



**UNIVERSITATEA TEHNICĂ "GHEORGHE ASACHI" DIN IAȘI**  
**Facultatea de Inginerie Chimică**  
**și Protecția Mediului**

**Noi sisteme polimere pentru includerea, transportul și eliberarea susținută a  
unor principii biologice active : hidrogeluri și nanocapsule**

**REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT**

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

**Doctorand:**  
**Mihalache Cristian**

**Iași - 2021**

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

Către \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Vă facem cunoscut că, în ziua de **24.03.2021** la ora **11.00** în <https://meet.google.com/cxw-tzbt-bxd>, va avea loc susținerea publică a tezei de doctorat intitulată:

**„NOI SISTEME POLIMERE PENTRU INCLUDEREA, TRANSPORTUL ȘI ELIBERAREA SUSȚINUTĂ 2  
A UNOR PRINCIPII BIOLOGIC ACTIVE : HIDROGELURI ȘI NANOCAPSULE „**

elaborată de domnul **Cristian MIHALACHE** în vederea conferirii titlului științific de doctor.

Comisia de doctorat este alcătuită din:

Prof.univ.dr.ing. Teodor Mălușan Universitatea Tehnică "Gheorghe Asachi" din Iași	președinte
Prof.univ.em.dr.ing.Dr.H.C. Marcel Popa Universitatea Tehnică "Gheorghe Asachi" din Iași	conducător de doctorat
Prof.univ.dr.farm. Lăcrămărașă Orhuz Universitatea de Medicină și Farmacie „Grigore T. Popa" din Iași	referent oficial
Prof.univ.dr.ing. Lucian-Mircea Rusnac Universitatea „Politehnica" din Timișoara	referent oficial
Prof.univ.dr.ing. Leonard-Ionuț Atanase Universitatea Apollonia din Iași	referent oficial


Cu această ocazie vă invităm să participați la susținerea publică a tezei de doctorat accesând link-ul: <https://meet.google.com/cxw-tzbt-bxd>

**RECTOR,**

Prof.univ.dr.ing. **DAN**



Secretar universitate,

  
Ing. Cristina Nagi

## *Mulțumiri ...*

Cu deosebit respect și recunoștință aș dori să mulțumesc *domnului profesor Marcel Popa*, în calitate de conducător științific al acestei teze de doctorat, pentru optimismul, profesionalismul, efortul depus și răbdarea de care a dat dovadă în îndrumarea mea științifică pe toată perioada mea de cercetare.

De asemenea, în mod deosebit doresc să- i mulțumesc doamnei *C.S.III dr. bioing. Delia Mihaela Rață*, pentru răbdarea, profesionalismul, sprijinul permanent și încrederea pe care mi le- a acordat în acești ani pentru a duce la bun sfârșit această teză de doctorat.

De asemenea doresc să mulțumesc membrilor comisiei pentru atenția și exigența profesională acordate prin recenzarea lucrării.

Doresc sa adresez mulțumirile cuvenite tuturor celor care, direct sau indirect, prin sugestiile oferite au contribuit la șlefuirea mea, dar și la acest demers științific și m-au susținut în finalizarea lui. Mulțumesc astfel *domnului profesor dr. Vasile Burlui* pentru îndrumarea spre o noua etapa din cariera mea, *doamnei șef lucrări dr. Ivona Daniela Tomiță* pentru tot sprijinul și încrederea acordată.

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 recunoștința mea.

În încheiere mulțumesc în mod special **soției mele Roxana** și **parinților mei**, care m-au sprijinit necondiționat pe toata perioada studiilor doctorale, pentru răbdarea de a mă motiva de a fi puternic și de a persevera în viața personală și profesională.

## CUPRINS

<b>Introducere</b>	<b>1</b>
<b>PARTEA I. Cercetare bibliografică</b>	
<b>Capitolul 1.</b>	
1.1.Sisteme polimerice de eliberare controlată a principiilor biologic active	<b>5</b>
1.1.1. Generalități	<b>5</b>
1.1.2. Clasificarea sistemelor polimerice de eliberare a principiilor biologic active	<b>6</b>
1.1.3. Polimeri utilizați în obținerea suporturilor pentru includerea de principii biologic active.	<b>8</b>
1.1.3.1.Polimerii naturali	<b>9</b>
1.1.3.2.Polimerii artificiali	<b>15</b>
1.1.3.3.Polimeri sintetici biodegradabili	<b>17</b>
1.1.3.4.Polimerii sintetici nebiodegradabili	<b>19</b>
1.1.4. Aspecte privind mecanismul și cinetica procesului de eliberare a principiilor biologic active din suporturi polimerice - modele cinetice	<b>20</b>
1.1.4.1. Modelul cinetic de ordinul zero	<b>21</b>
1.1.4.2. Modelul cinetic de ordinul întâi	<b>24</b>
1.1.4.3. Modelul Higuchi	<b>24</b>
1.1.4.4. Modelul Hixson–Crowell	<b>25</b>
1.1.4.5. Modelul Ritger–Peppas si Korsmeyer–Peppas (Legea puterii)	<b>26</b>
1.1.4.6. Modelul Brazel si Peppas	<b>26</b>
1.1.4.7. Modelul Baker si Lonsdale	<b>27</b>
1.1.4.8. Modelul Hopfenberg	<b>27</b>
1.1.4.9. Modelul Weibull	<b>28</b>
1.1.4.10. Modelul Peppas–Sahlin	<b>28</b>
1.1.5. Rețele polimerice cu caracter de hidrogel pentru includerea și eliberarea controlată de principii biologice active	<b>29</b>
1.1.5.1. Tipuri de rețele polimerice pe baza de polimeri hidrofilii (IPN, semi-IPN s.a.)	<b>29</b>
1.1.5.2.Metode de obținere a hidrogelurilor	<b>30</b>
1.1.5.3. Principalele proprietăți ale hidrogelurilor polimerice – metode de caracterizare	<b>32</b>
1.1.5.4. Aplicații ale rețelelor polimerice de tip hidrogel în domeniul biomedical	<b>35</b>
1.1.5.4.1. Aplicații în cultura de celule 3D	<b>36</b>
1.1.5.4.2. Aplicații în vindecarea plăgilor	<b>36</b>
1.1.5.4.3. Aplicații în ingineria tisulară	<b>37</b>
1.1.5.4.4. Aplicațiile hidrogelurilor în eliberarea de medicamente	<b>38</b>
1.1.6. Sisteme micro/nanoparticulate pentru includerea și eliberarea controlată a principiilor biologic active	<b>39</b>
1.1.6.1. Clasificarea micro/nanoparticulelor polimere	<b>40</b>
1.1.6.2. Metode de obținere a micro/nanoparticulelor (micro/nanocapsulelor)	<b>41</b>
1.1.6.3. Principalele proprietăți ale micro/nanoparticulelor (micro/nanocapsulelor) destinate includerii și eliberării controlate a principiilor biologic active	<b>42</b>
1.1.6.4.Aplicații ale sistemelor polimere micro/nanoparticulate în nanomedicina	<b>44</b>
1.1.6.4.1. Aplicații antitumorale	<b>44</b>

1.1.7. Aplicații ale sistemelor polimere (hidrogeluri, micro/nanocapsule) purtatoare de medicamente în tratarea afecțiunilor stomatologice	45
1.1.7.1. Sisteme de eliberare orodentară pe bază de chitosan	47
1.1.7.2. Sisteme de eliberare orodentară pe bază de celuloză și derivați de celuloză	48
1.1.7.3. Sisteme de livrare orodentară bazate pe alte polizaharide	49
<b>PARTEA II. Rezultate originale</b>	
<b>OBIECTIVELE CERCETĂRII</b>	52
<b>Capitolul 2. Materiale , tehnici de lucru, metode de caracterizare</b>	53
2.1. Materiale utilizate	53
2.2.1. Materiale utilizate pentru prepararea hidrogelurilor	53
2.1.1.1. Tehnici de sinteză	55
2.1.1.2. Metode de analiză și caracterizare	57
2.1.1.2.1. Spectroscopia FTIR	57
2.1.1.2.2. Microscopia electronica de baleaj (SEM)	58
2.1.1.2.3. Umflarea hidrogelurilor în soluții apoase	58
2.1.1.2.4. Eliberarea Bupivacainei din hidrogeluri	59
2.1.2.1.5. Consideratii teoretice privind eliberarea medicamentului	59
2.1.1.2.6. Citotoxicitate in vitro	60
2.1.1.2.7. Test in vivo al efectului anestezic. Model experimental	61
2.1.2. Materiale utilizate pentru prepararea nanocapsulelor pe bază de chitosan funcționalizat cu aptamer	62
2.1.2.1. Tehnici de sinteză	64
2.1.2.1.1. Sinteza chitosanului carboxilat	64
2.1.2.1.2. Sinteza copolimerului poli (N-vinil pirolidona-alt-anhidrida itaconica) – poli(NVPAI)	64
2.1.2.2. Obținerea și caracterizarea nanocapsulelor pe bază de chitosan funcționalizat cu aptamer	65
2.1.2.2.1. Funcționalizarea carboximetil chitosanului cu aptamer	65
2.1.2.2.2. Obținerea nanocapsulelor pe bază de pol (NVPAI) și chitosan/CCA	65
2.1.2.3. Metode de analiză și caracterizare	67
2.1.2.3.1. Spectroscopia FTIR	67
2.1.2.3.2. Spectroscopia RMN	67
2.1.2.3.3. Difuzia dinamică a luminii (DLS)	67
2.1.2.3.4. Potențialul zeta al nanocapsulelor	67
2.1.2.3.5. Microscopia electronică de baleiaj (SEM)	68
2.1.2.3.6. Determinarea compoziției elementale	68
2.1.2.3.7. Umflarea nanocapsulelor în soluții apoase	68
2.1.2.3.8. Studii de încărcare a nanocapsulelor NCA cu 5-Fluorouracil (5FU)	69
2.1.2.3.9. Eliberarea in vitro a 5-Fluorouracilului (5FU)	69
2.1.2.3.10. Evaluarea permeabilității in vitro	70
2.1.2.3.11. Analiza teoretică a eliberării medicamentului	71
2.1.2.3.12. Testul de hemoliză	71
2.1.2.3.13. Evaluarea in vitro a citotoxicității nanocapsulelor	72
2.1.2.3.14. Evaluarea potentialului iritativ al nanocapsulelor funcționalizate cu aptamer	73
2.1.2.3.15. Studiul in vitro al nanocapsulelor pe celule tumorale de tip TE 354.T	74
2.1.3 Materiale utilizate pentru prepararea unor formulări topice de tip gel pe bază de	76

nanocapsule funcționalizate cu aptamer, încărcate cu 5-fluorouracil	
2.1.3.1 Metoda de preparare	77
2.1.3.2 Metode de caracterizare	78
2.1.3.2.1. Caracterizarea reologică	78
2.1.3.2.2. Evaluarea apoptozei folosind tehnica citometriei în flux	78
<b>Capitolul 3. Sinteza și caracterizarea unor hidrogeluri pe bază de pol (acetat de vinil-alt-anhidridă maleică) și chitosan purtătoare de bupivacaină cu aplicații în medicina dentară</b>	<b>80</b>
3.1. Caracterizarea structurală	81
3.2. Morfologia hidrogelurilor	82
3.3 Comportamentul hidrogelurilor la umflare în soluție apoasă	84
3.4 Profilul de eliberare a bupivacainei	85
3.5 Analiza teoretică a procesului de eliberare a medicamentului	86
3.6 Analize de viabilitate celulară	88
3.7 Studii <i>in vivo</i> ale hidrogelurilor încărcate cu bupivacaină	88
<b>Concluzii</b>	<b>90</b>
<b>Capitolul 4. Sinteza și caracterizarea unor nanocapsule pe bază de poli(N-vinil pirolidona-alt-anhidrida itaconica) și carboximetil chitosanul funcționalizat cu aptamer încărcate cu 5-Fluorouracil</b>	<b>91</b>
4.1 Caracterizarea unor precursori polimerici necesari în prepararea nanocapsulelor	92
4.2 Caracterizarea nanocapsulelor pe bază de chitosan funcționalizat cu aptamer	95
4.2.1. Caracterizarea chitosanului funcționalizat cu aptamer	95
4.2.2. Caracterizarea nanocapsulelor pe bază de chitosan funcționalizat cu aptamer	96
4.2.2.1. Spectroscopia FTIR	97
4.2.2.2. Determinarea compoziției elementale	98
4.2.2.3. Diametrul mediu al nanocapsulelor	100
4.2.2.4. Determinarea potențialului zeta	101
4.2.2.5. Microscopia electronică de baleiaj (SEM)	102
4.2.2.6. Capacitatea de umflare a nanocapsulelor în soluții apoase	103
4.2.2.7. Studii de încărcare a nanocapsulelor cu 5-Fluorouracil	105
4.2.2.8. Testele de permeabilitate pe membrană artificială Strat-M	107
4.2.2.9. Analiza teoretică a eliberării medicamentului	108
4.2.2.10. Testul de hemoliză	111
4.2.2.11. Studiul <i>in vitro</i> al citotoxicității nanocapsulelor funcționalizate cu aptamer (cu și fără medicament încapsulat)	111
4.2.2.12. Evaluarea potențialului iritativ al nanocapsulelor funcționalizate cu aptamer (cu și fără medicament încapsulat)	112
4.2.2.13. Studiul <i>in vitro</i> al nanocapsulelor pe celule tumorale de tip TE 354.T	113
4.2.2.14. Capacitatea de țintire a nanocapsulelor prin schimbarea intensității de fluorescență	115
<b>Concluzii</b>	<b>116</b>
<b>Capitolul 5. Caracterizarea și testarea formulărilor topice de tip gel pe bază de nanocapsule funcționalizate cu aptamer încărcate cu 5-fluorouracil</b>	<b>117</b>
5.1. Caracterizarea reologică a formulărilor topice de tip gel pe bază de nanocapsule funcționalizate cu aptamer încărcate cu 5-fluorouracil	118
5.2. Stabilirea profilului cinetic de eliberare <i>in vitro</i> a 5-fluorouracilului din formulările obținute	120

5.3. Testul de hemoliză	121
5.4. Evaluarea potențialului iritativ indus de formulările de tip gel	122
5.5. Evaluarea citotoxicității formulărilor topice de tip gel pe bază de nanocapsule funcționalizate asupra celulelor fibroblaste de proveniență dermică	123
5.6. Evaluarea citotoxicității formulărilor topice de tip gel pe bază de nanocapsule funcționalizate asupra celulelor tumorale TE 354.T prin metoda MTT	125
5.7. Evaluarea apoptozei folosind tehnica citometriei în flux	129
<b>Concluzii</b>	<b>132</b>
<b>Concluzii generale</b>	<b>133</b>
<b>Referințe bibliografice</b>	<b>138</b>
<b>Valorificarea rezultatelor cercetării</b>	<b>161</b>

## INTRODUCERE

Au trecut practic 60 de ani de când, într-o celebră conferință prezentată la American Physical Society (29 Decembrie, 1959), intitulată sugestiv “*There’s Plenty of Room at the Bottom*”, Laureatul Premiului Nobel pentru fizică (1965) și unul dintre cei mai mari fizicieni ai lumii, Richard Phillips Feynman lansa conceptul de **nanostiință**, reprezentând sinteza de noi materiale prin manipularea directă a atomilor. Începea astfel o nouă eră în obținerea materialelor, impunându-se și termenul de **nanotehnologie**, respectiv manipularea materiei la nivel atomic, molecular și supramolecular. Prefixul **nano** se impune în toate domeniile științei, tehnologiei și chiar al vieții cotidiene, astfel încât implementarea începând din anul 1990 a termenului de **nanomedicină** a apărut cât se poate de firesc. El definește, în esență, aplicarea nanotehnologiei în medicină, scopul fiind acela de a monitoriza, ameliora și repara sistemul biologic uman acționând la nivel molecular prin utilizarea de nanostructuri și nanosisteme. Ultimele trei decenii îndeosebi cunosc o dezvoltare exponențială a nanomedicinii, consecință și a unor realizări remarcabile în domeniul biomaterialelor, îndeosebi a sistemelor de eliberare susținută/controlată a medicamentelor. S-a deschis perspectiva înlocuirii terapiei medicamentoase clasice cu administrare sistemică mai ales, în doze repetate, cu sisteme de eliberare controlată, de durată și mai ales țintită a medicamentului, avantajele fiind numeroase. Dezvoltarea unor astfel de sisteme a mers mână în mână și cu prepararea unor purtători de medicamente, îndeosebi de natură polimeră, și în cadrul acestora îndeosebi pe bază de polizaharide și protine, dar nu numai. Formularea unor astfel de sisteme s-a diversificat, incluzând geluri, hidrogeluri, micro- și nanoparticule, implanturi, inserturi, miclele ș.a, multe dintre acestea ajungând în stadiul de producere la nivel industrial. Aceasta a permis și diversificarea gamei de bioaplicații, astfel încât în prezent orice afecțiune a organismului uman poate fi, cel puțin în principiu, tratată cu sisteme polimer/medicament, chiar dacă pentru moment nu multe dintre aceste sisteme au trecut de stadiul de testare clinică.

În acest context se înscrie și prezenta teză de doctorat care are ca scop realizarea de două tipuri de suporturi polimere și în final sisteme de eliberare controlată a unor medicamente, și anume a unui nou hidrogel cu potențiale aplicații în domeniul medicinei stomatologice care constituie specialitatea autorului, respectiv nanocapsule purtătoare de medicamente antitumorale, cu potențiale aplicații în tratarea cancerului de piele.

Lucrarea este structurată în două părți, prima fiind rezultatul unui studiu bibliografic ce trece în revistă, desigur succint, problematica sistemelor polimere cu eliberare controlată a medicamentelor, iar cea de a doua constituind-o partea cu rezultatele originale, obținute în urma cercetărilor proprii.

Așadar, **Capitolul 1** (practic, studiul bibliografic) discută probleme privind definiția sistemelor de eliberare controlată cu purtător polimeric, clasificarea acestora, tipurile de polimeri utilizabili pentru realizarea lor, aspecte cinetice privind eliberarea medicamentelor din aceste sisteme cu trecerea în revistă a diferitelor modele dezvoltate în timp, aspecte privind obținerea, caracterizarea și aplicațiile medicale (în domeniu stomatologic, respectiv în terapia cancerului) ale două tipuri de formulări, respectiv hidrogeluri și nanoparticule (nanocapsule), care fac obiectul cercetărilor originale din cadrul tezei.

Cu **Capitolul 2** debutează partea a doua a lucrării, respectiv cercetarea întreprinsă. Sunt prezentate aici materialele, metodele de lucru, tehnicile de caracterizare, apartura și echipamentele de lucru utilizate.

**Capitolul 3** prezintă noul hidrogel obținut, care prezintă caracter de noutate, structura și proprietățile sale, capacitatea sa de a include și elibera controlat principiul biologic activ, modelarea



matematică a cineticii procesului de eliberare, precum și aplicarea sa *in vivo* pe animale de experiență, cu evidențierea efectelor produse.

În **Capitolul 4** sunt prezentate rezultatele privind obținerea unor nanocapsule inovative încărcate cu un antitumoral, funcționalizate cu un ligand și capabile astfel de ținti celulele tumorale specifice carcinomului bazal. Nanocapsulele sunt caracterizate fizico-chimic, structural, morfologic, din punct de vedere al calităților de biomaterial (cototoxicitate, hemocompatibilitate, capacitate *in vitro* de se fixa îndeosebi la celule tumorale, capacitate de a încapsula și a elibera treptat 5-fluorouracilul, medicament antitumoral selectat pentru studiu.

În final, **capitolul 5** în economia tezei, prezintă obținerea și caracterizarea unor formulări topice de tip gel, pe bază de nanocapsule funcționalizate, încărcate cu 5-fluorouracil, destinate tratării cancerului de piele. Formulările sunt caracterizate reologic probând o bună capacitate de etalare pe piele, din punct de vedere al citotoxicității și potențialului iritativ, al capacității de a acționa asupra celulelor tumorale, și este evaluată apoptoza acestora la contactul cu sistemul polimer-medicament.

Lucrarea prezintă concluzii la sfârșitul fiecărui capitol, se încheie cu un capitol **Concluzii generale**, urmat de lista bibliografică și de lista cu modul de valorificare a rezultatelor cercetării.

Teza de doctorat se întinde pe un număr de 162 pagini, cuprinde 68 figuri, 12 tabele, 6 scheme, 22 relații/ecuații de calcul, 236 de trimiteri bibliografice.

În rezumat sunt prezentate selectiv o serie de rezultate raportate pentru fiecare dintre cele trei capitole ale părții originale, păstrându-se numerotarea paragrafelor, figurilor, tabelelor, schemelor, relațiilor și ecuațiilor de calcul, respectiv a bibliografiei, ca în teza de doctorat

## OBIECTIVELE CERCETĂRII

**Obiectivul principal** al tezei de doctorat l-a constituit realizarea a două noi sisteme polimer/medicament cu potențiale aplicații biomedicale, și anume în domeniul medicinei dentare, respectiv în tratarea unei forme de cancer al pielii – carcinomul bazo-celular (BCC).

Îndeplinirea obiectivului principal a presupus rezolvarea unor obiective specifice după cum urmează.

**Sinteza unui nou hidrogel** destinat includerii de anestezice locale cu efect rapid și eliberare la locul afecțiunii, utilizate în tratamente stomatologice specifice precum și **realizarea sistemului polimer-medicament pe** această bază.

**Obținerea unui nou tip de nanocapsule polimerice funcționalizate** destinate includerii, transportului și eliberării „la țintă” a unui medicament antitumoral, cu potențială aplicație în tratarea cancerului de piele.

**Obținerea sistemului polimer-medicament** pe baza nanocapsulelor anterior sintetizate, încărcarea acestora cu 5-fluorouracil ca model de medicament antitumoral și caracterizarea sistemului din punct de vedere al caracteristicilor de biomaterial și al capacității de a ținti celulele tumorale (BCC).

**Realizarea unor formulări de tip gel** pe baza nanocapsulelor încărcate cu 5-fluorouracil, cu aplicare dermică pentru tratarea topică a cancerului de tip BCC.

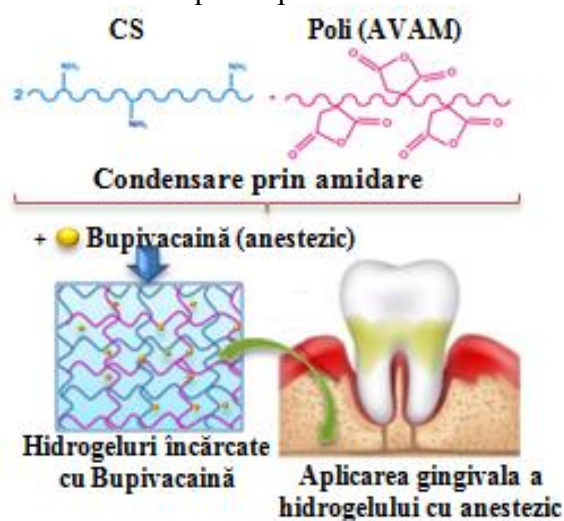
### CAPITOLUL 3

#### Sinteza și caracterizarea unor hidrogeluri pe bază de poli(acetat de vinil-*alt*-anhidridă maleică) și chitosan purtătoare de bupivacaină cu aplicații în medicina dentară

Acest capitol aduce în atenție un nou tip de hidrogeluri polimerice încărcate cu un anestezic (Bupivacaină) care pot fi utilizate în stomatologie pentru eliberarea controlată și rapidă a medicamentului în momentul în care suportul polimeric intră în contact direct cu mucoasa gingivală.

Originalitatea abordării noastre constă în folosirea unui polimer sintetic, și anume poli [(anhidridă maleică) -*alt*- (acetat de vinil)]-poli (AVAM) care nu a mai fost utilizat până acum pentru obținerea de hidrogeluri, precum și a combinației acestuia cu un polimer natural (chitosan) pentru a obține un material nou cu comportament de hidrogel.

O reprezentare schematică a conceptului prezentului studiu este prezentată în Figura 22.



**Figura 22.** Ilustrație schematică a hidrogelurilor încărcate cu Bupivacaină, cu acțiune în anestezia locală

Mucoadezivitatea este o proprietate importantă a sistemelor polimer-medicament, asigurând contactul permanent al acestora cu mucoasa ceea ce duce la creșterea biodisponibilității medicamentului și la reducerea efectelor secundare.

Metoda de preparare a hidrogelurilor s-a bazat pe un proces de condensare folosind amidarea. Această metodă are avantajul de formare rapidă a unei rețele, la temperatura ambiantă și la presiunea atmosferică, fără a utiliza agenți de reticulare suplimentari, frecvent toxici și dificil de îndepărtat. Reacția a avut loc prin deschiderea ciclurilor de anhidridă ale copolimerului, care sunt foarte reactive la temperatura ambiantă, sub acțiunea grupărilor  $\text{NH}_2$  ale chitosanului, în cele din urmă formând o membrană polimerică subțire. Aceasta are o structură reticulată, punțile dintre lanțurile polimerice aparținând celor doi parteneri fiind asigurate de legăturile amidice nou formate.

**Tabelul 2.** Program experimental și codificare a hidrogelului din care s-au preparat probele

Codul probelor	Raportul molar Poli (AVAM)/ $\text{NH}_2$	Cantitatea de poli (AVAM) în DMSO (g)	Raportul dintre DMSO/Apă (v/v)
CS-A-B-1	2/1	0.325	1:5
CS-A-B-2	1.33/1	0.217	1:5
CS-A-B-3	1/1	0.15	1:5

Pentru obținerea hidrogelurilor s-a urmărit un program experimental (Tabelul 2) în care s-a variat raportul molar dintre cei doi polimeri.

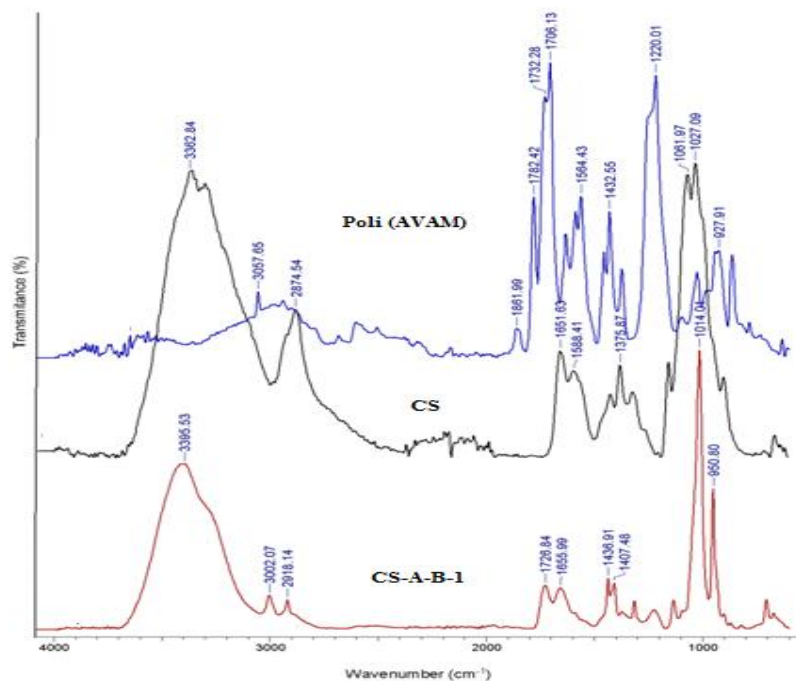
### 3.1. Caracterizarea structurală

Structurile polimerilor de pornire dar și a hidrogelului CS-A-B-1 au fost caracterizate utilizând spectroscopia FTIR (Figura 23). Spectrul chitosanului (CS) prezintă benzile caracteristice grupărilor carbonil (C=O) la  $1651\text{ cm}^{-1}$  și grupărilor amino libere ( $-\text{NH}_2$ ) la  $1588\text{ cm}^{-1}$ .

Spectrul poli (AVAM) prezintă benzi de absorbție la  $1782$  și  $1861\text{ cm}^{-1}$  care corespund vibrației de întindere a C=O din gruparea anhidridică.

Spectrul hidrogelului CS-AB-1 prezintă o bandă de absorbție la aproximativ  $1656\text{ cm}^{-1}$  corespunzător legăturii carbonilice din grupările amidice nou formate prin reacția copolimerului cu CS. Peak-ul de la aproximativ  $1726\text{ cm}^{-1}$  corespunde vibrației de întindere a  $-\text{C}=\text{O}$  din grupările carboxilice.

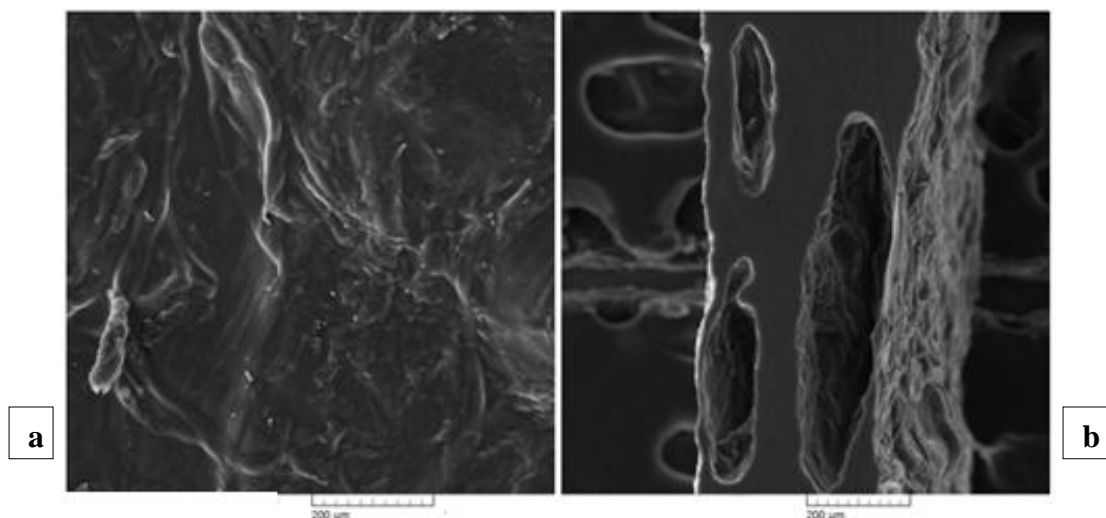
Apariția acestui peak combinat cu dispariția peak-ului corespunzător grupării anhidridice de la aproximativ  $1706\text{--}1732\text{ cm}^{-1}$  din poli (AVAM) evidențiază faptul că toate grupările de anhidridă au reacționat.



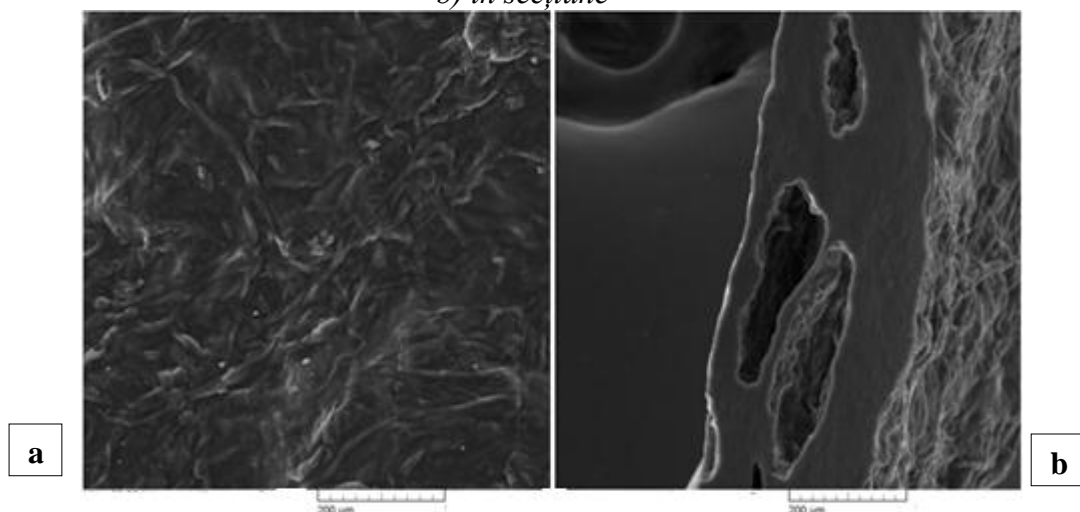
*Figura 23. Spectrul FTIR pentru hidrogelurile CS-A-B-1, CS, și poli(AVAM)*

### 3.2. Morfologia hidrogelurilor

Morfologia hidrogelurilor pentru probele CS-A-B-1 și CS-A-B-2 a fost investigată prin microscopie electronică de baleiaj (SEM) (Figurile 24 și 25). Microscopia de suprafață a filmelor de hidrogel relevă formațiuni fibrilare atribuite polizaharidei. Microscopia în secțiune relevă o structură macroporoasă cu pori eliptici, de dimensiuni neuniforme, aparent nedeterminate de compoziția hidrogelurilor. Lungimea axei mari a porilor variază între  $200$  și  $600\text{ }\mu\text{m}$ .



**Figura 24.** Microscopia electronică de baleiaj pentru proba de hidrogel CS-A-B-1: a) în suprafață; b) în secțiune



**Figura 25.** Microscopia electronică de baleiaj pentru proba de hidrogel CS-A-B-2: a) în suprafață; b) în secțiune

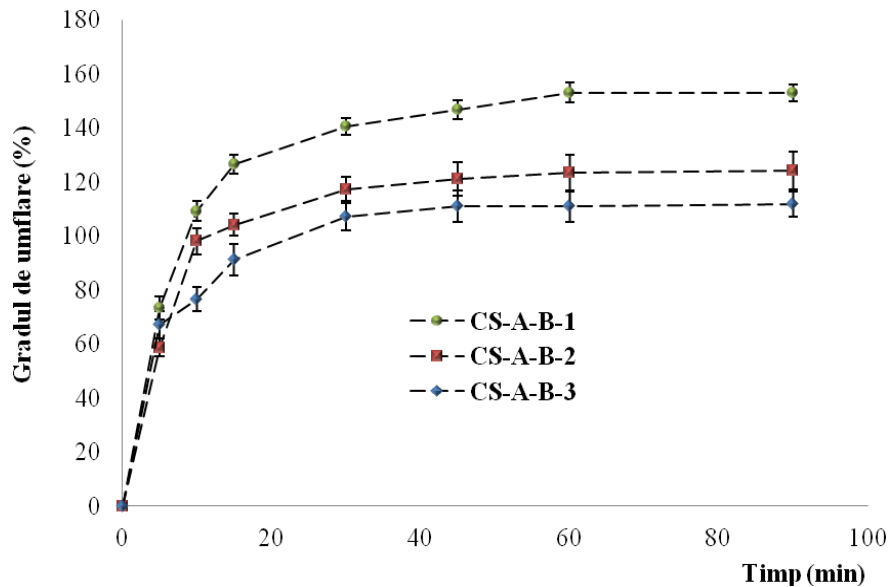
### 3.3 Comportamentul hidrogelurilor la umflare în soluție apoasă

S-a investigat comportamentul la umflare al hidrogelurilor obținute în mediu ușor alcalin (pH 7,4) pentru a le evalua potențialul de a fi utilizați ca purtători de medicamente în aplicații stomatologice, cunoscut fiind faptul că pH-ul salivei se plasează în domeniul slab bazic..

Umflarea hidrogelurilor este cauzată de pătrunderea apei prin difuzie în interiorul porilor hidrogelului până când aceștia sunt umpluți, urmată de umflarea membranei polimerice prin pătrunderea apei în ochiurile rețelei de hidrogel. Așa cum am menționat anterior, dimensiunea porilor nu este determinată, practic, de compoziția hidrogelului, deci nu poate influența capacitatea de umflare, aceasta fiind influențată de doi factori: densitatea de reticulare a rețelei (gradul de reticulare) și prezența unor grupări funcționale capabile să determine repulsiile electrostatice între lanțuri, mai mult sau mai puțin intense în funcție de proporția lor. Gradul de reticulare crește, în principiu, cu cantitatea de poli(AVAM), care este capabil să formeze un număr crescut de punți amidice între cei doi polimeri. În consecință, o creștere a raportului poli(AVAM)/CS trebuie să ducă la o scădere a gradului de umflare, consecință a creșterii gradului de reticulare. Cu toate acestea, un exces de poli(AVAM) (o parte care contribuie la amidarea grupărilor  $\text{NH}_2$  ale CS, iar restul

hidrolizând pentru a forma grupări carboxilice) face posibilă, în mediul ușor alcalin, apariția de grupe carboxilat, care sunt responsabile de efectele de repulsie electrostatică, ce duc astfel la creșterea dimensiunii ochiurilor rețelei, pătrunderea unor cantități mai mari de apă și în final la o creștere a gradului de umflare.

Prin urmare, creșterea cantității de poli(AVAM) are două efecte opuse asupra gradului de umflare, dar efectul predominant este formarea unui număr mare de grupări carboxilat având ca rezultat o creștere a gradului de umflare. Aceste considerații teoretice sunt susținute de rezultatele prezentate în Figura 26.



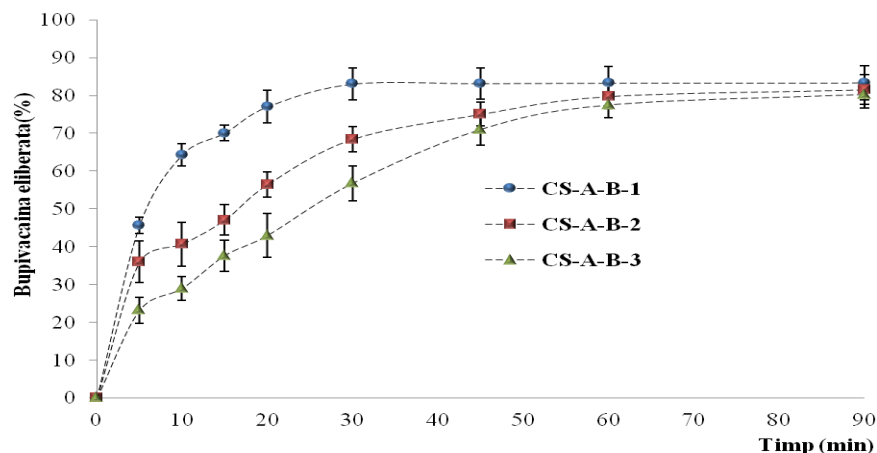
**Figura 26.** Curbele cinetice de umflare ale hidrogelurilor în condiții alcaline ( $pH = 7,4$ )

Rezultatele obținute arată că gradul de umflare a hidrogelurilor a fost situat între 110 și 155%, scăzând odată cu scăderea cantității de poli (AVAM) față de chitosan. Se poate observa că toate probele prezintă o umflare rapidă, care este cauzată de pătrunderea bruscă a apei în membrana polimerică, precum și în interiorul porilor hidrogelului, urmată de o umflare mai lentă până la aproximativ 30 min, după care se ajunge la echilibru. Rezultatele obținute conduc la concluzia că repulsiile electrostatice sunt importante, deci, în determinarea comportamentului de umflare, hidrogelurile obținute putând fi încadrate în categoria celor pH-sensibile.

### 3.4 Profilul de eliberare a bupivacainei

Rezultatele studiilor privind eliberarea de bupivacaină din hidrogeluri în soluție de tampon fosfat ( $pH = 7,4$ ) sunt prezentate în Figura 27, eficacitatea procesului variind între 80% și 84%. Este evident că raportul molar dintre cei doi polimeri are un rol important în eliberarea bupivacainei din hidrogeluri deoarece determină gradul de umflare și, în cele din urmă, transportul medicamentului prin matricea polimerică, printr-un proces difuzional. În primele 15 minute a apărut o eliberare rapidă a medicamentului din hidrogeluri, un fenomen cunoscut sub numele de efect de „explozie”. După acest interval de timp, s-a observat o eliberare lentă și atingerea stării de echilibru după aproximativ 60 min.

Este important de reținut că scopul acestui studiu a fost acela de a obține un sistem capabil să elibereze medicamentul în primele 15 minute după aplicare, asigurând astfel anestezie rapidă și creșterea complianței pacientului, rezultatele raportate demonstrând că el a fost atins.



**Figura 27.** Cinetica de eliberare in vitro a bupivacainei din hidrogeluri în soluție de tampon fosfat (pH 7,4)

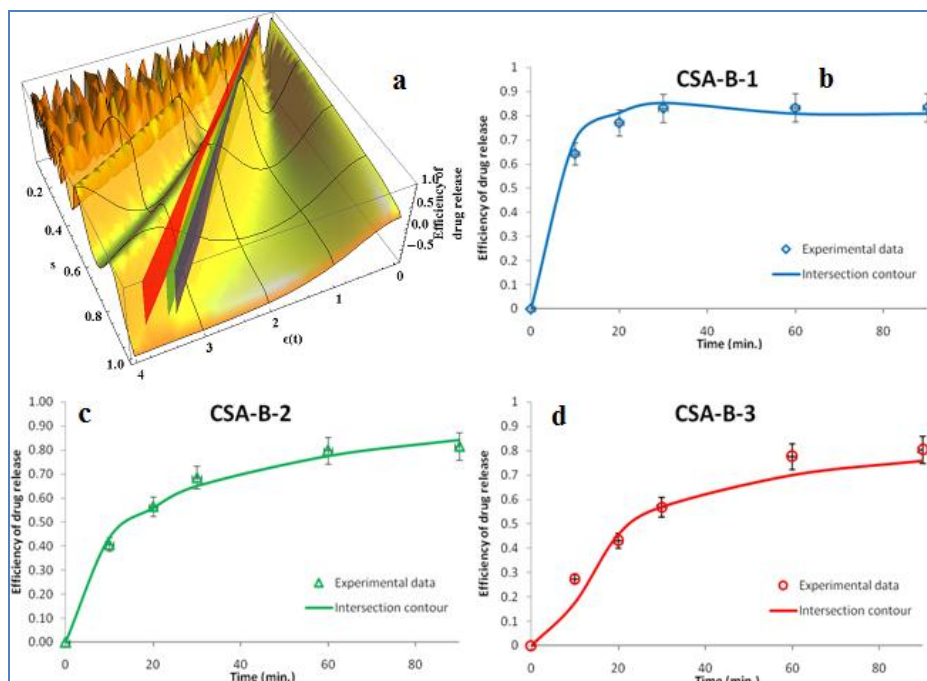
Se mai constată că eficiența de eliberare a medicamentului anestezic crește odată cu creșterea raportului poli (AVAM)/CS, în concordanță cu modul de variație a gradului de umflare.

### 3.5 Analiza teoretică a procesului de eliberare a medicamentului

Urmărind literatura de specialitate, neliniaritatea sistemului inițial  $s_0$  și rata de evoluție de la o stare instabilă și dezordonată (și invers) au fost determinate și sunt prezentate în Tabelul 3.

**Tabelul 3.** Parametrii neliniarității

Codul probei	CSA-B-1	CSA-B-2	CSA-B-3
$s_0$	0.0183	0.0167	0.0159
$\alpha$	6.290	4.078	3.757

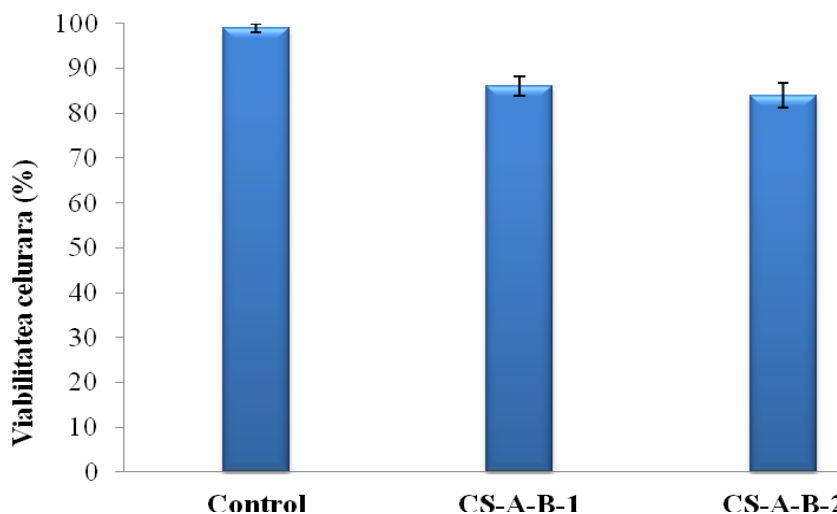


**Figura 28.** Dependența 3D a eficienței eliberării medicamentului (a) și a conturilor de intersecție față de cinetica de eliberare experimentală (b-d)

Putem observa că, deși eșantioanele au neliniaritate inițială comparabilă, adică o structură inițială comparabilă, rata de evoluție către stări instabile este de două ori mai mare pentru proba CS-A-B-1 comparativ cu CS-A-B-3, aproape egală cu raportul molar ( $\text{NH}_2/\text{AVAM}$ ) pentru aceste două probe. Ca o confirmare a acestei teorii, în Figura 28 sunt ilustrate cele mai bune fitări de date experimentale cu contururile de intersecție ale graficului teoretic tridimensional al modelului.

### 3.6 Analize de viabilitate celulară

Interacțiunea hidrogelurilor cu țesuturile corpului este crucială în înțelegerea efectelor potențiale ale unui material străin asupra corpului, iar viabilitatea celulară este una dintre cele mai frecvente analize pentru evaluarea citotoxicității biomaterialelor. Prin urmare, este de dorit ca un sistem să nu aibă efecte adverse asupra mediului celular și țesuturilor din apropiere. Pe baza rezultatelor obținute anterior, două probe de hidrogel încărcate cu bupivacaină (CS-AB-1 și CS-A-B-2) au fost selectate pentru a verifica citotoxicitatea, rezultatele obținute fiind prezentate în Figura 29. După cum se poate vedea, celulele fibroblaste tratate cu hidrogeluri prezintă o viabilitate bună (84% și 86%) care demonstrează clar că ambele tipuri de hidrogeluri nu au efecte citotoxice.



**Figura 29.** Viabilitatea celulelor fibroblaste tratate cu hidrogeluri de tip CS-A-B-1 și CS-A-B-2

### 3.7 Studii *in vivo* ale hidrogelurilor încărcate cu bupivacaină

Sensibilitatea la durere a fost testată la toate animalele de experiență utilizate în acest studiu prin pensarea mucoasei gingivale cu o pensă cu dinți la 10, 15, 20 și 30 min după administrarea anesteziei locale luând în considerare următoarele variabile: schimbări de comportament, retragerea imediată a capului și tendința de masticăție. În aceste studii *in vivo*, s-a utilizat pentru analiză proba de hidrogel CS-A-B-1 și s-au obținut rezultatele prezentate în Tabelul 4.

În același timp, pentru grupurile B și C au fost analizate macroscopic modificările la locul injecției cu bupivacaină (grupul B) și a zonei gingivale a hidrogelului încărcat cu bupivacaină (grupul C).

În grupul B s-a observat congestie locală și edem al mucoasei gingivale în jurul locului de injecție cu bupivacaină. În grupul C, în zonele cu hidrogel încărcat cu bupivacaină, nu s-au observat schimbări locale.



**Tabelul 4.** Efectul anestezic după nicio aplicare anestezică gingivală (grup de control; grupul A) și după tratamentul cu: injecție cu bupivacaină (5 mg/ml, flacon de 4 ml; grupul B); aplicarea gingivală a hidrogelului încărcat cu bupivacaină (20 mg bupivacaină/95 mg hidrogel; grupul C)

Grupul	Intervalele pentru testarea sensibilității la durere (min.)			
	10	15	20	30
<b>A</b>	Sensibilitate normală la durere	Sensibilitate normală la durere	Sensibilitate normală la durere	Sensibilitate normală la durere
<b>B</b>	Fără reacție dureroasă (anestezie instalată)	Fără reacție dureroasă (anestezie instalată)	Fără reacție dureroasă (anestezie instalată)	Reacție ușoară la durere prin ciupire cu o pensă cu dinți
<b>C</b>	Sensibilitate ușoară, cu o reacție redusă la tendința de mestecare	Fără reacție dureroasă (anestezie instalată)	Fără reacție dureroasă (anestezie instalată)	Reacție ușoară la durere prin ciupire cu o pensă cu dinți

Concluziile referitoare la acest studiu sunt sumarizate în capitolul **Concluzii generale** din finalul rezumatului.

#### CAPITOLUL 4

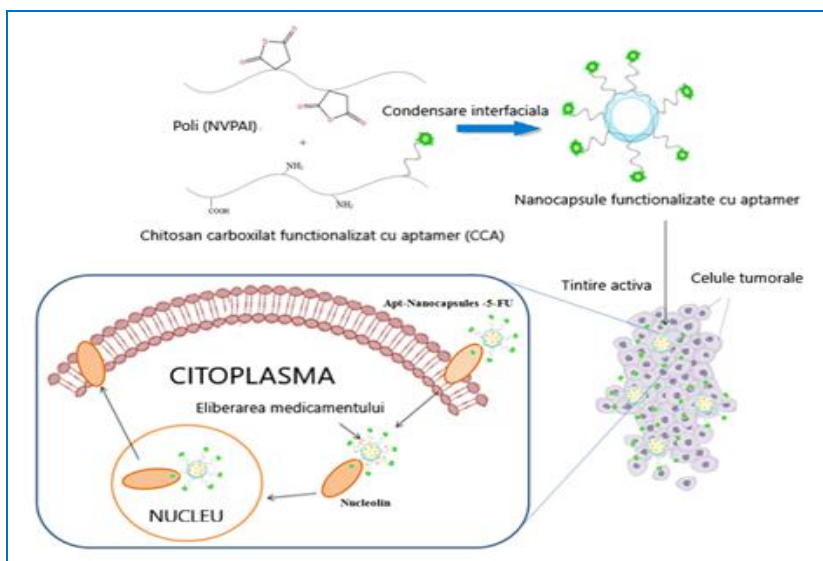
##### **Sinteza și caracterizarea unor nanocapsule pe bază de poli(N-vinil pirolidona-*alt*-anhidrida itaconica) și carboximetil chitosanul funcționalizat cu aptamer încărcate cu 5-Fluorouracil**

Nanotehnologia constituie o cale de a îmbunătăți biodistribuția medicamentelor (indeosebi hidrofobe) în piele dar și în alte organe, prin modificarea permeabilității/penetrabilității sale prin stratul cornos. Utilizarea nanoparticulelor (Nps) a devenit o practică destul de des întâlnită, dar această cale de administrare mai ales în bolile de piele este încă insuficient exploatată. Prin acest nou tip de terapie sunt țintite genele, proteinele, țesuturile ce contribuie la dezvoltarea tumorii și este considerabil limitată dispersarea celulelor canceroase, reducându-se riscul de distrugere a celor sănătoase.

Capitolul de față se înscrie pe această direcție de cercetare propunându-și realizarea de noi nanocapsule capabile de a include, transporta la țintă și elibera susținut/controlat medicamente antitumorale specifice tratării cancerului. O prezentare schematică începând cu etapa de preparare a nanocapsulelor funcționalizate, țintirea de către acestea a celulelor tumorale ca urmare a recunoașterii de către receptorii celulari (nucleolina) a ligandului cu care au fost funcționalizate nanocapsulele (aptamer), internalizarea nanocapsulelor în citoplasma celulelor tumorale unde eliberează treptat medicamentul antitumoral, este ilustrată în Figura 30.

Abordarea originală pe care o propunem are mai multe avcantaaje comparativ cu administrarea sistemică clasică a medicamentului antitumoral: (i) realizează țintirea în mod specific a celulelor tumorale; (ii) crește eficiența tratamentului prin eliberarea de medicamente antitumorale direct la locul afecțiunii; (iii) eliberează susținut și constant medicamentul pe o perioadă mai mare de timp; (iiii)evită în mare măsură pătrunderea medicamentului în celulele sănătoase, și deci producerea unor efecte secundare de distrugere a acestora; (iiii) crește complianța pacientului.





**Figura 30.** Ilustrarea schematică a realizării nanocapsulelor funcționalizate cu aptamer și încărcate cu 5-Fluorouracil, cu acțiune țintită la nivelul celulelor tumorale

Nanocapsulele au fost obținute printr-un proces de condensare interfacială, prin introducerea în picături a unui copolimer alternant al *N*-vinil piroloidonei cu anhidrida itaconică – poli(NVPAl), într-o soluție apoasă slabă acidă a unui amestec de chitosan carboxilat și chitosan funcționalizat cu aptamer (ligand recunoscut de nucleolină, receptor din membrana celulelor tumorale), compuși ce au fost mai întâi sintetizați și caracterizați. Ne vom referi în cele ce urmează doar la prezentarea rezultatelor referitoare la nanocapsulele obținute, conform mprogramului experimental prezentat în tabelul 6.

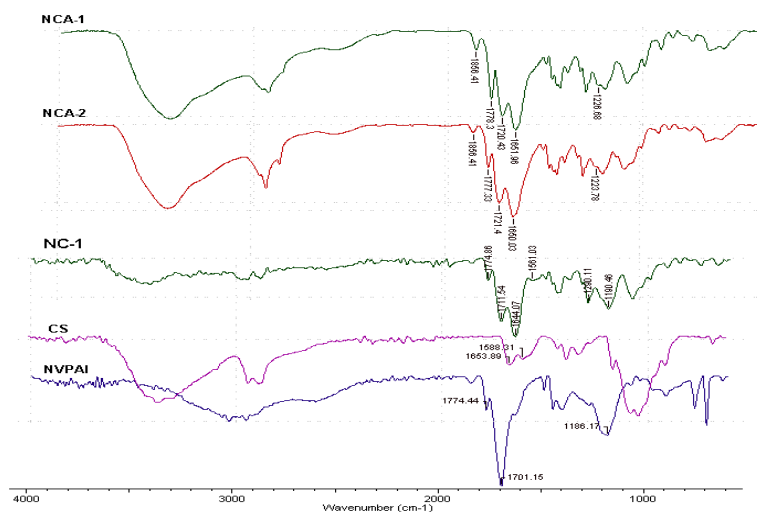
**Tabelul 6.** Programul experimental de obținere a nanocapsulelor și codificarea probelor sintetizate

Cod probe	Raportul molar (moli NH <sub>2</sub> libere din chitosan/moli NVPAl)	Poli(NVPAl) (%)	Amestec chitosan (%)		Span 80 (%)	Tween 80 (%)	Faza organică / Faza apoasă (v/v)
			Chitosan carboxilat funcționalizat cu aptamer (%)	Chitosan (%)			
NC-1	1/3	2	0	100	2	2	1:2
NC-2	1/2.5		0	100			
NC-3	1/2		0	100			
NCA-1	1/3		5	95			
NCA-2	1/2.5		4	96			
NCA-3	1/2		3	97			

#### 4.2.2. Caracterizarea nanocapsulelor pe bază de chitosan funcționalizat cu aptamer

##### 4.2.2.1. Spectroscopia FTIR

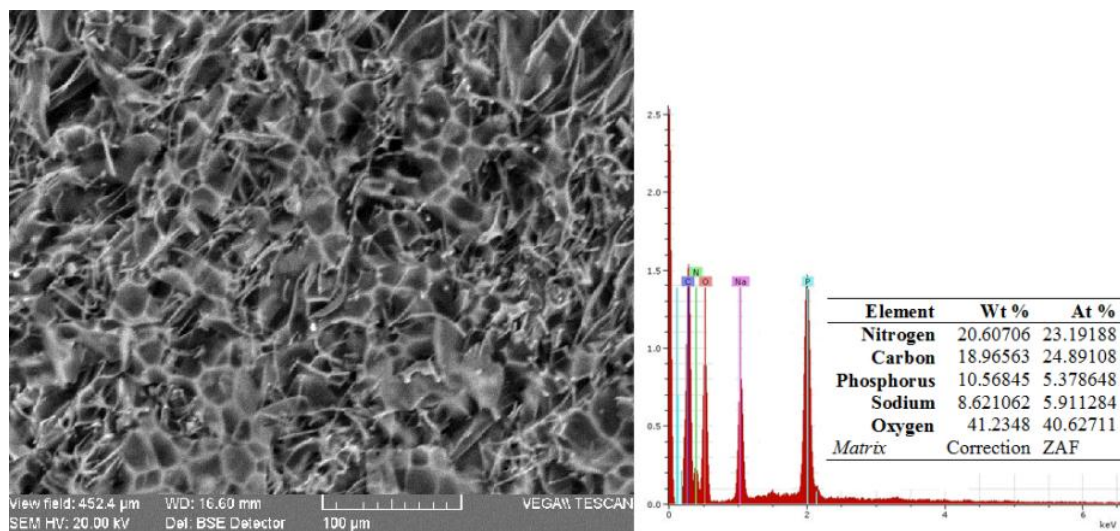
Spectroscopia FTIR (Figura 36) probează producerea reacției dintre grupările anhidridice și grupările aminice ale chitosanului prin formarea noilor grupări de tip amidă. Desigur, nanocapsulele continand si CCA sunt decorate la suprafata cu aptamer. Nanocapsulele funcționalizate cu aptamer prezintă o bandă de absorbție la 1494 cm<sup>-1</sup> atribuită legăturii –NH- din grupa amidică. Peak-ul de la 1651 cm<sup>-1</sup> corespunde legăturii carbonilice din grupele amidice nou formate prin reacția copolimerului cu CCA. Banda de absorbție de la 1719 cm<sup>-1</sup> corespunde vibrației de întindere a - C = O din grupările carboxilice. Mai mult decât atât, apariția acestui peak relevă faptul că toate grupările anhidridice au participat la reacția de condensare.



**Figura 36.** Spectrul FT-IR pentru poli(NVPAl), chitosan, NC-1, NCA-1 și NCA-2  
 Peak-ul de la  $1226\text{ cm}^{-1}$  (din spectrul NCA-1) și cel de la  $1223\text{ cm}^{-1}$  (din spectrul NCA-2) sunt atribuite legăturii P = O fapt ce evidențiază prezența aptamerului în membrana nanocapsulei.

#### 4.2.2.2. Determinarea compoziției elementale

Figurile 37, 38, 39, 40 prezintă spectrele EDAX pentru aptamer, CC, CCA cât și nanocapsulele pe bază de CCA



**Figura 37.** Spectrul EDAX pentru aptamer

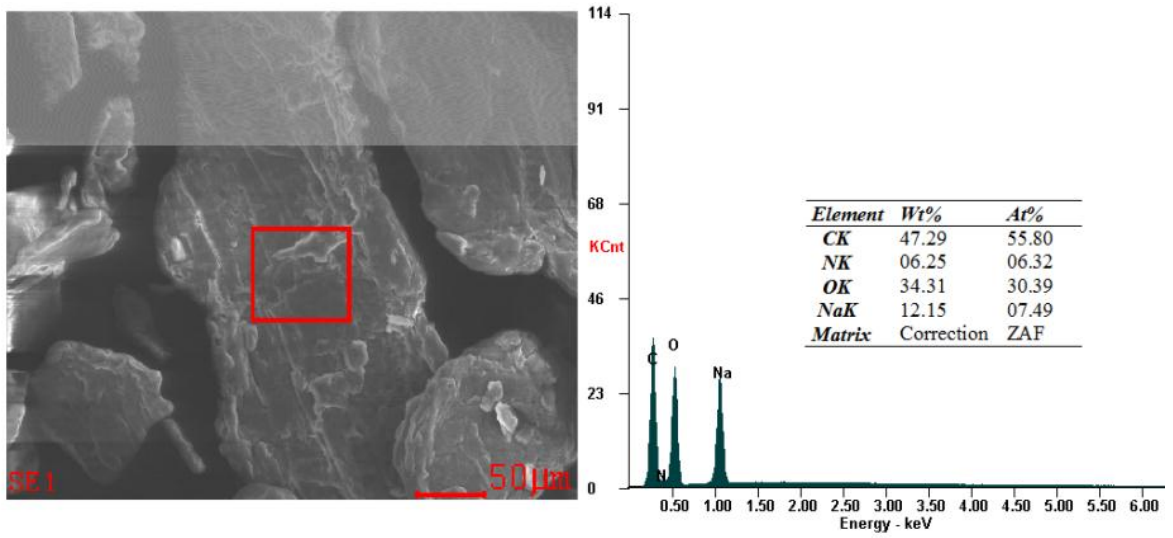


Figura 38. Spectrul EDAX pentru CC

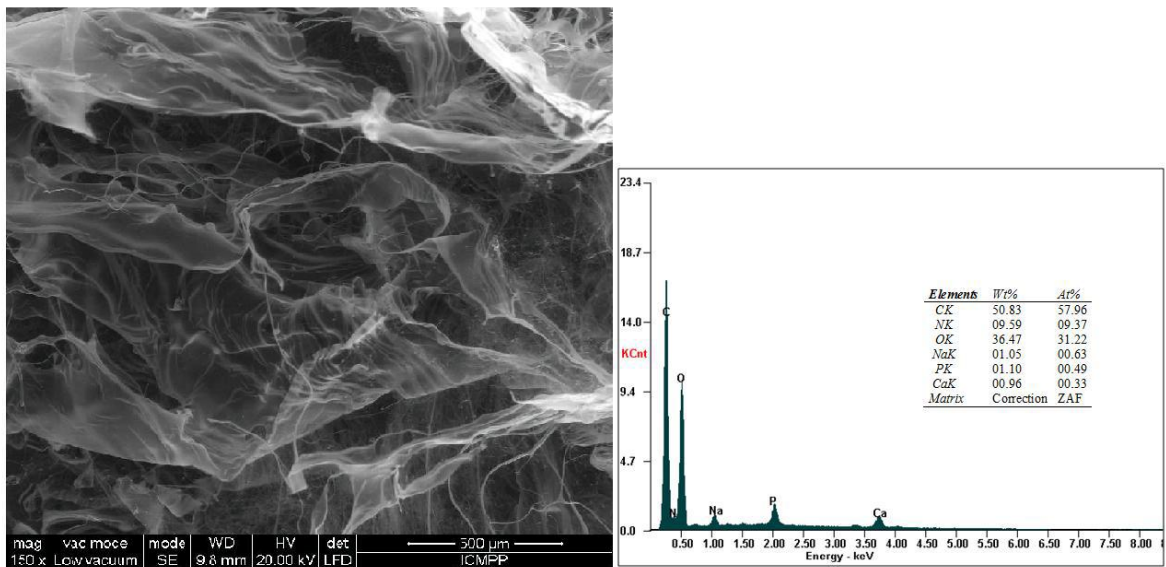


Figura 39. Spectrul EDAX pentru CCA

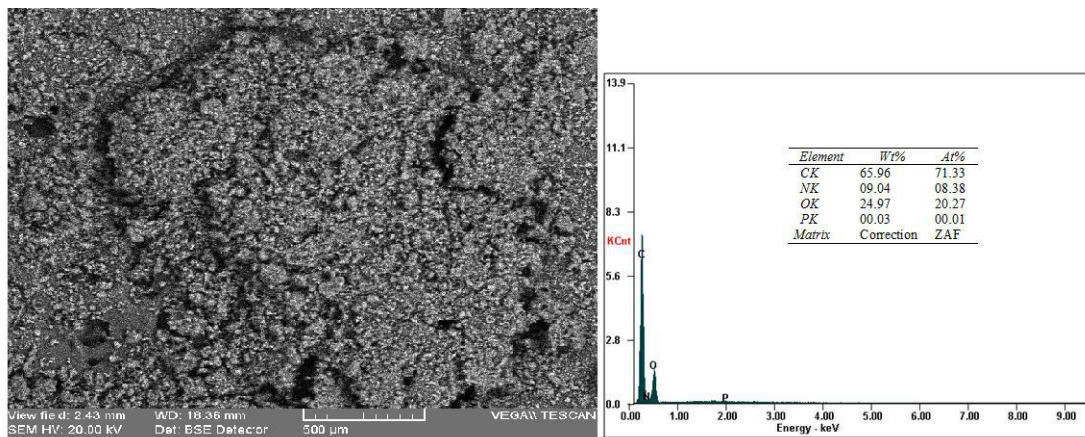


Figura 40. Spectrul EDAX pentru nanocapsule funcționalizate cu aptamer (NCA-1)

În spectrul EDAX pentru carboximetil chitosanul funcționalizat cu aptamer (CCA) s-a observat cu excepția carbonului, prezența oxigenului (aproximativ 36%) și a azotului care a fost de aproximativ 9%. De asemenea, în graficul obținut din analiza EDAX s-a observat și prezența fosforului elementar (aproximativ 1,1%). În concluzie, în spectrul pentru CCA există 11% aptamer AS1411-NH<sub>2</sub>. Imaginile EDAX pentru eșantionul NCA-1 (Figura 40) ilustrează prezența unor cantități mari de C, O și N. Prezența fosforului în spectru care a fost de aproximativ 0,03% a confirmat conjugarea aptamerului la nanocapsule. Rezultatele obținute au demonstrat că aproximativ 50% din aptamerul inițial se găsește în compoziția nanocapsulelor.

#### 4.2.2.3. Diametrul mediu al nanocapsulelor

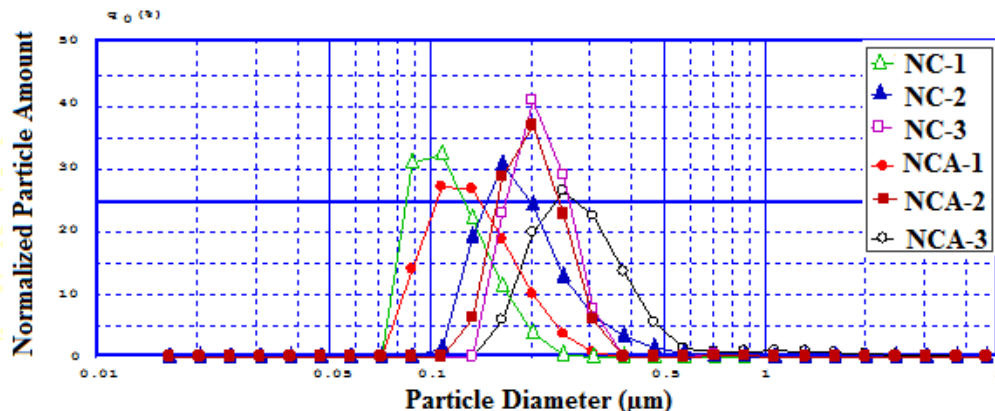
S-a constatat că valorile diametrului mediu al nanocapsulelor sunt situate între 118 și 267 nm și depind de raportul molar al celor doi polimeri, CS sau CS /CCA și poli(NVPAI) (Figura 41 și Tabelul 7).

**Tabelul 7.** Diametrul mediu și valorile indicelui de polidispersitate pentru nanocapsulele preparate

Codul probei	Diametrul mediu (nm)	Indicele de polidispersitate (PDI)
NC-1	118±3.48	0.32±0.015
NC-2	190±4.67	0.32±.012
NC-3	230±5.21	0.43±0.021
NCA-1	133±3.46	0.33±0.020
NCA-2	206±4.67	0.42±0.015
NCA-3	267±3.18	0.47±0.012

De asemenea, se poate observa că diametrul mediu al nanocapsulelor crește odată cu creșterea raportului dintre cei doi polimeri, respectiv cu creșterea cantității de CS/CCA în soluția inițială. Acest comportament poate fi explicat după cum urmează: creșterea cantității de CS/CCA va promova reacția de condensare între macromoleculele copolimerului cu un număr mai mare de grupări de aminice disponibile ducând în primul rând la o creștere a grosimii membranei și în al doilea rând, la o creștere a diametrului capsulei. Diametrul nanocapsulelor funcționalizate cu aptamer este mai mare decât cel al celor nefuncționalizate, așa cum era de așteptat.

Curbele de distribuție a diametrului mediu pentru toate probele de nanocapsule sunt prezentate în Figura 41.



**Figura 41.** Distribuția dimensională a nanocapsulelor



#### 4.2.2.4. Determinarea potențialului zeta

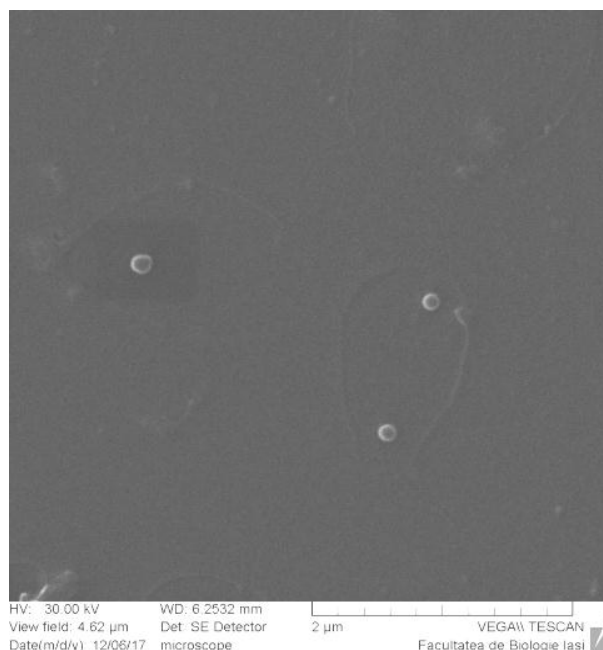
Potențialul zeta a fost determinat pentru a investiga stabilitatea dispersiei apoase de nanocapsule și depinde, în principal, de natura chimică a polimerilor și pH-ul mediului utilizat, fiind măsurat prin electroforeză într-o soluție de tampon fosfat (pH = 7, 4) pentru a simula condițiile fiziologice, la temperatura de 25 °C. Încărcarea negativă a nanocapsulelor este atribuită anionilor carboxilat formați pe seama grupărilor carboxilice existente fie în chitosan/CCA, fie prin deschiderea ciclului anhidridic al poli(NVPAI). CCA prezintă mai multe grupări carboxilice pe lanțul de bază decât chitosanul simplu, grupări ce au fost rezultate în urma reacției de carboxilare necesară pentru funcționalizarea cu aptamer. Prin urmare, așa cum era de așteptat, s-a constatat că nanocapsulele de tip NC-1 prezintă o valoare mai scăzută a potențialului zeta decât a celor de tip NCA-1 (Tabelul 8), fapt ce confirmă considerentele teoretice.

**Tabelul 8.** Valorile potențialului zeta pentru nanocapsulele preparate

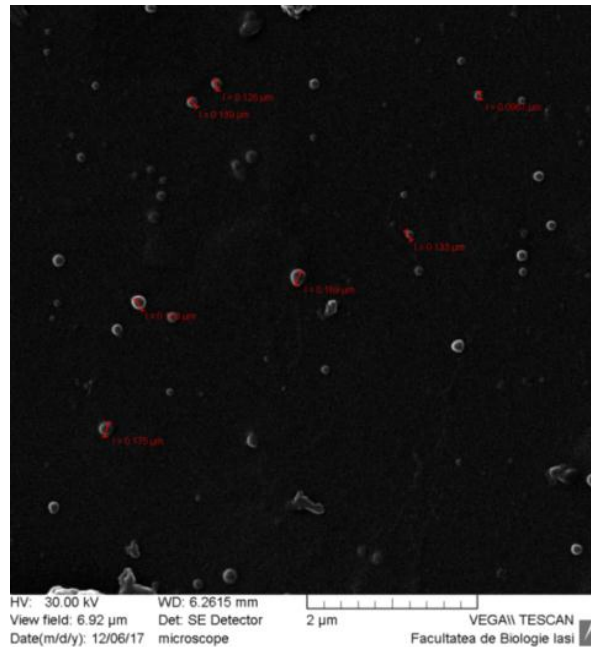
Codul probei	Zeta-potential (mV)	Conductivitate (mS/cm)
NC-1	-12.6±0.15	17.3±0.15
NC-2	-12.2±0.19	17.3±0.15
NC-3	-11.1±0.25	14.8±0.2
NCA-1	-19.2±0.12	15.5±0.23
NCA-2	-18.4±0.18	18.6±0.26
NCA-3	-17.5±0.23	15.3±0.2

#### 4.2.2.5. Microscopia electronică de baleiaj (SEM)

Morfologia nanocapsulelor a fost evaluată prin microscopie electronica de baleiaj obținându-se informații privind dimensiunea, forma, și gradul de aglomerare al acestora. În Figura 42 este prezentată imaginea SEM pentru proba de nanocapsule nefuncționalizate NC-1, iar in Figura 43 este prezentată imaginea SEM pentru proba de nanocapsule funcționalizate NCA-1.



**Figura 42.** Microscopia electronică de baleiaj pentru nanocapsulele NC-1

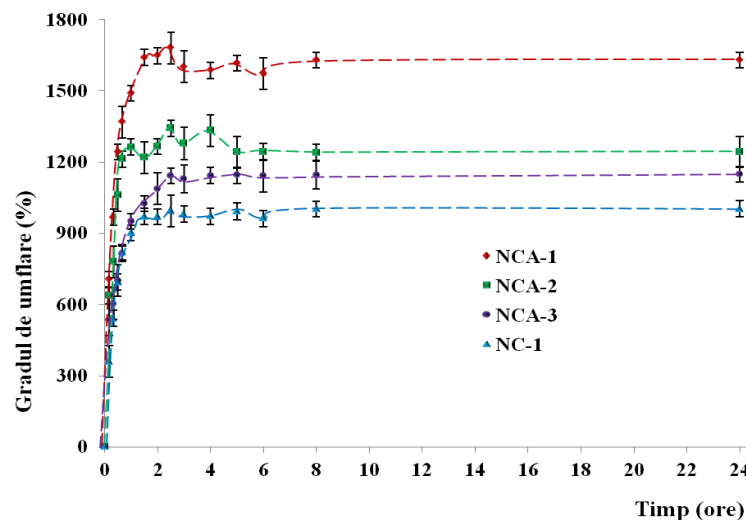


**Figura 43.** Microscopia electronică de baleiaj pentru nanocapsulele NCA-1

Nanocapsulele preparate au o formă sferică foarte bine definită și au prezentat o polidispersitate dimensională relativ scăzută. Diametrul lor se situează între 100 nm și 200 nm fiind în concordanță cu rezultatele obținute prin analiza DLS.

#### 4.2.2.6. Capacitatea de umflare a nanocapsulelor în soluții apoase

O caracteristică importantă a nanocapsulelor o constituie capacitatea lor de a reține fluide fiziologice în care sunt imersate, evaluată prin gradul de umflare (Q). Spre deosebire de particulele pline în care umflarea este datorată pătrunderii apei în matricea polimeră, în cazul nanocapsulelor umflarea este determinată de două fenomene: pătrunderea apei prin difuzie în interiorul capsulei goale, până la umplerea acesteia, respectiv umflarea membranei polimerice cu caracter de hidrogel.



**Figura 44.** Cinetica umflării nanocapsulelor funcționalizate (NCA-1, NCA-2, NCA-3) și nefuncționalizate (NC-1), în soluție de tampon fosfat (pH = 7,4).

Evident, cantitatea de apă patrunsă în cavitatea capsulei depinde pe de o parte de elasticitatea membranei, dar și de grosimea acesteia, care vor determina viteza de difuzie.

În Figura 44 sunt prezentate rezultatele studiului cinetic de umflare a nanocapsulelor funcționalizate (NCA-1, NCA-2, NCA-3) și nefuncționalizate (NC-1), în soluție de tampon fosfat (pH = 7,4). Grupările carboxilice care sunt formate prin deschiderea ciclului anhidridic sunt ionizate în mediul slab alcalin și repulsiile electrostatice dintre anionii formați determină creșterea gradului de umflare, care se situează între 1000-1680% și scade odată cu creșterea raportului dintre CS/CCA/poli(NVPAI), implicit creșterea cantității de chitosan din sistem.

Acest rezultat pare surprinzător la o primă analiză, deoarece în cazul probelor cu proporție mare de poli(NVPAI) crește probabilitatea reacției cu o cantitate mai mare de grupări de aminice din chitosan. Prin urmare, gradul de reticulare ar trebui să crească odată cu raportul molar al grupărilor funcționale ale celor doi polimeri. În consecință, gradul de umflare ar trebui să scadă (membrana probei NCA-1 este mai reticulată decât a probei NCA-3). Pe de altă parte însă, odată cu creșterea proporției de poli(NVPAI), un număr crescut de cicluri de anhidridă, care nu participă la reacția cu grupări aminice, se deschide prin reacția concomitentă de hidroliză ducând la formarea grupărilor carboxil. În consecință, în mediu slab bazic, în care au fost efectuate testele de umflare, gradul de umflare crește datorită faptului că grupările carboxilice devin ionizate provocând repulsiile electrostatice între lanțurile polimerice.

Așa cum era de așteptat, nanocapsulele funcționalizate arată o valoare mai mare a gradului de umflare decât nanocapsulele nefuncționalizate (NC-1) deoarece CCA are mai multe grupări carboxil pe lanțul de bază decât chitosanul simplu care duce la repulsia electrostatică între grupările carboxilat. Toate probele analizate au prezentat o umflare rapidă, care este cauzată de pătrunderea apei prin difuzie în interiorul capsulelor goale până la umplerea lor, urmată de umflarea mai lentă a membranei polimerice (care are un caracter de hidrogel) până la echilibru (în general după aproximativ 3h).

#### 4.2.2.7. Studii de încărcare a nanocapsulelor cu 5-Fluorouracil

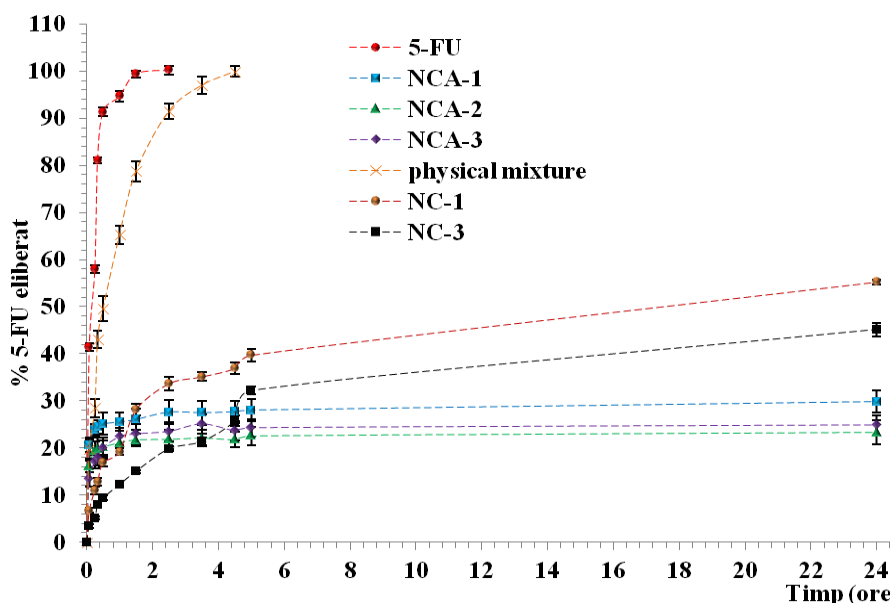
Nanocapsulele nefuncționalizate (NC) precum și cele funcționalizate cu aptamer (NCA) au fost evaluate din punct de vedere al eficacității de încărcare a 5-Fluorouracilului (5-FU), valorile acesteia fiind prezentate în Tabelul 9.

Acest tip de nanocapsule au fost elaborate în scopul de a fi utilizate în terapia antitumorală (carcinomul bazocelular), și din acest motiv s-a ales ca medicament model 5-FU. Rezultatele obținute relevă faptul că eficiența de încărcare a medicamentului scade odată cu creșterea raportului dintre CS/CCA/poli(NVPAI), implicit creșterea cantității de chitosan/amestecul de chitosan și CCA din sistemul inițial de polimeri. Acest comportament este în concordanță cu gradul de umflare al nanocapsulelor în mediu cu pH=7,4. Eficiența de încărcare variază între 21% și 34% și este mai scăzută în cazul nanocapsulelor funcționalizate cu aptamer.

**Tabelul 9. Eficiența de încărcare a 5-FU în nanocapsule**

Codul probei	Eficiența medie de încărcare (%)	Cantitatea medie de 5-FU încărcată (g)/g nanocapsule
NC-1	30.0±0.57	0.45±0.01
NC-3	28.0±0.88	0.42±0.01
NCA-1	22.5±0.86	0.34±0.01
NCA-2	21.0±0.57	0.31±0.01
NCA-3	21.0±1.15	0.31±0.02

Nanocapsulele încărcate au fost analizate din punct de vedere al *cineticii de eliberare* a 5-FU, în soluție de tampon fosfat (pH = 7,4). Cinetica de eliberare a 5-FU (Figura 45) a fost studiată pentru: 5-FU simplu, amestecul fizic al 5-FU cu nanocapsulele de tip NCA-2, nanocapsulele nefuncționalizate NC și nanocapsulele funcționalizate de tip NCA, și a fost evaluată folosind celule de difuzie Franz, cu scopul de a simula o administrare transdermală a medicamentului.



**Figura 45.** Cinetica de eliberare in vitro pentru: 5-FU simplu, amestecul fizic al 5-FU cu nanocapsulele NCA-2, nanocapsulele nefuncționalizate (NC-1, NC-3) și nanocapsulele funcționalizate (NCA-1, NCA-2, NCA-3) în soluție de tampon fosfat (pH = 7,4)

Concluziile rezultate în urma studiului au relevat că pentru nanocapsule s-a înregistrat o eliberare mai rapidă (în primele 5-7 ore) comportament care se poate datora fenomenului de desorbție a medicamentului de la nivelul membranei capsulei, iar eficiența de eliberare a 5-FU în mediu slab alcalin din nanocapsulele de tip NC este situată între 42% și 55% iar din nanocapsulele de tip NCA este situată între 27% și 39%. Creșterea cantității de chitosan, dar și conjugarea aptamerului la nanocapsule a condus la o scădere a procentului de medicament eliberat în mediul apos studiat.

#### 4.2.2.9. Analiza teoretică a eliberării medicamentului

Constantele Peppas-Sahlin au fost determinate prin fitarea datelor experimentale și sunt prezentate în Tabelul 10.

Modul în care ecuația Peppas Sahlin poate modela procesul de eliberare este ilustrat doar pentru trei probe pentru o mai bună vizualizare, în figura 47.

În ambele cazuri, valorile  $k_D$  sunt mai mici decât  $k_R$ , indicând astfel o eliberare dominată de difuzia Fickiană. Acestea scad, în valoare absolută, cu creșterea raportului dintre cei doi polimeri, sugerând o rețea polimerică densă.

Cu toate acestea, se observă o diferență în ce privește difuzia pentru cele două tipuri de probe: pentru cele fără aptamer, difuzia depășește relaxarea într-o proporție covârșitoare (de 15 până la 30 de ori), în timp ce pentru cele cu aptamer, contribuțiile celor două fenomene tind să se echilibreze, difuzia fiind în acest caz de trei ori mai intensă decât relaxarea.



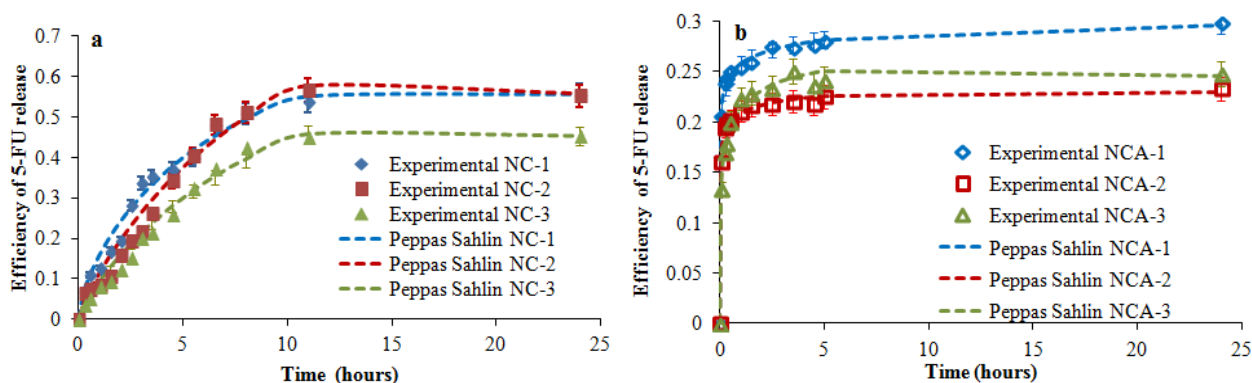


Figura 47. Cinetica de eliberare experimentală și curbele teoretice Peppas-Sahlin

Tabelul 10. (a) Parametrii Peppas-Sahlin pentru probele NC (b) Parametrii Peppas-Sahlin pentru probele NCA

(a)				
Cod proba	$k_D$	$k_R$	m	$R^2$
NC-1	15.90	-1.05	0.72	0.99
NC-2	9.36	-0.32	0.96	0.99
NC-3	7.76	-0.28	0.94	0.99
(b)				
Cod probă	$k_D$	$k_R$	m	$R^2$
NCA-1	37.64	-11.87	0.12	0.99
NCA-2	31.82	-10.97	0.14	0.99
NCA-3	30.13	-8.86	0.23	0.99

Evoluția raportului difuzie/relaxare în timpul monitorizării eliberării a arătat că contribuția difuziei în eliberarea medicamentului este mare, în special pentru probele fără aptamer, în prima parte a eliberării. Spre sfârșitul monitorizării, cele două fenomene se echilibrează, dar în cel mai scurt timp relaxarea devine dominantă. Valorile medii ale fracțiilor pe întregul interval sunt de aceeași ordine de mărime ca și constantele Peppas Sahlin  $k_D$  și  $k_R$ .

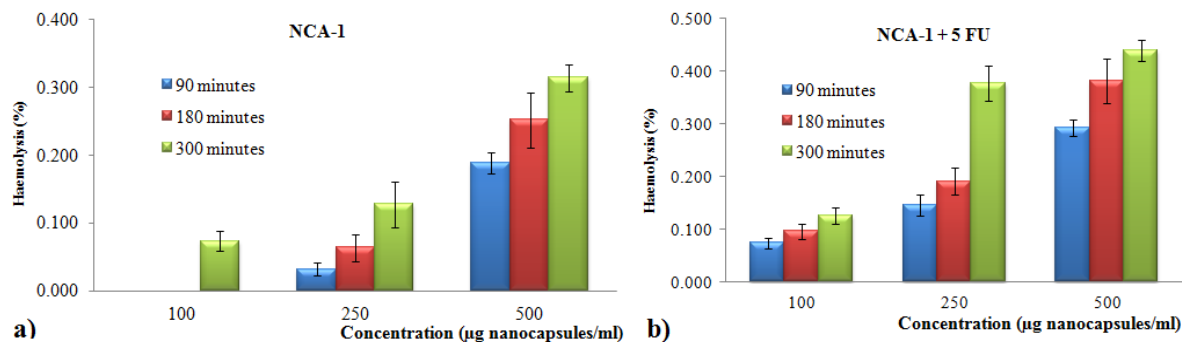
#### 4.2.2.10. Testul de hemoliză

Testul de hemoliză este o cerință obligatorie pentru materialele care intră în contact cu sângele, care pot provoca schimbarea proprietăților sangvine, ceea ce a impus evaluarea influenței nanocapsulelor asupra sângelui cu ajutorul unui test de hemoliză.

S-a utilizat o metodă spectrofotometrică care a fost efectuată în conformitate cu metoda lui Parameswara Rao Vuddanda și colab. Pentru testul de hemoliză a fost selectată proba NCA-1 (cu și fără medicament încapsulat) datorită faptului că a prezentat o viabilitate celulară mai crescută decât proba NCA-1.

Rezultatele obținute au pus în evidență faptul că gradul de hemoliză crește odată cu creșterea concentrației de nanocapsule (Figura 49), iar nanocapsulele încărcate cu medicament prezintă un grad de hemoliză ușor mai ridicat. Informațiile obținute în urma acestui test sugerează că nanocapsulele obținute prezintă o bună compatibilitate cu mediul sangvin, care se încadrează în

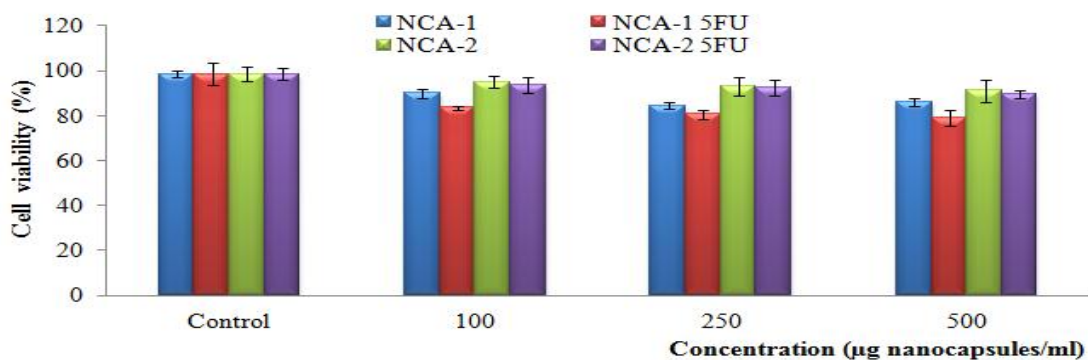
limitele normale (< 10% comparativ cu proba control pozitiv), valorile fiind cuprinse între 0,033-0,49% [236].



**Figura 49.** Rezultatele testului de hemoliză a nanocapsulelor funcționalizate cu aptamer cu (a) și fără medicament încapsulat (b)

#### 4.2.2.11. Studiul in vitro al citotoxicității nanocapsulelor funcționalizate cu aptamer (cu și fără medicament încapsulat)

Citotoxicitatea nanocapsulelor funcționalizate cu aptamer a fost testată asupra liniei de celule fibroblaste de proveniență dermică ((HDFa). Pe baza rezultatelor obținute și prezentate anterior s-au ales 2 probe de nanocapsule funcționalizate cu aptamer (NCA-1 și NCA-2, cu și fără medicament încapsulat), optime din punct de vedere al dimensiunii, stabilității în soluție apoasă, grad de umflare în soluții apoase, grad de încărcare și eliberare al 5-FU, în vederea realizării testelor de citotoxicitate. Procentul de viabilitate a fost determinat după 72ore, utilizând testul de excludere cu albastru trypan. După cum se poate observa în Figura 50, celulele fibroblaste tratate cu nanocapsule prezintă o viabilitate excelentă. Se poate observa că atât nanocapsulele fără medicament cât și cele cu medicament inclus nu prezintă efecte toxice la concentrații ridicate și nu inhibă proliferarea. Rezultatele obținute relevă faptul că viabilitatea celulară scade odată cu creșterea concentrației de nanocapsule expuse la celulele fibroblaste, și crește odată cu creșterea raportului dintre CS și NVPAl.



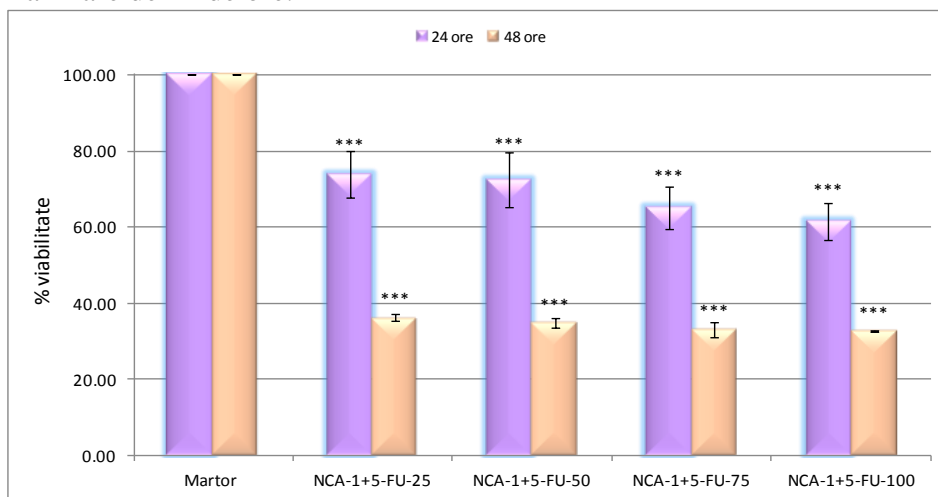
**Figura 50.** Viabilitatea celulelor fibroblaste tratate cu nanocapsule de tip NCA-1 și NCA-2 (cu și fără medicament inclus)

Viabilitatea țesuturilor testate a fost în cazul probei de nanocapsule funcționalizate cu aptamer, fără medicament încapsulat, mai mare de 50% demonstrând astfel că proba este neiritantă. În cazul probei de nanocapsule funcționalizate cu aptamer și încărcate cu medicament și a probei de medicament liber s-a înregistrat o viabilitate mai mică de 50%, la aceeași concentrație utilizată, demonstrând potentialul iritativ al acestora.

#### 4.2.2.13. Studiul *in vitro* al nanocapsulelor pe celule tumorale de tip TE 354.T

Efectul citotoxic al tratamentului cu nanocapsulelor încărcate cu 5-FU asupra celulelor tumorale TE 354 este prezentat în Figura 52. Folosirea nanocapsulelor încărcate cu 5-FU a indus scăderea viabilității celulare atât după 24 de ore cât, mai ales, după 48 de ore de tratament. După cum reiese din Figura 52, la tratamentul de 24 de ore s-au înregistrat două praguri de scădere a viabilității celulare: la dozele de 25 și 50  $\mu\text{g/ml}$  (24 ore) și, respectiv, dozele mari (75 și 100  $\mu\text{g/ml}$ ).

În cazul primului prag, viabilitatea celulelor a fost de 73,91% în cazul NCA1+5-FU-25 și 72,38% pentru NCA1+5-FU-50. O diminuare semnificativă a viabilității celulelor provenite dintr-un carcinom bazal de piele s-a instalat la tratamentul de 48 de ore, valoarea procentuală a acestui parametru fiind cuprinsă între 36,25% (NCA1+5-FU-25) și 32,81% (NCA1+5-FU-100). Acest fapt dovedește că, indiferent de doza nanocapsulelor, eliberarea agentului antitumoral, 5-FU, s-a realizat pe parcursul ciclurilor celulare secundare, știut fiind faptul că rata de diviziune în cazul acestei linii celulare este mai mare de 24 de ore.



**Figura 52.** Efectul tratamentului de 24 și 48 de ore, cu diferite concentrații ( $\mu\text{g/ml}$ ) ale nanocapsulelor NCA-1, asupra viabilității culturilor de celule TE 354.T

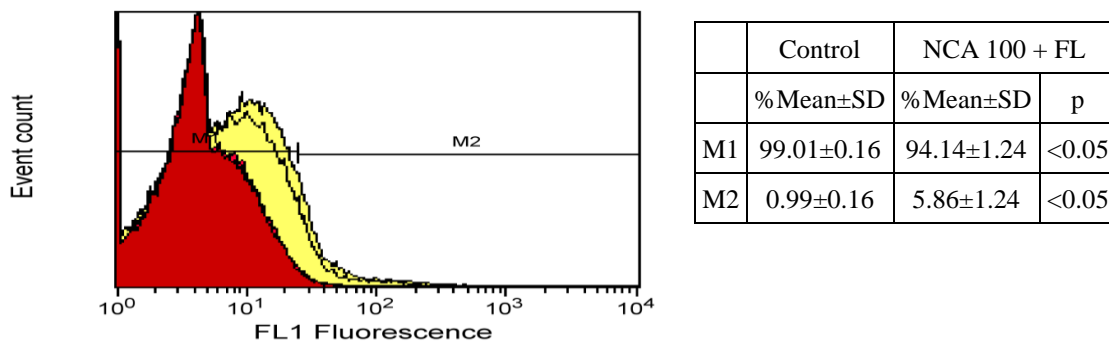
Atât la tratamentul de 24 de ore cât și la cel de 48 de ore are loc o interferență semnificativă a acestui compus antitumoral de sinteză cu viabilitatea celulară. După 24 de ore de tratament, la concentrațiile mari folosite, viabilitatea celulară este asemănătoare având valori de 62,85% (100  $\mu\text{g/ml}$ ), respectiv, 61,85% (200  $\mu\text{g/ml}$ ).

După 48 de ore de tratament, acțiunea citotoxică, care depășește pragul de minimum de 50% recomandat de programele de screening *in vitro*, apare chiar începând de la doza minimă (25  $\mu\text{g/ml}$ ) de tratament, viabilitatea celulelor fiind, în raport cu martorul, de 34,15%. La concentrațiile medii acest parametru a fost de 31,53% (50  $\mu\text{g/ml}$ ) și 31,32% (100  $\mu\text{g/ml}$ ). Inhibiția maximă a viabilității celulare a fost înregistrată la concentrația de 200  $\mu\text{g/ml}$  a 5-FU, atingând valoarea procentuală de 26,07%, care este corespunzătoare unui efect citotoxic de 73,93%.

#### 4.2.2.14. Capacitatea de ținere a nanocapsulelor prin schimbarea intensității de fluorescență

Pentru evaluarea absorbției de către celule a nanocapsulelor marcate fluorescent, culturile celulare au fost incubate în prezența acestor materiale timp de 8 ore, intensitatea de fluorescență fiind măsurată prin înregistrarea schimbării fluorescenței în culturile celulare tratate sau nu cu nanocapsulele marcate cu fluoresceină pe citometrul in flux. Gradul de penetrabilitate a

nanocapsulelor marcate la nivelul celulelor a fost de aproximativ 5% față de celulele martor (figura 54).



**Figura 54.** Histograma celulelor de control (zona roșie) și a celulelor tratate cu nanocapsule (zona galbenă) în scopul de a evalua absorbția lor de către celulele tumorale. Marker-ul M1– negativ pentru fluoresceină-fără țintire; marker-ul M2– pozitiv pentru fluoresceină, nanocapsulele au fost absorbite

Concluziile rezultate în urma acestui studiu sunt sumarizate la finalul rezumatului.

## CAPITOLUL 5

### Caracterizarea și testarea formulărilor topice de tip gel pe bază de nanocapsule funcționalizate cu aptamer încărcate cu 5-fluorouracil

Acest studiu a avut în vedere prepararea de noi formulări topice de tip gel cu bune proprietăți de etalare la nivelul pielii și reproductibilitate prin procese care nu compromit stabilitatea și eficiența de eliberare a medicamentului țintit la nivelul carcinomului bazocelular. În acest context, au fost obținute și testate două tipuri de geluri pe bază de polimeri naturali și sintetici. Pentru obținerea gelurilor G1 și G2, s-a respectat planul experimental din Tabelul 11.

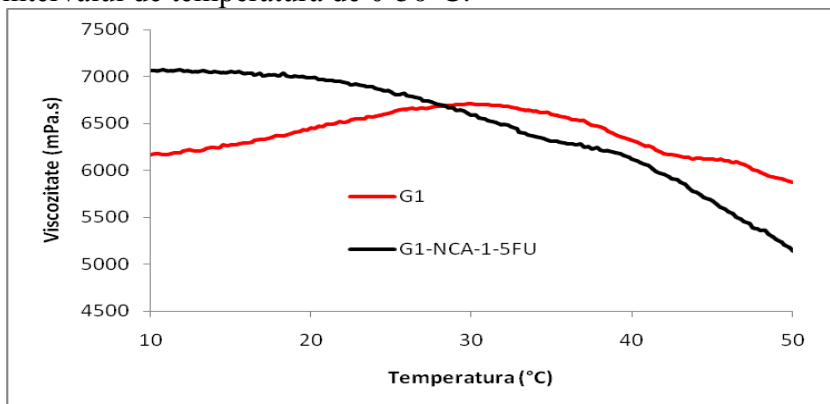
**Tabelul 11.** Compoziția gelurilor G1 și G2

Gelul G1		Gelul G2	
Ingrediente pentru ~25 ml	Cantitate	Ingrediente pentru ~25 ml	Cantitate
Alginat de Na (vascozitate mare)	360 mg	<b>Pluronic® F-108</b>	1,25 g
Hialuronan	40 mg	Apa ultrapura	25 ml
Apă ultrapură	25 ml	Alantoina	30 mg
Alantoină	30 mg	Glicerol	2 g
CaCl <sub>2</sub>	200 μL		
Glicerol	2 g		

Formulările topice de tip gel pe bază de nanocapsule funcționalizate cu aptamer, încărcate cu 5-fluorouracil au fost obținute prin amestecarea gelurilor (G1 și respectiv G2) cu nanocapsulele NCA-1-5FU utilizând un raport masic de 2/1.

### 5.1. Caracterizarea reologică a formulărilor topice de tip gel pe bază de nanocapsule funcționalizate cu aptamer încărcate cu 5-fluorouracil

Proprietățile reologice ale gelului obținut au fost studiate în funcție de temperatură (la o viteză de forfecare constantă) și în funcție de viteza de forfecare (la o temperatură constantă de 37°C). Într-o primă fază s-a determinat vâscozitatea gelului G1 și a gelului G1 cu nanocapsule (NCA-1-5FU) în intervalul de temperatură de 0-50°C.

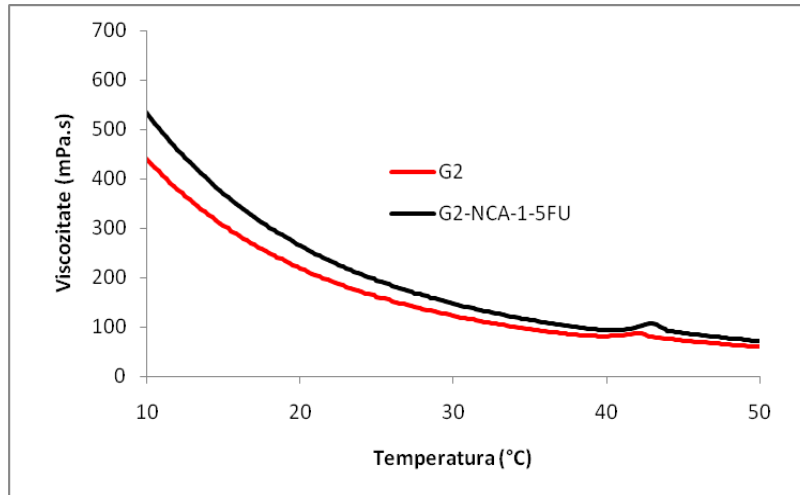


**Figura 55.** Evoluția vâscozității în funcție de temperatură pentru probele G1 și G1-NCA-1-5FU la o viteză de forfecare constantă de 50 1/s

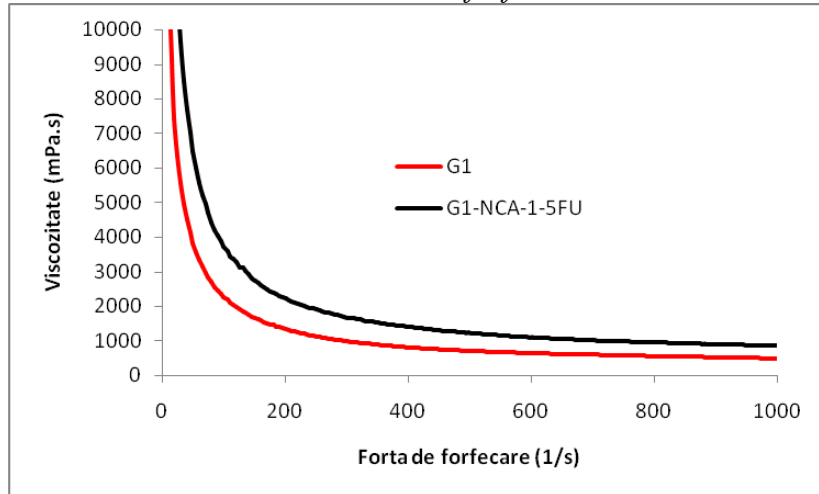
În Figura 55 este prezentată evoluția vâscozității pentru gelul G1 în funcție de temperatură. Se poate observa că încorporarea nanocapsulelor în baza de formulare conduce la o creștere a vâscozității. De asemenea, se poate nota că în cazul probei G1-NCA-1-5FU, scăderea vâscozității apare la o temperatură de 28°C.

Pentru gelul G2, din Figura 56, se observă că prezența NCA-1-5FU are doar o influență minoră asupra valorii vâscozității. De asemenea, creșterea temperaturii duce mai întâi la o scădere mai accentuată a vâscozității, până la temperatura de aproximativ 32°C. Până la 50°C, vâscozitatea rămâne aproape constantă.

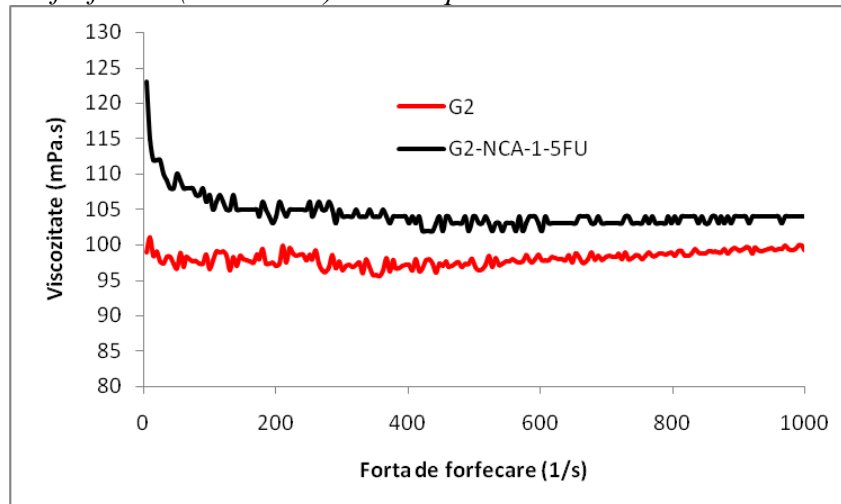
Din Figurile 57 și 58 se observă o diferență netă între valorile de vâscozitate ale cele 2 tipuri de gel. De asemenea, comportamentul lor reologic este foarte diferit. Gelul G1 prezintă o vâscozitate ridicată (mai mare de 1000 mPa.s), chiar la o temperatură de 37°C. Gelul încărcat cu nanocapsule prezintă o vâscozitate mai ridicată, datorată cel mai probabil structurii mai solide ale acestora. Gelul G1 prezintă un comportament non-Newtonian care se traduce printr-o reducere a vâscozității în funcție de viteza de forfecare până la o valoare a acesteia de aproximativ 300 1/s. La viteze de forfecare mai mari se observă că vâscozitatea rămâne constantă, indiferent de probă.



**Figura 56.** Evoluția vâscozității în funcție de temperatură pentru probele G2 și G2-NCA-1-5FU la o viteză de forfecare constantă de 50 1/s



**Figura 57.** Evoluția vâscozității pentru probele G1 și G1-NCA-1-5FU în funcție de viteza de forfecare (0-1000 1/s) la o temperatură constantă de 37°C



**Figura 58.** Evoluția vâscozității pentru probele G2 și G2-NCA-1-5FU în funcție de viteza de forfecare (0-1000 1/s) la o temperatură constantă de 37°C

Gelul G2 (gel fizic) are o vâscozitate de aproximativ 100 mPa.s. Prin creșterea vitezei de forfecare se observă că vâscozitatea rămâne constantă, ceea ce arată că gelul G2 are un comportament Newtonian.

Scaderea drastică a vâscozității în funcție de tensiunea de forfecare poate însemna un avantaj în vederea etalării mai ușoare a acestor geluri la nivelul pielii.

## 5.2. Stabilirea profilului cinetic de eliberare *in vitro* a 5-fluorouracilului din formulările obținute.

Gradul de permeabilitate a 5-FU din formulările de tip gel prin membrana de tip Strat M în soluție tampon fosfat (pH = 7,4) a fost monitorizat prin spectroscopie UV-VIS utilizând un dispozitiv UV-VIS Nanodrop One. Cinetica de permeabilitate a 5-FU a fost studiată pentru 5-FU liber și pentru formulările de tip gel pe bază de nanocapsule funcționalizate cu aptamer, încărcate cu 5-fluorouracil (G1-NCA-1-5FU și G2-NCA-1-5FU) (Figura 59). Cinetica de permeabilitate a 5-FU prin membrana artificială Strat M a fost evaluată folosind celule de difuzie Franz. Rezultatele obținute au pus în evidență faptul că gradul de permeabilitate a medicamentului din formulările topice de tip gel cu nanoparticule funcționalizate cu aptamer prin membrana Strat-M este mai scăzut decât în cazul nanoparticulelor libere.

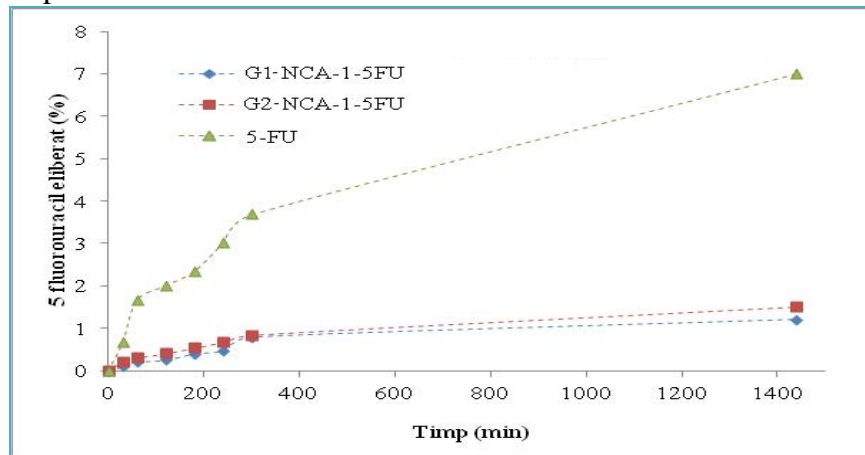
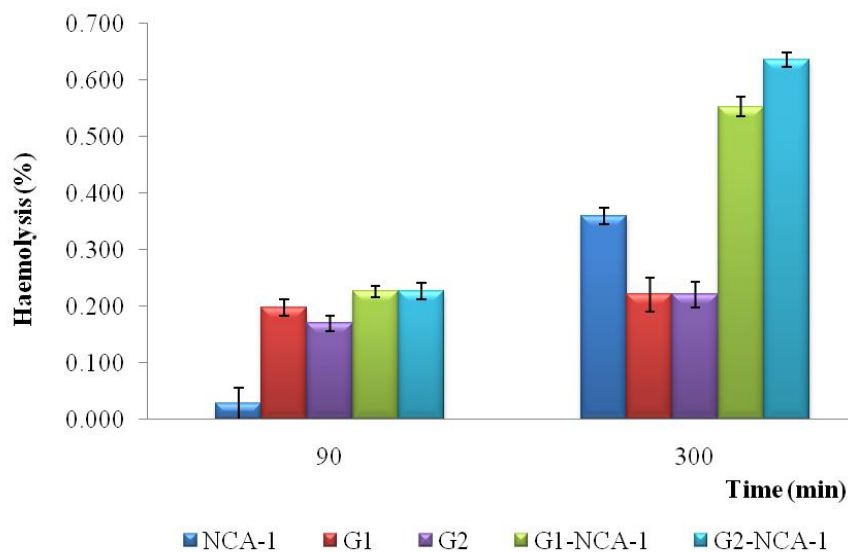


Figura 59. Cinetica de permeabilitate *in vitro* a 5-FU din probele G1-NCA-1-5FU și G2-NCA-1-5FU prin membrana pe tip Strat M

## 5.3. Testul de hemoliză

Pentru testul de hemoliză a fost utilizată o concentrație de 0,2 mg/ml pentru formulările de tip gel (G1, G2, G1-NCA1 și G2-NCA1) și 0.1 mg/ml pentru proba de nanocapsule NCA1. Rezultatele obținute au pus în evidență faptul că gradul de hemoliză crește odată cu creșterea timpului de incubare (Figura 60), iar nanocapsulele încărcate cu medicament prezintă un grad de hemoliză ușor mai ridicat.

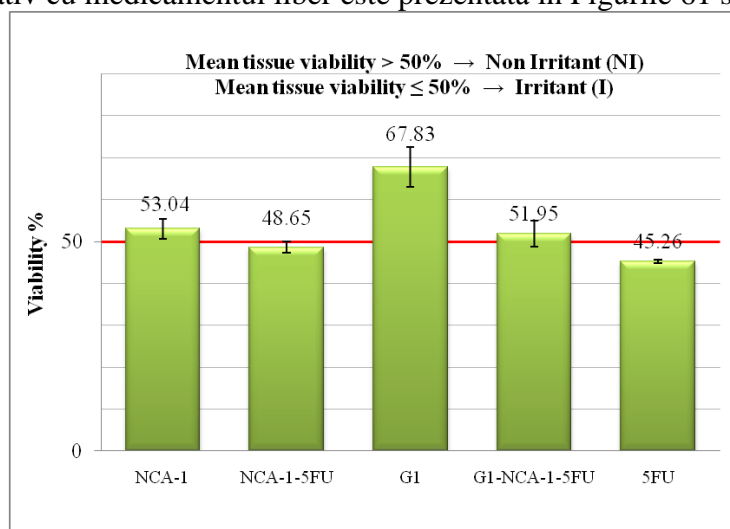
Informațiile obținute în urma acestui test sugerează că formulările obținute prezintă o bună compatibilitate cu mediul sangvin, care se încadrează în limitele normale (< 10% comparativ cu proba control pozitiv), valorile fiind cuprinse între 0,03 - 0,63%.



**Figura 60.** Rezultatele testului de hemoliză pentru nanocapsulele NCA-1 și formulările de tip gel G1, G2, G1-NCA-1 și G2-NCA-1

#### 5.4. Evaluarea potențialului iritativ indus de formulările de tip gel

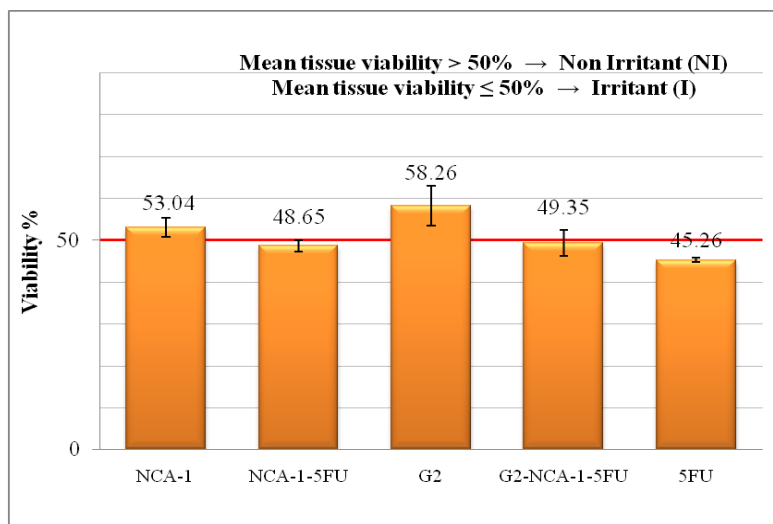
Viabilitatea celulară în țesuturile reconstruite tratate cu nanocapsule (cu și fără medicament încărcat), formulările de tip gel G1 și G2, și formulările de tip gel cu nanocapsule încărcate cu medicament comparativ cu medicamentul liber este prezentată în Figurile 61 și 62.



**Figura 61.** Evaluarea potențialului iritativ determinat de probele NCA-1, NCA-1-5FU, G1 și G1-NCA-1-5FU comparativ cu medicamentul liber

Viabilitatea țesuturilor testate a fost în cazul probelor NCA-1, G1, G2 și G1-NCA-1-5FU mai mare de 50% demonstrând astfel că probele sunt neiritante.



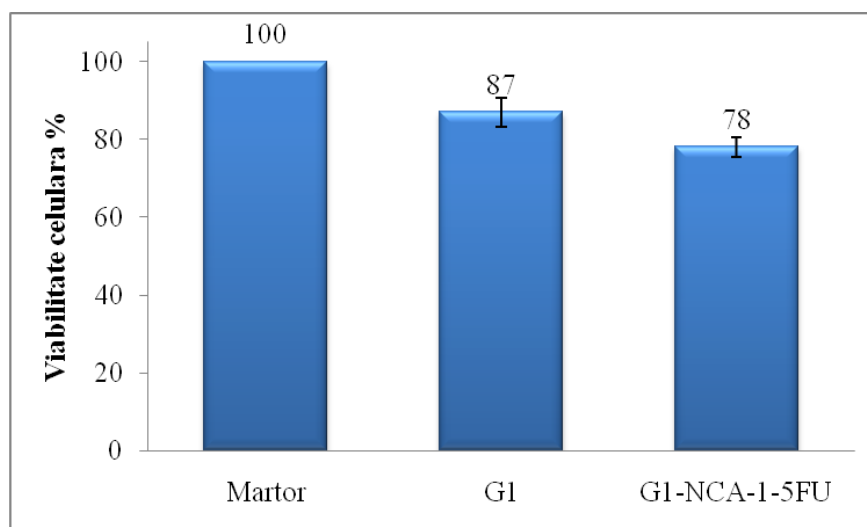


**Figura 62.** Evaluarea potențialului iritativ determinat de probele NCA-1, NCA-1-5FU, G2 și G2-NCA-1-5FU comparativ cu medicamentul liber

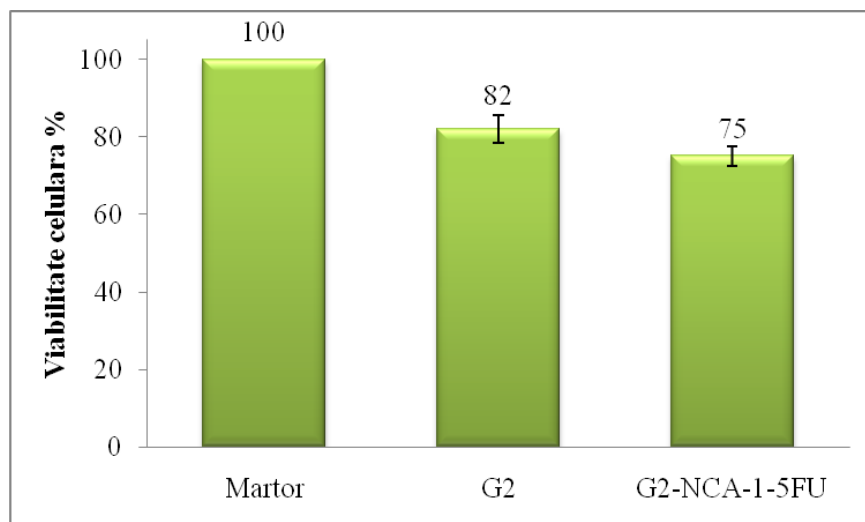
### 5.5. Evaluarea citotoxicității formulărilor topice de tip gel pe bază de nanocapsule funcționalizate asupra celulelor fibroblaste de proveniență dermică

Pentru evaluarea citotoxicității gelurilor G1 și G2 luate în studiu s-au utilizat celule fibroblaste adulte, aderente, de proveniență dermică (HDFa). Materialele supuse testării au fost puse în contact direct cu celulele fibroblaste atașate. Tipurile de materiale testate au fost: formulări topice de tip gel - G1 (100μg/ml) și G2 (100μg/ml), formulări topice de tip gel pe bază de nanocapsule funcționalizate, încărcate cu 5-FU - G1-NCA-1-5FU și G2-NCA-1-5FU (100 μg/ml).

Probele au fost evaluate citotoxic la 48 de ore de la incubare. Procentele de viabilitate obținute sunt prezentate în figurile 63 și 64.



**Figura 63.** Rezultate privind viabilitatea celulară după 48 de ore de incubare a celulelor fibroblaste în prezența probelor G1 și G1-NCA-1-5FU, (conc. 100μg/ml)



**Figura 64.** Rezultate privind viabilitatea celulară - după 48 de ore de incubare a celulelor fibroblaste în prezența probelor G2 și G2-NCA-1-5FU (conc. 100μg/ml)

În cazul gelurilor, testul de viabilitate celulară a evidențiat un efect citotoxic nesemnificativ după tratamentul de 48 de ore, rata viabilității fiind 87% pentru gelul G1 și, respectiv, 82% pentru gelul G2, la aceeași concentrație de 100μg/ml. Cu toate acestea, gradul de tolerabilitate celulară este crescut nedepășindu-se limita impusă de programele de referință de screening *in vitro* și anume, inhibarea proceselor celulare cu cel puțin 50%.

Tratamentul cu formulările topice de tip gel și nanocapsule funcționalizate cu aptamer și încărcate cu 5-FU (G1-NCA-1-5FU și G2-NCA-1-5FU) s-a concretizat prin diminuarea viabilității celulare. Astfel, analizând (Figurile 63 și 64), se constată un efect citotoxic moderat după 48 de ore de tratament. Prin urmare, comparativ cu martorul, viabilitatea celulelor HDFa a fost de 78% în cazul probei G1-NCA-1-5FU și 75% în cazul probei G2-NCA-1-5FU.

### **5.6. Evaluarea citotoxicității formulărilor topice de tip gel pe bază de nanocapsule funcționalizate asupra celulelor tumorale TE 354.T prin metoda MTT**

Studiile *in vitro*, pe culturi de celule tumorale, au avut ca scop investigarea gradului de biocompatibilitate a unor noi compuși de sinteză (nanocapsule, lipozomi, geluri), ce au fost ulterior încărcăți cu citostaticul de uz clinic 5-fluorouracil (5-FU), folosind o gamă largă de doze, variind de la 25 la 200 μg/ml, precum și evaluarea eficienței activității citostatice prin eliberarea controlată a medicamentului, în vederea realizării unei terapii antitumorale țintite. Durata tratamentului a fost de 24 și 48 ore, compușii testați și dozele folosite fiind redate în tabelul 12. Fiecare variantă experimentală a fost realizată în triplicat. În cazul tratamentului individual de 24 de ore, atât cu nanocapsulele NCA1, cât și cu gelul G1 a celulelor tumorale TE 354.T, s-a evidențiat un efect nesemnificativ asupra viabilității celulare, valorile fiind cuprinse, în cazul NCA1 între 97,75% (25 μg/ml) și de 91,35% (100 μg/ml), iar în cazul G1 între 97,75% la doza de 50 μg/ml și 77,80% (200 μg/ml), ceea ce sugerează o bună biocompatibilitate.

Tratamentul de 24 de ore cu NCA1 încărcate cu 5-FU a determinat scăderi moderate ale viabilității celulare într-o manieră dependență de doză, înregistrându-se la doza maximă (100 μg/ml) valoarea de 61,50%. O situație similară se observă și în cazul asocierii nanocapsulelor încărcate cu 5-FU cu G1, când se constată o valoare de 64,01% a viabilității celulare la doza maximă folosită (200 μg/ml).

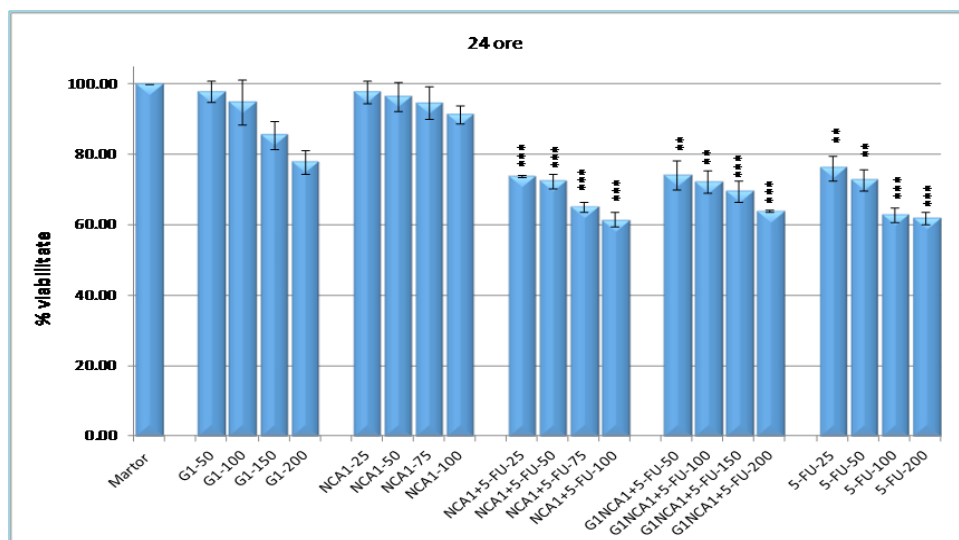
Tratamentul cu 5-FU timp de 24 de ore a indus o diminuare nesemnificativă și graduală, în funcție de doză, a viabilității celulare, fiind consemnată la doza de 200  $\mu\text{g/ml}$  valoarea de 61,85%, comparabilă cu cele determinate de NCA1-5FU și G1NCA1-5FU, fapt care atestă o bună eliberare a citostaticului din sistemele de vectorizare (figura 65). Totuși, nu se poate vorbi de un efect citotoxic foarte pronunțat, întrucât nu a fost depășită limita impusă de programele de referință de screening *in vitro* și anume, inhibarea proceselor celulare cu cel puțin 50% .

**Tabelul 12. Codificarea produșilor testați și dozele specifice folosite pentru tratarea celulelor TE 354.T, cifra din dreapta reprezentând doza ( $\mu\text{g/ml}$ ).**

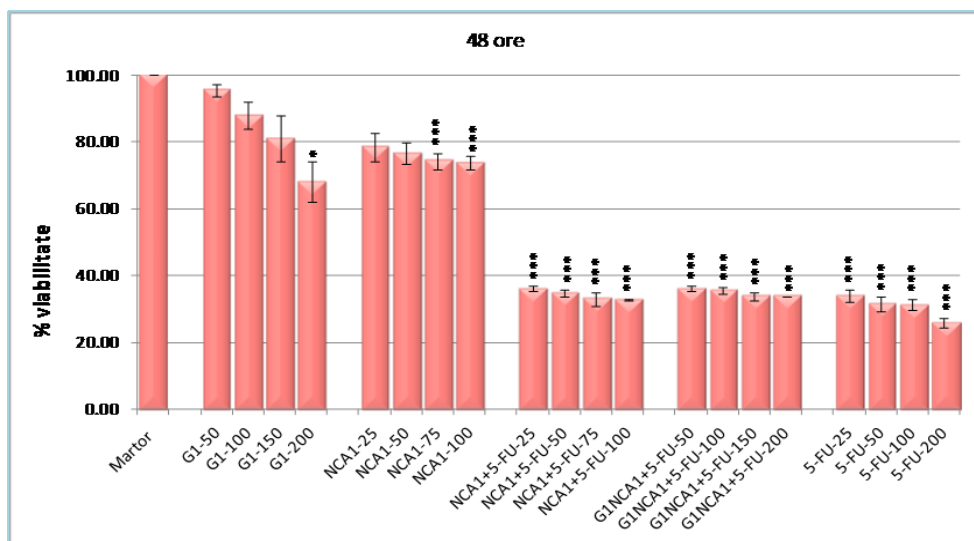
Nr. crt.	Compus	Nr. crt.	Compus
1	G1-50	15	NCA1-5FU-75
2	G1-100	16	NCA1-5FU-100
3	G1-150	17	G1-NCA1-5FU-50
4	G1-200	18	G1-NCA1-5FU-100
5	G2-50	19	G1-NCA1-5FU-150
6	G2-100	20	G1-NCA1-5FU-200
7	G2-150	21	G2-NCA1-5FU-50
8	G2-200	22	G2-NCA1-5FU-100
9	NCA1-25	23	G2-NCA1-5FU-150
10	NCA1-50	24	G2-NCA1-5FU-200
11	NCA1-75	25	5FU-25
12	NCA1-100	26	5FU-50
13	NCA1-5FU-25	27	5FU-100
14	NCA1-5FU-50	28	5FU-200

Diminuări semnificative ale viabilității celulelor provenite dintr-un carcinom bazal de piele s-au instalat la tratamentul de 48 de ore cu NCA1-5FU și G1NCA1-5FU, fiind atinse la dozele maxime valori de 32,81% (pentru NCA1-5FU ) și de 33,90% (pentru G1NCA1-5FU), după cum se observă din figura 66. În cazul 5-FU, după 48 de ore de tratament, acțiunea citotoxică apare chiar începând de la doza minimă (25  $\mu\text{g/ml}$ ) de tratament, viabilitatea celulelor fiind, în raport cu martorul, de 34,13%, pentru ca la doza maximă folosită, de 200  $\mu\text{g/ml}$ , să atingă valoarea de 26,07%, corespunzătoare unui efect citotoxic de 73,93%, valoare care depășește cu mult pragul de minimum de 50% recomandat de programele de screening *in vitro*. De menționat buna tolerabilitate celulară pentru NCA1 și G1, fiind înregistrate valori ale viabilității celulare la dozele maxime folosite de 73,91% pentru NCA1 și respectiv de 68,10% pentru G1. Se poate constata că probele NCA1-5FU și G1NCA1-5FU exercită un impact citotoxic apropiat de cel indus de 5-FU administrat singular, ceea ce le recomandă a fi candidați la folosirea lor ca vectori pentru transportul și eliberarea controlată a chimioterapicelor, contribuind astfel la îmbunătățirea eficienței terapeutice antitumorale.

Tratamentul de 24 de ore, atât cu nanocapsulele NCA1, cât și cu gelul G2 al celulelor tumorale TE 354.T, a evidențiat un impact neglijabil asupra viabilității celulare, valorile fiind cuprinse între 97,75% la concentrația minimă folosită (25  $\mu\text{g/ml}$ ), și de 91,35% (100  $\mu\text{g/ml}$ ) în cazul NCA1 și respectiv de 95,22% la doza de 50  $\mu\text{g/ml}$  și de 79,34% (200  $\mu\text{g/ml}$ ) în cazul G2.



**Figura 65.** Efectul tratamentului de 24 de ore, cu diferite concentrații ( $\mu\text{g/ml}$ ) ale compusului NCA1 asociat cu G1, asupra viabilității culturilor de celule TE 354.T.



**Figura 66.** Efectul tratamentului de 48 de ore, cu diferite concentrații ( $\mu\text{g/ml}$ ) ale nanocapsulelor NCA1 asociate cu G1, asupra viabilității culturilor de celule TE 354.T.

### 5.7. Evaluarea apoptozei folosind tehnica citometriei în flux

Celulele care au fost negative la iodură de propidiu (PI) și negative la Anexina V sunt considerate a fi sănătoase, celulele negative la PI și pozitive cu Anexina V sunt considerate apoptotice, iar celulele pozitive pentru PI și Anexina V sunt considerate necrotice.

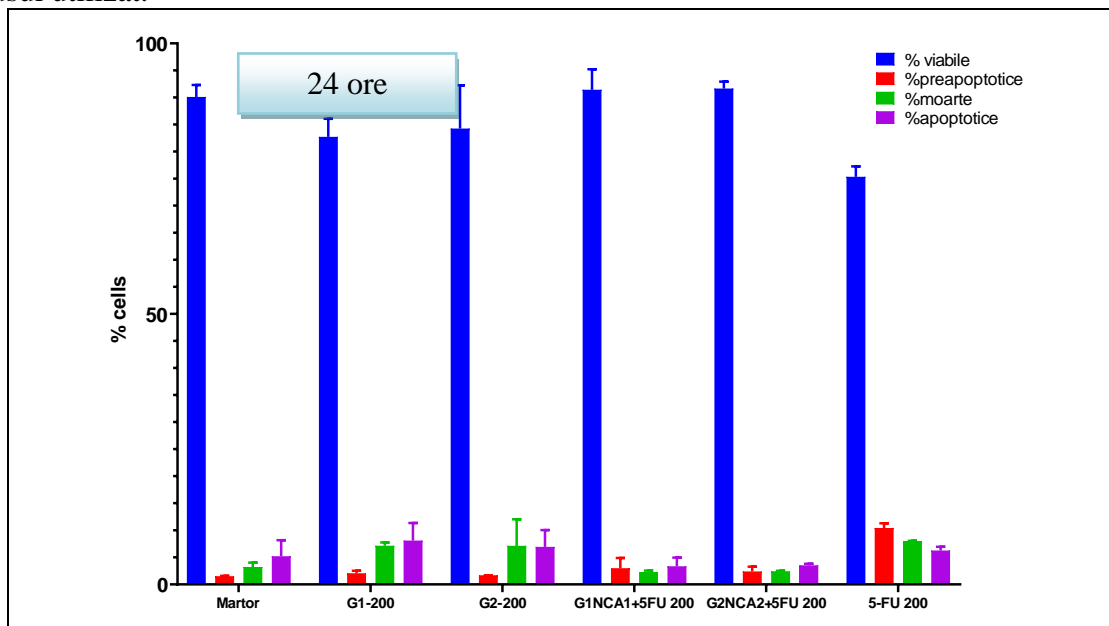
Apoptoza celulară a fost investigată după tratamentul de 24 și 48 de ore cu compușii testați prin testul cu Anexina V-FITC și iodură de propidiu. Determinarea apoptozei prin utilizarea anexinei V-FITC și a iodurii de propidiu are la bază afinitatea puternică a anexinei V pentru reziduurile de fosfatidilserină (în mod normal ascunse în membrana plasmatică) de la suprafața membranei celulare. De-a lungul instalării procesului apoptotic, fosfatidilserina este translocată de pe fața citoplasmatică a membranei plasmatică la suprafața celulei. Iodura de propidiu este utilizată

pentru diferențierea celulelor moarte de cele vii, permițând, de asemenea, separarea dintre celulele preapoptotice și apoptotice în combinație cu Anexina V.

Comparativ cu martorul, tratamentul de 24 ore cu G1 și, respectiv, G2-200 a condus la scăderea frecvenței celulelor viabile (82,71%, respectiv 84,27%), menținerea unui nivel similar al frecvenței celulelor preapoptotice și creșterea frecvenței celulelor apoptotice (8,10% și 6,93%) și, respectiv, moarte (7,15% și 7,13%). Ulterior, la 48 ore, parametrii urmăriți au fost apropiați celor înregistrați în cazul celulelor martor, însă procentul celulelor apoptotice și moarte a fost mai mare (Figura 69).

Efectul 5-FU în doză de 200  $\mu\text{g/ml}$  s-a concretizat printr-o reducere a viabilității celulare (73,35%) și o creștere considerabilă a frecvenței celulelor preapoptotice (10,42%) și de mai mică amplitudine în cazul celor moarte (7,98%) și apoptotice (6,25%).

Tratamentul cu G1NCA1-5FU și respectiv G2NCA1-5FU a determinat, la 24 ore de tratament, menținerea, relativ la același nivel, a frecvenței celulelor vii, preapoptotice, apoptotice și moarte (Figura 69). Prolungirea tratamentului la 48 ore a determinat o scădere a viabilității celulare, comparativ cu martorul (65,15 și 72,06%), un nivel similar al frecvenței celulelor preapoptotice și variații ale celor apoptotice (6,96% și 18,71%) și moarte (24,67% și 4,38%) dependente de compusul utilizat.



**Figura 69.** Efectul tratamentului de 24 și 48 de ore al compușilor G1, G2, G1NCA1-5FU-200, G2NCA1-5FU-200 și 5-FU asupra viabilității culturilor de celule TE 354.T și distribuția frecvenței celulelor viabile, moarte, preapoptotice și apoptotice corespunzătoare a fiecărui lot.

## CONCLUZII GENERALE

Obiectivul principal al tezei de doctorat l-a constituit realizarea a două noi sisteme polimer/medicament cu potențiale aplicații biomedicale. Au fost vizate două tipuri de aplicații, formulările polimer/principiu biologic activ fiind orientate în funcție de acestea. Astfel, formulări de tip hidrogel/medicament au fost realizate cu scopul utilizării în stomatologie ca anestezic local cu efect rapid, dezideratul fiind eliberarea medicamentului la locul afecțiunii, eliminarea unor efecte secundare nedorite ale medicamentului care se pot produce la administrarea clasică a acestuia, creșterea complianței pacientului, îndeosebi în cazul copiilor. Un alt tip de formulare, respectiv nanoparticule încărcate cu un antitumoral a vizat, eident, utilizarea sa pentru țintirea celulelor tumorale specifice cancerului de piele, fiind completată de realizarea unor geluri cu aplicare dermică pentru tratarea topică a acestui tip de cancer.

Lucrarea debutează cu cercetarea bibliografică ce a permis trecerea succintă în revistă a problematicii privind, pe de o parte, sistemele polimer/medicament sub formă de hidrogeluri și pe de altă parte sistemele nanoparticulate, precum și formulări farmaceutice – geluri – pe baza acestora. Studiul bibliografic întreprins a constituit baza abordării cercetărilor experimentale, permițând identificarea unor nișe în care s-au plasat acestea și asigurând astfel originalitatea lucrării.

Contribuțiile originale ale tezei se înscriu deci pe două coordonate, sunt structurate în 4 capitole, dintre care primul prezintă materialele utilizate, tehnicile de lucru, tehnicile de caracterizare și testele *in vitro* și *in vivo* efectuate. Concluziile generale rezultate în urma cercetărilor sunt formulate după cum urmează:

1. Au fost obținute trei hidrogeluri noi utilizând în acest scop chitosanul și un copolimer alternant pe bază de acetat de vinil și anhidridă maleică [poli(AVAM)] în vederea utilizării lor ca suport pentru includerea bupivacainei, cu scopul folosirii sistemului astfel realizat ca anestezic local pentru atenuarea durerii asociată cu procedurile invazive clasice și pentru evitarea contactului direct al medicamentului cu țesuturile.
2. La baza obținerii hidrogelului stă reacția de condensare interfacială prin amidare a grupelor aminice din chitosan cu ciclurile anhidridice foarte reactive în condiții moderate din copolimerul sintetic, rezultând astfel o rețea de tip interpenetrat/interconectat sub formă de membrană. Se impune precizarea că este pentru prima dată, după informațiile noastre, când se obține un hidrogel în care este implicat copolimerul amintit.
3. Caracterizarea structurală prin spectroscopie FT-IR a probat prezența în compoziția hidrogelului a celor două componente polimerice și a evidențiat formarea legăturilor amidice între ele, precum și apariția unor grupări carboxilice, consecință a hidrolizei parțiale inevitabile a ciclurilor de anhidridă maleică.
4. Morfologia hidrogelurilor evidențiată prin microscopie electronică de baleiaj este de tip macroporos, cu pori de formă eliptică a căror dimensiune a axei mari variază în domeniul 200-600 μm.
5. Caracterul de hidrogel, absolut necesar pentru a permite includerea de medicamente hidrosolubile, a fost probat de studiile cinetice de umflare în mediu slab alcalin, specific celui al salivei din cavitatea bucală. Hidrogelul prezintă un evident caracter pH-sensibil, determinat de grupările carboxilice provenite prin hidroliza ciclului anhidridic, care trec în grupări carboxilat ce determină respingeri electrostatice concretizate în producerea fenomenului de umflare. Gradul de umflare scade în consecință cu reducerea cantității de copolimer sintetic în compoziția hidrogelului.

6. Hidrogelurile obținute au capacitatea de a include bupivacaina – anestezie locală -și de a o elibera în timp. Foarte important pentru aplicația vizată este faptul că eficacitatea eliberării anestezicului în mediu care simulează saliva poate atinge 50% după primele 15 minute, conform dezideratului urmărit.
7. Eliberarea anestezicului din hidrogel decurge printr-un mecanism de difuzie, după cum era de așteptat, acesta fiind confirmat de valoarea parametrilor ecuației Peppas. Procesul atinge echilibrul după aproximativ 40 minute, eficacitatea eliberării plasându-se între 80-84%.
8. Eliberarea medicamentului din sistemul realizat decurge mai rapid din hidrogelurile cu grad ridicat de umflare în mediul salivar, în conformitate cu datele cinetice ale procesului de umflare.
9. Analiza teoretică a procesului de eliberare a confirmat încă o dată validitatea modelului fractal generalizat, justificând un model csavi-universal de eliberare a medicamentului capabil să ofere informații despre evoluția sa în timp.
10. Hidrogelurile nu prezintă citotoxicitate, calitate probată de testele realizate pe fibroblaste dermice umane, efect previzibil dată fiind biocompatibilitatea polimerilor implicați în formarea lor și lipsa unui agent de reticulare, de obicei toxic.
11. Testarea *in vivo* a unui hidrogel cu încărcarea maximă de bupivacaină pe animale de experiență – iepuri -, a evidențiat efectul anestezic al sistemului, care s-a instalat după 15 minute fără efecte secundare suplimentare.
12. Capacitatea chitosanului de a forma rețele cu caracter de hidrogel prin reacția cu cicluri anhidrice, demonstrată în cercetarea precedentă discutată, a fost exploatată în sensul obținerii unui nou tip de formulare, respectiv nanocapsule. Copolimerul sintetic utilizat însă în acest caz a fost pe bază de *N*-vinil pirolidonă și anhidridă itaconică, caracterizat prin biocompatibilitate și lipsă de toxicitate.
13. Nanocapsulele au fost obținute printr-un proces de amidare prin condensare interfacială, cercetarea având caracter original prin natura copolimerului utilizat pentru prima dată în realizarea acestui tip de transportor nanoparticulat, ca și prin utilizarea chitosanului funcționalizat cu un aptamer.
14. Scopul obținerii nanocapsulelor a fost acela de a include, transporta și elibera controlat/susținut un medicament antitumoral, aplicația vizată constituind-o tratarea cancerului de piele.
15. S-a urmărit țintirea activă de către nanocapsulele încărcate cu antitumoral cu precădere a celulelor tumorale, realizarea acestui efect fiind posibilă prin funcționalizarea chitosanului constituent al membranei capsulelor cu un aptamer (AS1411), ligand recunoscut de către nucleolină, receptor bine exprimat în membrana celulelor tumorale.
16. Prima etapă a studiului a constat în sinteza copolimerului, precum și funcționalizarea chitosanului cu aptamerul, respectiv caracterizarea sa fizico-chimică. Analizele spectrale FTIR și RMN au probat realizarea structurilor dorite.
17. Nanocapsulele au fost realizate printr-un proces de condensare interfacială, în condiții moderate dată fiind reactivitatea ridicată a ciclurilor anhidrice din catena de bază a copolimerului.
18. Realizarea membranei nanocapsulei prin condensarea celor doi polimeri, în fapt a chitosanului în amestec cu chitosan funcționalizat și a copolimerului, a fost demonstrată prin spectroscopia FTIR care probează apariția grupărilor amidice și prezența aptamerului legat pe chitosan, precum și prin spectroscopia EDAX.

19. Diametrul mediu și polidispersitatea dimensională a nanocapsulelor au fost evaluate prin difracție de fascicol laser, constatându-se că acestea au dimensiuni nanometrice, că diametrul crește cu creșterea cantității de chitosan din compoziția lor și că se formează o singură populație de nanostructuri, efect dovedit de curbele de distribuție cu caracter monomodal.
20. Microscopia electronică de baleiaj a confirmat morfologia nanocapsulelor: forma sferică și diametrul de ordin nanometric.
21. Suspensiile apoase de nanocapsule au stabilitate bună, probată de valorile ridicate ale potențialului „zeta”, ceea ce indică posibilitatea administrării acestora prin injecție intravenoasă fără riscul de înfundare a acului seringii sau obturare a vaselor de sânge prin aglomerare.
22. Nanocapsulele prezintă capacitate de umflare în medii apoase simulând fluide fiziologice (pH=7,4), gradul de umflare crescând cu creșterea ponderii polizaharidului în compoziție. Umflarea este consecința pe de o parte a difuziei apei în membrana cu caracter de hidrogel, dar și a pătrunderii apei în cavitatea goală a nanocapsulei.
23. Umflarea este rapidă în primele momente ale procesului tinzând apoi spre o valoare constantă prin atingerea echilibrului la peste două ore.
24. Nanocapsulele prezintă capacitate de încărcare a unui medicament utilizat ca model – 5-fluorouracil -, eficacitatea procesului crescând cu creșterea cantității de chitosan din compoziție, în concordanță cu procesul de umflare.
25. Cinetica de eliberare a medicamentului a fost evaluată simulând condițiile aplicării pe piele, respectiv utilizând o celulă Frantz ale cărei compartimente au fost separate de o membrană ce simulează derma.
26. Eliberarea medicamentului se realizează prin mecanism difuzional iar eficiența procesului este diminuată de creșterea cantității de chitosan în compoziția membranei nanocapsulei precum și de creșterea cantității de chitosan funcționalizat cu aptamer.
27. Diferența dintre cinetica de eliberare a medicamentului din capsulele funcționalizate și cele nefuncționalizate este determinată de modul în care contribuția difuziei și relaxării variază în timp.
28. Nanocapsulele obținute sunt necitotoxice, sunt bio- și hemocompatibile ceea ce le recomandă ca nanotransportori ai 5-fluorouracilului pentru țintirea celulelor tumorale, în particular pentru tratarea cancerului de piele.
29. Formulările topice de tip gel pe baza nanocapsulelor funcționalizate și încărcate cu 5-fluorouracil prezintă un comportament reologic care atestă buna lor capacitate de etalare pe piele, exprimată prin scăderea vâscozității în funcție de tensiunea de forfecare.
30. Formulările topice conținând nanocapsule funcționalizate sunt hemocompatibile, valorile hemocompatibilității fiind cuprinse în intervalul 0,03-0,55%, interval acceptat pentru această proprietate.
31. Testele de iritare *in vitro* au evidențiat faptul că nanocapsulele fără antitumoral, formulările simple de tip gel și cele care conțin nanocapsule încărcate cu 5-fluorouracil s-au dovedit a fi neiritante.
32. Formulările de tip gel care nu conțin nanocapsule încărcate cu antitumoral s-au dovedit a fi practic necitotoxice, pe când nanocapsulele încărcate cu 5-fluorouracil și formulările de tip gel care le conțin exercită un efect citotoxic similar celui indus de medicamentul liber și pot contribui la îmbunătățirea eficacității terapiilor antitumorale. Testele de apoptoză celulară confirmă rezultatele de citotoxicitate.



33. Testele au dovedit permeabilitatea/penetrabilitatea medicamentului din formulările topice de tip gel prin membrana care simulează derma, dar gradul de permeabilitate este mai redus decât în cazul nanocapsulelor încărcate cu antitumoral însă neincluse în gel.
34. Cercetările derulate în cadrul tezei de doctorat au condus la conceperea și dezvoltarea unui sistem complex, inovator, care poate ținti eficient membrana celulelor tumorale prin aptamerul cu care sunt funcționalizați în suprafață nanotransportorii medicamentului antitumoral, și pot astfel elibera în mod susținut și controlat 5-fluoruracilul la locul tumorii.

### **Bibliografie selectiva**

[236] Amin, K., and Dannenfelser, R., In vitro hemolysis: guidance for the pharmaceutical scientist, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 95:1173–1176, 2006.

### **Valorificarea rezultatelor cercetării**

#### **Lucrări științifice publicate în reviste cu factor de impact**

##### ***Lucrări publicate în reviste internaționale cotate ISI:***

1. **Cristian Mihalache**, Delia Mihaela Rață, Anca Niculina Cadinoiu , Xenia Patraș, Simona Elena Băcăiță, Marcel Popa, Leonard Ionuț Atanase, Oana Maria Darabă, „Bupivacaine-loaded chitosan hydrogels for topical anesthesia in dentistry”, *Polymer International*, 69. 11, 1152-1160, 2020 (DOI 10.1002/pi.6052)
2. Delia Mihaela Rață, Anca Niculina Cadinoiu, Leonard Ionuț Atanase, Simona Elena Băcăiță, **Cristian Mihalache**, Oana-Maria Darabă, Daniela Gherghel, Marcel Popa, “In vitro” behaviour of aptamer-functionalized polymeric nanocapsules loaded with 5-fluorouracil for targeted therapy”, *Materials Science and Engineering: C*, Volume 103, 109828, <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.109828> , October 2019.

#### **Lucrări publicate în reviste BDI**

1. Delia Mihaela Rață, Oana Darabă, Paula Merlușcă, Laura Ecaterina Dârțu, **Cristian Mihalache**, Ana Maria Chirap, Adina Buburuzan, „Hydrogels based on natural polymers with possible application in the treatment of periodontitis” *International Journal of Medical Dentistry* ,Vol 18 (4) : 265-270, 2014.

#### **Lucrări prezentate la manifestări științifice internaționale**

1. Delia-Mihaela Rață, Xenia Patraș, Anca-Niculina Cadinoiu, **Cristian Mihalache**, Vasile Burlui, Marcel Popa „Hidrogeluri încărcate cu Bupivacaină pentru anestezia locală în stomatologie” *Congresul Internațional al Universității Apollonia, Ediția a XXVI-a, Pregătim Viitorul Promovând Excelența, Biomateriale în medicina moderna*, 3 - 5 Martie 2016.
2. Delia-Mihaela Rață, Anca-Niculina Cadinoiu, **Cristian Mihalache**, Oana Darabă, Vasile Burlui, Marcel Popa „Hydrogels based on chitosan and poly(maleic anhydride-alt-vinyl acetate) with potential application in dentistry” Al 8 – lea *Congres National cu Participare*

*Internationala si a 34 – a Sesiune Nationala a Societatii Romane de Biologie Celulara, 8 – 12 iunie 2016.*

3. Delia Mihaela Rata, Anca Niculina Cadinoiu, Leonard Ionut Atanase, Vasile Burlui, **Cristian Mihalache**, Oana Maria Darabă, Marcel Popa „Biomaterial properties evaluation of Aptamer-Functionalized Polymeric Nanocapsules Loaded with 5-Fluorouracil” *International Congress of „Apollonia” University from Iasi*, By promoting excellence, we prepare the future, Edition XXIX, Iasi, Romania, 28 februarie – 03 martie, 2019

#### **Lucrări prezentate la manifestări științifice naționale**

1. Delia Mihaela Rață, Vasile Burlui, Anca Niculina Cadinoiu, **Cristian Mihalache**, Toni Cigu, Marcel Popa „Eliberarea secvențială a unor principii active din biocompozite cu potențiale aplicații în stomatologie” *Sesiunea Științifică de Toamnă 2015, Academia Oamenilor de Știință din România*, 24 - 26 Iași, Septembrie 2015
2. **Cristian Mihalache**, Anca Niculina Cadinoiu, Marcel Popa, Vasile Burlui, Paula Merlușcă, Delia-Mihaela Rață „Tratamentul bolii parodontale utilizând sisteme de transport cu eliberare secvențială de medicamente” *Sesiunea Științifică Anuală a Institutului de Cercetări „Acad. Ion Haulică” al Universității „Apollonia” din Iași*, 23 Noiembrie 2015.
3. Delia-Mihaela Rață, Anca-Niculina Cadinoiu, **Cristian Mihalache**, Oana Darab, Vasile Burlui, Marcel Popa „Hydrogels based on chitosan and poly(maleic anhydride-alt-vinyl acetate) with potential application in dentistry” *8th National Congress with International Participation and 34th Annual Scientific Session of the Romanian Society of Cell Biology*, Oradea, Romania, 8 – 12 June 2016.

#### **Granturi de cercetare**

1. “Formulări topice cu nanoparticule funcționalizate cu aptamer pentru tratamentul carcinomului bazocelular” PN-III-P4-ID-PCE-2016-0613, contract 185/2017, director proiect – Prof. Dr. Ing. Marcel Popa, data începerii: iulie 2017, Durata: 30 luni