# Raport stiintific privind implementarea proiectului "Plasture transdermic realizat prin metode laser pentru boli cardiovasculare" in perioada octombrie 2011 – octombrie 2014

### Obiectivele proiectului:

Obiectivul principal al acestui proiect este de a aplica o tehnologie alternativa, MAPLE (Evaporare laser pulsate asistata de o matrice) pentru a fabrica rapid si intr-un singur pas plasturi transdermici. Acesti plasturi contin substanta activa Captopril si vor fi folositi pentru tratarea hipertensiunii arteriale.

### **Objective intermediare:**

Obiectivul principal al proiectului este sustinut de obiective intermediare, ce corespund fiecarui an de implementare a proiectului:

Anul I: Experimente MAPLE pentru depunerea de filme subtiri polimerice si amestecuri de polimeri. Caracterizarea chimica si morfologica a filmelor subtiri de polimeri depuse.

Anul II: Experimente MAPLE pentru depunerea de filme subtiri polimerice ce contin substanta activa Captopril. Analiza materialelor depuse (studii morfologice, aderenta, masuratori de unghi de contact, structura chimica, determinarea variatiilor de grosime si masa, determinarea incorporarii de substanta activa).

Anul III: Teste in vivo si ex vivo.

### Introducere

Mortalitatea datorata bolilor cardiace creste dramatic cu varsta. Decesele datorate bolilor de inima ce apar inaintea varstei de 65 de ani sunt, in general, considerate decese premature care pot fi prevenite si sunt, prin urmare, de o importanta majora pentru domeniul sanatatii publice. Hipertensiunea arteriala reprezinta una din cauzele principale ale bolilor de inima, iar in ultimii ani rata de deces datorata acestei boli este in crestere. [D.L. Hoyert *et al.*, Natl. Vital Stat. Rep. **53** 1–48 (2005); J. H. Zhao *et al.* International Journal of Pharmaceutics **337:1-2**, 88-101 (2005)]

Patch-urile transdermice sunt plasturi adezivi ce contin medicamente, si care se aplica pe piele cu scopul de a elibera treptat medicamentul ce il contin, in vederea tratametului sistemic al bolii. Acest sistem terapeutic transdermic este disponibil pe piata farmaceutica inca din anul 1980. Aceasta metoda de administrare a medicamentelor ofera nenumarate avantaje, precum o eliberare controlata a medicamentelor, permite pastrarea unui echilibru la nivelul sangelui, conducand la efecte adverse reduse si, in anumite situatii, la eficacitate imbunatatita in comparatie cu alte forme de dozare. In acest sens, sistemul terapeutic transdermic are o semnificatie clinica particulara pentru prevenirea si tratamentul pe perioada lunga a bolilor cronice precum hipertensiunea arteriala. Hipertensiunea arteriala este o boala ce afecteaza o mare parte din populatia mondiala si in prezent este tratata prin administrarea orala de medicamente. Cu toate acestea, inca nu exista un sistem transdermic de eliberare controlata de medicamente (de ex. Captopril). In cazul sistemelor transdermice de eliberare controlata a medicamentelor, modul principal de actiune al acestora este chiar prin eliberarea controlata a medicamentelor cu ajutorul inglobarii lor in structuri cu proprietati speciale si controlate, acest lucru facand cruciala selectarea atat a materialelor cat si tehnicilor potrivite pentru controlul eliberarii de medicamente.

Prin acest proiect se urmareste realizarea unei noi generatii de plasturi transdermici prin folosirea unei tehnologii alternative (MAPLE) in vederea administrarii de captopril pentru prevenirea efectelor secundare ce pot aparea ca urmare a administrarii sale orale. Plasturii transdermici se bazeaza pe prelucrarea cu succes de polimeri, cele mai comune tipuri de astfel de plasturi fiind prezentate schematic in *Figura 1*.



Figura 1 Tipuri reprezentative de plasturi transdermici (S. Kandavilli et al. Pharmaceutical Technology 2002)

### Partea experimentala

### Materiale

Primul pas in vederea indeplinirii obiectivelor proiectului l-a reprezentat alegerea polimerilor ce urmeaza a fi depusi sub forma de filme subtiri prin tehnica MAPLE (Matrix Assisted Pulsed Laser Evaporation) si care urmeaza sa includa in compozitia lor medicamentul.

Principala provocare in fabricarea de sisteme eficiente transdermice de eliberare a medicamentelor este proiectarea unei matrici polimerice cu urmatoarele caracteristici:

- Biocompatibilitate;
- Compatibilitate chimica cu medicamentul ce urmeaza a fi eliberat;
- Sa ofere eliberare coerenta si eficienta a medicamentului pe tot parcursul vietii produsului;
- Sa fie sigure. [S. Kandavilli et al., Pharmaceutical Technology (2002)]

In studiile raportate in literatura, sunt prezentate sisteme terapeutice transdermice bazate pe nitredipina incorporata intr-o matrice de poliisobutilena folosind azone ca potentator de penetrare [L. P. Ruan *et al.*, J. Controll. Rel. **20**, 231-236 (1992)], precum si plasturi sensibili la presiune din materiale acrilice ce folosesc ca potentator de penetrare d-limonene [N. T. Dnyanesh *et al.*, Drug Dev. Ind. Pharm. **29**, 71-78 (2003)].

Studiile efectuate in cadrul acestui proiect au condus la selectarea urmatorilor polimeri:

- Poliisobutilena (PIB);
- Etilceluloza (EC);
- Hidroxipropil (metil)celuloza (HPMC).

Polimerii selectionati si materialele adiacente au fost achizitionate de la Sigma Aldrich (reprezentant in Romania SC Redox SRL).

i) **Poliisobutilena** este unul dintre polimerii de inters (Structura chimica este prezentata in *Figura 2*) datorita caracteristicilor chimice si fizice (hidrocarbura saturata), de

ex. coeficient de difuzie scazut. Proprietatile fizice ale acestui polimer se schimba treptat, odata cu cresterea masei moleculare.



Figura 2 Structura chimica a polimerului poliisobutilena (de la Sigma Aldrich <u>www.sigmaaldrich.com</u>).

O selectie de proprietati ale poliisobutilenei sunt prezentate in tabelul 1.

Masa moleculara	M <sub>n</sub> ~200,000 GPC/MALLS	
	M <sub>v</sub> ~420,000	
	M <sub>w</sub> ~500,000	
Indice de refractie	n20/D 1.5045	
Temperatura de tranzitie	Т <sub>g</sub> –64 °С	
Densitate	0.92 g/mL la 25 °C(lit.)	

Tabelul 1 Proprietati ale PIB (sursa Sigma Aldrich).

# ii) Etilceluloza (EC)

In *Figura 3* este prezentata structura chimica a polimerului EC, iar in tabelul de mai jos sunt prezentate caracteristicile fizice si chimice ale polimerului.



Figura 3 Structura chimica a polimerului EC.

Indice de refractie	n20/D 1.47(lit.)
Viscozitate	4 cP, 5 % in toluen/etanol 80:20 (lit.)
Temp. de tranzitie	155 °C
Densitate	1.14 g/mL la 25 °C(lit.)

# Tabelul 2 Proprietati ale EC (sursa

<u>http://www.sigmaaldrich.com/catalog/Lookup.do?N5=All&N3=mode+matchpartialmax&N4</u> =ethylcellulose&D7=0&D10=ethylcellulose&N1=S\_ID&ST=RS&N25=0&F=PR)

iii) Hidroxipropil (metil) celuloza HPMC

In *Figura 4* este prezentata structura chimica a polimerului HPMC. Una dintre cele mai importante proprietati ale acestui polimer este vascozitatea de 40-60 cP (2% in apa, la 20° C)).



Figura 4 Structura chimica a hidroxipropil(metil) celuloza (sursa <u>http://www.siqmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lanq=es&N4=H8384|SIGMA&N5=S</u> <u>EARCH\_CONCAT\_PNO|BRAND\_KEY&F=SPEC</u>)

Aplicarea unei game largi de medicamente prin plasturii transdermici este limitata de prezenta "obstacolelor" ce se gasesc in calea de penetrare a acestora prin piele. In consecinta, doza zilnica de medicament ce poate fi eliberata cu ajutorul patch-urilor transdermice este de 5-10 mg, limitand in mod evident metoda de administrare. Un efort semnificativ a fost a deci indreptat catre gasirea unei strategii necesara pentru depasirea impermeabilitatii pielii umane. [H. A. E. Benson, Current Drug Delivery **2**, 23-33 (2005)] In acest sens, se utilizeaza substante chimice care reduc temporar bariera pielii si care sunt cunoscute ca acceleratori sau potentatori ai fluxului de medicamente. Dintre aceste substante cel mai des folosite ca potentatori ai permeabilitatii pielii sunt terpenele. Terpenele se gasesc in uleiuri esentiale si sunt compusi formati din atomi de carbon, hidrogen si oxigen, dar care nu sunt aromatici. Acesti compusi sunt fost folositi ca medicamente, precum si ca arome sau condimente. In *Figura 5* este prezentata structura chimica a unei terpene ciclice, limonene.



Figura 5 Structura chimica a (R)-(+)-limonene.

Plasturii transdermici se bazeaza pe prelucrarea cu succes de polimeri sub forma de filme subtiri.

In vederea indeplinirii obiectivelor proiectului fiecare polimer a fost depus sub forma de film subtire individual. Urmatorul pas l-a reprezentat fabricarea de filme subtiri multistrat ce intra in componenta unui patch de tip matrice. In *Figura 6* este prezentata schema unui patch matrice: stratul de suport este polimerul poliisobutilena (PIB), stratul adeziv este polimerul etilceluloza (EC) iar medicamentul (Captopril (CP) vezi *Figura 7 pentru structura chimica*) este incoporat in polimerul hidroxipropil metilceluloza (HPMC) (membrana ce controleaza eliberarea medicamentului).



Figura 6 Schema unui patch transdermic de tip matrice.



Figura 7 Structura chimica a medicamentului Captopril.

### Metode

Sistemul experimental MAPLE pentru depunerea de polimeri este prezentat in Figura 8. In cadrul unei depuneri prin tehnica MAPLE, polimerii sunt dizolvati in solventii potriviti (astfel incat sa nu existe interactiuni chimice intre solvent si polimer) in concentratie de 1 – 2 wt %, iar solutia obtinuta este inghetata cu azot lichid (se va numi tinta). PIB este dizolvat in toluen, EC intr-un amestec de de toluen si etanol 80:20 wt% si HPMC in apa in concentratii de 1 % wt. Fasciculul laser generat de un laser pulsat Nd:YAG "Surelite II" (Continuum Company, 355 nm, si 266 nm lungime de unda) este focalizat pe tinta. Atunci cand acest fascicul laser iradiaza tinta, solventul se evapora, iar moleculele de polimer sunt colectate sub forma unui film subtire pe un substrat ce este plasat paralel si la mica distanta de tinta. In timpul depunerilor, fluenta laser (energie pe arie) este intre 0.08–0.5 J×cm<sup>-2</sup>. Ca substrate sunt folosite placute de Si (rigide) cat si diferite filme de Kapton, poliimida, etc. (cu diferite grosimi, de ex. 400 µm-1 mm), plasate la o distanta de 4 cm de tinta. Numarul de pulsuri laser este variat intre 6.000 si 300.000 pentru a obtine filme subtiri polimerice de diferite grosimi. Tinta este rotita in timpul depunerilor pentru a obtine o evaporare uniforma si pentru a se evita distrugerea acesteia. Temperatura in timpul depunerilor este controlata cu doua termocuple. In timpul depunerilor presiunea in camera de depunere a variat intre  $7 \times 10^{-5}$  mbar si  $2 \times 10^{-4}$  mbar, cel mai probabil datorita degazarii tintei in vid.



Figura 8 A) Schema dispozitivului experimental MAPLE; B) Imagine a sistemului MAPLE de depunere a filmelor subtiri polimerice; C) Imagine din timpul unei depuneri MAPLE.

### **Rezultate si Discutii**

Un numar mare de parametrii experimentali a fost investigat in vederea optimizarii depunerii prin MAPLE de filme subtiri de PIB, EC si HPMC: numarul de pulsuri laser, fluenta laser, lungimea de unda si concentratia de polimer in tinta. In acesta sectiune este prezentata o selectie reprezentativa a rezultatelor obtinute.

*Morfologia filmelor subtiri de PIB, EC si HPMC* a fost investigata prin AFM, microscopie optica si SEM. Calitatea suprafetelor filmelor polimerice obtinute prin depunere MAPLE depinde de fluenta laser aplicata. In *Figura 8* este prezentata o selectie de imagini AFM ce prezinta topografia suprafetelor filmelor de EC depuse la diferite fluente laser. Astfel, filmul polimeric acopera substratul pentru fluente laser mai mari 200 mJ/cm<sup>2</sup>. La fluente laser mai mici de 200 mJ/cm<sup>2</sup>, straturile depuse sunt in mare parte formate din particule si fragmente care cel mai probabil reprezinta "bucati" de polimer nedenaturat (asa cum reiese in urma investigatiei prin FTIR). Se poate afirma ca filmele depuse pe substrat, urmate de formarea de clustere 3D. De asemenea, prin AFM se poate determina rugozitatea filmelor depuse, care pentru toti polimerii s-a observat ca, creste odata cu cresterea fluentei laser. De exemplu, in cazul depunerii de PIB, rugozitatea filmelor depuse pe o arie de 40 µm × 40 µm creste de la aproximativ 40 nm pentru o fluenta laser de 100 mJ/cm<sup>2</sup> la mai mult de 150 nm pentru o fluenta laser de 700 mJ/cm<sup>2</sup>.



Figura 8 Imagini 2D ce reprezinta topografii ale suprafetelor filmelor de EC depuse prin MAPLE la lungimea de unda de 266 nm, pe substraturi de siliciu, in urma aplicarii a 9000 de pulsuri laser si la urmatoarele fluente laser A) 200 mJ/cm<sup>2</sup>; B) 300 mJ/cm<sup>2</sup>; C) 450 mJ/cm<sup>2</sup>; D) 700 mJ/cm<sup>2</sup>.

In cazul polimerului HPMC, filmele prezinta fragmente macroscopice ce pot fi detectate la microscopul optic (20X magnificare) si cea mai mare rugozitate dintre cei trei polimeri investigati (*Figura 9*).

Figura 9 A) Imagine de microscopie optica a unui film subtire de HPMC depus la o fluenta laser de 700 mJ/<sup>2</sup> pe siliciu; B) imagine AFM 2D corespunzatoare zonei accentuate din A); C) profilul liniei rosii din imaginea de AFM, ce releva depunerea de fragmente macroscopice de polimer.



Figura 10 Rugozitatea si grosimea filmelor subtiri de EC (determinata prin masuratori AFM) in functie de fluenta laser.

In plus, in *Figura 10* este prezentat un grafic al fluentei laser in functie de rugozitate (determinata prin masuratori AFM) cat si grosimea filmelor subtiri pentru polimerul EC.

In vederea investigarii structurii chimice a filmelor polimerice, pentru identificarea conditiilor experimentale pentru care pot fi obtinute filme subtiri cu structura chimica similara celei in bulk, a fost folosita tehnica FTIR. Prima concluzie ce poata fi trasa este referitoare la folosirea lungimilor de unda de 266 nm si 355 nm pentru depunerea de filme subtiri de PIB. Pentru aceasta au fost depuse filme subtiri in aceleasi conditii (aceeasi grosime de aproximativ 100 nm) la diferite fluente laser si la doua lungimi de unda (266 nm si 355 nm). In Figura 11 sunt prezentate spectrele FTIR ale filmelor subtiri de PIB depuse la diferite fluente laser, la lungimea de unda de 355 nm, iar in Tabelul 3 sunt prezentate benzile active in infrarosu si atribuirea acestora pentru PIB. Ca referinta, este prezentat de asemenea si spectrul FTIR al polimerului neiradiat. S-a observat ca benzile active in infrarosu ale filmelor subtiri de PIB depuse la 355 nm nu sunt reproduse, ceea ce conduce la concluzia ca aceasta lungime de unda nu este potrivita pentru obtinerea de filme subtiri de PIB. In plus, pentru filmele de PIB depuse la 266 nm, gama de fluente laser pentru care polimerul nu prezinta modificari structurale este intre 100 si 300 mJ/cm<sup>2</sup>. In cazul polimerului EC si HPMC, gama de fluente laser pentru care filmele subtiri sunt intacte din punct de vedere structural este mai larga, de la 120 la 700 mJ/cm<sup>2</sup> pentru HPMC, si de la 200 la 450 mJ/cm<sup>2</sup> in cazul polimerului EC.



Banda (cm <sup>-1</sup> )	Atribuire	
1365	CH <sub>3</sub> asymmetric bending	
1450, 1468	CH <sub>2</sub> scissoring	
2857	CH <sub>2</sub> symmetric stretching	
2869	CH <sub>3</sub> symmetric stretching	
2916	CH <sub>2</sub> asymmetric stretching	
2961	CH <sub>3</sub> asymmetric stretching	

Figura 11 Spectre FTIR ale filmelor subtiri de PIB depuse prin MAPLE la diferite fluente laser, la lungimea de unda de 355 nm. Tabelul 3 Benzile active in infrarosu ale polimerului PIB si atribuirea acestora.

Filmele subtiri multistrat sunt fabricate prin depunerea MAPLE succesiva de filme subtiri de PIB (primul strat), EC (al doilea strat) si HPMC (al treilea strat) cu diferite concentratii de Captopril (CP). Filmele multistrat au fost depuse pe doua tipuri de substraturi: rigide, placute de Si, si flexibile, thermanox si kapton, plasate la o distanta de 4 cm de tinta.

Avand in vedere investigatiile morfologice si structurale ce au fost realizate pentru filmele subtiri individuale, pentru *depunerea MAPLE a filmelor multistrat* s-au folosit numai conditiile experimentale pentru care filmele individuale (PIB, EC si HPMC) sunt intacte din punct de vedere structural. Astfel, conditiile experimentale in care filmele multistrat au fost depuse sunt prezentate in Tabelul 4.

Polimerul si solventul	Lungimea de unda	Fluenta [mJ/cm <sup>2</sup> ]
[wt%]	[nm]	
PIB 2% toluen 98%		180
EC 2% toluen:etanol 98%	266 nm	250
HPMC 2% apa distilata		300
98% + CP 1,3, 5,7% in		
solutia finala		

Tabelul 4 Conditiile experimentale in care au fost depuse filmele multistrat.

**Morfologia filmelor multistrat (PIB/EC/ HPMC+CP)** a fost investigata prin microscopie de forta atomica (AFM) si microscopie electronica de baleiaj (SEM). Suprafata filmelor polimerice multistrat obtinute prin depunere MAPLE prezinta caracteristici similare pentru toate concentratiile de Captopril investigate. In *Figura 12* este prezentata o selectie de imagini AFM ce prezinta topografia suprafetelor multistraturilor PIB/EC/HPMC+CP in diferite concentratii. In toate cazurile se poate observa o combinatie de pori si "insule" ce sugereaza o separare de faza. In plus, in *Figura 13* este prezentata o imagine SEM in care sunt indicati prin sageata rosie porii ce reprezinta ruta de eliberare a medicamentelor [P. Sakellariou, R.C. Rowe, International Journal of Pharmaceutics 1995].

In cadrul acestei faze de executie a proiectului am investigat filmele multistrat in sectiune transversala prin SEM. In *Figura 14* sunt prezentate doua imagini SEM in sectiune transversala ce reprezinta un bistrat PIB/EC (imaginea din stanga) si un multistrat PIB/EC/HPMC+CP 5% (imaginea din stanga). In aceste imagini nu se poate vedea o delimitare clara a celor 2 sau 3 straturi datorita indicilor de refractie similari ai celor trei polimeri (RI[PIB]= 1.50; RI[EC]= 1.47; RI[HPMC]= 1.36), insa se poate observa o crestere a grosimii straturilor prin adaugarea celui de-al treilea polimer.



Figura 12 (stanga) Imagini 2D ce reprezinta topografii ale suprafetelor filmelor multistrat PIB/EC/HPMC+CP depuse prin MAPLE. Figura 13 (dreapta) Imagine SEM ce reprezinta suprafata unui film multistrat PIB/EC/HPMC+CP 5%. Sagetile rosii indica prezenta porilor.



Figura 14 Sectiune transversala a unui film multistrat de PIB/EC (stanga) si PIB/EC/HPMC+CP5% (dreapta).

In vederea optimizarii cailor pe care se realizeaza transportul de medicamente (numarul si dimensiunea porilor) am realizat studii cu temperatura ale filmelor multistrat. In *Figura 15* este prezentat un astfel de studiu, in care filmele multistrat sunt incalzite sub temperatura de tranzitie vitroasa la 60°C si 120°C (post depunere). In urma acestor studii s-a observat ca prin cresterea temperaturii de coacere numarul de pori pe suprafata filmelor precum si dimensiunea acestora creste. Acest fenomen poate fi datorat evaporarii apei din filmele polimerice, in literatura [E. Leveugle, L. Zhigilei, JAP (2007)] raportandu-se ca in timpul depunerii MAPLE moleculele de polimer pot incorpora solvent (apa in cazul nostru). In consecinta, incalzind filmele, numarul de pori creste, creand astfel cai de acces pentru medicament sa poata fi eliberat.



Figura 15 Filme multistrat de PIB/EC/HPMC+5% CP incalzite la 60° si 120°.

Masurarea unghiuriulor de contact ale filmelor subtiri multistrat s-a realizat cu un sistem optic prevazut cu un obiectiv K2 DistaMax si picaturi de apa deionizata cu un volum de 5  $\mu$ l.

Proprietatile optice ale filmelor subtiri de EC (18KP) depuse prin MAPLE la o fluenta de 450 mJ/cm<sup>2</sup> (au fost determinate cu ajutorul spectroelipsometriei (SE), o tehnica comparativa (ce necesita un procedeu de fitare a datelor experimentale) si nedistructiva. Masuratorile experimentale au fost facute in intervalul spectral cuprins intre 500 si 1000 de nm cu un pas de 2 nm la un unghi de incidenta al fasciculului polarizat de 70<sup>°</sup>. In *Figura 16* este prezentata o astfel de analiza, impreuna cu modelul optic folosit si parametri rezultati din procesul de fitare.



Figura 16 Curbele experimentale si cele modelate ale parametrilor  $\psi$  si  $\Delta$  pentru un film subtire de EC-18Kp-450 mj depus pe siliciusi incalzit la 60<sup>°</sup> C (inset – modelul optic si parametri Cauchy rezultati).

Dependentele indicilor de refractie si ai coeficientilor de extinctie de lungimea de unda, obtinute cu ajutorul spectroelipsometriei sunt reprezentate in *Figura 17*. Pentru filme de EC (18kp) 450 mJ/cm<sup>2</sup>, indicele de refractie prezinta valori de n~1.61 dar acesta scade odata cu incalzirea filmului. Astfel, pentru o incalzire la 60<sup>0</sup> C aceastea scad usor la n~1.59 pastrand aceeasi forma a dispersiei. La o crestere a temperaturii la 120<sup>0</sup> C valorile lui n scad pana la 1.5 ( $\lambda$ =1000 nm) iar forma dispersiei este diferita de primele doua cazuri. Aceasta scadere si "stricarea" formei dispersiei ne duce la ipoteza ca filmele subtiri incep sa se degradeze la cresterea temperaturii, sau altfel spus structura polimerului se schimba, scaderea indicelui de refractie putand fi pusa pe seama aparitiei de nano-pori in film.



Figura 17 Dependetele lui n si k de lungimea de unda pentru filme subtiri de EC-18kP 450 mJ depuse pe substrat de siliciu.

Din punct de vedere al coeficientului de exctinctie si implicit al absorptiei optice schimbarile nu sunt asa drastice ca in cazul indicilor de refractie, observandu-se totusi o usoara crestere a valorilor lui K la cresterea temperaturii. Valorile se pastreaza totusi la valori de ordinul 10<sup>-2</sup>, filmele fiind practic transparente in intervalul spectral masurat.

# Evaluarea multistraturilor ca patch-uri transdermice: Studii privind absorbtia de umiditate, eroziunea si umflarea straturilor

Pentru realizarea acestor studii, filmele multristrat depuse prin MAPLE au fost taiate pentru a avea aceleasi dimensiuni de 10 mm ×10 mm si apoi au fost tinute intr-un desicator cu Si pentru 24 de ore. Dupa aceea au fost cantarite ( $W_0$ ) si plasate intr-un mediu cu clorura de sodiu avand o umiditate relativa de 75%. O data la doua zile, probele au fost cantarite pana au ajuns sa aiba o masa constanta ( $W_u$ ).

Astfel, absorbtia de umiditate (in procente) a fost calculata ca fiind cresterea masei filmelor multistrat comparata cu masa inititala ( $W_u - W_0$ ) /  $W_0$ .

Rapoartele de umflare si eroziune au fost determinate prin uscarea filmelor la 60°C peste noapte. Filmele au fost cantarite din nou ( $W_0$ ) si introduse in 5 mL apa distilata la temperatura camerei pentru 48 de ore. Dupa indepartarea excesului de apa, filmele au fost cantarite din nou ( $W_s$ ). Apoi, au fost uscate la 60±2°C peste noapte si cantarite din nou ( $W_d$ ). Raportul de umflare (in procente) a fost calculat ca cresterea masei ( $W_s - W_0$ ), iar procentajul de eroziune ca pierderea masei ( $W_0 - W_d$ ) / ( $W_0$ ).

Rezultatele obtinute au evidentiat ca atunci cand filmele au un raport de absorbtie de umiditate cat si o rata de umflare mai mare se erodeaza de asemenea mai repede si au un numar mai mare de pori (vezi *Figura 18*).

- Absorbtia de apa a condus la dizolvarea stratului de HPMC si erodarea acestuia de pe substrat, crescand astfel porozitatea filmelor.
- Aceste extra canale pot afecta eliberarea medicamentului din filme in timpul primelor etape ale eliberarii de medicamente.



Figura 18 Imagine AFM a unui film subtire de HPMC in care se poate observa formarea de pori.

**Morfologia filmelor subtiri din amestecuri de polimeri** a fost investigata prin microscopie de forta atomica (AFM). In *Figura 19* este prezentata o selectie de imagini AFM ce prezinta topografia suprafetelor straturilor amestec EC+HPMC in diferite proportii. In filmele ce contin o concentratie mai mare de EC se pot observa mai multe domenii. De asemenea, formatiunile de tip insule sunt mai mari pentru probele ce contin o concentratie mai mare de EC, ceea ce sugerea o agregare ridicata. In ceea ce priveste diametrul formatiunilor de tip insula, acesta creste de la 100~200 nm pentru 20% EC la 600~800 nm pentru 80% EC. Grosimea filmelor polimerice creste odata cu cresterea concentratiei de EC in compozitia filmului.

Filmele subtiri din amestecuri de polimeri ce contin Captopril au fost de asemenea investigate din punct de vedere morfologic. In *Figura 20* sunt prezentate imagini de AFM ce arata suprafata filmelor polimerice amestec cu diferite concentratii de Captopril obtinute prin depunere MAPLE. Accestea, prezinta caracteristici similare pentru toate concentratiile de Captopril investigate.



Figura 19 Imagini AFM ale filmelor subtiri de amestecuri de polimeri (HPMC+EC).

In vederea *investigarii structurii chimice a filmelor polimerice amestec (HPMC+EC)* cat si a celor ce contin Captopril, pentru identificarea conditiilor experimentale pentru care pot fi obtinute filme subtiri cu structura chimica intacta, a fost folosita tehnica FTIR. In *Figura 21* sunt prezentate spectrele FTIR ale filmelor subtiri amestec, iar in Tabelul 5 sunt prezentate benzile active in infrarosu si atribuirea acestora pentru cei doi polimeri. Se observa ca benzile active in infrarosu ale filmelor subtiri amestec. In plus, in *Figura 22* sunt prezentate spectrele FTIR pentru filmele amestec de polimeri ce contin diferite concentratii de Captopril. Asa cum se poate observa, pentru 10% Captopril in filme, spectrul in IR prezinta numai peak-urile ce sunt atribuite Captopril-ului (Tabelul 6).



Figura 20 Imagini AFM ale filmelor subtiri de amestecuri de polimeri cu diferite concentratii de Captopril.



*Figura 21 Spectre FTIR ale filmelor subtiri de amestecuri de polimeri depuse prin MAPLE. Tabelul 5 Benzile active in infrarosu ale polimerilor HPMC si EC si atribuirea acestora.* 



Figura 22 Spectre FTIR ale filmelor subtiri de amestecuri de polimeri ce contin Captopril in diferite concentratii depuse prin MAPLE. Tabelul 6 Benzile active in infrarosu ale medicamentului Captopril si atribuirea acestora.

Proprietatile optice ale filmelor subtiri de amestecuri de polimeri depuse prin MAPLE pe substrat de kapton au fost determinate cu ajutorul spectroelipsometriei. Masuratorile experimentale au fost facute in intervalul spectral cuprins intre 400 si 800 de nm. In *Figura 23* este prezentata o astfel de analiza, unde se poate observa cresterea transmisiei filmelor odata cu cresterea concentratiei de HPMC in film.



Figura 23 Transmisia filmelor de amestecuri de polimeri depuse prin MAPLE pe substrat de kapton.

Wettabilitatea filmelor subtiri a fost investigata prin masuratori ale unghiurilor de contact pentru filmele amestec. Prin aceste masuratori se poate determina hidrofilicitatea sau hidrofobicitatea suprafetelor filmelor, un aspect foarte important in determinarea proprietatilor biologice ale unei suprafete (aplicarea filmelor in sisteme de eliberare controlata de medicamente). In *Figura 24* sunt prezentate unghiurile de contact masurate pentru filmele subtiri realizate din amestecuri de polimeri. Se poate observa ca unghiurile de contact scad cu scaderea concentratiei de EC din film, aceasta descestere a unghiurilor de contact putand fi atribuita reducerii de grupari CH<sub>3</sub> de pe suprafata filmelor.



Figura 24 Unghiurile de contact masurate pentru filmele de amestecuri de polimeri (HPMC+EC).

Studiile de eliberarea controlata de medicamente (vezi *Figura 25*) au evidentiat faptul ca rata de eliberare a medicamentelor din filmele amestec de polimeri descreste cu cresterea concentratiei de HPMC in filme. Acest fapt poate fi atribuit umflarii polimerului, adica cresterii vascozitatii mediului, cresterii lungimii medii de difuzie a moleculelor de medicament pentru a fi eliberate in mediul de difuzie.



Figura 25 Masurarea eliberarii medicamentului Captopril in timp.

## Teste in vivo - Iritabilitate

Scopul acestui studiu a fost evaluarea iritarii cutanate pentru plasturii transdermici realizati prin MAPLE prin testul de reactivitate dermica la iepuri. Studiul a fost efectuat conform Standardului Internațional ISO 10993-10 Biological evaluation of medical devices – Part 10: Tests for irritation and skin sensitization.

La fiecare iepure s-a aplicat cate un plasture transdermic din substanta de testat/loc in cinci sau trei locuri pe o parte a fiecarui iepure, paravertebral. In mod similar, s-a aplicat transdermic cate un plasture cu substanta de control/loc in cele cinci locuri sau trei locuri de pe partea contralaterala a fiecarui iepure, paravertebral.

In conformitate cu criteriile de testare stabilite de ISO 10993-10, daca diferenta dintre media scorurilor substantei de testat si substanta de control **este mai mica sau egala cu 1**, substanta de testat este considerata ca nu are potential iritant.

Substanta Test (plasturi transdermici - PT): 7 tipuri de plasturi cu dimensiunea de 2,5/2,5 cm fiecare.

Substanta de Control (SLS/SDS): un esantion de 50 mg de Lauril Sulfat de sodium (SLS/SDS).

Specie/Tulpina: Iepuri (Oryctolagus cuniculus) /New Zeeland albinosi

Sursa: Crescătorie de animale de laborator – Institutul Național de Cercetare – Dezvoltare pentru Microbiologie și Imunologie "Cantacuzino" (INCDMI Cantacuzino), Statiunea Baneasa

Sex: Animale de acelasi sex - masculi

Interval greutate corporala: 2200 grame - 2500 grame in momentul inceperii testarii Varsta: 6 luni

Numar de animale: Trei

Reactie	Gradare	
	numerica	
ERITEM SI FORMARE DE ESCARE		
Fără eritem	0	
Ușor eritem ( abia perceptibil )	1	
Eritem bine - definit	2	
Eritem moderat	3	
Eritemul sever spre formare de escare, ce impiedica clasificarea eritemului	4	
FORMARE DE EDEM		
Fără edem	0	
Edem foarte ușor ( abia perceptibil )	1	
Edem bine – definit (marginile zonei bine definite, elevate)	2	
Edem moderat(denivelarea pielii cu aproximativ 1mm)	3	
Edem sever ( ridicat mai mult de 1 mm și se extinde dincolo de zona de expunere )	4	
Scor maxim posibil pentru iritare	8	
*Alte modificări adverse la locurile de injectare trebuie să fie înregistrate și raportate.		

### Sistemul de evaluare a reactiei cutanate

Rezultatul a fost calculat separat pentru fiecare substanta inoculata (de testare sau control). Fiecare rezultat total a fost impartit la 13 (13 puncte de observare) si s-a facut diferenta intre rezultatul de la substanta de testat si cel de la substanta de control.

## Rezultate examinare iepuri

Iepure	Test		Control			
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
1	0	0	0	4	4	4
2	0	0	0	2	2	2
3	0	0	0	1	2	2
Total	0 23		0			
Media (total/13)	0			1,76		
Diferenta	0 - 1,76 = -1,76					

## Teste in vivo – Sensibilizare

Specie/Tulpina: Guinea Pigs/Linia Dunkim-Hartley.

Sursa: Crescătorie de animale de laborator – Institutul Național de Cercetare – Dezvoltare pentru Microbiologie și Imunologie "Cantacuzino" (INCDMI Cantacuzino). Sex: Animale de acelasi sex (fie masculi, fie femele; in cazul in care se folosesc femele acestea vor fi nulipare si non-gestante).

Interval greutate corporala: 300 grame - 500 grame in momentul inceperii testarii. Varsta: tineret.

Numar de animale: Cincisprezece.

Evaluarea rezultatelor

Conform cu clasificarea Magnusson si Kligman (descrisa in ISO 10993-10).

Grade Magnusson-Kligman de  $\geq 1$  în grupul de test indică în general sensibilizare, daca animalele de control au grade<1. Dacă se observa grade $\geq 1$  la animalele de control, apoi reactiile animalele de testare care depăsesc cele mai severe reactii la animalele de control sunt considerate a fi cauzate de sensibilizare.

# Concluzii

In concluzie, se poate afirma ca obiectivele acestui proiect au fost atinse. In cadrul acestui proiect s-au obtinut urmatoarele rezultate:

- Filme subtiri de PIB, EC si HPMC cu diferite grosimi si rugozitati au fost depuse prin metoda MAPLE.
- Pentru toti trei polimerii, scazand fluenta laser rugozitatea filmelor depuse scade.
  Cele mai netede filme obtinute sunt filmele de PIB, care au rugozitate sub 70 nm, urmate de filmele de EC si in final de filmele de HPMC.
- Spectrele FTIR indica faptul ca in urma depunerii MAPLE este posibil sa se obtina filme subtiri polimerice cu structura asemanatoare celei in bulk.
- De asemenea, prin FTIR s-a demonstrat ca nu exista urme de solvent in filmele subtiri polimerice depuse prin MAPLE.
- Controlul conditiilor experimentale de depunere a filmelor multistrat (fluenta laser, temperatura de coacere, etc.) conduc la controlul asupra suprafetei filmelor, si in consecinta la controlarea profilului de eliberare a medicamentelor.
- In cazul filmelor multistrat PIB/EC/HPMC o combinatie de insule si pori a fost observata, fapt ce sugereaza o separare de faza.
- Abilitatea de a controla proprietatile morfologice si structurale ale polimerilor ce intra in componenta filmelor multistrat demonstreaza faptul ca MAPLE este o

tehnica folositoare pentru realizarea de sisteme de eliberare controlata de medicamente.

- Studiile in ceea ce priveste modificarea structurii filmelor atunci cand sunt expuse la diferite medii cat si modalitatea in care filmele elibereaza medicamente (prin difuzie) au aratat ca formarea si controlul dimensiunii porilor este foarte importanta (aceasta fiind ruta prin care medicamentele sunt eliberate).
- Rezultatele obtinute arata ca substanta testata a indeplinit criteriile ISO 10993-10 si ca nu are potential iritant.

## Activitati de diseminare

## Articole publicate

- <u>A. Palla-Papavlu,</u> L. Rusen, V. Dinca, M. Filipescu, T. Lippert, M. Dinescu, Characterization of ethylcellulose and hydroxypropyl methylcellulose thin films deposited by matrix-assisted pulsed laser evaporation, *Applied Surface Science* 302: 87-91 (2014)
- <u>A. Palla-Papavlu</u>, J. Shaw-Stewart, T. Mattle, V. Dinca, T. Lippert, A. Wokaun, M. Dinescu, Comparison of 193 nm and 308 nm laser liquid printing by shadowgraphy imaging, *Applied Surface Science* 278: 180-184 (2013)
- M. Dinescu, A. Matei, V. Dinca, <u>A. Palla-Papavlu</u>, F. Di Pietrantonio, D. Cannata, M. Benetti, E. Verona, T. Lippert, Laser processing of organic materials: applications in tissue engineering and chemical sensing, *Romanian Reports in Physics*, Vol. 65 (3), 1019–1031, (2013)

Nr.	Conferinta	Titlul si autorii	Tipul studiului
Crt.			prezentat
1.	E-MRS, Strasbourg,	Development of a polymer patch	Poster
	Franta	by matrix-assisted pulsed laser	
	14-18.05.2012	evaporation as a model of	
		transdermal sustained release	
		system, A. Palla-Papavlu, V.	
		Dinca, M. Filipescu, P. Rotaru, M.	
		Dinescu	
2.	New Materials and	Laser processing of soft	Lectie invitata
	Devices Group,	materials: An overview of	
	Polytechnic School of the	MAPLE and LIFT, A. Palla Papavlu	
	University of Sao Paulo,		
	Brazilia		
	14.06.2012		
3.	ROMOPTO, International	Application of laser based	Poster
	Conference on Optics	methods for the fabrication of	
	"Micro-to-Nano-	polymeric transdermal drug-	
	Photonics III" Bucuresti,	delivery systems incorporating	
	Romania	captopril: Morphological	
	3-6.09.2012	characterization, A. Palla	

### Participari la conferinte

		Papavlu, L. Rusen, V. Dinca, M.	
		Dinescu	
4.	ROMOPTO, International	Laser processing of soft	Lectie invitata
	Conference on Optics	materials: applications to	
	"Micro-to-Nano-	controlled drug delivery, tissue	
	Photonics III" Bucuresti,	engineering, sensing, I.A. Paun,	
	Romania	A. Matei, V.C. Dinca, A. Palla	
	3-6.09.2012	Papavlu, C. Luculescu, V. Ion, A.	
		Moldovan, T. Lippert, M. Dinescu	
5.	4th International	MAPLE and LIFT soft techniques	Lectie invitata
	Workshop: Current	for organic material processing,	
	trends and advanced	V. Dinca, A. Palla Papavlu, A.	
	ellipsometry and all x-ray	Matei, I.A. Paun, M. Dinescu	
	techniques for		
	characterization of TCO,		
	BIO, and other		
	nanostructured materials		
	12-14.09.2012		
6.	E-MRS, Strasbourg,	Development of a polymer patch	Poster
	Franta	by matrix-assisted pulsed laser	
	14-18.05.2012	evaporation as a model of	
		transdermal sustained release	
		system, A. Palla-Papavlu, V.	
		Dinca, M. Filipescu, P. Rotaru, M.	
		Dinescu	
7.	New Materials and	Laser processing of soft	Lectie invitata
	Devices Group,	materials: An overview of	
	Polytechnic School of the	MAPLE and LIFT, A. Palla Papavlu	
	University of Sao Paulo,		
	Brazilia		
	14.06.2012		
8.	ROMOPTO, International	Application of laser based	Poster
	Conference on Optics	methods for the fabrication of	
	"Micro-to-Nano-	polymeric transdermal drug-	
	Photonics III" Bucuresti,	delivery systems incorporating	
	Romania	captopril: Morphological	
	3-6.09.2012	characterization, A. Palla	
		Papavlu, L. Rusen, V. Dinca, M.	
		Dinescu	
9.	ROMOPTO, ,	Laser processing of soft	Lectie invitata
	International Conference	materials: applications to	
	on Optics "Micro-to-	controlled drug delivery, tissue	
	Nano-Photonics III"	engineering, sensing, I.A. Paun,	
	Bucuresti, Romania	A. Matei, V.C. Dinca, A. Palla	
	3-6.09.2012	Papavlu, C. Luculescu, V. Ion, A.	
		Moldovan, T. Lippert, M. Dinescu	
10.	4th International	MAPLE and LIFT soft techniques	Lectie invitata

	Workshop: Current trends and advanced ellipsometry and all x-ray techniques for characterization of TCO, BIO, and other nanostructured materials 12-14.09.2012	for organic material processing, V. Dinca, A. Palla Papavlu, A. Matei, I.A. Paun, M. Dinescu	
11.	High Power Laser Ablation HPLA/BEP, 21- 25.04.2014 Santa Fe, New Mexico, SUA	Application of laser-based methods for the fabrication of Captopril transdermal patches, A. Palla Papavlu, V. Dinca, M. Dinescu	Lectie invitata
12.	European Materials Research Society EMRS 26-30.05.2014 Lille, Franta	Fabrication of cardiovascular drug deliery systems by matrix assisted pulsed laser evaporation, A. Palla Papavlu, V. Dinca, M. Dinescu	Poster
13.	Conferinta nationala de Imunologie, 2-4.10.2014 Bucuresti	Application of laser-based methods for the fabrication of Captopril transdermal patches, A. Palla Papavlu, I. Tirca, M. Dinescu, L. Cremer, A. Calugaru, E. Vlase, C. Coman	Poster
14.	EMRS Autumn Meeting, 15-18.09.2014 Varsovia, Polonia	Laser printing of carbon nanotube networks for chemiresistor sensor applications, A. Palla Papavlu, J. Chen, A. Woakaun, T. Lippert, M. Dinescu	Prezentare orala