

Studii *in vitro* privind eliberarea nistatinei dintr-o membrană microporoasă de poliuretan-uree

CĂTĂLINA CIOBANU ^{1*}, DANA DOROHOF, LEONARD IGNAT ², CONSTANTIN CIOBANU ²

¹ Universitatea "Alexandru Ioan Cuza", Bulevardul Carol I, Nr.11, 700506, Iași, România

² Institutul de Chimie Macromoleculară „Petru Poni”, Aleea Gr. Ghica Vodă, Nr.41 A, 700487, Iași, România

The studies were concerned on the releasing of nystatin from polyurethane urea (PUU) microporous membrane at different pH values at room temperature. The whole ATR-FTIR spectrum of PUU-nystatin is shifted to smaller wave numbers compared to control PUU which indicates the increasing of structured degree of PUU-nystatin. The stress-strain curves are sustained by the ATR-FTIR results demonstrating the structuring effects of a polar bioactive nystatin materialized through an increasing of the initial modulus. The nystatin delivery in watery solution has a strong reaction to pH. At pH 3, in the first 170 minutes, the nystatin is released in proportion of 38% whereafter drug release is approximately constant in time.

Key words: polyurethane urea, nystatin, release

Cedarea controlată a produselor bioactive din matrici polimere biocompatibile și bioresorbabile reprezintă una din cele mai avansate metode de administrare a medicamentelor [1]. Eliberarea medicamentelor funcție de timp este de regulă specifică unui anumit organ, țesut sau situs din organism (stomac, intestin subțire sau gros, tumoare, chist etc) [2]. Sistemele polimere sub formă de gel, membrane microporoase sau nanofibre au fost frecvent utilizate ca suporturi pentru eliberarea controlată a medicamentelor [3-6]. Medicamentele încorporate în diferite tipuri de polimeri și direcționate spre o anumită țintă au o toxicitate redusă ca urmare a plafonării salturilor de concentrație în substanță activă liberă, o specificitate ridicată și elimină terapia discontinuă [6]. Cedarea medicamentului dintr-o matrice polimeră depinde atât de modalitatea de înglobare a medicamentului în polimer și de proprietățile polimerului (structură chimică și supramoleculară, permeabilitate, solubilitate a unităților structurale, temperatură de tranziție sticloasă, cristalinitate, proprietăți mecanice, biocompatibilitate, biodegradabilitate), cât și de caracteristicile mediului în care se află (pH, temperatură, umiditate, sisteme enzimatic) și ale unor factori externi (de exemplu un câmp electric slab) [7-20].

În lucrarea de față ne-am propus să studiem modul de eliberare a nistatinei *in vitro*, funcție de pH, dintr-o membrană microporoasă de poliuretan-uree biocompatibilă [21], în vederea obținerii ulterioare a unor preparate antifungice. Nistatina fiind o polienă antimicotică eficientă față de ciuperci din genurile *Cryptococcus* și *Candida*, este folosită în tratarea infecțiilor fungice ale pielii și în mucoaselor gurii, vaginului, tractului intestinal, precum și în profilaxia pacienților cu risc crescut de infecții fungice, cum ar fi cei bolnavi de SIDA și cei supuși chimioterapiei [22, 23].

Partea experimentală

Sinteza poliuretan-ureei (PUU)

Poliuretan-ureea a fost obținută conform unui procedeu descris anterior [24], pornind de la poli(etilen adipat)diol cu masa moleculară 2000 (1 mol), 4,4'- difenil metan diizocianat (MDI) (puritate 99,2%) (6 moli), butilen glicol

(BG) (puritate 99,6%) (4 moli) și apă (1 mol) în soluție de dimetil formamidă (DMF) (40% w/w), la 60°C, timp de 8 h. Masa medie molară a polimerului are valoarea de 116.607 (obținută prin cromatografie de permeație pe gel, aparat GPC tip PL-EMD-950). Concentrația în grupe uretanice este de 3,05 mol/1000g polimer, iar raportul molar uretan:uree este 3:1.

Obținerea filmului microporos din poliuretan-uree cu nistatină

Soluția din PUU cu 1000 ppm nistatină a fost obținută din soluție de PUU și soluție de nistatină în DMF, corespunzător unei concentrații de 400 UI/g polimer. Soluția PUU-nistatină, degazată în prealabil la presiune scăzută (10-15 mm Hg timp de 8-12 min), s-a depus pe un suport de sticlă cu dimensiunile de 220:240:4 mm cu ajutorul unui raclu cu deschiderea fantei de 6 mm. Suportul cu soluția polimeră a fost introdus timp de două ore într-o încălzită închisă saturată în vapori de apă la temperatura de 45°C, obținându-se o membrană cu microporozitate uniformă [25], care a fost în continuare uscată în etuvă, la 37°C și presiune scăzută de 20 mm Hg, timp de 200 h. Pentru îndepărtarea urmelor de solvent, membrana microporoasă rezultată a fost condiționată o săptămână într-un exicator la temperatura camerei și presiunea de 1-2 mm Hg.

Trasarea curbei etalon a nistatinei

Trasarea curbei de etalonare în UV-VIS s-a realizat ținând cont de solubilitatea redusă a nistatinei în soluție apoasă [26] și de concentrația medicamentului încorporat în membrană.

Metode de analiză

Proprietățile mecanice ale probelor de PUU, respectiv PUU-nistatină, au fost studiate cu un aparat de tip TIRA-Test 2161 cu computer înglobat. Probele au fost întinse la temperatura camerei cu viteza de 14 mm/min.

Structura chimică a matricei polimere a fost studiată cu un spectrometru Bruker Vertex 70 cu transformantă Fourier prin metoda reflexiei totale atenuate în infraroșu (ATR-FTIR).

La fiecare determinare au fost introduse câte 0,5 g membrană de PUU-nistatină în 10 ml soluție tampon acid

* email: catalinaxy15@yahoo.com

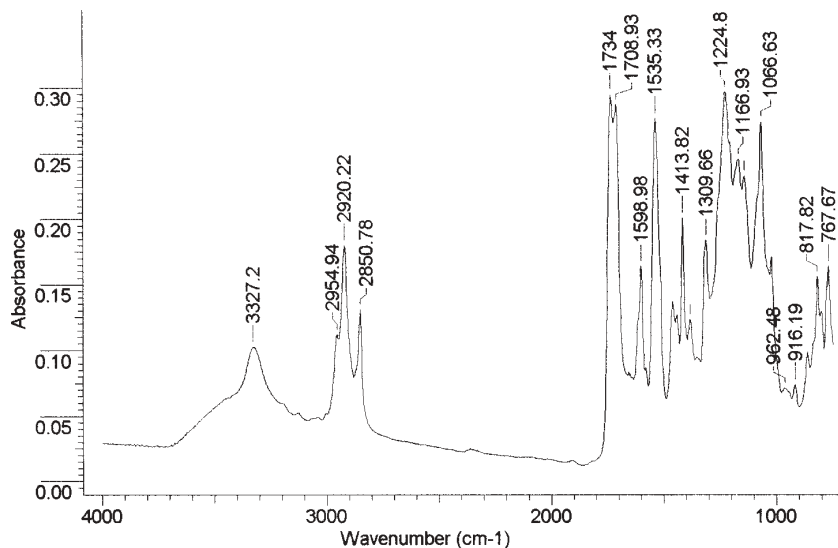


Fig. 1. Spectrul ATR-FTIR al PUU

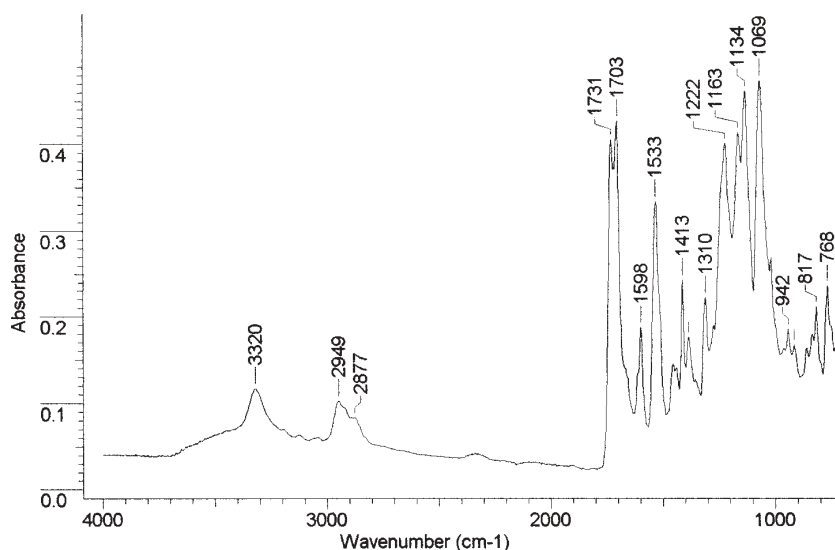


Fig. 2. Spectrul ATR-FTIR al PUU-nistatină

citric - NaHPO_4 (Fluka), termostată la temperatura de 20°C , cu pH 2; 3; 4,8; 5,8; 7,4 și respectiv 8. Fiecare probă a fost agitată continuu până în momentul măsurătorii.

Cantitatea de nistatină eliberată a fost măsurată la 305 nm prin metoda spectrofotometrică, utilizând un spectrofotometru UV-VIS Jenway 6505 cu achiziție de date.

Rezultate și discuții

Măsurători ATR-FTIR

Prin comparația spectrelor în infraroșu ale PUU și PUU-nistatinei obținute prin reflexie total atenuată (fig. 1, 2) se observă că raportul absorbanțelor grupărilor $\text{C}=\text{O}_{1734}/\text{C}=\text{O}_{1708,93}$ (I) de la PUU martor este supraunitar, iar raportul absorbanțelor grupărilor $\text{C}=\text{O}_{1731}/\text{C}=\text{O}_{1703}$ (II) de la PUU-nistatină este subunitar. Pe de altă parte, absorbțiile specifice ale întregului spectru al PUU-nistatinei sunt deplasate către numere de undă mai mici în raport cu martorul.

Aceste caracteristici spectrale indică un grad mai mare de ordonare al arhitecturii macromoleculare în membranele cu nistatină, nistatina înglobată în matricea poliuretanică determinând desfacerea unei părți din legăturile de hidrogen formate între grupele uretan și ester și creșterea concentrației în structuri mai ordonate, de tip uretan-uretan. Mărirea gradului de ordonare al matricei

poliuretan-ureice în prezența nistatinei a fost observată și la alte amestecuri poliuretani-compoziții organici cu masă molară mică [27, 28] și, asociată cu o foarte bună separare de faze, are ca efect îmbunătățirea în ansamblu a proprietăților polimerului [24, 29].

Proprietăți mecanice

Poliuretan-ureea cu nistatină dă un răspuns diferit față de martor la solicitările mecanice, după cum se observă la analiza curbelor tensiune-deformare în zona înalt elastică (fig. 3).

În timp ce polymerul martor prezintă un modul inițial de 26,25 MPa, modulul corespunzător probei de PUU-nistatină are valoarea de 43,89 MPa, ceea ce confirmă separarea de faze și structurarea matricei polimere sub influența nistatinei. Pe de altă parte, modulul inițial scade după umectare atât la martor cât și la PUU-nistatină, cu o mărime care variază funcție de pH -ul mediului (fig. 4).

Acest comportament se poate explica prin faptul că suprafața unei membrane hidrofile de poliuretan (cu o concentrație de peste 2 moli uretan la 1000 g polimer) se hidrofobizează după contactul cu apa, în timp ce o suprafață hidrofobă devine mai hidrofilă [30, 31]. Fiind o polienă hidrofobă, nistatina determină creșterea hidrofiliei membranei poliuretan-ureice microporoasă la contactul

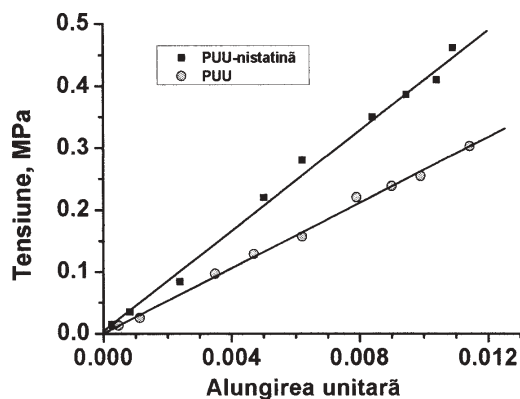


Fig. 3. Curbele tensiune-deformare a PUU, respectiv a PUU-nistatină

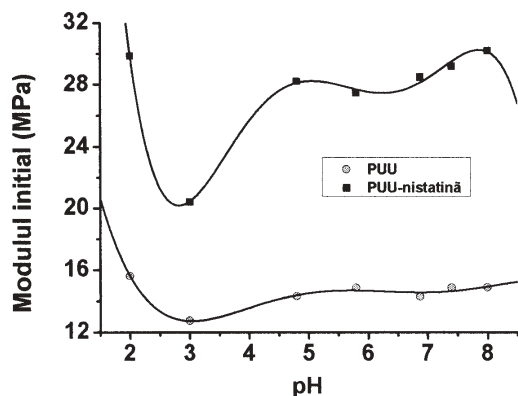


Fig. 4. Modulul inițial la probele de PUU, respectiv de PUU-nistatină, în funcție de pH-ul mediului

cu apa. În plus, apa din matricea polimeră face ca lanțurile macromoleculare să fie mai mobile [32], iar forțele inter- și intramoleculare să scadă, fenomen ce se reflectă prin scăderea modulului inițial la probele umectate în raport cu martorii. Modificarea modulului inițial nu numai ca urmare a umectării, ci și a domeniului de pH poate fi explicată printr-o hidratare mai accentuată a matricei polimerice la un anumit pH, cum este cazul la pH 3, unde se observă o scădere a modulului inițial cu 51,43% la martor și 53,47% la PUU-nistatină.

Eliberarea nistatinei

Cantitatea de nistatină eliberată din matricea polimeră, funcție de timp, depinde de valorile pH-ului mediului în care se află (fig. 5).

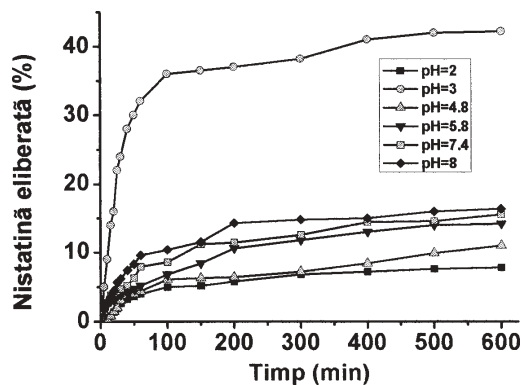


Fig. 5. Procentul de nistatină eliberată din matricea polimeră funcție de timp pentru diferite valori ale pH-ului mediului

S-a constatat că în primele 100 min proporția de nistatină eliberată crește rapid, având ca rezultat cedarea în mediu a 5-36% din cantitatea totală de nistatină înglobată în polimer. Cea mai mare creștere se înregistrează pentru

pH=3, datorită creșterii hidrofiliei matricei polimerice la acest pH. În intervalul de timp 100-600 min, proporția nistatinei eliberate este relativ constantă. Acest comportament indică prezența în matricea polimeră atât a nistatinei libere, cât și a celei legate. Nistatina liberă trece ușor în soluție, procesul fiind controlat de solubilitatea medicamentului și permeabilitatea membranei, în timp ce nistatina legată de lanțurile macromoleculare prin legături slabe este eliberată în funcție de morfologia matricei polimerice [1], motiv pentru care trecerea acesteia în soluție este mai lentă.

Concluzii

Nistatina înglobată în membrana poliuretanică determină mărirea gradului de ordonare al matricei polimerice, fapt confirmat de măsurătorile ATR-FTIR. Aceasta, asociată cu o foarte bună separare de faze, are ca efect îmbunătățirea în ansamblu a proprietăților polimerului.

Separarea de faze și structurarea matricei polimerice sub influența nistatinei este confirmată și de măsurătorile mecanice (modulul inițial al PUU-nistatină este aproape dublu față de modulul inițial al PUU). De asemenea, proba PUU-nistatină, atunci când este umectată, răspunde diferit la deformările mecanice, funcție de pH-ul mediului în care se află. La pH=3 se observă o scădere accentuată a modulului inițial (cu 53,47%). Modificarea modulului inițial nu numai ca urmare a umectării, ci și a domeniului de pH poate fi explicată printr-o hidratare mai accentuată a matricei polimerice la un anumit pH, cum este la pH=3.

Procentul de nistatină eliberată din membrana microporoasă poliuretanică depinde de morfologia matricei polimerice și de pH-ul mediului în care se află proba. În primele 100 minute proporția de nistatină eliberată crește rapid, în mediu cedându-se 5-36% din cantitatea totală înglobată în polimer. Cea mai mare creștere se înregistrează la pH=3 datorită creșterii hidrofiliei matricei poliuretanică la acest pH.

Bibliografie

1. UHRICH, K.E., CANNIZZARO, S.M., LANGER, R.S., SHAKESHEFF, K.M., Chem. Rev., **99**, nr. 11, 1999, p. 3181
2. NAMAZI, H., KANANI, A., Antibiotic Journal of Bioactive and Compatible Polymers, **22**, nr. 1, 2007, p. 77
3. FATIMA, L., ASGHAR, A., CHANDRAN, S., J. Pharm. Pharmaceut. Sci., **9**, nr. 3, 2006, p. 327
4. VAN DEN MOOTER, G., WEUTS, I., DE RIDDER, T., BLATON, N., Int. J. Pharm., **316**, nr. 1-2, 2006, p. 1
5. PERAKSLIS, E.D., Determination of the in vitro and in vivo Oral Drug Delivery Capabilities of Complexation Hydrogels, Teză de doctorat, Drexel University, Philadelphia, U.S.A., 2006, p. 44
6. CUI, W., LI, X., ZHU, X., YU, G., ZHOU, S., WENG, J., Biomacromolecules, **7**, 2006, p. 1623
7. KENAWY, E.R., EL-NEWEHY, M., ABDEL-HAY, F., OTTENBRITE, R.M., Biomacromolecules, **8**, 2007, p. 196
8. JAGUR-GRODZINSKI, J., Reactive & Functional Polymers, **39**, 1999, p. 99
9. ZHANG, Y.Z., WANG, X., FENG, Y., LI, J., LIM, C.T., RAMAKRISHNA, S., Biomacromolecules, **7**, 2006, p. 1049.
10. RABKIN, E., SCHOEN, F.J., Cardiovascular Pathology, **11**, 2002, p. 305
11. JANATA, J., JOSOWICZ, M., Anal. Chem., **70**, 1998, p. 179
12. SOTIROPOULOU, M., BOKIAS, G., STAIKOS, G., Macromolecules, **36**, 2003, p. 1349
13. GREEN, R.J., CORNEILLIE, S., DAVIES, J., DAVIES, M.C., ROBERTS, C.J., SCHACHT, E., TENDLER S.J.B., WILLIAMS, P.M., Langmuir, **16**, 2000, p. 2744
14. PLUNKETT, K.N., MOORE, J.S., Langmuir, **20**, 2004, p. 6535

15. GILLIES, E.R., FRECHET, J.M.J., *Bioconjugate Chem.*, **16**, 2005, p. 361
16. TORRES-LUGO, M., GARCIA, M., RECORD, R., PEPPAS, N.A., *Biotechnol. Prog.*, **18**, 2002, p. 612
17. LECOMTE, F., SIEPMANN, J., WALTHER, M., MACRAE, R.J., BODMEIER, R., *Biomacromolecules*, **6**, 2005, p. 2074
18. UHRICH, K.E., *Chem. Rev.*, **99**, 1999, p.3181
19. AMBADE, A.V., SAVARIAR, E.N., THAYUMANAVAN, S., *Molecular Pharmaceutics*, **2**, nr. 4, 2005, p. 264
20. VANBEVER, R., LANGERS, G., MONTMAYEUR, S., PREAT, V., *Journal of Controlled Release*, **50**, 1998, p. 225
21. CIOBANU, C., TURA, V., DOROHAI, O., CIOBANU, L.C., *Biocompatibilitate și biostabilitate. Biopoliuretani*, Ed. Performantica, Iasi, 2006, p. 25
22. LAI, W.H., LU, S.Y., ENG, H.L., *Chang Gung Medical Journal*, **25**, 2002, p. 606
23. BORGOS, S.E.F., TSAN, P., SLETTA, H., ELLINGSEN, T.E., LANCELIN, J.M., ZOTCHEV, S.B., *J. Med. Chem.*, **49**, 2006, p. 2431
24. CIOBANU, C., HAN, X., CA^aCAVAL, C.N., GUO, F., RO^aU, D., IGNAT, L., MOROI, G., *Journal of Applied Polymer Science*, **87**, 2003, p. 1858.
25. CIOBANU, C., *Poliuretani pentru piele sintetică*, Teză de doctorat, Institutul de Chimie Macromoleculară „Petru Poni”, Iași, 1979, p. 17
26. KASIM, N.A., WHITEHOUSE, M., RAMACHANDRAN, C., BERMEJO, M., LENNERNA, H., HUSSAIN, A.S., JUNGINGER, H.E., STAVCHANSKY, S.A., MIDHA, K.K., SHAH, V.P., AMIDON G.L., *Molecular Pharmaceutics*, **1**, nr. 1, 2003, p. 85
27. YEN, F.S., HONG, J.L., *Macromolecules*, **30**, 1997, p. 7927
28. CIOBANU, C., STOICA, E., CA^aCAVAL, C.N., RO^aU, D., RO^aU, L., STATE, M., EMANDI, A., NEME^a, E., PETRESCU, F., *Journal of Applied Polymer Science*, **103**, 2007, p. 659
29. KOJIO, K., UCHIBA, Y., MITSUI, Y., FURUKAWA, M., SASAKI, S., MATSUNAGA, H., OKUDA, H., *Macromolecules*, 2007, p.1. (Communications to the Editor)
30. MAKAL, U., WYNNE, K.J., *Langmuir*, **21**, 2005, p. 3742
31. ROGGE, T.M., STEVENS, C.V., VANDAMME, A., BOOTEN, K., LEVECKE, B., D'HOOGE, C., HAELTERMAN, B., CORTHOUTS, J., *Biomacromolecules*, **6**, 2005, p. 1992
32. MACKEL, M.J., SANCHEZ, S., KORNFIELD, J.A., *Langmuir*, **23**, 2007, p. 3

Intrat în redacție: 4.04.2007

