0,89$ mg medicament. Prin urmare, eficiențele de încărcare cu medicament au avut valori de $47,0 \div 76,0\%$, probând o capacitate ridicată a suporturilor polimerice MNP de a reține compusul biologic activ. Eficiența de încărcare a prezentat valori destul de ridicate. Datele experimentale obținute sunt în acord cu cele obținute în cazul comportamentului acestora la umflare discutate anterior, așa cum ne așteptam se poate observa că, dozele de medicament încapsulate de suporturile polimerice reticulate cu sulfat de sodiu

sunt mai ridicate. Spre exemplificare, au fost alese 4 probe (A8, A9, B8, B9), cinetica procesului de încărcare a LEV este prezentată în figura 8.13.



Figura 8.13. Cinetica încărcării cu LEV a probelor A8, A9, B8, B9

8.1.2.6. Capacitatea de eliberare a LEV

Pentru obținerea sistemelor polimer-principiu biologic activ, ca medicament model s-a ales LEV pentru tratarea unor afecțiuni ale polului posterior al ochiului. Prin urmare s-a impus studiul capacității de eliberare a LEV din MNP obținute anterior, acesta fiind realizat prin metoda difuzională, în mediu bazic pH=7,4, la temperatura de 37 °C.

În ceea ce privește procesul de eliberare a LEV pentru probele A8, A9, B8, B9, figura 8.14; 8.15 a) și b) s-a observat o etapă în care LEV a fost eliberat mai rapid și anume în primele 10 ore, urmată de o a doua etapă mai lentă (caracterizată printr-o eliberare constantă) până la 120 de ore când se atinge maximul cantității de medicament eliberat (A8 – 53,33% ; A9 – 49,22%; B8 – 64,4%; B9 – 60,0%). Analiza cineticii de eliberare a fost realizată, de asemenea și pe baza modelului matematic Korsmeyer-Peppas (figurile 8.16 și 8.17).



Figura 8.14. Capacitatea probelor A-8 și B-8 de a) eliberare a LEV b) eficiența de eliberare a LEV



Figura 8.15. Capacitatea probelor A-9 și B-9 de a) eliberare a LEV b) eficiența de eliberare a LEV



Figura 8.16. Determinarea valorilor modelului Korsmeyer-Peppas pentru evaluarea cineticii de eliberare a LEV din nanoparticulele A-8



Figura 8.17. Determinarea valorilor modelului Korsmeyer-Peppas pentru evaluarea cineticii de eliberare a LEV din nanoparticulele B-8

În urma analizei datelor cinetice experimentale pentru intervalul $0 \div 480$ minute, a fost posibil calculul exponentului difuzional, pe baza ecuațiilor de mai jos:

- $y = 0,4294 \cdot x 3,351$; din care s-au determinat parametrii k = 0.4214, n = 0.4294 și $R^2 = 0.9778$.
- $y = 0.5182 \cdot x 3.2$; din care s-au determinat parametrii k = 0.189, n = 0.5182 și $R^2 = 0.9845$.

Putem observa că în ambele cazuri (A8, B8), valoarea exponentului n care caracterizează mecanismul de eliberare, este destul de apropiată de 0,5 (0,5 < n < 1,0), ceea ce indică un mecanism de transport/eliberare dominat, practic, de difuzie.

8.1.2.7. Hemocompatibilitatea

Testul de hemoliză este o cerință obligatorie pentru materialele care intră în contact cu sângele, deoarece interacțiunea acestora cu componentele sangvine poate duce la liza eritrocitelor. Din acest motiv au fost evaluate efectele nanoparticulelor preparate asupra sângelui cu ajutorul unui test de hemoliză. Rezultatele obținute în urma acestui studiu au pus în evidență faptul că gradul de hemoliză crește odată cu creșterea concentrației de nanoparticule (figura 8.18). S-a constatat ca nanoparticulele obținute prezintă o bună compatibilitate cu mediul sangvin care se încadrează în limitele normale (< 10% comparativ cu proba control pozitiv) [431]. De asemenea s-a observat o creștere a procentului pentru hemoliză în cazul probelor B8 în acest caz fiind folosit ca și reticulant ionic Na₂SO₄, o posibilă cauză fiind cantitatea mai ridicată necesare pentru reticularea rețelei (raport molar NH₃^{+/} Na₂SO₄ - 1/4), în comparație cu proba A8 (raport molar NH₃^{+/} TPP- 1/2).



Figura 8.18. Influența concentrației de nanoparticule asupra gradului de hemoliză

Concluzii generale

Prezenta teză de doctorat a avut ca obiectiv principal *obținerea și caracterizarea unor* noi sisteme polimere sub formă de geluri pe bază de poliglobalidă și sub formă de micro/nanoparticule pe bază de dervați de chitosan pentru transportul și eliberarea controlată a medicamentelor în cazul unor afecțiuni specifice ale pielii și afecțiuni ale segmentului posterior al ochiului

Realizarea acestui obiectiv a demarat cu realizarea gelurilor pe bază de poliglobalidă și a copolimerului poli(etilen glicol) cu funcții tiolice prin intermediul reacției de adiție tiol-enă fotoinițiată, respectiv a două tipuri de sisteme particulate biocompatibile cu caracter de hidrogel, pe bază de chitosan modificat chimic cu poli(etilen glicol) metacrilat, respectiv poli(etilen glicol) metil eter acrilat prin reacția de adiție Michael, utilizând tehnica dublei reticulări (reticularea majoritară fiind cea ionică urmată de reticularea covalentă cu scopul asigurării stabilității mencanice a particulelor) realizată în emulsie inversă.

Concluziile constatate în urma cercetăriilor, structurate în cele patru capitole, sunt prezentate în cele ce urmează:

1. S-a realizat cu succes reacția de adiție tiol-enă radicalică între doi polimeri (PGL și PEG-SH) cu proprietăți hidrofile/hidrofobe foarte diferite, prin intermediul fotoinitierii reacției.

- pentru sinteza poliglobalidei a fost utilizată metodă de polimerizarea cu deschidere de ciclu enzimatică catalizată de lipază raportată în literatură.
- sinteza copolimerului de poli(etilenglicol) cu funcții tiolice s-a realizat prin procesul de policondensare a poli(etilen glicol) diol cu acid tiomalic în prezența trifluorometansulfonat de scandiu [Sc (OTf)₃] drept catalizator foarte eficient și chemoselectiv.
- ⇒ analiza structurală FT-IR şi FT-Raman a celor doi polimeri a permis obținerea unor informații cu privire la grupările funcționale ale PGL, şi anume apariția unei benzi caracteristice în jurul valorii de 1673 cm⁻¹, care rezultă din prezența funcționalității alchenelor C=C în catena principala a polimerului. De asemenea în cazul analizei FT-Raman pentru copolimerul PEG-SH spectrul evidențiază apariția benzilor caracteristice cum ar fi : semnalul specific vibrațiilor grupării esterice (O-C=O) la 1673 cm⁻¹ şi cel specific grupării funcționale tiolice (SH) la 2570 cm⁻¹.
- caracterizarea prin ¹H RMN, a confirmat obținerea celor doi polimeri prin apariția de noi picuri specifice și anume: în cazul PEG-SH legarea acidului tiomalic pe lanțurile de PEG este justificată de apariția peakurilor specifice de la 2,27 pm care corespund grupărilor

funcționale tiolice și sugerează că acestea au fost stabile în timpul procesului de policondensare, iar în cazul PGL apariția semnalului picului caracteristic al legăturilor C=O la 5,5 ppm.

- s-a constatat în urma analizelor structurale efectuate (GPC, ¹H RMN) că PGL prezintă o masă moleculară (Mn) de aproximativ 6000 g/mol, și o polidispersitate ridicată de 3,4, respectiv o conversie a monomerului ridicată de 74 % comparativ cu alte metode de lucru raportate în literatură.
- ➔ analiza GPC a copolimerul poli(etilenglicol-*co*-tiomaleat) (PEG-SH) a confirmat obținerea acestuia prezentând o masă moleculară (Mn) de aproximativ 2400 g/mol, o polidispersitate mare de 3,3 și un grad de policondensare de 3,25.
- rezultatele analizei MALDI MS au dezvăluit doar o fracție de masă moleculară scăzută datorită polidispersiei ridicate a probei, și a confirmat masa unității monomere de 238 Da.
- în cazul PEG-SH analiza MALDI MS nu a putut fi utilizată pentru determinarea masei moleculare, însă a evidențiat faptul că copolimerul PEG-SH este format dintr-un amestec de lanțuri macromoleculare cu număr diferit de macromeri PEG și comomeri tiomaleat. Datorită polidispersității ridicate a copolimerului, rezultatele au fost considerate doar ca o măsură calitativă a probei PEG-SH.
- analiza citotoxică a dovedit că PEG-SH, respectiv PGL sunt polimeri biocompatibili, iar viabilitatea celulară a fibroblastelor 3T3 tratate cu concentrații de până la 10 mg/ml a fost comparabilă cu viabilitatea celulelor martor netratate

2. S-au obținut 18 tipuri de geluri polimere pe baza de poliglobalidă și poli(etilen glicol) funcționalizat cu grupări tiolice

- s-au prepararat noi tipuri de rețele polimere pe bază de poliglobalidă prin intermediul reacției de adiție radicalică tiol-enă polimer-polimer fotoinițiată
- caracterizarea gelurilor prin spectroscopie FT-Raman a evidențiat semnalele vibrațiilor de întindere specifice benzii legăturii duble (C=C) la 1673 cm⁻¹, reprezentând legăturile duble nereacționate ale PGL și semnale vibrațiilor de întindere specifice benzii (SH) la 2570 cm⁻¹, reprezentând grupe tiol nereacționate.
- ➡ rețelele reticulate (gelurile) au fost analizate și prin analiza elementară, astfel pentru G3,6,9,12,15,18 (c=20% și diferite rapoarte molare inițiale SH/C=C, 1/1, 1/2, 1/3, 1/4, 2/1, 3/1), conținutul de sulf a fost doar puțin mai mic comparativ cu, conținutul teoretic inițial de sulf calculat din raportul inițial al polimerilor cu privire la fracția de gel de recuperată.

- Spectofotometria UV-Vis (Testul Ellman's) a evidențiat faptul că, conținutul de grupe tiol libere este dependent atât de concentrația totală de polimeri cât și de rapoartul molar (SH/C=C) utilizat, acesta crescând constant odată cu creșterea concentrației, astfel rețelele reticulate preparate la concentrații mai mici conțin o cantitate mai mare de sulf reacționat. De asemenea, diferența dintre sulful total și sulful din grupările tiol nereacționate este strâns legată de sulful reacționat din grupările tiol transformate, acesta fiind cel mai probabil cel din legăturile C-S-C formate între PGL și PEG-SH, însă nu se exclude complet nici posibilitatea formării și a unor legături disulfidice (S-S).
- ➡ pe baza rezultatelor obținute prin utilizare analizei foto-reoligice se poate afirma că tăria structurală a gelurilor este dependentă de concentrația totală a amestecului de polimeri. De asemenea, cea mai mare rigiditate, de aproape 10 kPa pentru modulul de stocare, a fost înregistrată pentru G9 (c=20 %, raport molar de 1/3), în timp ce la c=40% au fost înregistrate valori apropiate de valorile obținute la c=10 %, fapt ce indică că, la fel ca în cazul cineticii de reticulare, că pentru stabilitatea gelurilor există un optim în domeniul de concentrație totală de polimeri cuprinsă între 10% şi 20%.
- Caracteristicile mofologice ale gelurilor polimerice liofilizate au fost analizate cu ajutorul tehnicii de microscopie electronică de baleiaj, aceasta confirmând în cazul G16,17,18 obținerea unor geluri cu structură macroporoasă omogenă cu dimensiuni și pori interconectați cu forme destul de regulate pentru concentrațiile 20 %, 10%, 5%, având dimensiunea cuprinsă între 30, 60 și 150 μm.
- Comportamentul gelurilor la umflare a dezvăluit valori scăzute în cazul umflării în mediu apos (20 ÷ 70 %) datorită prezenței PGL (polimer hidrofob) ca parte a rețelei, dar proprietăți excelente de umflare în THF unde gradul de umflare a gelurilor a fost cuprins în intervalul 400 ÷1000%
- în urma evaluării citotoxicității rețelelor reticulate, determinată utilizând fibroblastele 3T3, s-a constatat că materialele pe bază de PGL posedă o biocompatibilitate ridicată de până la 50 mg/ml de conținut de gel solid în extracte și pot fi luate în considerare pentru utilizarea în aplicațiile biomedicale.
- gelurile obținute s-au dovedit a avea capacitate de reținere a LEV prin proces difuzional.
- eliberarea medicamentului în mediu apos se face cu un "burst effect" în primele 10 ore de eliberare, urmată de o fază mai lentă (caracterizată printr-o eliberare constantă) până la 48 ore când s-a atins o valoare de aproximativ 0,38 mg/mg gel.

procedura de modelare matematică a datelor cinetice de eliberare pe baza modelului matematic Korsmeyer-Peppas a permis calculul exponentului difuzional n a cărui valoare indică un transport al medicamentului guvernat de difuzie.

3. S-au obținut doi derivați de chitosan prin modificarea chimică a acestuia cu poli(etilen glicol) metacrilat, respectiv poli(etilen glicol) metil eter acrilat prin reacții chimice la gupările aminice primare ale polizaharidei formând compuși cu noi proprietăți care au stat la baza obținerii suporturilor polimere ulterioare.

- Caracterizarea structurală a derivaților CS-g-PEG-MA, respectiv, CS-g-PEG-A prin spectroscopie FT-IR a confirmat grefarea ambelor tipuri de poli(etilen glicol) pe catena principală a polizaharidei argumentată de deplasarea benzilor de absorbție în spectrul derivaților comparativ cu benzile caracteristice spectrului chitosanului și, de asemenea de apariția unora noi semnale.
- Caracterizarea celor doi derivați prin spectroscopie ¹H RMN a evidențiat prezența celor două tipuri de poli(etilen glicol) în structura noilor compuşi prin apariția picurilor specifice protonilor din unitatea structurală a poli(etilen glicolului), care lipsesc în structura chitosanului nativ.
- determinarea gradului de substituție a derivaților sintetizați, s-a realizat cu ajutorul intensității picurilor specifice protonilor din unitatea structurală a poli(etilen glicolului) și a chitosanului.
- În urma determinării gradului de grefare prin Spectroscopia de rezonanță magnetică (1H RMN) acesta s-a dovedit a fi dependent de raportul molar -NH₂/PEG-A.
- analiza stabilității termice a derivatului CS-g-PEG-MA evidențiază faptul că din punct de vedere termic CS-g-PEG-MA este mai puțin stabil comparativ cu chitosanul efect care este pus pe seama reducerii cantității de legături de hidrogel dintre lanțurile de polizaharid, ca urmare a interpunerii între acestea a grefelor de poli(etilenglicol) metacrilat
- analiza curbelor obținute prin Calorimetrie prin scanare diferențială (DSC) a chitosanului și a CS-g-PEG-MA a sugerat o bună stabilitate termică a acestora.

4. S-au obținut 14 tipuri de sisteme micro/nanoparticule polimere pe baza derivaților CSg-PEG-MA prin metoda emulsiei apă în ulei cu dublă reticulare. Reticularea ionică a fost majoritară realizându-se între polianioni (tripolifosfat) NasP3O10 sau anionii de sulfat Na2SO4 și cationii de amoniu ai CS-g-PEG-MA și prin legături iminice formate prin procesul de reticulare covalentă (cu rol de stabilizare mecanică) între grupele aminice ale polimerului și grupele carbonil ale aldehidei glutarice

- Caracterizarea structurală prin spectroscopie FT-IR a micro/nanoparticulelor a confirmat realizarea celor două tipuri de reticulare (ionică, covalentă) prin prezența benzilor de absorbție caracteristice fiecăreia.
- caracterizarea morfologică prin SEM confirmă obținerea unor sisteme particulate cu formă sferică și dimensiuni submicronice, adecvate aplicației vizate.
- Caracteristicile morfologice ale particulelor s-au dovedit a fi dependente de factorii: concentrația soluției de polimer, raportul molar −NH³⁺/ TPP sau Na₂SO₄ şi −NH³⁺/AG, timpul de reticulare ionică şi covalentă, respectiv viteza de agitare.
- curbele diferențiale de distribuție granulometrică, cu aspect monomodal, sunt în acord cu dimensiunea micro/nanoparticulelor determinată prin microscopia electronică de baleiaj, astfel evidențiindu-se influența concentrației soluției de polimer.
- analiza de difractometrie cu radiație laser a micro/nanoparticuleleor a evidențiat un aspect monomodal al curbelor de distribuție granulometrică, cu polidispersitate relativ mică și diametrul mediu al nanoparticulelor cuprins între 90 - 3500 nm, rezultate în acord cu cele înregistrate prin microscopie electronică.
- se constată și în acest caz că dimensiunea particulelor și polidispersitatea acestora este dependentă de factori precum concentrația soluției de polimer, natura reticulantului ionic și viteza de agitare.
- reducerea diametrului particulelor, este din ce în ce mai pronunțată odată cu scăderea a concentrației soluției și creșterea vitezei de agitare, ca o consecință a densității mai mari de reticulare; se obțin astfel sisteme particulate de dimensiuni reduse și mai bine individualizate.
- analiza prin Calorimetrie prin scanare diferențială (DSC) a nanoparticulelor a sugerat o bună stabilitate termică a acestora.
- micro/nanoparticulele preparate au dovedit un comportament la umflare bun atât în medii de pH acid cât și ușor bazic.
- scăderea concentrației soluției de polimer de la 0,75 % la 0,35 %, respectiv creșterea vitezei de agitare a dus la o scădere a diametrului probelor de la 3500 nm la 100 nm.
- scăderea concentrației soluției de polimer conduce la o creștere a gradului maxim de umflare a nanoparticulelor în mediu apos (pH = 3,4), acest comportament influentează capacitatea de încărcare cu medicamente.
- caracteristicile de umflare, includere şi eliberare a micro/nanoparticulelor pot fi controlate prin modificarea parametrilor studiați.

- micro/nanoparticulele obținute s-au dovedit a avea capacitate de încapsulare a LEV și BEV prin proces difuzional.
- eliberarea medicamentului în mediu apos (pH= 7,4, care simulează lichide fiziologice) se realizează în primă fază cu un "burst effect", atingând o valoare de aproximativ 78,12 % LEV și 30 % BEV după 10 ore din cantitatea totală încărcată, manifestând în continuare tendință de eliberare a medicamentului.
- ➡ procedura de analiza a datelor cinetice de eliberare pe baza modelului matematic Korsmeyer-Peppas a permis calculul exponentului difuzional *n* a cărui valoare indică un transport al medicamentului guvernat atât de difuzie pentru probele MA-8,9 şi MA-D,E, respectiv de difuzie cât şi de umflare, în cazul celorlate suporturi.
- testul de viabiltate celulară exemplificat pe probele MA-5,6,8 demonstrează lipsa de toxicitate a particulelor.
- rezultatele testelor de hemoliză pe nanoparticulele de tip MA-8 au dovedit că acestea sunt hemocompatibile și pot fi administrate intraocular.
- micro/nanoparticulele obținute s-au dovedit a fi practic lipsite de toxicitate si potential aplicabile ca purtători ai unui anticorp anti-VEGF A, concluzii rezultate în urma efectuării de experimente pe animale de experienta asupra modelului de formare a tuburilor celulelor endoteliale, respectiv efectului antiangiogenic asupra diabetului/boli inflamatorii ale ochiului.

5. S-au obținut 14 tipuri de sisteme micro/nanoparticule polimere pe baza derivaților CSg-PEG-A prin metoda dublei reticulări în emulsie inversă, utilizându-se aceiași reticulanți ca în cazul anterior.

- spectroscopia FT-IR a micro/nanoparticulelor a confirmat formarea de noi legături corespunzătoare celor două tipuri de reticulare (ionică, covalentă) prin prezența benzilor de absorbție caracteristice fiecăreia.
- caracterizarea morfologică prin SEM relevă obținerea unor sisteme particulate cu formă sferică și dimensiuni submicronice, corespunzătoare aplicației vizate.
- ➔ profilul morfologic al sistemelor polimere s-a dovedit a fi dependent de următorii factori: concentrația soluției de polimer, raportul molar –NH³⁺/ TPP sau Na₂SO₄ şi –NH³⁺/AG, timpul de reticulare ionică şi covalentă şi viteza de agitare.
- analiza de difractometrie cu radiație laser a micro/nanoparticuleleor a evidențiat un aspect monomodal al curbelor de distribuție granulometrică, cu polidispersitate relativ mică și diametrul mediu al nanoparticulelor cuprins între 90 - 4500 nm, rezultate în acord cu cele înregistrate prin microscopie electronică.

- Se constată și în acest caz că dimensiunea particulelor și polidispersitatea este dependentă de factori precum concentrația soluției de polimer, natura reticulantului ionic și viteza de agitare.
- Odată cu scăderea a concentrației soluției şi creşterea vitezei de agitare, densitatea de reticulare creşte conducând la reducerea diametrului particulelor, obținându-se sisteme polimere particulate mai individualizate de mărimi reduse.
- suporturile polimerice obținute s-au dovedit a avea o capacitate bună de umflare atât în mediu de pH acid cât și ușor bazic.
- scăderea concentrației soluției de polimer de la 0,75 % la 0,35 %, respectiv creșterea vitezei de agitare a dus la o scădere a diametrului particulelor de la 3500 nm la 100 nm.
- Scăderea concentrației soluției de polimer de la 0,75 % la 0,35 % conduce la o creștere a gradului maxim de umflare a nanoparticulelor în mediu apos (pH = 3,4), acest comportament influentează capacitatea de încărcare cu medicamente.
- proprietățile de umflare, includere și eliberare a medicamentelor din micro/nanoparticule pot fi controlate prin modificarea parametrilor studiați.
- micro/nanoparticulele obținute prezintă o capacitate bună de încărcare a levofloxacinului prin difuzie, cantitatea de LEV încapsulată fiind dependentă de concentrația soluției de polimer.
- eliberarea medicamentului în mediu apos (pH= 7,4, care simulează lichide fiziologice) se realizează în primă fază cu un "burst effect", atingând o valoare de aproximativ 60 % LEV după 10 ore din cantitatea totală încărcată, manifestând în continuare tendință de eliberare a medicamentului până la 120 ore.
- analiza a datelor cinetice de eliberare pe baza modelului matematic Korsmeyer-Peppas a permis calculul exponentului difuzional n a cărui valoare indică un transport al medicamentului guvernat atât de difuzie pentru probele A-8,9 şi B-8,9, respectiv de difuzie cât şi de umflare, în cazul celorlate suporturi.
- rezultatele testelor de hemoliză pe nanoparticulele de tip A-8 şi B-8 au dovedit că acestea sunt sunt hemocompatibile şi pot fi administrate intraocular.

Ținând cont de rezultatele cercetării și de concluziile desprinse pe baza acestora, prezentate anterior, considerăm că obiectivele tezei de doctorat propuse au fost îndeplinite și că sistemele polimere realizate prezintă caracteristici structurale, morfologice, sunt indicate pentru transportul de principii biologic active și au potențial de utilizare atât în aplicații ale ingineriei tisulare cât și în terapia afecțiunilor segmetului posterior al ochiului.
Bibliografie selectivă

- [25] D.W. Lee, K. Powers, R. Baney, "Physicochemical properties and blood compatibility of acylated chitosan nanoparticles," *Carbohydr. Polym.*, vol. 58, nr. 4, pp. 371-377, 2004.
- [70] B Luppi, F Bigucci, G Corace, et al., "Albumin nanoparticles carrying cyclodextrins for nasal delivery of the anti-Alzheimer drug tacrine.," *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 44, nr. 4, pp. 559-565, 2011.
- [171] C. Domingo, J. Saurina, "An overview of the analytical characterization of nanostructured drug delivery systems: Towards green and sustainable pharmaceuticals: A review," Anal. Chim. Acta, vol. 744, pp. 8-22, 2012.
- [172] B. D. Ratner, A. S. Hoffman, F. J. Schoen, J.E. Lemons, Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine, Elsevier Academic Press, 2004.
- [173] D. Bhowmik, H. Gopinath, B. P. Kumar, S. Duraivel, K. P. S.Kumar, "Controlled Release Drug Delivery Systems," *J Pharm Innov*, vol. 1, pp. 24-32, 2012.
- [235] J.J. Sperinde, L.G. Griffith , "Synthesis and characterization of enzymaticallycrosslinked-poly(ethylene glycol) hydrogels," *Macromolec.*, vol. 30, pp. 5255-5264, 1997.
- [253] A. Khan, M.B.H. Othman, K.A. Razak, H.M. Akil, "Synthesis and physicochemical investigation ofchitosan-pmaa-based dual-responsive hydrogels," J. Polym. Res., vol. 20, pp. 1-8, 2013.
- [261] A. Lendlein, R. Langer, "Biodegradable, elastic shape-memory polymers for potential biomedical applications," *Science*, vol. 296, nr. 5573, pp. 1673-1676, 2002.
- [358] K. Cholkar, A. Patel, A.D. Vadlapudi, A.K. Mitra, "Novel nanomicellar formulation approaches for anterior and posterior segment ocular drug delivery," *Recent Pat Nanomed.*, vol. 2, nr. 2, pp. 82-95, 2012.
- [362] G.R. da Silva, L. F. Sílvia; R.C.Siqueira; R.Jorge; A.C.J. da Silva, "Implants as drug delivery devices for the treatment of eye diseases," *Braz J Pharm Sci*, vol. 46, pp. 585-595, 2010.
- [367] JM Conrad and JR. Robinson , "Aqueous Chamber Drug Distribution Volume Measurement in Rabbits," J Pharm Sci, vol. 66, nr. 2, pp. 219-224, 1977.
- [370] N.P. Cheruvu, A.C. Amrite, U.B. Kompella, "Effect of eye pigmentation on transscleral drug delivery," *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 49, pp. 333-341, 2008.
- [384] H. Mutlu and M. A. R. Meier, "Ring-opening metathesis polymerization of fatty acid derived monomers," J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem, vol. 48, pp. 5899-5906, 2010.
- [385] O. Türünç and M. A. R. Meier, "Fatty Acid Derived Monomers and Related Polymers Via Thiol-ene (Click) Additions," *Macromol. Rapid Commun.*, vol. 31, p. 1822–1826, 2010.

- [386] M. Bouyahyi, M. P. F. Pepels, A. Heise, and R. Duchateau, "ω-Pentandecalactone Polymerization and ω-Pentadecalactone/ε-Caprolactone Copolymerization Reactions Using Organic Catalysts," *Macromolecules*, vol. 45, pp. 3356-3366, 2012.
- [400] P. Mainil-Varlet, C. Hauke, V. Maquet, G. Printzen, S. Arens, T. Schaffner, R. Jérme, S. Perren, and U. Schlegel, "Polylactide implants and bacterial contamination: an animal study," *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 54, p. 335–343, 2001.
- [403] M. Ilcíkova, M. Mrlík, T. Sedlacek, M. Doroshenko, K. Koynov, M. Danko, J. Mosnacek, " Tailoring of viscoelastic properties and light-induced actuation performance of triblock copolymer composites through surface modification of carbon nanotubes," *Polymer*, vol. 72, pp. 368-377, 2015.
- [405] S. Mongkhontreerat, K. Öberg, L. Erixon, P. Löwenhielm, A. Hulta, and M. Malkoch, , "UV initiated thiol–ene chemistry: a facile and modular synthetic methodology for the construction of functional 3D networks with tunable properties," *J. Mater. Chem. A*, vol. 1, pp. 13732-13737, 2013.
- [406] P. R. Vuddanda, V. M. Rajamanickam, M. Yaspal, and S. Singh, "Investigations on Agglomeration and Haemocompatibility of Vitamin E TPGS Surface Modified Berberine Chloride Nanoparticles," *BioMed Research International Volume*, p. 11, 2014.
- [409] S. Rezzola, M. Belleri, G. Gariano, D. Ribatti, C. Costagliola, F. Semeraro, and M. Presta, " In vitro and ex vivo retina angiogenesis assays," *Angiogenesis*, vol. 17, pp. 492-442, 2014.
- [410] W. Chen, Y. Wu, M. Zheng, Q. Gu, Z. Zheng, X. Xia, "Establishing an experimental rat model of photodynamically-induced retinal vein occlusion using erythrosin B," *Int J Ophthalmol*, vol. 7, nr. 2, pp. 232-238, 2014.
- [411] C.O. Răducanu, L. Chelaru, L. Simion, M Costuleanu, "Biochemical effects of biological supports-included stem cells on eye cells development," *Rev. Chim.* (*Bucharest*), vol. 67, nr. 11, pp. 2262-2265, 2016.
- [412] A. Goriuc, "Apoptoza în hipercreşterea gingivală indusă medicamentos. Teză de doctorat.," UMF "Grigore T. Popa", Iaşi, 2011.
- [413] Y Long, M Wang, H Gu, X Xie, "Bromodeoxyuridine promotes full-chemical induction of mouse pluripotent stem cells," *Cell Res*, vol. 24, pp. 1171-1174, 2015.
- [416] D. Wu, F. Xu, B. Sun, R. Fu, H. He, K. Matyjaszewski, "Design and preparation of porous polymers," *Chemical Reviews*, vol. 112, nr. 7, pp. 3959-4015, 2012.
- [420] A.G.B. Pereira, E.C. Muniz, Y.-L. Hsieh, "1H NMR and 1H–13C HSQC surface characterization of chitosan–chitin sheath-core nanowhiskers," *Carbohydr. Polym.*, vol. 123, nr. 5, pp. 46-52, 2015.
- [421] M. V Debandi, C. Bernal and N. J Francois, "Development of Biodegradable Films Based on Chitosan/Glycerol Blends Suitable for Biomedical Applications," J. Tissue Sci. Eng., vol. 7, nr. 3, pp. 1-9, 2016.
- [422] N. Sarkar, I. J. Kim, "Porous ceramics," în Advanced ceramic processing, A. Mohamed, Ed., InTech, 2015, pp. 55-84.

- [423] M.A. Dobrovolskaia, J.D. Clogston, B.W. Neun, J.B. Hall, A.K. Patri, S.E. McNeil, "Method for Analysis of Nanoparticle Hemolytic Properties In Vitro," *Nano letters*, vol. 8, nr. 8, pp. 2180-2187, 2008.
- [424] http://ec.europa.eu/health/documents/communityregister/2011/2011032498889/anx_9 8889_ro.pdf.
- [425] H. Gupta, M. Aqil, R. K. Khar, A. Ali, A. Bhatnagar & G. Mittal, "Biodegradable levofloxacin nanoparticles for sustained ocular drug delivery," *J. Drug Target.*, vol. 19, nr. 6, pp. 409-417, 2011.
- [426] P. Kraft, J.A. Bajgrowicz, C. Denis, and G. Frater, "Odds and Trends: Recent Developments in the Chemistry of Odorants Note on trademarksWords which we know or have reason to believe constitute registered trademarks (R) are designated as such.," *Angewandte Chemie International*, vol. 39, pp. 2890-3010, 2000.
- [427] H. Sheardown, M. W. Saltzman, "Novel Drug Delivery Systems for Posterior Segment Ocular Diseas," în *In Ocular Angiogenesis: Diseases, Mechanisms, and Therapeutics*, J. T. CJ Barnstable, Ed., Totowa, Humana Press Inc., 2006, pp. 393-408.
- [428] L. Hussain; D. Ashwini; D. Shirish, "Kinetic modeling and dissolution profiles comparison: an overview," *Int J Pharm Bio Sci*, vol. 4, nr. 1, pp. 728 - 737, 2013.

Valorificarea rezultatelor cercetării

Lucrări științifice acceptate spre publicare în reviste cu factor de impact

- Modern Drug Delivery Systems for Targeting the Posterior Segment of the Eye, Catalina Anisoara Peptu, Marcel Popa, Corina Savin, Radu Florin Popa and Lacramioara Ochiuz, Current Pharmaceutical Design, Volume 21, Number 42, December 2015, pp. 6055-6069 (15) (IF=2.757)
- Polyglobalide-based porous networks containing poly(ethylene glycol) structures prepared by photoinitiated thiol-ene coupling, C. L. Savin, C. Peptu, Z. Kronekova, M. Sedlačík, M. Mrlik, V. Sasinkova, C. A. Peptu, M. Popa, J. Mosnacek, Biomac., 2018 -Acceptată spre publicare (IF= 5.738)

Lucrări științifice trimise spre publicare în reviste cu factor de impact

C.L. Savin, M. Popa, C. Delaite, C.A. Peptu, PEG methacrylate -grafted chitosan nanoparticles as carrier for controlled release of bevacizumab, International Journal of Biological Macromolecules

Lucrări științifice în curs de redactare

C.L. Savin, M. Popa, C. Delaite, C.A. Peptu, Poly (ethylene glycol) methyl ether acrylate Grafted Chitosan Micro and Nanoparticles with Potential Applications in Ophthalmology

Capitol de carte

 Chemically modified polysaccharides with applications in nanomedicine, J. Desbrieres, C.A. Peptu, C. Savin, M. Popa, chapter X, in Biomass as renewable raw materials for bioproducts, Eds. V.I.Popa and I.Volf, 2018

Cerere brevet

 Procedeu de preparare a unor suporturi polimerice/nanoparticulate pe baza unui nou derivat de chitosan, pentru includerea şi eliberarea de medicamente hidrosolubile Catalina Anisoara PEPTU, Corina Lenuta SAVIN, Lacramioara OCHIUZ, Corneliu Sergiu STAN, Marcel POPA

Comunicări prezentate la manifestări științifice internaționale

A) În Romania

- Corina Savin, Catalina Anisoara Peptu, Marcel Popa, Developing a new system of micro
 / nanoparticles based on chitosan gelatine for ophthalmology applications, Annual
 Scientific Session of the Research Institute Acad. Ion Haulica Apollonia jointly with the
 University of experimental and clinical physiology of the stomatognate system in the Iasi
 Branch of the Romanian Academy, 2015, Iasi, Romania Prezentare orală
- Andriţoiu Calin Vasile, Corina Lenuţa Savin, Diana Ciubotaru, Peptu Catalina Anişoara, Marcel Popa, Evaluation of The Effect of the Collagen-Based Formulation on Cutaneous lesions, International Congress 7TH National congress with international participation and 33rd annual scientific session of the Romanian society for cell biology, 2015, Baia Mare, Romania – Prezentare orală
- C.A. Peptu, C.L. Savin, G. Andrew, C. E. Iurciuc (Tincu), M. Popa. Poly (ethylene glycol methacrylate) grafted chitosan micro particles for ophthalmic applications, International Conference of materials science and engineering, 9th edition of BRAMAT 2015, Brasov, Romania – Poster
- C.E. Iurciuc (Tincu), C.L. Savin, A. Savin, M. Popa, P. Martin, Immobilized yeast cells in spherical gellan matrices: a comparative study, International Conference of materials science and engineering, 9th edition of BRAMAT 2015, Brasov, Romania – Poster
- 5. Corina Savin, Marcel Popa, Manuela Ozturk, Vasile Drug, Danut Costin, Cătălina A. Peptu, Particulated carriers based on poly(ethylene glycol) methacrylate grafted chitosan for administration of levofloxacin at intraocular level, Iasi Academic Days, The XXV-nd Symposium, "Progress in organic and polymer chemistry", "Petru Poni" Institute of Macromolecular Chemistry, 2015, Iasi, Romania – Poster
- Cătălina A. Peptu, Corina Savin, Jacques Desbrieres, Nela Bibire, Marcel Popa, Micro and nanoparticles based on natural polymers with potential applications in the treatment of ophthalmic diseases, International Congress of University "APOLLONIA" Promoting Excellence in Iasi preparing future XXVI edition of the 3 to 5 March 2016, Iasi, Romania – Prezentare orală
- 7. Savin Corina-Lenuta, Mosnacek Jaroslav, Popa Marcel, Peptu Catalina, Peptu Cristian, Polyglobalide crosslinked networks via photoinitiated thiol-ene coupling, Congresul Internațional al Universității "Apollonia" din Iași, Ediția a XXVIII-a 1-4 martie 2018, IAȘI, ROMANIA – Prezentare orală

B) În străinătate

- Cătălina A. Peptu, Savin Corina, Marcel Popa, Micro and nanocarriers based on poly(ethylene glycol) methacrylate grafted chitosan for targeting the posterior segment of the eye, 6th Bratislava Young Polymer Scientists workshop, BYPOS, 2016, Slovakia – Poster
- Corina Savin, Marcel Popa, Jacques Desbrieres, Nela Bibire, Cătălina A. Peptu, Preparation and characterisation of nanoparticles based on poly(ethylene glycol) methacrylate grafted chitosan for intraocular administration of antibiotics, World Biomaterials Congress (WBC) 2016, Montreal, Canada – Poster
- Corina Savin, Cătălina A. Peptu, Marcel Popa, Christelle Delaite, Gerard Riess, New type of nanoparticles based on PEG methacrylate/acrylate grafted chitosan: a comparative study, XII th French-Romanian Polymer Meeting, 2016, Sophia Antipolis, France Poster
- M. Popa, C. Savin, C.Delaite, G.Riess, C.A.Peptu, Poly (ethylene glycol) methacrylate and poly (ethylene glycol) methyl ether acrylate grafted chitosan nanoparticles with potential applications in ophthalmology, Fifth International Symposium Frontiers in Polymer Science, 17-19 May 2017, Seville, Spain – Poster
- C. Peptu, C. Savin, M. Popa, Micro- and nanocarriers based on pooly(ethylene glycol) methacrylate and poly(ethylene glycol) methyl ether acrylate grafted chitosan, Materials, Methods and Technologies, 26-31 june 2017, Elenite, Bulgaria - Poster
- C. Peptu, C. Savin, Preparation of porous polymer gels through photoinitiated thiolene coupling, The International Conference on Functional Materials and Biomaterials, Nov. 17-19, 2017, Yichang, Hubei, China – Prezentare orală
- Corina-Lenuta Savin, Delia Iurea, Marcel Popa, Christelle Delaite, Gerard Riess, Catalina
 A. Peptu, Poly (ethylene glycol) methyl ether acrylate Grafted Chitosan Micro and
 Nanoparticles with Potential Applications in Ophthalmology, 4th International
 Conference on Biomedical Polymers & Polymeric Biomaterials, 15-18 July 2018,
 Kraków, Poland Poster