



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2020 00385

(22) Data de depozit: 06/07/2020

(41) Data publicării cererii:  
28/02/2022 BOPI nr. 2/2022

(71) Solicitant:  
• UNIVERSITATEA TEHNICĂ DIN CLUJ  
NAPOCA, STR. MEMORANDULUI, NR.28,  
CLUJ - NAPOCA, CJ, RO

(72) Inventatori:  
• PAȘCALĂU VIOLETA, STR.HAȚEG,  
BLOC LAMA G, SC.2, AP.55,  
CLUJ - NAPOCA, CJ, RO;  
• POPA CĂTĂLIN, STR.DONATH NR.113,  
AP.19, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;

• PAVEL CODRUȚA,  
STR.ALEXANDRU BOHAȚIEL NR.16,  
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;  
• CSAPAI ALEXANDRA,  
ALEEA HERCULANE, NR.6, SC.1, AP.21,  
CLUJ - NAPOCA, CJ, RO

(74) Mandatar:  
CABINET DE PROPRIETATE  
INDUSTRIALĂ CIUPAN CORNEL, STR.  
MESTECENILOR NR. 6, BL. 9E, SC.1, AP.  
2, CLUJ NAPOCA, CJ

(54) MICROCAPSULE NUCLEU - ÎNVELIȘ PE BAZĂ DE MATERII  
PRIME NATURALE CU APLICAȚII ÎN SISTEME  
DE TRANSPORT ȘI ELIBERARE LA ȚINTĂ  
A MEDICAMENTELOR ȘI PROCEDEU DE OBTINERE  
A ACESTORA

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unor microcapsule nucleu-înveliș cu aplicații în sisteme de transport și eliberare la țintă a medicamentelor. Procedeul, conform invenției, constă în următoarele etape: formarea unui nucleu care conține o matrice (6) de gel de albumină serică bovină (BSA) destinată transportului substanțelor active, formarea unui înveliș (2) multistrat prin tehnica depunerii strat cu strat, a unui strat (3) de hidrogel reticulat cu Ca<sup>2+</sup> al polizaharidei anionice, urmat de n straturi de complex polielectrolitic format

între hidrogel și polizaharida cationică (4) și respectiv între polizaharida anionică și cea cationică (5), urmată de o etapă de eliminare a componentei anorganice, rezultând microcapsule biocompatibile stabile, cu componente naturale, având capacitate de încapsulare a compușilor biologic activi, de transport și eliberarea controlată a acestora la ținta terapeutică.

Revendicări: 6  
Figuri: 3



4

## MICROCAPSULE NUCLEU-ÎNVELIȘ PE BAZĂ DE MATERII PRIME NATURALE CU APLICAȚII ÎN SISTEME DE TRANSPORT ȘI ELIBERARE LA ȚINTĂ A MEDICAMENTELOR ȘI PROCEDEU DE OBTINERE A ACESTORA

Invenția are ca domeniu de aplicare sistemele de eliberare controlată a medicamentelor, definite ca biomateriale biocompatibile și biodegradabile, sintetizate din materii prime naturale sau sintetice, cu rol de înglobare, depozitare, transport și administrare în interiorul organismului a agenților biologic activi, în scop terapeutic, care urmăresc eliberarea acestora la locul tratamentului și la aceeași concentrație pe întreaga durată a tratamentului. Procedul și materialele produse conform invenției se referă la biomateriale de tip moale (engleză-soft) utilizate în sistemele de eliberare controlată a medicamentelor, sub formă de microcapsule de tip nucleu-înveliș, biodegradabile și biocompatibile, sintetizate în întregime din materii prime naturale, de origine vegetală și animală, utilizate atât în industria alimentară cât și/sau în cea farmaceutică.

Reorganizarea materiei de la molecule simple aranjate dezordonat la structuri cu organizare superioară reprezintă procesul care ne conduce viața în interiorul organismului precum și în afara lui. În general, strategiile de autoasamblare și compartimentare sunt aspecte importante ale mediilor celulare și subcelulare. Ele servesc ca sursă de inspirație, de la care conceptele/procesele pot fi translatate sistemelor artificiale, utilizând astfel abordarea biomimetică la dezvoltarea de noi instrumente pentru aplicațiile terapeutice [1]. Asemenea sisteme artificiale cum ar fi capsule strat cu strat (engleză – Layer-by-layer (LbL)), polimerzomi, PIC-zomi (complexi poliionici (PIC), descriși [2] ca fiind acei polimerzomi obținuți cu o pereche de copolimeri bloc încărcăți cu sarcini contrare care formează o membrană de complex poliionic), dendrimeri/polimeri hiperramificați, sau micelle sferice au fost intens investigate ca potențiali candidați pentru realizarea așa-numitelor reacții de sinteză spațiale [3,4]. Dintre aceștia, capsulele LbL, polimerzomii și PIC-zomii merită o atenție deosebită. Capsulele LbL se bazează pe un model de sacrificiu pentru a forma o structură goală în interior. Acestea folosesc fie acoperirea sau grefarea unui singur polimer fie acoperirea LbL cu mai mulți polimeri peste particula-model de sacrificiu, permițând controlul dimensiunii, sarcinii suprafeței, morfologiei, etc. capsulei rezultate [5–7]. Aceste sisteme au fost pe larg utilizate ca vehicule pentru administrarea medicamentelor/proteinelor/genelor. Strategiile care permit difuzia selectivă a reactivilor și produșilor de reacție prin membrană cu menținerea integrității proprietăților mecanice și a rolului de protecție a încărcăturii active, sunt de o importanță majoră pentru proiectarea cu succes a capsulelor polimerice care să acționeze

*[Signature]*

Jy

ca micro-/nanoreactori. Proiectarea lor se bazează pe modelul și funcționalitatea sistemelor biologice și permite înțelegerea reacțiilor biochimice metabolice compartimentalizate, care au deschis deja numeroase căi pentru elaborarea nanotransportorilor sensibili la stimuli [8], nanofabricilor inteligente [9], organelor artificiale [10], celulelor sintetice [11] și a altor aplicații *in vitro* și *in vivo* [12].

Capsulele polimerice fabricate prin folosirea particulei de sacrificiu au atras o atenție deosebită în cazul aplicațiilor terapeutice datorită posibilității de control a caracteristicilor structurale ale învelișului polimeric, cum ar fi grosimea, sarcina suprafeței, proprietățile mecanice, dimensiunea și permeabilitatea [13,14]. În plus, învelișul polimeric poate fi decorat cu membrană lipidică pentru creșterea perioadei de circulație *in vivo* a capsulelor și cu molecule de recunoaștere cum sunt anticorpii sau cu proteine legate de membrană, pentru a conferi funcționalități suplimentare capsulelor polimerice, cu un interes constant pentru o serie de aplicații biomedicale (ca de ex. biomarkeri, izolarea celulelor, administrarea la țintă a medicamentelor etc.) [15,16]. În majoritatea cazurilor aceste capsule sunt fabricate utilizând tehnica strat cu strat [17,18], care implică depunerea straturilor polimerice prin interacțiuni electrostatice [19,20] sau covalente [21], legături de hidrogen [22-26] sau prin asamblarea unui singur polimer [27] pe un miez de sacrificiu urmat de dizolvarea acestuia și purificarea ulterioară. Capsulele polimerice prezintă potențial de utilizare în eliberarea controlată a diferitelor biomolecule cum sunt acizii nucleici [28-34], proteine/peptide [35,36] și medicamente [37] atât intra- cât și extracelular pentru aplicații terapeutice.

Având în vedere faptul că în ultimele decade au fost descoperite, caracterizate și comercializate multe peptide sau proteine cu importanță clinică, sfera lor de activitate în procesele biologice și fiziologice s-a extins la liganzi pentru semnalizare celulară, enzime pentru reacțiile de biotransformare și anticorpi în sistemul imunitar. Totuși, încorporarea acestor medicamente în tratamente farmaceutice de succes este strict dependentă de metodele de administrare. Aceasta este cauzată de faptul că majoritatea biomoleculelor își pierd ușor capacitatea terapeutică la pH-ul acid din stomac sau în prezența enzimelor proteolitice [38,39] precum și de necesitatea realizării nivelelor plasmatiche specifice ale acestor biomolecule pentru eficiență clinică optimă [40], care au fost menținute, de obicei, prin administrare repetată. De aceea, au fost proiectate sistemele de eliberare controlată pentru administrarea intactă a medicației prin intermediul unui mediu protector, care de asemenea, este capabil să controleze viteza de eliberare a medicamentelor. Microsferele din polimeri biodegradabili au fost utilizate cu succes ca transportori de medicamente datorită biocompatibilității lor, compatibilității cu medicamentele pe bază de proteine sau peptide,

Jy

avantajelor la procesare și confortului la administrare. Deoarece viteza de eliberare este influențată de proprietățile fizice sau chimice ale mediului de eliberare, cercetătorii au propus o serie de parametri de proiectare care pot fi modificați pentru realizarea profilurilor de eliberare dorite. Acești parametri includ compoziția polimerului [41], masa moleculară [42], mărimea particulelor [43,44], forma [45], nivelul de încărcare a proteinei [46] și concentrația polimerului în solventul organic în timpul preparării microsferelor [47]. De asemenea s-a raportat că eliberarea stabilă din microsferile biodegradabile s-ar putea realiza cu succes prin conjugarea medicamentului proteic cu matricea polimerică [48], sau prin formarea unui strat exterior care învelește miezul intern ce conține medicamentul [49]. Studiile sugerează variabile multiple, care în principiu ar putea fi luate în considerare pentru controlul cineticii de eliberare a medicamentelor, dar nu oferă o schemă sistematică și eficientă de realizare de profiluri de eliberare specifice. De aceea este necesară optimizarea acestor parametri, în diversitatea lor, pentru realizarea unor profiluri de eliberare a medicamentelor specifice pentru aplicații clinice concrete. Tehnologiile de eliberare a medicamentelor pot fi de interes în proiectarea structurilor bioactivate în care molecule cu mase moleculare mici sau macromolecule ar putea fi eliberate într-o anumită zonă și cu viteze preprogramate, prezentând un potențial interes în ingineria țesuturilor [50-53]. O categorie nouă de materiale multifuncționale, de dată recentă, care corespund acestor necesități o reprezintă **microcapsulele de polielectrolit**. Aceste capsule incită un interes crescut deoarece proprietățile lor pot fi ușor modificate. Microcapsulele de polielectrolit se obțin prin adsorbția treptată a polielectroliților încărcăți pozitiv și negativ pe particule coloidale folosite ca substrat, urmată de descompunerea particulelor. Formarea treptată permite introducerea de funcționalități multiple, obținându-se structuri și funcțiuni fără precedent. Se pot obține capsule goale cu pereți multistrat, având un potențial ridicat de aplicare în domeniul administrării medicamentelor, deoarece proprietățile și funcționalitățile, ca de exemplu încapsularea și capacitatea de eliberare pot fi fin adaptate prin varierea grosimii peretelui și a compozițiilor. Pe de altă parte se pot obține microcapsule care conțin în interior o proteină, capabilă să încapsuleze și să elibereze controlat alte molecule de medicamente. Microcapsulele de polielectrolit au o stabilitate controlată și o permeabilitate ridicată pentru moleculele polare. Microcapsulele pot fi obținute atât din polimeri naturali cât și sintetici. Capsulele obținute din polimeri naturali și derivați ai acestora pot avea un impact semnificativ în domeniul biomedical datorită avantajelor de a fi biocompatibile și biodegradabile. Un mare număr de polizaharide au fost testate pentru sisteme de eliberare a medicamentelor.

Polizaharidele sunt o clasă de biopolimeri alcătuiți din monomeri de zaharuri [54]. Monomerii (monozaharidele) sunt legați prin legături O-glicozidice care se pot realiza la oricare din grupările hidroxil ale monozaharidei, conferind polizaharidelor posibilitatea de a forma atât catene liniare cât și ramificate. Deosebirile în compoziția monozaharidelor, forma catenei și masa moleculară determină proprietățile lor fizice incluzând solubilitatea, gelificarea și proprietățile superficiale. Acești polimeri biologici pot fi obținuți din diferite surse: microbiene, animale și vegetale [55]. Utilizarea lor prezintă o serie de avantaje. În primul rând polizaharidele au o bună hemocompatibilitate, probabil ca urmare a similarității structurii lor cu cea a heparinei, nu sunt toxice, au costuri reduse în comparație cu alți biopolimeri, se găsesc din abundență și se obțin relativ ușor din resurse regenerabile.

Polizaharidele se recomandă ca materiale pentru structuri în ingineria tisulară, precum și ca sisteme de transport pentru eliberarea controlată a medicamentelor. Tehnica de asamblare strat cu strat recent elaborată (Layer-by-layer, LbL) este o tehnică bine stabilită de construire a straturilor multiple compozite. Autoasamblarea strat cu strat este o tehnică în care sunt exploatate forțele electrostatice pentru a asambla alternativ polielectroliți cu sarcini opuse pe un substrat cu formarea unui film multistrat. Această tehnică a fost extinsă pentru a permite depunerea straturilor multiple de polielectroliți cu sarcini opuse pe particule sferice coloidale. Aceste modele pot fi descompuse după ce sunt acoperite cu un număr dorit de straturi, rezultând capsule goale. Aceste capsule pot fi compuse din diferite materiale cum ar fi polielectroliți sintetici sau naturali cum ar fi polizaharidele, proteinele și lipidele. Microparticulele de  $\text{CaCO}_3$  sunt frecvent utilizate ca particule de sacrificiu la încapsularea biomacromoleculilor de medicamente în microcapsule. Îndepărtarea modelului de  $\text{CaCO}_3$  după formarea multistratului este realizată prin tratamentul cu EDTA sau cu soluții diluate de acizi minerali.

Compoziția chimică influențează în mare măsură proprietățile fizico-chimice ale micro-/nanoparticulelor, care la rândul lor guvernează farmacocinetica și biodistribuția micro-/nano sistemelor de administrare a medicamentelor. Cu toate acestea, fabricarea sau formularea joacă de asemenea un rol esențial în administrarea optimă. Relația structură-funcție este esențială în proiectarea, caracterizarea și validarea sistemelor de administrare a medicamentelor. În plus, metodele de fabricare influențează direct costul, purificarea, reproductibilitatea unui medicament, care se iau în considerare la elaborarea farmaceutică a acestuia.

Metodele convenționale de obținere a micro-/nanoparticulelor sunt: precipitarea într-o singură etapă, formarea în două etape prin emulsione și sinteza strat cu strat.

*Precipitarea într-o singură etapă* este una dintre cele mai comune metode de fabricare a particulelor, care reprezintă mai mult de 50% din particulele utilizate în sistemele de administrare a medicamentelor [56]. Se realizează prin adăugarea treptată, în picături, a unei soluții organice care conține polimerul și medicamentul lipofilic într-o soluție apoasă, sub agitare constantă. Nanoparticulele conținând medicamentul se formează instant pe măsură ce polimerul difuzează în faza apoasă. Miscibilitatea solventului cu apa este cel mai critic parametru, care guvernează rezultatul [57]. Viteza de adăugare a polimerului și cea de agitare influențează de asemenea dimensiunea particulelor și nivelul de încărcare a medicamentului. Dimensiunea particulelor este în jur de 200 nm, în general mai mică decât cea a particulelor obținute prin alte procese. Metoda poate fi aplicată la o gamă largă de polimeri, peptide și ciclodextrine amfifile, la scară largă fiind inefficientă datorită necesității de adăugare în picături.

*Metodele de formare a particulelor în două etape prin emulsionare.* În prima etapă faza organică conținând polimerii și medicamentele este agitată viguros sau ultrasonată în faza apoasă pentru formarea picăturilor fine emulsionate. Dimensiunea particulelor și încărcătura de medicament variază în funcție de sistemul emulsionat utilizat (de la nanoemulsii la microemulsii). Pentru formarea structurilor veziculare de tip nucleu-înveliș se pot prepara de asemenea prin utilizarea emulsiilor duble. După emulsionare, se folosesc diferite metode pentru precipitarea polimerului cu formarea particulelor dense încărcate cu medicament.

*Emulsionarea cu evaporarea solventului* este cea mai comună metodă de preparare a nanoparticulelor. În această metodă, polimerul este dizolvat într-un solvent volatil, (diclorometan, cloroform) și emulsionat în faza apoasă. Formarea nanoparticulelor se realizează prin evaporarea la presiune redusă a solventului, iar dimensiunea lor depinde de ajustarea condițiilor de evaporare a solventului. Este intens utilizată pentru încapsularea medicamentelor lipoflice.

*Emulsionarea cu difuzia solventului* este o altă metodă de preparare a nanoparticulelor încărcate cu medicament. În această metodă polimerul este dizolvat într-un solvent parțial miscibil cu apa (cum ar fi alcoolul benzilic și propilen carbonatul) care este presaturat cu apă. Apoi este folosită o metodă generală de emulsionare pentru obținerea picături fine de emulsie de ulei în apă (O/W) din polimerul dizolvat în solventul saturat cu apă. Picăturile dispersate sunt apoi diluate cu cantități mari de apă conținând un stabilizator. Difuzia solventului organic din picături duce la condensarea materialului în interiorul picăturii și la formarea nanoparticulelor. Procesul de extracție a solventului are loc în câteva milisecunde, ceea ce

determină o scădere bruscă a dimensiunii particulelor. În general, diametrul particulelor preparate prin această metodă este de aproximativ 150 nm, cu reproductibilitate ridicată a proprietăților fizice.

*Emulsionarea cu introducerea de săruri* este o variantă a metodei de emulsionare cu difuzia solventului. Solventul organic utilizat este total miscibil cu apa, ca de exemplu acetona. Solventul conținând polimerul este emulsionat într-o fază apoasă conținând o concentrație ridicată a unei săruri (clorură de magneziu, clorură de calciu) sau zahăr. Soluția apoasă saturată împiedică amestecarea acetonei cu apa. Diluarea picăturilor de emulsie în cantitate mare de apă conduce la o micșorare bruscă a concentrației de sare a fazei continue, ceea ce determină extracția solventului organic și precipitarea nanoparticulelor. Această metodă se recomandă exclusiv pentru medicamentele lipofile. Alegerea agentului de salifiere influențează mult dimensiunea particulelor și eficiența de încapsulare a medicamentului. Se pot obține particule mici dar eficiența de încărcare a medicamentului este de asemenea mică.

*Sinteza strat cu strat a nano-/microparticulelor* exploatează interacțiunile electrostatice dintre sarcinile opuse ale polielectrolitilor, ca de exemplu polilizina, chitosanul, gelatina B sau polietilen imina, care formează complecși cu alginatul de sodiu, acidul poliacrilic, sulfatul de dextran, acidul hialuronic, condroitin sulfatul sau heparina. Adesea se utilizează forma solidă a agenților bioactivi ca nucleu de creștere a structurii veziculare. Un strat de polimer este mai întâi adsorbit pe șablonul coloidal prin incubarea în soluția de polimer, care după spălare este transferat în soluția polimerului cu sarcini de semn contrar. Repetarea ciclului determină o acoperire multistrat, care poate controla cinetica de eliberare a agentului activ. Nanocristale de fosfat de calciu sunt frecvent utilizate ca nucleu, fiind îndepărtate ulterior prin dizolvare în acid clorhidric. Această metodă poate fi utilizată pentru încapsularea a diferiți agenți bioactivi, ca de exemplu citostatice, vitamine, hormoni (insulina), peptide antigenice, acizi nucleici etc.

Tehnicile de fabricare a micro-/nanoparticulelor sunt predispușe polidispersiei și variațiilor de la lot la lot. În timp ce heterogenitatea rămâne un obstacol insurmontabil în fabricarea la scară a sistemelor de administrare a medicamentelor, sistemul microfluidic de manipulare a fluidelor în canale la scară de nano/picolitri, prezintă oportunități atractive pentru îmbunătățirea fabricării acestora. Beneficiile generale ale conducerii reacției în circuite microfluidice include, dar nu se limitează doar la o rapidă amestecare a reactivilor, un mediu de reacție omogen, flexibilitate pentru proiectarea reacțiilor în mai multe trepte, îmbunătățirea preciziei și eficienței procesării, un mai bun transfer de căldură datorat unui raport

09

suprafață/volum ridicat, miniaturizarea și micșorarea costurilor ca urmare a unui consum redus de reactivi.

Particulele de sacrificiu joacă un rol crucial în fabricarea capsulelor de polimeri deoarece acestea determină dimensiunea și forma capsulelor rezultate precum și metoda de încapsulare care poate fi folosită pentru o anumită componentă activă (care poate fi pre sau post încărcare) [58]. Multe dintre modelele de particule de sacrificiu cunoscute în literatură nu permit încărcarea componentului activ în timpul formării capsulelor, ceea ce împiedică aplicarea capsulelor rezultate în aplicațiile terapeutice din cauza eficienței de încapsulare a componentului activ și a reproductibilității reduse, asociate cu procesul de difuzie implicat în metoda de încărcare a capsulelor preformate. Modificări extreme în alegerea solventului, concentrația sărurilor, pH-ului și/sau temperaturii pot fi folosite pentru creșterea permeabilității capsulelor polimerice. Totuși aceste condiții nu sunt potrivite pentru încărcarea biomoleculelor sensibile, cum sunt enzimele. Printre aceste modele care nu permit pre-încărcarea componentului activ sunt particulele coloidale de melamin formaldehida, polimetil metacrilatul și polistiren. Necesitatea folosirii solvenților organici (tetrahidrofura, cloroform și diclormetan) pentru îndepărtarea miezului capsulelor reprezintă un dezavantaj major în utilizarea capsulelor polimerice rezultate pentru aplicațiile terapeutice care afectează stabilitatea și/sau activitatea entităților încapsulate. O modalitate de depășire a neajunsurilor asociate cu încărcarea post procesare, o constituie utilizarea ca model de particule de sacrificiu a *micro- și nanoparticulelor anorganice poroase de dioxid de siliciu mezoporos și de carbonat de calciu*. Datorită structurii lor poroase, în aceste modele pot fi adsorbite cantități mari de compuși active. Pe de altă parte ele sunt ușor dizolvate cu formarea unor ioni cu masă moleculară mică, evitându-se astfel șocul osmotic și asigurându-se îndepărtarea completă a șablonului. Particulele de dioxid de siliciu mezoporos cu dimensiuni, mărimea porilor/structură controlabile au fost întrebuițate cu succes pentru încapsularea unor enzime (catalaza, peroxidaza, citocromC, liozima) și ADN [59-61]. Spre deosebire de particulele de dioxid de siliciu mezoporos, care necesită acid fluorhidric pentru îndepărtarea totală, ceea ce poate limita utilizarea lor în aplicațiile biomedicale, particulele de carbonat de calciu pot fi dizolvate în condiții foarte blânde, ca de exemplu complexarea calciului cu soluție de EDTA. Principala provocare asociată cu particulele de carbonat de calciu rămâne totuși un control mai dificil asupra dimensiunii particulelor sintetizate și obținerea nanoparticulelor.

*Hidrogelurile*, incluzând cele de alginat și dextran au fost considerate ca particule de sacrificiu potențiale, în care agentul activ poate fi preîncărcat. Microsferele de hidrogel se produc în general printr-un proces de emulsionare, permițând încorporarea unor component

09



active ca enzimele sau nanoparticule în timpul procesului de fabricare. Totuși acest proces conduce la o polidispersitate a particulelor obținute din cauza unui control limitat asupra dimensiunii particulelor și a distribuției lor. Mai mult de atât, îndepărtarea completă a modelului este o provocare.

Realizarea microparticulelor cu înveliș este cunoscută și în literatura de brevete, o selecție a documentelor relevante fiind prezentată în continuare.

**US2013156934** „Microcapsules by coacervation containing a pharmaceutical incorporated in the coating polymer” prezintă o metodă de preparare a microcapsulelor care conțin cel puțin un ingredient activ, care cuprinde o etapă de obținere a miezurilor, urmată de o altă etapă de aplicare a unei membrane polimerice. Metoda de acoperire constă din următoarele faze: formarea unei soluții a polimerului de membrană într-un solvent apos sau organic, realizarea unei suspensii prin introducerea miezurilor în soluția obținută, urmată de coacervarea polimerului de membrană prin separarea fazelor, formând astfel membrana polimerică la suprafața miezului. Dezavantajul acestei metode constă în faptul că nu se pot realiza particule cu dimensiuni mici și cu straturi multiple pentru administrarea controlată a medicamentelor.

**KR20040040044** „Microcapsule containing Vitamin E and/or natural oil for medical use nonwoven fabric and absorbing core coated by the microcapsule and absorbing product manufactured thereby” oferă o metodă de producere de microcapsule care conțin vitamina E și uleiuri naturale medicinale. Microcapsulele cu diametrul mediu de 1-50 micrometri se obțin dintr-o emulsie de vitamine și ulei natural, realizată cu un emulgator la o viteză de 8.000-15.000 rpm, o soluție de prepolimerizare utilizând uree și melamină sau formaldehidă și apă și un aditiv acid slab de polimerizare la temperatura de 55-65°C.

**US2020163896** „Floatable pharmaceutical microcapsule composition” prezintă o formulare de microcapsule nucleu-înveliș pentru eliberarea de medicamente. Metoda de producere a microcapsulelor constă în realizarea unei emulsii apă-ulei, faza apoasă conține un medicament și un agent osmotice iar faza uleioasă cuprinde un solvent organic, unul sau mai mulți polimeri hidrofobi și un agent de flotare, care este adăugată într-o soluție apoasă la pH de la 2 la 6 și agitată la temperatura ambiantă pentru a emulsiona din nou. În emulsia obținută se adaugă un nou volum de soluție apoasă și se obține un amestec intermediar care este centrifugat pentru evaporarea solventului.

**ES2706101** se referă la o metodă pentru obținerea microcapsulelor având un diametru mediu în intervalul cuprins între 5 μm și 2000 μm și care constă în formarea unui amestec fluid care conține și substanța de încapsulat, dizolvarea, suspendarea sau emulsionarea

amestecului, urmată adăugarea unui acid gras și a unui agent de încapsulare sub agitare în condiții adecvate de presiune și temperatură, pentru formarea de micle.

Patentele cunoscute nu oferă microcapsule biodegradabile și biocompatibile cu o structură chimică în întregime naturală și care să permită transportul la țintă și eliberarea controlată cu precizie ridicată, a substantelor active.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția este de a sintetiza microcapsule biodegradabile și biocompatibile obținute în întregime din materii prime naturale, care favorizează transportul la țintă și eliberarea cu precizia dorită a substantelor active.

Pentru a asigura o structură stabilă dar și susceptibilitate pentru difuzia substanței active, microcapsulele de tip nucleu-înveliș, conform invenției, au înveliș multistrat alcătuit din hidrogelul unei polizaharide anionice format prin reticulare cu ionii  $\text{Ca}^{2+}$  proveniți din nucleu, care participă ulterior la formarea unui complex polielectrolitic cu o polizaharidă cationică (chitosanul), urmată de depunerea de straturi alternative ale celor două polizaharide, realizate similar prin interacțiuni electrostatice, permeabilitatea învelișului fiind influențată atât de numărul și de grosimea straturilor alternative, cât și de polizaharidele utilizate.

Procedeul de sintetizare a microcapsulelor, conform invenției, constă în obținerea de microparticule de sacrificiu sferice rezultate prin coprecipitarea cu formarea de cristale de carbonat de calciu ( $\text{CaCO}_3$ ) cu albumina serică bovină (BSA - Bovine serum albumin),  $\text{CaCO}_3$ /BSA, forma polimorfă numită Vaterită și depunerea succesivă de straturi prin tehnica depunerii strat cu strat a hidrogelului unei polizaharide anionice format prin reticulare cu ionii  $\text{Ca}^{2+}$  proveniți din nucleu, care participă ulterior la formarea unui complex polielectrolitic cu o polizaharidă cationică (chitosanul), urmată de depunerea de straturi alternative ale celor două polizaharide, prin intermediul complexului format, iar după eliminarea carbonatului de calciu prin complexarea ionilor de  $\text{Ca}^{2+}$  cu un agent complexant, rezultă microcapsule cu înveliș poros cu permeabilitate controlată.

Microcapsulele se pot încărcă cu substanțe active în două moduri: a) în prima etapă de coprecipitare a miezului de  $\text{CaCO}_3$ /BSA, în care caz substanța activă va fi inclusă în interiorul microcapsulei și b) după formarea microcapsulelor, prin difuzia substanței active din soluție, favorizată de structura poroasă atât a învelișului cât și a rețelei de gel din nucleul acestora.

Prezenta invenție este orientată spre microtransportori biodegradabili pentru administrarea agenților terapeutici, procedeu de obținere și evaluarea *in vitro* a acestora. Există o necesitate clinică pentru transportori de agenți terapeutici care să fie biodegradabili, biocompatibili și care să realizeze eliberarea controlată la ținta a acestora. Atât polimerii naturali cât și cei sintetici pot fi asamblați în microcapsule pentru eliberarea controlată a

medicamentelor, dar cele obținute din polimeri naturali prezintă avantajul de a fi biodegradabile și biocompatibile [62]. Structura învelișului multistrat se bazează pe proprietatea polizaharidelor cu sarcini opuse de a forma complecși polielectrolitici prin interacțiuni electrostatice și de asemenea, pe tendința polizaharidelor anionice de a fi reticulate de către cationii metalici și de a forma hidrogeluri [63-65]. Conform definiției date de Peppas et al. Hidrogelurile sunt rețele polimerice tridimensionale hidrofile, capabile să îmbibe cantități mari de apă sau fluide biologice. Datorită acestei proprietăți hidrogelurile sunt asemănătoare cu țesuturile vii, ceea ce le face deosebit de utile într-o gamă largă de aplicații biomedicale [66]. Dintre numeroșii polimeri propuși pentru prepararea hidrogelurilor, polizaharidele prezintă o serie de avantaje față de polimerii sintetici folosiți inițial în domeniul farmaceutic. Polizaharidele sunt abundente și ușor de obținut din resurse regenerabile, cum sunt algele, plante, culturi de tulpini microbiene selectate, precum și prin tehnici de ADN recombinant. Ele prezintă o mare varietate în ceea ce privește compoziția și proprietățile, ceea ce le face mai ieftin de obținut decât polimerii sintetici. Hidrogelurile se caracterizează printr-o mare versatilitate în domeniul sistemelor de administrare controlată a medicamentelor și de asemenea sunt cercetate ca matrici pentru încapsularea celulelor vii, ca suporturi de susținere celulară în ingineria țesuturilor și pentru eliberarea controlată a proteinelor. Multe polizaharide au fost folosite la prepararea hidrogelurilor pentru aplicațiile farmaceutice. Dintre acestea, chitosanul este un reprezentant cationic datorită grupărilor sale glucozaminice. Chitosanul este un copolimer liniar netoxic, biodegradabil și biocompatibil de 2-acetamido-2-deoxi- $\beta$ -D-glucopiranoză și 2-amino-2-deoxi- $\beta$ -D-glucopiranoză legate  $\beta$  - (1,4), obținute prin deacetilarea chitinei, o polizaharidă componentă a învelișului crustaceelor, cuticulelor insectelor și fungilor [67]. Chitosanul este greu solubil în apă, dar cu grupările amino ale resturilor D-glucozaminice protonate în mediu de soluție diluată de acid, acesta devine un polication solubil, care poate forma complecși prin interacțiuni cu un număr mare de specii anionice. Acidul hialuronic este o polizaharidă larg răspândită în țesuturile conjunctiv, epitelial și nervos. Acesta este alcătuit din două unități alternante de acid D-glucuronic și N-acetil-D-glucozamină. Acidul hialuronic poate fi utilizat cu ușurință pentru a induce autoasamblarea ca urmare a biocompatibilității și a biodegradabilității sale. În plus, are o pronunțată afinitate pentru receptorii specifici supraexpresați la suprafața celulelor multor tipuri de cancer, de tipul glicoproteinei transmembranare, CD44, un receptor pentru medierea motilității acidului hialuronic [68]. Microparticule asociate cu acidul hialuronic au fost frecvent propuse ca transportori de medicamente antitumorale [69] capabile să transporte și să elibereze la țintă medicamentul [70].

Se dă un exemplu de realizare a invenției în legătură cu figurile 1, 2 și 3, care reprezintă:

- figura 1, secțiune prin microparticula cu înveliș multistrat;
- figura 2, secțiune prin microcapsula cu înveliș multistrat;
- figura 3, microimaginele SEM ale microcapsulelor sintetizate: microcapsule BSA gel/k-Carrageenan/Chitosan; microcapsule BSA gel/Pectina/Chitosan; microcapsule BSA gel/Acid hialuronic/Chitosan și microcapsule BSA gel/Pectina/Chitosan/Acid hialuronic.

Microcapsula de tip nucleu-înveliș se obține dintr-o microparticulă (figura 1) care are o formă aproximativ sferică și este alcătuită dintr-un nucleu de sacrificiu **1**, pe care se depun straturi alternative de polizaharide, care formează un înveliș multistrat **2**, cu rolul de a asigura porozitatea și permeabilitatea necesare pentru transferul substanței active.

Nucleul de sacrificiu **1** (figura 1) se obține prin coprecipitarea  $\text{CaCO}_3$  cu BSA, cu formarea cristalelor de  $\text{CaCO}_3$ /BSA într-un volum de soluție de  $\text{CaCl}_2$  0,33M conținând 0,75% BSA, la care se adăugă același volum de soluție de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,33M sub agitare mecanică energetică. După precipitare și decantare, microparticulele formate se separă prin centrifugare, urmată de spălare repetată cu apă distilată și centrifugare după fiecare spălare.

Învelișul de tip multistrat **2** (figura 1), s-a asamblat prin tehnica depunerii strat cu strat după cum urmează. Ionii de  $\text{Ca}^{2+}$  din microparticulele  $\text{CaCO}_3$ /BSA interacționează electrostatic cu ionii negativi ai polizaharidei anionice și formează hidrogelul polizaharidei anionice (3), care acoperă microparticulele. În continuare, hidrogelul polizaharidei anionice formează cu polizaharida cationică (chitosanul) un complex polielectrolitic (4). Acesta constituie primul strat dublu, care conține ambele polizaharide, legate între ele. Mai departe, se depun alternativ polizaharida anionică, urmată de cea cationică, care formează împreună complexul polielectrolitic (5), constituind cel de-al doilea strat. La fel se depun în continuare încă trei straturi duble.

După asamblarea învelișului microparticulei din figura 1, are loc eliminarea componentei anorganice,  $\text{CaCO}_3$ , prin complexarea ionilor de  $\text{Ca}^{2+}$  cu un agent complexant (EDTA), ceea ce conduce la solubilizarea carbonatului și difuzia din microparticule în mediul de dispersie; microparticulele se transformă în microcapsule nucleu-înveliș, iar prin tratare termică, BSA din nucleu se transformă în gel.

Microcapsulele conțin în nucleu o matrice **6**, de gel BSA, care va fi destinată transportului substanțelor active și un înveliș **2**, multistrat, poros și permeabil, care permite încărcarea prin difuzie a moleculelor active și eliberarea controlată din interior spre exterior,

după profile de eliberare dependente de caracteristicile mediului. Permeabilitatea învelișului multistrat 2 este influențată atât de numărul straturilor cât și de natura polizaharidelor utilizate.

Microcapsulele se pot încărca cu substanțe active în două moduri: a) în prima etapă de coprecipitare a miezului de  $\text{CaCO}_3/\text{BSA}$ , în care caz substanța activă va fi inclusă doar în interiorul microcapsulei și b) după formarea microcapsulelor, prin difuzia substanței active din soluție, favorizată de structura poroasă atât a învelișului cât și a rețelei de gel din matricea 6.

Eficiența de încărcare a unei componente active în microcapsule depinde de mai mulți factori. Porozitatea învelișului dar și a rețelei de gel BSA din miez este determinantă în cazul încărcării medicamentelor prin difuzie. Hidrogelurile care compun acest tip de microcapsule sunt hidrofile, au capacitatea de a absorbi apa, ceea ce conduce la o creștere a dimensiunii porilor și implicit a vitezei de difuzie a moleculelor mici de substanță activă. Desigur, un număr mai mare de straturi în înveliș, va contribui la o mai mare stabilitate a microcapsulelor, asigurată de un număr crescut de interacțiuni între grupările funcționale ionizate ale celor două polizaharide implicate în complexul polielectrolitic. Condițiile de încărcare sunt specifice fiecărei substanțe active, fiind influențate de structura chimică a acesteia dar și de pH-ul mediului de încărcare, care va influența ionizarea albuminei din nucleul microcapsulelor și în acest mod favorizarea sau impedimentarea interacțiunii gelului BSA cu substanța activă.

După eliminarea carbonatului de calciu, microcapsulele rămân formate dintr-o structură în întregime naturală care se bazează pe utilizarea unor materii prime naturale, o proteină, albumina serică bovină, extrasă din serul de bovine și a unor polizaharide de origine vegetală. Polizaharidele utilizate în formarea învelișului sunt k-carrageenanul, pectina, acidul hialuronic și chitosanul, substanțe folosite în alimentație și în industria farmaceutică, toate fiind biodegradabile și biocompatibile, astfel încât microcapsulele obținute sunt la rândul lor biodegradabile și biocompatibile, netoxice și neimunogene, eligibile pentru aplicațiile biomedicale în sistemele de administrare controlată a medicamentelor.

Noutatea invenției rezidă în faptul că, spre deosebire de microcapsulele comerciale, obținute din polimeri sintetici, a căror sinteză implică utilizarea atât a reactivilor chimici cât și a unor solvenți organici, a căror prezență în produsul finit, chiar în urme, determină o creștere a toxicității acestuia, microcapsulele propuse de inventatori sunt obținute în mediu apos, din polimeri naturali, polizaharide și proteine, care nu numai că sunt lipsite de toxicitate nefiind sintetizate chimic, dar în plus, prezintă și avantajul de a avea structura chimică similară unor componente ale organismului uman (proteinele serice, polizaharidele din matricea

extracelulară, ca de exemplu heparina, glucozaminele, condroitin sulfatul etc.), ceea ce le conferă o biocompatibilitate intrinsecă, obligatorie oricărui biomaterial. În acest fel organismul nu le va percepe ca pe un corp străin și nu va genera un răspuns al sistemului imunitar. Microcapsulele sintetizate, separate, purificate și caracterizate din punctul de vedere al structurii fizico-chimice sunt stabile, prezintă capacitatea de a fi încărcate cu compuși biologic activi dar și posibilitatea de eliberare prelungită a acestora la ținta terapeutică, pe baza sensibilității la pH-ul mediului. De asemenea, s-a dovedit experimental că sub acțiunea enzimelor din fluidele naturale, microcapsulele sunt degradate, iar ulterior eliminate, evitându-se astfel acumularea nedorită în organism. Microcapsulele propuse, cu structură naturală, după îndeplinirea funcției de transportor de medicamente, vor fi eliminate din organism ca metaboliți.

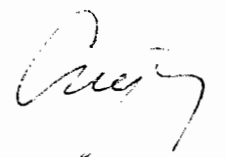
Tehnicile folosite pentru realizarea microcapsulelor se bazează pe metoda particulei de sacrificiu în formarea nucleului microcapsulelor și a tehnicii de depunere strat cu strat (LbL-Layer by layer) pentru construcția invelișului multistrat, mai întâi a hidrogelurilor formate prin reticularea grupărilor anionice ale polizaharidelor cu cationii ( $\text{Ca}^{2+}$ ) din nucleu iar apoi a straturilor alternative de complecși polielectrolitici formați prin interacțiuni electrostatice între perechi de polizaharide având grupări funcționale ionizabile, cu formarea de ioni cu sarcini opuse. O altă metodă folosită o reprezintă metoda complexării ionilor de  $\text{Ca}^{2+}$  cu agent complexant de tipul acidului etilen-diamino-tetraacetic (EDTA).

Procedeele de obținere a microcapsulelor se desfășoară în trei etape, prezentate în continuare.

#### ***Etapa 1. Sinteza microparticulelor $\text{CaCO}_3$ /BSA***

Pentru prepararea microparticulelor de sacrificiu  $\text{CaCO}_3$ /BSA s-a folosit un procedeu de coprecipitare a  $\text{CaCO}_3$  cu BSA. Stabilirea valorilor parametrilor experimentali, concentrațiile soluțiilor, viteza de agitare, timpul și temperatura, este critică pentru obținerea formei polimorfe Vaterita a cristalelor de  $\text{CaCO}_3$ /BSA, având forma sferică și dimensiunile micrometrice.

Într-un volum de soluție de  $\text{CaCl}_2$  0,33M, conținând 0,75% BSA s-a adăugat același volum de soluție de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,33M sub agitare mecanică energică, timp de 30 s. După 15 minute particulele s-au centrifugat la 4000 rpm timp de 5 min și s-au spălat repetat cu apă. Rezultatele experimentale se confirmă prin analize specifice de microscopie optică și electronică și prin spectroscopie FTIR.



### ***Etapa 2. Sinteza învelișului multistrat al microparticulelor***

Învelișul multistrat al particulelor s-a asamblat prin tehnica depunerii strat cu strat a hidrogelului reticulat cu  $\text{Ca}^{2+}$  al polizaharidei anionice și a straturilor alternative de complex polielectrolitic format între polizaharida anionică și cea cationică. O soluție 1% polizaharidă anionică dizolvată în apă pură sau în soluție tampon de pH adecvat (PBS), în funcție de structura chimică a polizaharidei anionice, și o soluție de 1% chitosan dizolvat în soluție 1% acid acetic s-au preparat prin agitare la temperatura camerei. Procesul de depunere s-a realizat în soluția fiecărui polizaharid, începând cu polizaharida anionică, urmând cu cea cationică și în continuare alternând succesiv cele două polizaharide, la 40°C sub agitare magnetică lentă (500 rpm) timp de 15 min pentru fiecare strat, urmat de centrifugare 3 min la 4000 rpm și 3 spălări cu apă distilată după fiecare strat. S-au depus cinci straturi duble prin alternarea celor două polizaharide cu sarcini opuse. S-au obținut microparticule albe de formă sferică având diametrul de 5-7  $\mu\text{m}$  și respectiv 10-12  $\mu\text{m}$ . Rezultatele experimentale se confirmă prin analize specifice de microscopie optică și electronică și prin spectroscopie FTIR.

### ***Etapa 3. Prepararea microcapsulelor***

Microparticulele preparate anterior s-au transformat în microcapsule de tip nucleu-înveliș prin îndepărtarea componentei anorganice, carbonatului de calciu, prin complexarea ionilor de  $\text{Ca}^{2+}$  cu un agent complexant, ceea ce conduce la solubilizarea carbonatului și difuzia din microparticule în mediul de dispersie. S-a folosit metoda complexării cu EDTA pentru îndepărtarea  $\text{CaCO}_3$  din microparticule.

Microparticulele s-au tratat repetat cu soluție de EDTA 0,2 M cu pH 7,5, sub agitare energetică, urmată de spălare cu cantitate abundentă de apă ultrapură și centrifugare (4000 rpm, 15 min), până la decolorarea totală. O tratare cu o soluție diluată de HCl (0,1 M), urmată de spălare până la pH neutru și centrifugare desăvârșește îndepărtarea  $\text{CaCO}_3$ , transformând microparticulele în microcapsule. Microcapsulele incolore obținute, având soluție de BSA în nucleu, s-au încălzit la 80°C sub agitare blândă timp de 30 minute, ceea ce a condus la gelificarea BSA-ului. După centrifugare și spălare s-a obținut un sediment cu aspect de gel constând din microcapsule conținând BSA gel în interior, având un conținut de  $3,5 \times 10^8$  microcapsule/ml. Concentratul diluat 1:10 cu apă pură a format o suspensie de microcapsule, care se păstrează la frigider până la utilizare. Rezultatele experimentale se confirmă prin analize specifice de microscopie optică și electronică și prin spectroscopie FTIR.

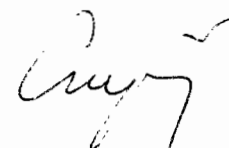
Prin aplicarea metodei s-au sintetizat patru tipuri de microcapsule de tip nucleu-înveliș, bazate în întregime pe materii prime naturale.

În primul exemplu de aplicare a invenției s-au sintetizat microcapsule având în interior BSA gel și înveliș multistrat format din hidrogelul reticulat cu ioni de calciu al k-carrageenanului și straturi alternative de complex polielectrolitic al k-carrageenanului cu chitosanul. k-Carrageenanul este o polizaharidă anionică conținând anioni sulfat care sunt susceptibili atât pentru reticularea ionică cât și pentru formarea complexului polielectrolitic cu chitosanul, purtător de cationi în mediu acid, rezultați prin protonarea grupărilor aminice componente. Aceste microcapsule au fost proiectate cu scopul de a fi utilizate în aplicații de transport și eliberarea prelungită a unor produși activi naturali, cu activitate antiinflamatorie, antibacteriană și anticancerigenă, a căror solubilitate apoasă foarte scăzută determină o slabă biodisponibilitate la administrare orală.

În al doilea exemplu de aplicare a invenției, s-au realizat o altă categorie de microcapsule care exploatează proprietățile mucoadezive atât ale chitosanului cât și ale unei alte polizaharide anionice, cunoscută în literatură pentru această caracteristică, pectina. S-au realizat microcapsule având în interior BSA gel și înveliș multistrat, cu arhitectura formată din hidrogelul reticulat cu ioni de calciu al pectinei și straturi alternative de complex polielectrolitic al pectinei cu chitosanul, depuse prin tehnica LbL, cu sarcini diferite ale învelișului în funcție de tipul anionic/cationic al polizaharidei care alcătuiește stratul exterior. Aceste microcapsule sunt destinate pentru transportul și eliberarea prelungită a unor compuși activi naturali cu solubilitate apoasă scăzută, cunoscuți pentru efectele lor antibacteriene și antiinflamatoare.

Într-un alt exemplu de aplicare a s-au sintetizat microcapsule cu conținut interior de BSA gel și înveliș multistrat format din hidrogelul acidului hialuronic reticulat cu  $\text{Ca}^{2+}$  și straturi alternative de complex polielectrolitic format între acidul hialuronic și chitosan.

În ultimul exemplu, nelimitativ de aplicare a invenției, s-a sintetizat o altă variantă de microcapsule care conțin în înveliș pectină, acid hialuronic și chitosan. În aceste microcapsule s-a introdus suplimentar acidul hialuronic pentru a funcționa ca polizaharidă anionică. Scopul a fost obținerea unor transportori de medicamente citostatice care să permită eliberarea la ținta antitumorală a acestora, pe baza afinității pronunțate a acidului hialuronic pentru receptorii specifici supraexpresiați la suprafața celulelor multor tipuri de cancer, de tipul glicoproteinei transmembranare, CD44. Prin utilizarea pectinei în structura învelișului microcapsulelor, pe lângă acidul hialuronic și chitosan, s-a urmărit pe de o parte creșterea rezistenței învelișului iar pe de altă parte introducerea unor funcționalități suplimentare.





Diversificarea structurii învelișului a fost posibilă prin modificarea condițiilor de lucru, în particular a pH-ul mediului, în funcție de particularitățile fiecărei componente utilizate în sinteză.

Prezenta invenție se poate aplica în sistemele de administrare controlată a medicamentelor, la încapsularea enzimelor precum și a celulelor. Metoda de fabricație propusă permite obținerea microcapsulelor cu rol de încapsulare, transport și eliberarea prelungită, la ținta terapeutică, bazate în întregime pe materii prime naturale, ceea ce le conferă biodegradabilitate și biocompatibilitate. Microcapsulele realizate au o structură bine definită, caracterizată prin tehnicile de investigare a materialelor, sunt stabile în condiții de depozitare adecvate și prezintă eficiențe ridicate de încapsulare și de încărcare cu compuși biologic activi. Metoda de fabricație se poate dezvolta și pentru alte tipuri de microcapsule, cu arhitecturi complexe, având caracteristici fizico-chimice care le conferă un răspuns inteligent la stimuli, adecvate unor aplicații biomedicale specifice.

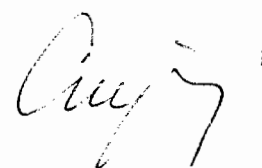
### **Bibliografia**

- [1] Whitesides GM, Grzybowski B. *Science* 2002;295:2418–21.
- [2] Koide A, Kishimura A, Osada K, Jang WD, Yamasaki Y, Kataoka K. *J Am Chem Soc* 2006;128:5988–9.
- [3] Postupalenko V, Einfalt T, Lomora M, Dinu IA, Palivan In: Sadjadi S, editor. *Organic nanoreactors – from molecular to supramolecular organic compounds*. 1st ed.; 2016.
- [4] Balasubramanian V, Herranz-Blanco B, Almeida PV, Hirvonen J, Santos HA. *Prog Polym Sci* 2016;60:51–85.
- [5] Johnston APR, Cortez C, Angelatos AS, Caruso F. *Curr Opin Colloid Interface Sci* 2006;11:203–9.
- [6] Qi J, Lai XY, Wang JY, Tang HJ, Ren H, Yang Y, et al. *Chem Soc Rev* 2015;44:6749–73.
- [7] Cui J, Richardson JJ, Björnholm M, Faria M, Caruso F. *Acc Chem Res* 2016;49:1139–48.
- [8] Mura S, Nicolas J, Couvreur P. *Nat Mater* 2013;12:991–1003.
- [9] Caruso F. In: Caruso F, editor. *Modern techniques for nano- and microreactors/-reactions*. Berlin: Springer-Verlag, Berlin; 2010. p. 1–184.
- [10] Tanner P, Balasubramanian V, Palivan CG. *Nano Lett* 2013;13:2875–83.
- [11] Hammer DA, Kamat NP. *Febs Lett* 2012;586:2882–90.
- [12] Anraku Y, Kishimura A, Kamiya M, Tanaka S, Nomoto T, Toh K, et al. *Angew Chem-Int Edit* 2016;55:560–5.
- [13] Peyratout CS, Dahne L. *Angew Chem-Int Edit* 2004;43:3762–83.

- [14] Delcea M, Mohwald H, Skirtach AG. *Adv Drug Deliv Rev* 2011;63:730–47.
- [15] Valdepérez D, del Pino P, Sánchez L, Parak WJ, Pelaz B. *J Colloid Interface Sci* 2016;474:1–8.
- [16] Gao C, Wu Z, Lin Z, Lin X, He Q. *Nanoscale* 2016;8:3548–54.
- [17] Decher G. *Science* 1997;277:1232–7.
- [18] De Geest BG, Sanders NN, Sukhorukov GB, Demeester J, De Smedt SC. *Chem Soc Rev* 2007;36:636–49.
- [19] Sukhorukov GB, Antipov AA, Voigt A, Donath E, Mohwald H. *Macromol Rapid Commun* 2001;22:44–6.
- [20] Sukhorukov GB, Donath E, Moya S, Susha AS, Voigt A, Hartmann J, et al. *J Microencapsul* 2000;17:177–85.
- [21] Huang X, Appelhans D, Formanek P, Simon F, Voit B. *ACS Nano* 2012;6:9718–26.
- [22] Price AD, Zelikin AN, Wang YJ, Caruso F. *Angew Chem-Int Edit* 2009;48:329–32.
- [23] Kozlovskaya V, Kharlampieva E, Drachuk I, Cheng D, Tsukruk VV. *Soft Matter* 2010;6:3596–608.
- [24] Chong SF, Lee JH, Zelikin AN, Caruso F. *Langmuir* 2011;27:1724–30.
- [25] Kempe K, Noi KF, Ng SL, Mullner M, Caruso F. *Polymer* 2014;55:6451–9.
- [26] Shutava T, Prouty M, Kommireddy D, Lvov Y. *Macromolecules* 2005;38:2850–8.
- [27] Richardson JJ, Tardy BL, Ejima H, Guo JL, Cui JW, Liang K, et al. *ACS Appl Mater Interfaces* 2016;8:7449–55.
- [28] Dash BC, Mahor S, Carroll O, Mathew A, Wang WX, Woodhouse KA, et al. *J Control Release* 2011;152:382–92.
- [29] Rethore G, Mathew A, Naik H, Pandit A. *Tissue Eng Part C-Methods* 2009;15:605–13.
- [30] Helary C, Browne S, Mathew A, Wang WX, Pandit A. *Acta Biomater* 2012;8:4208–14.
- [31] Newland B, Moloney TC, Fontana G, Browne S, Abu-Rub MT, Dowd E, et al. *Biomaterials* 2013;34:2130–41.
- [32] Browne S, Monaghan MG, Brauchle E, Berrio DC, Chantepie S, Papy-Garcia D, et al. *Biomaterials* 2015;69:133–47.
- [33] Dash BC, Thomas D, Monaghan M, Carroll O, Chen XZ, Woodhouse K, et al. *Biomaterials* 2015;65:126–39.
- [34] Fontana G, Srivastava A, Thomas D, Lalor P, Dockery P, Pandit A. *Bioconjugate Chem* 2015;26:1297–306.
- [35] Kraskiewicz H, Breen B, Sargeant T, McMahon S, Pandit A. *ACS Chem Neurosci* 2013;4:1297–304.

- [36] Samal J, Hoban DB, Naughton C, Concannon R, Dowd E, Pandit A. Nanomedicine – UK 2015;10:765–83.
- [37] Likhitpanichkul M, Kim Y, Torre OM, See E, Kazezian Z, Pandit A, et al. Spine J 2015;15:2045–54.
- [38] Lee W, Wiseman ME, Nam-Joon Cho, Glenn JS, Frank CW. Biomaterials, 2009;30:6648-6654.
- [39] Prausnitz MR, Mitragotri S, Langer R. Nat Rev Drug Discov 2004;3:115-24.
- [40] Langer R. Science 1990;249:1527-33.
- [41] Sanders LM, Kell BA, McRae GI, Whitehead GW, J Pharm Sci 1986;75:356-60.
- [42] Capan Y, Woo BH, Gebrekidan S, Ahmed S, DeLuca PP, Pharmacol Res 1999;16:509-13.
- [43] Sansdrap P, Moes AJ, Int J Pharmaceut 1993;98:157-64.
- [44] Siepmann J, Faisant N, Akiki J, Richard J, Benoit JP, J Control Release 2004;96:123-34.
- [45] Abidian MR, Kim DH, Martin DC, Adv Mater 2006;18:405-9.
- [46] Gabor F, Ertl B, Wirth M, Mallinger R, J Microencapsul 1999;16:1-12.
- [47] Chen W, Lu DR, J Microencapsul 1999;16:551-63.
- [48] Ringsdorf H, J Polym Sci Pol Sym 1975;51:135-53.
- [49] Huang YY, Chung TW, Tzeng TW, Int J Pharm 1999;182:93-100.
- [50] Biondi M, Ungaro F, Quaglia F, Antonio Netti P, Adv Drug Deliver Rev 2008;60:229-242.
- [51] Chen RR, Mooney DJ, Pharm Res 2003;20:1103-1112.
- [52] Saltzman WM, Olbricht WL, Nat Rev Drug Discov 2002;1:177-186.
- [53] Langer R, Mol Ther 2000;1:12-15.
- [54] Nishinari K, Takahashi R, Curr Opin Colloid in 2003;8:5983-5992.
- [55] Cascone MG, Barbani N, Cristallini C, Giusti P, Ciardelli G, Lazzeri L, J Biomat Sci-, Polym E 2001;12:267-281.
- [56] Mora-Huertas CE, Fessi H, Elaissari A, Int. J. Pharm. 2010;385:113–142.
- [57] Vauthier C, Bouchemal K, Pharm. Res. 2009;26:1025–1058.
- [58] Zhu HG, Stein EW, Lu ZH, Lvov YM, McShane MJ. Chem Mat 2005;17:2323–8.
- [59] Wang Y, Caruso F. Chem Mat 2005;17:953–61.
- [60] Yu A, Gentle I, Lu G, Caruso F. Chem Commun 2006;20:150–2.
- [61] Wang Y, Caruso F. Adv Mater 2006;18:795–800.
- [62] Cassano R, Trombino S, Ferrarelli T, Bilia A R, Bergonzi M C, Russo A, Amicis F D, Picci N. React. Funct. Polym. 2012;72:446–450.

- [63] Peppas NA, Bures P, Leobandung W, Ichikawa H. Eur. J. Pharm. Biopharm. 2000;50:27–46.
- [64] Hennink W E, van Nostrum C F. Adv. Drug Deliver. Rev. 2012;64, 223–236.
- [65] Pașcalău V, Popescu V, Popescu G L, Dudescu M C, Borodi G, Dinescu A, Perhaița A, Paul M. J. Pharm. Biopharm. 2012;536:S418–S423.
- [66] Hoffman AS. Adv. Drug Deliv. Rev. 2002;54: 3–12.
- [67] Dash M, Chiellini, Ottenbrite R M, Chiellini E. Prog. Polym. Sci. 2011;36: 981–1014.
- [68] Dosio F, Arpicco S, Stella B, Fattal E. Adv. Drug Deliver. Rev. 2016;97:204–236.
- [69] Zhang P, Yang H, Wang G, Tong W, Gao C. Colloid Surface B 2016;142:223–229.
- [70] Karbownik MS, Nowak JZ. Pharmacol rep 2013;65:1056-1074.



JL

## REVENDICĂRI

1. Microcapsule nucleu-înveliș pe bază de materii prime naturale cu aplicații în sisteme de transport și eliberare la țintă a medicamentelor având o matrice (6) de gel BSA, destinată transportului substanțelor active și un înveliș (2) prin care substanța activă difuzează, **caracterizate prin aceea că**, pentru a asigura parametrii doriți pentru difuzia substanței active, învelișul (2) are o structură multistrat formată dintr-un strat (3) de hidrogel reticulat cu  $\text{Ca}^{2+}$  al polizaharidei anionice urmat de alte  $n$  straturi de complex polielectrolitic format între hidrogelul polizaharidei anionice și polizaharida cationică (4) și în continuare între polizaharida anionică și cea cationică (5), proprietățile de difuziune ale învelișului fiind influentate atât de numărul straturilor cât și de natura polizaharidelor utilizate.
2. Microcapsule nucleu-înveliș, conform revendicării 1, **caracterizate prin aceea că**, pentru a fi utilizate în aplicații de transport și eliberarea prelungită a unor produși activi naturali, cu activitate antiinflamatorie, antibacteriană și anticancerigenă, a căror solubilitate apoasă foarte scăzută determină o slabă biodisponibilitate la administrare orală, se folosește un complex polielectrolitic format din k-carrageenan și chitosan.
3. Microcapsule nucleu-înveliș, conform revendicării 1, **caracterizate prin aceea că**, pentru a exploata proprietățile mucoadezive, se folosește un complex polielectrolitic format din pectină și chitosan.
4. Microcapsule nucleu-înveliș, conform revendicării 1, **caracterizate prin aceea că**, pentru alte proprietăți și utilizări, se folosește un complex polielectrolitic format din acid hialuronic și chitosan.
5. Microcapsule nucleu-înveliș, conform revendicării 1, **caracterizate prin aceea că**, pentru alte proprietăți și utilizări, se folosește un complex polielectrolitic format din pectină, acid hialuronic și chitosan.
6. Procedeu de sinteză a microcapsulelor de tip nucleu-înveliș, **caracterizate prin aceea că**, presupune efectuarea următoarelor etape:
  - a. *Sinteza microparticulelor  $\text{CaCO}_3/\text{BSA}$* , prin coprecipitare a  $\text{CaCO}_3$  cu BSA: într-un volum de soluție de  $\text{CaCl}_2$  0,33M, conținând 0,75% BSA se adăugă

Cruș

aceiași volum de soluție de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,33M sub agitare mecanică energică, timp de 30 s, iar după 15 minute are loc centrifugarea particulelor la 4000 rpm, timp de 5 min, apoi se spală repetat cu apă, cu centrifugare după fiecare spălare.

b. *Sinteza învelișului multistrat al microparticulelor*, prin tehnica depunerii strat cu strat, în următorii pași:

- i. primul strat se obține prin introducerea microparticulelor rezultate în etapa precedentă într-o soluție 1% polizaharidă anionică dizolvată în apă pură sau în soluție tampon de pH adecvat (PBS), sub agitare magnetică lentă (500 rpm) la 40°C, timp de 15 min, urmat de centrifugare 3 min la 4000 rpm și 3 spălări cu apă distilată;
- ii. al doilea strat se obține prin introducerea microparticulelor rezultate la pasul i într-o soluție 1% chitosan dizolvat în soluție 1% acid acetic, preparată prin agitare la temperatura camerei, sub agitare magnetică lentă (500 rpm) la 40°C, timp de 15 min, urmat de centrifugare 3 min la 4000 rpm și 3 spălări cu apă distilată;
- iii. următoarele n straturi se obțin prin introducerea alternativă a microparticulelor rezultate la pasul precedent în soluția polizaharidei anionice respectiv cationice, sub agitare magnetică lentă (500 rpm) la 40°C, timp de 15 min, urmat de centrifugare 3 min la 4000 rpm și 3 spălări cu apă distilată după fiecare strat.

c. *Prepararea microcapsulelor*, în următorii pași:

- i. eliminarea componentei anorganice prin complexarea ionilor de  $\text{Ca}^{2+}$  cu soluție de EDTA 0,2 M cu pH 7,5, sub agitare energică, urmată de spălare cu cantitate abundentă de apă ultrapură și centrifugare la 4000 rpm, 15 min, până la decolorarea totală;
- ii. tratarea cu o soluție diluată de HCl (0,1 M), urmată de spălare până la pH neutru și centrifugare pentru îndepărtarea totală a  $\text{CaCO}_3$ ;
- iii. gelificarea BSA-ului prin încălzirea microcapsulelor rezultate la pasul precedent la 80°C sub agitare blândă timp de 30 minute, urmată de centrifugare și spălare;

89

- iv. formarea unei suspensii de microcapsule prin diluarea concentratului de la pasul precedent 1:10 cu apă pură și păstrarea acesteia la frigider până la utilizare.

Cruz

57

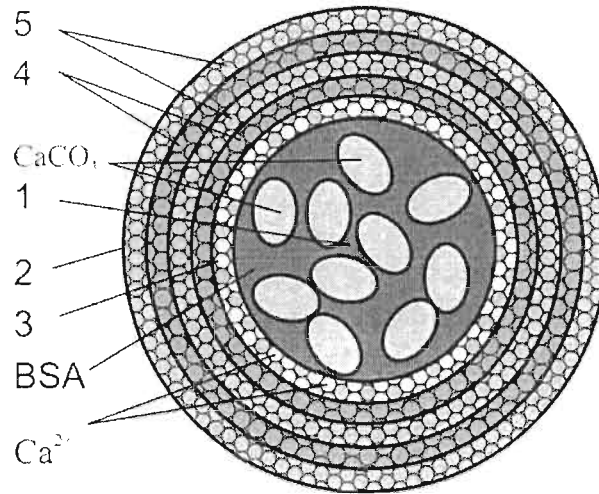


Figura 1

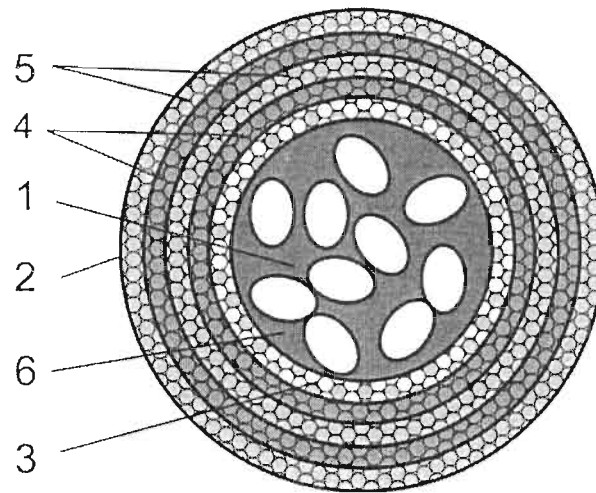
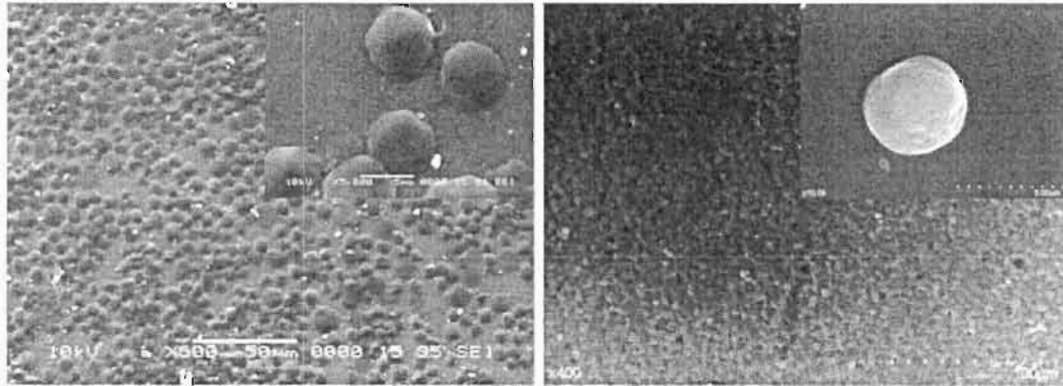


Figura 2

*Cupry*

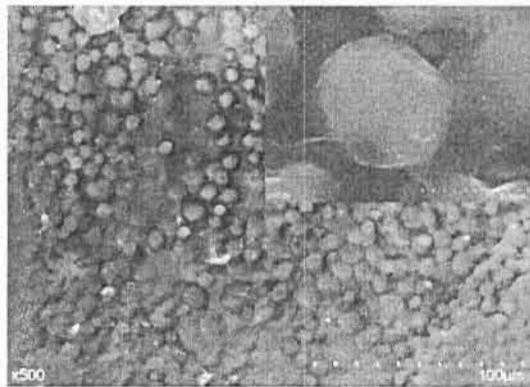


JL

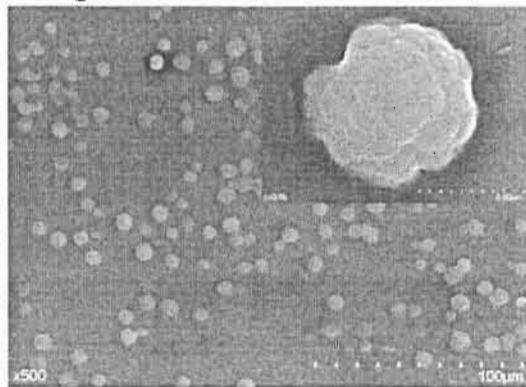


Microcapsule  
BSA gel/k-Carrageenan/Chitosan

Microcapsule  
BSA gel/Pectina/Chitosan



Microcapsule  
BSA gel/Acid hialuronic/Chitosan



Microcapsule  
BSA gel/Pectina/Chitosan/Acid Hialuronic

Figura 3

*Copy*