

Surfactanți polimerici pentru stabilizarea nanoparticulelor

LUCREȚIA CISMARU^{1*}, THIERRY HAMAIDE², MARCEL POPA¹

¹ Universitatea Tehnică Gh. Asachi, Iași, România. Bd. D. Mangeron, Nr. 71A, 700050, Iași, România

² Universite Claude Bernard Lyon 1, France

Polymeric nanoparticles are widely used as drug carriers in order to achieve the targeting of drug to the ill tissue. N-vinyl-2-pyrrolidone and itaconic anhydride were copolymerized and the alternating copolymer was then grafted with PEG of different molecular weight, to form amphiphilic copolymers. The grafted copolymers have been used to prepare polycaprolactone nanoparticles. The PCL has been chosen as it can mimic the hydrophobic drugs. Several emulsions were stabilized and characterized by SLS. The synthesized copolymers proved to be effective in stabilizing nanoparticles. The mean diameter of nanoparticles was stable in time, over 12 weeks.

Keywords: Polycaprolactone nanoparticles, amphiphilic surfactants, radical polymerization

În industria farmaceutică se caută în prezent noi soluții pentru eliberarea controlată a medicamentelor. Este cazul în special a medicamentelor destinate terapiei anticancerogene, adesea dificilă din cauza biodisponibilității nespecifice a principiului biologic activ, caracterizată prin prezența acestuia în cantitate scăzută la nivelul țesutului tumoral și acumularea în țesuturi normale, unde determină efecte toxice (în special la nivel hepatic).

Numeroase sisteme de eliberare controlată au fost deja descrise în literatură, unele pur fizice (sistemul port-a-cath, care presupune implantarea unui cateter prin intermediul căruia se administrează medicamentul), altele bazate pe noi vectori ce pot transporta medicamentul până la țesutul țintă.

Tumorile sunt caracterizate prin anumite particularități morfologice, cum ar fi angiogeneza crescută, permeabilitate capilară crescută și drenare limfatică foarte lentă. Din aceste cauze, acumularea medicamentelor la nivel tumoral se poate realiza, prin efecte de permeabilitate și retenție crescută (EPR) [1].

Pentru a realiza eliberarea controlată a medicamentelor, diferite tehnici pot fi utilizate. Una din cele mai promițătoare este includerea principiului activ în particule polimerice (nanoparticule [2], nanocapsule [3], micle [4], conjugate medicament-polimer [5] sau lipozomi [6]).

Nanoparticulele sunt utilizate frecvent ca sisteme de transport, întrucât pot asigura transportul principiului activ până la nivelul țesutului țintă, persistând un timp îndelungat în circulația sanguină (cazul nanoparticulelor cu lanțuri poli(etilenglicol) (PEG) pe suprafață). De asemenea nanoparticulele permit administrarea pe cale intravenoasă a medicamentelor lipofile.

Pentru a obține nanoparticule stabile se utilizează un surfactant. Majoritatea nanoparticulelor utilizate în domeniul biomedical sunt stabilizate cu un surfactant polimeric, de obicei poli(alcool vinilic) (PVA) [7, 8] sau un membru al familiei Pluronic (copolimeri bloc poli(etilen glicol)-poli(etilen oxid)-poli(etilen glicol)). Pluronic are anumite dezavantaje, cum ar fi toxicitatea și nebiodegradabilitatea [9].

Numeroase tehnici de obținere a nanoparticulelor au fost descrise. Una din primele metode descrise este polimerizarea în emulsie. Numeroși autori au descris mecanismul acestei polimerizări [10, 11]. Lee și colab [12] au obținut nanoparticule de poli(acid lactic)-succinat de tocoferil – polietilen glicol prin tehnica emulsiei duble, în prezența poli(alcool vinilic) PVA. Emulsifierea spontană a

fost descrisă de către Iyer [13] care a obținut micle copolimerice pe bază de stiren-*alt*-anhidridă maleică. În acest caz, hidrolizatul stiren-*alt*-anhidridă maleică acționează ca surfactant. Studii asemănătoare au fost realizate de către Zeisser [14] care a sintetizat nanoparticule de poli(acid lactic) încărcate cu hipericina. Nanoparticule pe bază de poli(acid lactic - acid glicolic) au fost obținute și de către Jeon prin dializă [15].

Partea experimentală

N-vinil-2-pirrolidona a fost achiziționată de la Sigma Aldrich și a fost utilizată fără purificare suplimentară, anhidrida itaconică a fost achiziționată de la Fluka și utilizată ca atare (conținutul de acid itaconic determinat prin RMN ¹H a fost sub 1%), azobisisobutironitril (AIBN) a fost purificat prin recristalizare din metanol de două ori. PEG a fost purificat prin liofilizare. Pluronic - F68 a fost achiziționat de la Acros. Toți solvenții au fost achiziționați de la Sigma-Aldrich sau Acros și au fost utilizați ca atare.

Sinteza copolimerilor NVP - AI

Copolimerii NVP-AI au fost sintetizați prin polimerizare radicalică clasică, în prezența AIBN, utilizând acetat de etil ca solvent. Într-un balon cu trei găuri prevăzut cu un refrigerent a fost introdusă o cantitate de anhidridă itaconică (5g) dizolvată în acetat de etil. AIBN (1% molar față de totalul comonomerilor) a fost dizolvat în NVP (4,95 g). Raportul molar inițial între cei doi comonomeri a fost de 1:1. Precipitatul de culoare albă a fost recuperat la sfârșitul reacției și purificat prin extracție Soxhlet în benzen timp de 8 h, urmată de uscare sub vid, 24h. Produsul final a fost caracterizat prin RMN ¹H, ¹³C și IR.

Sinteza copolimerilor grefați

Grefarea copolimerilor NVP-*alt*-AI a fost realizată prin reacția cu PEG (PEG350, PEG550, PEG750) în lipsa solventului. Reacția a fost realizată într-un balon cu două găuri în atmosferă inertă (argon), sub agitare, la 120°C. Produsul final a fost spălat cu THF de 4 ori pentru a elimina PEG nereacționat. Produsul grefat a fost în general hidrosolubil, în funcție de numărul de unități anhidridice rămase intacte, solubilizarea putând dura până la 10 ore. Spectrul IR al soluției clare obținute la dizolvarea copolimerului grefat în apă, a arătat că toate unitățile anhidridice au fost hidrolizate. Produsele au fost caracterizate prin GPC apoi cuplat cu cromatografie de excluziune sterică și IR.

* Tel.: 0723440716

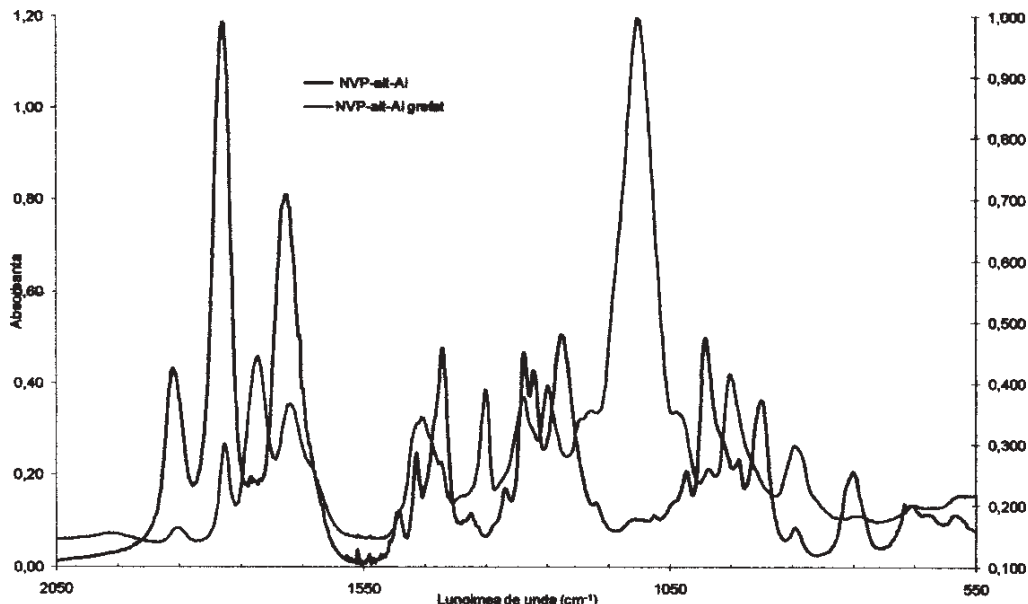


Fig. 1. Spectrul IR al unui copolymer NVP-*alt*-AI precum și al unui copolymer NVP-*alt*-AI grefat cu PEG. Se poate observa că sunt încă prezente unități anhidridice în copolimerul grefat

Determinarea CMC

Concentrația critică micelară a fost măsurată cu ajutorul unui tensiometru Kruss K 1000 prevăzut cu două biurete, pentru diluarea soluției de analizat, păstrând volumul constant.

Prepararea nanoparticulelor

Nanoparticulele au fost preparate prin tehnica evaporării solventului. O soluție de poli(caprolactonă) (PCL) în acetat de etil a fost preparată (4 g/L). Copolimerul a fost dizolvat în același volum de apă deionizată, rezultând o soluție de concentrație 0,4 g/L. Cele două soluții au fost amestecate, sub agitare magnetică moderată, și apoi ultrasonate la 450W timp de 5 min cu un generator Bioblock. Acetatul de etil a fost eliminat la presiune redusă, la temperatura camerei.

Determinarea dimensiunilor particulelor

Diametrul mediu al nanoparticulelor și indicele de polidispersitate au fost determinate cu un instrument Malvern Nanosizer prin tehnica difracției statice a luminii. Pentru a măsura diametrul particulelor, au fost realizate diluții de 1/100 (volumic) în apă deionizată.

Rezultate și discuții

Sinteza copolimerilor

Copolimerizarea NVP cu AI a avut loc printr-un mecanism ce implică existența unui complex de transfer de sarcină, după cum a fost relevat de către numeroși autori [16, 17]. Copolimerul obținut este de tip alternant, deși anhidrida itaconică spre deosebire de cea maleică prezintă posibilitatea de a homopolimeriza.

Spectrul ¹³C a relevat următoarele:

Atom	Deplasarea chimică (ppm)
1	42,4
2	30,8
3	177,3
4	32
5	16,4
6	45
7	171 – 175
8	36,5
9,10	47,5

Spectrul IR al copolimerilor sintetizați arată prezența celor două benzi anhidridice, (1863 cm⁻¹ și 1778 cm⁻¹) date de legătura C=O; banda amidică (1680 cm⁻¹); CH₂ polymer (2960 cm⁻¹).

Din studiul RMN s-a observat că modificarea raportului dintre cei doi comonomeri nu a determinat modificări importante în compoziția copolimerului.

Copolimerii grefați

Spectrul IR al copolimerilor grefați arată formarea unei intense benzi ester (1730 cm⁻¹) și scăderea dramatică a semnalului corespunzător benzilor C=O din anhidridă. Reacția nu decurge cu deschiderea completă a ciclurilor anhidridice, nici în cazul unui raport inițial PEG/(anhidrida copolymer) supraunitar. Păstrarea unui procent de grupări anhidridice intacte permite modularea caracterului copolimerului sintetizat, prin grefarea unui alt compus hidrofil/hidrofob. Astfel, pentru a crește aportul componentei hidrofobe, a fost grefat 1-dodecanol. Unitățile anhidridice rămase intacte suferă un proces de hidroliză la dizolvarea copolimerului în apă, transformându-se în acid, ceea ce favorizează solubilizarea.

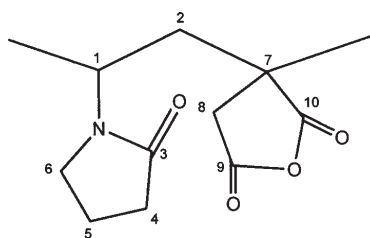
Determinarea CMC

CMC a fost determinat prin metoda lamei Wilhelmy, folosind un sistem automat. Tensiunea superficială a fost determinată prin intermediul ecuației:

$$\sigma = \frac{F}{L \cos \theta}$$

unde:

- σ reprezintă tensiunea superficială,
- F - forța ce acționează asupra balanței,
- L - lungimea udată de lichid.
- θ - unghiul de contact.



Metoda Wilhelmy prezintă anumite avantaje: nu necesită efectuarea de corecții, cum este cazul metodei inelului, nu modifică starea de echilibru a sistemului, din moment ce lama nu se deplasează, odată ce suprafața lichidului a fost atinsă. În concluzie metoda Wilhelmy se pretează cel mai bine la măsurarea CMC a surfactanților macromoleculari. O posibilă explicație a valorilor destul de mari găsite pentru CMC ar putea fi comportamentul special al PEG în apă.

Valorile măsurate ale CMC sunt prezentate în tabelul 1.

Tabelul 1

MASELE MOLECULARE MEDII ³¹I CMC ALE COPOLIMERILOR GREFAȚI

Proba	PEG	PEG/AI	Mn(g/mol)	CMC (g/L)
LC14	350	1:1	18896	4,08
LC15	350	3:4	20060	4,70
LC16	550	1:1	25630	4,07
LC17	550	3:4	32110	5,28
LC18	750	1:1	22810	5,01
LC19	750	3:4	28350	4,86
Pluronic		F-68		2,66

Conform așteptărilor, masa moleculară medie a crescut odată cu creșterea masei PEG utilizat și cu raportul PEG/anhidridă.

Prepararea nanoparticulelor

Nanoparticulele de PCL au fost stabilizate prin utilizarea copolimerilor sintetizați sau a unui amestec copolimer/Pluronic în unele cazuri. În toate cazurile, s-a utilizat un polimer poli(caprolactonă) cu masa de 14000. Rezultatele sunt prezentate în tabelul 2.

Tabelul 2

DIAMETRUL MEDIU AL PARTICULELOR, MĂSURAT PRIN SLS

Surfactant	Diametrul mediu (μm)
Pluronic F68	153
LC14	160
LC15	160
LC16	159
LC17	158
LC18	158
LC19	157

Diametrul mediu al particulelor nu s-a modificat substanțial în funcție de conținutul de copolimer utilizat. Imediat după preparare nanoparticulele au fost stabile, în unele cazuri apărând un fenomen de precipitare la câteva zile după preparare. Chiar și în acest caz, printr-o ușoară agitare nanoparticulele au fost imediat redispersate, infirmând astfel prezența fenomenelor de floculare. Stabilizarea sterică indusă de lanțurile copolimerice conținând PEG a fost eficientă, dimensiunea nanoparticulelor fiind asemănătoare celor stabilizate cu Pluronic.

Stabilitatea nanoparticulelor a fost urmărită pe parcursul a mai multor săptămâni, măsurând la intervale regulate de timp diametrul acestora. La temperatura camerei diametrul nanoparticulelor nu a înregistrat variații semnificative, ceea ce dovedește că stabilizarea sterică conferită de grupările PEG este eficientă.

Concluzii

Copolimerii NVP-alt-AI au fost sintetizați prin polimerizare radicalică clasică. Deoarece copolimerizarea decurge printr-un complex de transfer de sarcină, copolimerul obținut este de tip alternant, după cum au arătat și studiile RMN.

Nanoparticles stability

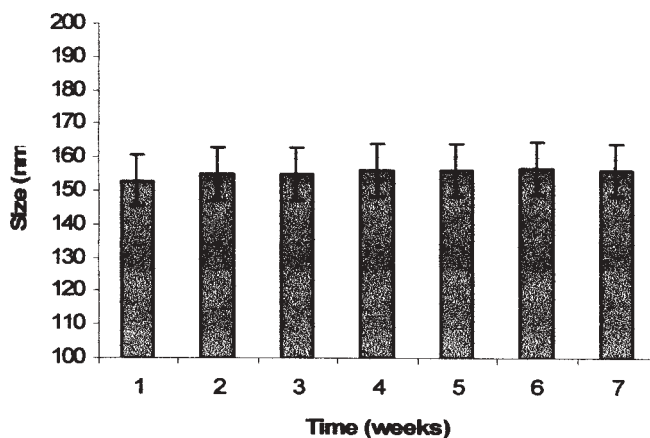


Fig. 2. Diametrul mediu al nanoparticulelor în funcție de timp

Copolimerii sintetizați au fost greșați cu PEG de diverse mase molare, pentru a obține copolimeri amfifili hidrosolubili. Copolimerii greșați au fost caracterizați prin spectroscopie IR și GPC apoi cuplat cu cromatografie de excluziune sterică. CMC a copolimerilor sintetizați a fost determinată prin metoda Wilhelmy, metodă indicată pentru sistemele macromoleculare.

Nanoparticule de policaprolactonă au fost stabilizate prin intermediul copolimerilor amfifili sintetizați, diametrul mediu al nanoparticulelor având valori similare celor stabilizate cu Pluronic, un surfactant frecvent utilizat. Stabilitatea nanoparticulelor în timp a fost studiată, arătându-se că diametrul variază foarte puțin, deci nanoparticulele stabilizate cu acest tip de surfactant pot fi stocate un timp îndelungat, înainte de o eventuală administrare în scop terapeutic.

Bibliografie

1. CIRSTOIU-HAPCA, A, BOSSY-NOBS, L, BUCHEGG, R FDELIE F, Int. J. Pharm., **331**, 2007, p. 190
2. COUVREUR PPUISIEUX, F, Advanced Drug Delivery Reviews, **10**, 1993, p. 141
3. COUVREUR, P, KANTE B, ROLAND, MGOIT P, J. Pharm. Pharmacol., **31**, 1999, p. 331
4. JONES M-CLEROUX J-C, Eur J Pharm Biopharm, **48**, 1999, p. 101
5. DUNCAN, R, Anti-Cancer Drugs, **3**, 1992, p. 175
6. SABATÉ, R, GALLARDO MESTELRICH J, Colloid Surface A, **270 - 271**, 2005, p. 13
7. DERAKHSHANDEH, K, ERFAN MDADASHZADEH S, Eur J Pharm Biopharm, **66**, 2007
8. GOMEZ-GAETE C, TSAPIS N, BESNARD M, BOCHOT AFATTAL E, Int. J. Pharm., **331**, 2007, p. 160
9. LEE S J, HAN B R, PARK S Y, HAN D KIM S C, J. Polym. Sci. Polym. Chem., **44**, 2006, p. 888
10. KREUTER, J, Pharm. Acta Helv., **58**, 1983, p. 196
11. VANDERHOFF, J, J. Polym. Sci., **72**, 1985, p. 161
12. LEE, S, ZHANG ZFENG S, Biomaterials, **28**, 2007
13. IYER, A, GREISH, K, FANG, JMURAKAMI, R, Biomaterials, **28**, 2007, p. 125
14. ZEISSER-LABOUÈBE M, LANGEN, GURNY RDELIER, Int. J. Pharm., **326**, 2006
15. JEON, H-J, JEONG, Y-I, JANG, M-KPARK, Y-H, Int. J. Pharm., **207**, 2000, p. 99
16. VERON, L, REVOL, M, MANDRAND, BDELAIR T, J Appl Polymer Sci, **81**, 2000, p. 3327
17. FEHERVARI, F, AZORI, MTUDOS F, Polymer Bulletin, **18**, 1987, p. 225

Intrat în redacție: 21.06.2007

