



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2018 00388

(22) Data de depozit: 31/05/2018

(41) Data publicării cererii:
30/10/2018 BOPI nr. 10/2018

(71) Solicitant:
• UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI
FARMACIE "CAROL DAVILA" DIN
BUCUREȘTI, STR. DIONISIE LUPU NR. 37,
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:
• GHICA MIHAELA VIOLETA,
CALEA CRÂNGAȘI NR. 26-28, BL. 48-49,
SC. A, ET. 2, AP. 4, SECTOR 6, BUCUREȘTI,
B, RO;
• ALBU KAYA MĂDĂLINA GEORGIANA,
BD. TINERETULUI, NR. 21, BL. Z6, SC. 1,
ET. 7, AP. 48, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B,
RO;
• UDEANU DENISA IOANA,
ȘOS. COLENTINA NR. 15, BL. R25, SC. B,
AP. 77, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;

• MARIN MARIA MINODORA,
SAT PĂUȘEȘTI - OTĂSĂU,
COMUNA PĂUȘEȘTI, VL, RO;
• MARIN ȘTEFANIA, BD. MATEI BASARAB
NR. 40, BL. 30, SC. B, AP. 21, ET. 5,
SLOBOZIA, IL, RO;
• KAYA DURMUŞ ALPASLAN,
CUMHURIYET MAHALLESİ, STR. IPEK,
BL. NUR NR. 35, AP. 15, ET. 3,
ANTAKYA-HATAY, TR;
• DINU-PIRVU CRISTINA ELENA,
STR. GHEORGHE LAZĂR NR. 10, ET. 1,
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;
• POPA LĂCRĂMIOARA,
STR. PICTOR ȘTEFAN DUMITRESCU NR. 3,
BL. 2, SC. 1, ET. 5, AP. 23, SECTOR 4,
BUCUREȘTI, B, RO;
• DĂNILĂ ELENA,
SAT GHEBOAIA, COMUNA FINTA, DB, RO

Această publicație include și modificările
descrierii, revendicărilor și desenelor, depuse conform
art. 35, alin. (20), din HG nr. 547/2008.

(54) **SISTEME DE CEDARE MULTIPARTICULATE TOPICE PE
BAZĂ DE BIOPOLIMERI CU ELIBERARE CONTROLATĂ
A UNUI MEDICAMENT ANTIINFLAMATOR, ȘI PROCEDEU
DE OBTINERE A ACESTORA**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un sistem multiparticulat de cedare controlată a unui medicament antiinflamator utilizat în tratarea arsurilor de severitate medie, și la un procedeu de obținere a acestuia. Sistemul conform invenției este constituit, în procente gravimetrice raportate la 100 g de gel de colagen, dintr-un suport polimeric constând dintr-un amestec de colagen fibrilar tip I, având un conținut de 0,8...1,2% colagen substanță uscată, până la 0,6% acid flufenamic și până la 1,2% dextran, până la 1,2% un agent de reticulare de tip glutaraldehidă, precum și 15...30% microcapsule alcătuite din 2,50...7,50% gelatină, 0,25...0,75% carboximetilceluloză sodică, 1,60...2,40% acid flufenamic și 0,50...1,50% alginat de sodiu. Procedeu conform invenției constă în amestecarea în prealabil a gelului de

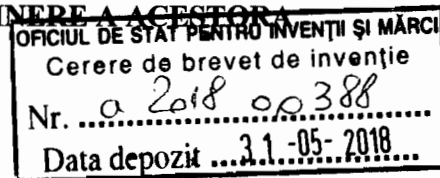
colagen cu soluția de acid flufenamic, se adaugă dextran, se ajustează pH la 7,4 cu soluție de hidroxid de sodiu 1M, și se adaugă apă distilată până la un conținut final al gelului de 0,8...1,2% colagen substanță uscată, în care se imersează 15...30% microcapsule, și se adaugă glutaraldehida sub formă de soluție de concentrație 0,2...0,3% în apă distilată, hidrogelul rezultat se lasă la maturat 24 h la 4°C, și apoi se liofilizează 48 h, rezultând un sistem multiparticulat cu acid flufenamic în forma liberă și încapsulată, respectiv, în formă încapsulată, cu cedare controlată bifazică a medicamentului pe o perioadă de 48 h.

Revendicări: 5

Figuri: 11



**SISTEME DE CEDARE MULTIPARTICULATE TOPICE PE BAZĂ DE
BIOPOLIMERI CU ELIBERARE CONTROLATĂ A UNUI MEDICAMENT
ANTIINFLAMATOR ȘI PROCEDEU DE OBTINERE A ACESTORA**



Domeniul tehnic în care poate fi folosită invenția:

Invenția se referă la sisteme topice multiparticulate de cedare controlată a medicamentului antiinflamator cu suport biopolimeric, cu utilizări în medicină, în special în leziuni cutanate sau arsuri.

Descrierea stadiului actual:

Problema tratamentului arsurilor este de o importanță majoră, deoarece acestea sunt caracterizate printr-o producție imediată și crescută de mediatori specifici proinflamatori, ceea ce determină o întârziere în regenerarea și vindecarea țesutului lezat, precum și apariția unei infecții secundare și afectarea concomitentă, în cascadă și a altor organe [1-4]. De aceea o primă etapă în îmbunătățirea procesului de vindecare a unei arsuri constă în tratamentul zonei arse inflamate.

Arsurile cutanate reprezintă leziuni acute caracterizate printr-o producție imediată și crescută de mediatori specifici proinflamatori, ceea ce determină o întârziere în regenerarea și vindecarea țesutului lezat.

Antiinflamatoarele nesteroidiene (AINS) sunt o clasă de medicamente care ușurează răspunsul inflamator post-leziune, reducând cu succes durerea persistentă și temporară, precum și inflamația lângă suprafața lezată, după apariția arsurii [5,6]. Sistemele de cedare topice cu medicamente antiinflamatoare cu acțiune directă la nivelul leziunii sunt în prezent unul dintre cele mai atractive și în continuă dezvoltare subiecte de interes [7-9], oferind câteva avantaje comparativ cu calea sistemică de administrare, în principal evitarea toxicității sistemice (sângerări gastro-duodenale) și a efectelor secundare asociate la nivel hepatic și renal, precum și o complianță crescută a pacientului [10,11].

În ultimii ani strategia utilizării căii topice de administrare a AINS-urilor în arsuri este bazată pe utilizarea biopolimerilor biodegradabili și nebiodegradabili ca suporturi potențiale pentru sisteme controlate de cedare a medicamentelor (numite și *pansamente medicamentoase*) [12]. O limitare a celor mai multe sisteme de eliberare a medicamentului pentru arsuri constă în aceea că ele sunt pe bază de polimeri nebiodegradabili și necesită înlocuiri frecvente care determină o suferință suplimentară pacientului și o vătămare a noului țesut epitelial format,

creșcând și riscul unei contaminări secundare [13]. De aceea, polimerii biodegradabili sunt considerați a fi vehicule ideale pentru cedarea medicamentelor. Dintre acești biopolimeri, o atenție considerabilă i se acordă colagenului, datorită proprietăților de biomaterial care-l recomandă în utilizarea ca sistem de transport a medicamentelor, fiind utilizat sub formă de hidrogeluri, membrane, fibre, matrici și materiale compozite, obținute din colagen nedenaturat[14,15]. Unele dintre cele mai frecvent întâlnite vehicule colagenice de cedare a medicamentelor sunt formele poroase (matrici spongioase) obținute prin liofilizare (uscarea prin înghețare urmată de sublimarea apei în vid) a soluțiilor/gelurilor de colagen [16]. Acestea sunt foarte utile în tratarea arsurilor cu diferite grade de afectare cutanată deoarece aderă bine la rănille umede, absorb cantități mari de exudat al țesutului, păstrează un mediu umed și susțin formarea noului țesut granular și epitelial la nivelul leziunii [16,17]. Astfel, colagenul însuși are un potențial semnificativ în vindecarea rănille cutanate datorată unei arsuri, precum și în regenerarea tisulară, și mai mult decât atât în prezența unui medicament antiinflamator poate preveni apariția ulterioară a altor leziuni tisulare cauzate de procesul inflamator [5,9,18]. Proprietățile mecanice și rezistența la degradarea enzimatică *in vivo* a suporturilor colagenice poate fi îmbunătățită prin reacții chimice, utilizând diferiți agenți de reticulare [19].

Pentru a reduce inflamația de la nivelul unei leziuni afectate de arsură, precum și pentru a evita influența unui răspuns inflamator prelungit, este necesară proiectarea unor noi sisteme de cedare controlată a medicamentului care să asigure atât o cedare rapidă a acestuia cât și o eliberare susținută *pe parcursul mai multor ore* [1,2,8,20].

Importanța modelării și controlării cineticii de cedare *in vitro* a medicamentelor din sisteme cu aplicare topică este evidențiată de studiile recente în acest domeniu [7,21]. Astfel, în cazul formelor spongioase cu medicamente antiinflamatoare nesteroidiene, se înregistrează profile de cedare bifazică tipică, cu un pronunțat efect de cedare rapidă a medicamentului, urmată de o cedare lentă, graduală a acestuia care să asigure o concentrație adecvată la locul de administrare [8,18]. Deși astfel de profile cinetice sunt de urmărit în cazul vindecării unor leziuni inflamate *de intensitate redusă*, atunci când se dorește atât o cedare imediată cât și pe termen lung a medicamentului antiinflamator *în cazul unor arsuri de severitate medie*, o limitare a acestor formulări constă în aceea că efectul de cedare rapidă este prea pronunțat în primele ore, existând riscul ca medicamentul să fie cedat într-o cantitate prea mare înainte ca procesul inflamator să fie controlat [8,18,22,23].

În această situație se impune dezvoltarea unor noi sisteme de cedare a medicamentului care să asigure o cedare adecvată a unui medicament antiinflamator din suporturi spongioase

colagenice utilizând diferite tehnici ce permit atât o degradare treptată a suportului colagenic cât și o cedare lentă a medicamentului, *pe parcursul mai multor zile*. În acest sens, sunt propuse *sistemele de cedare multiparticulate topice* pe bază de biopolimeri cu eliberare controlată a unui medicament antiinflamator. Sistemele multiparticulate sunt formulări obținute prin diferite tehnici, medicamentul fiind încapsulat în diverși polimeri, și a căror dimensiune variază de la nm până la mm. Polimerii utilizați pentru prepararea sistemelor multiparticulate sunt de origine naturală, semisintetică sau de sinteză. Prin această tehnică de încapsulare a medicamentului se poate modela și controla viteza de eliberare a acestuia, asigurându-se în acest fel o creștere a eficacității terapeutice și clinice, îmbunătățirea confortului pacientului prin reducerea numărului și frecvenței aplicării, și consecutiv o scădere a costurilor implicate în acordarea asistenței de specialitate.

Până în prezent, au fost dezvoltate diverse sisteme multiparticulate, în special produse cu administrare orală: sisteme multiparticulate pentru eliberarea hemoglobinei (brevet US 2017 224626(A1), morfinei (brevet ZA9809463(B)), milnacipran (brevet WO 2004 067039(A1)), sare de litiu (US 2006 039997(A1)), ribavirin (brevet US 2007 173464(A1)); cu administrare gastrica (brevet NZ516959(A)), AU2015238807(A1), NZ581267(A), US6290989(B1)), dar nu s-au înregistrat compoziții multiparticulate de uz topic.

Sistemele multiparticulate dezvoltate până în prezent au fost descrise în următoarele brevete: WO 2006 091180 (A2) descrie un sistem carrier injectabil obținut prin interacția fucoidanului cu polizaharide, unde fucoidanul este încapsulat în polimer - chitosan. Invenția JP 2016 138136 (A) prezintă o metoda de obținere a unei compoziții de medicament multiparticulat cu cel puțin o suprafața de stabilizator și care formează o multitudine de granule cu diametru de cel mult 2 μm . O altă compoziție de medicament multiparticulat descrisă în brevetul NZ 701898 (A) prezintă o multitudine de granule, fiecare conținând un miez inert, un agent de solubilizare în forma de suprafața activă sau un pH modulator situat lângă substratul inert sau între stratul semipermeabil și stratul de medicament. Brevetul IL 151150 (A) prezintă o formă multiparticulată de medicament adecvată pentru eliberarea uniformă a unui agent farmaceutic în intestinul superior și intestinul inferior, conținând cel puțin două forme de granule, A și B, miezul fiecăreia conținând un agent farmaceutic și cu diferite acoperiri polimerice care permit eliberarea agentului la schimbarea pH-ului. Acest sistem multiparticulat funcționează astfel: granula A este rezistentă la sucul gastric, dar se dizolvă rapid la pH 5,5 iar granula B eliberează mai puțin de 20% din agent la pH 6,8 în 6 ore, iar la pH 7,2 eliberează peste 50% din medicament în 6 ore. Alt sistem multiparticulat descris în US2005181062 (A1) pentru eliberarea controlată a medicamentelor este alcătuit dintr-un medicament cu structură

cristalină, o glicerida cu cel puțin un substituent alchilat cu cel puțin 16 atomi de carbon, și un poloxamer în care intră cel puțin 70% din medicamentul cristalin multiparticulat. Brevetul US 2010068276 (A1) prezintă o compoziție multiparticulată farmaceutică formată dintr-un miez care se topește, un medicament slab solubil în apă și un strat polimeric solid de dispersie amorfă. Brevetul WO 2017 192828 (A1) descrie o altă formă farmaceutică eficientă terapeutic și include o multitudine de particule individuale care conțin un miez - o combinație de ingredient activ dintr-o L-carnitină și o substanță nootropă și stratul de acoperire - un polimer de control al eliberării pe miez, care previne substanțial eliberarea ingredientelor activi în acidul gastric și permite eliberarea ingredientelor active într-un pH al mediului intestinal. Compoziția poate fi utilizată pentru tratarea stărilor asociate cu o reducere a cantității de L-carnitină în organism și / sau a unei tulburări cognitive.

Până în prezent nu au fost dezvoltate sisteme multiparticulate formate dintr-o multitudine de microcapsule având ca miez un medicament – acidul flufenamic și ca strat de acoperire un amestec de polimeri biodegradabili în mediul fiziologic, încorporate într-o matrice spongioasă polimerică liofilizată cu sau fără conținut de medicament. Acest sistem multiparticulat eliberează medicamentul în 2 etape: (1) după contactul sistemului multiparticulat cu mediul de cedare (exudatul leziunii) are loc pătrunderea acestuia în structura poroasă a matricii spongioase, hidratarea rețelei polimerice, umflarea polimerului relaxat cu eliberarea medicamentului reținut liber în rețeaua colagenică (în cazul în care matricea polimerică liofilizată are conținut de medicament), urmată de (2) difuziunea mai lentă, treptată a medicamentului entrapat în rețeaua polimerică în timpul procesului de liofilizare (în cazul în care matricea polimerică liofilizată are conținut de medicament) și în microcapsule, concomitent cu degradarea lentă a microcapsulelor și a suportului colagenic, asigurându-se astfel o *cedare pe parcursul mai multor zile*.

Au mai fost descrise matrici polimerice spongioase cu eliberare directă de medicament, dar nu sisteme multiparticulate în care medicamentul este încapsulat. Cererea de brevet A 00919 / 2012 prezintă un sistem de eliberare controlată a unui medicament de tip antiinflamator nesteroidian (acidul flufenamic) încorporat în formă liberă în suporturi de cedare de tip matrice spongioasă pe bază de amestec de colagen și dextran, reticulate și combinate în anumite proporții care să asigure controlul inflamației după producerea unei *arsuri de intensitate mai redusă*. Spre deosebire de această cerere de brevet, sistemele multiparticulate propuse în prezenta invenție, în care acidul flufenamic este încorporat în formă liberă și încapsulată, respectiv doar în formă încapsulată în matricea polimerică, asigură cedarea medicamentului antiinflamator pe o perioadă mai lungă de timp, de câteva zile, ceea ce are ca

efect reducerea durerii locale în primele 3 zile de la apariția arsurii favorizând vindecarea fără a induce reacții adverse topice. De asemenea datorită microîncapsulării medicamentului are loc reducerea cantității de medicament cedată prea rapid în primele ore, fiind astfel eliminat riscul ca acesta să fie cedat într-o cantitate prea mare înainte ca procesul inflamator să fie controlat. În plus aceste sisteme multiparticulate prezintă și eficiență în vindecarea *arsurilor de severitate medie* induse experimental prin expunerea la agent termic pe o perioadă mai lungă de timp și testate experimental la animalele de experiență.

1. M. Frieri, K. Kumar, An. Boutin, Wounds, burns, trauma, and injury, *Wound Medicine*, 2016, 13, 12-17.
2. J.A. Farina Jr., M.J. Rosique, R.G. Rosique, Curbing inflammation in burn patients, *International Journal of Inflammation*, 2013, article ID 715645, 9 pages.
3. K.C. Chang, H. Ma, W.C. Liao et al., The optimal time for early burn wound excision to reduce pro-inflammatory cytokine production in a murine burn injury model, *Burns*, 2010, 36(7), 1059-1066.
4. A.D. Widgerow, S. Kalaria, Pain mediators and wound healing - establishing the connection, *Burns*, 2012, 38(7), 951-959.
5. G.D. Krischak, P. Augat, L. Claes et al., The effects of non-steroidal anti-inflammatory drug application on incisional wound healing in rats, *Journal of Wound Care*, 2007, 16(2), 76-78.
6. W.H. Su, M.H. Cheng, W.L. Lee. et al., Nonsteroidal anti-inflammatory drugs for wounds: pain relief or excessive scar formation?, *Mediators of Inflammation*, 2010, article ID 413238.
7. M.V Ghica, Elemente fizico-chimice și biofarmaceutice ale sistemelor semisolidе cu acțiune topică. Aplicații la hidrogeluri cu indometacin, *Editura Printech*, București, 2010.
8. M.G. Albu, M. Ferdeș, D.A. Kaya et al., Collagen wound dressings with anti-inflammatory activity, *Mol. Cryst. Liq. Cryst.*, 2012, 555(1), 271-279.
9. Y.C. Chang, J.D. Wang, R.A. Hahn et al., Therapeutic potential of a non-steroidal bifunctional anti-inflammatory and anti-cholinergic agent against skin injury induced by sulfur mustard, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2014, 280(2), 236-244.
10. M. El-Badry, G. Feti, Preparation, characterization and anti-inflammatory activity of celecoxib chitosan gel formulations, *J. Drug Deliv. Sci. Tech.*, 2011, 21(2), 201-206.
11. C.A. Heyneman, C. Lawless-Liday, G.C. Wall, Oral versus topical NSAIDs in rheumatic diseases: a comparison, *Drugs*, 2000, 60, 555-574.

12. S. Huang, X. Fu, Naturally derived materials-based cell and drug delivery systems in skin regeneration, *J. Control. Release*, 2010, 142(2), 149-159.
13. J.J. Elsner, M. Zilberman, Novel antibiotic-eluting wound dressings: An *in vitro* study and engineering aspects in the dressing's design, *J. Tissue Viabil.*, 2010, 19(2), 54-66.
14. F. Puoci, C. Piangiolino, F. Givigliano et al., Ciprofloxacin-collagen conjugate in the wound healing treatment, *J. Funct. Biomater.*, 2012, 3(2), 361-371.
15. M.G. Abu, I. Titorencu, M.V. Ghica, Collagen-based drug delivery systems for tissue engineering In: Biomaterials applications for nanomedicine, R. Pignatello (Ed.), *InTech Open Acces Publisher*, Rijeka, Croatia, 2011, 333-358.
16. M.G. Abu, Collagen gels and matrices for biomedical applications, *Lambert Academic Publishing*, Saarbrücken, 2011.
17. M.S. Kumar, S. Kirubanandan, R. Sripriya et al., Triphala incorporated collagen sponge - a smart biomaterial for infected dermal wound healing, *J. Surg. Res.*, 2010, 158(1), 162-170.
18. M.V. Ghica, M.G. Abu Kaya, C.E. Dinu-Pîrvu, D. Lupuleasa, D.I. Udeanu, Development, optimization and *in vitro/in vivo* characterization of collagen-dextran spongy wound dressings loaded with flufenamic acid, *Molecules*, 2017, 22(9), E1552.
19. L. Zhang, K. Li, W. Xiao et al., Preparation of collagen-chondroitin sulfate-hyaluronic acid hybrid hydrogel scaffolds and cell compatibility *in vitro*, *Carbohydr. Polym.*, 2011, 84, 118-125.
20. AA. Salibian, A.T. Del Rosario, L.A.M. Severo, Current concepts on burn wound conversion - A review of recent advances in understanding the secondary progressions of burns, *Burns*, 2016.
21. M.V. Ghica, M.G. Abu, L. Popa et al., Response surface methodology and Taguchi approach to assess the combined effect of formulation factors on minocycline delivery from collagen sponges, *Pharmazie*, 2013, 68(5), 340-348.
22. H. Ferreira, T. Matama, R. Silva et al., Functionalization of gauzes with liposomes entrapping an anti-inflammatory drug: A strategy to improve wound healing, *React. Funct. Polym.*, 2010, 73, 1328-1334.
23. P. Panday, N. Shukla, D. Sisodiya et al., Design and characterization of microsponge loaded controlled release epicutaneous gel of lornoxicam, *Applied Medical Research*, 2015, 1, 16-21.

Problema tehnică

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția constă în realizarea unui sistem multiparticulat de eliberare controlată a medicamentului, în două etape – o cedare mai rapidă în primele ore urmată de o cedare lentă în următoarele 2 zile așa cum este prezentat în Descrierea stadiului actual, selectarea unui suport polimeric adecvat, un amestec de colagen și dextran, și a unui medicament antiinflamator nesteroidian, acidul flufenamic, încorporat în microcapsule și în suportul polimeric spongios, sau doar în microcapsule, și combinate în anumite proporții astfel încât, medicamentul eliberat să asigure controlul răspunsului inflamator post-leziune.

Soluția tehnică

Sistemele multiparticulate de cedare controlată a medicamentelor conform invenției înlătură dezavantajele menționate prin aceea că sunt constituite din 2 componente de bază, microcapsule cu medicament încorporate într-o matrice spongioasă, descrise după cum urmează:

1. Microcapsulele au fost obținute în prealabil dintr-un gel constituit din următoarele componente, exprimate în procente raportate la 100% gel: a) un polimer natural, gelatină, 2,50% ... 7,50%, obținută din derma pielii de vițel, cu un conținut de 0,5% ... 10% substanță uscată, b) 0,25% ... 0,75% carboximetilceluloză sodică (CMCNa), c) 1,60% ... 2,40% acid flufenamic și d) 0,50% ... 1,50% alginat de sodiu. Procedul de obținere al gelului pentru realizarea (micro)capsulelor, conform invenției, constă în aceea că, în prealabil, alginatul de sodiu și carboximetilceluloza sodică sunt solubilizate în apă distilată și acidul flufenamic în soluție de NaOH 1M, iar apoi au fost adăugate peste gelatină și întreaga compoziție a fost omogenizată. Gelul obținut a fost picurat cu ajutorul unei seringi în soluție de CaCl₂ 1M pentru reticulare și formare de capsule cu formă sferică. Întreg procedul de obținere a fost realizat la temperatura camerei.

În Figura 1 sunt prezentate în imagini exemple de microcapsule (denumite „mc”) optime obținute prin procedul descris anterior și care vor fi utilizate ca exemple în obținerea sistemelor multiparticulate care fac obiectul prezentei invenții.

Din punct de vedere al morfologiei, microcapsulele au prezentat următoarele particularități: (i) o cantitate mai mare de alginat de sodiu a condus la formarea unor microcapsule, mai stabile, omogene și individuale după preparare; (ii) prezența unei cantități mai mare de CMCNa în formulare determină un grad de transparență mai crescut al mc.

În continuare microcapsulele cu acid flufenamic, pe bază de gelatină, carboximetilceluloză sodică și alginat de sodiu sunt caracterizate din punct de vedere al gradului de entrapare al medicamentului, al diametrului și al rezistenței la degradare enzimatică.

Determinarea gradului de entrapare al microcapsulelor a fost evaluat prin metoda diferenței, ținându-se seama de cantitatea inițială de acid flufenamic din gelul folosit la prepararea microcapsulelor și cantitatea de acid flufenamic din soluția de CaCl₂, după îndepărtarea microcapsulelor formate. Cantitatea de acid flufenamic a fost evaluată spectrofotometric, la $\lambda=288$ nm corespunzând maximului de absorbție, utilizând curba de etalonare ($A_{1\%}^{1\text{cm}} = 534$). Obs.: randamentul de obținere al microcapsulelor din geluri a fost peste 98% în toate cazurile și s-a ținut seama și de acesta în determinarea gradului de entrapare a acidului flufenamic în microcapsule. Gradul de entrapare a acidului flufenamic a variat între 74,32 și 89,57%.

Diametrul microcapsulelor a fost determinat utilizând un șubler cu afișaj digital cu 5 cifre, comutabil în mm sau inch. Diametrul a variat între 2,34 și 3,41 mm.

Degradarea enzimatică a microcapsulelor a fost realizată prin monitorizarea pierderii de masă în funcție de timpul de expunere la soluția de collagenază, pentru a simula condițiile fiziologice. Microcapsulele au fost cântărite cu precizie, plasate în soluția de collagenază și incubate la 37°C. La intervale regulate de timp, cuprinse între 5 min și 72 de ore, microcapsulele au fost îndepărtate din soluția de degradare și au fost cântărite. Pierderea de masa a fost determinată folosind ec. (1):

$$\text{Pierdere de masă \%} = \frac{W_i - W_t}{W_i} \times 100 \quad (1)$$

unde W_i - greutatea inițială a microcapsulelor, iar W_t - greutatea înregistrată la timpul t .

Pierderea de masă a variat între 7,69 și 24,68% la 5 min, între 30,76 și 64,01% la 80 min, între 35,71 și 65,57% la 24 de ore, între 45,35 și 79,96% la 48 de ore, respectiv 54,09 și 85,71% la 72 de ore.

Microcapsulele optime obținute au fost încorporate într-un gel cu acid flufenamic și dextran care după reticulare și liofilizare a avut ca rezultat o matrice spongioasă cu microcapsule încorporate.

2. Sistem multiparticulat alcătuit din următoarele componente, exprimate în procente gravimetrice raportate la 100 grame de gel de collagen: a) un polimer natural, collagen fibrilar tip I, obținut din dermă bovină, sub formă de gel, cu structură de triplu helix, cu un conținut de 0,8 1,2% collagen substanță uscată, b) 0,4 0,6% acid flufenamic, solubilizat în prealabil în soluție de hidroxid de sodiu 1M, se adaugă în gelul de collagen, c) dextranul, o polizaharidă, în concentrație de 0% 1,2%, d) 15% 30% microcapsulele al căror

procedeu de obținere a fost prezentat anterior, și e) 0 1,2% agent de reticulare, glutaraldehida ce se amestecă în compoziția finală sub formă de soluție 0,2% ... 0,3% în apă distilată.

Procedeu de obținere a sistemelor multiparticulate constă în aceea că, în prealabil gelul de collagen se amestecă cu soluția de acid flufenamic cu concentrația de 0,4 ... 0,6%. Ulterior se adaugă dextranul cu o concentrație variind între 0% 1,2%, se omogenizează, se ajustează pH-ul la 7,4 cu soluție de hidroxid de sodiu 1M și se adaugă apă distilată până ce compoziția finală a gelului conține între de 0,8% 1,2% collagen substanță uscată. În compozițiile obținute sub formă de gel collagen-acid flufenamic-dextran se imersează 15% ... 30% microcapsule. Ulterior se adaugă agentul de reticulare glutaraldehida în concentrații cuprinse între 0 1,2%, ce se amestecă în compoziția finală sub formă de soluție 0,2% ... 0,3% în apă distilată. Hidrogelul rezultat se lasă la maturat 24 ore la 4°C și apoi se liofilizează 48 de ore. Se obțin astfel sisteme multiparticulate cu acid flufenamic încorporat în formă liberă și încapsulată în matricea spongioasă.

În Figura 2 sunt prezentate câteva imagini ale sistemelor multiparticulate cu acid flufenamic încorporat în formă liberă și încapsulată în matricea spongioasă polimerică, respectiv doar încapsulată, obținute prin procedeu descris anterior.

În continuare sistemele multiparticulate pe bază de acid flufenamic încorporat în formă liberă și încapsulată, respectiv doar în formă încapsulată sunt caracterizate din punct de vedere structural și morfologic, al capacității de umectare, absorbției, degradării enzimatică, cedării medicamentului.

Analiza structurală, dar și morfologică a sistemelor multiparticulate a fost investigată prin studii de microscopie optică, utilizând microscopul optic (LEICA, Model S8AP0, putere mărire: 20-160x). Probele vizualizate prin lumina transmisă au fost analizate cu ajutorul accesoriului destinat luminii polarizate, ce are și opțiunea de a filtra lumina cu ajutorul mai multor tipuri de lentile.

În Figura 3 sunt prezentate imagini obținute prin microscopie optică pentru sistemelor multiparticulate cu acid flufenamic încorporat în formă liberă și încapsulată, respectiv doar în formă încapsulată în matricea spongioasă.

Microscopia optică relevă faptul că sistemele multiparticulate au prezentat o structură poroasă cu porii interconectați, mai compactă cu creșterea cantității de microcapsule. Toate sistemele multiparticulate prezintă structură cu caracteristici favorabile creșterii celulare.

Pentru determinarea capacității de umectare a sistemelor multiparticulate, exprimată prin valoarea unghiului de contact (CA), s-a utilizat aparatul de determinări fizico-chimice KSV

Scientific Instruments prevăzut cu o cameră video pentru capturarea imaginilor și CAM 101 software pentru achiziția datelor. S-a utilizat metoda picăturii suspendate. După dispensarea picăturii de apă distilată din seringă Hamilton pe suprafața buretelui, imaginile picăturii au fost automat analizate, înregistrându-se unghiul de contact. Pentru evaluarea unghiului de contact (unghiul format de tangenta la suprafața lichid/gaz și suprafața liberă a solidului, în punctul de intersecție al celor trei faze) s-a aplicat ecuația Young care descrie din punct de vedere matematic forma picăturii. Unghiul de contact se exprimă în grade.

În Figura 4 sunt prezentate imagini ale formei picăturii obținute la determinarea unghiului de contact pentru sistemele multiparticulate cu acid flufenamic încorporat în formă liberă și încapsulată, respectiv doar în formă încapsulată în matricea spongioasă.

Unghiul de contact reprezintă un indicator util și rapid pentru determinarea gradului de umectare al suprafeței de către fluidele biologice, precum și o modalitate eficientă pentru studiul influenței compoziției asupra hidrofiliei suporturilor de cedare a medicamentului. Astfel, se observă că cele mai mari valori ale unghiului de contact sunt înregistrate pentru suporturile de cedare în care acidul flufenamic este încorporat atât în formă liberă cât și încapsulată în matricea spongioasă (Exemplele 1, 2, 3, 5 și 6). De asemenea, cu creșterea conținutului de microcapsule în suportul spongios, scade capacitatea de umectare a suprafeței (Exemplul 1 comparativ cu Exemplul 2, respectiv Exemplul 5 comparativ cu Exemplul 6). Se constată și valori mai scăzute ale unghiului de contact pentru suporturile de cedare din Exemplele 5 și 6 datorită compoziției gelului de colagen care este nereticulat, respectiv pentru cele din Exemplele 1 și 2 care prezintă un conținut minim de colagen (1%), comparativ cu suportul de cedare corespunzător Exemplului 3 care are o concentrație maximă de colagen și aldehydă glutarică. Valorile înregistrate pentru unghiul de contact indică o capacitate de umectare adecvată a sistemelor multiparticulate cu medicament încorporat în formă liberă și încapsulată, respectiv doar în formă încapsulată în matricea polimerică.

Capacitatea de absorbție a sistemelor multiparticulate a fost determinată printr-o metodă gravimetrică, la 37°C, utilizând ca mediu de absorbție o soluție de tampon fosfat pH 7,4 pentru simularea condițiilor fiziologice. Sistemele multiparticulate au fost cântărite în condiții uscate (W_0) și au fost apoi imersate în mediul de absorbție. La anumite intervale de timp, pe o perioadă de 72 de ore, matricile spongioase polimerice au fost extrase din mediul de absorbție, ținute timp de un minut până când nu se mai formau picături de apă și apoi cântărite (W_t). Capacitatea de absorbție a fost determinată conform ec. (1):

$$\text{Capacitate de absorbție (g/g)} = \frac{W_t - W_0}{W_0} \quad (2)$$

Capacitatea de absorbție a sistemelor multiparticulate este un parametru important ce trebuie luat în considerare în formularea suporturilor medicamentoase destinate utilizării în arsuri. Acest parametru critic în vindecarea unei arsuri este influențat atât de proprietățile biologice ale leziunii, cât și compoziția fizico-chimică a matricii spongioase. Absorbția fluidului a început după imersia buretelui în mediul de absorbție. Cantitatea crescută de fluid reținută în structura poroasă a sistemelor multiparticulatear putea fi atribuită pe de-o parte legării mediului de absorbție de colagen, iar pe de altă parte hidrofiliei crescute a acestuia. Abilitatea de a absorbi o cantitate importantă de fluid favorizează și formarea unui strat de gel după contactul buretelui cu leziunea, asigurând astfel un mediu umed adecvat.

În Figura 5 este redată capacitatea de absorbție (gradul de gonflare) înregistrat după 2 ore și 72 ore pentru sistemele multiparticulate cu acid flufenamic încorporat în formă liberă și încapsulată, respectiv doar în formă încapsulată în matricea polimerică.

După cum se observă în Figura 5, sistemele multiparticulate prezintă capacitate de absorbție bună, demonstrând abilitatea acestora de a absorbi exudat la nivelul unei leziuni cutanate, de a adera la o leziune umedă și de a favoriza formarea unui nou țesut regenerat.

Analiza degradării enzimatică a sistemelor multiparticulate a fost realizată prin monitorizarea pierderii de masă în funcție de timpul de expunere la soluția de colagenază, în mod similar metodei descrise pentru caracterizarea microcapsulelor. Cuantificarea rezistenței la degradare enzimatică s-a realizat cu ajutorul ec. (1).

Controlul vitezei de degradare este un aspect important în vindecarea unei arsuri deoarece rezorbția *in vivo* influențează capacitatea de regenerare tisulară. Astfel, o viteză de degradare mare determină o cedare foarte rapidă a medicamentului din cauza distrugerii suportului de cedare având ca rezultat scăderea eficienței tratamentului, în timp ce o viteză mică de degradare conduce la o întârziere a vindecării țesutului afectat.

Degradarea enzimatică a sistemelor multiparticulate depinde și este determinată de integritatea structurii triple helicoideale a acestuia și de gradul de reticulare, precum și de prezența microcapsulelor în formulare. Rezistența la degradare enzimatică a sistemelor multiparticulate a fost după 48 ore cuprinsă între 84,02% și 100%.

Pentru studiul cedării acidului flufenamic din sistemele multiparticulate cu medicamentul încorporat în formă liberă și încapsulată în matricea polimerică, respectiv doar în formă încapsulată s-a utilizat un echipament de dizolvare prevăzut cu palete (Esadissolver). Sistemele multiparticulate având formă circulară și diametru de 3 cm au fost plasate pe suprafața unui dispozitiv de tip sandwich transdermic care a fost apoi imersat în vasul aparatului de dizolvare. Determinările au fost efectuate la temperatura de 37°C, la o viteză de

rotație de 50 rpm. Mediul de cedare utilizat a fost reprezentat de o soluție de tampon fosfat pH 7,4. La diferite intervale de timp, probe de 5 mL au fost extrase din vasul de cedare și înlocuite cu același volum de tampon fosfat, proaspăt și preîncălzit, pentru menținerea unui volum constant în vasul de cedare. Concentrația de acid flufenamic din fiecare probă a fost determinată spectrofotometric.

A fost studiată influența factorilor de formulare și a modului de încorporare a acidului flufenamic în sistemele multiparticulate asupra profilelor de cedare a medicamentului.

Cinetica de cedare *in vitro* a acidului flufenamic din sistemele multiparticulate cu acid flufenamic încorporat în formă liberă și încapsulată, respectiv doar în formă încapsulată în matricea polimerică, este prezentată comparativ în profilele cinetice cumulate, ilustrate în Figura 6 ca procent de medicament cedat în funcție de timp.

În Figura 7 este prezentată spre exemplificare influența cantității de microcapsule asupra procentului de acid flufenamic cedat din sistemele multiparticulate cu medicament încorporat în formă liberă și încapsulată, respectiv doar în formă încapsulată în matricea polimerică.

În Figura 8 este prezentată spre exemplificare influența factorilor de formulare (compoziția microcapsulelor și compoziția hidrogelului de colagen) asupra procentului de acid flufenamic cedat din sistemele multiparticulate cu medicament încorporat în formă liberă și încapsulată în matricea polimerică.

În Figura 9 este prezentată spre exemplificare influența modului de încorporare (în formă liberă și încapsulată, respectiv doar în formă încapsulată) a acidului flufenamic asupra procentului de medicament cedat din sistemele multiparticulate.

Din analiza Figurilor 6-9 se constată alura similară a profilelor cinetice, cedarea medicamentului având loc în două etape. Într-o primă etapă, în primele 60 de minute, acidul flufenamic este cedat mai rapid, într-un procent cuprins între 14,53% (Exemplul 1) și 21,06% (Exemplul 6). Această comportare cunoscută ca efect „burst release” (mult mai redusă însă comparativ cu eliberarea medicamentului din matrici spongioase în care acesta este încorporat doar în formă liberă) este urmată de o cedare progresivă, graduală a medicamentului antiinflamator pe o perioadă de 48 de ore. Procentul cumulat de acid flufenamic cedat variază după 48 de ore între 84,85% (Exemplul 4) și 96,05% (Exemplul 5). Aceste profile cinetice ce implică două etape de eliberare a medicamentului sunt de dorit pentru controlul local al inflamației și al durerii asociate unei arsuri cutanate. Efectul de cedare rapidă determină reducerea senzației de durere și a cascadei de mediatori proinflamatori cedați la locul leziunii. Cedarea lentă, treptată pe parcursul următoarelor ore oferă un efect antiinflamator și analgezic pentru o perioadă mai lungă de timp necesară vindecării arsurii. Astfel de profile de eliberare

a medicamentului sunt de urmărit pentru tratamentul unei arsuri deoarece primele 12-48 de ore sunt critice în vindecarea acesteia.

Din examinarea profilelor înregistrate în Figurile 6-9 se constată că eliberarea din sistemele multiparticulate în care acidul flufenamic este încorporat doar în formă încapsulată înregistrează o scădere a procentului de medicament cedat. În schimb, prezența acidului flufenamic atât în formă liberă cât și încapsulată determină o creștere a procentului de medicament cedat după 48 de ore, dar și o cedare mai rapidă a medicamentului în primele 60 de minute datorită acidului flufenamic liber.

Încorporarea acidului flufenamic în microcapsule conduce la o eliberare a medicamentului pe o perioadă mai îndelungată de timp, fapt datorat și proprietăților fizico-chimice, morfologice și biologice ale acestora. Cedarea medicamentului din sistemele multiparticulate în care acesta este încorporat în formă liberă și încapsulată în matricea polimerică, respectiv doar în formă încapsulată este mai lentă, întrucât microcapsulele sunt entrapate în rețeaua buretelui colagenic.

Pentru evaluarea mecanismului ce caracterizează cedarea acidului flufenamic din sistemele multiparticulate au fost aplicate datelor experimentale diferite modele cinetice: modelul Legii puterii (ec. (3)) și Higuchi (ec. (4)).

$$\frac{m_t}{m_\infty} = k \cdot t^n \quad (3)$$

$$\frac{m_t}{m_\infty} = k \cdot t^{0,5} \quad (4)$$

unde m_t - cantitatea de substanță medicamentoasă cedată în timp; m_∞ - conținutul total de substanță medicamentoasă din matricile colagenice; m_t / m_∞ - fracția de substanță medicamentoasă cedată la timpul t ; n - exponentul de cedare care indică mecanismul de cedare al medicamentului; k - constantă de viteză de cedare a procesului cinetic.

În tabelul următor sunt prezentate coeficientul de corelație corespunzător cedării acidului flufenamic din sistemele multiparticulate, determinat prin aplicarea modelelor Legii puterii și Higuchi, parametrii cinetici specifici modelului Legii puterii, precum și procentul de medicament cedat.

Matrice spongiosă	Model Higuchi	Model Lege putere	Exponent de cedare	Constantă cinetică (1/min ⁿ)	Procent medicament cedat (%)
Exemplul 1	0,9621	0,9784	0,39	0,048	95,01
Exemplul 2	0,9525	0,9772	0,36	0,059	91,39
Exemplul 3	0,9590	0,9747	0,39	0,044	89,23
Exemplul 4	0,9841	0,9915	0,41	0,033	84,85
Exemplul 5	0,9417	0,9760	0,33	0,075	96,05
Exemplul 6	0,9559	0,9831	0,35	0,064	92,49

După cum se observă în tabelul anterior, valorile înregistrate pentru coeficientul de corelație sunt mai mari pentru modelul Legii puterii ($R > 0,97$) comparativ cu modelul Higuchi, indicând un mecanism cinetic non-Fickian de eliberare al acidului flufenamic din sistemele multiparticulate în care medicamentul este încorporat în formă liberă și încapsulată, respectiv doar în formă încapsulată în matricea polimerică.

Mecanismul cinetic pentru aceste formulări depinde de mai multe procese. Inițial, la nivelul leziunii de tip arsură se găsește o cantitate importantă de exudat care udă suprafața buretelui, fluidul este apoi absorbit și penetrează structura poroasă a sistemului multiparticulat. La contactul sistemului multiparticulat cu leziunea se formează un strat de gel ce favorizează difuzia medicamentului reținut liber la și aproape de suprafață (în cazul sistemelor multiparticulate în care acidul flufenamic este încorporat în formă liberă și încapsulată). Pentru sistemele multiparticulate care conțin acid flufenamic doar sub formă încapsulată, această etapă inițială de cedare a medicamentului este mai lentă. Procesul de absorbție este urmat de hidratarea rețelei polimerice, urmată de gonflarea polimerului relaxat, și respectiv difuziunea mai lentă, graduală a medicamentului din microcapsule, respectiv din forma liberă, entrapate în rețeaua polimerică în timpul procesului de liofilizare, concomitent cu procesul de degradare a suportului de cedare. Prin aceste procese fizico-chimice complexe se explică abaterea de la modelul Higuchi, caracterizat prin aceea că viteza de difuziune a medicamentului este mai mică decât viteza de relaxare a polimerului.

Profilele de cedare ale acidului flufenamic din sistemele multiparticulate cu medicamentul încorporat în formă liberă și încapsulată în matricea polimerică, respectiv doar încapsulată în matricea polimerică, precum și mecanismul cinetic sunt influențate de factorii de formulare (compoziția microcapsulelor și a hidrogelului de colagen), de cantitatea de microcapsule încorporate, precum și de modul de încorporare a acidului flufenamic în sistemele multiparticulate. Prin modularea acestor parametri poate fi controlată cantitatea cedată de medicament, pentru obținerea unor sisteme de cedare cu eliberare optimă a medicamentului

lalocul de administrare și în funcție de indicația terapeutică.

Sistemele multiparticulate cu medicamentul încorporat în formă liberă și încapsulată în matricea polimerică, respectiv doar încapsulată în matricea polimerică, au fost testate pe animale de experiență, și anume 35 șobolani masculi, rasa Wistar, în greutate de aprox. 180 g procurați de la Biobaza U.M.F. „Carol Davila”, București. Animalele ținute în condiții standard de laborator, au primit hrană de 2 ori pe zi și apă *ad libitum*. Experimentele s-au desfășurat conform Directivei 2010/63/UE a Consiliului European privind protecția animalelor utilizate în scopuri științifice și a Legii nr. 43, adoptată de Parlamentul României la data de 11/04/2014.

Animalele au fost distribuite în 7 loturi a câte 5 animale, după cum urmează: Lot 1 – Exemplu 1, Lot 2 – Exemplu 2, Lot 3 – Exemplu 3, Lot 4 – Exemplu 4, Lot 5 – Exemplu 5, Lot 6 – Exemplu 6, Lot 7 – Control netratat.

Model experimental de leziune cutanată indusă prin arsură

Animalele au fost epilate pe zona dorsală și s-a indus o arsură menținând timp de 15 secunde un dispozitiv special cu diametrul de 10mm încălzit în ser fiziologic la 100°C. Sistemele multiparticulate au fost aplicate direct pe arsură și au fost fixate cu o bandă adezivă de mătase. Lotului martor i s-a aplicat un pansament steril pe leziune fixat cu o bandă adezivă de mătase. Starea animalelor și aspectul leziunii au fost evaluate zilnic. Leziunile au fost evaluate macroscopic și fotografiate cu un aparat Olympus. După inducerea experimentală a arsurii la animalele de experiență, leziunea capătă aspectul unei escare albe care evoluează spre o leziune roșiatică datorită declanșării procesului inflamator post-traumatic cu extravazarea eritrocitelor și activarea sistemului imun de apărare. Evoluția diametrului răni a fost măsurată în zilele 1 (inițial), 3, 5, 7, 10, 12, 14 și 17, iar procesul de vindecare al rănilor a fost urmărit comparativ cu lotul netratat.

Procesul de cicatrizare al arsurilor a fost determinat cu ajutorul ec. (5):

$$\text{Cicatrizare \%} = \frac{(\text{Diametrul inițial al leziunii } t=0) - (\text{Diametrul leziunii la timpul } t)}{\text{Diametrul inițial al leziunii } t=0} \quad (5)$$

Prelucrarea statistică a datelor a fost făcută cu ajutorul softului GraphPad Prism 6 (www.graphpad.com). Semnificația statistică a datelor a fost stabilită cu ajutorul testelor ANOVA și testul t-student raportate la lotul de control. Rezultatele au fost considerate semnificative statistic la valori ale $p < 0,05$ și ne semnificative statistic pentru $p > 0,05$.

În Tabelul următor este prezentată evoluția diametrului leziunii (mm) induse experimental prin arsură la șobolanii Wistar în urma tratamentului cu suporturi colagenice cu Sistemele multiparticulate cu medicamentul încorporat în formă liberă și încapsulată în matricea

polimerică, respectiv doar încapsulată în matricea polimerică, respectiv lotului martor tratat clasic cu comprese sterile.

	ZI 1 Media±SD	ZI 3 Media±SD	ZI 5 Media±SD	ZI 7 Media±SD	ZI 10 Media±SD	ZI 12 Media±SD	ZI 14 Media±SD	ZI 17 Media±SD
Exemplul 1	10±0	9±0.1***	6±0.6***	5.25±1.2**	3.75±1.1**	1.7±0.8***	1±1.1	0±0
Exemplul 2	10±0	9.25±0.1***	7±0.6**	6±1.2	5.25±1.1	0.7±0.8	0.5±1.1	0±0
Exemplul 3	10±0	9.8±0.4***	7±2.2**	5.3±1.0*	3.1±1.9	1.7±1.7	0.3±0.5	0±0
Exemplul 4	10±0	9±0***	7.5±0.6**	7±1.2	4.7±0.5*	2.7±1.9***	0.75±1.5	0±0
Exemplul 5	10±0	8.5±1.0***	7.5±1.3**	5.5±1.3*	5±1.2	2.5±1.0*	0.5±1	0±0
Exemplul 6	10±0	9±0***	7.7±0.5*	6.7±1.0	5±1.2	2.2±2.2	0.75±1.5	0±0
Control	10±0	11.75±0.4***	10.7±0.4*	8.7±1.2	7.8±1.1	5.5±0.5	2±2.0	1±1.4
ANOVA (P)	NS	P<0.0001	P<0.0001	0.0012	P<0.0001	P=0.0043	NS	NS

SD = deviația standard, NS = nesemnificativ statistic.

Testul t-student ***p<0,001, **p<0,01, *p<0,05

În Figura 10 este prezentată evoluția procesului de vindecare al arsurilor induse experimental la șobolanii Wistar și tratate cu sistemele multiparticulate cu medicamentul încorporat în formă liberă și încapsulată în matricea polimerică, respectiv doar încapsulată în matricea polimerică (Exemplele 1-6) comparativ cu lotul martor tratat cu comprese sterile.

În Figura 11 este prezentat procesul macroscopic de cicatrizare al leziunilor induse prin arsură la șobolani Wistar în urma tratamentului cu sistemele multiparticulate cu medicament încorporat în diferite variante (Exemplele 1-6) comparativ cu lotul martor tratat cu comprese sterile.

Din tabelul anterior și Figurile 10 și 11, se observă faptul că aplicarea sistemelor multiparticulate a avut un efect mult mai favorabil în vindecarea leziunilor comparativ cu lotul martor căruia i-a fost aplicat tratamentul clasic cu comprese sterile.

Astfel, tratamentul cu sistemele multiparticulate au avut un efect benefic asupra procesului inflamator post-traumatic, influențând pozitiv procesul de vindecare în zilele 3, 5 și 7, perioadă considerată critică în evoluția procesului de cicatrizare.

În cazul aplicării sistemului multiparticulat Exemplul 5, diametrul leziunii scade în primele 3 zile cu aproximativ 15%, fiind cea mai favorabilă evoluție a procesului de vindecare din toate tratamentele aplicate pentru această perioadă de timp. Scăderi semnificative statistic se obțin și în cazul tratamentului cu sistemele multiparticulate Exemplul 1, Exemplu 4 și Exemplul 6 cu un proces de cicatrizare de 10% față de inițial.

După 5 zile de la inducerea leziunii, se observă cea mai mare scădere a diametrului leziunii dintre toate loturile tratate în cazul sistemului multiparticulat Exemplul 1 de 40 % față de inițial. O scădere semnificativă (p<0,01) se observă și în cazul tratamentului cu sistemele

multiparticulate Exemplul 2 și Exemplul 3 de 30%, precum și în cazul Exemplelor 4 și 5 de 25 % ($p < 0,05$) după 5 zile.

Un proces evolutiv accelerat comparativ cu martorul se observă în următoarele 7 zile pentru sistemele multiparticulate luate în studiu, în ordine descrescătoare după cu urmează: Exemplul 1, Exemplul 3, Exemplul 5, Exemplul 2, Exemplul 6 și Exemplul 4.

În cazul loturilor tratate cu sistemele multiparticulate căderea crustei a fost observată la animale începând cu ziua 12 de tratament comparativ cu lotul de control. Majoritatea animalelor din cadrul seriilor tratate sunt complet vindecate după 2 săptămâni. În cazul lotului de control, procesul de vindecare a fost întârziat depășind 17 zile de la inducerea leziunii.

Administrarea sistemelor multiparticulate cu medicamentul încorporat în formă liberă și încapsulată în matricea polimerică a avut un efect benefic asupra vindecării arsurilor, biopolimerii oferind un suport de refacere tisulară locală. Prezența în sistemele multiparticulate a medicamentului antiinflamator are un efect de reducere a durerii locale post-traumatice și a demonstrat un efect pozitiv asupra evoluției procesului de vindecare din primele zile fără efecte secundare asupra sistemului imun din prima barieră de apărare la nivel topic.

Scurtă descriere a desenelor

Figura 1 prezintă imagini ale microcapsulelor pe bază de gelatină, carboximetilceluloză sodică, acid flufenamic și alginat de sodiu, obținute prin procedeul descris anterior.

Figura 2 prezintă imagini ale sistemelor multiparticulate cu acid flufenamic încorporat în formă liberă și încapsulată în matricea polimerică, respectiv doar în formă încapsulată în matricea polimerică, obținute prin procedeul descris anterior: a) Exemplul 1; b) Exemplul 2; c) Exemplul 3; d) Exemplul 4; e) Exemplul 5; f) Exemplul 6.

Figura 3 prezintă imagini obținute prin microscopie optică pentru sistemelor multiparticulate cu acid flufenamic încorporat în formă liberă și încapsulată în matricea polimerică, respectiv doar în formă încapsulată în matricea polimerică: a) Exemplul 1; b) Exemplul 2; c) Exemplul 3; d) Exemplul 4; e) Exemplul 5; f) Exemplul 6.

Figura 4 prezintă imagini ale formei picăturii înregistrate la determinarea unghiului de contact pentru pentru sistemelor multiparticulate cu acid flufenamic încorporat în formă liberă și încapsulată în matricea polimerică, respectiv doar în formă încapsulată în matricea polimerică: a) Exemplul 1; b) Exemplul 2; c) Exemplul 3; d) Exemplul 4; e) Exemplul 5; f) Exemplul 6.

Figura 5 prezintă capacitatea de absorbție înregistrată după 2 ore și 72 ore pentru sistemelor multiparticulate cu acid flufenamic încorporat în formă liberă și încapsulată în matricea polimerică, respectiv doar în formă încapsulată în matricea polimerică.

Figura 6 prezintă cedarea cumulativă a acidului flufenamic din sistemelor multiparticulate cu acid flufenamic încorporat în formă liberă și încapsulată în matricea polimerică, respectiv doar în formă încapsulată în matricea polimerică.

Figura 7 prezintă influența cantității de microcapsule asupra procentului de acid flufenamic cedat din sistemelor multiparticulate cu acid flufenamic încorporat în formă liberă și încapsulată în matricea polimerică, respectiv doar în formă încapsulată în matricea polimerică.

Figura 8 prezintă influența factorilor de formulare (compoziția microcapsulelor și compoziția hidrogelului de colagen) asupra procentului de acid flufenamic cedat din sistemelor multiparticulate cu acid flufenamic încorporat în formă liberă și încapsulată în matricea polimerică.

Figura 9 prezintă influența modului de încorporare a acidului flufenamic asupra procentului de medicament cedat din sistemele multiparticulate.

Figura 10 prezintă evoluția procesului de vindecare al arsurilor induse experimental la șobolanii Wistar și tratate cu sistemelor multiparticulate cu acid flufenamic încorporat în formă liberă și încapsulată în matricea polimerică, respectiv doar în formă încapsulată în matricea polimerică: Exemplele 1, 2, 3, 4, 5 și 6 comparativ cu lotul martor tratat cu comprese sterile.

Figura 11 prezintă procesul macroscopic de cicatrizare al leziunilor induse prin arsură la șobolani Wistar în urma tratamentului cu sistemelor multiparticulate cu acid flufenamic încorporat în formă liberă și încapsulată în matricea polimerică, respectiv doar în formă încapsulată în matricea polimerică: Exemplele 1,2,3,4,5 și 6 comparativ cu lotul martor tratat cu comprese sterile.

Avantajele invenției în raport cu stadiul tehnicii:

Aplicarea invenției conduce la următoarele avantaje:

- utilizarea unui sistem multiparticulat de cedare topică a unui medicament antiinflamator, pe bază de polimeri biodegradabili, cu compatibilitate tisulară crescută și efecte pozitive în vindecarea arsurilor, care asigură eliberarea medicamentului direct la locul de acțiune, cu menținerea unei concentrații suficiente și eficiente exercitării efectului terapeutic la nivelul leziunii;

- evitarea toxicității sistemice (în special sângerări gastro-duodenale) și a efectelor secundare asociate la nivel hepatic și renal, precum și asigurarea unei compliance crescute a pacientului;
- utilizarea sistemelor multiparticulate în care acidul flufenamic este încorporat în formă liberă și încapsulată, respectiv doar în formă încapsulată în matricea polimerică, având proprietăți fizico-chimice, morfologice, biologice și biofarmaceutice adecvate care permit: (i) atât o cedare bifazică a medicamentului antiinflamator, cu reducerea eliberării rapide în primele ore eliminând riscul ca medicamentul să fie cedat într-o cantitate prea mare înainte ca procesul inflamator să fie controlat, și o eliberare graduală, lentă pe parcursul a 48 de ore corespunzătoare perioadei critice a unei arsuri, cât și (ii) o degradare treptată a suportului colagenic;
- reducerea durerii locale post-traumatice în primele 3 zile de la apariția unei arsuri de severitate medie, fără a induce reacții adverse topice;
- efect pozitiv asupra evoluției procesului de vindecare din primele zile ale arsurilor de severitate medie induse experimental prin expunerea la agent termic pe o perioadă mai lungă de timp și testate experimental la animalele de experiență;
- sistemele multiparticulate în care acidul flufenamic este încorporat în formă liberă și încapsulată în matricea polimerică, respectiv doar în formă încapsulată în matricea polimerică, asigură o creștere a eficacității terapeutice și clinice, îmbunătățirea confortului pacientului prin reducerea numărului și frecvenței aplicării, și consecutiv o scădere a costurilor implicate în acordarea asistenței de specialitate.

Descrierea detaliată a invenției:

Gelul de colagen fibrilar tip I obținut din piele bovină, având o concentrație de colagen de 0,8 până la 1,2% (g/g) este utilizat în această invenție. Gelul trebuie să aibă o anumită puritate, să nu conțină grăsimi și cenușă. pH-ul gelului trebuie să fie acid: 2,2 până la 3,5.

Gelatina utilizată în această invenție este obținută prin hidroliza gelului de colagen, având o concentrație de 2,50% 7,50% în obținerea microcapsulelor.

Dextranul din *Leuconostoc ssp.* utilizat în această invenție în procent de 0 până la 1,2%, este o polizaharidă comercială cu masa moleculară de aprox. 500.000 Da. Se poate utiliza și dextran cu mase moleculare mai mici. Prezintă biocompatibilitate tisulară crescută și are capacitatea de a crește stabilitatea *in vitro* a colagenului și a scădea imunogenicitatea acestuia. Are un potențial crescut în stimularea vindecării unei leziuni cutanate.

Carboximetilceluloza sodică este sarea de sodiu a eterului poli (O-carboximetilic) al celulozei. Este un polimer formator de gel, biocompatibil, biodegradabil și care favorizează

reepitelizarea. Este utilizată în această invenție în obținerea microcapsulelor în procent de 0,25%0,75%.

Alginatul de sodiu este un polimer ușor solubil în apă, cu o biocompatibilitate tisulară crescută și efecte benefice în vindecarea unei leziuni cutanate. În prezenta invenție este utilizat în concentrație de 0,50% 1,50% pentru obținerea microcapsulelor.

Acidul flufenamic este din punct de vedere chimic un derivat de acid antranilic și anume acidul 2-{{3-(Trifluorometil) fenil}amino}benzoic. Acidul flufenamic utilizat în această invenție este o substanță medicamentoasă comercială, care se prezintă sub formă de pulbere cristalină, slab gălbuie, fără miros sau cu miros foarte slab și cu gust foarte slab amar. Valoarea constantei de disociere pK_a este 3,9, iar coeficientul de partiție log P (octanol/apă) este 5,2. Acidul flufenamic inhibă ambele forme ale ciclooxigenazei implicate în biosinteza prostaglandinelor. Și-a demonstrat efectul antiinflamator și analgezic în diferite formulări topice destinate afecțiunilor reumatice. Mai pot fi utilizate și alte medicamente antiinflamatoare nesteroidiene cu ar fi: acidul niflumic, acidul mefenamic, acidul tolfenamic, acidul meclofenamic, diclofenacul, aceclofenac, indometacinul, ibuprofenul, naproxenul, flurbiprofenul, ketoprofenul, fenilbutazona, piroxicamul, tenoxicamul, meloxicamul, nimesulidul în procent de 0,1 ... 1%.

Agentul de reticulare este glutaraldehida care trebuie să fie în concentrație de 0%1,5% raportată la conținutul de colagen. Glutaraldehida selectată ca agent de reticulare scade imunogenicitatea colagenului și îi crește rezistența la degradare enzimatică.

Invenția va fi explicată mai în detaliu prin următoarele exemple:

Exemplul 1

În această invenție microcapsulele au fost constituite din următoarele componente, exprimate în procente raportate la 100% gel: a) un polimer natural, gelatină, 2.5% obținută din derma pielii de vițel, b) 0,25% carboximetilceluloză sodică (CMCNa), c) 2,4% acid flufenamic și d) 1 % alginat de sodiu.

Procedeul de obținere al gelului pentru realizarea (micro)capsulelor, conform invenției, constă în aceea că, în prealabil, alginatul de sodiu și carboximetilceluloza sodică sunt solubilizate în apă distilată și acidul flufenamic în soluție de NaOH 1M, iar apoi au fost adăugate peste gelatină și întreaga compoziție a fost omogenizată. Gelul obținut a fost picurat cu ajutorul unei seringi în soluție de $CaCl_2$ 1M pentru reticulare și formare de capsule cu formă sferică întreg. Procedeul de obținere a fost realizat la temperatura camerei.

Sistemele multiparticulate cu acid flufenamic, dextran și microcapsule sunt alcătuite din următoarele componente, exprimate în procente gravimetrice raportate la 100 de grame de gel de colagen: a) un polimer natural, colagen fibrilar tip I, obținut din dermă bovină, sub forma de gel, cu structură de triplu helix, cu un conținut de 0,8% colagen substanță uscată, b) 0,4% acid flufenamic, solubilizat în prealabil în soluție de hidroxid de sodiu 1M, se adaugă în colagenul gel, c) dextranul, o polizaharidă, în concentrație de 0,96% d) 30% microcapsulele al căror procedeu de obținere a fost prezentat anterior și e) 0,48% agent de reticulare, glutaraldehida care se amestecă în compoziția finală sub formă de soluție 0,25% în apă distilată.

Procedeu de obținere a sistemelor multiparticulate cu acid flufenamic, dextran și microcapsule constă în aceea că, în prealabil gelul de colagen se amestecă cu soluția de acid flufenamic, se omogenizează, se ajustează pH-ul la 7,4 cu hidroxid de sodiu 1M și se adaugă apă distilată până ce compoziția finală a gelului conține 0,8% colagen substanță uscată. Ulterior se adaugă dextranul. În compozițiile obținute sub formă de gel colagen-acid flufenamic-dextran se imersează microcapsulele în diferite proporții. Ulterior se adaugă agentul de reticulare. Hidrogelul rezultat se lasă la maturat 24 ore la 4°C și apoi se liofilizează 48 de ore. Se obțin sisteme microparticulate sub formă de matrici spongioase din colagen – dextran cu microcapsule din gelatină-alginat-CMCNa și acid flufenamic încorporate în aceasta.

Exemplul 2

Microcapsulele au fost obținute prin procesul descris în Exemplul 1, exceptând faptul că au fost încorporate în proporție de 15% în matricile spongioase. Sistemele multiparticulate au fost obținute prin procedeu descris în Exemplul 1, cu un conținut mai mic de medicament.

Exemplul 3

Microcapsulele au fost obținute prin procesul descris în Exemplul 1 exceptând cantitățile de gelatină, CMCNa și acid flufenamic care au fost de 7,5%, 0,75% și respectiv 2%, alginatul de sodiu fiind în același procent de 1% și au fost încorporate în proporție de 15% în matricile spongioase. Sistemele multiparticulate au fost obținute prin procedeu descris în Exemplul 1, exceptând compoziția care conține 1,2% colagen, 0,72% dextran, 0,6% acid flufenamic și reticulate cu 0,144% glutaraldehidă.

Exemplul 4

Microcapsulele au fost obținute prin procesul descris în Exemplul 1 exceptând cantitățile tuturor componentelor, care au fost de 7,5% gelatină, 0,5% CMCNa, 2% acid flufenamic și 1,5% alginat de sodiu și au fost încorporate în proporție de 30% în sistemul multiparticulat.

Sistemele multiparticulate au fost obținute prin procedeul descris în Exemplul 1, exceptând compoziția care conține 1% colagen, 1,2% dextran, nu conține acid flufenamic și nu este reticulată (0% glutaraldehidă).

Exemplul 5

Microcapsulele au fost obținute prin procesul descris în Exemplul 4 și au fost încorporate în proporție de 30% în sistemul multiparticulat. Sistemele multiparticulate au fost obținute prin procedeul descris în Exemplul 4, exceptând compoziția care conține 0,5% acid flufenamic.

Exemplul 6

Microcapsulele au fost obținute prin procesul descris în Exemplul 5 exceptând faptul că au fost introduse în proporție de 15% în sistemul multiparticulat.

Sisteme multiparticulate de cedare controlată a acidului flufenamic din matricile colagen-dextran în care a fost încorporat pe de-o parte în formă liberă și pe de altă parte în formă încapsulată în microcapsulele dintr-un amestec polimeric gelatină-CMCNa-alginat de sodiu, respectiv doar în formă încapsulată în microcapsulele dintr-un amestec polimeric gelatină-CMCNa-alginat de sodiu, au fost obținute și demonstrată capacitatea de eliberare controlată bifazică a medicamentului, precum și un efect pozitiv asupra evoluției procesului de vindecare al unei arsuri de severitate medie induse experimental prin expunerea la agent termic pe o perioada mai lungă de timp și testate experimental la animalele de experiență.

REVENDICĂRI

1. Sisteme topice multiparticulate de cedare controlată a medicamentului antiinflamator cu suport biopolimeric, cu utilizări în medicină, în special în leziuni cutanate sau arsuri **caracterizate prin aceea că** sunt constituite din două componente de bază, microcapsule cu medicament încorporate într-o matrice spongioasă.
2. Microcapsulele **caracterizate prin aceea că** au fost obținute în prealabil dintr-un gel constituit din următoarele componente, exprimate în procente raportate la 100% gel: a) un polimer natural, gelatină, 2,50% 7,50%, obținută din derma pielii de vițel, cu un conținut de 0,5% ... 10% substanță uscată, b) 0,25% ... 0,75% carboximetilceluloză sodică (CMCNa), c) 1,60%2,40% acid flufenamic și d) 0,50% 1,50% alginat de sodiu.
3. Procedeu de obținere al gelului pentru realizarea (micro)capsulelor definite în revendicarea 2, **caracterizat prin aceea că**, în prealabil, alginatul de sodiu și carboximetilceluloza sodică sunt solubilizate în apă distilată și acidul flufenamic în soluție de NaOH 1M, iar apoi au fost adăugate peste gelatină și întreaga compoziție a fost omogenizată. Gelul obținut a fost picurat cu ajutorul unei seringi în soluție de CaCl₂ 1M pentru reticulare și formare de capsule cu formă sferică.
4. Sistemul multiparticulat definit în revendicarea 1, **este caracterizat prin aceea că** este alcătuit din următoarele componente, exprimate în procente gravimetrice raportate la 100 grame de gel de collagen: a) un polimer natural, collagen fibrilar tip I, obținut din dermă bovină, sub formă de gel, cu structură de triplu helix, cu un conținut de 0,8%.... 1,2% collagen substanță uscată, b) 0,4 ... 0,6% acid flufenamic, solubilizat în prealabil în soluție de hidroxid de sodiu 1M, se adaugă în gelul de collagen, c) dextranul, o polizaharidă, în concentrație de 0% 1,2%, d) 15%30% microcapsule definite în revendicarea 2 și e) 0 1,2% agent de reticulare, glutaraldehida ce se amestecă în compoziția finală sub formă de soluție 0,2% ... 0,3% în apă distilată.
5. Procedeu de obținere a sistemelor multipticulate definite în revendicarea 4, **este caracterizat prin aceea că**, în prealabil gelul de collagen se amestecă cu soluția de acid flufenamic cu concentrația de 0,4 ... 0,6%. Ulterior se adaugă dextranul cu o concentrație variind între 0% 1,2%, se omogenizează, se ajustează pH-ul la 7,4 cu soluție de hidroxid de sodiu 1M și se adaugă apă distilată până ce compoziția finală a gelului conține între de 0,8% 1,2% collagen substanță uscată. În compozițiile obținute sub formă de gel collagen-acid flufenamic-dextran se imersează 15% ... 30% microcapsule. Ulterior se adaugă agentul de reticulare glutaraldehida în concentrații cuprinse între 0 1,2%, ce se

amestecă în compoziția finală sub formă de soluție 0,2% ... 0,3% în apă distilată. Hidrogelul rezultat se lasă la maturat 24 ore la 4°C și apoi se liofilizează 48 de ore. Se obțin astfel sisteme multiparticulate cu acid flufenamic încorporat în formă liberă și încapsulată în matricea polimerică.

FIGURI



Figura 1

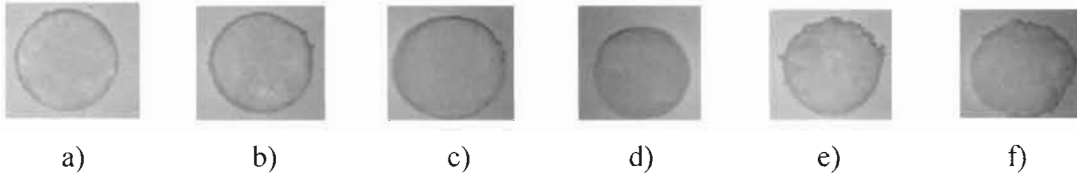


Figura 2

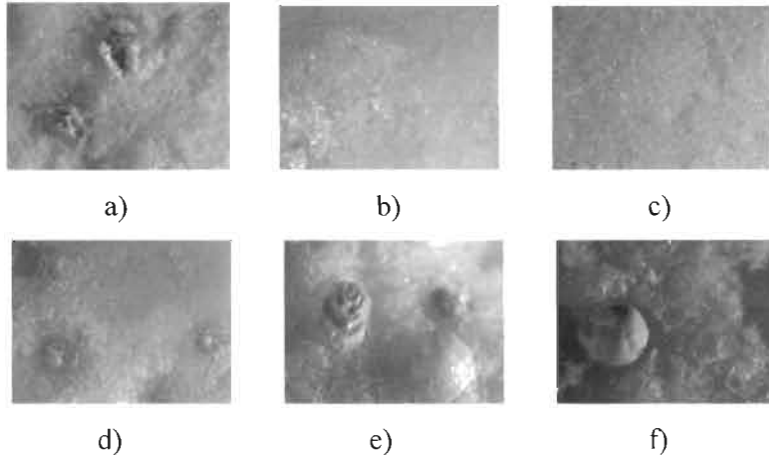


Figura 3



a) $CA=91,51^\circ$ b) $CA=86,28^\circ$ c) $CA=95,48^\circ$ d) $CA=83,18^\circ$ e) $CA=90,40^\circ$ f) $CA=84,82^\circ$

Figura 4

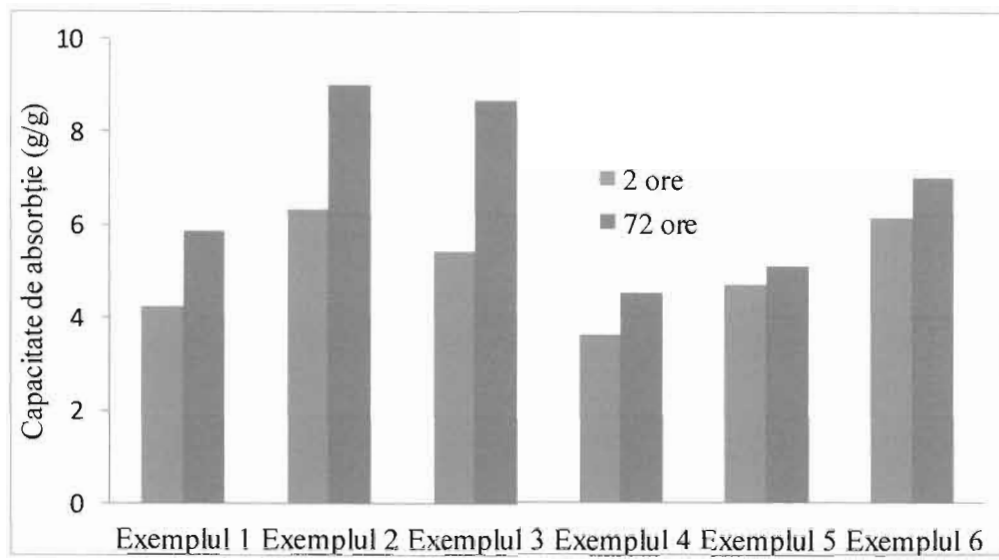


Figura 5

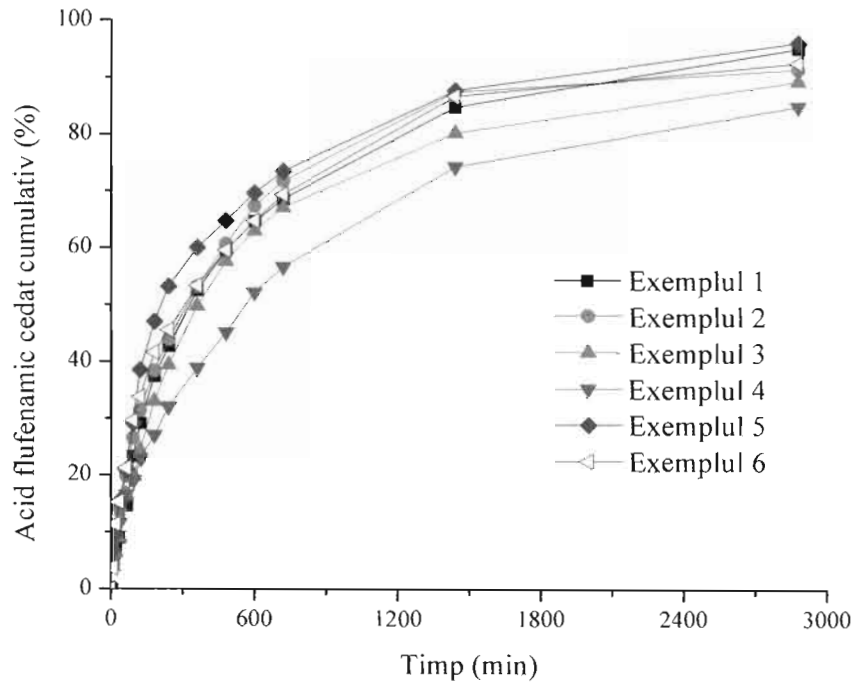


Figura 6

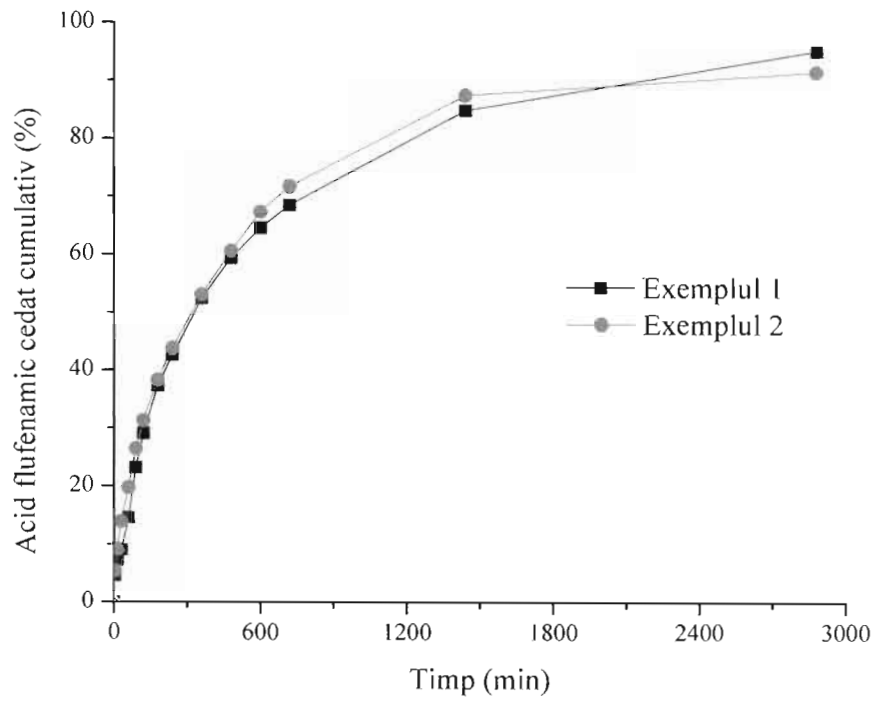


Figura 7

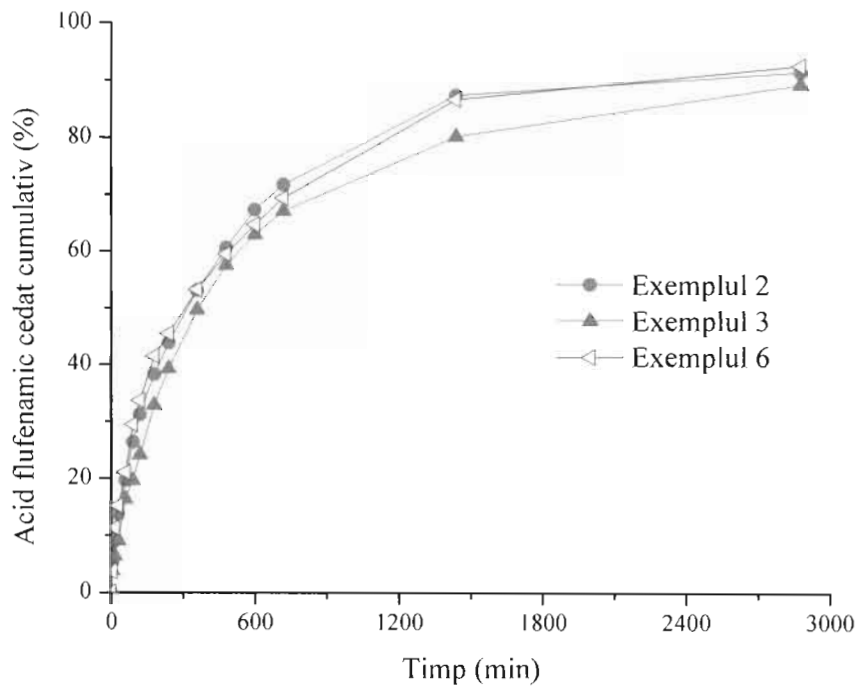


Figura 8

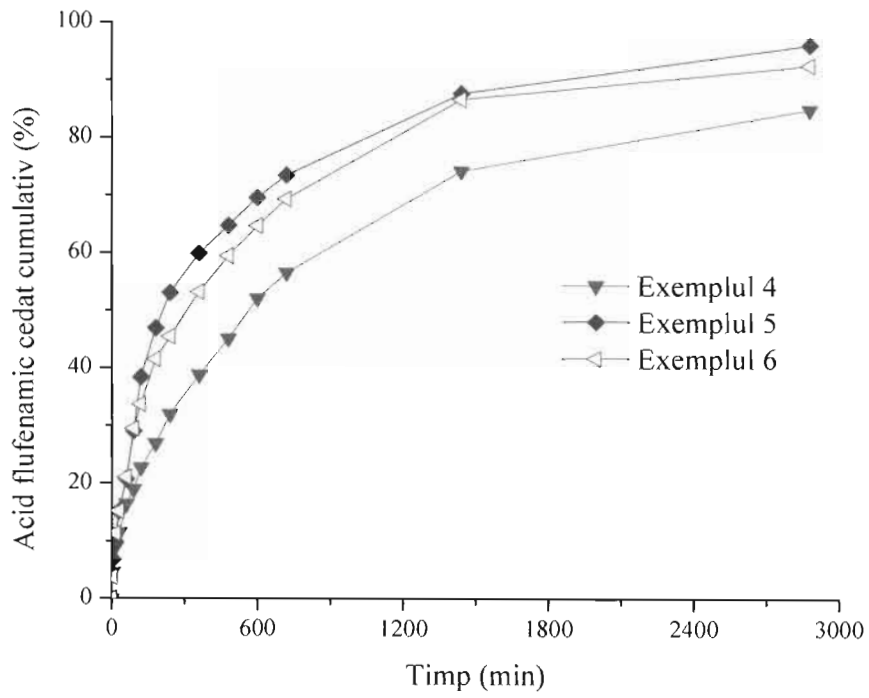


Figura 9

75

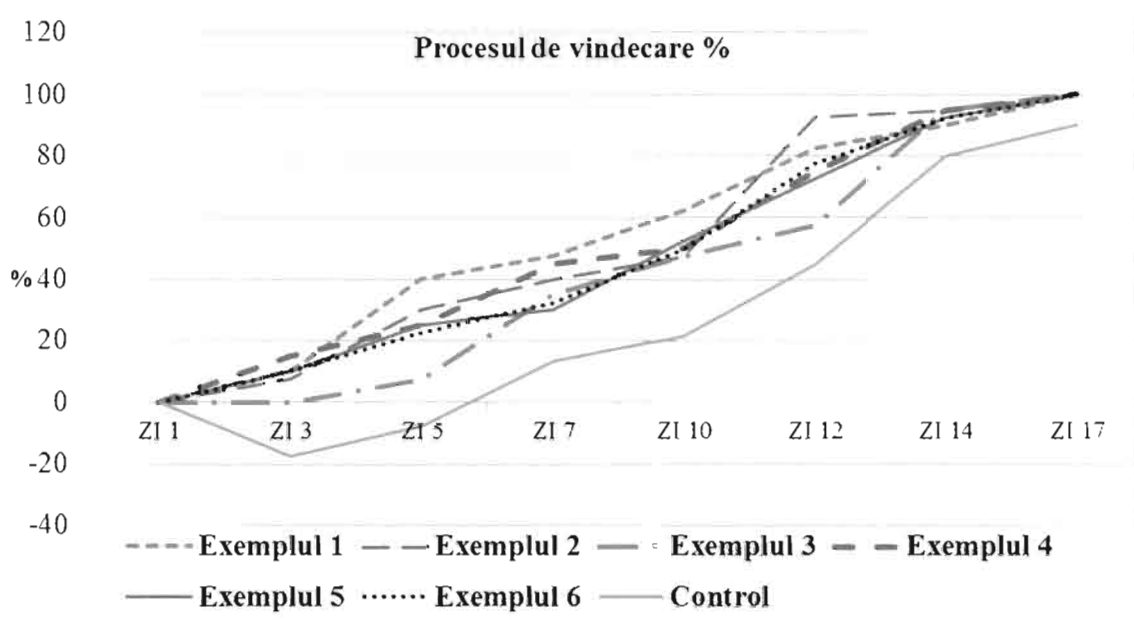


Figura 10

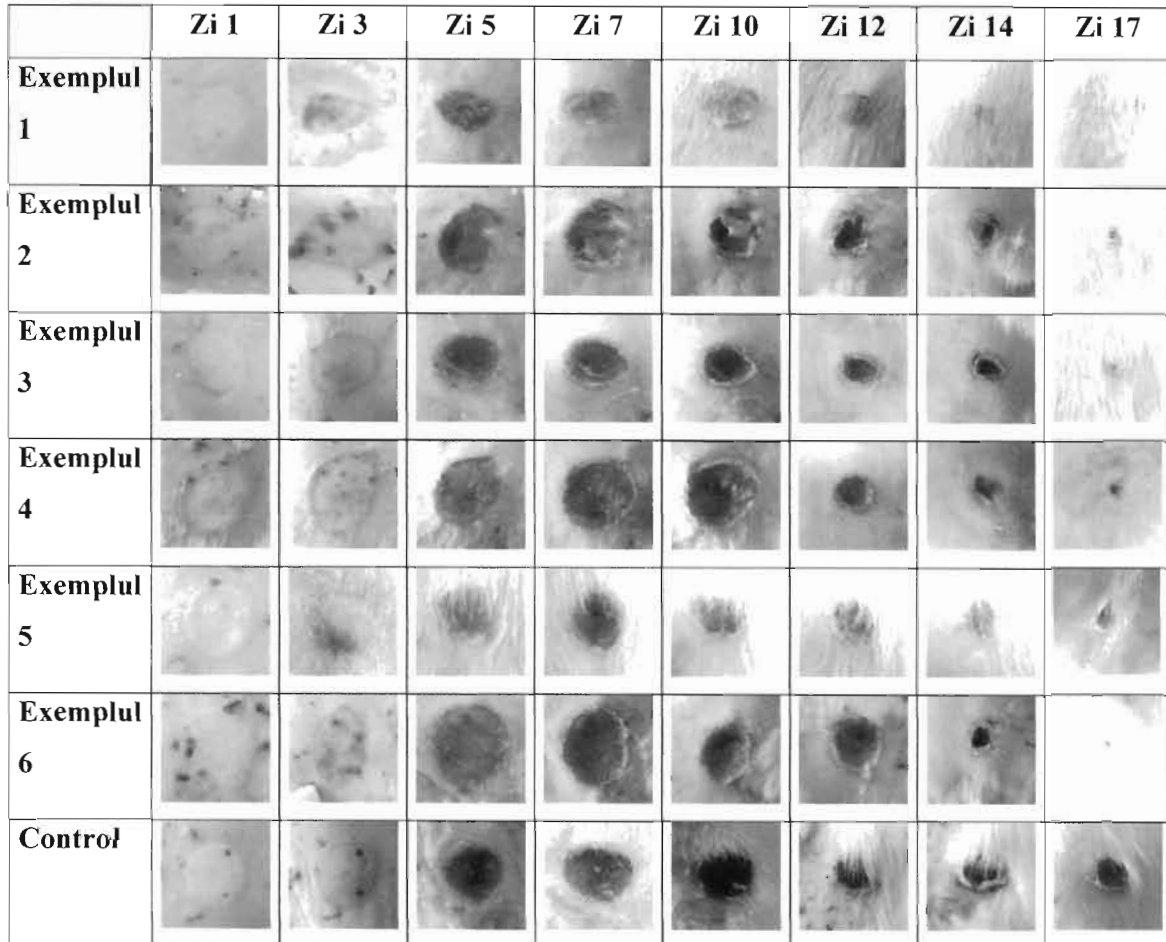


Figura 11

REVENDICĂRI

1. Sistem multiparticulat de cedare controlată a unui medicament antiinflamator utilizat în tratarea arsurilor de severitate medie **caracterizat prin aceea că** este constituit în procente gravimetrice raportate la 100 g de gel de colagen, dintr-un suport polimeric constând dintr-un amestec de colagen fibrilar tip I având un conținut de 0,8...1,2% colagen substanță uscată, până la 0,6% acid flufenamic și până la 1,2% dextran, până la 1,2% un agent de reticulare de tip glutaraldehidă, precum și 15...30% microcapsule alcătuite din 2,50...7,50% gelatină, 0,25...0,75% carboximetilceluloză sodică, 1,60...2,40% acid flufenamic și 0,50...1,50% alginat de sodiu.
2. Procedeu de obținere a sistemului definit în revendicarea 1 **caracterizat prin aceea că** se amestecă în prealabil gelul de colagen cu soluția de acid flufenamic, se adaugă dextran, se ajustează pH la 7,4 cu o soluție de hidroxid de sodiu 1M și se adaugă apă distilată până la un conținut final al gelului de 0,8...1,2% colagen substanță uscată, în care se imersează 15...30% microcapsule și se adaugă glutaraldehida sub formă de soluție de concentrație 0,2...0,3% în apă distilată, hidrogelul rezultat se lasă la maturat 24 ore la 4°C și apoi se liofilizează 48 de ore, rezultând un sistem multiparticulat cu acid flufenamic în forma liberă și încapsulată, respectiv în formă încapsulată, cu cedare controlată bifazică a medicamentului pe o perioadă de 48h.