UNIVERSITATEA TEHNICĂ „GHEORGHE ASACHI” DIN IAŞI

Facultatea de Inginerie Chimică și Protecția Mediului „Cristofor Simionescu”

NANOPARTICULE CU ACȚIUNE ANTIMICROBIANĂ OBȚINUTE DIN COPOLIMERI BIODEGRADABILI PE BAZĂ DE POLIESTERI

REZUMAT

TEZĂ DE DOCTORAT

Doctorand: Oana Cucoveică

Conducător ştiinţific:

Prof. Univ. Habil. Dr. Ing. Leonard Ionuț ATANASE

Iaşi – 2026

INTRODUCERE GENERALĂ

Prezenta teză de doctorat se înscrie în contextul dezvoltării materialelor polimerice biodegradabile și biosursate, ca alternativă sustenabilă la polimerii convenționali derivați din resurse petroliere. Deși poliamidele oferă proprietăți mecanice și termice excelente, lipsa biodegradabilității le limitează utilizarea în domeniul biomedical. În schimb, poliesterii biodegradabili prezintă biocompatibilitate și degradare controlată, dar au performanțe mecanice mai reduse. Poliesteramidele reprezintă o soluție promițătoare, combinând avantajele ambelor clase de materiale.

Interesul pentru aceste materiale este susținut de dezvoltarea sistemelor moderne de administrare controlată a medicamentelor, în care nanoparticulele polimerice biodegradabile permit protejarea substanțelor active, creșterea biodisponibilității și eliberarea controlată a acestora. În acest context, teza a avut ca obiectiv dezvoltarea unor noi copolimeri biodegradabili pe bază de poliesteri și poliesteramide biosursate și evaluarea potențialului lor pentru obținerea de nanoparticule destinate administrării controlate a Nistatinei, un antifungic utilizat în tratamentul infecțiilor cu specii de *Candida*.

Lucrarea este structurată în opt capitole, grupate într-o parte bibliografică și una experimentală. Primele patru capitole prezintă fundamentele teoretice privind sinteza poliesterilor biodegradabili, mecanismele de biodegradare, metodele de preparare a micro- și nanoparticulelor polimerice și aplicațiile acestora în sistemele de eliberare controlată a medicamentelor. Capitolul 5 descrie materialele, metodele experimentale și tehnicile de caracterizare utilizate.

Partea experimentală include sinteza și caracterizarea copolimerilor bloc PLLA-b-PCL și evaluarea influenței parametrilor moleculari asupra proprietăților nanoparticulelor obținute (Capitolul 6), dezvoltarea și studiul biodegradabilității copolimerilor PCL-b-PEA-b-PCL (Capitolul 7), precum și prepararea de nanoparticule pe bază de acești copolimeri pentru încapsularea Nistatinei (Capitolul 8). Au fost investigate eficiența încapsulării, profilul de eliberare a medicamentului, biocompatibilitatea, hemocompatibilitatea și activitatea antifungică împotriva principalelor specii de *Candida*.

Rezultatele obținute demonstrează că noii copolimeri sintetizați pot fi utilizați pentru dezvoltarea unor sisteme nanoparticulate eficiente, cu proprietăți adecvate pentru administrarea controlată a medicamentelor. Prin integrarea sintezei polimerilor, caracterizării fizico-chimice,

studiilor de biodegradare și evaluărilor biologice, teza contribuie la dezvoltarea unor noi platforme polimerice biodegradabile destinate aplicațiilor biomedicale și farmaceutice, în special pentru tratamentul infecțiilor fungice.

CAPITOLUL 1

SINTEZA POLIESTERILOR SUB FORMĂ DE COPOLIMERI: STRATEGII DE PROIECTARE MOLECULARĂ ȘI METODE DE OBȚINERE UTILIZATE ÎN DEZVOLTAREA SISTEMELOR AVANSATE DE ELIBERARE CONTROLATĂ

Sinteza copolimerilor poliesterici reprezintă o direcție majoră în dezvoltarea biomaterialelor biodegradabile, deoarece permite ajustarea proprietăților fizico-chimice, mecanice și biologice ale materialelor prin combinarea diferitelor unități structurale într-un singur lanț macromolecular [1–3]. Spre deosebire de homopolimerii clasici, precum PLA, PAG sau PCL, copolimerii oferă posibilitatea controlului degradării, hidrofilicității, flexibilității și funcționalizării, ceea ce a condus la apariția unor materiale performante precum PLGA, unul dintre cei mai utilizați copolimeri biodegradabili în aplicațiile biomedicale [4–6].

Cea mai utilizată metodă de obținere a copolimerilor poliesterici este polimerizarea prin deschiderea ciclului (ROP), datorită controlului superior asupra masei moleculare, dispersității și arhitecturii polimerice [7–9]. Prin introducerea simultană sau secvențială a monomerilor se pot obține copolimeri statistici sau bloc, iar utilizarea catalizatorilor precum $Sn(Oct)_2$, respectiv a catalizatorilor alternativi pe bază de metale biocompatibile sau organocatalizatori (TBD, DBU), permite realizarea unor sisteme adaptate aplicațiilor biomedicale sensibile [10–18].

O alternativă importantă este policondensarea directă între diacizi și dioli sau hidroxiacizi, metodă apreciată pentru flexibilitatea structurală și posibilitatea introducerii unor grupe funcționale complexe, deși oferă un control mai redus asupra masei moleculare și secvențialității [19–22]. De asemenea, copolimerii pot fi obținuți prin reacții de cuplare chimică („click chemistry”, reacții tiol-enă, esterificări terminale), care permit conectarea precisă a diferitelor segmente polimerice și funcționalizarea cu molecule bioactive [23].

Pentru dezvoltarea unor arhitecturi macromoleculare complexe se utilizează tehnicile de polimerizare radicalică controlată, precum ATRP, RAFT și NMP [24]. Aceste metode permit funcționalizarea poliesterilor cu segmente vinilice sau acrilice și obținerea unor copolimeri

grefați, stea sau hiperbranșați [25–32]. ATRP este utilizată frecvent pentru generarea sistemelor amfifilice capabile să formeze micele și nanoparticule pentru transportul medicamentelor [25–28], în timp ce RAFT facilitează obținerea materialelor stimuli-responsive sensibile la pH, temperatură sau potențial redox [29, 30]. NMP oferă copolimeri bine definiți și fără contaminare metalică, însă necesită temperaturi mai ridicate [31, 32].

O categorie deosebit de importantă este reprezentată de copolimerii PEG–poliesterici, care combină hidrofilicitatea și biocompatibilitatea PEG-ului cu biodegradabilitatea segmentelor poliesterice [33–39]. Aceștia sunt sintetizați, în principal, prin ROP utilizând PEG drept macroinițiator și pot forma structuri dibloc, tribloc sau arhitecturi complexe [40–43]. Caracterul lor amfifilic favorizează autoasamblarea în micele polimerice, utile pentru încapsularea și transportul medicamentelor hidrofobe [44–46]. Prezența PEG-ului conferă efectul „stealth”, reducând recunoașterea de către sistemul imunitar și prelungind timpul de circulație al nanoparticulelor [46, 47]. În plus, degradarea segmentului poliesteric generează metaboliți netoxici, ceea ce recomandă aceste sisteme pentru aplicații clinice [48].

Poli(ester-amidele) (PEA) reprezintă o clasă importantă de biomateriale biodegradabile, obținute prin numeroase metode de sinteză, inclusiv policondensare, polimerizare prin deschiderea ciclului, ADMET și alte strategii moderne [49–57]. Introducerea aminoacizilor în structura acestora a îmbunătățit biocompatibilitatea, degradabilitatea și posibilitățile de funcționalizare, ceea ce a extins aplicațiile în eliberarea controlată a medicamentelor și ingineria tisulară [58–61].

Sinteza PEA se realizează prin trei metode principale: policondensare în masă, interfacială și în soluție [51]. Policondensarea în masă oferă randamente ridicate și proprietăți termice favorabile, dar necesită temperaturi ridicate [62–65]. Policondensarea interfacială permite reacții rapide la temperaturi moderate și a fost utilizată pentru obținerea unor PEA biodegradabile destinate aplicațiilor vasculare și ingineriei tisulare [66–75]. Policondensarea în soluție conduce la mase moleculare ridicate și dispersități reduse, fiind utilizată pentru prepararea unor sisteme capabile să încorporeze eficient medicamente anticancerigene [76–86].

Au fost dezvoltate și PEA bazate pe esteri ciclici și comonomeri, prin copolimerizarea ε-caprolactonei cu lactame, aminoacizi sau morfolin-dione, rezultând materiale cu proprietăți termice, mecanice și biodegradabile ajustabile în funcție de compoziție [87–106].

Un aspect fundamental în proiectarea copolimerilor biomedicali îl reprezintă controlul arhitecturii moleculare [107, 108]. Copolimerii liniari sunt cei mai simpli și mai utilizați datorită sintezei și caracterizării facile [109, 110]. Structurile de tip stea oferă densități mari de funcționalizare și stabilitate coloidală superioară [111], în timp ce dendrimerii permit încărcarea simultană a unui număr mare de molecule terapeutice și agenți imagistici [112, 113]. Polimerii hiperbranșați combină avantajele dendrimerilor cu metode de sinteză mai simple, prezentând capacități ridicate de încărcare și autoasamblare [114–118]. Tendința actuală constă în dezvoltarea unor arhitecturi hibride care integrează biodegradabilitatea, vectorizarea selectivă, răspunsul la stimuli și eficiența ridicată de transport al medicamentelor, reprezentând una dintre cele mai promițătoare direcții în nanomedicină și ingineria biomaterialelor avansate [107–118].

CAPITOLUL 2

BIODEGRADABILITATEA POLIESTERILOR: PARTICULARITĂȚI STRUCTURALE ȘI MECANISME DE DEGRADARE ÎN CAZUL HOMOPOLIMERILOR ȘI COPOLIMERILOR UTILIZAȚI ÎN SISTEMELE DE ELIBERARE CONTROLATĂ

Biodegradabilitatea reprezintă una dintre proprietățile fundamentale care au consacrat poliesterii ca materiale de referință pentru sistemele moderne de eliberare controlată a medicamentelor [119–121]. Capacitatea acestora de a se degrada progresiv în mediul biologic până la produși metabolizabili sau ușor eliminați reduce riscul acumulării tisulare și al reacțiilor inflamatorii asociate materialelor permanente. În plus, procesul de degradare influențează direct profilul de eliberare al substanțelor active, deoarece eliberarea este determinată atât de difuzia medicamentului, cât și de eroziunea progresivă a matricei polimerice [122].

Biodegradarea poliesterilor se realizează în principal prin hidroliza legăturilor esterice din lanțul principal, proces influențat de acțiunea enzimelor, pH, temperatură și caracteristicile structurale ale polimerului [119]. Deși mecanismul general este comun tuturor poliesterilor, viteza și modul de degradare diferă semnificativ în funcție de structura moleculară.

Dintre homopolimerii esterici biodegradabili, poli(acidul glicolic) (PGA) este caracterizat printr-un grad ridicat de cristalinitate și proprietăți mecanice excelente, însă degradarea sa produce acid glicolic, care poate genera acidifiere locală și reacții inflamatorii [123, 124]. Din acest motiv, PGA este utilizat mai frecvent în copolimeri decât ca material individual.

Poli(acidul lactic) (PLA) este unul dintre cei mai studiați poliesteri biodegradabili datorită biocompatibilității sale ridicate [125]. Viteza degradării este influențată de stereochimie, forma semicristalină PLLA degradându-se mai lent decât forma amorfă PDLLA [126]. Procesul de degradare implică absorbția apei, clivajul legăturilor esterice și formarea acidului lactic, metabolizat ulterior prin ciclul Krebs. Un fenomen caracteristic PLA este autocataliza internă, prin care acidul lactic acumulat accelerează degradarea ulterioară, influențând semnificativ profilul de eliberare al medicamentelor [127].

Poli(ε-caprolactona) (PCL) prezintă cea mai lentă degradare dintre poliesterii utilizați biomedical, datorită hidrofobicității ridicate și flexibilității structurii sale [128]. Pe lângă hidroliză, PCL poate suferi și degradare enzimatică prin acțiunea lipazelor și esterazelor. Timpul de degradare poate varia de la câteva luni la câțiva ani, ceea ce face acest polimer adecvat pentru sisteme implantabile și formulări cu eliberare prelungită [129, 130].

Pentru optimizarea biodegradabilității și a proprietăților mecanice au fost dezvoltați copolimerii esterici. Cel mai important exemplu este poli(lactid-co-glicolidul) (PLGA), considerat standardul de aur al sistemelor biodegradabile de administrare controlată [131]. Introducerea unităților glicolid reduce cristalinitatea și accelerează penetrarea apei în matrice. Compoziția monomerică influențează direct viteza de degradare, iar formulările PLGA 50:50 se degradează cel mai rapid datorită caracterului lor predominant amorf [132]. Totuși, degradarea generează acid lactic și acid glicolic, ceea ce poate amplifica fenomenul de autocataliză și poate afecta stabilitatea proteinelor încapsulate [133].

Copolimerii PEG–poliesterici reprezintă o altă clasă importantă de materiale biodegradabile [134, 135]. Introducerea segmentelor PEG crește hidrofilicitatea și facilitează pătrunderea apei în matrice, favorizând o degradare mai uniformă. În plus, dizolvarea PEG-ului creează microcanale care accelerează hidratarea și eliberarea medicamentelor. Cu toate acestea, un conținut excesiv de PEG poate compromite proprietățile mecanice și poate conduce la degradare prea rapidă.

Copolimerii multibloc, precum și arhitecturile dendritice și hiperbranșate, oferă posibilitatea unui control avansat asupra degradării [111, 114–116]. Alternarea segmentelor hidrofile și hidrofobe permite degradarea secvențială și eliberarea multifazică a principiilor active. Structurile dendritice și hiperbranșate prezintă suprafețe mari și acces facil al apei, ceea ce favorizează degradarea accelerată și uniformă.

Poli(ester-amidele) (PEA) combină avantajele biodegradabilității poliesterilor cu stabilitatea și funcționalitatea legăturilor amidice [136]. Degradarea acestora poate fi ajustată prin alegerea aminoacizilor incorporați în structură. PEA pe bază de aminoacizi hidrofobi, precum fenilalanina, degradează mai lent, în timp ce cele pe bază de lizină sau arginină sunt mai hidrofile și prezintă degradare accelerată [137]. Această flexibilitate permite dezvoltarea unor sisteme sensibile la microambientul patologic, cu potențial ridicat pentru medicina personalizată.

Pe lângă compoziția chimică, biodegradarea este influențată de factori externi precum pH-ul, temperatura, activitatea enzimatică, ionicitatea și prezența proteinelor adsorbite [138]. Deosebit de importantă este influența dimensiunii particulelor. Nanoparticulele se degradează mai rapid decât microsferele datorită raportului suprafață/volum mai mare, care facilitează pătrunderea apei și hidroliza legăturilor esterice [139, 140]. În schimb, microsferele mari pot prezenta degradare neuniformă și fenomene accentuate de autocataliză internă.

Porozitatea reprezintă un alt factor esențial, deoarece particulele poroase permit difuzia rapidă a apei și accelerează atât degradarea, cât și eliberarea medicamentelor [138, 140]. În mod similar, prezența grupărilor ionice crește hidratarea și mobilitatea lanțurilor polimerice, favorizând degradarea. Totuși, interacțiunile electrostatice dintre polimer și medicament pot modifica semnificativ profilul de eliberare, ceea ce impune optimizarea simultană a tuturor parametrilor structurali.

În concluzie, biodegradabilitatea poliesterilor și a copolimerilor lor reprezintă rezultatul interacțiunii complexe dintre structura moleculară, arhitectura polimerică și condițiile mediului biologic [119–140]. Controlul acestor factori permite proiectarea unor sisteme de eliberare controlată cu profiluri terapeutice predictibile și adaptate cerințelor specifice ale aplicațiilor biomedicale moderne.

CAPITOLUL 3

METODE DE PREPARARE A PARTICULELOR PE BAZĂ DE POLIESTERI BIODEGRADABILI: ABORDĂRI CLASICE ȘI MODERNE PENTRU HOMOPOLIMERI ȘI COPOLIMERI

Prepararea particulelor polimerice pe bază de poliesteri biodegradabili reprezintă o etapă esențială în dezvoltarea sistemelor moderne de eliberare controlată a medicamentelor, deoarece caracteristicile particulelor – dimensiunea, distribuția granulometrică, morfologia, porozitatea,

sarcina superficială, eficiența de încapsulare și stabilitatea coloidală – influențează direct performanța terapeutică [139]. Aceste proprietăți depind atât de natura polimerului utilizat (PLA, PGA, PCL, PLGA, PEG-poliesteri sau poli(ester-amide)), cât și de metoda de preparare a particulelor [139, 141].

În prezent, există numeroase metode de preparare a particulelor polimerice, care includ tehnici bazate pe precipitare, emulsificare, separare de fază, evaporarea sau extracția solventului, uscare prin pulverizare, electrospraiere, fluide supercritice, autoasamblare supramoleculară și microfluidică [139, 141]. Alegerea metodei depinde de tipul principiului activ, de dimensiunea dorită a particulelor și de profilul terapeutic urmărit.

Metodele bazate pe precipitare sunt apreciate pentru simplitatea și eficiența lor. Cea mai utilizată este nanoprecipitarea, care presupune dizolvarea polimerului într-un solvent organic miscibil cu apa și introducerea acestuia într-o fază apoasă, unde difuzia rapidă a solventului determină formarea spontană a nanoparticulelor [135, 139, 143, 144]. Metoda este potrivită pentru poliesterii hidrofobi și pentru copolimerii amfifilici, oferind particule de dimensiuni mici și distribuții granulometrice uniforme. Principalul său avantaj este simplitatea experimentală, însă eficiența de încapsulare a moleculelor hidrofile este redusă.

O variantă particulară o reprezintă precipitarea prin schimb de pH sau temperatură, utilizată pentru copolimerii stimuli-responsivi și poli(ester-amidele) funcționalizate. Modificarea condițiilor de mediu determină schimbarea solubilității polimerului și formarea controlată a nanoparticulelor, fiind o metodă valoroasă pentru dezvoltarea sistemelor inteligente de eliberare controlată.

Metodele bazate pe emulsificare reprezintă cele mai utilizate tehnici la scară de laborator și industrială [139]. Emulsia simplă ulei-în-apă (O/W) este folosită în special pentru încapsularea compușilor hidrofobi. Polimerul și medicamentul sunt dizolvate într-un solvent organic, apoi dispersate într-o fază apoasă cu stabilizatori, iar eliminarea solventului conduce la formarea particulelor [135, 139]. Această metodă oferă eficiențe ridicate de încapsulare pentru medicamente lipofile și este frecvent utilizată pentru microsfere injectabile și sisteme depot [145, 146].

Pentru biomolecule hidrofile, precum proteinele, peptidele, vaccinurile sau acizii nucleici, este preferată emulsia dublă apă-în-ulei-în-apă (W/O/W) [139]. Această tehnică permite protejarea biomoleculelor în compartimente apoase încorporate în matricea polimerică și este

utilizată pe scară largă în formulări pe bază de PLGA și poli(ester-amide) [145, 147, 148]. Deși oferă avantaje importante pentru încapsularea moleculelor sensibile, metoda este mai complexă și poate conduce la pierderi de substanță activă în timpul procesării.

Emulsificarea prin difuzia solventului combină principiile emulsificării și nanoprecipitării, generând particule uniforme, cu porozitate redusă și eficiență ridicată de încapsulare [139]. Această metodă este apreciată pentru reproductibilitatea și controlul bun asupra proprietăților particulelor.

Metodele de evaporare și extracție a solventului sunt extensii ale proceselor de emulsificare și se bazează pe eliminarea solventului organic pentru solidificarea particulelor [139]. Evaporarea solventului este una dintre cele mai utilizate tehnici pentru formulările farmaceutice clasice, în timp ce extracția solventului produce particule mai dense și este preferată pentru sisteme cu eliberare prelungită.

Coacervarea (separarea de fază) reprezintă o metodă eficientă pentru obținerea microcapsulelor cu perete bine definit [149]. Prin reducerea controlată a solubilității polimerului se formează picături bogate în polimer care înconjoară substanța activă și ulterior se solidifică. Metoda este utilizată în special pentru sisteme cu eliberare susținută pe termen lung.

Uscarea prin pulverizare este una dintre cele mai importante metode industriale pentru producerea particulelor polimerice [151]. Soluția sau emulsia polimerică este atomizată într-un flux de gaz cald, iar evaporarea rapidă a solventului conduce la formarea particulelor solide. Metoda este rapidă, scalabilă și utilizată frecvent pentru formulări inhalatorii și orale pe bază de PLA, PLGA și PCL.

Electrospraierea utilizează un câmp electric pentru generarea unor picături foarte fine din soluția polimerică, care se transformă ulterior în particule uniforme prin evaporarea solventului [151]. Această tehnică oferă un control excelent asupra dimensiunii particulelor și evită utilizarea surfactanților, fiind potrivită pentru formulări avansate pe bază de poliesteri și poli(ester-amide).

Metodele cu fluide supercritice, bazate în principal pe utilizarea CO_2 supercritic, permit obținerea unor particule foarte pure, fără reziduuri toxice de solvent [152]. Aceste tehnici sunt promițătoare pentru aplicații farmaceutice de înaltă performanță, însă costurile ridicate și complexitatea echipamentelor limitează utilizarea lor pe scară largă.

Autoasamblarea supramoleculară este specifică în special copolimerilor amfifilici, precum PEG-b-PLA, PEG-b-PCL și anumite poli(ester-amide), care formează spontan micele și

alte nanostructuri în mediu apos [153]. Metoda este deosebit de valoroasă pentru nanomedicină, deoarece permite încapsularea delicată a moleculelor sensibile fără utilizarea unor condiții agresive de procesare.

Microfluidica reprezintă una dintre cele mai moderne și promițătoare tehnologii de preparare a particulelor [154]. Utilizarea microcanalelor permite controlul precis al dimensiunii, formei și monodispersității particulelor, oferind o reproductibilitate excelentă. Această tehnologie a fost utilizată cu succes pentru dezvoltarea nanoparticulelor pe bază de PLGA și PEG-PLGA destinate livrării tumorale și vaccinurilor ARNm [155, 156], precum și pentru formulări avansate pe bază de poli(ester-amide) [157, 158].

Diversitatea metodelor de preparare reflectă complexitatea cerințelor terapeutice moderne. Metodele clasice, precum nanoprecipitarea și emulsificarea, rămân cele mai utilizate datorită simplității și costurilor reduse, în timp ce tehnologiile avansate – microfluidica, electrospraierea și fluidele supercritice – oferă un control superior asupra arhitecturii particulelor și sunt considerate esențiale pentru dezvoltarea viitoarelor sisteme inteligente de administrare a medicamentelor [139, 141, 151–158].

Metoda de preparare influențează direct profilul de eliberare al principiului activ. Particulele dense obținute prin nanoprecipitare favorizează eliberarea lentă controlată prin difuzie, în timp ce microsferele poroase rezultate prin emulsificare simplă pot genera un fenomen de tip „burst release”, urmat de eliberare susținută. În cazul emulsiilor duble, distribuția heterogenă a biomoleculelor poate conduce la profile multiphasice de eliberare, utile în vaccinare și terapii secvențiale. De asemenea, viteza de evaporare a solventului influențează porozitatea și structura internă a particulelor: evaporarea rapidă favorizează formarea cavităților și eliberarea accelerată, în timp ce evaporarea lentă conduce la particule mai compacte și la profile de eliberare prelungite [139].

CAPITOLUL 4

SISTEMELE DE ELIBERARE CONTROLATĂ A PRINCIPIILOR ACTIVE SUB FORMĂ DE PARTICULE PE BAZĂ DE POLIESTERI: DE LA HOMOPOLIMERII ESTERICI LA COPOLIMERII DE TIP ESTER

Sistemele moderne de eliberare controlată a medicamentelor urmăresc menținerea unei concentrații terapeutice optime și reducerea efectelor adverse, iar poliesterii biodegradabili au

devenit materiale de interes major datorită biocompatibilității, degradabilității controlabile și versatilității structurale [159]. Capacitatea acestora de a forma micro- și nanoparticule permite încorporarea unei game largi de substanțe active, de la molecule hidrofobe până la proteine și acizi nucleici, în timp ce degradarea lor produce metaboliți fiziologic tolerabili [160].

Homopolimerii esterici biodegradabili, precum PLA, PGA și PCL, au reprezentat prima generație de materiale utilizate pentru administrarea controlată a medicamentelor. PLA este apreciat pentru biocompatibilitatea ridicată și degradarea în acid lactic, iar proprietățile sale depind de stereochimie și gradul de cristalinitate [129, 130]. Nanoparticulele de PLA au fost utilizate pentru transportul unor agenți antitumorali precum paclitaxelul, doxorubicina și docetaxelul, oferind stabilitate și biodisponibilitate îmbunătățite [139]. PGA prezintă proprietăți mecanice superioare și degradare rapidă, fiind utilizat în special pentru încapsularea peptidelor și proteinelor, deși poate genera un efect pronunțat de tip „burst release” [161]. PCL se caracterizează prin degradare foarte lentă, flexibilitate ridicată și capacitatea de a susține eliberarea pe termen lung a medicamentelor, fiind utilizat în sisteme implantabile și terapii cronice [128, 129].

Limitările homopolimerilor, legate de controlul insuficient al degradării, hidrofilicității și proprietăților mecanice, au condus la dezvoltarea copolimerilor poliesterici. Cel mai important exemplu este PLGA, a cărui rată de degradare poate fi ajustată prin modificarea raportului lactidă/glicolidă [131]. Acest copolimer este utilizat pe scară largă în formulări clinice pentru eliberarea hormonilor, peptidelor și altor medicamente și poate fi funcționalizat cu PEG, anticorpi sau liganzi pentru vectorizare activă [162, 163]. Copolimerii PEG-b-PLA și PEG-b-PCL formează spontan micele polimerice capabile să transporte eficient medicamente hidrofobe și să reducă toxicitatea sistemică [164].

O clasă avansată de biomateriale este reprezentată de poli(ester-amidele) (PEA), care combină biodegradabilitatea poliesterilor cu funcționalitatea aminoacizilor [136–138]. Introducerea aminoacizilor precum fenilalanina, arginina sau lizina permite ajustarea hidrofobicității, sarcinii electrice și răspunsului la stimuli biologici. Astfel, PEA pe bază de fenilalanină au demonstrat eficiență în transportul docetaxelului pentru tratamentul cancerului pulmonar [165], cele pe bază de arginină au fost utilizate pentru administrarea orală a insulinei și vectorizare genică [166], iar cele pe bază de lizină permit funcționalizări suplimentare și dezvoltarea unor sisteme sensibile la pH, glutationă sau lumină [167].

În ceea ce privește tratamentul infecțiilor fungice orale, Nistatina rămâne unul dintre cele mai importante antifungice utilizate clinic. Descoperită în 1950 și obținută prin fermentația actinomicetei *Streptomyces noursei*, aceasta este primul antifungic polienic introdus pe scară largă în practică [168, 169]. Structura sa macrolidică amfifilă îi conferă afinitate selectivă pentru ergosterolul din membrana fungică, determinând formarea de pori transmembranari și moartea celulară fungică [168, 170–173]. Nistatina este eficientă împotriva unui spectru larg de fungi, inclusiv *Candida albicans* și speciile de tip *Candida non-albicans*, fiind utilizată cu succes în tratamentul candidozelor orale și al stomatitei protetice [171, 172].

Un avantaj major al Nistatinei îl constituie incidența foarte redusă a rezistenței fungice, datorită mecanismului său de acțiune orientat direct asupra ergosterolului membranar [168, 171, 175]. În plus, aceasta poate perturba biofilmele mixte formate de *Candida albicans* și *Streptococcus mutans*, contribuind la destabilizarea structurii biofilmului și la creșterea eficienței terapeutice [176, 177].

Cu toate acestea, formele convenționale de administrare ale Nistatinei prezintă limitări importante. Clearance-ul salivar rapid reduce timpul de contact cu mucoasa orală, iar concentrația locală scade sub concentrația minimă inhibitorie în mai puțin de 15–20 de minute după administrare [178]. Necesitatea aplicărilor frecvente afectează complianța pacientului, iar gustul amar și instabilitatea chimică în medii acide contribuie suplimentar la reducerea eficienței terapeutice [168, 178, 179]. De asemenea, suspensiile convenționale pătrund insuficient în biofilmele mature și în porozitățile protezelor dentare, favorizând recidivele infecțioase [178].

Pentru depășirea acestor limitări, au fost dezvoltate sisteme moderne de eliberare controlată pe bază de poliesteri biodegradabili [180–188]. Cele mai utilizate materiale sunt PCL, PLA, PLGA și diferiți copolimeri care conțin secvențe PEG, datorită capacității lor de a încapsula eficient Nistatina și de a-i proteja stabilitatea [189–193]. Nanoparticulele și microsferele pe bază de PCL oferă eliberare susținută și protecție împotriva oxidării și fotoizomerizării [189, 193], în timp ce sistemele pe bază de PLA și PLGA permit ajustarea fină a profilului de eliberare prin controlul degradării matricei polimerice [190–192].

Au fost investigate și sisteme micelare bazate pe copolimeri amfifilici, precum Poloxamer 407, care îmbunătățesc dispersabilitatea și activitatea antifungică a Nistatinei [196, 197]. De asemenea, fibrele electrofilate pe bază de PCL, PCL/PEG sau PCL/gelatină sunt intens

studiate pentru aplicații locale, datorită suprafeței specifice ridicate și capacității de eliberare prelungită [198, 199].

Încapsularea Nistatinei în matrici poliesterice oferă multiple avantaje: protecție împotriva degradării chimice, mascarea gustului amar, eliberare controlată și prelungită, precum și creșterea eficienței împotriva biofilmelor fungice [168, 171]. Menținerea unei concentrații locale constante permite penetrarea progresivă a biofilmului și reducerea recidivelor clinice. În plus, analiza literaturii indică faptul că nu au fost raportate până în prezent sisteme pe bază de poli(ester-amide) sau copolimeri aminoacidici biodegradabili pentru transportul Nistatinei, ceea ce evidențiază un potențial important de cercetare în această direcție.

În concluzie, evoluția de la homopolimerii esterici către copolimeri multifuncționali și poli(ester-amide) avansate reflectă dezvoltarea unor platforme tot mai sofisticate pentru administrarea controlată a medicamentelor. Aplicarea acestor materiale la formularea Nistatinei poate transforma un antifungic clasic într-un sistem terapeutic modern, capabil să ofere eficiență crescută, stabilitate superioară și o adaptare mai bună la cerințele medicinei personalizate și ale stomatologiei moderne [159–199].

CAPITOLUL 5

MATERIALE, TEHNICI DE LUCRU ȘI METODE DE CARACTERIZARE

Acest capitol prezintă materialele, metodele de sinteză, tehnicile experimentale și metodele de caracterizare utilizate pentru obținerea și evaluarea copolimerilor biodegradabili și a sistemelor coloidale nanoparticulate, atât în absența, cât și în prezența Nistatinei (NYS). Alegerea materialelor și a procedurilor experimentale a urmărit obținerea unor rezultate reproductibile și relevante din punct de vedere științific.

Materiale utilizate

Pentru sinteza copolimerilor au fost folosiți diverși monomeri, catalizatori și solvenți, printre care acid adipic, acid succinic, acid dodecanedioic, etilen glicol, ε-caprolactonă, L-lactidă, butoxid de titan, octoat de staniu, acid para-toluensulfonic, toluen și cloroform. Au fost utilizate și materiale polimerice de referință, precum poli(ε-caprolactona) (PCL), precum și poli(alcool vinilic) (PVA) pentru stabilizarea nanoparticulelor. Nistatina a reprezentat principiul activ utilizat pentru conferirea proprietăților antifungice.

Pentru testele biologice au fost utilizate fibroblaste dermice umane adulte (HDFa), cultivate în condiții standard de laborator, împreună cu reactivii necesari menținerii viabilității și

proliferării celulare. Activitatea antifungică a fost evaluată pe tulpini de referință din genul *Candida*.

Sinteza copolimerilor

Au fost sintetizate două tipuri principale de copolimeri:

- **PCL-b-PEA-b-PCL**, obținuți prin policondensare în masă și reacții de transesterificare. Mai întâi s-au sintetizat precursorii poliester-amidici dihidroxilați (PEA-diOH), urmați de polimerizarea ε-caprolactonei pe aceste segmente.
- **PLLA-b-PCL**, sintetizați prin polimerizare cu deschidere de ciclu (ROP), în două etape succesive: formarea blocului PLLA urmată de creșterea blocului PCL.

Prepararea nanoparticulelor

Nanoparticulele au fost obținute prin metoda emulsificare–evaporare a solventului. Copolimerul dizolvat în cloroform a fost dispersat într-o soluție apoasă de PVA, urmată de omogenizare, evaporarea solventului, centrifugare, spălare și liofilizare. Nanoparticulele încărcate cu Nistatină au fost preparate prin aceeași metodă, medicamentul fiind dizolvat în faza organică.

Tehnici de caracterizare

Caracterizarea copolimerilor și a nanoparticulelor a fost realizată prin:

- **RMN (^{1}H și ^{13}C)** pentru confirmarea structurii chimice și determinarea maselor molare;
- **SEC** pentru determinarea distribuției maselor molare și a dispersității;
- **MALDI-TOF MS** pentru analiza compoziției moleculare;
- **DSC și TGA** pentru evaluarea proprietăților termice și stabilității termice;
- **ATR-FTIR** pentru identificarea grupărilor funcționale și monitorizarea degradării;
- **DLS** pentru determinarea dimensiunii nanoparticulelor și a indicelui de polidispersitate;
- **TEM** pentru observarea morfologiei și dimensiunii particulelor.

Studii de biodegradabilitate și eliberare a medicamentului

Biodegradabilitatea copolimerilor a fost evaluată prin degradare enzimatică folosind extracte proteice provenite de la *Pseudomonas aeruginosa,* iar gradul de degradare a fost determinat prin pierderea de masă. Eficiența de încapsulare și încărcare cu Nistatină a fost determinată spectrofotometric, iar profilul de eliberare in vitro a medicamentului a fost studiat în condiții fiziologice controlate.

Evaluări biologice

Biocompatibilitatea nanoparticulelor a fost investigată prin:

- testul de hemoliză pe eritrocite umane;
- testul MTT pe fibroblaste dermice umane pentru evaluarea citotoxicității și viabilității celulare.

Activitatea antifungică a nanoparticulelor goale și încărcate cu Nistatină a fost analizată prin metoda difuzimetrică, folosind mai multe tulpini de *Candida*, prin măsurarea diametrelor zonelor de inhibiție.

În ansamblu, capitolul descrie metodologia completă utilizată pentru sinteza, prepararea, caracterizarea și evaluarea biologică a copolimerilor biodegradabili și a nanoparticulelor dezvoltate ca sisteme de eliberare controlată a Nistatinei.

CAPITOLUL 6

CARACTERISTICILE COLOIDALE ALE NANOPARTICULELOR PE BAZĂ DE COPOLIMERI BLOC ESTERICI DE TIPUL POLI(ACID L-LACTIC)-B-POLI(Ɛ-CAPROLACTONĂ) OBȚINUTE PRINTR-O METODĂ DE EMULSIFICARE/EVAPORARE

6.1. Introducere

Nanomaterialele și nanotehnologiile aplicate în medicină reprezintă un domeniu aflat într-o dezvoltare continuă, determinată de necesitatea identificării unor sisteme terapeutice mai eficiente și mai sigure. Administrarea țintită a principiilor active către organe, țesuturi sau celule afectate constituie o provocare majoră, în special în tratamentul cancerului. În acest context, nanotehnologiile destinate terapiei și diagnosticului oferă perspective promițătoare datorită capacității lor de a vectoriza și controla eliberarea medicamentelor [202–205].

Dezvoltarea sistemelor de administrare a medicamentelor (DDS) este condiționată de proprietăți precum biocompatibilitatea, biodegradabilitatea și toxicitatea redusă. Dintre materialele utilizate în acest scop, poliesterii biodegradabili ocupă un loc important datorită capacității lor de a se degrada prin procese hidrolitice sau enzimatice în compuși netoxici, care pot fi eliminați de organism. Poli(L-lactida) (PLLA) și poli(ε-caprolactona) (PCL) sunt doi dintre cei mai studiați poliesteri pentru aplicații biomedicale [206–208]. PLLA este biodegradabilă și bioresorbabilă, degradându-se în produși care sunt metabolizați prin ciclul Krebs sub formă de apă și dioxid de carbon [209], în timp ce PCL se caracterizează printr-o rată de degradare mai

lentă, flexibilitate ridicată și biocompatibilitate excelentă, fiind aprobată de FDA pentru diverse aplicații medicale [210, 211].

Sinteza acestor poliesteri se realizează frecvent prin polimerizare cu deschidere de ciclu (ROP), proces care permite controlul structurii și masei molare a polimerilor. Dintre mecanismele de polimerizare existente, inserția prin coordonare este una dintre cele mai utilizate pentru sinteza lactidei și ε-caprolactonei [212–215]. Totuși, PLLA prezintă o fragilitate ridicată datorită temperaturii sale de tranziție vitroasă mari, în timp ce PCL are un comportament elastic datorită temperaturii de tranziție vitroasă situate sub temperatura camerei [216]. Pentru a combina avantajele ambilor polimeri, au fost dezvoltați copolimeri și amestecuri PLLA-PCL, copolimerizarea fiind preferată datorită compatibilității mai bune și posibilității de ajustare a proprietăților fizice, mecanice și de degradare [217–219].

Poliesterii biodegradabili prezintă numeroase avantaje, printre care degradarea controlată în mediu biologic, posibilitatea reglării vitezei de degradare prin modificarea compoziției și a masei molare, metode simple de sinteză și formarea unor produși de degradare netoxici [220, 221]. Aceste caracteristici îi recomandă pentru utilizarea în sisteme moderne de eliberare controlată a medicamentelor, menite să depășească limitările asociate compușilor bioactivi, precum solubilitatea redusă, instabilitatea biologică sau biodistribuția ineficientă.

Dintre numeroasele sisteme de transport existente, nanoparticulele polimerice (NPs) se remarcă prin stabilitate, biocompatibilitate și biodegradabilitate, fiind considerate purtători eficienți pentru administrarea medicamentelor [222]. Nanoparticulele obținute din copolimeri pe bază de poliesteri permit controlul eliberării principiului activ prin modificarea caracteristicilor matricei polimerice și prezintă avantajul unui timp îndelungat de circulație în organism [223]. Proprietățile lor depind atât de structura moleculară a copolimerilor utilizați, cât și de metoda de preparare. Printre tehnicile frecvent utilizate pentru obținerea nanoparticulelor cu dimensiuni cuprinse între 50 și 200 nm se numără nanoprecipitarea, emulsificarea/evaporarea solventului și difuzia emulsie/solvent [224].

În cadrul acestui studiu, nanoparticulele au fost preparate prin metoda emulsificării/evaporării solventului, care presupune dizolvarea copolimerului și a moleculei hidrofobe într-un solvent volatil nemiscibil cu apa, urmată de formarea unei emulsii stabile în prezența unui surfactant și eliminarea solventului prin evaporare. Caracteristicile

nanoparticulelor rezultate sunt influențate de natura solventului, concentrația copolimerului, raportul fazelor, condițiile de emulsionare și tipul surfactantului utilizat [224–226].

Obiectivul principal al studiului a fost obținerea și caracterizarea nanoparticulelor pe bază de copolimeri bloc PLLA-b-PCL cu lungimi diferite ale blocului PCL, pentru a evalua influența caracteristicilor moleculare ale copolimerilor asupra proprietăților coloidale ale nanoparticulelor goale și încărcate cu medicament. Copolimerii au fost sintetizați pornind de la același bloc PLLA obținut prin mecanism de inserție prin coordonare în prezența octoatului de staniu, în timp ce blocurile PCL au fost sintetizate prin mecanism monomer activat cationic pentru a limita reacțiile de transesterificare. Caracterizarea copolimerilor a fost realizată prin tehnici precum rezonanța magnetică nucleară (RMN), cromatografia de excludere sterică (SEC) și calorimetria diferențială cu scanare (DSC), iar nanoparticulele obținute au fost investigate prin difuzia dinamică a luminii (DLS), la temperaturi de 25°C și 37°C, pentru evaluarea dimensiunii și stabilității lor coloidale.

6.2. Rezultate

6.2.1. Sinteza copolimerilor bloc PLLA-b-PCL

Sinteza copolimerilor dibloc PLLA-b-PCL a fost realizată în două etape: prin polimerizare cu deschidere de ciclu, şi prin adăugarea succesivă a L-lactidei și a ε-caprolactonei.

O serie de copolimeri dibloc diferiți, având același bloc PLLA inițial și secvențe PCL cu lungimi crescătoare, au fost obținuți, iar caracteristicile moleculare sunt prezentate în **Tabelul 6.1.**

Tabelul 6.1. Caracteristicile moleculare ale copolimerilor dibloc sintetizați

Probă	M_n PLLA[b] (g.mol^{-1})	Theor. DP_n PCL	Exp. P_n CL[a]	M_n PCL[a] (g.mol^{-1})	M_n cop.[a] (g.mol^{-1})	M_n cop.[b] (g.mol^{-1})	Đ[b]	T_m (°C) H_m (J.g^{-1})[c]	T_C [c](°C)	χ_c[c] (%)
DB$_1$	2500	18	16	1800	4300	5700	1.45	8.2 17.7	16.0	30.8
DB$_2$		53	77	8800	11300	9100	1.56	2.8 1.8	30.3	8.5
DB$_3$		88	5	9800	12300	10200	1.46	2.0 57.2	28.0	51.5
DB$_4$		123	143	16300	18800	12700	1.41	3.4 63.5	0.3	52.5

DB_5		175	162	18500	21000	13200	1.41	9.7 62.8	9.3	51.0

[a] Calculat din analiza RMN ^1H; [b] Valori obținute prin SEC în THF în raport cu standarde de polistiren; [c] Obținut prin DSC (al doilea rampaj de încălzire).

Figura 6.2 prezintă spectrul ^1H RMN și atribuirea lor pentru un copolimer dibloc PLLA-b-PCL în cloroform deuterat.

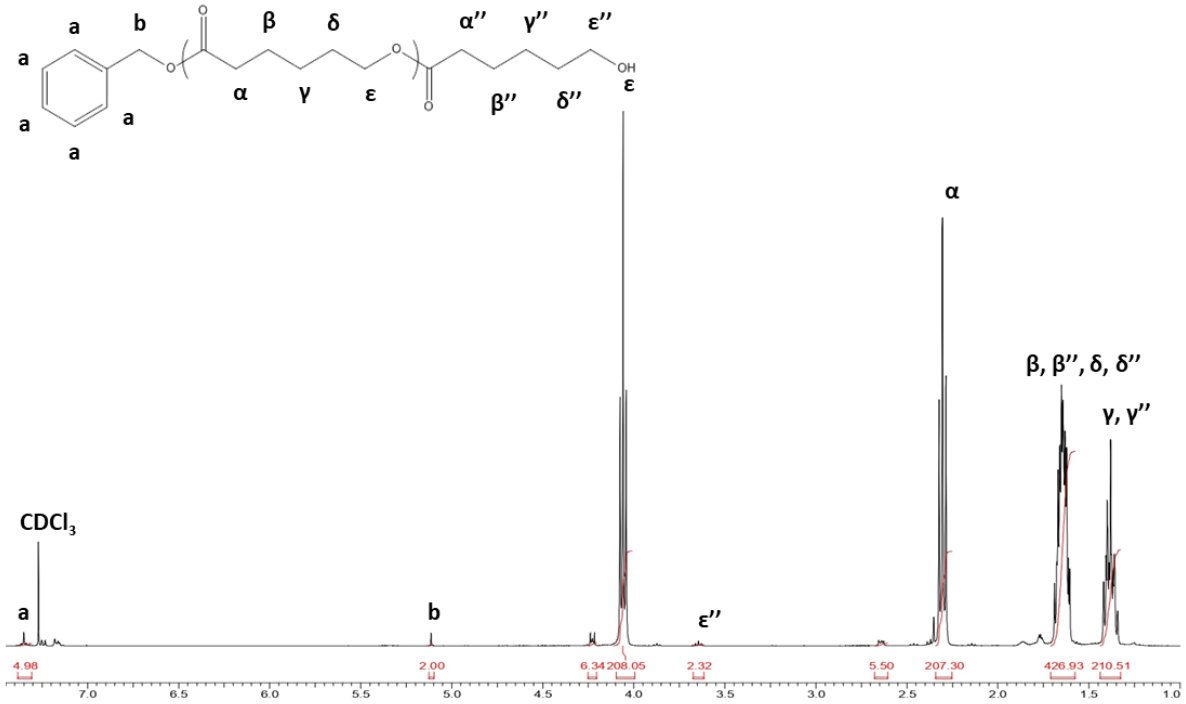
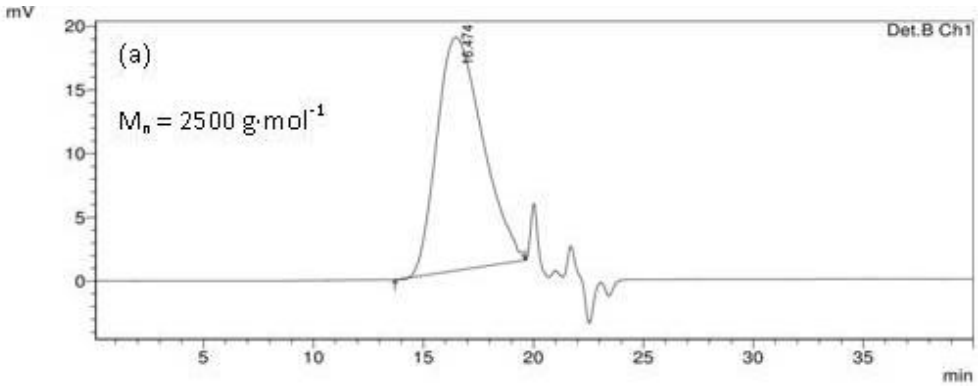


Figura 6.2. Spectrul RMN ^1H al copolimerului PLLA-b-PCL (DB4) în $CDCl_3$

Ca exemplu, cromatogramele SEC ale PLLA și ale unui copolimer dibloc PLLA-b-PCL (proba DB2) sunt prezentate în **Figura 6.3a** și respectiv**, Figura 6.3b**.



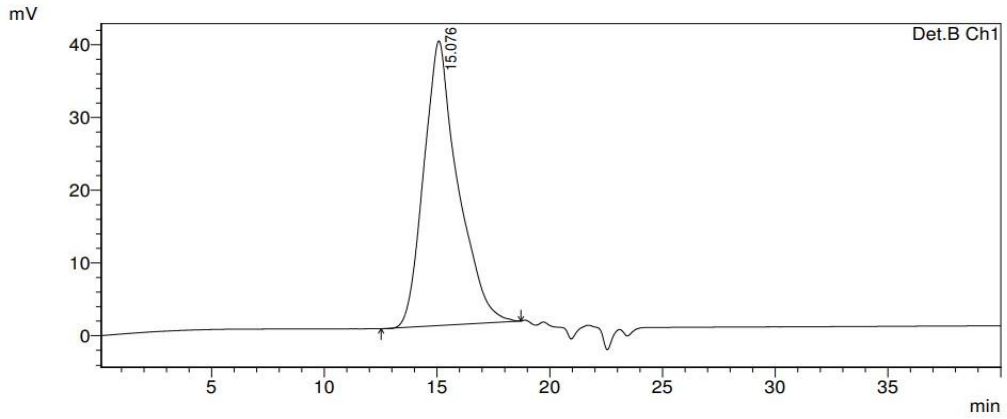


Figura 6.3. Cromatogramele SEC ale precursorului PLLA (a) și ale copolimerului PLLA-b-PCL (DB2) (b)

Masa molară a copolimerului este 9100 g·mol^{-1} (conform unei curbe de calibrare utilizând etaloane de polistiren), în timp ce masa molară a PLLA este 2500 g·mol^{-1}. Masa molară a copolimerului este mai mare decât cea a PLLA, ceea ce înseamnă că a avut loc o re-iniţiere a PCL din PLLA. Mai mult, picul monomodal unic confirmă prezența unei singure populații și, prin urmare, absența homopolimerului de PLLA rezidual. Acest rezultat arată că a fost obținut un copolimer dibloc și exclude posibilitatea de a avea un amestec de doi homopolimeri.

Nu au fost observate diferențe semnificative pentru comportamentul termic al probelor obținute. Pentru a ilustra acest lucru, **Figura 6.4** arată un ciclu dublu de răcire/încălzire de la 250 °C la −80 °C și de la −80 °C la 250 °C (a doua rampă de temperatură).

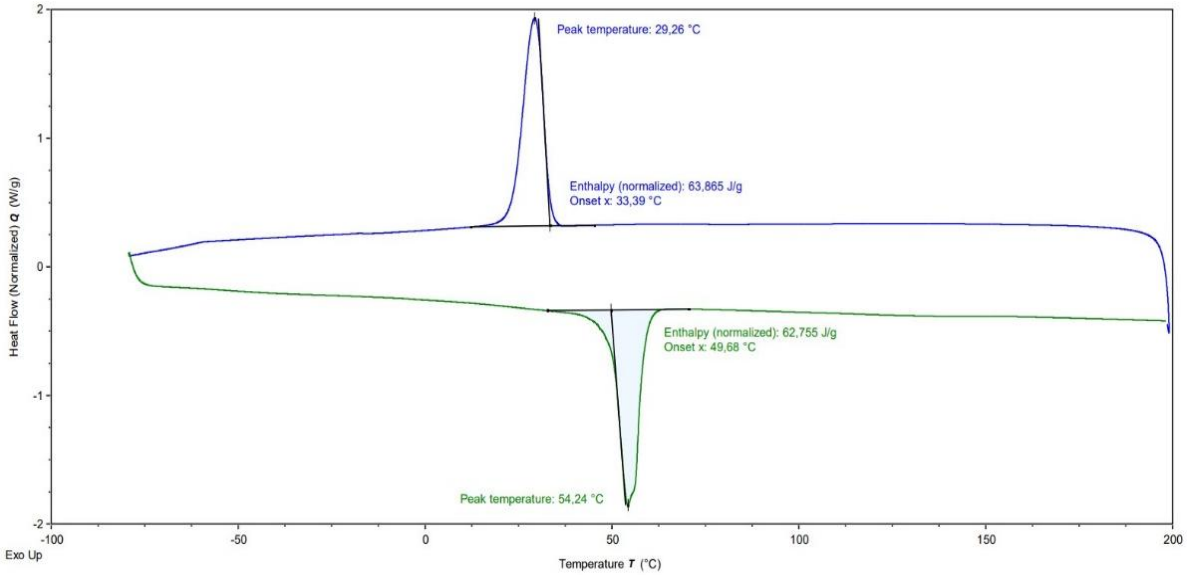


Figura 6.4. Termograma DSC a probei DB5 (rampă de răcire și a doua rampă de încălzire)

Temperaturile de tranziție vitroasă (T_g) ale PLLA și PCL sunt în jur de 60 °C și respectiv, −60°C, conform datelor din literatură [229, 230]. Totuși, analizele DSC nu arată un T_g clar observabil pentru blocul PLLA din cauza suprapunerii cu picul de topire al PCL, care este și el în jur de 60°C. T_g a blocului PCL nu poate fi observată pe diferitele termograme. Analiza DSC a copolimerilor dibloc PLLA-b-PCL cu compoziții variate confirmă structura bloc a acestora, deoarece temperatura de topire (T_f) a segmentelor principale de PCL este observată în jur de 50–55°C. Pe de altă parte, era de aşteptat apariţia picului de topire în jur de 160–165°C, corespunzător segmentului central al PLLA, compoziția sa fiind mult mai mică decât a PCL. Mai mult, valorile raportului de cristalinitate al PCL cresc odată cu lungimea PCL și se stabilizează în jur de 50% pentru o masă molară de aproximativ 10000 g/mol, în acord cu datele din literatură [231].

6.2.2. De la copolimeri dibloc la nanoparticule

Pentru început, a fost interesant să investigăm variaţia dimensiunilor NPs în fiecare etapă a metodei de pregătire. În acest context, **Tabelul 6.3** prezintă dimensiunile NPs obținute din copolimerul DB3 în funcție de temperatură.

Tabelul 6.3. Valorile Z-average și PDI ale NPs obținute din copolimerul DB3 după evaporarea solventului, înainte de înghețare și după înghețare, în prezența sau absența trehalozei

Temperatură (°C)	Parametri	După evaporarea solventului	După adăugarea trehalozei	După liofilizare în absența trehalozei	După liofilizare în prezența trehalozei
25	Z-average (nm)	128.5±0.1	139.2±0.3	173.3±0.8	151.4±0.4
	PDI	0.066±0.01	0.071±0.3	0.134±0.02	0.069±0.01
37	Z-average (nm)	127.8±0.2	138.9±0.2	172.4±0.4	150.3±0.2
	PDI	0.064±0.01	0.078±0.2	0.127±0.01	0.099±0.01

Datele prezentate în **Tabelul 6.3** arată o ușoară aglomerare a NPs după liofilizarea în absența trehalozei (valori mai mari ale Z-average și PDI). Totuși, nu se observă nicio aglomerare după liofilizarea în prezența trehalozei, ceea ce indică rolul benefic al trehalozei, chiar dacă dimensiunile NPs cresc ușor în prezența crioprotectorului.

Morfologia NPs a fost investigată prin TEM, iar rezultatele au arătat că acestea au o formă sferică, fără a se observa aglomerări (**Figura 6.6**).

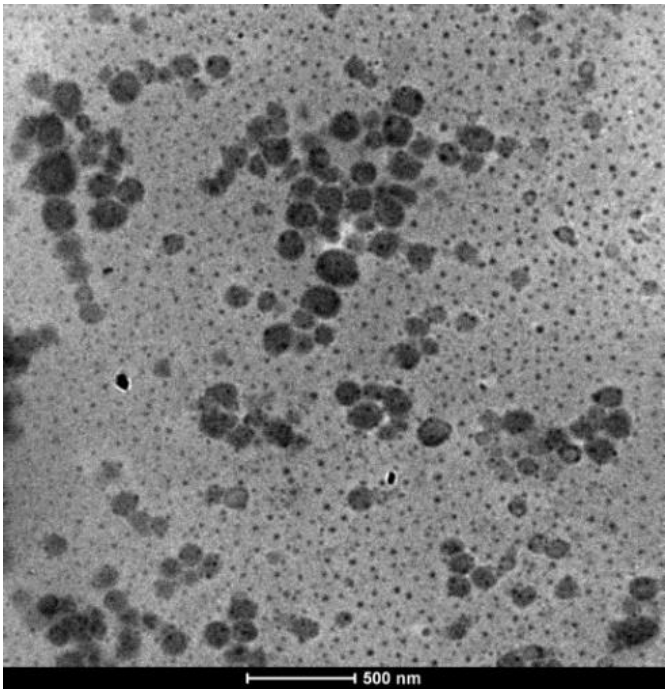


Figura 6.6. Micrografie TEM a NPs obţinute din copolimerul DB1

Caracteristicile coloidale, obținute prin DLS, ale NPs preparate din toți copolimerii sintetizaţi sunt prezentate în **Tabelul 6.4**.

Tabelul 6.4. Valorile Z-average, Dv și PDI, la 25 și 37°C, ale NPs la o concentrație masică de 0.1% în apă

T (°C)	Parametri	NPs-DB_1	NPs-DB_2	NPs-DB_3	NPs-DB_4	NPs-DB_5
25	Z-average (nm)	144.3±0.2	148.9±0.3	151.4±0.4	151.7±0.4	153.1±0.3
	Dv (nm)	143.8±0.3	148.2±0.2	150.9±0.3	151.2±0.4	153.0±0.2
	PDI	0.114±0.02	0.078±0.01	0.069±0.01	0.078±0.01	0.088±0.01
37	Z-average (nm)	143.5±0.4	148.0±0.1	150.3±0.2	150.9±0.5	152.8±0.4
	Dv (nm)	143.2±0.3	147.5±0.2	149.5±0.3	150.2±0.3	152.5±0.3
	PDI	0.097±0.01	0.072±0.01	0.099±0.01	0.070±0.01	0.072±0.01

Având în vedere caracteristicile coloidale ale nanoparticulelor obținute, se poate afirma că aceste particule pot fi utilizate ca nanotransportori pentru prepararea sistemelor de eliberare a medicamentelor cu aplicații biomedicale.

6.3. Concluzii

În acest studiu au fost sintetizați copolimeri bloc PLLA-b-PCL bine definiți, utilizând două metode distincte de polimerizare: polimerizarea prin coordonare-inserție pentru L-lactidă și polimerizarea cationică a monomerului activat pentru ε-caprolactonă, strategie adoptată pentru limitarea reacțiilor de transesterificare. Copolimerii obținuți au avut un bloc PLLA cu masă

molară constantă (Mn ≈ 2500 g·mol⁻¹) și blocuri PCL cu mase molare variabile, cuprinse între 1800 și 18.500 g·mol⁻¹, pentru a permite modificarea ratei de biodegradare.

Caracterizarea moleculară a evidențiat obținerea unor copolimeri cu puritate ridicată și dispersitate redusă. Pentru evaluarea influenței masei molare asupra proprietăților coloidale, au fost preparate nanoparticule prin metoda emulsificare/evaporare. Nanoparticulele rezultate au prezentat morfologie sferică, dimensiuni de aproximativ 150 nm și valori foarte mici ale indicelui de polidispersitate (PDI < 0,1), indicând o distribuție dimensională uniformă.

Rezultatele au arătat că creșterea masei molare a copolimerilor determină o ușoară creștere a dimensiunii medii a nanoparticulelor, de la aproximativ 140 la 150 nm, fără a influența semnificativ valorile PDI. De asemenea, creșterea temperaturii de la 25°C la 37°C a avut un efect minim asupra dimensiunii particulelor, demonstrând o bună stabilitate coloidală.

În concluzie, nanoparticulele obținute prezintă caracteristici adecvate pentru aplicații biomedicale, datorită dimensiunilor reduse, distribuției uniforme și stabilității lor. Pe baza acestor rezultate preliminare, studiile viitoare vor viza prepararea și caracterizarea nanoparticulelor încărcate cu medicamente.

CAPITOLUL 7
EVALUAREA BIODEGRADABILITĂȚII COPOLIMERILOR POLIESTERICI PE BAZĂ DE POLI(ETILEN ADIPAT) ȘI POLI(Ɛ-CAPROLACTONĂ)

7.1 Introducere

În ultimele decenii, polimerii biodegradabili au atras un interes deosebit datorită potențialului lor de a înlocui materialele plastice convenționale și de a fi utilizați în aplicații biomedicale și farmaceutice [233–236]. Proprietăți precum biocompatibilitatea, toxicitatea redusă, flexibilitatea și posibilitatea funcționalizării chimice îi recomandă pentru dezvoltarea de nanopurtători pentru eliberarea moleculelor bioactive, inginerie tisulară, realizarea scaffold-urilor și alte aplicații medicale [237, 238].

Un domeniu important de cercetare îl reprezintă sistemele de eliberare controlată a medicamentelor (DDS), definite ca formulări sau dispozitive capabile să îmbunătățească eficiența terapeutică prin controlul ratei, duratei și localizării eliberării substanței active [239–243]. În acest context, nanoparticulele polimerice încărcate cu medicamente oferă avantaje

semnificative, precum eficiență ridicată de încapsulare, biodisponibilitate îmbunătățită, stabilitate chimică și biologică, controlul eliberării medicamentului și posibilitatea administrării prin multiple căi [244, 245].

Pentru utilizarea în DDS, polimerii trebuie să fie biodegradabili, biocompatibili, să prezinte proprietăți mecanice adecvate și să permită procesare facilă [246]. Dintre aceștia, poliesterii alifatici, precum PLA, PGA, PLGA și PCL, sunt utilizați pe scară largă datorită biodegradabilității, biocompatibilității și proprietăților mecanice favorabile [247–250]. De asemenea, proprietățile lor fizice, inclusiv masa molară, gradul de cristalinitate și punctul de topire, influențează direct comportamentul de eliberare a medicamentelor [247–250].

Poli(ε-caprolactona) (PCL), obținută prin polimerizarea cu deschidere de inel a ε-caprolactonei, este un poliester semicristalin biodegradabil, aprobat de FDA, caracterizat printr-o temperatură de topire scăzută (Tm ≈ 60°C) și o temperatură de tranziție vitroasă redusă (Tg ≈ −60°C) [251–254]. Totuși, cristalinitatea sa ridicată conduce la o degradare lentă, motiv pentru care sunt necesare strategii de copolimerizare sau amestecare cu polimeri mai rapid biodegradabili [259]. Degradarea polimerilor biodegradabili are loc prin hidroliză sau prin acțiunea enzimelor, fiind însoțită de reducerea masei molare și modificarea proprietăților fizico-chimice, până la formarea unor produși cu masă moleculară mică, ușor eliminați din organism [252].

Un material care a atras atenția în ultimii ani este poli(etilen adipatul) (PEA), un poliester alifatic biodegradabil cu cristalinitate redusă și o rată de degradare mai mare decât cea a PCL și a altor poliesteri utilizați frecvent în DDS [259, 260]. Din acest motiv, copolimerii bazați pe PCL și PEA prezintă un interes deosebit, deoarece proprietățile lor pot fi ajustate prin modificarea compoziției, masei molare, structurii moleculare și gradului de cristalinitate, pentru a răspunde cerințelor unor aplicații specifice.

Pornind de la aceste considerente, obiectivul prezentului studiu a fost sinteza, pentru prima dată, a unei serii omoloage de copolimeri bloc poli(ε-caprolactonă)-b-poli(etilen adipat)-b-poli(ε-caprolactonă) (PCL-b-PEA-b-PCL), având masa molară a blocului PEA constantă și lungimi variabile ale secvențelor PCL. Copolimerii au fost obținuți prin policondensarea la topire a ε-caprolactonei pornind de la un precursor dihidroxi-PEA. După caracterizarea fizico-chimică detaliată a materialelor sintetizate, a fost evaluată biodegradabilitatea lor enzimatică, în vederea

explorării potențialului lor pentru aplicații biomedicale și sisteme de eliberare controlată a medicamentelor.

7.2. Rezultate şi discuţii

7.2.1. Sinteza și caracterizarea precursorilor PEA

Caracteristicile moleculare ale precursorilor PEA sintetizați în acest studiu sunt prezentate în **Tabelul 7.1**.

Tabelul 7.1. Caracteristicile moleculare ale poliesterilor dihidroxilați obținuți

Caracteristicile moleculare	PEA-1	PEA-2	PEA-3
M_n[a] (g/mol)	960	2480	670
M_n[b] (g/mol)	1045	2420	670
M_n[c] (g/mol)	1415	3275	1000
T_m[d] (°C)	43.0	45.5	42.0
T_g[e] (°C)	-52	-47.5	-52.5
T_d[f] (°C)	278.5	316.0	242.0

[a] determinat prin 1H RMN; [b] determinat prin ^{13}C RMN; [c] determinat prin SEC folosind standarde PS; [d] temperatura de topire determinată prin DSC; [e] temperatura de tranziție vitroasă determinată prin DSC; [f] temperatura de degradare.

În această etapă, s-au obținut și caracterizat din punct de vedere fizico-chimic o serie de PEA di-hidroxilați. Rezultatele obținute au demonstrat că proba PEA-2 are caracteristicile optime pentru sinteza ulterioară a copolimerilor bloc PCL-b-PEA-b-PCL.

7.2.2. Sinteza și caracterizarea copolimerilor bloc

Polimerizarea ε-CL pornind de la proba PEA-2-diOH a fost efectuată prin tehnica policondensării în masă la temperaturi ridicate. Prin variația cantității de monomer, s-a obținut o serie de copolimeri cu aceeași lungime a secvenței centrale PEA, dar cu mase molare diferite pentru PCL.

Caracteristicile moleculare ale tuturor probelor de copolimeri obținute în acest studiu sunt rezumate în **Tabelul 7.2**.

Tabelul 7.2. Caracteristicile moleculare ale copolimerilor PCL-b-PEA-b-PCL

Proba	$Mn_{(NMR)}$ PEA (g/mol)	Mn_{th} PCL (g/mol)	$Mn_{(NMR)}$ PCL (g/mol)	$Mn_{(SEC)}$ cop (g/mol)	Đ cop	T_m cop (°C)	T_g cop (°C)	T_d cop (°C)
PCL_{1000}-PEA_{2500}-PCL_{1000}	2480	2000	2900	5500	1.73	46.5	-48.5	320.3
PCL_{2000}-PEA_{2500}-PCL_{2000}		4000	4800	7200	1.99	58.8	-52.1	325.2
PCL_{3000}-PEA_{2500}-PCL_{3000}		6000	6800	9400	1.78	61.2	-55.7	348.9
PCL_{5000}-PEA_{2500}-PCL_{5000}		10000	10700	14100	1.65	63.5	-57.3	360.4
PCL_{7000}-PEA_{2500}-PCL_{7000}		14000	15100	18300	1.87	65.2	-58.5	375.6

PCL_{10000}-PEA_{2500}-PCL_{10000}	20000	21500	23200	1.98	67.9	-61.2	398.5

Din **Tabelul 7.2** reiese că o serie omoloagă de copolimeri PCL-b-PEA-b-PCL a fost obținută pornind de la dihidroxi-PEA. Apoi, se pare că valorile M_n calculate prin ^1H RMN sunt apropiate de valorile teoretice, în timp ce valorile dispersității Đ sunt mai mici decât doi, ceea ce este caracteristic tipului de polimerizare utilizată în acest studiu.

În ceea ce privește proprietățile termice ale copolimerilor obținuți, se poate observa că T_m, T_g și T_d cresc odată cu creșterea lungimii secvenței PCL, așa cum era de așteptat. La lungimi mici ale secvențelor PCL, pentru probele PCL1000-PEA2500-PCL1000 și PCL2000-PEA2500-PCL2000, proprietățile termice ale copolimerilor sunt inferioare celor ale homopolimerului PCL comercial având un M_n de 10.000 g/mol [261]. Totuşi, cu creşterea masei molare a blocului de PCL, proprietăţile termice sunt îmbunătăţite prin creşterea valorilor T_m, T_g şi T_d.

7.2.3. Studiul de degradare al copolimerilor PCL-b-PEA-b-PCL

7.2.3.1. Studiul gravimetric al degradării copolimerilor

Profilurile de pierdere în greutate în funcție de timpul de incubare (**Figura 7.8**) au relevat capacitatea de degradare a copolimerilor PCL-b-PEA-b-PCL investigați și a homopolimerilor PCL cu greutăți moleculare diferite (14000 și 80000 g/mol) care au fost supuși degradării în scopul comparației.

Hidroliza enzimatică a fost efectuată în soluție tampon fosfat (pH=7,4; 37°C timp de 10 și 21 de zile) în care s-a adăugat extract bacterian fără celule conținând enzimele *Pseudomonas lipase* PAO1. Numeroase studii *in vitro* au arătat că diferite tipuri de enzime sunt foarte active față de polimerii care conțin legături esterice hidrolizabile în lanțurile lor, de la esterază [262] și cutinază [263] până la enzime de tip lipază, utilizate preferențial pentru polimerii pe bază de PCL. Enzimele de tip lipază sunt cunoscute ca fiind foarte active și capabile să rupă legăturile esterice din polimerii pe bază de PCL ca substrat hidrofob [264].

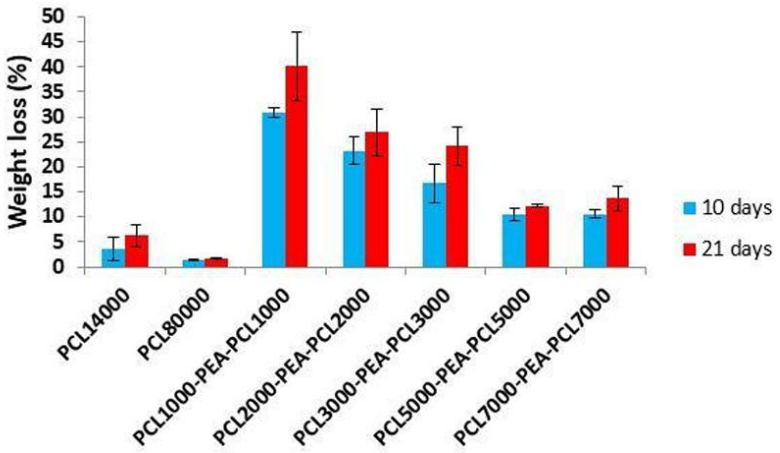
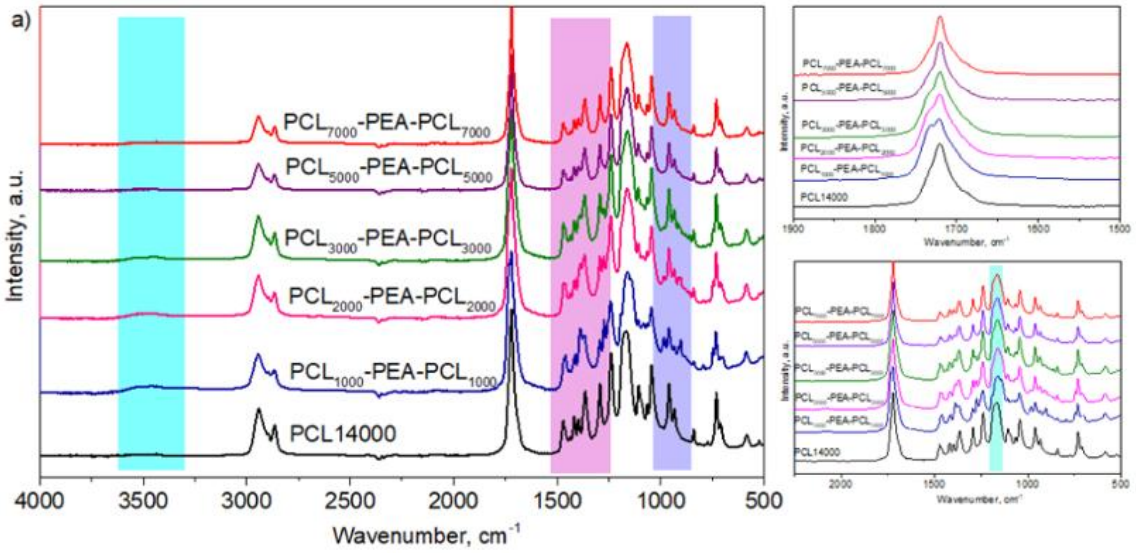


Figura 7.8. Profiluri de pierdere în greutate ale homopolimerilor PCL și copolimerilor PCL-b-PEA-b-PCL

Masa molară a copolimerului a apărut ca fiind factorul cel mai influent care dictează capacitatea de degradare. Prin urmare, PCL1000-PEA2500-PCL1000, un copolimer cu cea mai mică masă molară din serie, a pierdut aproximativ 40% din masă după 21 de zile.

7.2.3.2. Analiza FTIR a probelor degradate

Spectroscopia de infraroșu cu transformată Fourier (FTIR) este un instrument util pentru estimarea modificărilor structurii polimerului după degradarea enzimatică. În **Figura 7.9a**, sunt prezentate spectrele FTIR ale tuturor probelor investigate.



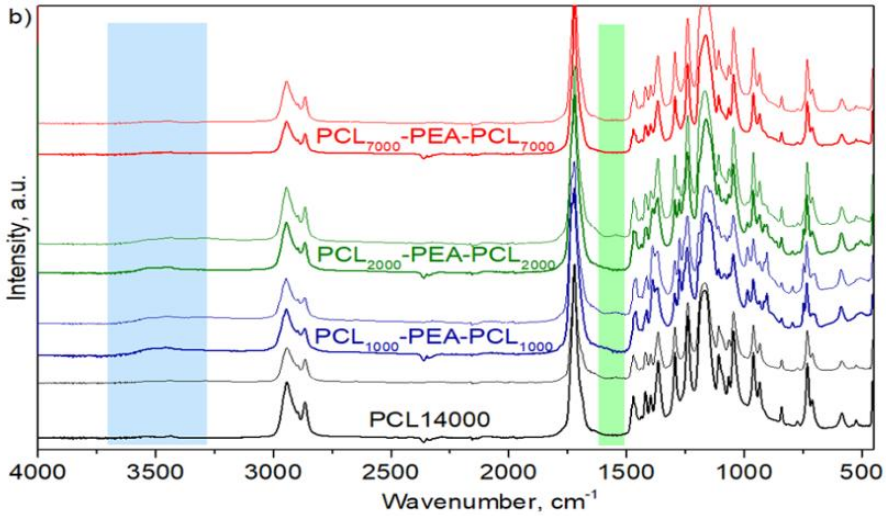


Figura 7.9. Analiza FTIR a probelor de polimeri de control/blank (a) și a spectrelor reprezentative ale homopolimerului PCL și copolimerilor PCL-b-PEA-b-PCL (b) după 21 de zile de degradare în prezența enzimelor *Pseudomonas lipază* PAO1

Analiza FTIR a copolimerilor PCL-b-PEA-b-PCL a confirmat prezența simultană a grupărilor caracteristice atât pentru PCL, cât și pentru PEA. Banda carbonilică (-C=O), observată la 1720 cm^{-1} în homopolimerul PCL, s-a lărgit și s-a divizat în două maxime la 1720 și 1733 cm^{-1} în copolimeri, ca urmare a introducerii blocurilor PEA. Pentru copolimerii cu secvențe PCL mai lungi (≥ 5000 g/mol), această divizare a devenit mai puțin evidentă, spectrele apropiindu-se de cele ale PCL pur. De asemenea, apariția unui nou semnal la 1272 cm^{-1} a evidențiat contribuția blocurilor PEA, iar modificarea benzii de la 1164 cm^{-1} a indicat schimbări structurale în faza amorfă a materialului. Grupările terminale hidroxil (-OH) au fost detectate doar la copolimerii cu mase molare mici (< 10000 g/mol), datorită lungimii reduse a lanțurilor PCL.

Studiul degradării enzimatice a arătat că structura homopolimerului PCL a rămas practic neschimbată după expunerea la lipaza *Pseudomonas lipase* PAO1, în ciuda unei anumite pierderi de masă. În schimb, copolimerii cu lanțuri PCL scurte (PCL1000-PEA2500-PCL1000 și PCL2000-PEA2500-PCL2000), care au prezentat cea mai mare pierdere în greutate, au evidențiat modificări spectrale semnificative. Lărgirea benzii asociate grupărilor hidroxil (3000–3500 cm^{-1}) și apariția unui nou semnal la 1560 cm^{-1} au indicat formarea de grupări carboxil și hidroxil rezultate din hidroliza legăturilor esterice și degradarea enzimatică a copolimerilor. Aceste rezultate confirmă susceptibilitatea mai ridicată la biodegradare a copolimerilor care conțin blocuri PEA și secvențe PCL mai scurte.

7.3. Concluzii

În prezentul studiu s-a obținut o serie omoloagă de copolimeri pe bază de poliester. Punctul de plecare a fost un precursor dihidroxi-PEA, iar copolimerii PCL-b-PEA-b-PCL au fost sintetizaţi prin policondensarea în masă a ε-CL la temperaturi ridicate. Masa molară obținută pentru PEA a fost de aproximativ 2500 g/mol, în timp ce masa molară a blocurilor PCL a variat între 1000 și 10000 g/mol. Conform analizei fizico-chimice efectuate, caracteristicile moleculare ale copolimerilor sunt direct corelate cu masa molară a blocurilor de PCL. Studiile de degradabilitate enzimatică, în funcție de timp, au arătat că prezența secvenței PEA crește rata de degradabilitate a copolimerilor în comparație cu homopolimerii PCL comerciali.

Prezentul studiu demonstrează că degradabilitatea acestor copolimeri, care este o caracteristică esențială pentru aplicațiile biomedicale, poate fi modulată în funcție de raportul dintre blocurile PEA și PCL. Prin urmare, se poate admite că acești copolimeri pot fi utilizați pentru prepararea unor sisteme de administrare a medicamentelor biodegradabile și biocompatibile.

CAPITOLUL 8

ACTIVITATEA ANTIFUNGICĂ *IN VITRO* A NANOPARTICULELOR PE BAZĂ DE COPOLIMERI BIODEGRADABILI DE TIPUL POLI(Ɛ-CAPROLACTONĂ)-B-POLI(ADIPAT DE ETILENĂ)-B-POLI(Ɛ-CAPROLACTONĂ) ÎNCĂRCATE CU NISTATINĂ

8.1. Introducere

Administrarea controlată a medicamentelor reprezintă una dintre principalele direcții de cercetare în domeniul biomaterialelor polimerice, având ca obiectiv optimizarea eficienței terapeutice prin controlul ratei, momentului și locului de eliberare a substanțelor active [269-273]. Diverse sisteme de administrare, precum micelele polimerice, polimerzomii, nanoparticulele, nanoemulsiile, hidrogelurile și fibrele obținute prin electrofilare, oferă avantaje importante față de formele farmaceutice convenționale, inclusiv eficiență terapeutică crescută, toxicitate redusă și o mai bună complianță a pacientului [272, 274-279]. Un sistem eficient de administrare a medicamentelor trebuie să asigure stabilitatea medicamentului, o capacitate ridicată de încărcare și încapsulare, profile controlate de eliberare și un proces de preparare simplu și reproductibil.

Nanoparticulele polimerice încărcate cu medicamente sunt deosebit de atractive datorită eficienței ridicate de încapsulare, biodisponibilității îmbunătățite, stabilității crescute și posibilității

de control al eliberării substanței active [280-283]. Acestea pot fi preparate prin diferite metode, dintre care tehnica emulsie/evaporare este cea mai utilizată, datorită versatilității și eficienței sale [224-226].

Poliesterii alifatici biodegradabili, precum PLA, PGA, PLGA și PCL, sunt larg utilizați în aplicații biomedicale datorită biocompatibilității, biodegradabilității și proprietăților mecanice favorabile [231, 233, 234, 237]. Dintre aceștia, PCL este un polimer aprobat de FDA, caracterizat prin temperaturi scăzute de topire și tranziție vitroasă, însă cristalinitatea sa ridicată determină o rată redusă de biodegradare [284-287]. Pentru a depăși această limitare, PCL este frecvent copolimerizat cu poliesteri care se degradează mai rapid [260, 291].

Poli(adipatul de etilenă) (PEA) este un poliester biodegradabil cu cristalinitate redusă și degradare mai rapidă decât PCL, ceea ce îl recomandă pentru dezvoltarea de noi copolimeri cu proprietăți adaptate sistemelor de administrare a medicamentelor [291]. Deoarece proprietățile copolimerilor pot fi ajustate prin controlul compoziției, masei molare și structurii moleculare, aceștia prezintă un potențial superior față de homopolimeri pentru aplicații biomedicale.

În acest context, studiul a urmărit dezvoltarea unor nanoparticule originale pe bază de copolimeri bloc PCL-b-PEA-b-PCL, un sistem care nu fusese raportat anterior în literatură [292, 293]. Pentru evaluarea potențialului lor ca sisteme de administrare a medicamentelor, Nistatina (NYS), un antifungic cu spectru larg și solubilitate redusă în apă, a fost încapsulată în nanoparticule obținute prin metoda emulsie/evaporare. Nanoparticulele rezultate au fost caracterizate prin metode fizico-chimice și biologice, iar eficacitatea lor a fost evaluată prin testarea activității antifungice împotriva mai multor specii de fungi.

8.2. Rezultate

8.2.1. Optimizarea dimensiunilor NPs

Pentru a optimiza dimensiunile particulelor goale, s-au modulat o serie de parametri pentru prepararea particulelor pe bază de homopolimer PCL.

Pe baza rezultatelor obţinute, se poate aprecia că condițiile optime (dimensiuni mici și randament ridicat) pentru prepararea nanoparticulelor PCL sunt:

- raportul volumic faza organică/apoasă = 5/60 ml;
- concentrația în PVA = 1%;
- durata sonicării = 5 min;
- adăugare directă;

- DH (PVA) = 80,
- M_n (PCL) = 14000 g/mol.

După stabilirea acestor condiții, a fost posibilă prepararea atât a particulelor goale, cât și a celor încărcate cu Nistatină, pe baza nu doar a homopolimerului PCL, cu o masă molară de 14000 g/mol, ci și a copolimerului PCL5000-PEA2500-PCL5000, care are o masă molară apropiată de cea a homopolimerului PCL (PCL14000). Au fost investigate cinci rapoarte polimer/medicament, iar particulele obținute au fost studiate prin DLS. Valorile dimensiunilor sunt prezentate în **Tabelul 8.6**.

Din **Tabelul 8.6** se poate observa o ușoară creștere a valorilor dimensiunilor particulelor atât pentru copolimerul PCL14000, cât și pentru copolimerul PCL5000-PEA2500-PCL5000, în funcție de raportul polimer/medicament. Cu toate acestea, toate particulele au dimensiuni mai mici de 200 nm, ceea ce este în acord cu alte tipuri de particule obținute din polimeri preformați [283]. Având în vedere aceste valori, se poate admite că aceste particule pot fi utilizate pentru aplicații biomedicale. Valorile PDI sunt mai mici de 0.2, ceea ce indică o distribuție relativ uniformă a dimensiunilor particulelor, dar şi faptul că particulele obținute sunt sferice. Așa cum era de așteptat, valorile ZP sunt apropiate de 0, deoarece PVA este un surfactant neionic.

Tabelul 8.6. Caracteristicile coloidale ale particulelor, preparate pe bază de PCL cu o masă molară de 14000 g/mol şi copolimerul PCL5000-PEA2500-PCL5000, goale şi încărcate cu Nistatină (NYS) în funcție de rapoartele medicament/NYS

Polimer	Parametri	Raport masic polimer/NYS					
		Fără NYS	1/0.1	1/0.2	1/0.5	1/1	1/2
PCL14000	Dv (nm)	177±1	188±1	189±2	189±1	195±1	198±1
	PDI	0.131	0.140	0.189	0.223	0.224	0.192
	Potenţial zeta (mV)	-1	-1	0	1	1	-1
PCL5000-PEA2500-PCL5000	Dv (nm)	167±1	168±1	169±2	169±1	170±1	171±1
	PDI	0.121	0.120	0.119	0.123	0.124	0.122
	Potenţial zeta (mV)	-1	-1	0	1	1	2

8.2.2. Spectroscopia de infraroșu cu transformată Fourier (FTIR)

Spectrele FTIR confirmă încapsularea NYS și prezența unor interacțiuni, probabil legături de hidrogen, între matricea copolimerului și medicamentul încărcat.

8.2.3. Eficiența încărcării și încapsulării Nistatinei

Tabelul 8.7. Valorile eficienței încărcării și încapsulării NYS în funcție de raportul polimer/medicament

Probe	Raport masic polimer/NYS	DLE (%)	DEE (%)
PCL14000	1/0.1	3.4	51.3

	1/0.2	1.8	35.0
	1/0.5	0.7	21.3
	1/1	0.3	14.3
	1/2	0.1	7.6
PCL_{5000}-PEA_{2500}-PCL_{5000}	1/0.1	4.8	72.5
	1/0.2	3.2	64.8
	1/0.5	1.6	46.7
	1/1	0.7	42.1
	1/2	0.2	20.6

8.2.4. Cinetica de eliberare a Nistatinei

Din datele ilustrate în **Figura 8.4**, apare o diferență clară între NYS liberă și cea încărcată. Așa cum era de așteptat, NYS liberă a fost eliberată foarte rapid (aproape 100% în mai puțin de 30 de minute), prezentând un "burst" efect pronunțat. Comparând probele PCL5000-PEA2500-PCL5000/NYS = 1/1 și PCL14000/NYS = 1/1, se poate observa că procentul de NYS eliberată din NP-urile pe bază de homopolimer PCL14000 este mai mare decât cel din proba de copolimer. O explicație a acestui comportament poate fi legată de interacțiunile mai puternice dintre matricea copolimerului și NYS, ceea ce duce la o eliberare mai lentă și susținută. Mai mult, prin creșterea raportului PCL5000-PEA2500-PCL5000/NYS, crește și cantitatea de NYS eliberată, ceea ce este un comportament normal, deoarece cantitatea de NYS încapsulată este mai mare. În plus, se poate concluziona că curbele cinetice de eliberare sunt tipice pentru o eliberare controlată prin difuzie, în care echilibrul este atins după 24 de ore, chiar dacă procentul cumulativ de NYS eliberat din NPs nu a atins 100%.

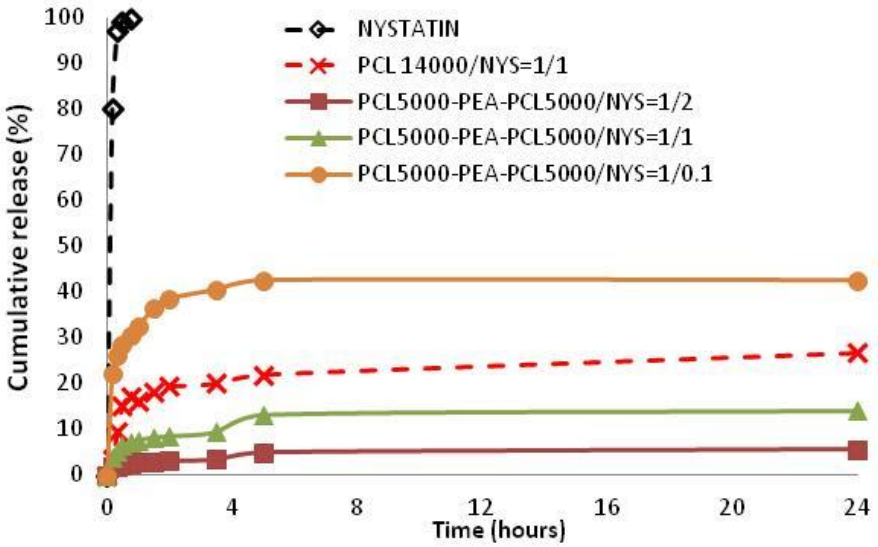


Figura 8.4. Cinetica de eliberare a NYS în funcție de timp și raportul polimer/medicament

8.2.5 Evaluarea gradului de hemoliză

Deoarece NPs obținute vor intra în contact cu sângele, a fost interesant să se evalueze influența acestor particule asupra eritrocitelor, componenta majoritară a sângelui. În primul rând, NPs goale obținute din copolimerul PCL5000-PEA2500-PCL5000 au fost analizate în funcție de timp și concentrație, iar rezultatele obținute sunt ilustrate în **Figura 8.5**.

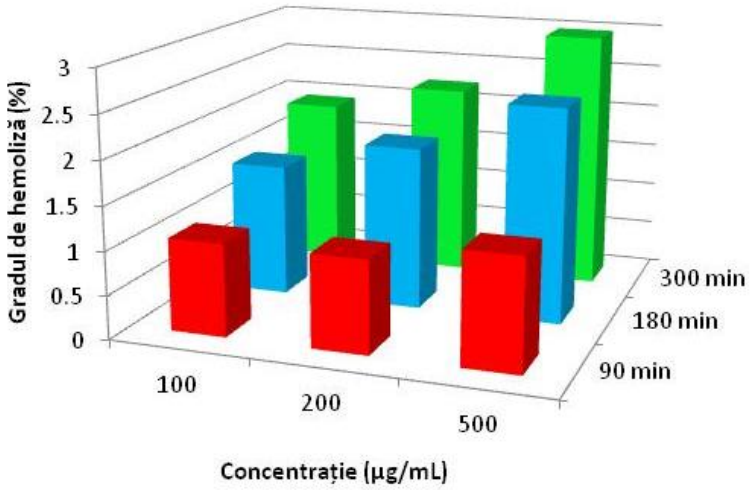


Figura 8.5. Evoluția gradului de hemoliză în funcție de concentrație și timp pentru NPs goale PCL5000-PEA2500-PCL5000

Datele furnizate în **Figura 8.5** arată că gradul de hemoliză crește ușor în funcție de timp și concentrație. Cu toate acestea, rezultatele obținute demonstrează că NPs goale bazate pe copolimeri PCL5000-PEA2500-PCL5000 au un grad de hemoliză mai mic de 3%, chiar și la cea mai mare concentrație de 500 µg/ml, şi după 300 min. Trebuie menționat faptul că o probă este considerată hemolitică dacă gradul de hemoliză este mai mare de 5% [295].

În etapa următoare, a fost important să se investigheze efectul NPs încărcate cu NYS în funcție de raportul copolimer/medicament. **Figura 8.6** prezintă evoluția gradului de hemoliză al NPs încărcate cu NYS în funcție de concentrație după 90 min.

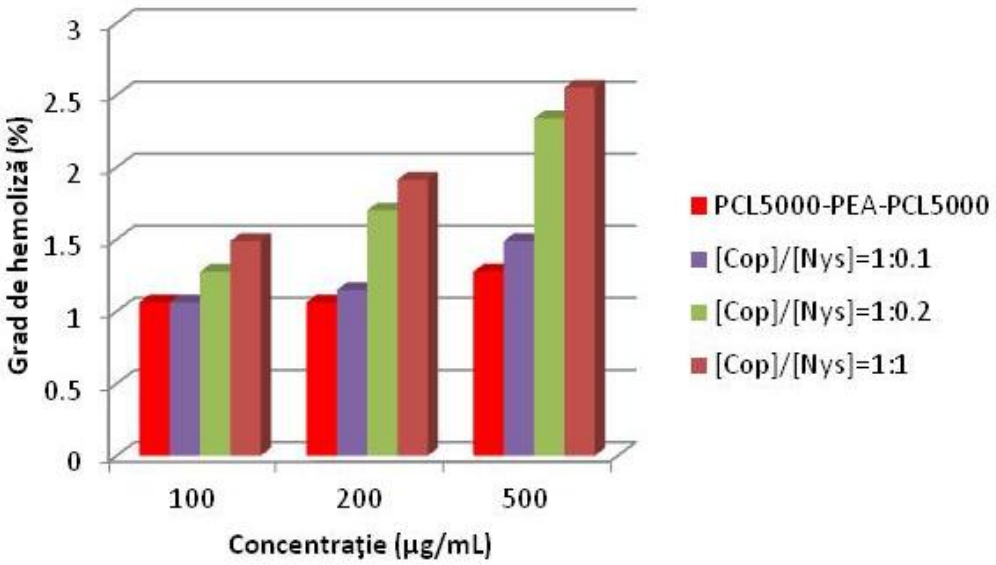


Figura 8.6. Evoluția gradului de hemoliză al NPs încărcate cu NYS în funcție de concentrație, determinată după 90 de minute

O primă observație, din **Figura 8.6**, este că gradul de hemoliză crește ușor pentru NPs încărcate cu NYS în comparație cu NPs goale. Mai mult, gradul de hemoliză crește odată cu creșterea cantității de NYS încărcată în NPs. Cu toate acestea, chiar şi la o concentrație mare în NYS, valorile gradului de hemoliză sunt mai mici de 2.5, ceea ce reprezintă o dovadă directă că aceste NPs încărcate cu NYS pot fi utilizate în aplicații biomedicale.

8.2.6. Studiul citotoxicităţii nanoparticulelor

Din **Figura 8.7** se poate observa că viabilitatea celulară, după 24 h, este mai mare de 80% pentru toate probele analizate, independent de concentraţia lor, ceea ce denotă efectul lor necitotoxic. De asemenea, se poate nota faptul că viabilitatea celulară scade cu creşterea cantităţii de Nistatină din particule şi cu creşterea concentraţiei particulelor. Un efect similar a fost descris în literatură şi de alţi autori [296, 297].

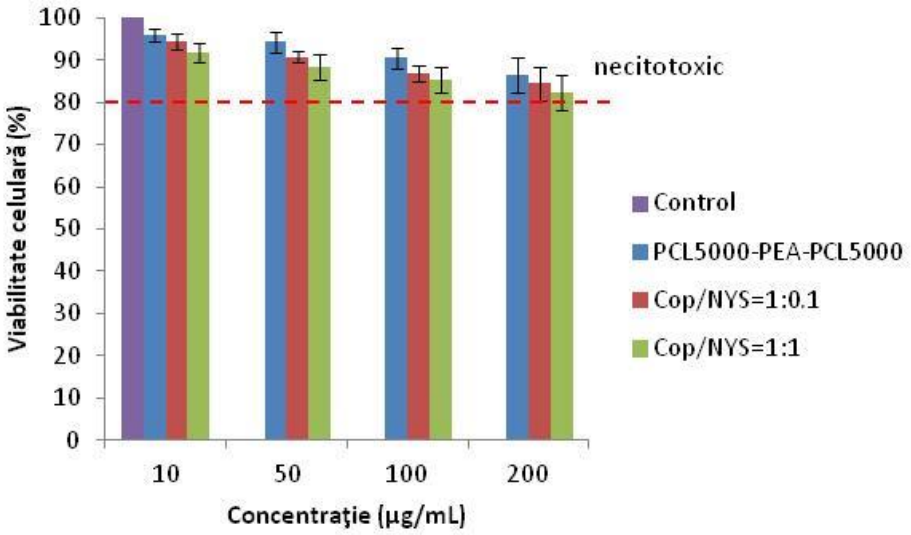


Figura 8.7. Evoluţia viabilităţii celulare după 24h

8.2.7. Studiul activităţii antifungice

Genul *Candida* cuprinde un grup de microorganisme eucariote unicelulare, aparținând fungilor levuriformi, caracterizate printr-o structură antigenică complexă și o mare capacitate de adaptare la diferite medii biologice.

Rezultatele diametrelor de inhibiţie obţinute în urma determinării activităţii antimicrobiene utilizând 4 tipuri de tulpini din clasa *Candida* sunt prezentate în **Tabelul 8.8**. **Figura 8.10** ilustrează zonele de inhibiţie.

Tabel 8.8. Diametrele zonelor de inhibiţie

Probă	*Candida albicans*	*Candida glabrata*	*Candida parapsilopsis*	*Candida tropicalis*
NYS	26.0	25.5	25.0	26.5
PCL5000-PEA-PCL5000	8.0	8.0	8.0	8.0
PCL14000	0	0	0	0
PCL14000/Nys = 1/1	22.0	21.0	17.5	19.0
PCL14000/Nys = 1/2	25.0	24.0	22.0	23.0
PCL5000-PEA-PCL5000/Nys = 1/0.1	8.0	9.0	9.0	9.0
PCL5000-PEA-PCL5000/Nys = 1/0.2	11.0	14.0	11.0	12.0
PCL5000-PEA-PCL5000/Nys = 1/0.5	16.0	17.0	17.0	16.5
PCL5000-PEA-PCL5000/Nys = 1/1	23.0	21.5	18.5	22.5
PCL5000-PEA-PCL5000/Nys = 1/2	26.5	26.0	25.0	27.5

Analizând datele prezentate în **Tabelul 8.8**, se observă că particulele polimerice care nu conțin Nistatină prezintă zone de inhibiție neglijabile, demonstrând lipsa unei activități

antifungice proprii a matricei polimerice. În schimb, creșterea concentrației de Nistatină în particulele obținute atât din homopolimerul PCL14000, cât și din copolimerul de tip ester PCL-b-PEA-b-PCL, cu masă moleculară comparabilă cu cea a homopolimerului, determină o creștere progresivă a diametrului zonelor de inhibiție, evidențiind o intensificare semnificativă a activității antifungice.

8.7. Concluzii

Rezultatele studiului au demonstrat că nanoparticulele pe bază de homopolimer PCL14000 și, în special, cele pe bază de copolimer PCL5000-PEA2500-PCL5000 reprezintă sisteme eficiente pentru încapsularea și administrarea controlată a Nistatinei. Prin optimizarea metodei de preparare s-au obținut nanoparticule cu dimensiuni sub 200 nm, distribuție dimensională îngustă și stabilitate coloidală adecvată pentru aplicații biomedicale. Încapsularea medicamentului a influențat doar ușor dimensiunea particulelor, fără a compromite stabilitatea acestora.

Analiza FTIR a confirmat integrarea cu succes a Nistatinei în matricea polimerică și existența unor interacțiuni între medicament și copolimer, probabil prin legături de hidrogen. Aceste interacțiuni au favorizat creșterea eficienței de încărcare și încapsulare în cazul copolimerului PCL5000-PEA2500-PCL5000, sugerând că secvențele PEA contribuie la retenția mai eficientă a medicamentului în nanoparticule.

Studiile de eliberare au evidențiat faptul că nanoparticulele asigură o eliberare graduală și susținută a Nistatinei timp de 24 de ore, spre deosebire de medicamentul liber, care se eliberează rapid. Sistemele pe bază de copolimer au prezentat cel mai controlat profil de eliberare, ceea ce poate contribui la menținerea unor concentrații terapeutice eficiente pe perioade mai lungi și la reducerea frecvenței administrării.

Evaluarea biocompatibilității a arătat că atât nanoparticulele goale, cât și cele încărcate cu Nistatină sunt hemocompatibile și necitotoxice. Valorile hemolizei au rămas sub limita acceptată de 5%, iar viabilitatea celulară a fibroblastelor a depășit 80% după 24 și 48 de ore de incubare, fără modificări morfologice semnificative.

Testele antifungice au confirmat eficiența ridicată a nanoparticulelor încărcate cu Nistatină împotriva principalelor specii de *Candida* (*Candida albicans, Candida glabrata, Candida tropicalis* și *Candida parapsilosis*). Activitatea antifungică a crescut odată cu cantitatea de medicament încapsulat, iar nanoparticulele pe bază de copolimer au generat, la concentrații ridicate, efecte comparabile sau chiar superioare Nistatinei libere.

În concluzie, nanoparticulele bazate pe copolimerul PCL5000-PEA2500-PCL5000 prezintă avantaje semnificative față de sistemele pe bază de PCL pur, datorită capacității superioare de încapsulare, eliberării controlate a medicamentului, biocompatibilității ridicate și activității antifungice îmbunătățite. Aceste caracteristici le recomandă drept sisteme promițătoare pentru dezvoltarea unor noi formulări destinate tratamentului infecțiilor fungice, în special al candidozelor.

CONCLUZII GENERALE

Prezenta cercetare a avut ca obiectiv dezvoltarea și caracterizarea unor copolimeri biodegradabili pe bază de poliesteri și evaluarea potențialului acestora pentru obținerea unor sisteme nanoparticulate destinate administrării controlate a Nistatinei. Rezultatele obținute demonstrează că strategia adoptată, bazată pe proiectarea unor arhitecturi macromoleculare bine definite și pe utilizarea acestora ca matrice pentru formulări nanoparticulate, reprezintă o abordare eficientă pentru dezvoltarea unor sisteme moderne de transport al medicamentelor.

Următoarele concluzii generale pot fi evidenţiate:

✓ Au fost sintetizați cu succes copolimeri biodegradabili de tip PLLA-b-PCL și PCL-b-PEA-b-PCL, cu mase molare controlate și dispersități reduse, utilizând metode de polimerizare adecvate fiecărui sistem.

✓ Caracterizarea fizico-chimică a confirmat obținerea unor materiale cu structură bine definită și puritate ridicată.

✓ Variația masei molare a blocurilor polimerice a influențat dimensiunea nanoparticulelor obținute, fără a afecta semnificativ stabilitatea coloidală a acestora.

✓ Metoda de emulsificare/evaporare a permis obținerea unor nanoparticule sferice, cu dimensiuni cuprinse între aproximativ 140–200 nm și valori reduse ale indicelui de polidispersitate (PDI).

✓ Introducerea secvențelor PEA în structura copolimerilor a condus la creșterea degradabilității enzimatice comparativ cu homopolimerii PCL comerciali.

✓ Degradabilitatea copolimerilor poate fi controlată prin ajustarea raportului dintre blocurile PEA și PCL, oferind posibilitatea personalizării materialelor în funcție de aplicația biomedicală vizată.

✓ Nanoparticulele dezvoltate au prezentat o capacitate eficientă de încapsulare a Nistatinei, copolimerul PCL5000-PEA2500-PCL5000 demonstrând performanțe superioare față

de homopolimerul PCL14000.

✓ Analiza FTIR a confirmat încapsularea medicamentului și existența unor interacțiuni între Nistatină și matricea copolimerică.

✓ Încapsularea Nistatinei a permis transformarea profilului de eliberare rapidă al medicamentului liber într-un profil de eliberare controlată și susținută.

✓ Nanoparticulele pe bază de copolimer au prezentat o eliberare mai lentă și mai susținută comparativ cu sistemele bazate exclusiv pe PCL.

✓ Testele de hemocompatibilitate au evidențiat valori ale hemolizei sub limita de 5%, demonstrând siguranța biologică a sistemelor dezvoltate.

✓ Studiile de citotoxicitate au arătat o viabilitate celulară mai mare de 80% după 24 și 48 de ore, confirmând caracterul necitotoxic al nanoparticulelor.

✓ Morfologia fibroblastelor nu a fost afectată de prezența nanoparticulelor, indiferent de concentrația acestora sau de cantitatea de Nistatină încapsulată.

✓ Nanoparticulele încărcate cu Nistatină au prezentat activitate antifungică semnificativă împotriva speciilor *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis* și *Candida parapsilosis*.

✓ Activitatea antifungică a crescut odată cu creșterea cantității de Nistatină încapsulate.

✓ Sistemele bazate pe copolimerul PCL5000-PEA2500-PCL5000 au prezentat performanțe antifungice superioare celor bazate pe homopolimerul PCL14000.

✓ Încapsularea Nistatinei nu a diminuat activitatea antifungică a medicamentului, ci a contribuit la îmbunătățirea eficacității acestuia.

În ansamblu, rezultatele obținute validează potențialul copolimerilor biodegradabili de tip poliester ca platforme eficiente pentru dezvoltarea unor sisteme avansate de administrare controlată a medicamentelor antifungice și demonstrează posibilitatea utilizării acestora în aplicații biomedicale și stomatologice.

PERSPECTIVE DE VIITOR

Rezultatele obținute în cadrul acestei cercetări deschid numeroase direcții de dezvoltare și optimizare a sistemelor nanoparticulate pe bază de copolimeri biodegradabili.

✓ Optimizarea suplimentară a structurii copolimerilor prin modificarea raportului dintre blocurile PEA și PCL pentru reglarea mai precisă a degradabilității și a profilului de eliberare.

✓ Investigarea altor mase molare și arhitecturi macromoleculare (copolimeri multibloc,

stea, grefați) pentru îmbunătățirea proprietăților funcționale ale nanoparticulelor.

✓ Studierea detaliată a mecanismelor de interacțiune dintre Nistatină și secvențele PEA responsabile de eficiența ridicată a încapsulării.

✓ Extinderea studiilor de eliberare in vitro pe perioade mai lungi și în medii biologice care simulează condițiile fiziologice reale.

✓ Investigarea comportamentului nanoparticulelor în prezența proteinelor plasmatice și a altor componente biologice.

✓ Realizarea studiilor *in vivo* pentru evaluarea biodistribuției, farmacocineticii, biodegradării și eficacității terapeutice.

✓ Evaluarea siguranței pe termen lung și a eventualelor efecte adverse asociate administrării repetate a nanoparticulelor.

✓ Testarea activității antifungice împotriva tulpinilor clinice rezistente la tratamentele convenționale.

✓ Investigarea eficienței sistemelor dezvoltate împotriva biofilmelor fungice, responsabile de numeroase infecții cronice și recurente.

✓ Dezvoltarea unor sisteme de administrare locală pentru tratamentul candidozelor orale și al altor infecții fungice ale cavității orale.

✓ Integrarea nanoparticulelor încărcate cu Nistatină în materiale stomatologice, precum: proteze dentare; rășini și materiale restaurative; membrane pentru regenerare tisulară ghidată; sisteme de eliberare locală utilizate în chirurgie orală și parodontală.

✓ Evaluarea potențialului copolimerilor PCL-b-PEA-b-PCL pentru transportul altor molecule bioactive (antibiotice, antiinflamatoare, antitumorale).

✓ Funcționalizarea suprafeței nanoparticulelor cu liganzi specifici pentru obținerea unor sisteme de administrare țintită.

✓ Dezvoltarea unor formulări multifuncționale care să combine proprietățile antifungice cu efecte antiinflamatoare sau regenerative.

✓ Transferul tehnologiei către aplicații clinice și industriale prin optimizarea proceselor de producție și scalarea metodelor de preparare.