



ACADEMIA ROMÂNĂ

Școala de Studii Avansate a Academiei Române

Institutul de Chimie Macromoleculară „Petru Poni” din Iași

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

**MATERIALE INTELIGENTE
PE BAZĂ DE POLIMERI SENSIBILI LA STIMULI
EXTERNI CU APLICAȚII BIOMEDICALE**

CONDUCĂTOR DE DOCTORAT:

Dr. Gheorghe FUNDUEANU-CONSTANTIN

DOCTORAND,

Biol. Bogdan-Paul COȘMAN

Iași, 2023

ACADEMIA ROMÂNĂ

Institutul de Chimie Macromoleculară „Petru Poni” din Iași

Nr. 4508 / 5.X.2023

Doamnei/Domnului.....

Vă facem cunoscut faptul că în ziua de **26 octombrie 2023**, ora **12:00**, în Sala de Conferințe a Institutului de Chimie Macromoleculară „Petru Poni” Iași, va avea loc susținerea publică a tezei de doctorat „**Materiale inteligente pe bază de polimeri sensibili la stimuli externi cu aplicații biomedicale**”, autor **Coșman Bogdan-Paul**, în vederea acordării titlului științific de doctor.

PREȘEDINTE: CS I Dr. Valeria Harabagiu

Institutul de Chimie Macromoleculară „Petru Poni”, Iași

CONDUCĂTOR

ȘTIINȚIFIC: CS I Dr. Habil. Gheorghe FUNDUEANU-CONSTANTIN

Institutul de Chimie Macromoleculară „Petru Poni”, Iași

REFERENȚI: Profesor Dr. Geta David

Universitatea Tehnică „Gheorghe Asachi” din Iași

Profesor Dr. Liliana Vereștiuc

Universitatea de Medicină și Farmacie „Grigore T. Popa” din Iași

CSI Dr. Luminița Marin

Institutul de Chimie Macromoleculară „Petru Poni”, Iași

În conformitate cu Regulamentul privind organizarea și desfășurarea doctoratului pentru acordarea titlurilor științifice în Academia Română, vă trimitem rezumatul tezei de doctorat cu rugămintea de a ne comunica aprecierile și observațiile dumneavoastră. Cu această ocazie vă invităm să participați la susținerea publică a tezei de doctorat.



Director
Dr. Valeria Harabagiu

Mulțumiri

Dedicarea și perseverența reprezintă componente esențiale în elaborarea unei teze de doctorat. Toate aceste aspecte prind contur sub îndrumarea atentă a coordonatorului științific.

*Cele mai sincere mulțumiri, sentimente de recunoștință și respect se îndreaptă către dnul **Dr. Ing. Gheorghe Fundueanu-Constantin** care, cu multă răbdare, grijă și profesionalism mi-a călăuzit pașii într-un domeniu nou, captivant și plin de oportunități. Sunt profund recunoscător pentru înțelegere, sprijinul acordat și pentru sfaturile prețioase ce au contribuit la formarea mea profesională.*

*Adresez mulțumiri și aleasă recunoștință dnei **Dr. Ing. Marieta Constantin** pentru îndrumarea academică acordată, generozitate și răbdare, oferindu-mi sprijinul necesar pentru înțelegerea în profunzime a studiilor realizate.*

*Deosebite mulțumiri dnei **Dr. Ing. Sanda-Maria Bucătariu** pentru inițierea mea în tainele cercetării, pentru dăruire, susținerea nemărginită și încrederea oferită.*

*Mulțumesc membrilor comisiei de doctorat, dnei **Profesor Dr. Liliana Vereștiuc**, dnei **Profesor Dr. Geta David** și dnei **CSI Dr. Luminița Marin** pentru amabilitatea de a evalua teza de doctorat și pentru sugestiile formulate.*

*Sincere mulțumiri și sentimente de considerație se îndreaptă către **Dr. Irina Popescu**, **Dr. Dana Mihaela Suflet** și **Dr. Irina Mihaela Pelin** pentru îndrumare și sfaturile oferite.*

*Mulțumesc de asemenea dnei **Dr. Luminița Ghimici** pentru gândurile frumoase, recomandările oferite și pentru suportul acordat pe perioada stagiului de doctorat.*

*Mulțumiri dlui **Dr. Florin Bucătariu** și dnei **Tinca Bunia** pentru încurajări și sfaturile mereu bine-venite.*

*Distinse mulțumiri tuturor colegilor din cadrul **Laboratorului “Polimeri Naturali, Materiale Bioactive și Biocompatibile”** și tuturor celor din **Institutul de Chimie Macromoleculară “Petru Poni”** pentru ajutorul oferit și instruirea mea ca viitor cercetător științific.*

*Doresc să le adresez mulțumiri dnei **Dr. Maria Bercea** pentru testele reologice și colectivului din cadrul **Institutului de Biologie și Patologie Celulară “Nicolae Simionescu” din București** pentru testele de citocompatibilitate și de internalizare celulară.*

*Dragilor mei părinți, **Mihai și Florentina**, le mulțumesc enorm pentru răbdare, educația oferită, pentru susținerea necondiționată și pentru toate eforturile depuse spre a-mi îndeplini visele.*

*Mulțumiri **Academiei Române**, pentru suportul financiar acordat în perioada elaborării tezei de doctorat.*

CUPRINS

INTRODUCERE	1
PARTEA I. STUDIU DE LITERATURĂ	6
Capitolul I. STADIUL ACTUAL AL CERCETĂRII ÎN DOMENIUL POLIMERILOR INTELIGENȚI	7
I.1. Considerații generale.....	8
I.2. Sisteme de eliberare controlată a medicamentelor.....	9
I.3. Sisteme polimerice injectabile.....	11
I.4. Polimeri sensibili la stimuli externi.....	14
I.4.1. Polimeri sensibili la stimuli fizici.....	14
I.4.1.1. Polimeri sensibili la temperatură.....	14
I.4.1.2. Polimeri fotosensibili.....	17
I.4.1.3. Polimeri sensibili la câmpul magnetic.....	18
I.4.2. Polimeri sensibili la stimuli chimici.....	19
I.4.2.1. Polimeri sensibili la pH.....	19
I.4.2.1.1. Legături chimice sensibile la pH.....	21
I.4.2.1.2. Grupări ionizabile.....	23
I.4.2.2. Polimeri sensibili la potențial redox.....	27
I.4.3. Polimeri sensibili la stimuli biologici.....	28
I.4.3.1. Polimeri sensibili la glucoză.....	28
I.4.3.2. Polimeri sensibili la enzime.....	28
I.4.3.3. Polimeri sensibili la stările inflamatorii.....	29
I.5. Matrici polimerice inteligente.....	30
I.5.1. Hidrogeluri.....	30
I.5.1.1. Hidrogeluri sensibile la stimuli externi.....	32
I.5.2. Nano- și microparticule.....	34
I.5.2.1. Sinteza nano- și microparticulelor.....	35
I.5.2.2. Nano- și microparticule sensibile la stimuli externi.....	36
I.5.3. Micele.....	37
I.5.3.1. Micele sensibile la stimuli externi.....	39
I.5.4. Filme.....	41
I.5.4.1. Obținerea filmelor polimerice.....	41
I.5.4.2. Filme polimerice sensibile la stimuli externi.....	42
I.6. Concluzii.....	44
PARTEA a II-a. REZULTATE ORIGINALE	45
Capitolul II. PARTEA EXPERIMENTALĂ	46
II.1. Materiale utilizate.....	47
II.1.1. Monomeri, inițiatori și acceleratori pentru reacțiile de polimerizare.....	47
II.1.2. Polimeri.....	47
II.1.3. Agenți de reticulare.....	47
II.1.4. Reactivi și solvenți.....	47
II.1.5. Medicamente.....	48

II.1.6. Soluții tampon.....	48
II.2. Metode de sinteză.....	48
II.2.1. Sinteza copolimerilor pe bază de N-izopropilacrilamidă și vinilimidazol (P(NIPAAm-co-VI)).....	48
II.2.2. Sinteza copolimerilor pe bază de N-izopropilacrilamidă și 4-vinil piridină (P(NIPAAm-co-4-VP)).....	49
II.2.3. Sinteza copolimerilor pe bază de N-izopropilacrilamidă și hidroxietilacrilamidă (P(NIPAAm-co-HEAAm)).....	49
II.2.4. Sinteza copolimerului grefat pe bază de Poloxamer 407 și carboximetil pululan (Plx-g-CMP).....	50
II.2.4.1. Sinteza derivatului monoaminic de poloxamer (MAPlx).....	50
II.2.4.2. Sinteza carboximetil pululanului (CMP).....	50
II.2.4.3. Sinteza copolimerului grefat.....	51
II.2.5. Prepararea micro- și nanosferelor din P(NIPAAm-co-VI).....	51
II.2.6. Prepararea microsferelor din P(NIPAAm-co-4-VP).....	52
II.2.7. Prepararea hidrogelurilor convenționale PNH din P(NIPAAm-co-HEAAm).....	52
II.2.8. Prepararea rețelelor dublu reticulate DC pe bază de P(NIPAAm-co- HEAAm) și poli(metil vinil eter-co-anhidridă maleică) (PMVE/MA).....	53
II.2.9. Prepararea amestecurilor fizice apoase din Poloxamer 407 și carboximetil pululan.....	53
II.3. Analize fizico-chimice.....	53
II.3.1. Spectrometrie de rezonanță magnetică nucleară (RMN).....	53
II.3.2. Spectrometrie în infraroșu cu transformată Fourier (FT-IR).....	54
II.3.3. Spectrofotometrie UV-Viz.....	54
II.3.4. Cromatografie pe gel permeabil (GPC).....	54
II.3.5. Analiza morfologică și dimensională.....	55
II.3.6. Difuzia dinamică a luminii (DLS).....	55
II.3.7. Calorimetrie diferențială de baleiaj (DSC).....	56
II.3.8. Studii reologice.....	56
II.3.9. Măsurători potențiometrice.....	57
II.3.10. Măsurători conductimetrice.....	57
II.3.11. Măsurători de vâscozitate.....	58
II.3.12. Măsurători de densitate.....	59
II.3.13. Determinarea temperaturii de gelifiere.....	59
II.3.14. Metode specifice structurilor reticulate.....	60
II.3.14.1. Determinarea temperaturii de tranziție de volum (VPTT).....	60
II.3.14.2. Cinetici de umflare/colapsare.....	60
II.3.14.3. Determinarea porozității.....	61
II.3.14.4. Studii de includere a principiilor active.....	61
II.3.14.5. Evaluarea <i>in vitro</i> a eliberării controlate a principiilor active.....	62
II.3.14.6. Teste mecanice.....	63
II.4. Caracterizări farmacologice.....	64
II.4.1. Teste <i>in vitro</i> de citotoxicitate.....	64

II.4.1.1. Teste colorimetrice.....	64
II.4.1.2. Teste de bioluminescență.....	64
II.4.2. Internalizarea <i>in vitro</i> a nanosferelor de către celulele tumorale.....	65
II.4.3. Teste <i>in vitro</i> de hemocompatibilitate.....	65
II.4.4. Analize statistice.....	66
II.5. Tehnici de lucru.....	66
II.5.1. Purificare.....	66
II.5.2. Liofilizare.....	67
Capitolul III. MICRO- ȘI NANO-PARTICULE SENSIBILE LA pH	
ȘI TEMPERATURĂ.....	68
III.1. MICRO- ȘI NANO-SFERE DIN POLI(N-IZOPROPILACRILAMIDĂ-	
co-VINILIMIDAZOL).....	69
III.1.1. Prepararea copolimerului liniar sensibil la temperatură și pH.....	71
III.1.2. Caracterizarea fizico-chimică a copolimerului.....	72
III.1.2.1. Caracterizarea spectrală și determinarea compoziției chimice.....	72
III.1.2.2. Determinarea constantei de aciditate (pKa).....	75
III.1.2.3. Determinarea LCST.....	76
III.1.3. Prepararea micro- și nano-sferelor din P(NIPAAm-co-VI) încărcate cu doxorubicină (MS-DXR).....	77
III.1.4. Caracterizarea fizico-chimică a microsferelor.....	79
III.1.4.1. Analiza morfologică și dimensională.....	79
III.1.4.2. Înglobarea și eficiența de înglobare a doxorubicinei.....	81
III.1.4.3. Eliberarea <i>in vitro</i> a doxorubicinei din microsferes.....	82
III.1.5. Teste biologice.....	83
III.1.5.1. Citocompatibilitatea <i>in vitro</i>	83
III.1.5.2. Internalizarea celulară <i>in vitro</i>	86
III.1.5.3. Hemocompatibilitatea <i>in vitro</i>	90
III.1.5.4. Biodistribuția și hemocompatibilitatea <i>in vivo</i> a NS-DXR.....	91
III.1.6. Concluzii.....	94
III.2. MICROSFERE DIN POLI(N-IZOPROPILACRILAMIDĂ-co-	
4-VINIL PIRIDINĂ).....	96
III.2.1. Prepararea copolimerului liniar sensibil la temperatură și pH.....	97
III.2.2. Caracterizarea fizico-chimică a copolimerului.....	98
III.2.2.1. Caracterizarea spectrală și determinarea compoziției chimice.....	98
III.2.2.2. Determinarea pKa.....	101
III.2.2.3. Determinarea LCST.....	103
III.2.3. Prepararea microsferelor din P(NIPAAm-co-4-VP) încărcate cu dexametazonă.....	103
III.2.4. Caracterizarea fizico-chimică a microsferelor.....	104
III.2.4.1. Caracterizarea morfologică și dimensională.....	104
III.2.4.2. Înglobarea și eficiența de înglobare a dexametazonei.....	105
III.2.4.3. Eliberarea <i>in vitro</i> a dexametazonei din microsferes.....	108
III.2.5. Concluzii.....	113

Capitolul IV. HIDROGELURI DUBLU RETICULATE CU SENSIBILITATE LA TEMPERATURĂ ȘI pH.....	115
IV.1. Considerații generale.....	116
IV.2. Sinteza copolimerului liniar poli(N-izopropilacrilamidă-co- hidroxietilacrilamidă) P(NIPAAm-co-HEAAm).....	118
IV.2.1. Caracterizarea fizico-chimică a copolimerului.....	120
IV.2.1.1. Caracterizarea spectrală și determinarea compoziției chimice.....	120
IV.2.1.2. Determinarea LCST.....	123
IV.3. Prepararea hidrogelurilor termosensibile pe bază de P(NIPAAm-co-HEAAm)....	124
IV.4. Prepararea hidrogelurilor dublu reticulate sensibile la temperatură și pH.....	125
IV.5. Caracterizarea fizico-chimică a hidrogelurilor.....	128
IV.5.1. Caracterizarea prin spectroscopie FT-IR.....	128
IV.5.2. Analiza morfologică și determinarea porozității.....	129
IV.5.3. Determinarea temperaturii de tranziție (VPTT).....	131
IV.5.4. Cinetici de umflare/ colapsare.....	135
IV.6. Proprietăți mecanice.....	139
IV.7. Studii de înglobare și eliberare <i>in vitro</i> a metoclopramidei.....	141
IV.7.1. Înglobarea și eficiența de înglobare a metoclopramidei.....	141
IV.7.2. Eliberarea <i>in vitro</i> a metoclopramidei din hidrogeluri.....	142
IV.7.3. Mecanismul de eliberare a metoclopramidei.....	144
IV.8. Concluzii.....	146
Capitolul V. SISTEME POLIMERICE CU PROPRIETĂȚI DE GELIFIERE “IN SITU”	148
V.1. Considerații generale.....	149
V.2. TERMOGELURI PE BAZĂ DE AMESTECURI FIZICE DINTRE POLOXAMER ȘI CARBOXIMETIL PULULAN.....	152
V.2.1. Sinteza carboximetil pululanului (CMP).....	153
V.2.1.1. Caracterizarea spectrală.....	153
V.2.1.2. Determinarea gradului de substituție.....	156
V.2.2. Prepararea amestecurilor fizice din Plx și CMP.....	157
V.2.2.1. Studii de miscibilitate prin vâscozimetrie.....	157
V.2.2.2. Determinarea temperaturii de gelifiere.....	167
V.2.3. Caracterizarea termogelurilor Plx/CMP.....	168
V.2.3.1. Proprietăți mecanice.....	168
V.2.3.2. Studii reologice.....	170
V.2.3.2.1. Tranziția sol-gel.....	170
V.2.3.2.2. Cinetica de gelifiere.....	173
V.2.3.2.3. Capacitatea de auto-refacere.....	174
V.2.4. Concluzii.....	176
V.3. TERMOGELURI PE BAZĂ DE COPOLIMER POLOXAMER-g- CARBOXIMETIL PULULAN.....	178
V.3.1. Sinteza copolimerului grefat Plx-g-CMP.....	178
V.3.2. Caracterizarea fizico-chimică a copolimerului Plx-g-CMP.....	181

V.3.2.1. Caracterizarea spectrală și determinarea compoziției chimice.....	181
V.3.2.2. Determinarea masei moleculare numerice.....	185
V.3.2.3. Determinarea densității.....	186
V.3.3. Studiul proprietăților de gelifiere.....	186
V.3.3.1. Determinarea temperaturii de gelifiere.....	186
V.3.3.2. Studii reologice.....	187
V.3.3.2.1. Cinetica de gelifiere.....	187
V.3.3.2.2. Capacitatea de auto-refacere.....	191
V.3.4. Plx-g-CMP folosit ca suport pentru înglobarea/eliberarea controlată a amoxicilinei.....	193
V.3.4.1. Eliberarea <i>in vitro</i> a amoxicilinei din termogeluri.....	193
V.3.4.2. Mecanismul de eliberare a amoxicilinei.....	195
V.3.5. Concluzii.....	198
CONCLUZII GENERALE.....	199
BIBLIOGRAFIE.....	211

INTRODUCERE

Răspunsul la stimulii externi reprezintă o caracteristică fundamentală și intrinsecă a sistemelor vii, fiind crucială pentru menținerea funcțiilor normale, efectuarea unor activități complexe și combaterea bolilor.

De la organisme unicelulare la specii pluricelulare, aproape toate procesele fiziologice importante sunt reglate de semnale chimice, biologice sau fizice, inclusiv diviziunea celulară, proliferarea, diferențierea, apoptoza celulelor, precum și respirația, fotosinteza și imunoreglarea. Frecvent, aceste răspunsuri sunt însoțite de transformarea structurală a sistemelor la nivel molecular și celular până la nivel macroscopic. La nivel molecular, enzimele, canalele ionice și alte proteine de transport suferă adesea tranziții structurale care facilitează legarea de molecule mici, ioni sau alte substanțe. La nivel celular, biomembranele își modulează în mod dinamic arhitecturile prin interacțiunile cu o varietate de molecule, în special macromolecule, precum proteine, biopolimeri, etc. Aceste modificări conformaționale joacă un rol important în procesele celulare, cum ar fi exocitoza și endocitoza.

Inspirați de sistemele de organizare ale organismelor vii și de modul în care acestea reacționează la condițiile și procesele exogene fluctuante, cercetătorii au încercat să imite aceste fenomene din natură și să conceapă anumite sisteme, de regulă polimerice, care pot recunoaște anumite schimbări ale factorilor externi și reacționa prin modificări ale unor proprietăți fizico-chimice. Polimerii care au aceste proprietăți ale sistemelor vii au fost denumiți „*polimeri sensibili la stimuli externi*” sau „*polimeri inteligenți*”.

Polimerii sensibili la stimuli externi suferă modificări reversibile ale proprietăților lor fizice sau chimice ca urmare a micilor variații ale factorilor externi. De fapt, acești stimuli induc răspunsuri la scară macroscopică ale materialelor polimerice, cum ar fi umflarea, colapsarea sau tranzițiile de la soluție la gel. De asemenea, acești compuși macromoleculari pot răspunde simultan la mai mulți stimuli externi, precum pH, lumină, temperatură, tăria ionică, câmp electric, substanțele biochimice, etc. Din punct de vedere practic, o asemenea capacitate de a percepe și de a reacționa la schimbările de mediu poate fi exploatată pentru crearea unor dispozitive performante care pot îmbunătăți activitatea în diverse domenii: biomedical, industria alimentară, industria textilă, cosmetică, bioseparări și bioprocesări.

Pentru aplicațiile biomedicale, materialele polimerice inteligente pot fi obținute sub formă de hidrogeluri, filme, capsule, micro- și nano-particule, micle. Aceste formulări pot

fi folosite ca sisteme de eliberare controlată a medicamentelor, dispozitive de diagnosticare, suporturi pentru ingineria tisulară, sisteme optice, biosenzori sau sisteme microelectromecanice.

Obiectivul general al tezei de doctorat a constat în elaborarea unor sisteme inteligente de eliberare controlată a medicamentelor. Aceste formulări farmaceutice asigură eliberarea unor substanțe terapeutice în organism ori de câte ori parametri fiziologici sunt în afara limitelor normale, îmbunătățind astfel eficacitatea medicamentului prin controlul vitezei, momentului și locului de eliberare.

Este bine-cunoscut faptul că în cazul formulărilor convenționale, după administrare, concentrația principiului activ în sânge atinge foarte rapid un maxim, apoi scade la fel de rapid la o valoare la care este necesară repetarea dozei. De multe ori concentrația maximă atinge valori mai mari decât nivelul terapeutic eficient, putând chiar să depășească pragul de toxicitate. Sistemele de eliberare controlată convenționale elimină variațiile de concentrație a principiului activ din sânge și asigură un nivel terapeutic pe o perioadă îndelungată. Totuși, există un număr de situații clinice când o asemenea abordare nu este suficientă și eficientă. Acestea includ eliberarea insulinei pentru pacienții cu diabet zaharat, antiaritmicele pentru pacienți cu tulburări de ritm cardiac, inhibitori ai secreției de acid gastric pentru controlul ulcerului, nitrați pentru pacienți cu angină pectorală, ca și beta-blocanți selectivi, imunizări, chemioterapia cancerului, etc. Prin urmare, pentru a îmbunătăți complianța pacienților la terapiile deja existente este crucială conceperea și realizarea unor sisteme inovatoare iar polimerii inteligenți reprezintă cheia pentru soluționarea acestor dificultăți, în special depășirea barierelor biologice, eliberarea medicamentului doar în anumite condiții patologice și menținerea acțiunii principiului activ pentru o perioadă îndelungată de timp.

Teza este structurată în două părți: prima parte cuprinde date din literatură privind polimerii sensibili la stimuli externi, urmată de clasificarea și descrierea matricilor macromoleculare inteligente (micro- și nano-particule, hidrogeluri, micle, filme) iar partea a II-a cuprinde rezultatele originale obținute în perioada de doctorat.

Capitolul I prezintă informații generale despre polimerii sensibili la stimuli externi, clasificarea acestor compuși macromoleculari, precum și avantajele utilizării lor în domeniul biomedical.

Capitolul II cuprinde date referitoare la materialele folosite în teză, metodele de sinteză și caracterizare atât a polimerilor liniari sensibili la stimuli externi, cât și a matricilor macromoleculare inteligente obținute.

Capitolul III prezintă rezultate originale privind sinteza și caracterizarea microsferelor sensibile la pH și temperatură pe bază de copolimeri de poli(N-izopropilacrilamidă-co-vinilimidazol) P(NIPAAm-co-VI) și poli(N-izopropilacrilamidă-co-4-vinil piridină) P(NIPAAm-co-4-VP).

În **subcapitolul III.1** s-au sintetizat copolimerii liniari pe bază de NIPAAm și VI prin copolimerizarea radicalică a celor 2 co-monomeri și s-a stabilit compoziția chimică pentru care copolimerul prezintă o temperatură critică de insolubilizare (LCST, “lower critical solution temperature”) apropiată de cea a corpului uman în condiții fiziologice simulate. Acest copolimer a fost apoi folosit pentru sinteza microsferelor cu sensibilitate la pH și temperatură și încărcate cu doxorubicină. Aceste microsfele au capacitatea de a se auto-dezintegra în nanosfere monodisperse în condiții similare cu cele întâlnite în fluidele fiziologice (pH = 7,4, T = 36 °C). După administrarea intravenoasă în fluxul sanguin, nanosferele sunt stabile și eliberează o cantitate mică de medicament, dar în mediile care simulează condițiile endozomale și lizozomale (pH = 5,5 și respectiv pH = 5,0), acestea se solubilizează și eliberează întreaga cantitate de principiu activ înglobată. Nanosferele au fost testate biologic folosind două linii de celule canceroase, carcinom hepatic (HepG2) și celule ale adenocarcinomului pulmonar A549, iar datele au arătat o susceptibilitate mai mare pentru linia celulară HepG2. Prin urmare, ele pot fi utilizate ca sisteme de eliberare controlată pentru doxorubicină în tumorile hepatice.

Subcapitolul III.2 prezintă rezultate originale privind sinteza și caracterizarea microsferelor de poli(N-izopropilacrilamidă-co-4-vinil piridină). Mai întâi, a fost sintetizat polimerul liniar sensibil la pH și temperatură care a fost caracterizat fizico-chimic prin spectroscopie IR și RMN, iar valoarea pK_a a fost determinată prin titrare potențiomtrică. De asemenea, a fost determinată temperatura critică (LCST) a copolimerului. Microsfele au fost obținute din copolimerul liniar printr-o metodă originală de evaporare a solventului, iar ca medicament pentru înglobare în microsfele a fost selectat dexametazona. În urma testelor efectuate s-a constatat că aceste sisteme microparticulate încărcate cu dexametazonă sunt stabile în condiții fiziologice, dar se solubilizează rapid în condiții fiziologice simulate cu pH = 5,0, condiții specifice micromediilor tumorale și drept rezultat eliberează întreaga cantitate de medicament.

Capitolul IV prezintă rezultatele originale privind obținerea unor noi hidrogeluri dublu reticulate sensibile la temperatură și pH. Inițial, a fost sintetizat un hidrogel termosensibil convențional prin reacția de polimerizare radicalică a N-izopropilacrilamidei

cu N-hidroxiethylacrilamida în prezență de N,N'-metilenbisacrilamidă, folosită ca agent de reticulare. Apoi, structurile dublu reticulate sensibile și la pH au fost obținute din hidrogelurile convenționale preparate anterior prin imersarea acestora într-o soluție de poli(metil vinil eter-*alt*-acid maleic) (P(VME/AM)) și reticularea termică ulterioară. Ca noutate, hidrogelurile dublu reticulate au fost realizate în absența oricărui solvent organic sau agent de reticulare, ambele fiind în general toxice pentru organism. Noile matrici au fost caracterizate compozițional prin spectroscopie FT-IR, morfologic prin microscopie electronică de baleiaj și s-au studiat capacitatea de umflare și proprietățile mecanice. Metoclopramida a fost selectată ca medicament model pentru a investiga capacitatea matricii de a controla viteza de eliberare a principiului activ. Rezultatele obținute au arătat că în fluidul gastric (pH = 1,2 și T = 36 °C) hidrogelul este în stare colapsată datorită protonării grupelor carboxilice și ca urmare, difuzia medicamentului este împiedicată. În fluidul intestinal (pH = 7,4), grupele carboxilice sunt ionizate, hidrogelul se umflă și eliberează mai rapid medicamentul. În concluzie, hidrogelurile dublu reticulate sunt recomandate pentru administrarea orală a metoclopramidei sau a altor compuși similari biologic activi.

Capitolul V cuprinde rezultate originale referitoare la prepararea și caracterizarea unor noi geluri injectabile termosensibile fie pe bază de amestec fizic dintre Poloxamer 407 și carboximetil pululan (CMP), fie prin grefarea de Poloxamer 407 pe carboximetil pululan.

Subcapitolul V.1 prezintă studiul de miscibilitate în soluție apoasă dintre cele două componente polimerice (Poloxamer și CMP) și stabilirea efectului concentrației și a gradului de substituție a CMP asupra temperaturii de tranziție sol-gel, cineticii de gelificare și proprietăților mecanice ale termogelurilor obținute la 37 °C. Studiile reologice au arătat că datorită vâscozității relative scăzute, adăugarea CMP în soluția de poloxamer nu are ca efect creșterea parametrilor reologici ai termogelurilor. Scăderea temperaturii de gelificare și creșterea în duritate a gelurilor s-a observat pentru concentrații de 0,4 - 1% CMP în amestec. Gelurile au prezentat o recuperare bună a structurii chiar și după o solicitare de 1000%, gelul cu 1% CMP a prezentat o temperatură de gelificare de 26 °C și o duritate bună, acest amestec putând fi utilizat ca bază pentru o formulare de gel *in situ*, cu precădere în aplicațiile dermale.

În **subcapitolul V.2**, s-a sintetizat și caracterizat un nou copolimer sensibil la pH și temperatură prin grefarea Poloxamerului 407 pe CMP (Plx-g-CMP). Structura copolimerului grefat a fost evaluată prin spectroscopie în infraroșu cu transformată Fourier și rezonanță magnetică nucleară. Studiul efectului concentrației de copolimer asupra comportamentului

la gelifiere a fost efectuat prin teste reologice. Acestea au evidențiat o elasticitate ridicată și o excelentă capacitate a copolimerului de a-și recupera structura inițială după îndepărtarea forței aplicate sau a stimulilor externi. Mai mult, hidrogelul a prezentat o eliberare susținută a amoxicilinei (medicament model) timp de 168 de ore. Rezultatele obținute indică clar că acest copolimer poate fi utilizat ca hidrogel injectabil, în special pentru reconstrucția cartilajelor deteriorate.

La finalul tezei sunt prezentate **concluziile generale**, precum și lista cu referințele bibliografice.

OBIECTIVELE CERCETĂRII

- ☞ Obținerea unor microparticule sensibile la temperatură și pH încărcate cu doxorubicină (MS-DXR) din copolimerul liniar preformat P(NIPAAm-co-VI) prin metoda evaporării solventului pentru eliberarea medicamentului la nivelul tumorilor induse experimental de liniile celulare A549 și HepG2.
- ☞ Prepararea unor microparticule sensibile la temperatură și pH (MS-DEX) prin metoda evaporării solventului din copolimerul preformat P(NIPAAm-co-4-VP) și dexametazonă folosite ca platforme pentru eliberarea principiului activ la nivelul micromediilor tumorale.
- ☞ Sinteza unor hidrogeluri convenționale termosensibile (PNH) printr-o reacție de polimerizare radicalică a NIPAAm și HEAAm în prezența sistemului redox de inițiere KPS/TEMED.
- ☞ Obținerea unor hidrogeluri dublu reticulate sensibile la pH și temperatură (DC) din hidrogelurile convenționale (PNH) și P(MVE/MA) de diferite concentrații folosite ca matrici pentru eliberarea metoclopramidei.
- ☞ Studiul comportării unor amestecuri fizice pe bază de Poloxamer și carboximetil pululan (CMP) de diferite concentrații și cu anumite grade de substituție.
- ☞ Sinteza unui copolimer grefat sensibil la pH și temperatură printr-o reacție de cuplare dintre grupările aminice ale poloxamerului monofuncționalizat și grupările carboxilice prezente pe lanțurile de pululan utilizat ca sistem pentru eliberarea controlată de amoxicilină și ca potențială matrice pentru refacerea cartilajelor articulare.

Teza de doctorat intitulată “**Materiale inteligente pe bază de polimeri sensibili la stimuli externi cu aplicații biomedicale**” conține **250** pagini împărțite în **5** capitole ce includ **13** Tabele, **84** Figuri, **12** Scheme, **41** Ecuații și **432** referințe bibliografice.

CONTRIBUȚII PERSONALE

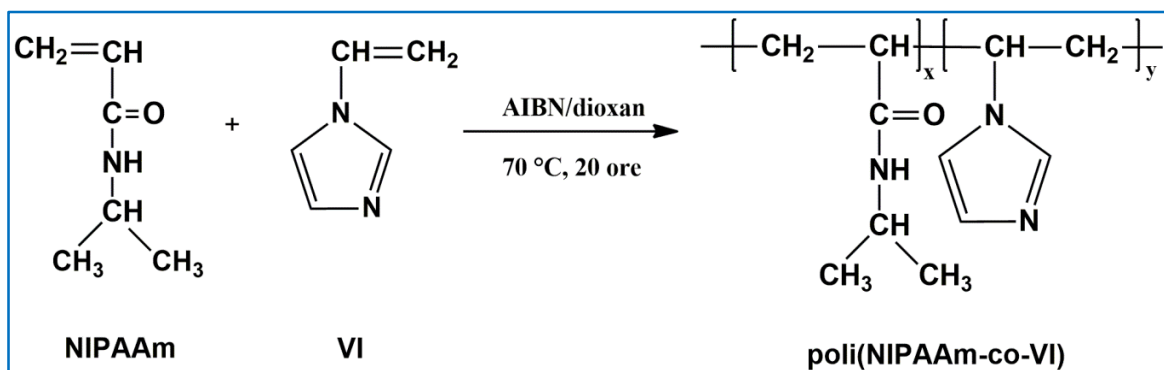
Capitolul III. MICRO- ȘI NANO-PARTICULE SENSIBILE LA pH ȘI TEMPERATURĂ

III.1. MICRO- ȘI NANO-SFERE DIN POLI(N-IZOPROPILACRILAMIDĂ-CO-VINILIMIDAZOL)

Cancerul se numără printre principalele cauze de deces la nivel mondial iar pentru tratarea acestuia cele mai folosite metode sunt chirurgia și chimioterapia, metode ce prezintă multe efecte secundare nedorite datorate neselectivității. O soluție de rezolvare a acestei probleme o constituie realizarea unor sisteme capabile să direcționeze medicamentele către o regiune anatomică specifică [1]. De-a lungul ultimelor decenii au fost concepute sisteme capabile să transporte un medicament prin fluxul sanguin, urmând ca apoi să fie eliberat datorită influenței unor stimuli externi, precum pH-ul [2], temperatura [3] sau potențialul redox [4]. Sistemele de eliberare controlată a medicamentelor cu sensibilitate la pH sunt frecvent aplicate în terapia cancerului datorită faptului că pot reacționa la modificările pH-ului din țesuturile tumorale [5,6]. În general, pH-ul extracelular al țesuturilor normale se situează în intervalul 7,2 – 7,5, în timp ce pH-ul specific tumorilor este ușor acid, fiind în intervalul 6,4 – 7,0 [7]. Celulele canceroase se comportă similar cu celulele normale în procesul de internalizare a particulelor prin endocitoză. Internalizarea lor implică trecerea de la endozomi la lizozomi unde pH-ul scade de la 6,0 - 5,5 la 5,0 [8]. Prin urmare, sistemele polimerice sensibile la pH se numără printre cele mai adecvate modele pentru conceperea unor sisteme de eliberare controlată a medicamentelor.

Pentru a obține un copolimer sensibil la temperatură și pH s-a recurs la copolimerizarea N-izopropilacrilamidei (NIPAAm) cu vinilimidazol (VI). VI a fost ales spre a fi copolimerizat cu NIPAAm deoarece conține grupări aminice care ionizează la un pH situat la limita dintre condițiile fiziologice și cele patologice. Mai mult, protonarea/deprotonarea VI modulează proprietățile termosensibile ale P(NIPAAm-co-VI) și prin urmare, solubilitatea/insolubilitatea copolimerului. În acest scop s-au sintetizat patru probe de copolimer prin polimerizarea radicalică în 1,4-dioxan a celor doi co-monomeri în prezență de N,N'- azobisisobutironitril (AIBN) ca inițiator. Reacția de copolimerizare a avut

loc la 70 °C timp de 20 de ore în atmosferă inertă de azot (**Schema 1**). S-au preparat copolimeri sensibili atât la pH, cât și temperatură prin varierea raportului molar dintre co-monomeri NIPAAm:VI (10:0; 10: 1; 10:1,5 și 10:2) în amestecul inițial de reacție. Structura chimică a copolimerului a fost confirmată prin spectrometrie RMN-¹H iar analiza spectrelor a permis determinarea compoziției chimice a acestuia (raportul molar dintre co-monomeri) (**Figura 1**).



Schema 1. Schema reacției de obținere a copolimerului P(NIPAAm-co-VI).

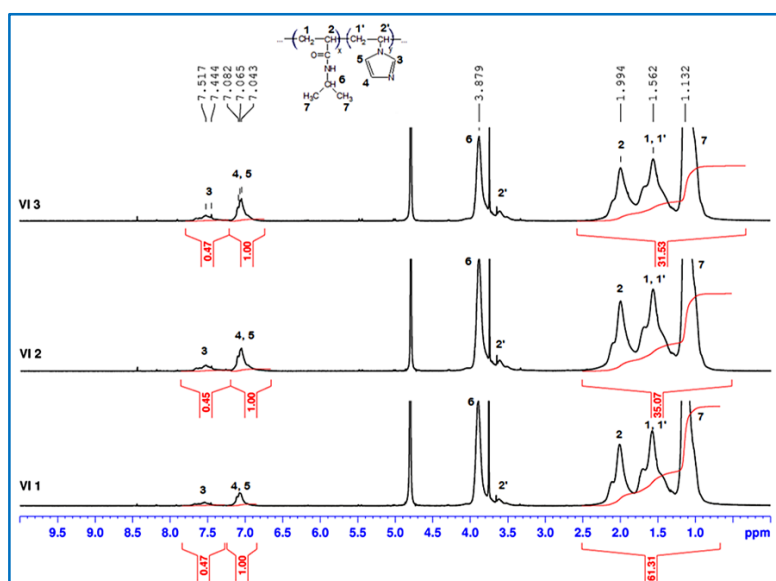


Figura 1. Spectrele RMN-¹H în D₂O ale copolimerilor P(NIPAAm-co-VI).

Raportul molar al co-monomerilor din P(NIPAAm-co-VI) a fost calculat din spectrele RMN-¹H (**Figura 1**) cu ajutorul ecuațiilor de mai jos (**Ec. (1)** și **Ec. (2)**):

$$9x+2y=A1 \quad \text{Ec. (1)}$$

$$2y=A2 \quad \text{Ec. (2)}$$

unde: **x** este fracția molară a NIPAAm și care s-a calculat ca valoarea integralei semnalului protonului metinic (**6**) iar **y** este fracția molară a VI.

Copolimerul P(NIPAAm-co-VI) a fost utilizat la obținerea **microsfereleor sensibile la pH și temperatură** încărcate cu doxorubicină (DXR) (**MS-DXR**) printr-o abordare complet nouă a metodei de evaporare a solventului. Noutatea tehnicii constă în faptul că faza continuă este reprezentată de ciclohexan, iar faza dispersată de apă. Alegerea acestui sistem

binar de solvenți a fost făcută din următoarele motive: (i) solvenții nu sunt miscibili; (ii) apa este cel mai bun solvent pentru doxorubicină (DXR); (iii) moleculele de ciclohexan care se evaporă ușor din cauza volatilității sale ridicate, antrenează molecule de apă mai puțin volatile, reducând considerabil timpul de preparare.

Microsferele au fost preparate în soluție ușor acidă. Protonarea VI duce la creșterea valorii temperaturii critice minime de insolubilizare (LCST) a soluției de copolimer și în consecință, face posibilă evaporarea apei la o temperatură mai mare fără a apărea riscul de precipitare a copolimerului termosensibil. Prin această metodă s-au obținut microsfere care prezintă în stare uscată o formă sferică (**Figura 2A**) și o suprafață rugoasă (**Figura 2B**). Prin analiza imaginilor SEM și măsurarea a cel puțin 200 de microsfere s-a ajuns la concluzia că microsferele prezintă o distribuție a dimensiunilor relativ largă având diametre cuprinse între 500 nm și 8 μm. Microsferele au fost produse dintr-o soluție apoasă folosind succesiv două viteze de emulsionare: o viteză inițială de 12.000 rpm care are ca rezultat producerea unor picături de dimensiuni nanometrice acoperite cu agentul tensioactiv, urmată de o viteză de 800 rpm care are ca rezultat coagularea acestor nanopicături în microsfere solide de dimensiuni micrometrice. Rezultă astfel microsfere formate din nanosfere agregate delimitate de surfactantul care se dezintegrează în contact cu lichidele fiziologice. Dezintegrarea are loc deoarece lecitina din soia este un surfactant foarte hidrofil, iar în medii apoase are loc pătrunderea apei în microsfere, provocând dezintegrarea acestora. Nanoparticulele rezultate (**NS-DXR**) sunt caracterizate printr-un diametru hidrodinamic de ~250 nm (**Figura 2C**), un indice de polidispersitate (PDI) de 0,2 precum și de un potențial zeta de -9,57 mV.

Procentul de DXR înglobat în microsfere este de 2,0% (g/g) iar eficiența de înglobare de 82,0%. Valorile mari pentru eficiența de înglobare erau de așteptat deoarece polimerul nu este solubil în ciclohexan iar difuzia medicamentului este limitată doar la interfața dintre cele două faze. În condiții de flux sanguin simulat (PB la pH = 7,4), valoarea LCST a P(NIPAAm-co-VI) este de 33,1 °C. Prin urmare, la temperatura corpului uman (36-37 °C) care este situată deasupra LCST, copolimerul este complet insolubil, ca și nanosferele realizate din acest copolimer, iar cantitatea de medicament eliberată este foarte mică.

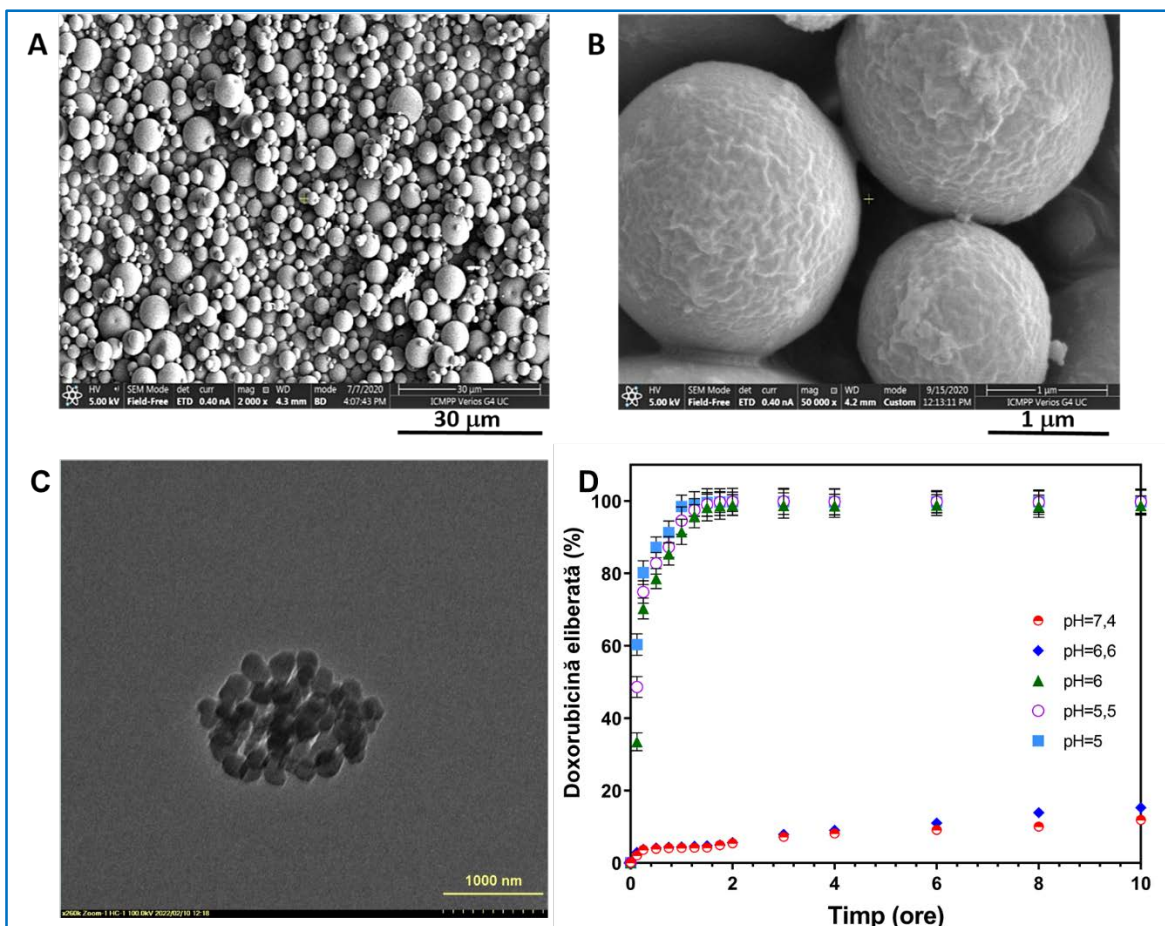


Figura 2. Microfotografiile SEM ale microsferelor din P(NIPAAm-co-VI) încărcate cu DXR (A și B); Imagine TEM a NS-DXR (C); Profilul curbelor de eliberare a doxorubicinei din NS-DXR în condiții fiziologice (PB) cu pH diferit (D).

Studiile de eliberare *in vitro* a DXR (Figura 2D) au aratat că după 2 ore, presupusă a fi perioada petrecută de nanosferele în fluxul sanguin, doar 5,43% din DXR a fost eliberată, reflectând foarte probabil fracția de medicament care se afla pe suprafața nanosferelor. În PB la pH = 6,6 valoarea LCST este de 34 °C, din nou sub temperatura corpului uman, iar profilul de eliberare a medicamentului este aproape similar cu cel la pH = 7,4. Dimpotrivă, la pH = 6,0; 5,5 și 5,0, valorile LCST sunt de 36,2; 37,7 și, respectiv, 39,7 °C, toate temperaturile critice de insolubilizare fiind situate peste temperatura corpului uman. Așadar, copolimerul și prin urmare, nanosferele se solubilizează și eliberează medicamentul într-o manieră controlată.

Teste biologice

Testele de *citocompatibilitate și de internalizare celulară* s-au realizat la Institutul de Biologie și Patologie Celulară “Nicolae Simionescu” din București în cadrul unei colaborări bilaterale. Pentru a determina citotoxicitatea *in vitro* a nanosferelor din

P(NIPAAm-co-VI) încărcate cu DXR s-au folosit testele XTT și ToxiLight™ prin expunerea celulelor HepG2 și A549 la diferite concentrații de NS, NS-DXR și DXR liberă (**Figura 3**). Ambele metode au arătat că viabilitatea celulelor HepG2 și A549 nu a fost afectată de incubarea cu nanosfere fără medicament (NS). Acest rezultat sugerează că NS sunt citocompatibile cu liniile celulare testate. În conformitate cu rezultatele testului XTT s-a obținut o susceptibilitate mai mare a nanosferelor încărcate cu doxorubicină, dar și a medicamentului liber pentru linia celulară HepG2, în comparație cu celulele A549.

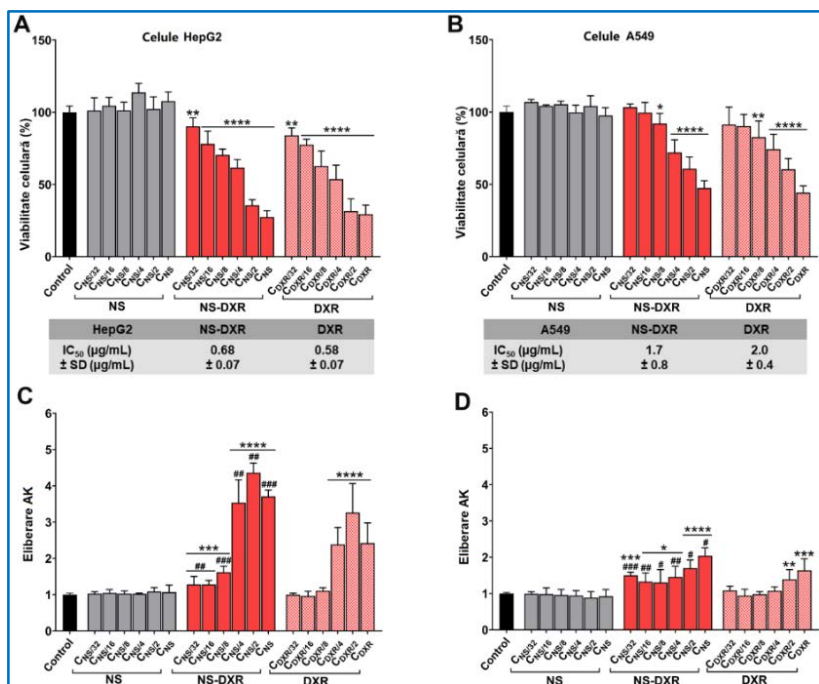


Figura 3. Viabilitatea celulelor HepG2 (**A,C**) și A549 (**B,D**) după expunerea la nanosferele simple (NS), încărcate cu DXR (NS-DXR) și DXR liberă determinată prin testele XTT (**A,B**) și ToxiLight™ (**C,D**).

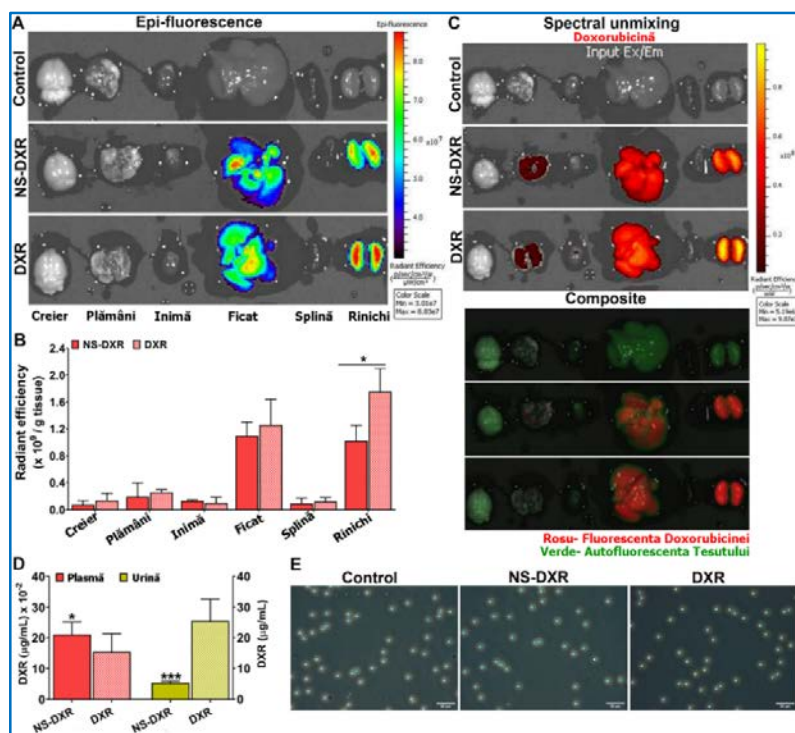
Imaginile înregistrate utilizând microscopia de fluorescență au arătat că atât NS-DXR, cât și DXR liberă au fost *internalizate de către celule* prin endocitoză într-o manieră dependentă de doză și timp. DXR a fost detectată în principal în nucleele celulelor, rezultatele fiind în concordanță cu studiile anterioare care cuprind alte sisteme de eliberare a DXR.

Ca un pas preliminar al investigării preclinice ulterioare a potențialului terapeutic al nanosferelor încărcate cu doxorubicină după administrarea intravenoasă, s-a evaluat *comportamentul hemolitic* al nanosferelor simple (NS), a celor încărcate cu doxorubicină (NS-DXR) și a medicamentului liber (DXR). Prin urmare, s-a evaluat efectul diferitelor formulări asupra integrității membranei eritrocitelor prin cuantificarea hemoglobinei eliberate din eritrocite, izolate de la șoarecii din linia C57BL6, după incubarea cu NS, NS-DXR și DXR liberă. Rezultatele au arătat că procentul de hemoliză nu a depășit 3,5%, subliniind faptul că eritrocitele nu au fost afectate de incubarea cu NS, NS-DXR și DXR. Un

prag de 5% al hemolizei produs de biomateriale este considerat acceptabil conform Organizației Internaționale pentru Standardizare (ISO) 10993 4:2017.

Localizarea NS-DXR și a DXR libere în diferite organe după injectarea retro-orbitală la șoarecii din linia C57BL/6 a fost investigată prin imagistică optică cu fluorescență pe baza proprietăților fluorescente ale doxorubicinei (**Figura 4**).

Figura 4. (A) Localizarea NS-DXR și DXR liberă în organele recoltate de la șoarecii din linia C57BL/6. (B) Cuantificarea eficienței radiante totale în organe. (C) Analiză de separare spectrală. (D) Cuantificarea DXR în plasma și urina șoarecilor la 1 oră după administrarea a 3 mg/kg de DXR liberă sau încorporată în NS-DXR. (E) Evaluarea hemo-compatibilității *in vivo* prin urmărirea agregării eritrocitelor după administrarea de NS-DXR. Scala: 50 μ m.



Datele de emisie de fluorescență arată că la 1 oră după administrare, DXR liberă cât și nanoparticulele încărcate cu medicament se acumulează la nivelul ficatului și rinichilor. De asemenea, administrarea de NS-DXR și DXR liberă nu a determinat agregarea eritrocitelor, aspectul acestora fiind asemănător cu cel al probei de control (administrarea de PB) (**Figura 4**). Prin urmare, în condiții simulate ale fluxului sanguin, microsferile sintetizate (**Figura 5A**) se dezintegrează în nanoparticule stabile monodisperse (**Figura 5B**). După interacțiunea cu o celulă tumorală, nanoparticulele sunt captate prin diferite tipuri de endocitoză (**Figura 5C**), urmând ca apoi să se realizeze internalizarea acestora prin trecerea de la endozomii timpurii la lizozomi, unde nanoparticulele se auto-dezintegrează la pH acid și eliberează doxorubicina încărcată.

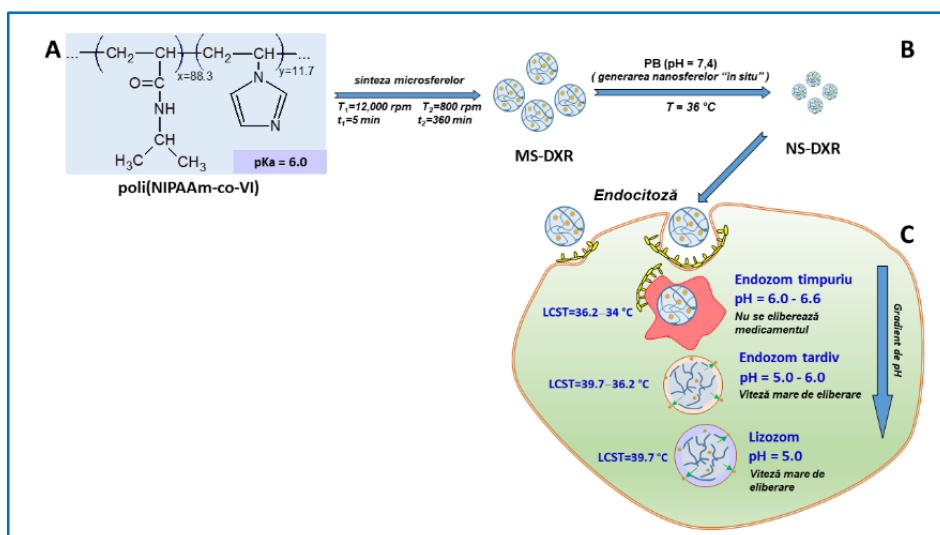


Figura 5. Reprezentarea schematică a „comportamentului” microsferelor încărcate cu DXR (MS-DXR) după imersarea în soluții fiziologice simulate și interacțiunea cu o celulă tumorală.

III.2. MICROSFERE DIN POLI(N-IZOPROPILACRILAMIDĂ-co-4-VINIL PIRIDINĂ)

O particularitate specifică formațiunilor neoplazice o constituie pH-ul relativ scăzut și temperatura crescută comparativ cu valorile fiziologice. Poli(4-vinil piridina) (P(4-VP)) este un polimer sensibil la pH ce prezintă un $pK_a = 5,46$ [9], valoare ce este adesea întâlnită în micromediul tumoral. În ceea ce privește temperatura, aceasta poate avea valori cuprinse între $37,5 - 40,5$ °C [10]. Așadar, un copolimer sensibil la pH și temperatură P(NIPAAm-co-4-VP) reprezintă candidatul ideal pentru realizarea unor dispozitive farmaceutice care să exploateze aceste mici variații ale parametrilor fiziologici în terapia cancerului [11].

Copolimerizarea NIPAAm cu monomerul hidrofil 4-VP a fost realizată printr-o reacție de polimerizare radicalică în soluție apoasă folosind ca inițiator un sistem redox format din KPS și TEMED. Reacția de polimerizare a avut loc în mediu inert de azot, la 20 °C timp de 24 ore iar pentru solubilizarea 4-VP a fost necesară acidifierea mediului de reacție cu HCl 1N [12]. S-au sintetizat 3 probe de copolimer prin varierea raportului molar dintre cei doi co-monomeri în amestecul inițial de reacție în domeniul $10:1 \div 10:2$ (Tabelul 1). Proba **VP₂** cu un conținut de 13,70% 4-VP a fost aleasă pentru experimentele ulterioare deoarece prezintă LCST la 22,1 °C în condiții fiziologice simulate (PB la pH = 7,4) ceea ce înseamnă că la temperatura de 36 °C, acest copolimer este complet insolubil. În soluție PB cu pH = 5,0, **VP₂** are un LCST de 36,8 °C, ceea ce indică faptul că devine solubil la temperatura corpului uman.

Tabelul 1. Influența raportului molar dintre co-monomeri în amestecul inițial și în copolimerul obținut asupra LCST (concentrația soluției de copolimer a fost de 1%, g/v).

Cod probă	Compoziția co-monomerilor				LCST (°C)				
	În amestecul inițial		În copolimer		H ₂ O	pH=7,4	pH=6,0	pH=5,5	pH=5,0
	10 ⁻³ M (% raport molar)		(% raport molar)						
	NIPAAm	4-VP	NIPAAm	4-VP					
VP ₀	10 (100)	0 (0)	100	0	32,6 ± 0.2	28,8 ± 0.3	30,2 ± 0.2	29,2 ± 0.2	31,2 ± 0.3
VP ₁ ^a	10 (90,9)	1 (9,1)	90,69	9,31	30,1 ± 0.3	26,8 ± 0.2	27,9 ± 0.3	28,6 ± 0.3	33,8 ± 0.1
VP ₂ ^b	10 (86,96)	1,5 (13,04)	86,30	13,70	27,8 ± 0.3	22,1 ± 0.3	23,5 ± 0.4	27,7 ± 0.3	36,8 ± 0.3
VP ₃ ^c	10 (83,33)	2 (16,67)	83,0	17,0	23,1 ± 0.2	12,4 ± 0.5	21,1 ± 0.3	24,2 ± 0.4	37,3 ± 0.4

^aMn = 10460 g/mol, Mw = 17600 g/mol, IP = 1,68; ^bMn = 9047 g/mol, Mw = 14.480 g/mol, IP = 1,60; ^cMn = 12.670 g/mol, Mw = 18.240 g/mol, IP = 1,44 (determinate prin GPC).

Microsferele de P(NIPAAm-co-4-VP) conținând dexametazonă (DEX) (**MS-DEX**) au fost sintetizate prin metoda evaporării solventului (metanol/ciclohexan) (**Figura 6**) deoarece polimerul și medicamentul sunt solubile în metanol (faza dispersă), iar metanolul nu este miscibil cu ciclohexanul (faza continuă). Prin această metodă, evaporarea progresivă a metanolului din soluția de polimer dispersată sub formă de picături lichide a permis formarea de particule solide mici pe bază de poli(NIPAAm-co-4-VP) încărcate cu medicament.

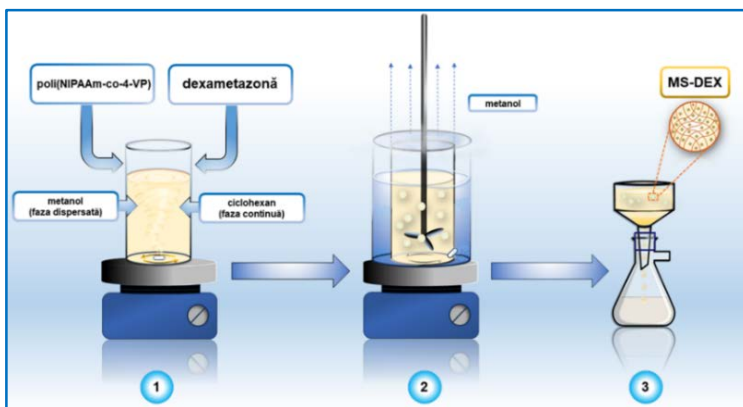
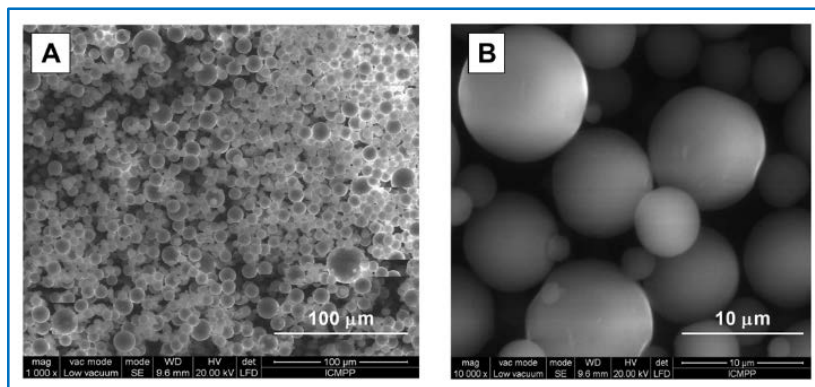


Figura 6. Reprezentare schematică pentru modul de obținere a microsferelor MS-DEX.

Analiza imaginilor SEM a evidențiat forma perfect rotundă a microsferelor în stare uscată, omogeneitatea dimensională (**Figura 7A**) și suprafața netedă a acestora (**Figura 7B**). Microsferele de poli(NIPAAm-co-4VP) cu DEX au prezentat o distribuție dimensională relativ îngustă, cu un diametru cuprins între 0,5 și 20 μm. Totuși, majoritatea microsferelor au avut dimensiuni între 4 și 10 μm.

Figura 7. Microfotografii SEM ale microsferelor de P(NIPAAm-co-4-VP) încărcate cu DEX: vedere generală (A) și detalii de suprafață (B).



Dexametazonă a fost înglobată în microsferile pe bază de P(NIPAAm-co-4-VP) în timpul sintezei particulelor, deoarece atât polimerul cât și medicamentul sunt solubile în metanol. Mai mult, metanolul este un solvent volatil și este unul dintre puținii solvenți organici nemiscibili cu ciclohexanul. Procentul de medicament înglobat în microsferă a fost 8,89% (g/g) iar eficiența de înglobare de 97,8%. Rezultatele erau previzibile întrucât polimerul și medicamentul nu sunt solubile în ciclohexan și prin urmare acestea trebuie regăsite în microparticulele uscate după evaporarea solventului.

Cu scopul de a obține informații privind gradul de dispersare a DEX în matricea polimerică a microsferelor, precum și despre interacțiunea dintre medicament și polimer, s-au realizat analize de calorimetrie diferențială de baleiaj (DSC) atât pentru microsferile cu DEX, cât și pentru DEX și respectiv, microsferile fără DEX (**Figura 8**). Termograma dexametazonei (**Figura 8(a)**) afișează un peak în jurul valorii de 270 °C care corespunde punctului de topire al medicamentului. În absența medicamentului, microsferile nu prezintă nici un peak în regiunea punctului de topire al DEX (**Figura 8(b)**) iar polimerul are o temperatură de tranziție sticloasă (T_g) de 128 °C. Pentru microsferile încărcate cu medicament, termograma este aproape similară cu cea obținută în absența DEX, dar valoarea T_g este puțin mai mare (136 °C) (**Figura 8(c)**). Lipsa punctului de topire al dexametazonei la 270 °C evidențiază *dispersarea moleculară a medicamentului în rețeaua polimerică* [13]. Creșterea T_g sugerează că legăturile de hidrogen dintre medicament și polimer sunt mai puternice decât cele dintre polimer-polimer și mai mult decât atât, DEX acționează ca un agent de reticulare slab.

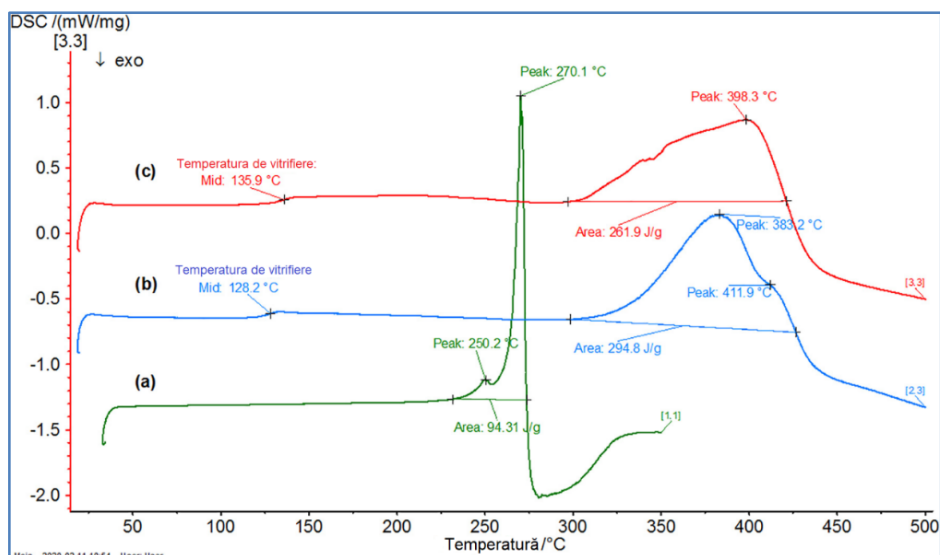
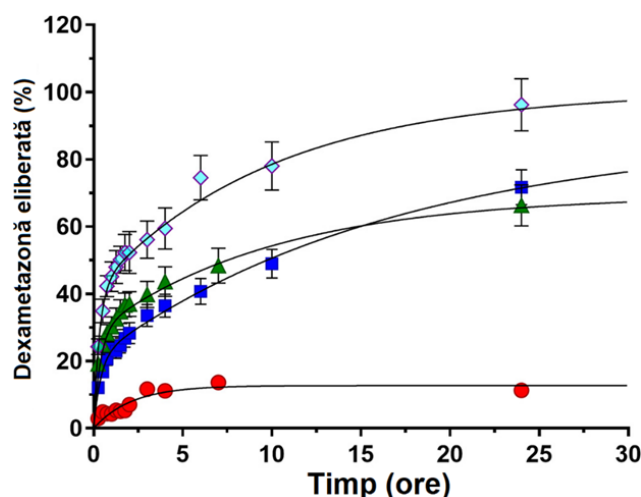


Figura 8. Termogramele DSC pentru DEX pură (a), microsfere din P(NIPAAm-co-4-VP) fără medicament (b) și microsfere încărcate cu DEX (c). Viteza de scanare: $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$.

Studiile de eliberare a DEX au fost efectuate în condiții fiziologice simulate (PB la $\text{pH} = 7,4$) deoarece microsferele cu sensibilitate la pH și temperatură circulă pentru o anumită perioadă de timp în fluxul sanguin. De asemenea, cineticile de eliberare au fost determinate la pH scăzut, simulând condițiile endozomale ($\text{pH} = 6,0 - 5,5$) și lizozomale ($\text{pH} = 5,0$), după internalizarea particulelor (Figura 9). La $\text{pH} = 7,4$, valoarea LCST a copolimerului P(NIPAAm-co-4VP) este de $22,1\text{ }^{\circ}\text{C}$. Prin urmare, la temperatura corpului uman ($36\text{ }^{\circ}\text{C}$) situată peste LCST, copolimerul este insolubil iar viteza de eliberare a medicamentului este foarte scăzută. După 2 ore, presupus a fi intervalul petrecut de microsfere în fluxul sanguin, doar 7% (g/g) din DEX a fost eliberată datorită probabil, dizolvării fracției de medicament de pe suprafața microsferelor. Dimpotrivă, la $\text{pH} = 5,0$, valoarea LCST este de $36,8\text{ }^{\circ}\text{C}$. În aceste condiții, microsferele suferă un proces de solubilizare și eliberează medicamentul. După 2 ore, în $\text{pH} = 5,0$, s-a eliberat 52% (g/g) din medicamentul încărcat după care are loc o eliberare treptată iar după 24 de ore a fost eliberată aproape întreaga cantitate a principiului activ.

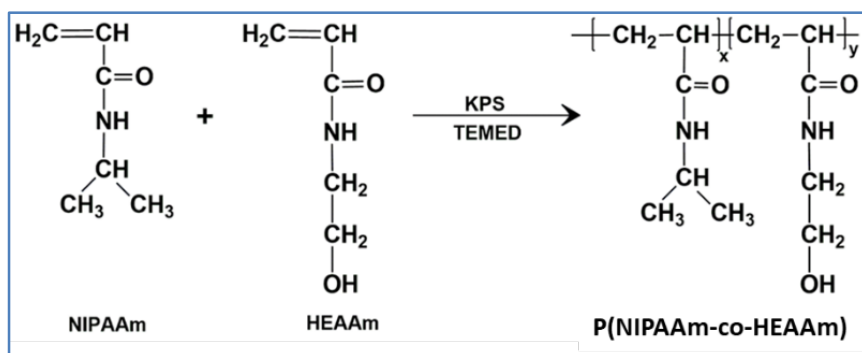
Figura 9. Profilurile curbelor de eliberare a dexametazonei din microsferele de P(NIPAAm-co-4VP) în condiții fiziologice normale (PB) la $\text{pH} = 7,4$ (cercuri) și în condiții slab acide la $\text{pH} = 6,0$ (pătrate), $5,5$ (triunghiuri) și $5,0$ (romburi).



Capitolul IV. HIDROGELURI DUBLU RETICULATE CU SENSIBILITATE LA TEMPERATURĂ ȘI pH

Hidrogelurile pe bază de polimeri inteligenți prezintă sensibilitate la mici modificări ale mediului extern prin modificări de formă sau volum. Această clasă de materiale este folosită frecvent ca suport pentru eliberarea medicamentelor deoarece prezintă biocompatibilitate ridicată [14], control spațio-temporal al eliberării medicamentului, protejează compusul bioactiv de condițiile vitrege din organism, etc. [15]. Matricea polimerică a hidrogelurilor sensibile la stimuli utilizate ca sisteme de transport de medicamente poate proteja principiile active împotriva degradării hidrolitice sau enzimatică din fluidele fiziologice cum ar fi degradarea în pH-ul scăzut din stomac [16]. Alegerea reticulantului sau reticulanților potriviți ca și ajustarea gradului lor de reticulare este una din căile care poate conduce la o îmbunătățire a proprietăților mecanice ale hidrogelurilor [17] și la o mai bună optimizare a încărcării, protejării și eliberării medicamentului [16,17].

În scopul utilizării copolimerilor pe bază de NIPAAm în domeniul biomedical se recurge la copolimerizarea NIPAAm cu monomeri hidrofilii care permit ajustarea tranziției de fază în jurul temperaturii fiziologice. Drept urmare, a fost sintetizat și caracterizat copolimerul termosensibil pe bază de NIPAAm și HEAAm, folosind diferite rapoarte molare dintre co-monomeri în amestecul de reacție inițial. Reacția de copolimerizare radicalică a celor doi co-monomeri a decurs în apă la temperatura camerei folosind ca inițiator perechea redox formată din KPS și TEMED (**Schema 2**).



Schema 2. Schema reacției de obținere a copolimerului P(NIPAAm-co-HEAAm).

Pentru a stabili care este compoziția chimică la care copolimerul prezintă o temperatură critică minimă de insolubilizare (LCST) apropiată de cea corpului uman, s-au realizat în prealabil o serie de sinteze de copolimer P(NIPAAm-co-HEAAm) în care s-a variat raportul molar dintre cei 2 co-monomeri (1:1, 2:1 și 5:1) în amestecul de reacție inițial (**Tabelul 2**). Copolimerul **H3** cu un conținut de NIPAAm de 82% (mol) și de HEAAm de 18% (mol) are un LCST de 38,3 °C, valoare situată în apropierea temperaturii corpului uman.

Tabelul 2. Compoziția co-monomerilor în amestec și în copolimer; valoarea LCST în funcție de raportul molar al co-monomerilor (concentrația soluției de copolimer a fost de 1%, g/v).

Codul probei	Compoziția co-monomerilor în				LCST (°C) în PB, pH=7,4	Randament (%)
	Amestecul de reacție		Copolimer			
	× 10 ⁻³ M (% molar)		(% molar)			
	NIPAAm	HEAAm	NIPAAm	HEAAm		
H ₁	1 (50)	1 (50)	50,77	49,23	71,1	87,4
H ₂	2 (66,66)	1 (33,33)	65,79	34,21	49,1	89,3
H ₃	5 (83,33)	1 (16,67)	81,97	18,03	38,3	92,8

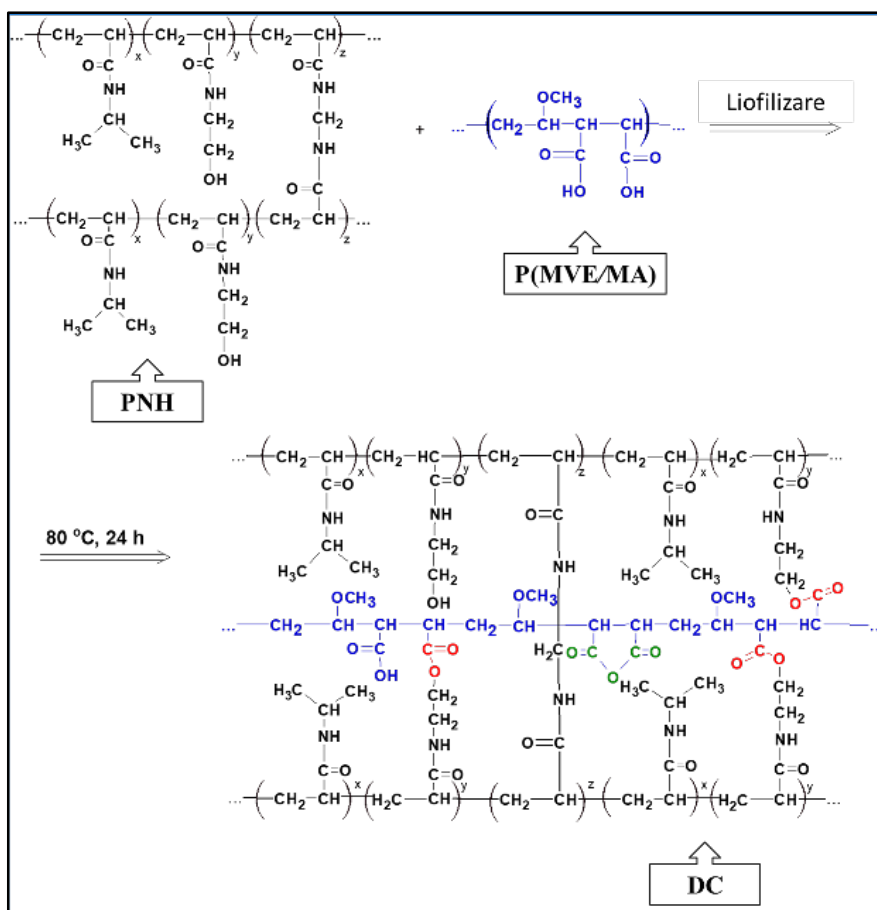
Hidrogelurile convenționale (PNH) sensibile la temperatură au fost preparate prin polimerizarea radicalică a monomerilor NIPAAm și HEAAm în apă, folosind un raport molar între co-monomeri de 5:1 și în prezența unui agent de reticulare, N,N-metilenbisacrilamida (BisAAm) (Schema 3).

Hidrogelurile dublu reticulate (DC) au fost obținute din cele convenționale prin imersarea acestora într-o soluție de poli(metil vinil eter-co-acid maleic) P(MVE/MA) de diferite concentrații (2 și 5%, g/v) (Tabelul 3), apoi hidrogelurile umflate au fost înghețate rapid cu azot lichid și liofilizate timp de 2 zile. Probele semi-interpenetrare rezultate au fost obținute sub formă cilindrică și sunt formate dintr-o primă rețea reticulată pe bază de P(NIPAAm-co-HEAAm) și o a doua rețea ne-reticulată realizată din P(MVE/MA) (Schema 3). Pentru a reticula cele două rețele polimerice, probele au fost introduse într-o etuvă cu vid la 80 °C timp de 24 de ore. La această temperatură au avut loc, datorită unor reacții de condensare, atât esterificarea dintre grupările hidroxil ale PNH-urilor și grupările carboxilice ale P(MVE/MA), cât și anhidrizarea grupărilor carboxilice ale P(MVE/MA).

Cod probă	Hidrogelurile convenționale folosite la obținerea DC	P(MVE/MA) (% , g) în	
		amestecul inițial	hidrogelul final
DC _{0.4} -P2	PNH _{0.4}	37,5	25,88
DC _{0.4} -P5	PNH _{0.4}	50	44,57
DC _{0.6} -P2	PNH _{0.6}	37,5	25,55
DC _{0.6} -P5	PNH _{0.6}	50	40,67
DC _{0.8} -P2	PNH _{0.8}	37,5	22,90
DC _{0.8} -P5	PNH _{0.8}	50	34,58

Tabelul 3. Compozițiile chimice ale amestecurilor inițiale și ale hidrogelurilor dublu reticulate.

Adăugarea de P(MVE/MA) în hidrogelurile convenționale a schimbat în mod semnificativ aspectul porilor (Figura 10). Deoarece hidrogelurile DC sunt obținute după formarea PNH-urilor, este de așteptat ca dimensiunea porilor să rămână aceeași, însă aceștia sunt umpluți diferit, în funcție de concentrația de P(MVE/MA) folosită.



Schema 3.
 Reprezentarea schematică a reacțiilor chimice implicate în obținerea hidrogelurilor dublu reticulate sensibile la pH și temperatură (DC).

Mai mult, s-a observat o întrepătrundere destul de omogenă a P(MVE/MA) în rețelele hidrogelurilor convenționale ca rezultat atât al unei bune difuzii a P(MVE/MA) în PNH cât și a unor interacțiuni intermoleculare de tipul legăturilor de hidrogen dintre P(MVE/MA) și PNH cu efect de stabilizare a rețelei de hidrogel.

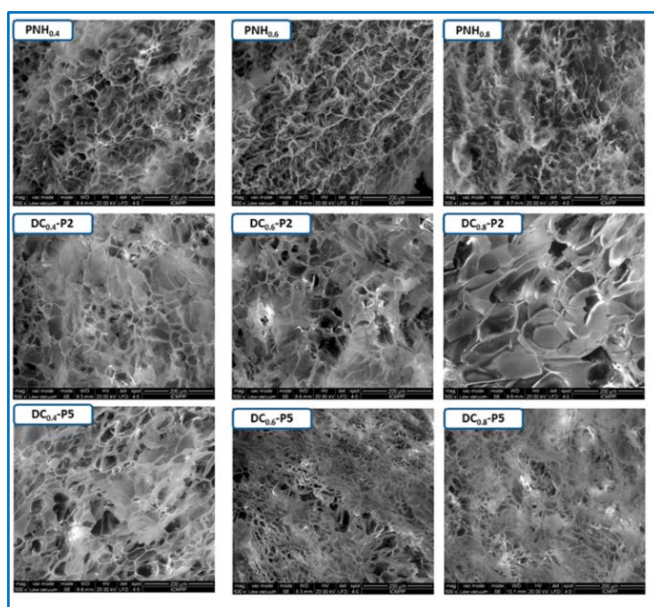


Figura 10. Fotografii SEM ale hidrogelurilor convenționale (PNH) și dublu reticulate (DC-P). Scala corespunde la 200 μ m.

Hidrogelurile dublu reticulate (**DC_{0.6-P2}** și **DC_{0.6-P5}**) obținute din cele convenționale **PNH** reticulate cu 0.6% BisAam (**PNH_{0.6}**) au fost alese pentru studiile ulterioare deoarece conțin aproximativ aceeași cantitate de P(MVE/MA) reticulată ca și **PNH_{0.4}** dar mai mare decât **PNH_{0.8}** (**Tabelul 3**).

Prezența P(MVE/MA) în hidrogelurile dublu reticulate modifică semnificativ valoarea tranziției de fază (VPTT) și influențează gradele de umflare și forma curbelor de umflare. În prezența medicamentului (Metoclopramida, **MET**) care interacționează electrostatic cu noile grupări carboxilice introduse în rețeaua hidrogelurilor dublu reticulate, se observă o scădere a valorii VPTT în PB la o valoare apropiată de temperatura fiziologică (**Figura 11**) și o alură mai abruptă a curbelor de umflare. Această comportare se datorează caracterului hidrofob imprimat hidrogelurilor de interacțiunea electrostatică a medicamentului (hidrofob) cu grupele carboxil ale acidului maleic din P(MVE/MA). În mediul acid, grupele carboxil sunt în stare protonată și hidrogelul este practic colapsat. Ca urmare, influența MET este aproape neglijabilă indiferent de concentrația folosită (1 sau 5 mg/ml) și valorile VPTT ale hidrogelurilor dublu reticulate scad la valori comparative cu cele ale PNH-urilor.

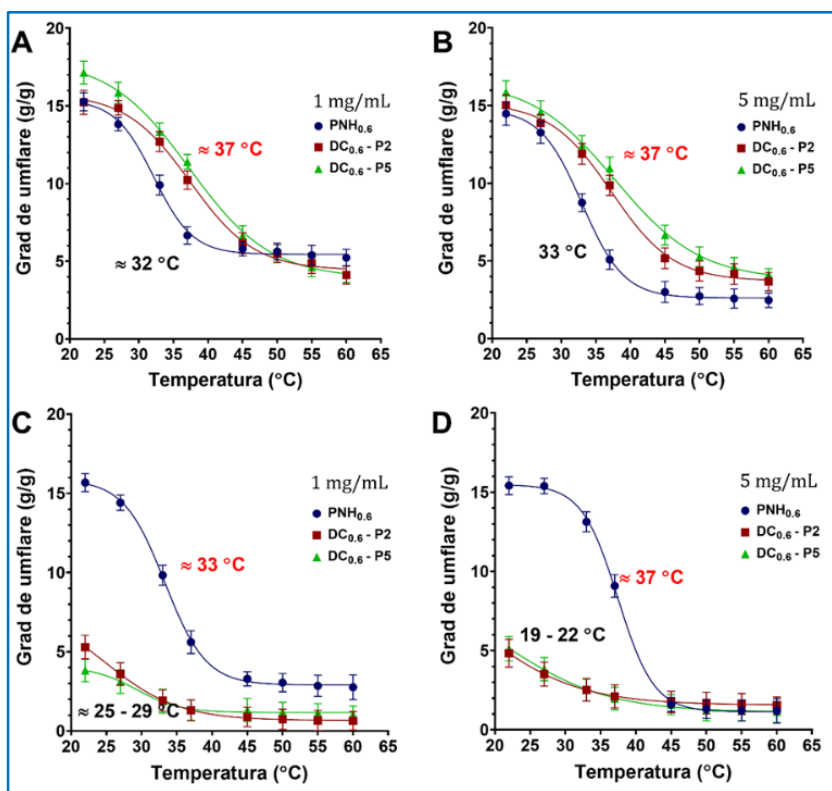


Figura 11. Reprezentarea grafică a gradelor de umflare a hidrogelurilor convenționale (PNH_{0.6}) și dublu reticulate (DC_{0.6}-P2 și DC_{0.6}-P5) în funcție de temperatură și de prezența medicamentului (MET) în diferite concentrații în PB (A,B) și ABS (C,D).

Pentru determinarea *rezistenței mecanice* a hidrogelurilor DC la compresie, acestea au fost umflate la echilibru în soluții tampon cu pH = 7,4 și pH = 1,2, simulând condițiile fiziologice. Valorile modulului elastic cresc de la 2,78 kPa pentru proba de hidrogel convențional (PNH_{0.6}) la 6,54 kPa pentru proba de hidrogel dublu reticulat (DC_{0.6}-P5) (**Figura 12**). Valorile modulului elastic al hidrogelurilor DC sunt încă scăzute spre deosebire de alte hidrogeluri dublu reticulate, acestea fiind foarte elastice. Totuși, cea mai mare valoare a rezistenței la deformare a fost observată pentru proba DC_{0.6}-P5 cu 21,32 kPa în ABS, ceea

ce este semnificativ mai mare în comparație cu $\text{PNH}_{0,6}$, ce prezintă o valoare de 4,5 kPa în același mediu. Aceste caracteristici recomandă aceste hidrogeluri ca matrici pentru ingineria tisulară sau alte aplicații biomedicale unde suporturile folosite trebuie să fie moi și flexibile, dar și suficient de rezistente la acțiunea unor forțe din exterior.

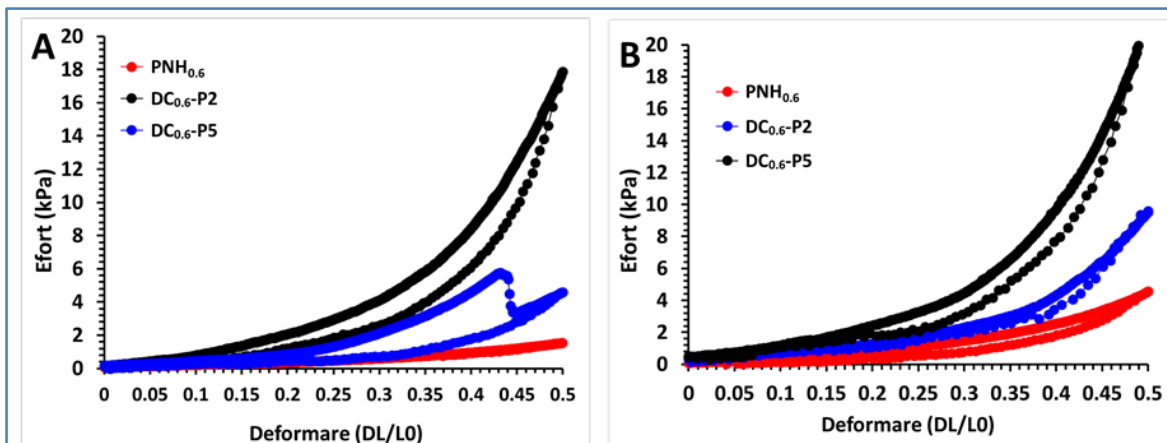


Figura 12. Curbele efort - deformare specifice hidrogelurilor convenționale și hidrogelurilor dublu reticulate în condiții fiziologice simulate: PB cu $\text{pH}=7,4$ (A) și ABS cu $\text{pH}=1,2$ (B).

Cinetica de eliberare a metoclopramidei din hidrogeluri a fost studiată în soluție tampon la $\text{pH} = 7,4$ și $\text{pH} = 1,2$, la 37°C (Figura 13). În PB, MET este eliberată mai repede din hidrogelul DC decât din PNH datorită gradului mai mare de umflare (ionizarea grupărilor carboxilice) (Figura 13A). În schimb, la $\text{pH} = 1,2$ hidrogelurile DC sunt complet protonate, rețeaua polimerică este în stare colapsată și, prin urmare, viteza de eliberare este mai mică (Figura 13B). Trebuie subliniat faptul că medicamentul este mai solubil în $\text{pH} = 1,2$ (formă clorhidrat) decât în $\text{pH}=7,4$ și, drept urmare, contribuția matricei polimerice la întârzierea eliberării medicamentului în lichidele gastrice este semnificativă.

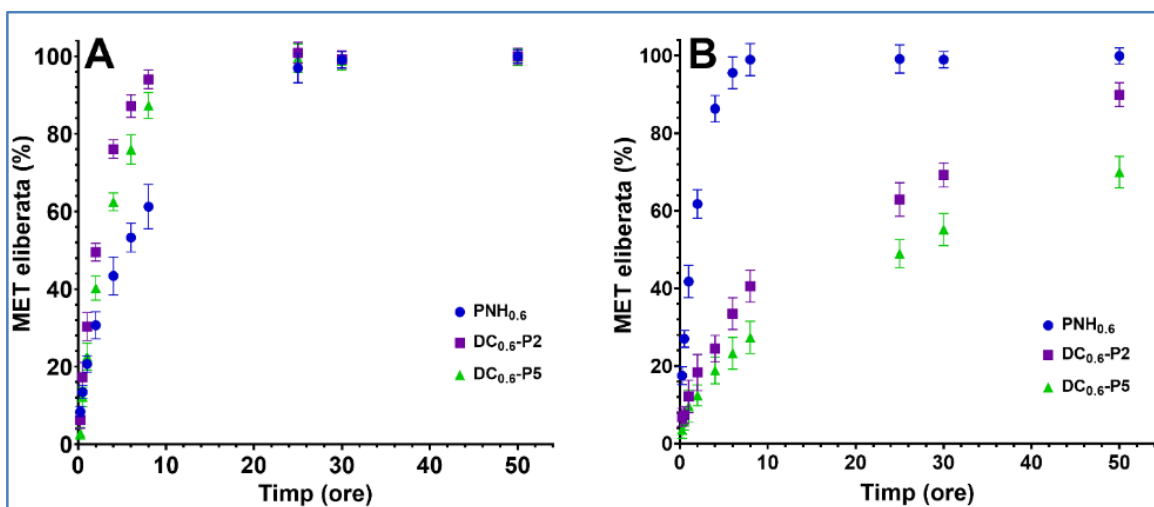


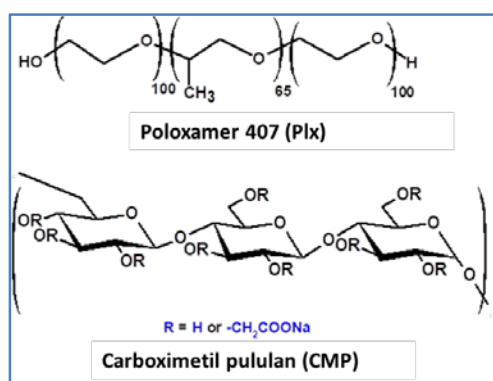
Figura 13. Cinetica de eliberare a metoclopramidei din hidrogelurile $\text{DC}_{0,6}$ în soluții tampon cu $\text{pH} = 7,4$ (A) și $\text{pH} = 1,2$ (B).

Capitolul V. SISTEME POLIMERICE CU PROPRIETĂȚI DE GELIFIERE “IN SITU”

Termogelurile sunt materiale ce se află în stare lichidă la temperatura camerei dar gelifiază în apropierea temperaturii fiziologice (36 °C) [18]. Datorită acestei proprietăți, termogelurile pot fi utilizate ca matrici injectabile pentru transportul și eliberarea unor medicamente [19,20] dar și în aplicațiile ingineriei tisulare datorită similarității cu matricea extracelulară (ECM). O primă variantă pentru obținerea sistemelor polimerice care gelifiază „in situ” o reprezintă folosirea amestecurilor fizice. Aceste sisteme pot fi obținute din Poloxamer 407 și pululan, aceste componente fiind deja studiate și evaluate ca posibile dispozitive farmaceutice pentru uz intradermal [21] sau dermal [22]. O altă variantă constă în grefarea polimerilor sintetici pe polizaharidele naturale, deoarece copolimerii rezultați cumulează avantajele celor două tipuri de polimeri, în special biocompatibilitatea necesară pentru aplicațiile care necesită interacțiunea cu țesuturile biologice [23]. Comparativ cu amestecurile fizice, copolimerii grefați pe bază Poloxamer 407 pot forma geluri reversibile cu elasticitate ridicată în medii apoase la concentrații mici de copolimer.

V.2. TERMOGELURI PE BAZĂ DE AMESTECURI FIZICE DINTRE POLOXAMER SI CARBOXIMETIL PULULAN

În capitolul actual este prezentat studiul sistemelor polimerice pe bază de amestec fizic dintre Poloxamer 407 (Plx) de concentrație 17% (g/v) și carboximetil pululan (CMP) cu trei grade de substituție diferite (CMP_{0.42}, CMP_{0.95} și CMP_{1.46}) ca potențiale matrici injectabile pentru aplicații farmaceutice sau pentru ingineria tisulară [22].



Structura chimică a celor doi polimeri care au stat la baza sintezei termogelului este prezentată în **Figura 14**.

Figura 14. Structura chimică a Poloxamerului 407 (Plx) și a carboximetil pululanului (CMP).

Amestecurile fizice au fost obținute prin adăugarea CMP în soluția stoc de Plx (17, g/g) (Plx17) sub agitare ușoară, alternativ la 4 °C și temperatura camerei (~ 23 °C). S-au preparat soluții apoase de amestec Plx17/CMP_x în care CMP a avut trei grade de substituție diferite (x = 0.42; 0,95 și 1,6) iar concentrația CMP în amestec s-a variat de la 0 la 4% (g/v).

Prima etapă a studiului a constat în determinarea miscibilității celor doi polimeri în soluție apoasă prin vâscozimetrie. Toate studiile de miscibilitate a Plx cu CMP s-au realizat în soluții apoase la 37 °C ținând cont de faptul că scopul studiului este de a obține un sistem care să *gelifieze în jurul temperaturii corpului uman*. Amestecurile fizice Plx/CMP au prezentat un comportament specific polielectroliților. Valorile parametrilor ε (abaterea de la valorile experimentale ideale ale vâscozității intrinseci $[\eta]$) și B (interacțiunea vâscometrică dintre segmentele polimerului) au evidențiat că interacțiunea dintre lanțurile Plx și CMP determină creșterea volumului hidrodinamic al unimerilor spiralați izolați sau existența unimerilor micști de CMP și Plx cu dimensiuni crescute. Această abatere este mai pronunțată pentru CMP_{0.42} în prezența unor fracții mari de Plx. În schimb, pentru fracții mari de CMP_{1.6}, abaterile de la volumul hidrodinamic ideal sunt foarte mici și au loc unele interacțiuni între cei doi polimeri.

Capacitatea de gelifiere a soluției de Plx 17% în prezența CMP_{0.95} și CMP_{1.6} a fost investigată prin două metode diferite. Într-o primă etapă, temperatura de tranziție sol-gel a fost determinată prin metoda inversării tubului [24]. Pentru determinarea $T_{\text{sol-gel}}$, soluția de amestec Plx17/CMP_x este încălzită cu 0,2 °C/min de la 20 la 40 °C și cu echilibrare la fiecare temperatură timp de 5 minute. Temperatura de gelifiere s-a considerat ca fiind momentul când soluția a devenit un gel și nu curge timp de 30 secunde după inversarea recipientului (**Figura 15**).

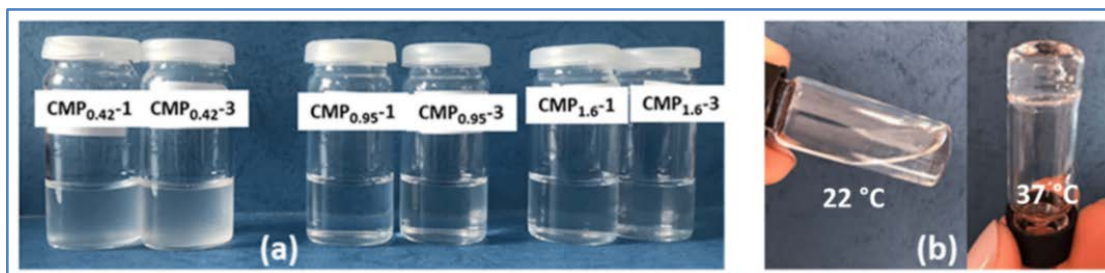
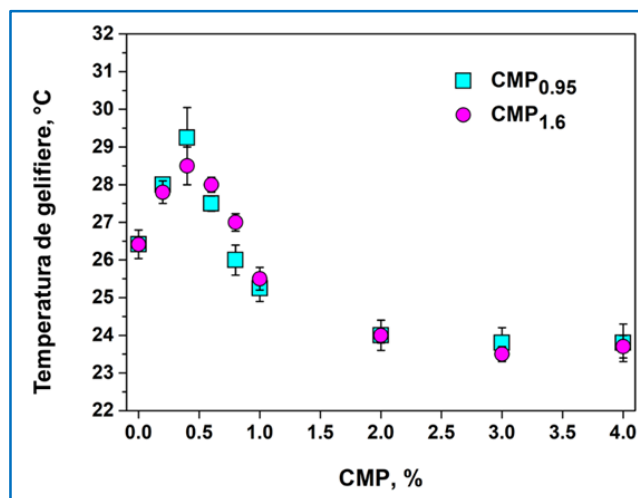


Figura 15. (a) Imagini ale soluțiilor concentrate de poloxamer (17%) în amestec cu CMP_{0.42}, CMP_{0.95} și CMP_{1.6} (de la stânga la dreapta) la temperatura camerei. (b) Ilustrare a gelifierii amestecului fizic Plx17 cu 1% (g/g) CMP_{0.95} prin metoda de inversare a tubului.

S-a observat o creștere a temperaturii de gelifiere cu un maxim determinat la 29,5 °C în prezența concentrațiilor scăzute de polielectrolit (sub 0,5%) (**Figura 16**). După cum era de așteptat, creșterea în continuare a concentrației de CMP are ca efect reducerea temperaturii de gelifiere [25]. Mai mult, la 5% CMP în amestecul Plx/CMP s-a format un gel foarte moale care prezintă proprietăți de curgere iar temperatura de gelifiere nu a putut fi măsurată prin metoda inversării tubului. Acest comportament ar putea fi explicat prin vâscozitatea modestă

a CMP datorită masei sale moleculare relativ scăzute și a flexibilității ridicate a lanțurilor în comparație cu alte polizaharide.

Figura 16. Variația temperaturii de gelifiere a Plx17/CMP cu concentrația și gradul de substituție al CMP.



Adăugarea CMP în concentrații mici (sub 0,5%) are ca efect scăderea durtății gelurilor din Plx17/CMP_x (**Figura 17**).

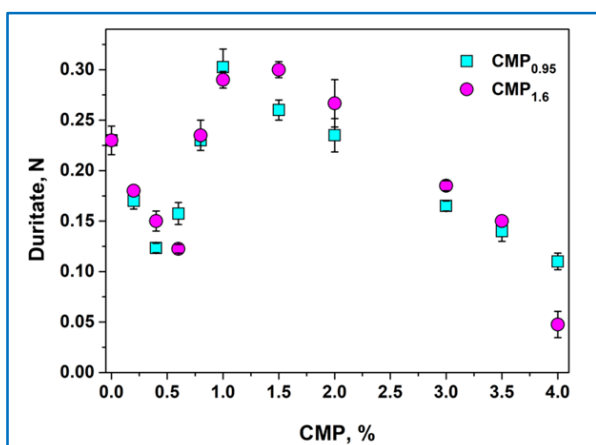


Figura 17. Variația proprietăților mecanice (durtatea) gelurilor Plx17/CMP cu concentrația și gradul de substituție al CMP.

Creșterea concentrației de CMP în amestec de la 0,5 pînă la 1,5% este însoțită de creșteri în rezistență a gelurilor cu înregistrarea unui maxim la concentrații de 1% CMP_{0.95} și 1,5% CMP_{1.6}.

Gelurile obținute din Plx17% cu CMP_{0.95} și CMP_{1.6} se comportă similar datorită densităților de sarcină relativ ridicate ale celor doi derivați de pululan și, probabil, configurației similare în soluție. Ca urmare, comportarea la gelifiere prin teste reologice s-a studiat doar pentru gelurile de **Plx17/CMP_{0.95}**.

Figura 18 prezintă variația parametrilor reologici (G' , G'' și $\tan \delta$) cu creșterea temperaturii și determinarea temperaturii de tranziție sol-gel. Starea inițială de soluție a amestecurilor este evidențiată de valorile mici ale modulelor vâscoelastice $G' < G''$ și $\tan \delta > 1$. Sub temperatura T_0 care marchează debutul gelifierii, unimerii și micellele de Plx coexistă în soluție cu lanțurile de CMP, iar creșterea temperaturii are o influență mică asupra parametrilor reologici. Peste T_0 , când temperatura crește cu mai puțin de 10 °C, modulele vâscoelastice cresc brusc, creșterea G' fiind mai rapidă comparativ cu G'' . Acest lucru se datorează modificărilor structurale induse de temperatură, de la micelle la polimicelle și la

structura de rețea. În punctul de tranziție de la soluție la starea de gel, notat $T_{\text{sol-gel}}$ (care este aproape de T_0), $G' = G''$ și $\tan\delta = 1$. Deasupra acestei temperaturi, $G' > G''$ și în jurul temperaturii T_{gel} , rețeaua este formată și se atinge echilibrul. Probele se comportă diferit atunci când concentrația de $\text{CMP}_{0.95}$ în soluția de Plx 17% crește (**Figura 18(b)**). În acest caz, valorile temperaturilor T_0 și $T_{\text{sol-gel}}$ se deplasează spre valori mai mici. Adăugarea unei cantități mici de CMP duce la scăderea temperaturilor de tranziție și perturbă cinetica de gelificare și structura rețelei de Plx.

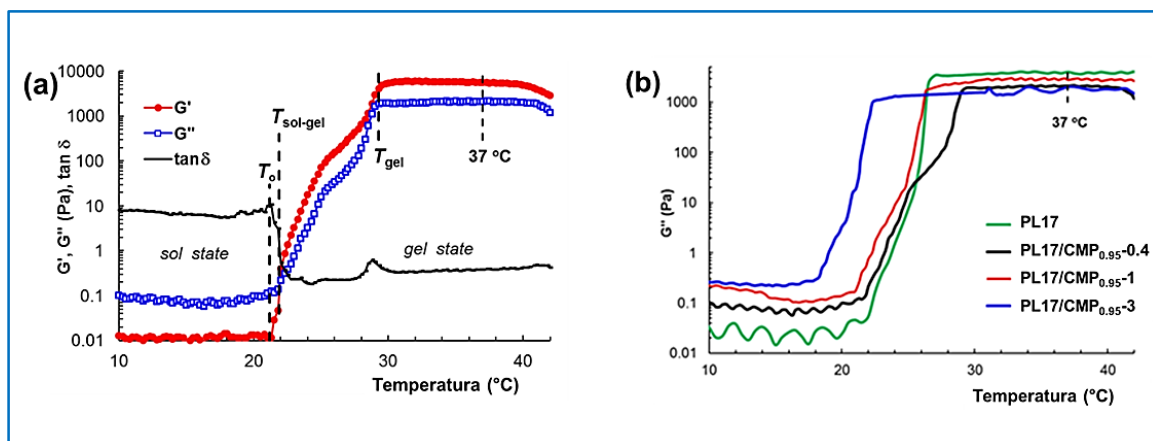


Figura 18. (a) Diagramele tranzițiilor sol-gel pentru proba $\text{Plx17/CMP}_{0.95-0.4}$ rezultate din dependența parametrilor vâscoelastici de temperatură; (b) variația modulului de pierdere în timpul gelifierii induse de temperatură pentru probele $\text{Plx17/CMP}_{0.95}$ (viteza de încălzire de $0,5\text{ }^{\circ}\text{C/min}$, $\omega = 1\text{ rad/s}$, $\gamma = 1\%$).

Datele experimentale arată că odată cu creșterea concentrației de CMP, $T_{\text{sol-gel}}$ scade, dar T_{gel} (care este în bună concordanță cu T_{gel} măsurată prin metoda inversării tubului) prezintă un comportament deosebit: mai întâi crește (proba $\text{Plx17/CMP}_{0.95-0.4}$) și apoi scade.

Adăugarea de CMP are două efecte diferite asupra gelifierii amestecurilor fizice: (i) crește concentrația de Plx în domeniile fără polielectrolit ($T_{\text{sol-gel}}$ scad odată cu creșterea concentrației de CMP), (ii) perturbă agregarea micelilor de Plx și formarea gelului (de aceea parametrii reologici specifici gelurilor formate din Plx și CMP sunt mai mici comparativ cu parametrii gelurilor obținute doar din Plx).

La concentrații scăzute, polielectrolitul are o conformație extinsă a lanțurilor și împarte rețeaua de Plx în multe domenii, scăzând astfel rezistența gelului (**Figura 19(b)**). Odată cu creșterea concentrației de CMP, conformația polizaharidei devine mai încolăcită și forțează aglomerarea micelilor de Plx în macrodomenii. Astfel, interacțiunile dintre micelle sunt mult mai puternice, iar rezistența rețelei de Plx crește atunci când în sistem este adăugat CMP de până la 1%. Pe măsură ce concentrația CMP adăugat în amestec depășește 1%,

flexibilitatea gelului crește datorită izolării progresive a micelilor de Plx iar parametrii reologici scad.

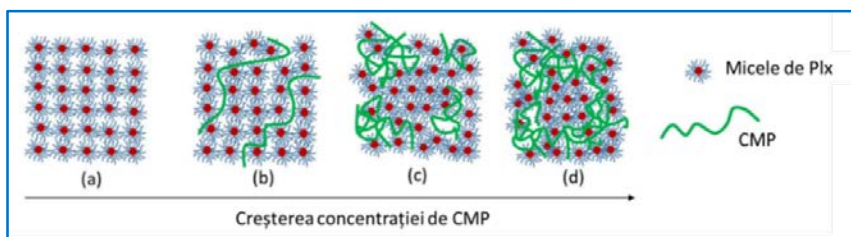
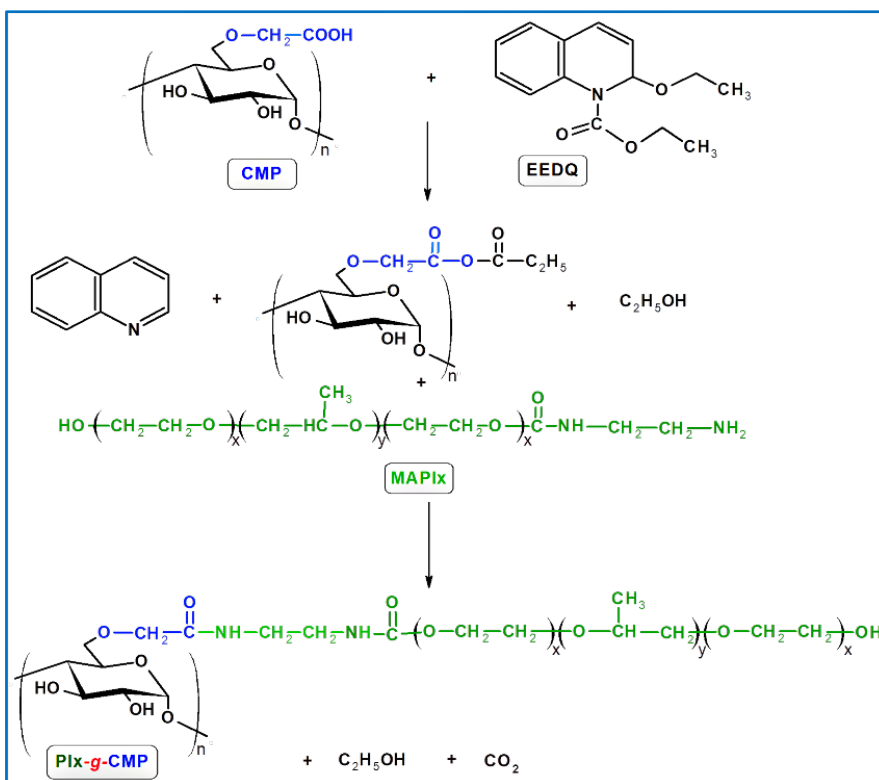


Figura 19. Reprezentarea schematică a influenței concentrației CMP asupra comportamentului de gelificare pentru sistemele: Plx17 (a), Plx17/CMP_{0.95-0.4} (b), PL17/CMP_{0.95-1} (c) și PL17/CMP_{0.95-3} (d).

V.3. TERMOGELURI PE BAZĂ DE COPOLIMER POLOXAMER-g-CARBOXIMETIL PULULAN

Copolimerul grefat poloxamer-g-carboximetil pululan (**Plx-g-CMP**) a fost preparat printr-o reacție de cuplare dintre grupările aminice ale unui derivat monoaminat al Poloxamerului 407 și grupările carboxilice prezente pe lanțurile de carboximetil pululan (**Schema 4**). Mai întâi, s-au sintetizat cei doi derivați, carboximetil pululanul (CMP) și Poloxamerul monoaminat (MAPlx), folosind metode descrise în literatură.



Schema 4. Etapele de sinteză a copolimerului grefat Plx-g-CMP.

Temperatura la care polimerul suferă o tranziție sol-gel a fost determinată mai întâi prin metoda inversiei tubului și experimentele s-au efectuat atât pentru soluții în PB de poloxamer, cât și de copolimer grefat (**Figura 20**). Temperatura de gelificare scade odată cu

creșterea concentrației de copolimer: de la 33 °C la o concentrație de 11% (g/v) la 20 °C la o concentrație de 18% (g/v). În plus, tranziția sol-gel a copolimerului grefat are loc până la o concentrație de 11% (g/v), în timp ce gelifierea poloxamerului nu are loc la concentrații mai mici. Aceste observații certifică faptul că Plx-g-CMP formează puncte de reticulare suplimentare (adică, legături de hidrogen). Mai mult, în condiții fiziologice simulate la pH = 7,4, lanțurile polimerice se află într-o stare extinsă, iar mediul în care se află segmentele de poli(oxid de propilenă) (PPO) devine mai polar, forțând segmentele de PPO să formeze agregate la temperaturi mai scăzute.

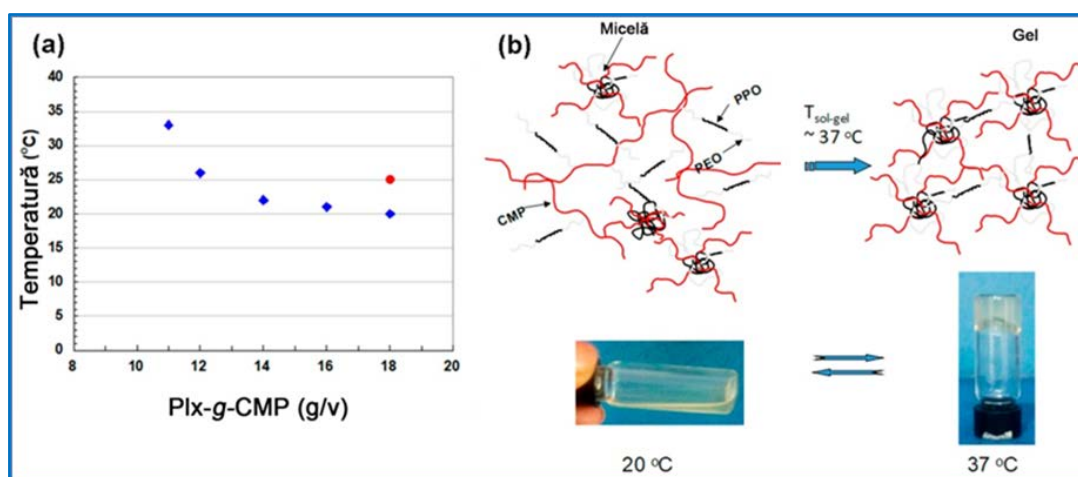


Figura 20. Influența concentrației copolimerului asupra temperaturii de gelifiere a Plx (●) și Plx-g-CMP (◆). Măsurătorile s-au efectuat în tampon fosfat 0,05 M cu pH = 7,4 (a). Reprezentarea schematică a tranziției sol-gel a soluției Plx-g-CMP (b).

Studiile reologice au pus în evidență că, în funcție de temperatura la care soluția de copolimer a fost menținută înaintea testului, procesul de gelifiere a probei de copolimer de concentrație 13% a început fie după 990s, fie după 280, când se observă o creștere rapidă a valorilor lui G' și G'' (Figura 21). În continuare, s-a constatat că modificarea parametrilor vâscoelastici este mult mai lentă în timp, pe măsură ce se formează o structură tridimensională stabilă ($\tan \delta < 1$) și care nu este influențată de temperatura de repaus a probelor înaintea testelor sau de concentrația copolimerului Plx-g-CMP. Procesul de gelifiere are loc în două etape (de exemplu, după 990s și 2500s sau 280s și 2000s), probabil datorită competiției dintre diferitele tipuri de interacțiuni (legături de hidrogen, interacțiuni hidrofobe) care se dezvoltă în timp.

Pentru concentrații mai mari (22 și 30%, g/v), timpul de gelifiere este de ordinul zecilor de secunde pentru probele păstrate la 4 °C, în timp ce pentru probele menținute la 20 °C, gelifierea are loc aproape instantaneu.

Când proba este supusă unei deformații oscillatorii mari ($\gamma = 100\%$), G' și G'' scad, structura rețelei se distruge ($\tan \delta > 1$) și fluiditatea probei crește (**Figura 22**). Prin schimbarea deformației de la o valoare mare de 100% la una mică de 1%, structura rețelei este recuperată în câteva secunde. De asemenea, se observă că structura de repaus nu este complet recuperată după primul ciclu de deformare (valoarea G' după primul ciclu este de aproximativ 65% din valoarea sa de repaus). Testul a fost repetat de cinci ori (cu menținerea deformației pentru 200s la fiecare ciclu) și s-a observat că procesul de refacere este reversibil pentru următoarele patru cicluri de deformare; proba este capabilă să-și recupereze structura de rețea 3D după acțiunea succesivă a unor forțe externe ($\tan \delta$ este de aproximativ 0,14 în repaus și crește lent între 0,2 și 0,4 după aplicarea a până la cinci cicluri de deformare).

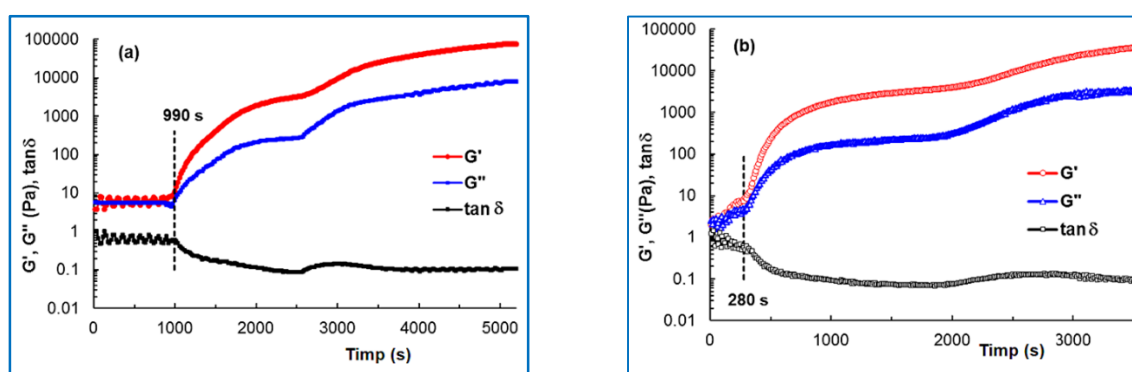
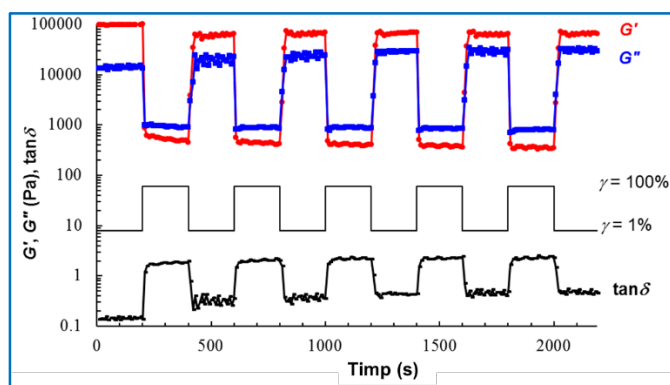


Figura 21. Evoluția parametrilor viscoelastici în timp la 37 °C pentru copolimerul Plx-g-CMP cu concentrația 13% (g/v) după 24 de ore de repaus la 4 °C (a) și 20 °C (b) ($\omega = 1$ rad/s, $\gamma = 1\%$)

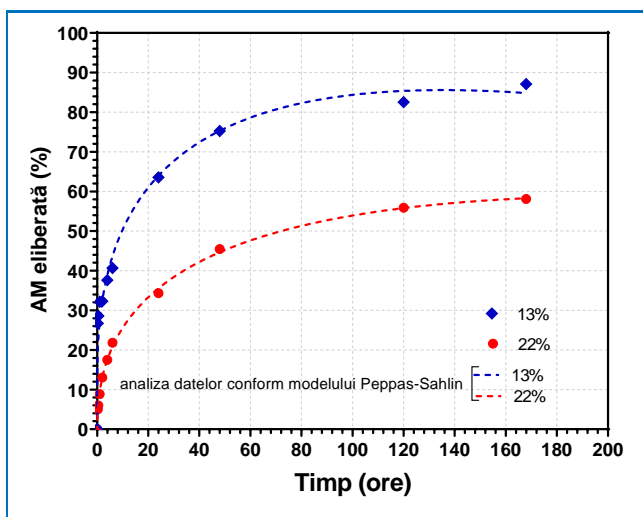
Figura 22. Diagramele rezultatelor testelor de auto-refacere pentru hidrogelul obținut din Plx-g-CMP (13%) la 37 °C și 1 rad/s.



Gelul format de copolimerul grefat Plx-g-CMP la două concentrații și conținând amoxicilină (AM) a fost testat ca posibila matrice suport în aplicațiile de inginerie tisulară.

Studiile de eliberare a AM din hidrogelul obținut prin folosirea a două concentrații de copolimer (13 și 22%, g/v) au fost efectuate în condiții fiziologice simulate (tampon fosfat (PB) cu pH = 7,4) (**Figura 23**). Rezultatele studiului evidențiază o eliberare treptată a AM din ambele hidrogeluri pe o perioadă de aproximativ 168 de ore. În primele 6 ore, 41% din medicament este eliberat din hidrogelul Plx-g-CMP obținut la o concentrație de 13% (g/v),

care este de două ori mai mare decât cea eliberată din hidrogelul obținut la o concentrație de 22% (g/v). Pentru următoarele 48 de ore, curbele de eliberare urmează aproape același profil, dar diferența este mai mică. Din acest punct și până la sfârșitul experimentului, profilul curbelor de eliberare urmează o traiectorie aproximativ paralelă, sugerând că eliberarea medicamentului este în principal controlată de către difuzia acestuia din matricea hidrogelului. Cu toate acestea, difuzia AM din hidrogel în fluidul de eliberare ar trebui controlată atât prin interacțiuni sterice cu rețeaua polimerică, cât și prin posibilele interacțiuni electrostatice între sarcinile opuse ale medicamentului și CMP. Atâta timp cât studiile de eliberare sunt efectuate într-un tampon fosfat cu o anumită tărie ionică (50 mM), interacțiunile electrostatice dintre AM și grupele carboxilice ale CMP sunt împiedicate de prezența ionilor concurenți. Ca rezultat, viteza de difuzie a medicamentului va fi controlată numai de interacțiunile sterice dintre medicament și rețeaua polimerică. Evident, cu cât



rețeaua este mai densă cu atât probabilitatea interacțiunilor intermoleculare este mai mare, iar viteza de eliberare a amoxicilinei este mai mică.

Figura 23. Profilurile curbelor de eliberare *in vitro* a amoxicilinei din hidrogelurile obținute din Plx-g-CMP la două concentrații (13% și 22%, g/v).

CONCLUZII GENERALE

Din studiile efectuate asupra preparării și caracterizării **microsferelor sensibile la temperatură și pH pe bază de P(NIPAAm-co-VI)** s-au desprins următoarele concluzii:

- ☞ A fost sintetizat un nou copolimer sensibil la temperatură și pH printr-o reacție de polimerizare radicalică a co-monomerilor N-izopropilacrilamidă și 1-Vinilimidazol.
- ☞ Temperatura critică minimă de insolubilizare (LCST) a copolimerului a fost determinată prin spectrofotometrie UV-Vis iar valorile LCST pentru P(NIPAAm-co-VI) cresc odată cu creșterea cantității de VI în copolimer. De asemenea, pentru cele trei probe (VI₁-VI₃), LCST crește odată cu scăderea pH-ului de la 7,4 la 5,0.
- ☞ Proba VI₂ a fost selectată pentru studiile ulterioare datorită faptului că nu este solubilă la pH = 7,4 dar este solubilă la pH = 5,5 și pH = 5,0 la temperatura corpului uman,

fiind un candidat ideal pentru obținerea sistemelor de eliberare controlată a medicamentelor la nivelul tumorilor.

- ☞ S-au obținut microparticule încărcate cu doxorubicină (MS-DXR) din copolimerul liniar P(NIPAAm-co-VI) prin metoda evaporării solventului.
- ☞ MS-DXR au capacitatea de a se dezintegra în nanoparticule (NS-DXR) în condiții fiziologice simulate (pH = 7,4 la 37 °C).
- ☞ Studiile *in vitro* și *in vivo* realizate pe NS-DXR arată că aceste sisteme polimerice sunt stabile odată ce sunt introduse în fluxul sangvin dar se solubilizează la pH = 6,0 - 5,0 și eliberează medicamentul (DXR) într-o manieră controlată în nucleii celulelor canceroase HepG2 și A549.

Din studiile realizate pe **microsferele sensibile la pH și temperatură obținute din copolimerul P(NIPAAm-co-4-VP)** s-au desprins următoarele rezultate:

- ☞ A fost sintetizat un copolimer nou cu dublă sensibilitate, la temperatură și pH printr-o reacție de polimerizare radicalică a co-monomerilor N-izopropilacrilamidă și 4-vinilpiridină.
- ☞ A fost confirmată structura chimică a copolimerului P(NIPAAm-co-4-VP) și a fost determinată compoziția procentuală prin spectrometrie RMN-¹H.
- ☞ Prin spectrofotometrie UV-Vis a fost determinată temperatura critică minimă de insolubilizare a copolimerului P(NIPAAm-co-4-VP). În condiții fiziologice normale (PB la pH = 7,4), cele trei probe de copolimer (VP₁ - VP₃) prezintă valori LCST sub temperatura corpului uman și prin urmare sunt insolubile. Mai mult decât atât, în soluție tampon cu pH = 7,4, valoarea LCST scade odată cu creșterea cantității de 4-VP din copolimer.
- ☞ Proba VP₂ a fost selectată pentru următoarele etape de studiu deoarece nu este solubilă la pH = 7,4, dar este solubilă la pH = 5,0, la temperatura corpului uman, fiind potrivită pentru obținerea unor sisteme de eliberare a principiilor active la nivelul micromediului tumoral.
- ☞ Microparticulele de P(NIPAAm-co-4-VP) încărcate cu dexametazonă (MS-DEX) au fost obținute prin metoda evaporării solventului.
- ☞ Gradul de dispersare a dexametazonei în matricea polimerică a microsferelor precum și posibilele interacțiuni dintre medicament și polimer au fost evaluate prin analize de calorimetrie diferențială de baleiaj (DSC). Rezultatele au evidențiat o dispersare

moleculară a medicamentului în rețeaua polimerică. Mai mult decât atât, s-a remarcat că medicamentul prezintă și un rol de plastifiant.

- ☞ Prin testele *in vitro* efectuate pe MS-DEX a fost demonstrată capacitatea acestor matrici polimerice de a fi utilizate ca sisteme de eliberare controlată a medicamentelor în condițiile acide ale micromediului tumoral.

Studiile efectuate pe **hidrogelurile convenționale sensibile la temperatură** obținute din P(NIPAAm-co-HEAAm) s-au finalizat cu următoarele rezultate:

- ☞ S-a obținut un copolimer liniar pe bază de NIPAAm și HEAAm folosind diferite rapoarte molare între cei doi co-monomeri în amestecul inițial de reacție.
- ☞ Au fost obținute hidrogeluri convenționale (PNH) prin polimerizarea radicalică a monomerilor NIPAAm și HEAAm în apă la un raport molar între co-monomeri de 5:1 și în prezența agentului de reticulare, N,N-metilenbisacrilamidă (BisAAm).
- ☞ Rezultatele studiilor de eliberare *in vitro* a metoclopramidei din hidrogelurile convenționale indică o eliberare rapidă a medicamentului în soluțiile tampon PB și ABS.

Studiile realizate pe **hidrogelurile dublu reticulate cu sensibile la temperatură și pH** s-au concretizat în următoarele rezultate:

- ☞ Hidrogelurile dublu reticulate (DC) au fost obținute prin imersarea hidrogelurilor convenționale în soluții de P(metil vinil eter-*alt*-acid maleic) (P(MVE/MA)) de diferite concentrații (2 și 5%, g/v). Probele semi-interpenetrate rezultate au fost supuse unui tratament termic la 80 °C timp de 24 de ore, pentru o reticulare suplimentară. Metoda oferă avantajul că nu necesită folosirea unor solvenți sau a unor reticulanți chimici toxici.
- ☞ În soluție PB cu pH = 7,4 s-a observat că temperatura tranziției de fază volumică (VPTT) în prezența medicamentului a atins o valoare apropiată de temperatura fiziologică iar această comportare poate fi explicată de interacțiunea electrostatică a medicamentului (hidrofob) cu grupele carboxil ale acidului maleic din P(MVE/MA).
- ☞ În soluție tampon cu pH = 7,4, MET este eliberată mai repede din hidrogelurile dublu reticulate datorită gradelor mari de umflare (ionizarea grupărilor carboxilice). În schimb, la pH = 1,2, hidrogelurile DC sunt complet protonate iar rețeaua polimerică se află în stare colapsată și prin urmare, viteza de eliberare a medicamentului este mai mică.

Din studiile privind obținerea și caracterizarea **termogelurilor pe bază de amestecuri fizice dintre poloxamer și carboximetil pululan** s-au conturat următoarele concluzii:

- ☞ Rezultatele studiilor de miscibilitate prin vâscozimetrie au arătat că lanțurile de carboximetil pululan se află într-o conformație extinsă în prezența Poloxamerului iar interacțiunile dintre segmentele lanțurilor de CMP_{0.95} sau CMP_{1.6} cu Plx sunt mai mari comparativ cu cele observate la sistemul format din CMP_{0.42} și Plx.
- ☞ Sistemele Plx17/CMP_{0.95} și Plx17/CMP_{1.6} sunt miscibile cu Poloxamerul la o concentrație mare, însă amestecul format din CMP_{0.45} și Poloxamer prezintă o separare de fază.
- ☞ Adăugarea de CMP are două efecte opuse asupra gelifierii amestecurilor pe bază de Plx: crește concentrația de Plx în domeniile fără polielectroliți, scăzând T_{sol-gel}, dar perturbă și agregarea micelilor de Plx într-o structură organizată de rețea, iar gelurile se înmoaie.
- ☞ Adăugarea CMP de concentrație 1% în soluția de Plx 17%, a permis obținerea unor termogeluri cu o temperatură de gelifiere (T_{gel}) la aproximativ 26 °C, acestea prezentând o duritate moderată.

În urma studiilor efectuate pe **termogelurile pe bază de copolimer poloxamer-g-carboximetil pululan** s-au deprins următoarele concluzii:

- ☞ Copolimerul grefat poloxamer-g-carboximetil pululan (Plx-g-CMP) a fost obținut printr-o reacție de cuplare dintre grupările aminice ale poloxamerului monofuncționalizat și grupările carboxilice prezente în structura carboximetil pululanului.
- ☞ A fost determinat gradul de substituție (G.S.) a carboximetil pululanului prin titrare conductometrică. S-a obținut un G.S. de 0,87 care corespunde unui conținut în grupe carboxilice de 3,78 mmoli/g.
- ☞ Capacitatea de gelifiere a copolimerului Plx-g-CMP a fost investigată prin studii de reologie. Copolimerul Plx-g-CMP poate forma un gel în condiții fiziologice simulate (tampon fosfat la pH = 7,4 și 37 °C) iar temperatura de tranziție sol-gel a copolimerului este mai mică (20 °C) decât cea specifică Poloxamerului nativ (25 °C) la aceeași concentrație (18%, g/v). În plus, tranziția sol-gel a copolimerului grefat are loc până la o concentrație de 11% (g/v) în timp ce gelifierea Poloxamerului 407 nu are loc la concentrații mai mici de 18% (g/v).

- ☞ Studiile de eliberare a medicamentului model, amoxicilină, din gelurile obținute prin folosirea a două concentrații de copolimer grefat (13 și 22%, g/v), efectuate în condiții fiziologice simulate (tampon fosfat (PB) cu pH = 7,4), au evidențiat o eliberare controlată a medicamentului pe o perioadă de aproximativ 168 de ore.
- ☞ Pe baza proprietăților fizico-chimice și a celor reologice se poate conchide că Plx-g-CMP poate fi utilizat cu succes atât ca matrice pentru eliberarea prelungită a amoxicilinei cât și pentru refacerea cartilajelor articulare.

DISEMINAREA REZULTATELOR ȘI ALTE ACTIVITĂȚI ȘTIINȚIFICE ȘI DE FORMARE PROFESIONALĂ

Rezultatele obținute în cadrul acestei teze de doctorat constituie subiectul a cinci articole științifice și șapte comunicări orale.

Lucrări publicate în extenso în reviste de specialitate de circulație internațională recunoscute (reviste cotate ISI):

1. Constantin, M.; Bucatariu, S.; Popescu, I.; **Cosman, B.**; Ascenzi, P.; Fundueanu, G., **2021**. *Intelligent Micro-vehicles For Drug Transport And Controlled Release To Cancer Cells*. *Reactive and Functional Polymers* 165, pp.104961.
2. Constantin, M.; **Cosman, B.**; Bercea, M.; Ailiesei, G.-L.; Fundueanu, G., **2021**. *Thermosensitive Poloxamer-graft-Carboxymethyl Pullulan: A Potential Injectable Hydrogel for Drug Delivery*. *Polymers* 13(18), 3025.
3. Fundueanu, G.; Constantin, M.; Turtoi, M.; Bucatariu, S.-M.; **Cosman, B.**; Anghelache, M.; Voicu, G.; Calin, M., **2022**. *Bio-Responsive Carriers for Controlled Delivery of Doxorubicin to Cancer Cells*. *Pharmaceutics* 14(4), 865.
4. **Cosman, B.-P.**; Bucătariu, S.-M.; Constantin, M.; Fundueanu, G., **2022**. *Temperature/pH-Sensitive Double Cross-Linked Hydrogels as Platform for Controlled Delivery of Metoclopramide*. *Gels* 8(12), 824.
5. Popescu, I.; Constantin, M.; Bercea, M.; **Cosman, B.-P.**; Suflet, D.M., Fundueanu, G., **2023**. *Poloxamer/Carboxymethyl Pullulan Aqueous Systems—Miscibility and Thermogelation Studies Using Viscometry, Rheology and Dynamic Light Scattering*. *Polymers* 15(8), 1909.

Comunicări la manifestări științifice

1. *pH/temperature-sensitive microspheres for drug delivery to the tumors*; Fundueanu G., Constantin M., **Cosman B.**, Bucatariu S.; *International Congress of the „Apollonia”*

University FROM Iasi „By promoting excellence, we prepare the future” XXXIth Edition, Iasi, Romania, 01-03.03. 2021

2. *pH/temperature-sensitive interpenetrating polymeric hydrogel*; **Cosman B.**; Bucatariu S.; Constantin M.; Fundueanu G.; *ICMPP - Open Door to the Future Scientific Communications of Young Researchers MacroYouth 2022*, Iași, România, 19.11. 2021
3. *pH/thermosensitive copolymer with gelling properties for controlled delivery of drugs*; **Cosman B.**; Constantin M.; Bercea M.; Ailiesei G.-L.; Fundueanu G., *The International Congress of Apollonia University of Iasi*, Iasi, Romania, 28.02.2022 – 01.03.2022
4. *Stimuli-sensitive microspheres for drug delivery to the tumors*; **Cosman B.**; Constantin M.; Bucatariu S.; Fundueanu G., *ICMPP - Open Door to the Future Scientific Communications of Young Researchers MacroYouth 2022*, Iași, România, 18.11.2022
5. *Smart microparticulate systems for the transport and controlled delivery of doxorubicin to tumor cells*; Fundueanu G., **Cosman B.**, Bucatariu S., Constantin M.; *The International Congress of Apollonia University of Iasi*, Iași, România, 28.02 – 01.03. 2022
6. *Design of double cross-linked smart hydrogel for biomedical applications*; **Cosman B.**; Bucătariu S.; Fundueanu G.; Constantin M.; *International Congress of the “Apollonia” University of Iasi “By promoting excellence, we prepare the future” XXXIIIth Edition*, Iasi, 2-5.03. 2023
7. *Intelligent polymers for biomedical applications*; Fundueanu-Constantin G., Bucatariu S., **Cosman B.**, Constantin M.; *International Congress of the “Apollonia” University of Iasi “By promoting excellence, we prepare the future” XXXIIIth Edition*, Iasi, 2-5.03. 2023

Articole și comunicări conexe cu subiectul tezei de doctorat, elaborate pe bază de colaborări

1. **Cosman, B.**; Rata, D.M.; Suflet, D.M.; Fundueanu, G.; **2021**. *Chitosan-PVA composite hydrogels: synthesis, characterization and their antibacterial properties*; Proceedings of the Progress in Organic and Macromolecular Compounds Conference, online, pag 127-128.
2. Constantin, M.; **Cosman, B.**; Ascenzi, P.; Simionescu, B.C.; Fundueanu, G., **2022**. *New Chromatographic Insights On Drug:Cyclodextrin Inclusion Complexes And Their Potential Use In Drug Delivery*. Expert Opinion on Drug Delivery 19(12), 1696–1709.
3. *Design of chitosan films via solvent free thermal cross linking method*; Bucatariu S., **Cosman B.**, Fundueanu G., Constantin M.; *International Congress of the „Apollonia”*

University FROM Iasi „By promoting excellence, we prepare the future” XXXIth Edition, Iasi, Romania, 01-03.03. 2021

4. *Chitosan - PVA composite hydrogels: synthesis, characterization and their antibacterial properties*; **Cosman B.**, Rata D.M., Suflet D.M., Fundueanu G.; *Progress in Organic and Macromolecular Compounds Conference MacroIasi'2021*, Iasi, Romania, 7 - 9.10.2021
5. *An interpenetrating polymeric scaffold based on hyaluronic acid and a thermosensitive polymer for biomedical applications*; Bucatariu S., **Cosman B.**, Constantin M., Fundueanu G.; *The International Congress of Apollonia University of Iași*, Iași, România, 28.02 – 01.03. 2022

Brevete

1. *Procedeu de obținere a unui film pe bază de chitosan, poli(metil vinil eter-alt-anhidridă maleică) și nanoparticule de argint cu activitate antimicrobiană*; Bucatariu S.M., Suflet D.M., Fundueanu-Constantin M., Popescu I., Pelin I.M., **Cosman B.P.**, Fundueanu-Constantin G.; A00218 din 28.04.2022.

Implicare ca membru în echipă în proiecte de cercetare

1. Hidrogeluri compozite avansate cu proprietăți antibacteriene și anti-inflamatorii pentru tratarea parodontozei, PERIOSILVERDDS, proiect **PN-III-P2-2.1-PED-2019-1780**, contract 312PED/2018 (2019-2022).
2. Polimeri ionici pe bază de polizaharide: Corelații între structura chimică, proprietăți fizico-chimice și interacțiuni cu particule cu sarcină opusă, proiect **PN-III-P4-ID-PCE-2020-0296**, contract PCE94/2020 (2020-2023).

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

- [1] Zhu, L.; Xu, W.; Zhang, W.; Wu, M.; Li, W.; Ge, F.; Tao, Y.; Song, P., 2021. *De novo synthesis of pH-responsive, self-assembled, and targeted polypeptide nano-micelles for enhanced delivery of doxorubicin*, *Nanotechnology*, 32(29), pp.295707–295707.
- [2] Kundu, M.; Chatterjee, S.; Ghosh, N.; Manna, P.; Das, J.; Sil, P.C., 2020. *Tumor targeted delivery of umbelliferone via a smart mesoporous silica nanoparticles controlled-release drug delivery system for increased anticancer efficiency*, *Materials Science and Engineering: C*, 116, p.111239.
- [3] Needham, D.; Dewhirst, M.W., 2001. *The development and testing of a new temperature-sensitive drug delivery system for the treatment of solid tumors*, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 53(3), pp.285–305.
- [4] Tang, Z.; Zhang, L.; Wang, Y.; Li, D.; Zhong, Z.; Zhou, S., 2016. *Redox-responsive star-shaped magnetic micelles with active-targeted and magnetic-guided functions for cancer therapy*, *Acta Biomaterialia*, 42, pp.232–246.

- [5] Chen, J.; Xiao, L.; Zhao, X.; Wu, Q.; Zhu, H.; Mao, Z.; Gao, C., 2018. *Doxorubicin-conjugated pH-responsive gold nanorods for combined photothermal therapy and chemotherapy of cancer*, *Bioactive Materials*, 3(3), pp.347–354.
- [6] Sim, T.; Lim, C.; Hoang, N.H.; Shin, Y.; Kim, J.C.; Park, J.Y.; Her, J.; Lee, E.S.; Youn, Y.S.; Oh, K.T., 2020. *An On-Demand pH-Sensitive Nanocluster for Cancer Treatment by Combining Photothermal Therapy and Chemotherapy*, *Pharmaceutics*, 12(9), pp.839–839.
- [7] Thistlethwaite, A.J.; Leeper, D.B.; Moylan, D.J.; Nerlinger, R.E., 1985. *pH distribution in human tumors*, *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 11(9), pp.1647–1652.
- [8] Liu, Y.; Wang, W.; Yang, J.; Zhou, C.; Sun, J., 2013. *pH-sensitive polymeric micelles triggered drug release for extracellular and intracellular drug targeting delivery*, *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 8(3), pp.159–167.
- [9] Teixeira, R.; Diniz, K.M.; Cajamarca, A.; Segatelli, M.G., 2017. *Study on the performance of micro-flow injection preconcentration method on-line coupled to thermospray flame furnace AAS using MWCNTs wrapped with polyvinylpyridine nanocomposites as adsorbent*, *RSC Advances*, 7(31), pp.19296–19304.
- [10] Knapp, J.P.; Kakish, J.E.; Bridle, B.W.; Speicher, D.W., 2022. *Tumor Temperature: Friend or Foe of Virus-Based Cancer Immunotherapy*, *Biomedicines*, 10(8), pp.2024.
- [11] Tarabukina, E.B.; Rozanova, A.; Filippov, A.P.; Constantin, M.; Harabagiu, V.; Fundueanu G., 2018. *Thermo- and pH-responsive phase separation of N-isopropylacrylamide with 4-vinylpyridine random copolymer in aqueous solutions*, *Colloid and Polymer Science*, 296, pp.557–565. [298]
- [12] Tsarevsky, N.V.; Braunecker, W.A.; Brooks, S.J.; Matyjaszewski, K., 2006. *Rational Selection of Initiating/Catalytic Systems for the Copper-Mediated Atom Transfer Radical Polymerization of Basic Monomers in Protic Media: ATRP of 4-Vinylpyridine*. *Macromolecules*, 39(20), pp.6817–6824.
- [13] Fundueanu, G.; Constantin, M.; Stanciu, C.; Theodoridis, G.; Ascenzi, P., 2009. *pH- and temperature-sensitive polymeric microspheres for drug delivery: the dissolution of copolymers modulates drug release*, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 20, pp.2465–2475.
- [14] Naahidi, S.; Jafari, M.; Logan, M.; Wang, Y.; Yuan, Y.; Bae, H.; Dixon, B.; Chen, P., 2017. *Biocompatibility of hydrogel-based scaffolds for tissue engineering applications*, *Biotechnology Advances*, 35(5), pp.530–544.
- [15] Li, J.; Mooney, D.J., 2016. *Designing hydrogels for controlled drug delivery*, *Nature Reviews Materials*, 1(12), pp.11-17.
- [16] Sharpe, L.A.; Daily, A.M.; Horava, S.D.; Peppas, N.A., 2014. *Therapeutic applications of hydrogels in oral drug delivery*, *Expert opinion on drug delivery*, 11(6), pp.901–915.
- [17] Li, H.; Lv, T.; Sun, H.; Qian, G.; Li, N.; Yao, Y.; Chen, T., 2019. *Ultrastretchable and superior healable supercapacitors based on a double cross-linked hydrogel electrolyte*, *Nature Communications*, 10(1), pp.536.
- [18] Hutchison, J.S.; Ward, R.E.; Lacroix, J.; Hébert, P.C.; Barnes, M.A.; Bohn, D.J.; Dirks, P.B.; Doucette, S.; Fergusson, D.; Gottesman, R.; Joffe, A.R.; Kirpalani, H.M.; Meyer, P.G.; Morris, K.P.; Moher, D.; Singh, R.N.; Skippen, P.W., 2008. *Hypothermia Therapy*

- after Traumatic Brain Injury in Children, *New England Journal of Medicine*, 358(23), pp.2447–2456.
- [19] Matanović, M.R.; Kristl, J.; Grabnar, P.A., 2014. *Thermoresponsive polymers: Insights into decisive hydrogel characteristics, mechanisms of gelation, and promising biomedical applications*, *International Journal of Pharmaceutics*, 472(1), pp.262–275.
- [20] Lin, Q.; Owh, C.; Lim, J.Y.C.; Chee, P.L.; Yew, M.P.Y.; Hor, E.T.Y.; Loh, X.J., 2021. *The Thermogel Chronicle—From Rational Design of Thermogelling Copolymers to Advanced Thermogel Applications*, *Accounts of Materials Research*, 2(10), pp.881–894.
- [21] Mahajan, H.S.; Jadhao, V.D.; Chandankar, S.M., 2022. *Pullulan and Pluronic F-127 based in situ gel system for intranasal delivery: Development, in vitro and in vivo evaluation*, *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 37(5), pp.406–418.
- [22] Bercea, M.; Constantin, M.; Plugariu, I.-A.; Daraba, M.O.; Ichim, D.L., 2022. *Thermosensitive gels of pullulan and poloxamer 407 as potential injectable biomaterials*, *Journal of Molecular Liquids*, 362, pp.119717.
- [23] Baldwin, A.D.; Kiick, K.L., 2010. *Polysaccharide-modified synthetic polymeric biomaterials*, *Biopolymers*, 94(1), pp.128–140.
- [24] Chen, J.; Zhou, R.; Li, L.; Li, B.; Zhang, X.; Su, J., 2013. *Mechanical, Rheological and Release Behaviors of a Poloxamer 407/ Poloxamer 188/Carbopol 940 Thermosensitive Composite Hydrogel*, *Molecules*, 18(10), pp.12415–12425.
- [25] Gratieri, T.; Gelfuso, G.M.; Rocha, E.M.; Sarmiento, V.H.; de Freitas, O.; Lopez, R.F.V., 2010. *A poloxamer/chitosan in situ forming gel with prolonged retention time for ocular delivery*, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics: Official Journal of Arbeitsgemeinschaft Fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V*, 75(2), pp.186–193.