

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE

“VICTOR BABEȘ” DIN TIMISOARA

FACULTATEA DE FARMACIE

Departamentul I

BORCAN FLORIN



TEZĂ DE DOCTORAT

**STRUCTURI POLURETANICE APLICABILE ÎN TRANSFERUL
TRANSMEMBRANAR AL COMPUȘILOR BIOLOGIC ACTIVI**

R E Z U M A T

Conducător de doctorat:

PROF. UNIV. DR. ȘOICA CODRUȚA MARINELA

Timișoara

2023

C U P R I N S

Lista articolelor științifice publicate	V
Lista cu abrevieri și simboluri	VI
Lista figurilor	IX
Lista tabelelor	XI
Mulțumiri	XII
INTRODUCERE.....	1
PARTEA GENERALĂ	5
Capitolul 1. Sisteme polimerice de transport de medicamente	5
Capitolul 2. Membranele corpului uman	31
2.1. Membrane epiteliale	31
2.2. Membrane sinoviale	33
PARTEA SPECIALĂ	37
Capitolul 3. Influența pH-ului asupra structurilor poliuretanic	37
3.1. Scopul și obiectivele studiului	42
3.2. Metode	42
3.3. Rezultate și discuții	47
Capitolul 4. Transportor poliuretanice pentru acyclovir	51
4.1. Date generale.....	52
4.2. Protocol.	55
4.3. Constatări și direcții viitoare de cercetare.....	61
Capitolul 5. Modificări în solubilitatea în apă a structurilor poliuretanic	71
5.1. Prezentare generală a brevetului	71

5.2. Metode	73
5.3. Rezultate și discuții	74
Capitolul 6. Particule poliuretanică pentru nucleozide	81
6.1. Implicații teoretice	84
6.2. Proceduri	86
6.3. Contribuția generală	88
 CONCLUZII	 107
BIBLIOGRAFIE	111
ARTICOLELE PUBLICE IN EXTENSO	125

REZUMAT

Dezvoltarea nanotehnologiilor capabile să transporte compuși biologic activi în organism și să le elibereze într-un mod specific la locul de acțiune face posibilă creșterea activității terapeutice și reducerea toxicității multor medicamente. Acești „nanovectori” sunt capabili să protejeze molecula activă față de degradarea ei de către enzimele corpului, să o adreseze selectiv către țesutul sau celula țintă și să controleze eliberarea acesteia. Mai specifice decât formulările farmaceutice tradiționale, „nanomedicamentele” fac posibilă proiectarea de noi strategii terapeutice în lupta împotriva bolilor severe, precum cancerule, infecțiile intracelulare, bolile metabolice sau neurodegenerative etc.

Prefixul „nano” evocă scenarii ciudate, parcă desprinse din science-fiction, însă nanoștiința se referă pur și simplu la o serie de tehnici de manipulare a particulelor la scară nanometrică, adică moleculară. Această tehnologie ar trebui să inspire mai degrabă speranță decât frică, după cum afirmă Prof. Dr. C. Palivan, o cercetătoare de origine română de la catedra de Chimie fizică a Universității din Basel, membră a Institutului Elvețian de Nanotehnologii.

Poliuretanii (PU) s-au dezvoltat inițial ca spume flexibile obținute la nivel de laborator de către colectivul Prof. Otto Bayer în anii 1930 la compania germană I.G. Farben; spuma obținută atunci era un material mai flexibil, mai rezistent la umiditate și cu un cost de producție relativ scăzut față de toate celelalte materiale cunoscute atunci. Foarte repede, au fost introduse noi îmbunătățiri pentru a reduce și mai mult costul de producție și pentru a spori flexibilitatea materialului. Au urmat studii ce vizau o rezistență mai mare la deformare și reducerea inflamabilității, iar ulterior modificarea unor caracteristici fizico-mecanice precum rigiditatea și duritatea au condus la deschiderea multiplelor posibilități de utilizare spre industria auto. Orașul Timișoara a produs la scară industrială poliuretani în cadrul S.C. Spumotim S.A. prezentând un catalog extins de produse dintre care cele mai cunoscute aparținând secției de spumare a scaunelor autoturismelor Dacia, secția de tălpi de încălțăminte, produse de camping, peliculogene și diverse soluții de izolare fonică și termică.

Datorită versatilității sale, poliuretanul este utilizat pe scară largă în industria medicală și farmaceutică. Există poliuretani biodegradabili fără riscuri pentru sănătate care oferă performanțe excelente în ceea ce privește durabilitatea, flexibilitatea și rezistența. Aceste

materiale se remarcă și printr-o biocompatibilitate impecabilă, rezistență la încovoiere și versatilitate, care le permit să se adapteze la diferite tipuri de utilizări.

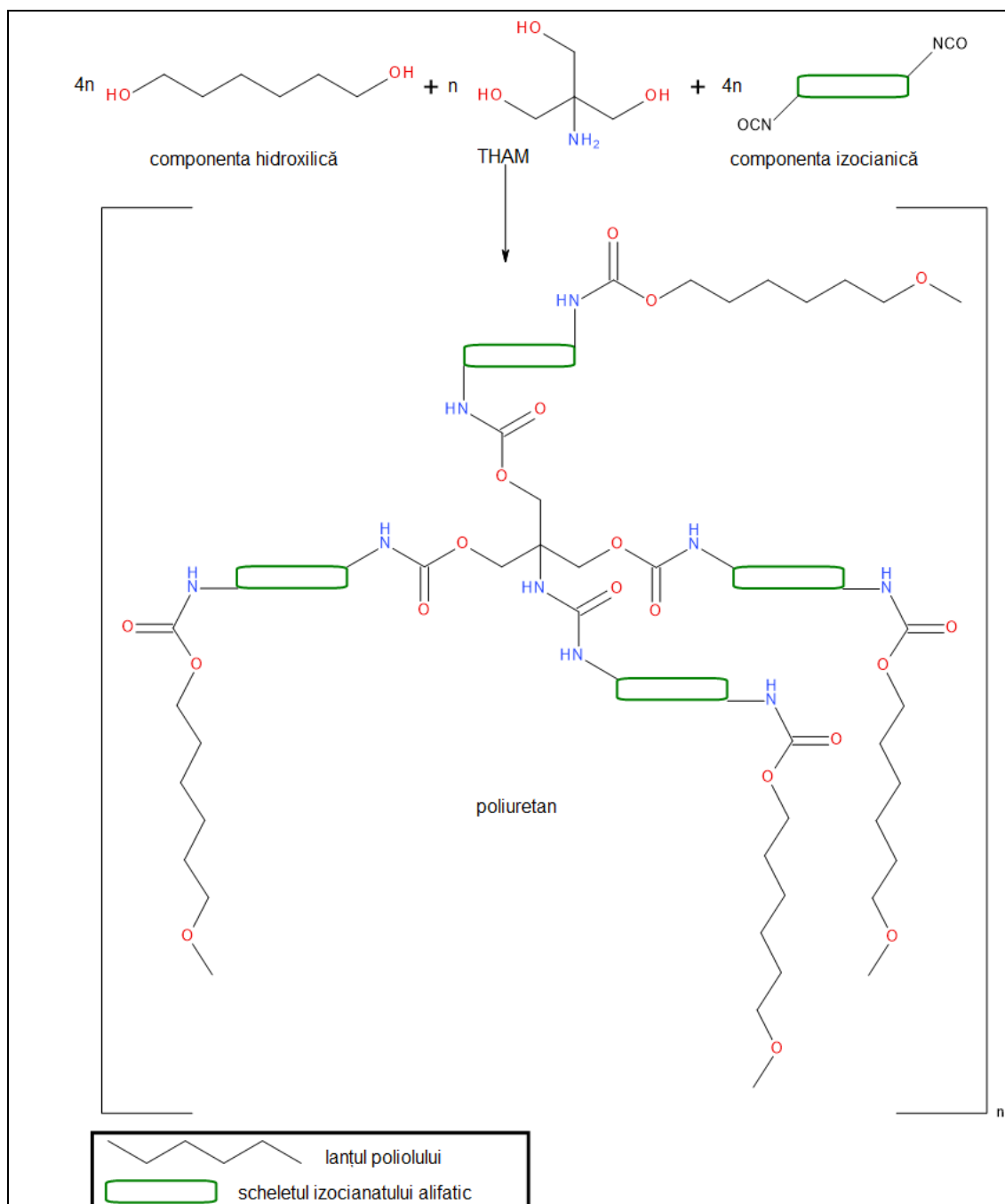


Fig. 1. Prezentarea schematică a ecuației chimice a sintezei unui poliuretan ramificat

Sistemele de transport de medicamente pe bază de particule poliuretaneice au început să apară în ultimul deceniu al secolului trecut, dar studiile respective s-au bazat pe utilizarea precursorilor industriali precum difenilmetan-4,4'-diizocianat (MDI), amestecul de izomeri toluilen-2,4-diizocianat și toluilen-2,6-diizocianat (TDI), respectiv catalizatori precum octoatul stanos și 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octan (Dabco), toți fiind compuși cu o toxicitate ridicată. În plus,

nu s-a reușit atunci diminuarea dimensiunilor structurilor macromoleculare obținute sub pragul de 1000 nm, astfel încât să se asigure permeabilitatea transmembranară dorită. Colaborările dintre K. Bouchemal de la Chimie ParisTech, PSL University și Prof. H. Fessi de la Universitatea din Lyon din perioada 2003-2006, au condus la o serie de lucrări științifice care descriu sinteza unor capsule poliuretane pe bază de izocianați alifatici, obținute printr-un procedeu de poliadiție combinată cu o emulsionare puternică în prezența a doi surfactanți (unul lipofil și celălalt hidrofil), cu dimensiuni cuprinse între 200 și 600 nm, utilizabile ca transportori pentru alfa-tocoferol.

Preocupările pentru obținerea și caracterizarea unor transportori de medicamente au constituit o direcție de cercetare în cadrul Facultății de Farmacie din Universitatea de Medicină și Farmacie „Victor Babeș” Timișoara încă dinainte de 2010; au fost publicate mai întâi o serie de articole științifice despre încapsularea acidului betulinic în complecși ai ciclodextrinelor, iar mai târziu, echipa noastră a raportat obținerea și optimizarea unor structuri poliuretane, dar și pe bază de nanoparticule metalice. În universitatea noastră au fost publicate aproape 80 de lucrări științifice, dintre care peste jumătate de către cercetători din Facultatea de Farmacie, despre diferiți transportori utilizabili ca sistem de livrare a compușilor biologic activi, conform Clarivate® Web of Science.

Ținând cont de toate aspectele enunțate anterior, această teză de doctorat se înscrie în preocupările și direcțiile de cercetare ale diverselor colective și centre de cercetare din universitatea noastră, tema centrală fiind sinteza și caracterizarea preliminară a unor biomateriale pe bază de structuri poliuretane utilizabile ca transportori de substanțe biologice active. **Scopul acestei teze de doctorat** a fost să aducă o contribuție importantă în dezvoltarea de noi particule poliuretane care să aibă proprietăți fizico-chimice și biologice îmbunătățite față de ceea ce era deja raportat în literatura de specialitate. La nivelul anului 2019, atunci când au demarat studiile incluse în această teză, se cunoșteau următoarele aspecte: (1) precursorii sintezei materialelor poliuretane sunt compuși organici relativ ieftini, (2) există posibilitatea de a obține produși foarte variați în funcție de materiile prime și de raportul dintre acestea, dar (3) materialele finite au o solubilitate scăzută și (4) nu au fost studiate foarte mult în domeniul de aplicabilitate ales. În ceea ce privește noutatea și originalitatea studiilor cuprinse în perioada doctorală, rezultatele obținute și raportate în reviste prestigioase au indicat obținerea unor particule polimerice ce nu au fost studiate până în momentul respectiv, a căror dimensiune poate fi ușor ajustată în funcție de încărcătura vizată. Prin metodele multidisciplinare abordate, de la simple determinări de solubilitate, pH și indice

de refracție, caracterizări spectrale, analize termice și până la teste *in vitro* și *in vivo*, prezenta teză de doctorat se constituie ca o cercetare complexă menită să întregească imaginea generală asupra unor produse polimerice deja consacrate în diverse domenii industriale. Metoda de sinteză, prietenoasă cu mediul înconjurător, bazată pe un consum redus de energie electrică și pe absența unor agenți chimici agresivi (acizi și baze tari), a fost modificată de mai multe ori astfel încât să fie diminuat aportul agenților auxiliari (surfactanți, catalizatori de reacție, inițiatori de polimerizare, extenderi de lanț etc.), să fie eliminați toți compușii cu potențial cancerigen (izocianatii aromatici), dar fără să fie afectate proprietățile vizate pentru produșii de reacție.

Partea generală a tezei descrie pe rând, în **Capitolul 1**, câteva sisteme polimerice utilizabile ca transportori de substanțe biologic active, atât naturale, cât și sintetice. Astfel, colagenul apare în tratamente autoadministrate în câteva boli oftalmice, ca hidrogeluri și respectiv sistem de eliberare a unor medicamente utilizate pentru a ținti condrocitele în repararea cartilajului. Alături de colagen în hidrogeluri se utilizează și gelatina cu ajutorul căreia s-au putut ajusta eficiența la încapsulare, densitatea sarcinii electrice și a hidrofobicității transportorului. Albumina, chitosanul și ciclodextrinele sunt alte substanțe frecvent întâlnite în studiile de specialitate. Spre deosebire de acești compuși, polimerii biodegradabili sintetici, precum polietilen-glicolul, acidul poli(lactic-co-glicolic), câteva poliamide, poli(orto-esteri) și polianhidride, se regăsesc printre compușii macromoleculari preferați în acest domeniu. Prezentarea se încheie cu un scurt istoric al poliuretanilor, structura lor chimică și date comerciale de actualitate privind domeniile lor de aplicabilitate.

Capitolul 2 descrie membranele epiteliale prezentând celulele care formează epiteliul multi-stratificat și funcțiile pe care acest țesut le îndeplinește. Se pune accent pe descrierea joncțiunii și interdependenței cu țesutul cognitiv, pe organizarea moleculară complexă, pe diferențierile care apar și pe grosimea straturilor. Cartilajul articular, un țesut nevascularizat care acoperă componentele osoase ale articulațiilor, este responsabil de mișcarea fără durere a corpului absorbind diferite șocuri. Acesta și membranele sinoviale sunt importante de studiat atunci când ținta tratamentului este durerea articulară.

Partea specială a tezei, în care se regăsesc contribuțiile personale ale doctorandului, a fost construită pe baza a patru studii prezentate pe rând în capitole distincte. Astfel, **Capitolul 3** prezintă o investigație asupra modificărilor pe care pH-ul le poate produce asupra unor soluții ce conțin structuri poliuretanice. Studiile anterioare ne-au demonstrat că în majoritatea cazurilor soluțiile apoase care conțin particulele poliuretanice sintetizate de către grupul nostru

de cercetare prezintă valori de pH situate într-un interval îngust (aproape neutru acido-bazic, 6,6-7,2) și că sunt perfecte din acest punct de vedere pentru utilizare indiferent de modul de administrare vizat. Totuși, administrarea orală, cea mai comodă, produce frecvent inactivarea multor substanțe biologice active din cauza valorilor foarte scăzute de pH ale sucului gastric și datorită prezenței activităților fermentative și populațiilor microbiene care reduc stabilitatea și absorbția unor medicamente precum sulfamidele, tetraciclina, cloramfenicolul etc. Studiul publicat de către doctorand în *Journal of Medicine and Life* în anul 2020 are la bază o probă de microstructuri poliuretane pentru care determinările inițiale au evidențiat obținerea unei suspensii coloidale mono-populaționale cu o distribuție gaussiană a dimensiunilor cuprinse între 139 și 151 nm, pH = 6,78 și potențial Zeta de +24,6 mV. Alicote de referință și de testare au fost introduse în soluții tampon de pH 3, 7 și respectiv 10 și menținute în mediul respectiv pentru o perioadă de 15 zile. Câte 1,5 mL din fiecare mediu a fost înlocuit din două în două zile cu soluția tampon aferentă și au fost măsurate modificările de dimensiune a particulelor și de încărcare electrică la suprafață utilizând un instrument de tip Zetasizer de la Cordouan Technol. (Franța). S-a observat faptul că are loc o descreștere accelerată a dimensiunii structurilor poliuretane în mediu acid (pH = 3) însoțită de o creștere a valorilor potențialului Zeta în același mediu ceea ce conduce la o stabilitate mai mare împotriva tendinței de aglomerare, fenomen frecvent întâlnit în soluții coloidale. Cunoscând deja faptul că structurile de tip polieter-uretan se degradează lent în medii ce simulează fluidele corpului, acest studiu a contribuit major în înțelegerea potențialului pe care asemenea structuri îl au ca transportori de substanțe biologice active.

Capitolul 4 indică în partea inițială rolul pe care îl are medicația antivirală în tratamentul unor infecții, un accent deosebit punându-se pe acyclovir ca substanță de bază. Acyclovirul a fost descoperit la mijlocul anilor 1970 și a condus la un Premiu Nobel pentru Medicină în 1988, acordat biochimistului și virusologului american Gertrude Belle Elion pe baza cercetărilor ei în dezvoltarea de noi medicamente. Din păcate, în timp, alături de avantajele utilizării acyclovirului în infecțiile cu virusul Herpes simplex, Herpes zoster, varicelă etc., au fost descoperite și o serie importantă de dezavantaje, dintre care amintim doar absorbția scăzută la administrare orală, reacții de hipersensibilitate locală și toxicitatea renală cu nefropatie tranzitorie. Pe lângă o serie de avantaje precum mascarea caracterului lipofil / hidrofil al agentului încapsulat și protejarea acestuia împotriva mediului extern, transportorii de substanțe biologice prezintă posibilitatea de a-și elibera treptat și țintit încărcătura. Astfel, literatura științifică prezintă multe sisteme de transport dezvoltate pentru a reduce efectele

adverse ale acyclovirului. Studiul nostru a combinat cunoștințele acumulate cu o serie de materii prime principale atent selecționate (amestec de doi izocianați alifatici: hexameten-diizocianat și izoforon-diizocianat, polietilen-glicol și 1,4-butandiol) pentru a obține un vehicul de transport cu eliberare controlată.

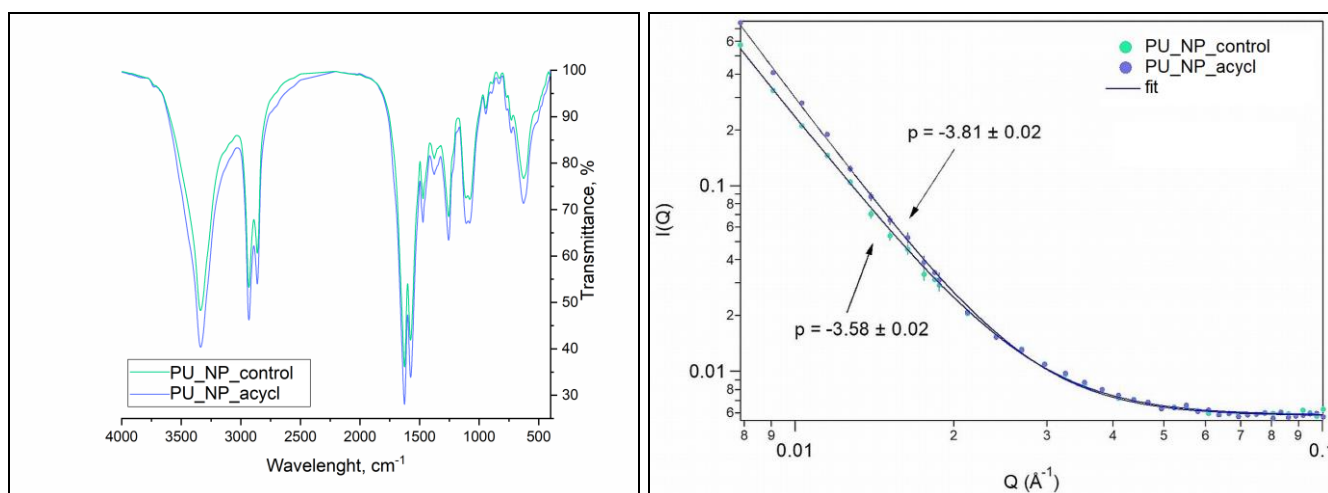


Fig. 2. Caracterizarea comparativă a probelor prin spectroscopie FT-IR și SANS

Rezultatele acestei cercetări au evidențiat obținerea unor nanoparticule poliuretane cu dimensiuni cuprinse între 78 și 91 nm, cu indici scăzuți de polidispersie, caracteristici unor probe aproape omogene, cu valori de potențial Zeta între +26 și +29 mV, foarte stabile în intervalul de temperatură investigat. Cercetarea a fost diseminată în revista *Nanomaterials* aparținând MDPI în anul 2021 (jurnal situat în prima cuartilă / a 25-a percentilă conform *Journal Citation Reports 2022*, **F.I. = 5,719**), iar analiza spectrală a indicat o eficiență la încapsulare de 78% din masa acyclovirului introdus în reacție, în timp ce eliberarea acestuia, care a fost testată într-un mediu simulat, a coincis cu profilurile caracteristice formelor farmaceutice cu eliberare prelungită și susținută. Un dezavantaj major al produsului sintetizat a fost valoarea scăzută a solubilității în mediu apos și organic a transportorului poliuretan utilizat ca vehicul pentru acyclovir.

Pe baza rezultatelor avute și în special din cauza dezavantajului constatat și enunțat anterior, studiul următor s-a îndreptat spre modificarea structurală a lanțurilor polimerice astfel încât produsele finite să prezinte valori îmbunătățite ale solubilității. Astfel, **Capitolul 5** descrie o cercetare care a stat la baza unei invenții, înregistrate la Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci la data de 23.10.2020 și pentru care autoritatea națională a eliberat Brevetul de invenție Nr. 134816 / 30.06.2023. Invenția descrie un procedeu de îmbunătățire a solubilității unui transportor de tip poliuretan, utilizabil pentru acyclovir. Față de ceea ce se cunoștea în

momentul respectiv și anume: (1) plasturii bioadezivi descriși de brevetele *EP 2136781 A1* și *US 20130303556 A1* care necesitau schimbare repetată la intervale scurte de timp, (2) implanturile polimerice din invenția *US 20100303883 A1* pentru care este nevoie de intervenția unui personal calificat și cresc riscul de infecție locală, (3) matricele lipidice descrise în *US 20160354470 A1* care aveau ca dezavantaje degradarea și eliberarea foarte rapidă a unor antibiotice, antifungice sau anti-cancerigeni, invenția colectivului nostru de cercetare s-a bazat pe un transportor de tip polieter-uretanic în ale cărui lanțuri macromoleculare s-au inserat grupări polare prin intercalarea de 2-acetoxi-1-propan-1-ol ($C_5H_{10}O_3$), respectiv 2,3-diacetoxi-propan-1-ol ($C_7H_{12}O_5$). Concluziile studiului au fost că solubilitatea a crescut de 1,5-2,0 ori în raport cu o probă de referință, în timp ce dimensiunea medie a particulelor și potențialul lor Zeta au rămas aproape neschimbate față de reper.

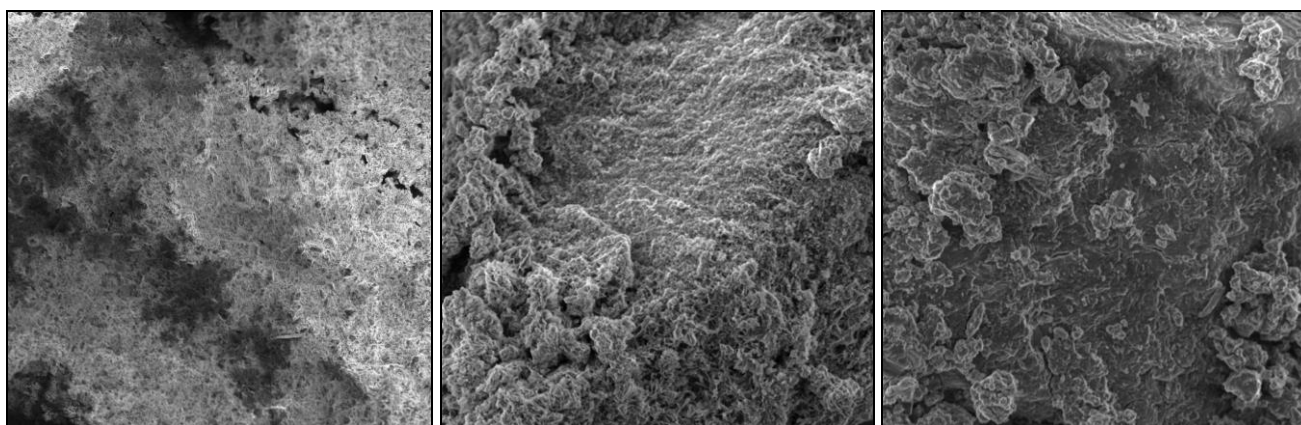


Fig. 3. Aspectul celor trei probe de transportor poliuretanice

Capitolul 6 prezintă cel mai recent studiu al echipei noastre de cercetare și se constituie ca un punct de plecare în transportul de material genetic folosind structuri poliuretanice ca vectori. Lucrarea publicată în *Journal of Functional Biomaterials* de la MDPI în toamna lui 2023 (jurnal situat în a doua cuartilă / a 50-a percentilă conform *Journal Citation Reports 2022*, **F.I. = 4,800**) descrie sinteza și caracterizarea unui transportor utilizabil pentru 2'-deoxicitidin-5'-monofosfat (dCMP), o nucleotidă ce are la bază un schelet pirimidinic și o deoxi-beta-D-ribofuranoză. Nucleotidele se leagă între ele formând lanțuri de polinucleotide care sunt segmentele unor macromolecule biologice numite acizi nucleici. Este de asemenea foarte important de menționat faptul că nucleotidele și derivații lor sunt implicați în multe procese biochimice având un rol important în metabolismul celular. Deși acești compuși sunt sintetizați în organism, în anumite condiții este necesară o aprovizionare exogenă pentru a acoperi nevoile organismului. Studiul nostru descrie sinteza și caracterizarea preliminară a

unui transportor de dCMP, cercetarea putând fi extinsă ulterior spre alți compuși care se pretează la o abordare genetică în tratamentul unor boli.

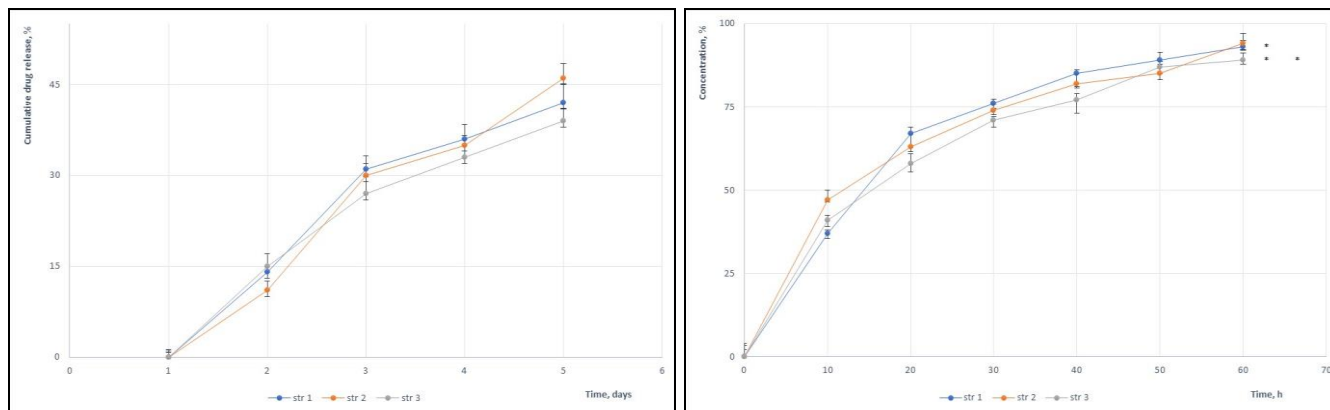


Fig. 4. Viteza de eliberare a agentului activ și de penetrabilitate printr-o membrană artificială

Rezultatele obținute indică obținerea unor structuri cu dimensiuni cuprinse între 132 și 190 nm, cu o stabilitate medie împotriva tendinței de aglomerare, demonstrată atât prin măsurători ale potențialului Zeta, dar și prin imagistică SEM. Probele s-au dovedit foarte stabile în timp, stabile într-un interval larg de temperaturi, au prezentat o eficiență la încapsularea nucleotidei de aprox. 70% și același profil de eliberare întârziată a agentului activ care a fost întâlnit și în studiile noastre precedente. În evaluări *in vivo* neinvazive în care au fost utilizate sonde profesionale de la Courage-Khazaka (Germania) pentru determinarea nivelului de eritem și hidratare a stratului cornos nu au fost observate efecte adverse pe piele de animal (șoarece de laborator) și respectiv în modele de testare *in vitro* pe cultură de fibroblaști dermici umani s-a constatat că transportorul polimeric pe bază de poliuretan conduce la o creștere a viabilității celulare, un aspect observat și prezentat anterior și de alte colective de cercetare.

Ultimul capitol al tezei de doctorat evidențiază principalele concluzii ale studiile descrise anterior. Este deosebit de important de amintit faptul că nanomaterialele și biomaterialele sunt produse de actualitate, generate de o colaborare multi-disciplinară între colectivele de cercetare ale universităților de prestigiu din lume. Succesiunea de studii prezentate în cadrul tezei respectă o înșiruire logică, un algoritm determinat de nevoia de a dezvolta transportori de substanțe biologic active care să răspundă tuturor cerințelor actuale.