

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
“CAROL DAVILA” BUCUREȘTI
FACULTATEA DE FARMACIE**

**SISTEME DE ELIBERARE A
SUBSTANȚELOR MEDICAMENTOASE
PE BAZĂ DE CHITOSAN PENTRU
APLICAȚII TOPICE**

**CHITOSAN-BASED DRUG DELIVERY
SYSTEMS FOR TOPICAL
APPLICATIONS**

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

**CONDUCĂTOR ȘTIINȚIFIC,
Prof. univ. dr. DUMITRU LUPULEASA**

**DOCTORAND,
ANA MARIA MUȚ**

**BUCUREȘTI
2018**

Teza de doctorat cuprinde:

165 pagini din care:

- **42 pagini: PARTE GENERALĂ**
- **123 pagini: PARTE EXPERIMENTALĂ**, care include
 - 47 figuri
 - 40 tabele
 - 350 indicații bibliografice
 - lista lucrărilor publicate *in extenso*

CUPRINS

INTRODUCERE	1
PARTEA GENERALĂ	
I. EXCIPIENȚI FARMACEUTICI NATURALI UTILIZAȚI ÎN DEZVOLTAREA UNOR FORMULĂRI TOPICE SEMISOLIDE BIOCOMPATIBILE	4
I.1. Chitosanul polimer natural utilizat ca agent gelifiant	5
I.1.1. Proprietățile fizico-chimice ale chitosanului	6
I.1.2. Proprietățile biologice ale chitosanului	10
I.2. Esteri de zaharoză ai acizilor grași ca surfactanți și promotori de penetrare	16
I.2.1. Structură și proprietăți fizico-chimice	16
I.2.2. Proprietăți emulsionante și stabilizante	18
I.2.3. Proprietățile de creștere a permeabilității cutanate a esterilor de zaharoză ai acizilor grași	19
I.3. Uleiurile esențiale produse naturale cu rol de promotori ai penetrației percutanate a substanțelor medicamentoase	24
I.3.1. Penetrația prin piele a uleiurilor esențiale și a constituenților acestora	25
I.3.2. Mecanismul de acțiune al uleiurilor esențiale ca promotori de penetrare	25
I.3.3. Uleiuri esențiale utilizate ca promotori de penetrație percutanată	28
I.3.4. Compușii uleiurilor esențiale ca promotori ai penetrației percutanate	28
I.3.5. Irritația și toxicitatea cutanată a uleiurilor esențiale și constituenților lor	30
II. SISTEME FARMACEUTICE BIOCOMPATIBILE PENTRU ELIBERAREA TOPICĂ A SUBSTANȚELOR MEDICAMENTOASE	32
II.1. Hidrogeluri pe bază de chitosan	32
II.1.1. Considerații generale privind hidrogelurile	32
II.1.2. Posibilități de obținere ale hidrogelurilor pe bază de chitosan	33
II.1.3. Aplicații farmaceutice ale hidrogelurilor pe bază de chitosan	34
II.2. Microemulsii și microemulsii-gel pe bază de surfactanți naturali și biopolimeri	35
II.2.1. Considerații generale privind microemulsiile	35
II.2.2. Structura și compoziția microemulsiilor	36
II.2.3. Caracterizarea microemulsiilor	38
II.2.4. Modalități de mărire a penetrației percutanate a substanțelor medicamentoase prin intermediul formulărilor pe bază de microemulsii	38
II.2.5. Eficacitatea și inocuitatea formulărilor pe bază de microemulsii biocompatibile	40
III. DATE DE LITERATURĂ PRIVIND FLUCONAZOLUL – SUBSTANȚA MEDICAMENTOASĂ MODEL	41
III.1. Motivarea alegerii fluconazolului ca model	41
PARTEA EXPERIMENTALĂ	
IV. DEZVOLTAREA UNOR HIDROGELURI PE BAZĂ DE CHITOSAN ȘI COSOLVENȚI CA VEHICULE PENTRU ELIBERAREA TOPICĂ A SUBSTANȚELOR MEDICAMENTOASE GREU SOLUBILE ÎN APĂ	43

IV.1. Introducere	43
IV.2. Materiale și metode	44
IV.2.1. Materiale	44
IV.2.2. Metode	44
IV.2.2.1. Selectarea componentelor hidrogelurilor pe bază de chitosan	44
IV.2.2.2. Prepararea hidrogelurilor pe bază de chitosan	44
IV.2.2.3. Controlul calității hidrogelurilor pe bază de chitosan	44
IV.2.2.3.1. Examenul caracterelor macroscopice	44
IV.2.2.3.2. Determinarea pH-ului hidrogelurilor pe bază de chitosan	45
IV.2.2.3.3. Analiza reologică	45
IV.2.2.3.4. Analiza statistică a rezultatelor	45
IV.3. Rezultate și discuții	46
IV.3.1. Selectarea componentelor hidrogelurilor pe bază de chitosan	46
IV.3.2. Examinarea macroscopică	46
IV.3.3. Determinarea pH-ului hidrogelurilor pe bază de chitosan	46
IV.3.4. Analiza reologică a hidrogelurilor pe bază de chitosan	47
IV.4. Concluzii	54
 V. DEZVOLTAREA ȘI EVALUAREA UNOR NOI HIDROGELURI TOPICE BIOCOMPATIBILE PE BAZĂ DE CHITOSAN/HIDROXIPROPILMETILCELULOZĂ CONȚINÂND FLUCONAZOL 2% ȘI DIFERIȚI PROMOTORI DE ABSORBȚIE NATURALI	55
 V.1. Studii privind dezvoltarea unor hidrogeluri pe bază de chitosan/hidroxipropilmetilceluloză conținând fluconazol 2% și esteri de zaharoză. Influența esterilor de zaharoză utilizați ca promotori de absorbție asupra eliberării și permeației <i>in vitro</i> a fluconazolului	55
V.1.1. Introducere	55
V.1.2 Materiale și metode	56
V.1.2.1. Materiale	56
V.1.2.2. Metode	56
V.1.2.2.1. Studii de solubilitate	56
V.1.2.2.2. Selectarea componentelor hidrogelurilor cu 2% fluconazol	57
V.1.2.2.3. Prepararea hidrogelurilor pe bază de chitosan/HPMC conținând fluconazol 2% și esteri de zaharoză	57
V.1.2.2.4. Controlul calității hidrogelurilor pe bază de chitosan/HPMC conținând fluconazol 2% și esteri de zaharoză	58
V.1.2.2.4.1. Examenul caracterelor macroscopice	58
V.1.2.2.4.2. Determinarea conținutului în fluconazol al hidrogelurilor	58
V.1.2.2.4.3. Determinarea pH-ului hidrogelurilor	58
V.1.2.2.4.4. Analiza reologică	58
V.1.2.2.5. Studii privind eliberarea și permeația <i>in vitro</i> a fluconazolului din hidrogelurile pe bază de chitosan/HPMC și esteri de zaharoză	59
V.1.2.2.5.1. Pregătirea pielii excizate de pe urechea de porc (membrana biologică)	59
V.1.2.2.5.2. Evaluarea eliberării și permeației <i>in vitro</i> a fluconazolului din hidrogeluri prin membrană sintetică și piele excizată de pe urechea de porc	59
V.1.2.2.6. Analiza rezultatelor studiilor de eliberare și permeație <i>in vitro</i>	59
V.1.2.2.7. Evaluarea activității antifungice <i>in vitro</i> a hidrogelurilor experimentale	60
V.1.2.2.8. Analiza statistică a rezultatelor	61

V.1.3. Rezultate și discuții	61
V.1.3.1. Studii de solubilitate	61
V.1.3.2. Formularea hidrogelurilor pe bază de chitosan/HPMC conținând fluconazol 2% și esteri de zaharoză	62
V.1.3.3. Examenul caracterelor macroscopice	63
V.1.3.4. Determinarea conținutului în fluconazol al hidrogelurilor	63
V.1.3.5. Determinarea pH-ului hidrogelurilor	64
V.1.3.6. Analiza reologică	64
V.1.3.7. Studiul de eliberare și permeație cutanată <i>in vitro</i>	67
V.1.3.7.1. Evaluarea cedării <i>in vitro</i> a fluconazolului din hidrogelurile experimentale prin membrană sintetică	67
V.1.3.7.2. Studiul permeației <i>in vitro</i> a fluconazolului din hidrogelurile experimentale prin piele excizată de pe urechea de porc	70
V.1.3.8. Evaluarea activității antifungice <i>in vitro</i> a hidrogelurilor experimentale	75
V.1.4. Concluzii	76
V.2. Studii privind dezvoltarea unor hidrogeluri pe bază de chitosan/hidroxipropilmetilceluloză conținând fluconazol 2% și uleiuri esențiale. Influența uleiurilor esențiale utilizate ca promotori de absorbție asupra eliberării și permeației <i>in vitro</i> a fluconazolului	78
V.2.1. Introducere	78
V.2.2. Materiale și metode	78
V.2.2.1. Materiale	78
V.2.2.2. Metode	79
V.2.2.2.1. Formularea și prepararea hidrogelurilor pe bază de chitosan/HPMC conținând fluconazol 2% și uleiuri esențiale	79
V.2.2.2.2. Controlul calității hidrogelurilor pe bază de chitosan/HPMC conținând fluconazol 2% și uleiuri esențiale	80
V.2.2.2.2.1. Examenul caracterelor macroscopice	80
V.2.2.2.2.2. Determinarea conținutului în substanță medicamentoasă și a pH-ului	80
V.2.2.2.2.3. Analiza reologică	80
V.2.2.2.3. Studiul de eliberare și permeație cutanată <i>in vitro</i> a fluconazolului din hidrogelurile experimentale	80
V.2.2.2.3.1. Studiul cedării <i>in vitro</i> a fluconazolului din hidrogelurile experimentale prin membrană sintetică	80
V.2.2.2.3.2. Studiul permeației <i>in vitro</i> a fluconazolului din hidrogelurile experimentale prin piele excizată de pe urechea de porc	81
V.2.2.2.4. Analiza rezultatelor studiilor de cedare <i>in vitro</i>	81
V.2.2.2.5. Evaluarea activității antifungice <i>in vitro</i> a hidrogelurilor experimentale	81
V.2.2.2.6. Analiza statistică a rezultatelor	81
V.2.3. Rezultate și discuții	82
V.2.3.1. Formularea și prepararea hidrogelurilor pe bază de chitosan/HPMC conținând fluconazol 2% și uleiuri esențiale	82
V.2.3.2. Controlul calității hidrogelurilor pe bază de chitosan/HPMC conținând fluconazol 2% și uleiuri esențiale	82
V.2.3.2.1. Examenul caracterelor macroscopice	82
V.2.3.2.2. Determinarea conținutului în substanță medicamentoasă și a pH-ului hidrogelurilor	83
V.2.3.2.3. Analiza reologică	83

V.2.3.2.4. Studiul de eliberare și permeație cutanată <i>in vitro</i>	87
V.2.3.2.4.1. Studiul cedării <i>in vitro</i> a fluconazolului din hidrogelurile experimentale prin membrană sintetică	87
V.2.3.2.4.2. Studiul permeației <i>in vitro</i> a fluconazolului din hidrogelurile experimentale prin piele excizată de pe urechea de porc	90
V.2.3.3. Evaluarea activității antifungice <i>in vitro</i> a hidrogelurilor experimentale	94
V.2.4. Concluzii	95
 VI. DEZVOLTAREA UNOR MICROEMULSII BIOCOMPATIBILE GELIFICATE CU CHITOSAN, PE BAZĂ DE ULEIURI VOLATILE ȘI ESTERI DE ZAHAROZĂ PENTRU ELIBERAREA TOPICĂ A FLUCONAZOLULUI	98
VI.1. Introducere	98
VI.2. Materiale și metode	99
VI.2.1. Materiale	99
VI.2.2. Metode	99
VI.2.2.1. Studii de solubilitate	99
VI.2.2.2. Selectarea componentelor formulărilor	100
VI.2.2.2.1. Selectarea fazei uleioase	100
VI.2.2.2.2. Selectarea surfactantului și a cosurfactantului	100
VI.2.2.3. Construirea diagramelor pseudoternare de fază	100
VI.2.2.4. Prepararea formulărilor de microemulsii L/H pe bază de uleiuri esențiale și esteri de zaharoză conținând 2% fluconazol	101
VI.2.2.5. Prepararea microemulsiilor gelificate cu chitosan, pe bază de uleiuri esențiale și esteri de zaharoză, conținând 2% fluconazol	102
VI.2.2.6. Caracterizarea microemulsiilor L/H cu fluconazol	102
VI.2.2.7. Controlul calității microemulsiilor gelificate cu chitosan, pe bază de uleiuri esențiale și esteri de zaharoză, conținând 2% fluconazol	103
VI.2.2.7.1. Examenul caracterelor macroscopice	103
VI.2.2.7.2. Determinarea conținutului în fluconazol și a pH-ului microemulsiilor-gel experimentale	103
VI.2.2.7.3. Analiza reologică	103
VI.2.2.8. Studiul de eliberare și permeație cutanată <i>in vitro</i>	103
VI.2.2.8.1. Evaluarea cedării <i>in vitro</i> a fluconazolului prin membrană sintetică din microemulsiile gelificate cu chitosan, pe bază de uleiuri esențiale și esteri de zaharoză	103
VI.2.2.8.2. Studiul permeației <i>in vitro</i> a fluconazolului prin piele excizată de pe urechea de porc din microemulsiile gelificate cu chitosan, pe bază de uleiuri esențiale și esteri de zaharoză	103
VI.2.2.9. Analiza rezultatelor studiilor de eliberare și permeație <i>in vitro</i>	104
VI.2.2.10. Evaluarea activității antifungice <i>in vitro</i> a microemulsiilor-gel experimentale	104
VI.2.2.11. Analiza statistică a rezultatelor	104
VI.3. Rezultate și discuții	104
VI.3.1. Studii de solubilitate	104
VI.3.2. Selectarea componentelor formulărilor	106
VI.3.2.1. Selectarea fazei uleioase	106
VI.3.2.2. Selectarea surfactantului și a cosurfactantului	106
VI.3.3. Construirea diagramelor pseudoternare de fază	107
VI.3.4. Formularea microemulsiilor L/H și a microemulsiilor-gel pe bază de uleiuri esențiale și esteri de zaharoză, conținând fluconazol	111

VI.3.5. Caracterizarea microemulsiilor L/H cu fluconazol, pe bază de uleiuri esențiale și esteri de zaharoză	111
VI.3.6. Controlul calității microemulsiilor gelificate cu chitosan, pe bază de uleiuri esențiale și esteri de zaharoză, conținând fluconazol	116
VI.3.6.1. Examenul caracterelor macroscopice	116
VI.3.6.2. Determinarea conținutului în fluconazol și a pH-ului microemulsiilor-gel experimentale	117
VI.3.6.3. Analiza reologică a microemulsiilor gelificate cu chitosan, pe bază de uleiuri esențiale și esteri de zaharoză, conținând 2% fluconazol	117
VI.3.7. Studiul de eliberare și permeație cutanată <i>in vitro</i>	121
VI.3.7.1. Evaluarea cedării <i>in vitro</i> a fluconazolului prin membrană sintetică din microemulsiile pe bază de uleiuri esențiale și esteri de zaharoză, gelificate cu chitosan	121
VI.3.7.2. Studiul permeației <i>in vitro</i> a fluconazolului prin piele excizată de pe urechea de porc din microemulsiile gelificate cu chitosan, pe bază de uleiuri esențiale și esteri de zaharoză	125
VI.3.8. Evaluarea activității antifungice <i>in vitro</i> a microemulsiilor-gel experimentale	128
VI.4. Concluzii	130
VII. DEZVOLTAREA ȘI VALIDAREA UNEI METODE SPECTROFOTOMETRICE ÎN VIS PENTRU DOZAREA FLUCONAZOLULUI ÎN PREZENȚA UNOR ULEIURI ESENȚIALE	132
VII.1. Introducere	132
VII.2. Materiale și metode	133
VII.2.1. Materiale	133
VII.2.2. Metode	133
VII.2.2.1. Prepararea soluțiilor standard	133
VII.2.2.2. Procedura recomandată pentru determinarea spectrofotometrică a fluconazolului în prezența uleiurilor volatile (stabilirea lungimii de undă de măsurare)	133
VII.2.2.3. Validarea metodei spectrofotometrice	133
VII.2.2.3.1. Precizia	133
VII.2.2.3.2. Liniaritatea	134
VII.2.2.3.3. Exactitatea (acuratețea)	134
VII.2.2.3.4. Robustețea	134
VII.3. Rezultate și discuții	135
VII.3.1. Procedura recomandată pentru determinarea spectrofotometrică a fluconazolului în prezența uleiurilor volatile (stabilirea lungimii de undă de măsurare)	135
VII.3.2. Validarea metodei spectrofotometrice	138
VII.3.2.1. Precizia	138
VII.3.2.2. Liniaritatea	138
VII.3.2.3. Acuratețea (exactitatea)	140
VII.3.2.4. Robustețea	140
VII.4. Concluzii	141
CONCLUZII GENERALE	142
BIBLIOGRAFIE	147
PUBLICAȚII	

INTRODUCERE

Un domeniu de actualitate al cercetării farmaceutice îl constituie dezvoltarea unor noi sisteme farmaceutice semisolide ca potențiale vehicule pentru eliberarea topică a substanțelor medicamentoase, utilizând excipienți de origine naturală. Beneficiile pe care le prezintă aceste tipuri de formulări sunt determinate atât de diversitatea excipienților, cât și de proprietățile specifice deosebit de avantajoase ale acestora și anume: abundență relativă, biocompatibilitate, biodegradabilitate, non-iritabilitate, inocuitate și preț de cost scăzut. Hidrogelurile reprezintă o categorie importantă de baze de unguent, utilizate frecvent în formularea preparatelor dermatologice și cosmetice, datorită numeroaselor avantaje pe care le oferă. Din acest grup fac parte și hidrogelurile biocompatibile pe bază de polimeri naturali, (ex. chitosan, pectine, gume), care au fost intens studiate în ultimul deceniu, datorită beneficiilor asigurate de caracteristicile specifice ale agenților formatori de gel.

Totodată, cercetările în domeniul tehnologiei farmaceutice urmăresc abordarea unor strategii de mărire/optimizare a eliberării substanțelor medicamentoase la locul de acțiune, astfel încât să se obțină o biodisponibilitate crescută/optimă a agentului terapeutic. Cu toate că eliberarea dermică/transdermică oferă avantaje semnificative în comparație cu căile convenționale, funcția de barieră a pielii limitează foarte mult transportul transdermic al substanțelor medicamentoase. O strategie de largire a gamei de substanțe medicamentoase care pot fi eliberate eficient prin piele, este utilizarea promotorilor de permeație cutanată. În ultimii ani, două grupe de promotori ai penetrației percutanate a substanțelor active au captat interesul cercetătorilor din domeniul dermatologiei și farmaceutic: esterii de zaharoză din grupul surfactanților neionici și uleiurile esențiale. Acestor excipienți de origine naturală li s-a acordat statut GRAS (*Generally Recognized As Safe*), fiind biocompatibili, biodegradabili, netoxici, neiritanți și non-alergici. Potențialul de promotori ai penetrației percutanate al esterilor de zaharoză și uleiurilor esențiale a fost demonstrat pentru numeroase substanțe medicamentoase liposolubile și hidrosolubile.

Infecțiile fungice superficiale și invazive sunt considerate în prezent o problemă de sănătate publică pe plan mondial, datorită creșterii incidenței lor. În scopul soluționării acestei probleme, au fost propuse și avizate câteva strategii pentru largirea arsenalului terapeutic disponibil pacienților cu infecții fungice sistemice sau superficiale. Una dintre aceste strategii a constat în introducerea în terapia clinică de noi agenți antifungici, aparținând diferitelor clase chimice, cum ar fi derivații de azol. Din această clasă, face parte și fluconazolul, care, datorită spectrului de acțiune și proprietăților biofarmaceutice și farmacocinetice avantajoase, este foarte frecvent utilizat astăzi în tratamentul oral și topic al candidozelor, dermatofitozelor și altor infecții fungice superficiale. O altă strategie de largire a arsenalului terapeutic antifungic vizează dezvoltarea de noi sisteme farmaceutice, care să asigure o biodisponibilitate optimă substanțelor medicamentoase antimicotice încorporate și implicit creșterea eficacității lor. Cercetările din ultimele două decenii au fost orientate mai ales în direcția dezvoltării de noi forme farmaceutice destinate terapiei antifungice topice, care s-a dovedit a fi mai avantajoasă față de tratamentul sistemic, al cărui principal inconvenient este incidența crescută a efectelor secundare ale agenților antimicotici. În formularea acestor noi sisteme farmaceutice de eliberare a agenților antifungici, astăzi se acordă o atenție deosebită atât asigurării inocuității și toleranței preparatelor prin selectarea unor excipienți naturali, biocompatibili și biodegradabili, cât și optimizării penetrației percutanate a substanței medicamentoase prin diferite modalități.

Toate premisele prezentate mai sus, sunt descrise în detaliu în primele trei capitole ale tezei, constituind partea generală.

Pe baza acestor premise, cercetările experimentale efectuate în cadrul acestei teze de doctorat au vizat dezvoltarea unor noi sisteme farmaceutice semisolide hidrofile pentru eliberarea topică eficientă a fluconazolului, utilizând substanțe auxiliare biocompatibile, biodegradabile, netoxice, neiritante și cu activitate antifungică proprie. Un obiectiv important

al formulării noilor sisteme semisolide studiate a fost și optimizarea penetrației percutanate a fluconazolului, prin abordarea mai multor strategii care să determine mărirea semnificativă a concentrației agentului terapeutic la locul de aplicare, implicit creșterea eficacității terapeutice a medicamentului și a complianței pacientului la tratament.

O primă direcție de cercetare, prezentată în capitolul IV al acestei teze, a avut ca obiectiv dezvoltarea și caracterizarea farmacotehnică a unor baze de hidrogel conținând un polimer hidrofil natural, chitosanul, ca agent gelifiant și diferiți cosolvenți (glicerol, propilenglicol, tetraglicol și polietilenglicol 400), capabile să încorporeze și să dizolve un număr cât mai mare de substanțe medicamentoase insolubile în apă. În această etapă a studiului s-a evaluat influența tipului și concentrației cosolventului asupra caracteristicilor fizico-chimice și reologice ale bazelor de hidrogel cu chitosan în diferite concentrații.

În cea de-a doua etapă a cercetării experimentale descrisă în capitolul V, s-a investigat posibilitatea formulării și preparării unor noi hidrogeluri topice biocompatibile pe bază de chitosan/hidroxipropilmetilceluloză conținând fluconazol 2% și diferiți promotori de absorbție naturali. În acest scop, fluconazolul a fost încorporat într-un vehicul hidrogel inovator, pe bază de doi biopolimeri ca agenți de gelifiere (chitosan și hidroxipropilmetilceluloză) și un ester de zaharoză (laurat sau palmitat de zaharoză în diferite concentrații), respectiv un ulei esențial, ca promotor de penetrare. Totodată, s-a studiat și influența variabilelor de formulare (esterii de zaharoză și uleiurile esențiale) atât asupra caracteristicilor fizico-chimice (conținut în substanță activă, pH) și reologice (viscozitate, comportament de curgere, consistență, capacitate de etalare) ale hidrogelurilor experimentale, cât și asupra eliberării și permeației *in vitro* a fluconazolului din formulări prin membrană sintetică hidrofilă și prin piele excizată de pe urechea de porc. De asemenea, a fost evaluată și activitatea antifungică *in vitro* a hidrogelurilor experimentale.

Capitolul șase al părții experimentale este dedicat prezentării contribuțiilor aduse la dezvoltarea unor microemulsii biocompatibile gelificate cu chitosan, pe bază de uleiuri volatile și esteri de zaharoză pentru eliberarea topică a fluconazolului. În acest studiu, a fost investigat potențialul altei metode de mărire a penetrației percutanate în cazul fluconazolului și anume utilizarea microemulsiilor ca transportori coloidali ai substanței active prin piele. Noile formulări de microemulsii au fost stabilite pe baza diagramelor ternare de fază, iar caracteristicile lor (diametrul mediu al picăturilor, indicele de polidispersie, potențialul zeta, viscozitatea, pH-ul) au fost evaluate prin teste specifice acestei forme farmaceutice. Calitatea microemulsiilor gelificate cu chitosan a fost evaluată prin aceleași teste aplicate și în cazul hidrogelurilor prezentate în capitolul anterior. De asemenea, a fost efectuat și studiul eliberării și permeației percutanate *in vitro* a fluconazolului din microemulsiile-gel prin membrană sintetică respectiv biologică (piele excizată de pe urechea de porc). Activitatea antifungică *in vitro* a microemulsiilor-gel experimentale a fost evaluată față de tulpini de *Candida albicans*.

În ultimul capitol al părții experimentale se descrie validarea unei metode spectrofotometrice în vizibil propusă pentru dozarea fluconazolului în prezența unor uleiuri esențiale, astfel încât performanțele metodei analitice să fie maxime și în același timp metoda să fie cât mai rapidă. Validarea metodei de analiză cantitativă propuse a fost efectuată în conformitate cu reglementările naționale și europene, fiind verificați următorii parametri: precizia, liniaritatea, acuratețea și robustețea.

Rezultatele studiilor experimentale din această lucrare conduc la concluzii finale privind:

- efectul tipului și concentrației unor cosolvenți (glicerol, propilenglicol, polietilenglicol 400 și tetraglicol) asupra caracteristicilor fizice și mecanice ale unor hidrogeluri pe bază de 3%, 3,5% și 4% chitosan, ca potențiale vehicule pentru eliberarea topică a unor substanțe medicamentoase greu solubile în apă;
- efectul esterilor de zaharoză asupra penetrației percutanate *in vitro* a fluconazolului din hidrogeluri biocompatibile pe bază de chitosan/hidroxipropilmetilceluloză prin piele de porc;

- efectul uleiurilor esențiale asupra penetrației percutanate *in vitro* a fluconazolului din hidrogeluri biocompatibile pe bază de chitosan/hidroxipropilmetilceluloză prin piele de porc;
- posibilitatea de mărire a penetrației și absorbției percutanate prin dezvoltarea unor microemulsii gelificate cu chitosan folosite ca transportori ai fluconazolului;
- activitatea antifungică *in vitro* a hidrogelurilor experimentale dezvoltate;
- dezvoltarea și validarea unei metode de analiză prin spectrofotometrie în vizibil pentru dozarea fluconazolului în prezența unor uleiuri esențiale.

Tema acestei teze de doctorat este importantă și de actualitate, iar studiile efectuate și rezultatele acestora deschid pe plan național o nouă direcție de cercetare, iar pe plan internațional contribuie la extinderea grupului noilor sisteme farmaceutice topice semisolidе cu efect antimicotic, propuse și investigate în scopul dezvoltării unor produse medicamentoase fiabile comercial.

Motivația cercetării

Până în prezent pe piața farmaceutică autohtonă nu este disponibil niciun preparat topic cu fluconazol, iar pe piața internațională au fost autorizate doar câteva produse (ex. Diflucan® gel). Principala provocare în dezvoltarea unor sisteme topice de eliberare a fluconazolului o constituie hidrosolubilitatea sa foarte scăzută, care limitează considerabil posibilitățile de formulare a unor preparate hidrofile, cu proprietăți specifice avantajoase și cu biodisponibilitate crescută. În consecință s-a considerat oportună și de actualitate efectuarea unor studii detaliate privind formularea, prepararea și caracterizarea unor forme farmaceutice semisolidе, biocompatibile, netoxice și neiritante ca vehicule pentru eliberarea topică eficientă a fluconazolului.

Contribuțiile originale ale acestei teze de doctorat au fost orientate în direcția:

- abordării problematicei utilizării fluconazolului încorporat în noi sisteme farmaceutice semisolidе biocompatibile, pe bază de excipienți naturali, pentru administrare topică la pacienții cu infecții fungice;
- dezvoltării unor sisteme farmaceutice dermice semisolidе cu fluconazol, cu eliberare și permeație crescută, în premieră națională, sub formă de:
 1. hidrogeluri pe bază de chitosan/hidroxipropilmetilceluloză conținând fluconazol 2% și esteri de zaharoză (laurat de sucroză și palmitat de sucroză) sau uleiuri esențiale (ulei de scorțișoară și ulei de cuișoare) ca promotori de penetrare;
 2. microemulsii topice biocompatibile gelificate cu chitosan, pe bază de uleiuri volatile și esteri de zaharoză, pentru eliberarea fluconazolului.
- elaborării și validării unei metode spectrofotometrice în vizibil pentru dozarea fluconazolului în prezența unor uleiuri esențiale.

Obiectivele tezei de doctorat

În ultimul deceniu, s-a manifestat un interes crescut față de utilizarea topică a fluconazolului, ca alternativă la terapia orală sau sistemică, fiind propuse și investigate diferite sisteme de eliberare clasice și moderne (ex. emulsii, emulgeluri, lipogeluri, geluri lipozomale, microemulsii, microemulsii-geluri), capabile să transporte și să elibereze mai eficient fluconazolul, optimizând astfel acțiunea sa terapeutică.

Studiile efectuate în cadrul tezei de doctorat au fost orientate în următoarele direcții:

- dezvoltarea și caracterizarea farmacotehnică a unor baze de hidrogel pe bază de chitosan (polimer hidrofil natural), ca agent gelifiant și diferiți cosolvenți (glicerol, propilenglicol, tetraglicol și polietilenglicol 400), în vederea încorporării și dizolvării unui număr cât mai mare de substanțe medicamentoase insolubile în apă;

- formularea și prepararea unor noi hidrogeluri topice biocompatibile pe bază de chitosan/hidroxipropilmetilceluloză conținând fluconazol 2% și diferiți promotori de absorbție naturali (esteri de zaharoză și uleiuri esențiale);
- influența variabilelor de formulare (esterii de zaharoză și uleiurile esențiale) asupra caracteristicilor fizico-chimice, reologice, și asupra eliberării și permeației *in vitro* a fluconazolului din formulările experimentale prin membrană sintetică hidrofilă și prin piele excizată de pe urechea de porc;
- dezvoltarea unor microemulsii biocompatibile gelificate cu chitosan, pe bază de uleiuri volatile și esterii de zaharoză pentru eliberarea topică a fluconazolului;
- investigarea potențialului altei metode de mărire a penetrației percutanate în cazul fluconazolului și anume utilizarea microemulsiilor ca transportori coloidali ai substanței active prin piele;
- evaluarea activității antifungice *in vitro* a formulărilor experimentale cu fluconazol față tulpini de *Candida albicans*;
- propunerea și validarea unei metode spectrofotometrice în vizibil pentru dozarea fluconazolului în prezența unor uleiuri esențiale.

PARTEA GENERALĂ

Partea generală a tezei de doctorat cuprinde trei capitole:

Capitolul I – care descrie excipienții farmaceutici naturali utilizați în dezvoltarea unor formulări topice semisolide biocompatibile precum esterii de zaharoză cu rol de promotori de penetrație și surfactanți, uleiurile esențiale produse naturale cu rol de promotori ai penetrației și chitosanul polimer natural cu rol de agent gelifiant.

Capitolul II – se referă la două tipuri de sisteme farmaceutice biocompatibile intens studiate în prezent ca vehicule pentru eliberarea topică a substanțelor medicamentoase și anume: hidrogelurile pe bază de chitosan și microemulsiile/microemulsiile-gel pe bază de surfactanți naturali și biopolimeri.

Capitolul III – care include date de literatură despre fluconazol selectat ca substanță medicamentoasă model și motivează alegerea sa.

PARTEA EXPERIMENTALĂ

A doua parte a tezei de doctorat cuprinde contribuții proprii și este structurată în patru capitole:

Capitolul IV – prezintă un studiu preliminar având ca obiectiv dezvoltarea unor hidrogeluri pe bază de chitosan și cosolvenți ca vehicule pentru eliberarea topică a substanțelor medicamentoase greu solubile în apă;

Capitolul V – dezvoltarea și evaluarea unor noi hidrogeluri topice biocompatibile pe bază de chitosan/hidroxipropilmetilceluloză conținând fluconazol 2% și esterii de zaharoză sau uleiuri esențiale ca promotori de absorbție naturali;

Capitolul VI – dezvoltarea unor microemulsii biocompatibile gelificate cu chitosan 1,9%, pe bază de uleiuri volatile și esterii de zaharoză pentru eliberarea topică a fluconazolului;

Capitolul VII – dezvoltarea și validarea unei metode spectrofotometrice în domeniul vizibil pentru dozarea fluconazolului în prezența unor uleiuri esențiale.

CAPITOLUL IV

DEZVOLTAREA UNOR HIDROGELURI PE BAZĂ DE CHITOSAN ȘI COSOLVENȚI CA VEHICULE PENTRU ELIBERAREA TOPICĂ A SUBSTANȚELOR MEDICAMENTOASE GREU SOLUBILE ÎN APĂ

Obiectivul acestei etape de studiu a fost dezvoltarea și caracterizarea farmaceutică, în special reologică, a unor hidrogeluri pe bază de chitosan în diferite concentrații și conținând diferiți cosolvenți (glicerol, propilenglicol, tetraglicol și polietilenglicol 400), în scopul dezvoltării unor sisteme semisolide capabile să încorporeze și să dizolve un număr cât mai mare de substanțe medicamentoase insolubile în apă, sisteme care pot fi administrate pe diferite căi (oftalmică, rectală, bucală, nazală, intestinală, vaginală, cutanată). Prin urmare, scopul studiului nu a fost acela de a demonstra că hidrogelurile cu chitosan și cosolvenți sunt mai bune decât gelurile chitosan/apă, ci de a prezenta o potențială metodă alternativă care poate fi utilizată în cazul substanțelor medicamentoase practic insolubile în apă.

IV.1 Materiale și metode

Selectarea componentelor și prepararea hidrogelurilor pe bază de chitosan. În acest studiu, precum și în cercetările prezentate în capitolele următoare, a fost utilizat sortul comercial de chitosan Chitopharm M, obținut din cochilii de crabi și prezentând o masă moleculară de 300-2000 kDa și un grad de dezacetilare > 70%. În scopul obținerii unor hidrogeluri, sortul de chitosan Chitopharm® M a fost utilizat ca agent formator de gel în diferite concentrații (3%, 3,5% și 4%). Ca agenți de umectare și cosolvenți (pentru mărirea solubilității substanțelor medicamentoase greu solubile în apă) au fost selectați glicerolul (GLC), propilenglicolul (PG), tetraglicolul (TG) și PEG 400 în concentrații cuprinse între 10 și 50%. Chitosanul (3, 3,5 și 4% m/m) s-a dizolvat, prin ușoară agitare, folosind un agitator magnetic, în soluția apoasă de nipaesteri acidulată cu acid acetic 1% (m/m), în care apoi s-a adăugat cosolventul (glicerol, propilenglicol, tetraglicol sau PEG 400).

Determinarea pH-ului hidrogelurilor pe bază de chitosan s-a determinat potențiometric, conform prevederilor F.R. X, folosind un pH-metru portabil digital (Sension™1, Hach Company, S.U.A.).

Analiza reologică s-a efectuat prin determinarea caracterelor reologice (curgere și viscozitate) cu ajutorul unui reometru cu control al tensiunii (RheoStress 1, HAAKE, Franța) și prin determinarea consistenței folosind un penetrometru (PNR 12, Petrolab, Germania) cu micro-con și un recipient adecvat. Datele testului viscozimetric au fost analizate cu programul HAAKE RheoWin 3 versiunea 1.0. S-a verificat fitarea datelor experimentale cu modele matematice specifice: modelul legea putere, modelul Casson și modelul Herschel-Bulkley. De asemenea, s-a determinat și capacitatea de etalare a hidrogelurilor cu ajutorul extensometrului Pozo Ojeda-Sune Arbussa.

IV.2. Rezultate și discuții

Au fost formulate și preparate 22 de hidrogeluri pe bază de chitosan, dintre care 9 formulări pentru concentrația de 3% chitosan și diferite concentrații de cosolvenți (10, 30 și 50%), 5 formulări cu 3,5% chitosan și două concentrații de cosolvent (10 și 50%), precum și 8 formulări cu 4% chitosan și cosolvent în concentrație de 10, 30 și 50%. Deoarece după preparare au prezentat o consistență ridicată, asemănătoare masei gelatinoase, nu au fost incluse în studiu următoarele sisteme: formulările conținând 3% chitosan și 30% sau 50% PG respectiv TG; formulările cu 4% chitosan și 30% sau 50% PEG 400 respectiv TG.

Toate hidrogelurile pe bază de chitosan preparate au fost omogene, translucide, transparente, incolore, cu miros slab de acid acetic și au prezentat valori de pH cuprinse între 4,63 și 5,33, încadrându-se în limitele prevăzute de farmacopee (4,5-8,5) fiind totodată și apropiate de pH-ul fiziologic al pielii.

Reogramele obținute au relevat faptul că toate hidrogelurile pe bază de chitosan 3% în prezență de PG (10, 30 și 50%), PEG 400 10% și TG 10% prezintă un comportament pseudoplastic, cu o ușoară tixotropie (valori ale ariei buclei de histereză cuprinse între 905 și 14950 Pa/s), iar formulările în prezență de glicerină au prezentat o tixotropie mai pronunțată odată cu creșterea concentrației cosolventului de la 10% la 50% (valori ale ariei buclei de histereză cuprinse între 4564-40310 Pa/s). Hidrogelurile cu chitosan 3% și glicerol au prezentat cele mai mari valori ale viscozității aparente (1,67-3,12 Pa·s), fiind urmate de cele cu PG (1,572-2,335 Pa·s); în această serie, valori mai mici ale viscozității au prezentat hidrogelurile cu 10% PEG 400 sau 10% TG (1,593 Pa·s respectiv 1,53 Pa·s), iar formularea fără cosolvent, CTS 3% a condus la cea mai mică valoare a viscozității aparente (1,412 Pa·s).

Chitosanul în concentrație de 3,5% și în prezență de cosolvent a format hidrogeluri cu un comportament pseudoplastic-tixotrop, caracterul tixotrop fiind mai pronunțat în cazul formulărilor CTS 3,5% - GLC 50% și CTS 3,5% - PG 50%, pentru care au fost calculate valori mari ale ariei de histereză (56620 Pa/s respectiv 22620 Pa/s), precum și în cazul formulării CTS 3,5% - TG 10% pentru care tixotropia a fost de 10340 Pa/s.

Viscozitatea aparentă a gelurilor pe bază de chitosan 3,5% a variat în următoarea ordine: CTS 3,5% - GLC 50% > CTS 3,5% - TG 10% > CTS 3,5% > CTS 3,5% - PG 50% > CTS 3,5% - PEG 400 10%.

Se poate observa că în concentrație de 4%, chitosanul formează în mediu apos acidulat, atât în prezența cât și în absența cosolventului, geluri cu comportament pseudoplastic-tixotrop, gradul de tixotropie crescând cu creșterea concentrației cosolventului de la 10% la 50%.

Viscozitatea aparentă a hidrogelului de chitosan 4% (2,087 Pa·s) a crescut de 1,6-1,7 ori la adăugarea de 10% cosolvent (PG, PEG 400 respectiv GLC), de 1,6 ori în prezență de 30% și 50% PG și de aproximativ 2 ori la adăugare de glicerol în concentrație de 30% și 50%.

Pe baza valorilor gradului de penetrare, prezentate în figura, a fost posibilă ierarhizarea în funcție de creșterea consistenței în cadrul fiecărei serii astfel:

- hidrogelurile pe bază de chitosan 3%

CTS 3% > CTS 3% - TG10% > CTS 3% - PG10% > CTS 3% - PEG 400 10% > CTS 3% - GLC 10% > CTS 3% - PG30% > CTS 3% - GLC 30% > CTS 3% - PG50% > CTS 3% - GLC 50%

- hidrogelurile pe bază de chitosan 3,5%

CTS 3,5% > CTS 3,5% - TG 10% > CTS 3,5% - PEG 400 10% > CTS 3,5% - PG 50% > CTS 3,5% - GLC 50%

- hidrogelurile pe bază de chitosan 4%

CTS 4% > CTS 4% - PG10% > CTS 4% - GLC 10% > CTS 4% - PEG 400 10% > CTS 4% - PG30% > CTS 4% - GLC 30% > CTS 4% - PG50% > CTS 4% - GLC 50%

Astfel, cele mai mari suprafețe de întindere, atestând o capacitate de întindere mare, a prezentat gelul cu 3% chitosan, urmat de formulările CTS 3% - GLC 10%, CTS 3% - PG10%, CTS 3% - PEG 400 10%, CTS 3% - TG10% și CTS 3,5%.

IV.3. Concluzii

Această primă etapă a cercetării, a constituit un studiu preliminar al cărui obiectiv a fost evaluarea efectului tipului și concentrației unor cosolvenți (glicerol, propilenglicol, polietilenglicol 400 și tetraglicol) asupra caracteristicilor fizice și mecanice ale unor hidrogeluri pe bază de 3%, 3,5% și 4% chitosan, ca potențiale vehicule pentru aplicarea topică a unor substanțe medicamentoase greu solubile în apă.

Rezultatele analizei reologice a hidrogelurilor pe bază de chitosan și diferiți cosolvenți au evidențiat influența tipului și concentrației cosolventului asupra comportamentului la curgere, viscozității, consistenței și capacității de etalare a sistemelor. Astfel, deși toate hidrogelurile au prezentat o curgere pseudoplastică-tixotropă, viscozitate, consistență și capacitate de etalare adecvate, specifice sistemelor semisolide, gradul de tixotropie precum și

celelalte caracteristici reologice au fost diferite, valorile lor crescând odată cu creșterea concentrației polimerului și a cosolventului în formulare. De asemenea, diferențele privind aceste caracteristici au fost determinate și de tipul de cosolvent din formulare, glicerolul și propilenglicolul exercitând efecte mai pronunțate decât PEG 400 și tetraglicolul.

Pe baza rezultatelor obținute în cadrul acestei etape a studiului experimental, considerăm că toate hidrogelurile testate, pe bază de chitosan și diferiți cosolvenți, pot fi selectate ca vehicule (baze de unguent hidrofile) pentru eliberarea dermică a unor substanțe medicamentoase greu solubile în apă.

CAPITOLUL V

DEZVOLTAREA ȘI EVALUAREA UNOR NOI HIDROGELURI TOPICE BIOCOMPATIBILE PE BAZĂ DE CHITOSAN/HIDROXIPROPILMETILCELULOZĂ CONȚINÂND FLUCONAZOL 2% ȘI DIFERIȚI PROMOTORI DE ABSORBȚIE NATURALI

Obiectivul studiului experimental a fost formularea și evaluarea unor noi hidrogeluri pentru aplicarea topică a fluconazolului, utilizând substanțe auxiliare biocompatibile, biodegradabile, netoxice, neiritante și cu activitate antifungică proprie. În acest scop, FZ a fost încorporat într-un vehicul hidrogel inovator, care conține doi biopolimeri ca agenți de gelifiere (chitosan și hidroxipropilmetilceluloză) și un ester de zaharoză (laurat de zaharoză sau palmitat de sucroză, în diferite proporții) ca promotor de penetrare.

V.1. Studii privind dezvoltarea unor hidrogeluri pe bază de chitosan/hidroxipropilmetilceluloză conținând fluconazol 2% și esteri de zaharoză. Influența esterilor de zaharoză utilizați ca promotori de absorbție asupra eliberării și permeației *in vitro* a fluconazolului

V.1.1 Metode

Studii de solubilitate. Solubilitatea FZ în apă și diferiți cosolvenți, utilizați în mod frecvent în formulările de tip hidrogeluri, și anume glicerolul, tetraglicolul, PEG 400 și PEG 600, a fost determinată prin metoda saturației prin agitarea flaconului. De asemenea, a fost determinată, folosind aceeași metodă, solubilitatea celor doi esteri de zaharoză (SL și SP) în apă și trei cosolvenți (etanol, alcool izopropilic și tetraglicol).

Selectarea componentelor hidrogelurilor cu 2% fluconazol. Formularea hidrogelurilor experimentale de tip soluție, s-a bazat pe rezultatele studiilor de solubilitate. Tetraglicolul în concentrație de 20 % a îndeplinit rolul de cosolvent pentru FZ și totodată rolul de potențial promotor de penetrație percutanată.

Ca agenți gelifianți au fost selectați doi biopolimeri și anume chitosanul și hidroxipropilmetilceluloza, utilizați în amestec, iar concentrațiile lor în formulările finale au fost de aproximativ 0,65% respectiv 1,7%.

Ca potențiali promotori de absorbție, în formulările hidrogelurilor experimentale cu fluconazol, au fost selectați doi *surfactanți neionici*, lauratul de sucroză (0,5-5%) și palmitatul de sucroză (0,5%). În formularea hidrogelului cu palmitat de zaharoză, a fost utilizat alcoolul izopropilic în concentrație de 10% cu rol de cosolvent pentru surfactantul natural.

De asemenea, s-a formulat și un hidrogel cu 2% FZ, fără ester de sucroză (formularea de control, codificată FZ 2%), în scopul evaluării potențialelor efecte ale esterilor de sucroză.

Prepararea hidrogelurilor pe bază de chitosan/HPMC conținând fluconazol 2% și esteri de zaharoză

Prepararea bazei de hidrogel s-a efectuat prin amestecarea hidrogelului de chitosan 3% cu hidrogelul de HPMC 4% în raport de 1:2. Hidrogelul pe bază de 3% chitosan s-a preparat prin dizolvarea polimerului, prin ușoară agitare, în soluție apoasă de acid acetic 1%. Hidrogelul pe bază de 4% HPMC a fost preparat prin metoda „cald/rece”.

Prepararea hidrogelurilor cu 2% fluconazol și esteri de zaharoză: fluconazolul a fost dizolvat în tetraglicol, iar esterul de zaharoză (SL sau SP) a fost dizolvat în 10 g apă distilată sau alcool izopropilic. Soluția de fluconazol în tetraglicol s-a adăugat la baza de hidrogel, prin amestecare moderată, apoi în hidrogelul medicamentos obținut s-a adăugat soluția apoasă/alcoolică de ester de zaharoză.

Prepararea hidrogelului cu 2% fluconazol (hidrogelul de control) s-a efectuat în mod similar preparării hidrogelurilor cu fluconazol și esteri de zaharoză.

Controlul calității hidrogelurilor pe bază de chitosan/HPMC conținând fluconazol 2% și esteri de zaharoză

Au fost efectuate teste fizico-chimice generale (examinarea macroscopică, determinarea conținutului în substanță medicamentoasă, determinarea pH-ului) și specifice preparatelor semisolide (determinarea caracterelor reologice, comportamentul la curgere, viscozitatea, consistența; testul de disponibilitate *in vitro* a fluconazolului din formulările experimentale prin membrană sintetică și biologică).

Determinarea conținutului în fluconazol al hidrogelurilor s-a efectuat prin metoda spectrofotometrică, la 253 nm, folosind un spectrofotometru UV-VIS (T70+, cu soft UVWIN5, PG Instruments, Anglia).

Studii privind eliberarea și permeația in vitro a fluconazolului din hidrogelurile pe bază de chitosan/HPMC și esteri de zaharoză

Pregătirea pielii excizate de pe urechea de porc (membrana biologică)

Studiile de permeație *ex vivo* au fost efectuate utilizând ca membrană model pielea excizată de pe urechi de porc domestic, în vârstă de 4 luni (de sex feminin sau masculin);

Evaluarea eliberării și permeației in vitro a fluconazolului din hidrogeluri prin membrană sintetică și piele excizată de pe urechea de porc

Experimentele au fost efectuate cu un sistem de 6 celule de difuzie Franz (sistemul Microette-Hanson, model 57-6AS9, S.U.A), folosind membrane sintetice hidrofile de polisulfonă, cu diametrul de 25 mm și pori de 0,45μm (HT Tuffryn membrane, Pall Corporation, S.U.A) pentru testul *in vitro* și piele excizată de pe urechea porcină pentru studiul *ex vivo*.

Pentru asigurarea condițiilor “sink” pe toată durata testării *in vitro*, compartimentul receptor al fiecărei celule de difuzie a fost umplut cu soluție tampon fosfat salin (pH 7,4) cu 60% etanol, proaspăt preparată, încălzită și dezaerată. Pentru studiul *ex vivo*, ca mediu receptor, a fost selectată o soluție salină de tampon fosfat (pH 7,4).

Experimentele au fost efectuate timp de 8 ore (*in vitro*) sau 24 ore (*ex vivo*).

Probele prelevate au fost analizate spectrofotometric în UV (spectrofotometru UV-VIS T70+ cu soft UVWIN5, PG Instruments, Anglia), la lungimea de undă 266 nm, corespunzătoare maximului de absorbție al FZ în soluția tampon fosfat salin (pH 7,4) cu 60% etanol și la 261 nm pentru absorbția FZ în soluție salină de tampon fosfat (pH 7,4).

Analiza rezultatelor studiilor de eliberare și permeație in vitro. Cantitatea cumulativă medie de FZ care a permeat prin membrană ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) a fost reprezentată grafic în funcție de timp (t , h). Parametrii specifici permeației, respectiv fluxul în stare staționară (J_{ss} , $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$) și timpul de latență (t_L , h) au fost calculați din panta dreptei și respectiv din interceptul la axa x a porțiunii liniare a curbelor cantității cumulative de substanță medicamentoasă care a permeat în funcție de timp în condiții de stare staționară. Coeficientul de permeabilitate (K_p , cm/h) a fost calculat raportând fluxul la concentrația inițială a substanței active în compartimentul donor. Valorile vitezei de eliberare (k) s-au calculat pe baza pantelor curbelor cantității cumulative de substanță medicamentoasă care a permeat prin membrană ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) în funcție de rădăcina pătrată a timpului în condiții de stare staționară. Valorile coeficientului de difuzie (D) au fost calculate din valorile vitezei de eliberare.

Pentru a evalua cinetica eliberării fluconazolului din hidrogelurile pe bază de chitosan/HPMC, a fost analizată fitarea rezultatelor obținute în studiile de eliberare *in vitro* și *ex vivo* în patru modele matematice, după cum urmează:

- modelul de ordin zero:
- modelul de ordinul unu:
- modelul Higuchi:
- modelul Korsmeyer-Peppas:

Evaluarea activității antifungice in vitro a hidrogelurilor experimentale. Activitatea antifungică a formulărilor de hidrogeluri selectate a fost evaluată față tulpini de *Candida albicans* ATCC-90028. Pentru a evalua eficacitatea hidrogelurilor selectate față de tulpinile fungice menționate mai sus, a fost utilizată metoda difuziei în placa cu agar, ușor modificată.

Analiza statistică a rezultatelor a fost realizată cu ajutorul programului Statistica 7.0.

V.1.2. Rezultate și discuții

Studii de solubilitate. Valoarea cea mai mare a solubilității FZ a fost determinată în tetraglicol, cu un factor de creștere de aproximativ 358. Pe baza celei mai mari valori a solubilității FZ în solvenții miscibili cu apa testați, tetraglicolul a fost selectat ca cosolvent pentru formulările de hidrogel experimentale. În cazul solubilității esterilor de zaharoză în solvenții testați (apă, tetraglicol, etanol, alcool izopropilic), se poate observa alcoolul izopropilic a prezentat cea mai mare capacitate de dizolvare a SP, cu un factor de creștere calculat de 367 (față de solubilitatea în apă).

Pentru SL cea mai mare valoare de solubilitate s-a regăsit în etanol (2,45 ori mai mare decât în apă). De asemenea, solubilitatea lauratului de zaharoză în alcool izopropilic și tetraglicol a fost mai mare decât în apă de 1,28 și respectiv 1,57 ori, însă creșterea a fost mai modestă decât în cazul etanolului, care poate fi astfel considerat solventul preferențial pentru acest ester de zaharoză. Comparând datele de solubilitate obținute pentru cei doi esteri de zaharoză, SL a fost mai solubil decât SP în toți solvenții testați.

Formularea hidrogelurilor pe bază de chitosan/HPMC conținând fluconazol 2% și esteri de zaharoză. Studiul de solubilitate a FZ în diferiți solvenți, a evidențiat faptul că tetraglicolul poate fi considerat un solvent preferențial pentru fluconazol, având o mare capacitate de dizolvare a acestuia (198,773 mg/mL). De aceea, tetraglicolul în concentrație de 20% a fost selectat pentru a îndeplini rolul de cosolvent al fluconazolului, menținând dizolvată substanța medicamentoasă în concentrație dorită (2%) și permițând astfel obținerea unor hidrogeluri de tip soluție

Lauratul de zaharoză a fost utilizat în concentrații de 0,5%, 1%, 2,5% și 5% în formulările care conțin apă, în timp ce în formularea cu alcool izopropilic (FZ-SL 0.5%-10% ISP) a fost utilizat doar în concentrație de 0,5%. Palmitatul de zaharoză s-a folosit în formulări în concentrație de 0,5% în prezență de alcool izopropilic 10%, prezența în hidrogel a alcoolului izopropilic ca cosolvent fiind absolut necesară datorită solubilității foarte scăzute în apă a palmitatului de zaharoză. Baza de hidrogel s-a obținut prin amestecarea hidrogelului de chitosan 3% cu hidrogel pe bază de HPMC 4% în raport de 1:2.

Examenul caracterelor macroscopice. Toate hidrogelurile experimentale cu 2% fluconazol, au fost omogene, translucide, transparente, slab gălbui (figurile 1a și 1b), cu miros slab de acid acetic sau de acid acetic și alcool izopropilic, corespunzând cerințelor oficiale referitoare la caracteristicile vizuale, olfactive și tactile.



Figura 1. Hidrogelurile experimentale pe bază de chitosan/HPMC, cu 2% FZ și cu sau fără 0,5% ester de sucroză și 10% alcool izopropilic(a), și respectiv 0,5-5% laurat de zaharoză (b)

Determinarea conținutului în fluconazol al hidrogelurilor. Conținutul în FZ al hidrogelurilor pe bază de chitosan/HPMC și ester de sucroză a fost cuprins între $98,87 \pm 1,35$ și $103,26 \pm 0,78\%$ din valoarea teoretică (2%, m/m), încadrându-se în specificațiile compendiale referitoare la conținutul în substanță medicamentoasă

Determinarea pH-ului hidrogelurilor. Valorile pH-ului hidrogelurilor medicamentoase pe bază de chitosan/HPMC au variat într-un domeniu foarte îngust, cuprins între $4,52 \pm 0,01$ și $4,69 \pm 0,07$

Analiza reologică

Testul viscozimetric Hidrogelurile conținând 0,5% ester de sucroză și 10% alcool izopropilic au prezentat un comportament reologic foarte asemănător, pseudoplastic-tixotrop.

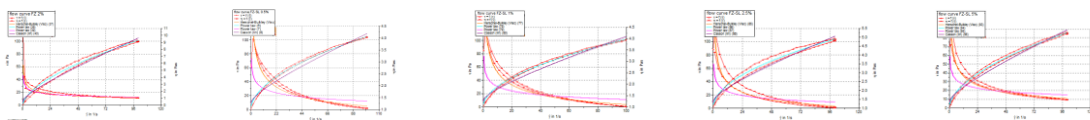


Figura 2. Reogramele și curbele de viscozitate ale hidrogelurilor experimentale cu 2% fluconazol, pe bază de chitosan/HPMC și laurat de sucroză

Hidrogelurile medicamentoase pe bază de chitosan/HPMC, conținând 0,5-5% laurat de zaharoză au produs profile de curgere similare celorlalte hidrogeluri studiate, comportându-se ca sisteme pseudoplastice-tixotrope (figura 2). Gradul de tixotropie a scăzut de la 1462 Pa/s la 1098 Pa/s cu creșterea concentrației de surfactant de la 0,5% la 5%, cu excepția formulării FZ-SL 2,5% al cărei grad de tixotropie a fost aproape dublu. De fapt, pentru această formulare s-a măsurat cea mai mare valoare a tixotropiei.

Valorile de viscozitate obținute pentru hidrogelurile de fluconazol testate au variat într-un domeniu relativ îngust de valori, de la 0,785 până la 1,045 Pa·s, limitele acestui interval corespunzând formulării FZ-SL 0.5% - 10% ISP și respectiv FZ-SL 0.5%.

Determinarea capacității de întindere Hidrogelul FZ-SL 5% a prezentat cea mai mare capacitate de etalare, fiind urmat de hidrogelul de control (fără ester de zaharoză) și de formulările conținând laurat de zaharoză în concentrație de 0,5-2,5%, pentru care s-au măsurat suprafețe de întindere mai scăzute. Formulările FZ-SL 0.5% - 10% ISP și FZ-SP 0.5% - 10% ISP au produs cele mai mici valori ale suprafeței de etalare, deci au prezentat cea mai scăzută capacitate de întindere.

Studiul de eliberare și permeație cutanată in vitro

Evaluarea cedării in vitro a fluconazolului din hidrogelurile experimentale prin membrană sintetică

Pentru formulările FZ-SL 1% și FZ-SL 0,5%-10% ISP, difuzia fluconazolului din hidrogelurile testate (cu și fără ester de sucroză) a fost cea mai intensă și a crescut progresiv în primele 6 ore de testare, când s-a eliberat $61,85 \pm 1,23\%$ - $85,91 \pm 2,76\%$ din cantitatea totală de fluconazol (figura 3). Ulterior, procesul de eliberare și difuzie a fost mai lent, iar starea staționară a fost atinsă. Cea mai mare cantitate cumulativă de fluconazol ($85,91 \pm 2,76\%$) s-a eliberat după 6 ore de testare din formularea FZ-SL 0,5%, urmată de formulările FZ-SL 2,5% și FZ-SP 0,5%-10% ISP, din care s-a eliberat $76,92 \pm 0,95\%$, respectiv $75,99 \pm 1,78\%$ FZ. Formulările FZ-SL 1% și FZ-SL 0,5% -10% ISP au condus, după 8 ore de testare, la un procent cumulativ de cedare ușor mai scăzut ($64,38 \pm 1,26\%$ și respectiv $73,33 \pm 0,48\%$), în timp ce hidrogelul de control FZ 2% a eliberat o cantitate cumulativă de $68,04 \pm 2,86\%$, după 6 ore de testare (figura 3).

Prin compararea valorilor parametrilor specifici permeației și eliberării *in vitro* a fluconazolului din hidrogelurile studiate prin membrana sintetică, se poate observa că hidrogelul conținând 2,5% laurat de zaharoză a produs cea mai mare viteză de transfer a FZ ($620,4 \pm 8,15 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$), fiind urmat de hidrogelul FZ-SL 0,5% având în compoziție 0,5% laurat de sucroză ($566,0 \pm 3,81 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$). Valori relativ apropiate ale fluxului FZ ($537,8 \pm 6,25$

$\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ și $528,6 \pm 3,31 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$) au fost calculate pentru formularea *FZ-SL 5%* și, respectiv hidrogelul de control, fără ester de sucroză. În schimb, hidrogelurile *FZ-SL 0,5%-10% ISP* și *FZ-SP 0,5%-10% ISP* au produs valori ale fluxului în stare staționară de 2,05 și respectiv 1,93 ori mai mici decât cea obținută pentru formularea conținând 2,5% laurat de zaharoză.

Analiza comparativă a valorilor coeficienților de corelare obținuți pentru fiecare formulare studiată, a indicat faptul că eliberarea FZ din hidrogelurile experimentale și permeația acestuia prin membrana sintetică, pe o perioadă de 8 h, au fost descrise cel mai bine de următoarele ecuații:

- modelul de ordin I în cazul formulărilor *FZ-SL 0,5%*, *FZ-SL 1%*, *FZ-SL 2,5%* și *FZ-SL 0,5%-10% ISP* (R^2 cuprins între 0,929 și 0,9977), sugerând că fracțiunea de substanță medicamentoasă eliberată la fiecare timp de prelevare a fost proporțională cu cantitatea rămasă în hidrogel;
- modelul Higuchi pentru formulările *FZ 2%* și *FZ-SP 0,5%-10% ISP* ($R^2 > 0,9$);
- modelul Korsmeyer-Peppas pentru formularea *FZ-SL 5%* ($R^2 > 0,9$), caz în care valoarea calculată a exponentului de difuzie n , fiind mai mare decât 0,89, sugerează un mecanism de eliberare de tip super caz II (datorat efectului combinat al difuziei substanței și relaxării/dizolvării polimerului hidrofil).

Studiul permeației in vitro a fluconazolului din hidrogelurile experimentale prin piele excizată de pe urechea de porc

Rezultatele testelor de permeație *ex vivo* a FZ au fost diferite de cele ale testului de eliberare *in vitro* prin membrană sintetică.

Analiza comparativă a procentului de substanță activă eliberat prin membrana biologică (fig. 3a) după 24 ore de testare, arată că hidrogelul conținând 5% laurat de zaharoză a cedat cea mai mare cantitate de FZ ($40,13 \pm 1,86\%$), urmat de formulările *FZ-SL 0,5%* ($26,0 \pm 0,35\%$), *FZ-SL 1%* ($24,03 \pm 0,77\%$), *FZ-SL 2,5%* ($23,12 \pm 1,15\%$). Hidrogelurile conținând 0,5% ester de zaharoză (laurat sau palmitat) și 10% alcool izopropilic, au eliberat după 24 ore cele mai scăzute procente de FZ ($19,54 \pm 0,62\%$ respectiv $13,67 \pm 0,81\%$). Din hidrogelul de control s-a eliberat după 24 ore de testare 22,70% din conținutul total de substanță medicamentoasă, procent de aproximativ 2 ori mai scăzut decât cel produs de formularea cu 5% laurat de zaharoză (fig. 3a).

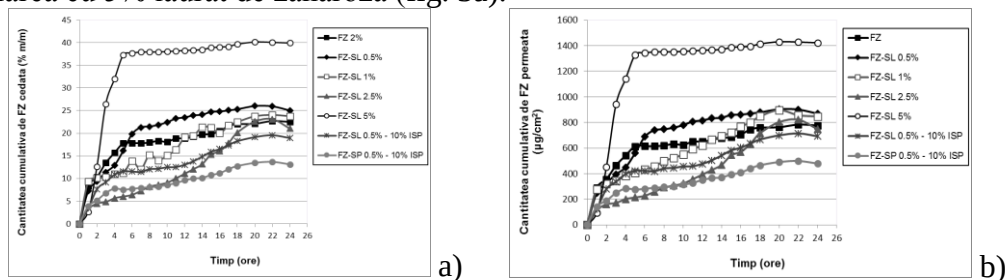


Figura 3. Profilele de eliberare (a) și permeație (b) *ex vivo* a FZ prin piele porcină, din hidrogelurile pe bază de chitosan/HPMC, cu și fără ester de sucroză

Valorile cele mai ridicate ale parametrilor de permeație *ex vivo* au fost produse de hidrogelul *FZ-SL 5%*, urmat de formularea *FZ-SL 0,5%-10% ISP* (de aproximativ 3 ori mai mici). Un transfer ușor mai scăzut și mai lent de FZ poate fi observat pentru formulările *FZ-SL 0,5%*, *FZ 2%* și *FZ-SP 0,5-10% ISP* comparativ cu cele obținute pentru hidrogelurile *FZ-SL 5%* și *FZ-SL 0,5%-10% ISP*, în timp ce formulările *FZ-SL 1%* și *FZ-SL 2,5%* au produs cele mai scăzute valori ale permeației substanței medicamentoase prin piele excizată de pe urechea de porc.

Pe baza valorilor calculate ale exponentului de difuzie n , cuprinse între 0,3073 și 0,7724 se poate afirma că permeația FZ din sistemele *FZ 2%*, și *FZ-SP 0,5-10% ISP* a urmat mecanismul de difuzie Fickiană (difuzia substanței active dependentă de gradientul de

concentrație), iar pentru celelalte două formulări (*FZ-SL 0,5%* și *FZ-SL 5%*) transportul FZ a fost de tip non-Fickian (difuzia substanței active în matricea hidratată și relaxarea polimerului).

Eliberarea fluconazolului *ex vivo* din hidrogelurile *FZ-SL 1%* și *FZ-SL 0,5-10% ISP* a fost descrisă cel mai bine de modelul Higuchi ($R^2 > 0,94$), iar cea din hidrogelul cu 2,5% laurat de zaharoză a fost descrisă cu acuratețe de modelul de ordinul zero ($R^2 = 0,9601$).

Evaluarea activității antifungice in vitro a hidrogelurilor experimentale

Se observă diferențe semnificative între valorile diametrelor zonelor de inhibare măsurate pentru hidrogelul de control și pentru hidrogelurile cu laurat sau palmitat de zaharoză (figura 4).

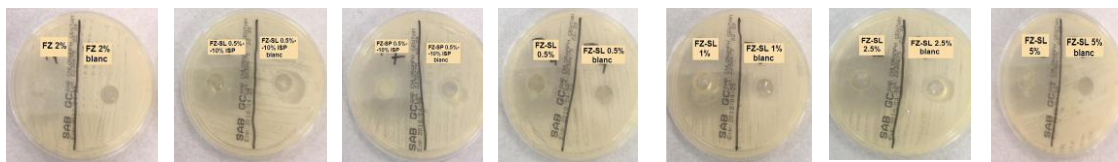


Figura 4. Inhibarea creșterii fungice a *Candida albicans* în prezența hidrogelurilor experimentale cu 2% fluconazol și ester de zaharoză

Hidrogelurile conținând 0,5% SL cu sau fără alcool izopropilic au prezentat un efect antimicotic ușor mai scăzut decât formularea de control, ceea ce sugerează faptul că surfactantul în această concentrație nu a manifestat efect sinergic cu fluconazolul, ci chiar i-a redus activitatea mai ales în prezența cosolventului. În schimb, acțiunea antifungică a formulării *FZ-SP 0,5%-10% ISP* a fost similară formulării de control și de 1,15 ori mai intensă decât cea a formulării *FZ-SL 0,5%-10% ISP*, de care se deosebește doar prin tipul esterului de zaharoză prezent în compoziție. Astfel, creșterea lungimii lanțului de atomi de C mărește eficacitatea esterului de zaharoză ca antimicotic (în cazul de față $C12 < C16$), ceea ce ar putea reflecta rolul important al echilibrului dintre grupările hidrofile și grupările lipofile din structura sa în exercitarea efectului inhibitor. Pe baza acestui fenomen se poate specula că esterul de zaharoză se poate combina la suprafața bacteriilor prin intermediul grupărilor acil, influențându-le funcția fiziologică.

Efectul antimicotic sinergic al lauratului de zaharoză s-a manifestat odată cu creșterea concentrației sale de la 0,5% la 1-5% în formulările de hidrogeluri, fapt evidențiat de diametrele zonelor de inhibare măsurate, care au fost de aproximativ 1,2 ori mai mari decât cele produse de formularea *FZ-SL 0,5%*.

V.1.3. Concluzii

În această etapă a cercetării experimentale, au fost formulate și preparate cu succes hidrogeluri inovatoare pentru administrarea locală a fluconazolului, folosind un amestec de doi polimeri hidrofilici naturali, netoxici, biocompatibili, biodegradabili ca agenți gelifianti (chitosan și hidroxipropilmetilceluloză) și doi surfactanți naturali neionici din grupa esterilor de sucroză, bine tolerați de piele și cu potențial rol de promotori de absorbție.

Testul de disponibilitate *in vitro* a substanței medicamentoase, a evidențiat superioritatea hidrogelurilor cu 2,5% și 5% laurat de sucroză, care au produs cele mai mari valori ale vitezei de transfer ($620,4 \pm 8,15 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ respectiv $537,8 \pm 6,25 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$) și de eliberare ($1677 \pm 7,45 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}^{1/2}$ respectiv $1450 \pm 5,28 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}^{1/2}$) a FZ prin membrana sintetică hidrofilă, demonstrându-și astfel performanța.

Studiul de permeație *ex vivo* a fluconazolului din hidrogelurile experimentale prin pielea porcine a susținut doar parțial rezultatele testului de eliberare *in vitro*, prin faptul că doar formularea cu 5% laurat de zaharoză a condus la cele mai mari valori fluxului prin piele și vitezei de eliberare ($315,5 \pm 4,28 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ respectiv $1036,0 \pm 12,63 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}^{1/2}$). În plus, s-a evidențiat și formularea conținând 0,5% laurat de zaharoză asociat cu 10% alcool izopropilic

care s-a situat pe locul doi în ierarhia bazată pe valorile fluxului în stare staționară și vitezei de eliberare ($100,7 \pm 3,38 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ respectiv $203,9 \pm 4,37 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}^{1/2}$).

Rezultatele obținute au arătat că lauratul sucroză singur, în concentrație de 5% sau asociat în concentrație de 0,5% cu 10% alcool izopropilic este un promotor de penetrare eficient pentru fluconazol. Mai mult, formularea cu 5% laurat de zaharoză a prezentat și activitatea antimicotică cea mai intensă, evidențiind efectul sinergic al surfactantului în concentrație de 5% cu fluconazolul.

Rezultatele obținute au indicat influența semnificativă a componentelor vehiculului, variabile de formulare (tipul și concentrația esterului de sucroză, prezența cosolventului) asupra caracteristicilor lor fizice, reologice și de eliberare și permeație percutanată *in vitro* a substanței medicamentoase.

V.2. Studii privind dezvoltarea unor hidrogeluri pe bază de chitosan/hidroxipropilmetilceluloză conținând fluconazol 2% și uleiuri esențiale. Influența uleiurilor esențiale utilizate ca promotori de absorbție asupra eliberării și permeației *in vitro* a fluconazolului

Obiectivul acestui studiu a fost de a investiga posibilitatea formulării unor hidrogeluri pentru administrarea locală a fluconazolului, utilizând un amestec de doi biopolimeri (chitosan și hidroxipropilmetilceluloză) ca agenți de gelifiere, uleiul de cuișoare sau uleiul de scorțișoară ca promotori de penetrare și componente antifungice sinergice cu FZ, cosolvenți și un surfactant sintetic anionic ca solubilizanti pentru substanța activă și uleiurile esențiale. În plus, a fost studiată influența uleiurilor esențiale asupra proprietăților fizice, comportamentului reologic și eliberării și permeației *in vitro* a FZ din hidrogelurile experimentale.

V.2.1 Metode

Formularea și prepararea hidrogelurilor pe bază de chitosan/HPMC conținând fluconazol 2% și uleiuri esențiale

Prepararea bazei de hidrogel a fost realizată prin amestecarea unui hidrogel de chitosan de concentrație 3% cu un hidrogel de HPMC de concentrație 4%, într-un raport de 1:2.

Prepararea hidrogelurilor pe bază de chitosan/HPMC cu 2% fluconazol și uleiuri esențiale. Cantitățile de fluconazol și Cremophor A25 cântărite în prealabil, au fost dizolvate în amestecul de cosolvenți (tetraglicol-etanol 1:2). În soluția obținută, uleiul esențial (de scorțișoară sau de cuișoare) în concentrație de 3% sau 5% (m/m) a fost adăugat sub agitare, până la dizolvare completă. În baza de hidrogel s-a adăugat prin agitare moderată (300 rpm) soluția de fluconazol, ulei esențial și Cremophor A25 în amestecul de cosolvenți.

Prepararea hidrogelului cu 2% fluconazol fără ulei esențial (formularea de control) a fost realizată în mod similar preparării hidrogelurilor cu fluconazol și uleiuri esențiale, însă fără a utiliza ulei esențial.

Controlul calității hidrogelurilor pe bază de chitosan/HPMC conținând fluconazol 2% și uleiuri esențiale s-a efectuat conform metodelor descrise în capitolele anterioare.

Studiul de eliberare și permeație cutanată in vitro a fluconazolului din hidrogelurile experimentale

Studiul cedării in vitro a fluconazolului din hidrogelurile experimentale prin membrană sintetică

Testul de eliberare *in vitro* a FZ din hidrogelurile experimentale cu uleiuri esențiale prin membrană sintetică hidrofilă de polisulfonă, cu diametrul de 25 mm și pori de $0,45 \mu\text{m}$ (membrane HT Tuffryn, Pall Corporation, S.U.A), a fost efectuat folosind sistemul de celule de difuzie Franz, conform unui protocol experimental similar descris în subcapitolul anterior,

cu diferența că în probele prelevate s-au adăugat 0,5 mL soluție clorură cuprică 0,0514% (m/V), în scopul formării complexului fluconazol-Cu(II).

Determinarea cantitativă a FZ în probe s-a efectuat printr-o metodă spectrofotometrică în UV, la lungimea de undă 330 nm, corespunzătoare maximului de absorbție al complexului FZ-Cu(II) în ser fiziologic cu 60% etanol.

Studiul permeației in vitro a fluconazolului din hidrogelurile experimentale prin piele excizată de pe urechea de porc

Pentru evaluarea *in vitro* a permeației FZ prin piele porcină, a fost respectat modul de lucru specificat în subcapitolul anterior. În probele prelevate s-au adăugat 0,5 mL soluție clorură cuprică 0,0514% (m/V), în scopul formării complexului fluconazol-Cu(II).

V.2.2 Rezultate și discuții

Formularea de control (fără ulei volatil) s-a prezentat sub forma unui hidrogel omogen, translucid, transparent, ușor gălbui, cu miros slab de acid acetic. Formulările cu uleiuri volatile s-au prezentat sub forma unor geluri omogene, translucide, cu miros caracteristic uleiului volatil din compoziție (scorțișoară sau cuișoare).

Conținutul în FZ al gelurilor hidrofile experimentale a variat în intervalul 97,61%-102,36%, valorile încadrându-se în limitele prevăzute de FR X și indicând distribuția uniformă a substanței active în preparate.

pH-ul tuturor hidrogelurilor testate s-a încadrat în domeniul slab acid și a variat foarte puțin în jurul valorii de 4.

Analiza reologică

Testul de curgere în stare staționară

Din figura 5 se poate constata faptul că toate gelurile hidrofile cu fluconazol testate au prezentat un caracter pseudoplastic-tixotrop, însă gradul de tixotropie a fost diferit. Comparativ cu formularea de control (FZ 2%), hidrogelurile cu 3% ulei volatil de scorțișoară sau ulei de cuișoare, au prezentat o tixotropie de 3,3 ori respectiv de 1,03 ori mai mare, în timp ce gradul de tixotropie al gelurilor cu 5% ulei volatil de scorțișoară și de cuișoare a fost de 6,7 ori respectiv de 4 ori mai scăzut.

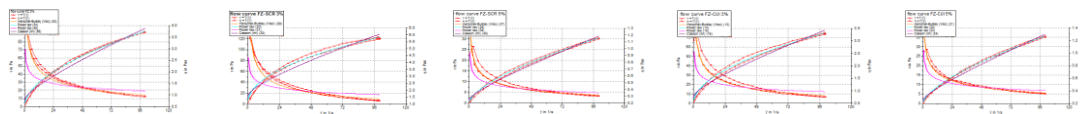


Figura 5. Reogramele și curbele de viscozitate ale hidrogelurilor experimentale pe bază de chitosan/HPMC, conținând 2% fluconazol și uleiuri esențiale

Comportamentul pseudoplastic-tixotrop al gelurilor experimentale a fost descris matematic cu mare acuratețe atât de modelul „legea putere” ($R > 0,99$), cât și de modelul Casson ($R > 0,96$).

Analiza regresională a datelor a permis calcularea a doi parametri reologici și anume indicele de consistență K și indicele de curgere n . Pseudoplasticitatea gelurilor hidrofile cu 5% ulei volatil a fost ușor mai scăzută decât a celorlalte formulări, valorile indicelui de curgere n fiind cele mai mari (0,697 pentru formularea cu ulei de scorțișoară și 0,705 pentru formularea cu ulei de cuișoare).

Se observă că gelurile cu 5% ulei volatil au prezentat cele mai mici valori ale indicelui de consistență K (de aproximativ 4 ori mai mici) decât cea calculată pentru formularea de control (fără ulei volatil în compoziție), ceea ce indică o capacitate de întindere mai scăzută în timpul aplicării lor pe tegument. În schimb, în concentrație de 3%, cele două uleiuri volatile au exercitat efecte diferite asupra indicelui de consistență K al gelurilor: uleiul volatil de scorțișoară a condus la creșterea valorii acestui parametru (de 1,63 ori), iar uleiul esențial de cuișoare a produs o ușoară scădere (de 1,16 ori) a indicelui de consistență.

Profilul curbelor de viscozitate ale hidrogelurilor experimentale arată că viscozitatea acestora scade odată cu creșterea tensiunii de forfecare și respectiv a vitezei de deformare, relație specifică sistemelor pseudoplastice non-newtoniene. S-a constatat că adăugate în formulare în concentrație de 5% ambele uleiuri esențiale au produs o scădere de aproximativ 3 ori a viscozității hidrogelului *FZ* 2%, iar în concentrație de 3% uleiul esențial de scorțișoară a mărit de 1,32 ori viscozitatea gelului de control, în timp ce uleiul esențial de cuișoare a scăzut de 1,24 ori viscozitatea gelului de control.

Testul penetrometric Pentru formularea *FZ-SCR* 5% s-a măsurat cel mai mare grad de penetrare, indicând deci consistența cea mai scăzută. De asemenea, hidrogelul conținând 5% ulei de cuișoare (formularea *FZ-CUI* 5%) a condus la o valoare mare a gradului de penetrare (de numai 1,36 ori mai mică decât cea produsă de formularea *FZ-SCR* 5%), având ca urmare o consistență scăzută.

Determinarea capacității de etalare Cele mai mari suprafețe de etalare au fost măsurate, pentru toate greutatea aplicate, în cazul gelurilor cu fluconazol conținând 5% ulei volatil (formulările *FZ-SCR* 5% și *FZ-CUI* 5%); mai mult, profilele extensiometrice ale acestor geluri au fost superpozabile. Gelurile cu fluconazol conținând 3% ulei volatil au prezentat profile extensiometrice similare, însă cu suprafețe de întindere mai mici. Hidrogelul cu fluconazol, dar fără ulei volatil a prezentat capacitatea de etalare cea mai scăzută.

Studiul de eliberare și permeație cutanată in vitro

Studiul cedării in vitro a fluconazolului din hidrogelurile experimentale prin membrană sintetică

Cele mai mari cantități cumulative de fluconazol ($85,14 \pm 0,63\%$ și $81,43 \pm 0,97\%$) s-au eliberat, după 8 ore de testare, din formulările *FZ-SCR* 3% și *FZ-SCR* 5%. Hidrogelurile cu 2% fluconazol și 3% sau 5% ulei esențial de cuișoare au eliberat cantități cumulative de *FZ* mai mici: $71,11 \pm 1,53\%$ la sfârșitul perioadei de testare respectiv $60,05 \pm 1,09\%$ după 5 ore de testare. Formularea de control (fără ulei esențial) a eliberat cel mai mic procent cumulativ de *FZ* la 5 ore de testare (până la atingerea stării staționare), însă după aceea cantitatea cedată a crescut atingând o valoare maximă de $68,66 \pm 0,58\%$ la sfârșitul perioadei de testare.

Comparând valorile parametrilor specifici permeației și eliberării *in vitro* a fluconazolului prin membrană sintetică din hidrogelurile studiate, se poate observa că gelurile conținând 5% ulei esențial de scorțișoară sau de cuișoare au produs cele mai mari valori ale vitezei de transfer a *FZ* ($395,95 \pm 1,28 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ respectiv $346,15 \pm 2,41 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$), fiind urmate de gelurile *FZ-CUI* 3% și *FZ* 2%, care au condus la valori apropiate ale fluxului în stare staționară ($328,90 \pm 0,62 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ respectiv $323,75 \pm 1,02 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$). Pentru formularea în compoziția căreia uleiul volatil de cuișoare a fost prezent în concentrație de 3% (*FZ-CUI* 3%), s-a obținut o valoare a fluxului în stare staționară de 1,7 ori mai mică față de cea produsă de formularea cu 5% ulei esențial de scorțișoară (*FZ-SCR* 5%).

Valorile vitezei de eliberare a fluconazolului prin membrana sintetică din gelurile hidrofile studiate au variat în mod asemănător fluxului, fiind posibilă următoarea ierarhizare în ordine descrescătoare:

$$FZ-SCR\ 3\% > FZ-SCR\ 5\% > FZ-CUI\ 5\% > FZ\ 2\% > FZ-CUI\ 5\%$$

Cinetica de eliberare a *FZ* din toate hidrogelurile studiate a fost descrisă cel mai bine de modelul matematic propus de Korsmeyer-Peppas (valorile R^2 cuprinse între 0,9872 și 0,9993), ceea ce sugerează un mecanism de difuzie (tabelul V.15 și fig. V.17).

Studiul permeației in vitro a fluconazolului din hidrogelurile experimentale prin piele excizată de pe urechea de porc. Profilele permeației fluconazolului timp de 24 ore prin piele porcină din hidrogelul de chitosan/HPMC în prezența uleiului volatil în diferite concentrații (3% și 5%) sunt prezentate în figura 6.

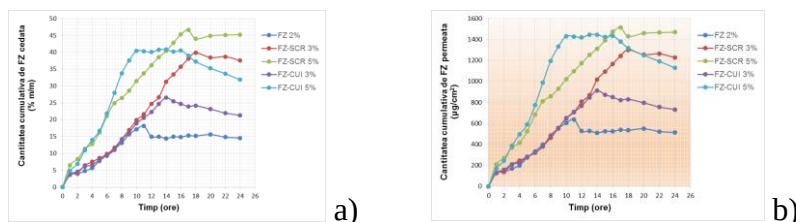


Figura 6. Profilurile cinetice cumulative de cedare (a) și de permeație (b) ale fluconazolului din hidrogelurile pe bază de chitosan/HPMC în prezența uleiului esențial prin piele porcină (media $\pm$ DS, n=3)

Se poate observa că prezența uleiului esențial în baza de hidrogel a condus la procente cumulative maxime de fluconazol eliberat de 1,46-2,58 ori mai mari decât cel obținut pentru hidrogelul fără ulei esențial ($18,09 \pm 0,71\%$) (figura 6a). Cantitatea cumulativă maximă de fluconazol eliberată prin pielea porcină a crescut cu creșterea concentrației uleiului esențial în formulare de la 3% la 5%, cele mai mari procente cumulative maxime de fluconazol fiind cedate de formulările *FZ-CUI 5%* ($40,82 \pm 0,64\%$) și *FZ-SCR 5%* ($46,60 \pm 1,13\%$), după 14 ore respectiv 17 ore de testare. Comparând cantitățile cumulative de FZ eliberate din hidrogelurile cu ulei esențial în concentrație de 3% și 5%, se constată că uleiul esențial de scorțișoară a fost mai eficient ca promotor de absorbție decât uleiul esențial de cuișoare, producând procente cumulative mai mari (figura 6a).

După cum se poate observa din figura 6b, permeația fluconazolului din toate hidrogelurile testate prin pielea porcină a fost progresivă și rapidă până la instalarea stării staționare, după 11 ore (pentru formularea de control), după 18 și 17 ore (pentru formulările *FZ-SCR 3%* și respectiv *FZ-SCR 5%*) și după 14 ore și 10 ore de testare (în cazul formulărilor cu ulei volatil de cuișoare 3% și respectiv 5%).

Modelul matematic care a descris cel mai bine eliberarea FZ din hidrogelurile cu uleiuri volatile a fost modelul Korsmeyer-Peppas, fapt indicat de valorile mari ale coeficientului de determinare R^2 , cuprinse între 0,9 și 0,979.

De asemenea, rezultatele studiului de permeație *ex vivo* a FZ obținute pentru hidrogelul cu 3% ulei esențial de scorțișoară au fitat bine și cu modelele cinetice de ordin zero și unu (cu valori ale coeficientului de determinare R^2 0,9442 respectiv 0,9417), ceea ce poate confirma faptul că în acest caz difuzia a fost principalul mecanism de eliberare.

Evaluarea activității antifungice in vitro a hidrogelurilor experimentale

Activitatea antifungică a hidrogelurilor testate, inclusiv a celor conținând doar ulei esențial (fără fluconazol) utilizate ca formulări de control, este prezentată în tabelul 1.

Tabelul 1. Activitatea antifungică a hidrogelurilor experimentale pe bază de chitosan/HPMC și ulei esențial de scorțișoară sau cuișoare (3% și 5%), cu sau fără fluconazol 2%

Cod formulare	Diametrul zonei de inhibare (mm)	
	Hidrogel de control	Hidrogel cu 2% fluconazol
<i>FZ 2%</i>	0	$36 \pm 0,33$
<i>FZ-SCR 3%</i>	$34 \pm 0,28$	$53 \pm 0,42$
<i>FZ-SCR 5%</i>	$42 \pm 0,30$	$63 \pm 0,57$
<i>FZ-CUI 3%</i>	$36 \pm 0,24$	$54 \pm 0,61$
<i>FZ-CUI 5%</i>	$41 \pm 0,35$	$58 \pm 0,49$

Se constată reducerea creșterii fungice în toate cazurile, cu excepția hidrogelului de control fără fluconazol și fără ulei esențial. De asemenea, se evidențiază efectul antifungic puternic al hidrogelurilor control conținând doar ulei esențial, acestea producând valori ale diametrului zonei de inhibare apropiate (formularea de control cu 3% SCR), egale (formularea de control cu 3% CUI) sau mai mari (formulările de control cu 5% ulei esențial) decât cea

produsă de formularea FZ 2%. Creșterea concentrației de ulei esențial de la 3% la 5% a determinat mărirea zonei de inhibare a dezvoltării fungice, iar pentru aceeași concentrație ambele uleiuri esențiale au prezentat efecte antifungice similare (tabelul 1).

V.2.3 Concluzii

În cadrul acestui studiu experimental, s-a investigat posibilitatea dezvoltării unor noi geluri hidrofile ca potențiale vehicule semisolidе pentru eliberarea topică a fluconazolului.

Au fost formulate și preparate geluri hidrofile, conținând 2% fluconazol, două uleiuri esențiale având activitate antimicrobică intrinsecă (de scorțișoară sau de cuișoare), un surfactant sintetic neionic (Cremophor A25), doi cosolvenți (tetraglicol și etanol) și o bază de hidrogel compusă dintr-un amestec de două polizaharide naturale (chitosan și hidroxipropilmetilceluloză). Pe baza rezultatelor acestor teste se desprind următoarele concluzii:

- Conținutul în substanță activă și pH-ul hidrogelurilor analizate s-au încadrat în limitele compendiale în vigoare;
- Toate gelurile hidrofile studiate s-au dovedit a fi corpuri ne-newtoniene, cu comportament pseudoplastic și caracter tixotrop mai mult sau mai puțin pronunțat, cu viscozitate, consistență și capacitate de etalare adecvate;
- Studiul eliberării *in vitro* a substanței active a arătat un transfer intens și progresiv al fluconazolului prin membrana sintetică hidrofilă. Hidrogelurile conținând 5% ulei esențial de scorțișoară sau de cuișoare s-au dovedit a fi cele mai performante, întrucât au produs cele mai mari valori ale fluxului FZ prin membrana sintetică hidrofilă ($395,95 \pm 1,28 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ respectiv $346,15 \pm 2,41 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$), iar cantitățile cumulative de fluconazol eliberate după 8 ore de testare au fost mari ($81,43 \pm 0,97\%$ și $60,05 \pm 1,09\%$). Modelul matematic care a descris cel mai bine eliberarea FZ din hidrogelurile cu uleiuri volatile prin pielea excizată de pe urechea de porc a fost modelul Korsmeyer-Peppas.
- Activitatea antifungică a hidrogelurilor cu 2% fluconazol față de *Candida albicans* a fost mai puternică în prezența uleiului esențial (de scorțișoară sau de cuișoare) în concentrație de 3% și 5% fapt comparativ cu cea măsurată pentru formularea FZ 2% (fără ulei esențial). Hidrogelurile cu 2% fluconazol și 5% ulei esențial s-au dovedit a fi cele mai eficiente ca antifungice, producând cele mai mari suprafețe ale zonei de inhibare.

Din acest studiu se poate concluziona că încorporarea uleiului de scorțișoară și a uleiului de cuișoare în hidrogeluri pe bază de polizaharide poate fi explorată pentru o eliberare locală sigură și eficientă a fluconazolului, pentru a îmbunătățirea tratamentului infecțiilor fungice superficiale.

CAPITOLUL VI

VI. DEZVOLTAREA UNOR MICROEMULSII BIOCOMPATIBILE GELIFICATE CU CHITOSAN, PE BAZĂ DE ULEIURI VOLATILE ȘI ESTERI DE ZAHAROZĂ PENTRU ELIBERAREA TOPICĂ A FLUCONAZOLULUI

Obiectivul general al acestui studiu a fost dezvoltarea unor microemulsii L/H biocompatibile, pe bază de excipienți naturali și gelificate cu biopolimer (chitosan), ca vehicule pentru aplicarea topică a fluconazolului. Componentele naturale de bază din formularea microemulsiilor gelificate au fost următoarele: uleiul esențial de scorțișoară, de oregano sau de cuișoare, ca fază lipofilă internă în care să fie încapsulat fluconazolul; lauratul sau palmitatul de zaharoză ca surfactant hidrofil și chitosan ca agent gelifiant. De asemenea, s-a urmărit combinarea efectelor biologice intrinseci (antimicrobian și în special antifungic) ale compușilor naturali din compoziția uleiurilor volatile cu acțiunea antimicrobică a unei substanțe medicamentoase de sinteză, fluconazolul, în scopul potențării efectului terapeutic

prin mecanism sinergic. Un obiectiv secundar al studiului a fost evaluarea efectului tipului și concentrației uleiului esențial și surfactantului natural atât asupra proprietăților reologice ale microemulsiilor gelificate, cât și asupra eliberării și permeației *in vitro* a fluconazolului din sistemele respective.

VI.1. Metode

Studii de solubilitate. Datorită solubilității scăzute a FZ în apă, fluconazolul a fost supus unor teste de solubilitate în două uleiuri grase de sinteză (miristat de izopropil și oleat de etil) și în nouă uleiuri esențiale (de eucalipt, de lemongrass, de cuișoare, de scorțișoară, de mentă, de lavandă, de fenicul dulce și de oregano), pentru care a fost raportată în literatură activitatea antimicotică proprie. În cazul uleiurilor esențiale, a fost efectuat inițial un screening preliminar, evaluându-se, prin observare vizuală, capacitatea acestora de a dizolva FZ. Pe scurt, 1 mg fluconazol s-a adăugat la 1 mL ulei esențial, apoi sistemele au fost supuse ultrasonării timp de 15 min, pentru a accelera dizolvarea substanței medicamentoase, iar solubilitatea FZ a fost evaluată vizual după 24 h. Pentru uleiurile esențiale în care s-a dizolvat întreaga cantitate de FZ adăugată, tehnica descrisă mai sus a fost repetată consecutiv până la apariția unui precipitat.

Uleiurile esențiale în care fluconazolul a prezentat solubilitate aparentă mai mare (uleiul esențial de scorțișoară, *SCR*, uleiul esențial de cuișoare, *CUI* și uleiul esențial de oregano, *ORG*), au fost selectate pentru evaluarea cantitativă a solubilității, folosind metoda saturației prin agitarea flaconului. O probă din fiecare soluție saturată (0,1 mL) a fost diluată cu ulei esențial, iar apoi cu un amestec de acetonitril-soluție apoasă de CuCl_2 în raport de 9:1. Concentrația soluției apoase de clorură cuprică a fost de 0,53 g/mL.

Cuantificarea fluconazolului în aceste soluții s-a bazat pe formarea unui complex metalic al ionului Cu^{2+} cu FZ, colorat (verde), în amestecul apă-acetonitril 1:9. În consecință, determinarea cantitativă a FZ a fost efectuată prin spectrofotometrie în vizibil (spectrofotometru T70+, PG Instruments, U.K.) la lungimea de undă 800 nm (pentru uleiul esențial de scorțișoară și de cuișoare) și, respectiv 762 nm (pentru uleiul esențial de oregano), pe baza ecuațiilor curbelor de etalonare obținute pentru fiecare ulei volatil în aceleași condiții de diluție.

Metoda saturației prin agitarea flaconului a fost folosită și pentru determinarea solubilității fluconazolului în uleiurile grase de sinteză (miristat de izopropil și oleat de etil), respectându-se tehnica de lucru descrisă mai sus, însă concentrația FZ în filtrat, după diluarea acestuia cu etanol, a fost măsurată spectrofotometric în UV, la 253 nm.

Tot în cadrul acestor studii, folosind criteriul calitativ bazat pe recomandările compendiale referitoare la „Solubilitate”, a fost determinată și solubilitatea aparentă a lauratului și palmitatului de zaharoză în ulei esențial de cuișoare, de scorțișoară și de oregano, precum și în miristat de izopropil; a fost respectată tehnica descrisă mai sus în cazul fluconazolului.

Selectarea componentelor formulărilor

Selectarea fazei uleioase. Selectarea uleiului esențial ca o componentă a fazei uleioase a microemulsiilor L/H cu fluconazol s-a bazat pe capacitatea sa de dizolvare a substanței medicamentoase. A doua componentă a fazei uleioase a fost selectată din grupul solvenților lipofili de sinteză, pe baza miscibilității sale cu uleiul esențial și a capacității sale de a dizolva fluconazolul. Uleiul esențial a fost diluat cu uleiul gras de sinteză în raport de masă de 1:1.

Selectarea surfactantului și a cosurfactantului. Dintre esterii de zaharoză testați ca emulgatori în formulări farmaceutice, în acest studiu au fost selectați doi agenți tensioactivi și anume lauratul de sucroză (*D1216*) și palmitatul de sucroză (*D1616*). Screeningul s-a bazat pe capacitatea lor de solubilizare a fazei uleioase, mai precis capacitatea de a forma o zonă largă de microemulsie. Este de menționat faptul că au fost aleși surfactanți cu aceeași valoare HLB (16), deși lungimea lanțului de acid gras este diferită (12 respectiv 16 atomi de carbon).

Singurul criteriu de selecție a cosurfactantului pentru dezvoltarea microemulsiilor biocompatibile experimentale a fost capacitatea sa de dizolvare a surfactantului hidrofil (esterul de zaharoză), care este solid la temperatura camerei.

Construirea diagramelor pseudoternare de fază. Pentru a determina domeniul concentrației componentelor (faza uleioasă, faza apoasă și amestecul surfactant/cosurfactant, S_{mix}), care corespunde regiunii de microemulsii, au fost construite diagrame pseudoternare de fază. Uleiul esențial și miristatul de izopropil au fost amestecați în raport masic de 1:1, iar surfactantul (laurat sau palmitat de zaharoză) a fost dizolvat în cosurfactant (alcool izopropilic) în două raporturi masice (1:1,5 și 1:2) prin agitare. În continuare, au fost preparate diferite amestecuri de fază uleioasă și S_{mix} în 9 raporturi de masă și anume 1:9, 2:8, 3:7, 4:6, 5:5, 6:4, 7:3, 8:2 și 9:1, astfel încât a fost acoperit maximul de raporturi masice care permite delimitarea cu precizie a granițelor dintre fazele formate în diagrama pseudoternară. Diagramele pseudoternare de fază au fost construite folosind o metodă relativ nouă, metoda diluției în microplacă, bazată pe metoda convențională de titrare cu apă. Crearea diagramelor pseudoternare de fază prin folosirea metodei diluției în microplacă a fost recent de descrisă de Schmidts T. și colab. [340] și prezintă avantajul economiei de timp și de materiale. În diagrama pseudoternară de faze, faza de microemulsie a fost identificată cu regiunea în care sistemele au fost clare, transparente și fluide.

Prepararea formulărilor de microemulsii L/H pe bază de uleiuri esențiale și esteri de zaharoză, conținând 2% fluconazol

Din regiunile de microemulsii delimitate în diagramele pseudoternare de fază construite pentru sistemele (ulei esențial de scorțișoară/IPM)-(D1616/IZP)-apă, (ulei esențial de scorțișoară/IPM)-(D1216/IZP)-apă, (ulei esențial de oregano/IPM)-(D1616/IZP)-apă, (ulei esențial de oregano/IPM)-(D1216/IZP)-apă și (ulei esențial de cuișoare/IPM)-(D1616/IZP)-apă, au fost selectate câte două formulări, cu 6% sau 10% fază uleioasă și 45% S_{mix} .

Prepararea microemulsiilor pe bază de uleiuri volatile și esteri de sucroză, conținând 2% fluconazol

Fluconazolul a fost dizolvat în amestecul obținut prin amestecarea fazei uleioase (formată din ulei volatil și miristat de izopropil) cu soluția esterului de zaharoză (palmitat sau laurat de zaharoză) în alcool izopropilic, sub agitare. În soluția rezultată, a fost adăugată, în picături și sub agitare, cantitatea corespunzătoare de soluție apoasă de acid acetic 2%. Concentrația finală a fluconazolului în formulările de microemulsii a fost de 2% (m/m). Toate microemulsiile preparate au fost păstrate timp de 24 h la temperatura camerei înainte de a fi supuse testelor ulterioare.

Prepararea microemulsiilor gelificate cu chitosan, pe bază de uleiuri esențiale și esteri de zaharoză, conținând 2% fluconazol

În acest studiu, chitosanul în concentrație de 1,9% (m/m) a fost utilizat ca agent gelifiant al microemulsiilor experimentale.

Chitosanul a fost adăugat în porțiuni mici și sub agitare moderată, la microemulsiile L/H cu fluconazol, a căror fază apoasă a fost soluția de acid acetic 2%. S-a continuat agitarea până la dizolvarea completă a chitosanului și obținerea unei microemulsii-gel omogene și transparente. Toate microemulsiile preparate au fost păstrate la temperatura camerei timp de 24 h înainte de a fi caracterizate.

Caracterizarea microemulsiilor L/H cu fluconazol

Microemulsiile cu fluconazol obținute au fost evaluate în ceea ce privește diferite caracteristici fizico-chimice și stabilitatea fizică.

Examinarea macroscopică a fost efectuată prin inspecția vizuală și olfactivă a formulărilor în scopul evaluării caracterelor organoleptice (aspect, culoare, miros, fluiditate). Distincția între sistemele lichide și cele viscoase a fost făcută pe baza capacității de curgere a dispersiei plasate la o înclinație de 45°.

Diametrul mediu a picăturilor, indicele de polidispersie și potențialul zeta al microemulsiilor cu FZ 2% au fost măsurate în triplicat prin spectroscopie de corelare fonică,

folosind instrumentul Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments, UK). Măsurătorile s-au efectuat la un unghi fix de 173° și la temperatura de 25°C .

Indicii de refracție și viscozitatea au fost determinate în triplicat, la $25\pm 2^\circ\text{C}$, utilizând un refractometru (Digital ABBE Mark II-REICHERT, Depew, NY, USA) și respectiv un viscosimetru rotațional (Brookfield DV-I+, Anglia), folosind sonda S-05.

pH-ul microemulsiilor a fost măsurat la $25\pm 2^\circ\text{C}$, folosind un pH-metru portabil (Sension™, Hach Company, SUA). Experimentele au fost efectuate în triplicat pentru fiecare probă.

Controlul calității microemulsiilor gelificate cu chitosan, pe bază de uleiuri esențiale și esteri de zaharoză, conținând 2% fluconazol

Examenul caracterelor macroscopice vizuale (aspect, consistență, omogenitate), olfactive (miros) și tactile, s-a efectuat conform prevederilor FR X la monografia *Unguenta* sau alte monografii.

Determinarea conținutului în fluconazol și a pH-ului microemulsiilor-gel experimentale

Pentru dozarea fluconazolului conținut în formulările de microemulsii gelificate studiate, s-au cântărit aproximativ 0,4 g probă și s-au adus cantitativ cu amestec de acetonitril-soluție apoasă de CuCl_2 (9:1) într-un balon cotat de 25 mL, completând la volum cu același solvent; concentrația soluției apoase de clorură cuprică a fost de 0,53 g/mL. Conținutul în fluconazol al soluției filtrate a fost analizat spectrofotometric în vizibil, (spectrofotometru T70+, PG Instruments, U.K.) la lungimea de undă 800 nm (pentru uleiul esențial de scorțișoară și de cuișoare) și, respectiv 762 nm (pentru uleiul esențial de oregano). Fiecare experiment a fost efectuat în triplicat.

pH-ul dispersiilor apoase conținând 5% (m/m) probă de microemulsie-gel a fost determinat la 25°C folosind un pH-metru digital (Sension™, Hach Company, SUA). Experimentele au fost efectuate în triplicat pentru fiecare probă.

Studiul de eliberare și permeație cutanată in vitro

Evaluarea cedării in vitro a fluconazolului prin membrană sintetică din microemulsiile gelificate cu chitosan, pe bază de uleiuri esențiale și esteri de zaharoză

Testul de eliberare *in vitro* a FZ din microemulsiile-gel experimentale prin membrană sintetică hidrofilă de polisulfonă, cu diametrul de 25 mm și pori de $0,45\mu\text{m}$ (membrane HT Tuffryn, Pall Corporation, S.U.A), a fost efectuat folosind sistemul de celule de difuzie Franz descris în subcapitolul V.

Determinarea cantitativă a FZ în probe s-a efectuat printr-o metodă spectrofotometrică în UV (spectrofotometru UV-VIS T70+ cu soft UVWIN5, PG Instruments, Anglia), în condițiile descrise la subcapitolul V.

Toate determinările au fost efectuate în triplicat.

Studiul permeației in vitro a fluconazolului prin piele excizată de pe urechea de porc din microemulsiile gelificate cu chitosan, pe bază de uleiuri esențiale și esteri de zaharoză

Pentru evaluarea *in vitro* a permeației FZ s-a respectat modul de lucru specificat în subcapitolul V. Determinarea cantitativă a FZ în probe s-a efectuat prin metodă spectrofotometrică în UV (spectrofotometru UV-VIS T70+ cu soft UVWIN5, PG Instruments, Anglia), conform modului de lucru descris în subcapitolul V.

Analiza rezultatelor studiilor de eliberare și permeație in vitro

Calcularea parametrilor specifici permeației și eliberării fluconazolului din preparatele studiate prin membrana sintetică și prin pielea excizată de pe urechea de porc, precum și evaluarea cineticii de cedare a substanței active au fost efectuate utilizând metoda și ecuațiile prezentate la subcapitolul.

Evaluarea activității antifungice in vitro a microemulsiilor-gel experimentale s-a efectuat conform protocolului de lucru descris la subcapitolul V.

Analiza statistică a rezultatelor a fost realizată cu ajutorul programului de soft Statistica 7.0. Datele au fost prezentate ca medie $\pm$ deviația standard (DS) și au fost considerate semnificative statistic la $P < 0,05$.

VI.2 Rezultate și discuții

Studii de solubilitate. Datele de solubilitate raportate în literatura de specialitate, incluzând și un studiu propriu anterior, arată că fluconazolul este foarte puțin solubil în apă (5,551 mg/mL), puțin solubil sau solubil în uleiuri grase, solubil sau ușor solubil în alcool izopropilic, propilenglicol și etanol, (60,614 mg/mL, 103,436 mg/mL respectiv 126,991 mg/mL).

În urma evaluării capacității de dizolvare maxime a uleiurilor esențiale selectate față de fluconazol sub forma solubilității aparente se poate observa că fluconazolul este ușor solubil în uleiul esențial de cuișoare și de oregano, și solubil în uleiul esențial de scorțișoară.

Datorită faptului că fluconazolul a prezentat cea mai mare solubilitate aparentă în aceste uleiuri, ele au fost selectate pentru cuantificarea mai exactă a capacității de dizolvare a fluconazolului. Din analiza datelor de solubilitate obținute pentru cele trei uleiuri esențiale, se constată că uleiul volatil de oregano a prezentat cea mai mare capacitate de dizolvare a FZ ($242,47 \pm 0,91$ mg/mL), fiind urmat de uleiul esențial de cuișoare ($140,56 \pm 0,52$ mg/mL) și de uleiul esențial de scorțișoară ($90,18 \pm 0,73$ mg/mL).

Comparând valorile solubilității fluconazolului în cele două uleiuri grase, se poate constata că miristatul de izopropil a prezentat o capacitate mai mare de dizolvare a substanței medicamentoase decât oleatul de etil.

A fost efectuat și un studiu privind solubilitatea celor doi surfactanți esteri de zaharoză în uleiurile în care fluconazolul a prezentat cei mai mari coeficienți de solubilitate, întrucât se preconiza că aceste uleiuri vor fi componente ale fazei uleioase a formulărilor de microemulsii.

S-a putut observa că lauratul de zaharoză este ușor solubil în toate cele trei uleiuri esențiale testate, iar palmitatul de zaharoză este ușor solubil în ulei esențial de cuișoare și de oregano și solubil în ulei esențial de scorțișoară.

Selectarea componentelor formulărilor

Selectarea fazei uleioase. Uleiul esențial de oregano, uleiul esențial de cuișoare și uleiul esențial de scorțișoară au fost selectate ca și componente ale fazei uleioase pentru dezvoltarea microemulsiilor, deoarece au produs cele mai mari valori ale solubilității fluconazolului.

Dintre cele două uleiuri grase alese pentru screening, miristatul de izopropil a fost selectat ca a doua componentă a fazei uleioase a microemulsiilor, datorită capacității mai mari de dizolvare a fluconazolului.

Cele două lichide lipofile au fost amestecate în raport masic de 1:1, pentru a fi posibilă obținerea unor microemulsii stabile, cu o concentrație adecvată de ulei esențial, la care acesta să poată acționa ca promotor al penetrației percutanate a fluconazolului.

Selectarea surfactantului și a cosurfactantului. Esterii de sucroză selectați ca surfactanți în acest studiu posedă proprietăți farmacologice de interes pentru formulările studiate și anume activitate antimicrobiană și antimicotică pe lângă alte proprietăți ca: *toxicitate scăzută, valoare HLB adecvată, capacitate crescută de solubilizare a substanței medicamentoase și a uleiului*

Alegerea unui cosurfactant pentru formularea microemulsiilor pe bază de esteri de zaharoză a fost determinată de considerentul că, în general, adăugarea cosurfactanților în formularea acestor sisteme microemulsionate este favorabilă, deoarece asigură o reducere suplimentară a tensiunii interfaciale și mărește fluiditatea filmului de surfactant. Astfel, întrucât esterii de zaharoză singuri nu sunt capabili de a reduce tensiunea interfacială în măsura în care să favorizeze formarea de microemulsii, a fost necesară utilizarea unui cosurfactant.

Alcoolul izopropilic a fost selectat pentru rolul de cosurfactant, datorită capacității sale mai mari de dizolvare a surfactanților esteri de zaharoză, deși solubilitatea fluconazolului în acest solvent este mai mică decât în alți solvenți polari utilizați frecvent ca și cosurfactanți în formulările de microemulsii (etanol, propilenglicol, tetraglicol, PEG 400).

Construirea diagramelor pseudoternare de fază

În etapa de formulare a unei microemulsii, construirea diagramei pseudoternare de fază este o etapă importantă, deoarece permite determinarea domeniului de concentrații ale componentelor (fază uleioasă, fază apoasă și amestec de surfactant/cosurfactant) corespunzător regiunii de microemulsii.

Figurile 7.1, 7.2 și 7.3 prezintă diagramele pseudoternare de fază ale sistemelor (ulei esențial de scorțișoară/IPM)-(D1616/IZP)-apă, (ulei esențial de scorțișoară/IPM)-(D1216/IZP)-apă, (ulei esențial de oregano/IPM)-(D1616/IZP)-apă și (ulei esențial de oregano/IPM)-(D1216/IZP)-apă pentru raporturile S_{mix} 1:1,5 și 1:2, precum și a sistemului (ulei esențial de cuișoare/IPM)-(D1616/IZP)-apă pentru raportul S_{mix} 1:2. În diagrame este marcată doar regiunea de microemulsii (zona colorată în negru), restul suprafeței diagramei corespunzând regiunii de emulsii. Nu a fost posibilă construirea diagramelor ternare de fază pentru sistemele (ulei esențial de cuișoare/IPM)-(D1616/IZP)-apă în care raportul S_{mix} a fost 1:1,5 și (ulei esențial de cuișoare/IPM)-(D1216/IZP)-apă pentru ambele raporturi S_{mix} (1:1,5 și 1:2), deoarece amestecurile de fază uleioasă- S_{mix} au fost opalescente înainte de diluarea cu apă în placa de microtitrare.

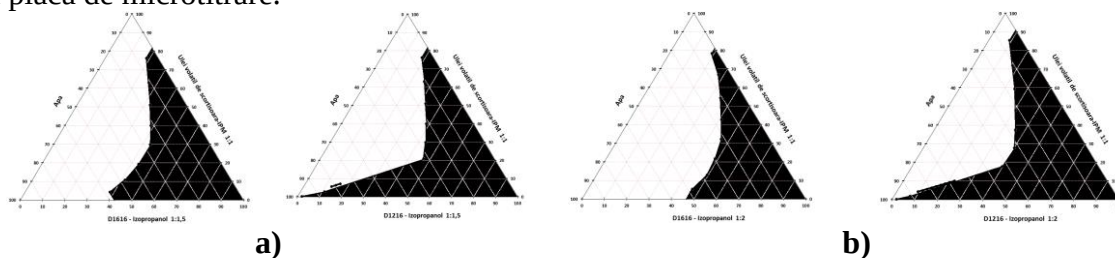


Figura 7.1. Diagramele pseudoternare de fază ale sistemelor (ulei esențial de scorțișoară/IPM)-(D1616/IZP)-apă și (ulei esențial de scorțișoară/IPM)-(D1216/IZP)-apă, pentru raporturile S_{mix} 1:1,5 (a) și 1:2 (b)

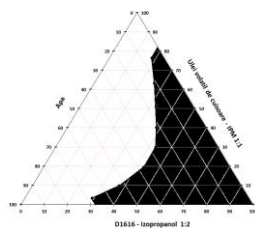


Figura 7.2. Diagrama pseudoternară de fază a sistemului (ulei esențial de cuișoare/IPM)-(D1616/IZP)-apă pentru raportul S_{mix} 1:2

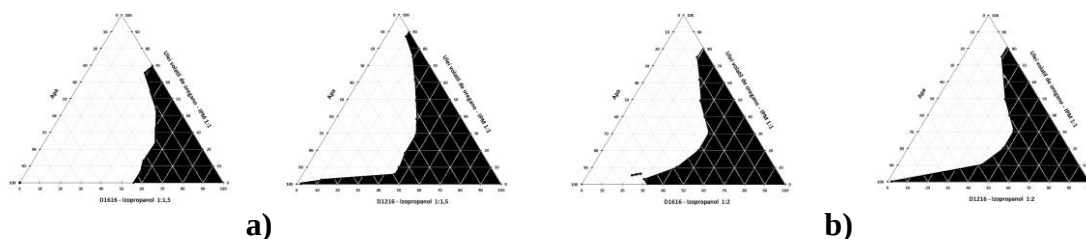


Figura 7.3. Diagramele pseudoternare de fază ale sistemelor (ulei esențial de oregano/IPM)-(D1616/IZP)-apă și (ulei esențial de oregano/IPM)-(D1216/IZP)-apă pentru raporturile S_{mix} 1:1,5 (a) și 1:2 (b)

Comparând mărimea zonelor de microemulsii din diagramele pseudoternare de fază obținute, se poate observa că lauratul de sucroză a produs zone de microemulsii ușor mai mari decât palmitatul de sucroză. Astfel, în seria sistemelor conținând ulei esențial de scorțișoară, regiunile de microemulsii produse de lauratul de zaharoză pentru ambele raporturi S_{mix} (1:1,5 și 1:2) au ocupat 49,16% respectiv 56,49% din suprafața diagramei, în timp ce regiunile de microemulsii produse de palmitatul de zaharoză la aceleași raporturi S_{mix} au fost mai mici (43,49% respectiv 35,94%). Similar, în seria sistemelor conținând ulei esențial de oregano, D1216 a produs, pentru ambele raporturi S_{mix} , zone de microemulsii mai mari (45,32% respectiv 45,12%) decât D1616 (28,44% respectiv 42,39%).

Pe baza observațiilor prezentate mai sus, formulările studiate au fost selectate din regiunile de microemulsii L/H ale diagramelor pseudoternare de fază construite pentru următoarele sisteme:

- (ulei esențial de scorțișoară/IPM)-(D1616/IZP)-apă, în care raportul S_{mix} 1:1,5;
- (ulei esențial de scorțișoară/IPM)-(D1216/IZP)-apă, în care raportul S_{mix} 1:2;
- (ulei esențial de oregano/IPM)-(D1616/IZP)-apă, în care raportul S_{mix} 1:2;
- (ulei esențial de oregano/IPM)-(D1216/IZP)-apă, în care raportul S_{mix} 1:1,5;
- (ulei esențial de cuișoare/IPM)-(D1616/IZP)-apă, în care raportul S_{mix} 1:2.

În diagramele pseudoternare de fază obținute pentru aceste sisteme, regiunea de microemulsii L/H a ocupat cele mai mari suprafețe.

Formularea microemulsiilor L/H și a microemulsiilor-gel pe bază de uleiuri esențiale și esteri de zaharoză, conținând fluconazol

Din fiecare diagramă pseudoternară de fază construită pentru fiecare dintre cele cinci sisteme ternare enumerate mai sus, au fost selectate câte două formulări conținând 6% sau 10% fază uleioasă internă, 45% S_{mix} și 49% sau 45% apă. S-a considerat că selectarea celor 10 formulări va permite studiul efectului componentelor (în special al uleiului esențial și al surfactantului) asupra caracteristicilor microemulsiei.

Caracterizarea microemulsiilor L/H cu fluconazol, pe bază de uleiuri esențiale și esteri de zaharoză

La examinarea macroscopică, microemulsiile studiate s-au prezentat ca sisteme omogene, fluide, transparente, incolor sau slab gălbui, cu miros caracteristic componentelor puternic odorante (ulei esențial și acid acetic). Eventuala colorație a fost datorată uleiului esențial și palmitatului de zaharoză din compoziție.

Rezultatele evaluării caracteristicilor fizice ale microemulsiilor cu fluconazol experimentale sunt prezentate în tabelul 2.

Pentru cele 10 formulări de microemulsii s-au obținut indici de polidispersie, PDI , cu valori cuprinse între 0,129 și 0,363 precum și raze hidrodinamice, r_h (prin intensitate, I) relativ scăzute, având valori cuprinse între 9,9 și 19,2 nm. Cu cât PDI este mai mic, cu atât sistemul este mai stabil. De asemenea, datorită valorilor mici ale diametrului mediu al picăturilor în toate sistemele de microemulsii studiate, se poate afirma că suprafața lor specifică este mare; prin urmare, se obține un contact mai bun între picăturile de ulei și membrană/piele, rezultând un gradient de concentrație crescut și o permeabilitate îmbunătățită a fluconazolului.

Valorile potențialului zeta măsurate pentru cele 10 microemulsii experimentale au fost cuprinse între +0,05 și +1,05 mV (tabelul 2). Aceste rezultate indică formarea unor microemulsii cu o densitate de sarcină electrică apropiată de zero.

Viscozitatea tuturor sistemelor analizate nu s-a modificat cu schimbarea tensiunii de forfecare, confirmând caracterul newtonian al formulărilor. Pentru toate microemulsiile experimentale, valorile viscozității au fost mici, cuprinse între 4 și 12 mPa·s, ceea ce era de așteptat în cazul acestei forme farmaceutice fluide.

Indicele de refracție este parametrul care arată caracterul izotrop al formulărilor. În cazul tuturor microemulsiilor testate, valorile medii ale indicelui de refracție au fost foarte apropiate, încadrându-se într-un interval îngust de 1,3862-1,3948 (tabelul 2).

pH-ul microemulsiilor cu fluconazol studiate a variat într-un domeniu de valori foarte îngust, cuprins între $3,47 \pm 0,06$ și $3,72 \pm 0,03$ (tabelul 2), cu diferențe nesemnificative între formulări, fiind datorat prezenței acidului acetic 2% în faza apoasă a sistemelor.

Tabel 2. Diametrul mediu al picăturii, indicele de polidispersie, viscozitatea, indicele de refracție, potențialul zeta și pH-ul microemulsiilor experimentale cu fluconazol

Cod formulare	Diametrul mediu al picăturii (nm)	Indice de polidispersie	Viscozitate (mPa·s)	Indice de refracție	Potențial zeta (mV)	pH
ME-FZ-D1616-SCR 6%	$13,00 \pm 0,72$	0,197	$6,67 \pm 0,61$	$1,3883 \pm 0,02$	$0,15 \pm 0,08$	$3,60 \pm 0,08$
ME-FZ-D1616-SCR 10%	$13,27 \pm 1,08$	0,353	$6,67 \pm 0,32$	$1,3935 \pm 0,01$	$0,87 \pm 0,03$	$3,53 \pm 0,02$
ME-FZ-D1216-SCR 6%	$9,88 \pm 0,84$	0,236	$8,0 \pm 0,95$	$1,3862 \pm 0,04$	$0,05 \pm 0,11$	$3,60 \pm 0,01$
ME-FZ-D1216-SCR 10%	$14,18 \pm 1,28$	0,231	$12,0 \pm 0,64$	$1,3924 \pm 0,03$	$0,10 \pm 0,07$	$3,64 \pm 0,03$
ME-FZ-D1616-ORG 6%	$11,26 \pm 0,73$	0,277	$4,0 \pm 0,18$	$1,3869 \pm 0,02$	$1,05 \pm 0,15$	$3,60 \pm 0,02$
ME-FZ-D1616-ORG 10%	$19,16 \pm 0,91$	0,129	$4,0 \pm 0,81$	$1,3935 \pm 0,05$	$0,17 \pm 0,05$	$3,56 \pm 0,03$
ME-FZ-D1216-ORG 6%	$11,45 \pm 1,27$	0,307	$8,0 \pm 1,12$	$1,3882 \pm 0,03$	$1,04 \pm 0,12$	$3,63 \pm 0,05$
ME-FZ-D1216-ORG 10%	$18,20 \pm 1,02$	0,171	$12,0 \pm 1,05$	$1,3948 \pm 0,01$	$0,43 \pm 0,08$	$3,72 \pm 0,03$
ME-FZ-D1616-CUI 6%	$12,89 \pm 0,61$	0,363	$12,0 \pm 1,16$	$1,3863 \pm 0,02$	$0,67 \pm 0,09$	$3,47 \pm 0,06$
ME-FZ-D1616-CUI 10%	$14,26 \pm 0,44$	0,221	$12,0 \pm 0,53$	$1,3919 \pm 0,07$	$0,17 \pm 0,16$	$3,52 \pm 0,04$

Controlul calității microemulsiilor gelificate cu chitosan, pe bază de uleiuri esențiale și esteri de zaharoză, conținând fluconazol

Examenul caracterelor macroscopice

Toate microemulsiile-gel experimentale cu 2% fluconazol, au fost omogene, translucide, transparente, gălbui (figura 8), cu miros specific componentelor odorante (uleiul volatil și acidul acetic), corespunzând cerințelor oficiale referitoare la caracteristicile vizuale, olfactive și tactile.



Figura 8. Microemulsiile gelificate cu chitosan, conținând 2% fluconazol, pe bază de ulei esențial de oregano și palmitat sau laurat de zaharoză (a), ulei esențial de scorțișoară și palmitat sau laurat de zaharoză (b) și ulei esențial de cuișoare și palmitat de zaharoză (c)

Determinarea conținutului în fluconazol și a pH-ului microemulsiilor-gel experimentale. Conținutul în fluconazol al microemulsiilor-gel a fost cuprins între $97,55 \pm 0,48\%$ și $102,05 \pm 0,67\%$, valorile încadrându-se în limitele prevăzute de FR X la monografia *Unguenta* (alineatul Dozare).

Toate formulările de microemulsii-gel experimentale cu 2% fluconazol au prezentat pH slab acid, cuprins între $4,50 \pm 0,017$ și $4,63 \pm 0,025$, cu diferențe nesemnificative între valori.

Analiza reologică a microemulsiilor gelificate cu chitosan, pe bază de uleiuri esențiale și esteri de zaharoză, conținând 2% fluconazol

a) Testul viscozimetrie (de curgere în stare staționară)

Dependența liniară a tensiunii de forfecare (τ) de viteza de deformare ($\dot{\gamma}$) și scăderea viscozității (η) cu creșterea vitezei de deformare, indică faptul că toate microemulsiile-gel studiate sunt corpuri newtoniene, cu caracter pseudoplastic.

Toate microemulsiile experimentale gelificate cu chitosan au prezentat și o ușoară tixotropie, mai pronunțată în cazul formulării *MEGEL-FZ-D1616-ORG 6%* și al formulărilor cu ulei esențial de scorțișoară cu 10% fază uleioasă.

Curgerea pseudoplastic-tixotropă a microemulsiilor gelificate experimentale a fost descrisă matematic cu mare acuratețe atât de modelul „legea putere” ($R > 0,99$), cât și de modelul Casson ($R > 0,96$). Ca urmare, se poate sugera faptul că mecanismul de curgere al microemulsiilor gelificate a fost similar, deși au existat diferențe între formulări privind gradul de tixotropie.

Modelul matematic Herschel-Bulkley a descris cu acuratețe variația viscozității sistemelor în funcție de viteza de forfecare, fapt relevat de valorile apropiate de 1 ale coeficientului de corelare (0,9644-0,9931). Viscositatea microemulsiilor-gel experimentale a fost cuprinsă între 0,437-0,541 Pa·s, încadrându-se în domeniul de valori specific preparatelor semisolide.

Analiza regresională a datelor testului viscozimetrie a permis calcularea a doi parametri reologici și anume indicii de consistență K și indicii de curgere n , care pot fi utilizați pentru stabilirea influenței variabilelor de formulare asupra proprietăților reologice ale microemulsiilor experimentale cu fluconazol gelificate cu chitosan.

Valorile indicelui de consistență (K) s-au încadrat în intervalul 2,861-4,440.

Valorile indicelui de curgere n , mai mici decât 1 în toate cazurile, au confirmat pseudoplasticitatea sistemelor studiate. Totuși, caracterul pseudoplastic a fost moderat ($n > 0,5$), cu diferențe mici între formulări, valorile n variind într-un domeniu îngust (0,551-0,606).

b) Determinarea capacității de întindere

Pentru toate formulările studiate se constată că:

- etalarea pe suprafață a crescut progresiv, cu creșterea greutății aplicate;
- alura curbelor extensiometrice obținute a fost similară;
- au prezentat o bună capacitate de etalare, demonstrată de valorile extensiometrice mari obținute.

Studiul de eliberare și permeație cutanată in vitro

Evaluarea cedării in vitro a fluconazolului prin membrană sintetică din microemulsiile pe bază de uleiuri esențiale și esteri de zaharoză, gelificate cu chitosan

Din toate formulările testate s-au eliberat cantități mari de fluconazol (89,88-99,37%). Mai precis, cele mai mari procente cumulative de substanță medicamentoasă eliberată după 5 respectiv 6 ore de testare (99,19% respectiv 99,37%) s-au obținut pentru formulările pe bază de ulei volatil de oregano și palmitat de zaharoză.

Profilele cinetice de permeație a FZ prin membrana sintetică din toate formulărilor prezintă alură similară profilelor de eliberare, așa cum era de așteptat. S-a constatat că transferul FZ prin membrană a fost cel mai intens din microemulsia-gel pe bază de ulei esențial de oregano și laurat de zaharoză, cu 6% fază uleioasă, care a produs cea mai mare valoare a fluxului în stare staționară ($975,89 \pm 8,60 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$), deși nu a eliberat cea mai mare cantitate cumulativă de substanță medicamentoasă. De asemenea, valori mari ale fluxului prin membrană (cuprinse între $712,42 \pm 9,94 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ și $808,51 \pm 2,80 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$) au produs trei dintre formulările pe bază de palmitat de zaharoză și anume *MEGEL-FZ-D1616-SCR 10%*, *MEGEL-FZ-D1616-ORG 10%* și *MEGEL-FZ-D1616-ORG 6%*.

Viteza de eliberare a FZ din formulările de microemulsii-gel studiate au fost de 2,7-4,4 ori mai mare decât fluxul în stare staționară, ceea ce sugerează faptul că procesul de eliberare a substanței active din vehicul nu a fost dependent de transferul acesteia prin membrană.

Studiul permeației in vitro a fluconazolului prin piele excizată de pe urechea de porc din microemulsiile gelificate cu chitosan, pe bază de uleiuri esențiale și esteri de zaharoză

Procente cumulative semnificativ mai mari de fluconazol au fost eliberate din majoritatea sistemelor pe bază de ulei esențial de oregano și scorțișoară ($P < 0,05$) comparativ cu formulările pe bază de ulei esențial de cuișoare: 91,10% (MEGEL-FZ-D1216-ORG 10%), 87,80% (MEGEL-FZ-D1616-ORG 10%), 87,06% (MEGEL-FZ-D1216-SCR 10%), 83,03% (MEGEL-FZ-D1216-ORG 6%), 77,61% (MEGEL-FZ-D1216-SCR 6%) și 72,27% (MEGEL-FZ-D1616-SCR 10%) versus 59,26% (MEGEL-FZ-D1616-CUI 10%) și 48,06% (MEGEL-FZ-D1616-CUI 6%). Procentul cumulativ maxim de FZ eliberat de formulările pe bază de palmitat de zaharoză, conținând 6% fază uleioasă, MEGEL-FZ-D1616-ORG 6% și MEGEL-FZ-D1616-SCR 6%, a fost apropiat respectiv mai mic decât cel produs de microemulsiile conținând ulei esențial de cuișoare și același surfactant (57,93% respectiv 37,81%).

Prin compararea profilelor dermato-farmacocinetice ale FZ din microemulsiile-gel prin piele porcină și a valorilor fluxului în stare staționară calculate pe baza datelor acestui studiu *in vitro*, se poate observa că din trei formulări conținând 10% fază uleioasă și anume MEGEL-FZ-D1616-SCR 10%, MEGEL-FZ-D1216-SCR 10% și MEGEL-FZ-D1616-ORG 10% au fost transferate prin piele cele mai mari cantități de FZ. Spre deosebire de acestea, toate formulările pe bază de palmitat de zaharoză și 6% fază uleioasă (MEGEL-FZ-D1616-CUI 6%, MEGEL-FZ-D1616-ORG 6% și MEGEL-FZ-D1616-SCR 6%) au produs cele mai mici valori ale fluxului transcutanat. Viteza de permeație a fluconazolului din microemulsiile-gel pe bază de laurat de zaharoză și ulei esențial de oregano a fost ușor mai scăzută decât cea din formularea pe bază de palmitat de zaharoză, MEGEL-FZ-D1616-ORG 10%. Similar eliberării *in vitro* prin membrana sintetică, viteza de eliberare a FZ din formulările studiate la suprafața pielii a fost de aproximativ 4,5-5,2 ori mai mare decât viteza de permeație a acestuia prin piele, evidențiind faptul că cedarea substanței active din vehicul a fost independentă de permeația percutanată.

Profilurile permeației *in vitro* a FZ prin piele porcină din microemulsiile-gel experimentale au fost evaluate cinetic, prin fitarea datelor experimentale în diferite ecuații cinetice.

Cele mai mari valori ale coeficientului de determinare au fost obținute pentru modelul Korsmeyer-Peppas în cazul tuturor formulărilor analizate, deci acest model a descris cel mai bine eliberarea *in vitro* a FZ din formulările respective, confirmându-se implicarea mai multor fenomene în acest proces. În plus, valorile exponentului de difuzie (n) au fost cuprinse fie între 0,5926-0,8723 ($0,45 < n < 0,89$) pentru formulările MEGEL-FZ-D1616-SCR 6%, MEGEL-FZ-D1216-SCR 10%, MEGEL-FZ-D1616-ORG 6%, MEGEL-FZ-D1616-ORG 10%, MEGEL-FZ-D1216-ORG 6% și MEGEL-FZ-D1216-ORG 10%, fie între 1,0058-1,1351 ($n > 0,89$) în cazul formulărilor MEGEL-FZ-D1616-SCR 10%, MEGEL-FZ-D1216-SCR 6%, MEGEL-FZ-D1616-CUI 6% și MEGEL-FZ-D1616-CUI 10%, indicând mecanismul de transport non-Fickian respectiv super cazul II de transport.

Evaluarea activității antifungice in vitro a microemulsiilor-gel experimentale

Toate preparatele evaluate, cu sau fără fluconazol, au inhibat creșterea fungică, activitatea antimicotică crescând cu creșterea concentrației de ulei esențial în formulare, atât în cazul preparatelor de control, cât și în cazul preparatelor medicamentoase. Se evidențiază, de asemenea, sinergismul în ceea ce privește efectul antifungic dintre uleiul esențial și fluconazol, diametrul zonei de inhibare a probelor fiind de aproximativ 1,4 – 2,1 ori mai mare decât cea a preparatului de control.

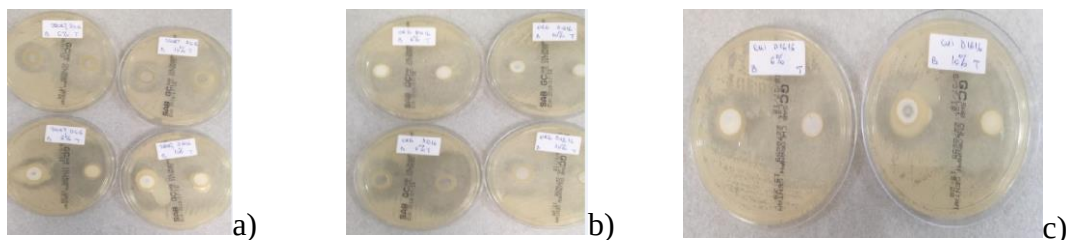


Figura 9. Inhibarea creșterii fungice a *Candida albicans* în prezența microemulsiilor gel experimentale cu 2% fluconazol

Rezultatele privind activitatea antifungică a MEGEL de control, pe bază de uleiuri volatile și esteri de zaharoză, sunt încurajatoare întrucât sugerează oportunitatea utilizării acestora ca alternativă eficientă în managementul clinic al candidozelor cutaneo-mucoase rezistente la substanțele medicamentoase antifungice utilizate curent.

VI.3 Concluzii

În acest studiu s-a investigat posibilitatea asocierii unor uleiuri esențiale (ulei de scorțișoară, ulei de oregano și ulei de cuișoare) cu esteri de zaharoză, alcool izopropilic și chitosan, ca fază uleioasă, surfactanți, cosurfactant și respectiv agent gelifiant, în scopul obținerii unor microemulsii gelificate biocompatibile conținând 2% fluconazol.

Se poate concluziona că aceste microemulsii-gel bicompatibile, pe bază de ulei esențial și surfactant natural (palmitat sau laurat de sucroză) și gelificate cu chitosan, ar putea fi utilizate ca vehicule pentru administrarea topică simultană a ambelor grupe de compuși biologic activi (uleiul esențial și fluconazolul). Însă, sunt necesare testări suplimentare avansate, preclinice și clinice privind microstructura sistemelor emulsionate, structura gelică, solubilitatea componentelor în fazele lichide ale sistemului, profilul textural, stabilitatea, inocuitatea, disponibilitatea cutanată și eficacitatea terapeutică *in vitro* și *in vivo* a componentelor active. Dacă studiile se vor finaliza cu succes, formulările farmaceutice optimizate propuse vor putea fi implementate în practica terapeutică pentru a oferi beneficiile efectelor terapeutice simultane ale componentelor active (naturale și de sinteză) asociate cu proprietățile favorabile ale chitosanului și esterilor de zaharoză la aplicare dermică.

CAPITOLUL VII

VII. DEZVOLTAREA ȘI VALIDAREA UNEI METODE SPECTROFOTOMETRICE ÎN VIS PENTRU DOZAREA FLUCONAZOLULUI ÎN PREZENȚA UNOR ULEIURI ESENȚIALE

Obiectivul prezentului studiu a fost elaborarea și validarea unei metode spectrofotometrice în VIS, sensibilă și rapidă, pentru analiza cantitativă a fluconazolului în prezența a trei uleiuri esențiale (de scorțișoară, de oregano și de cuișoare), care să poată fi utilizată pentru determinarea solubilității fluconazolului în aceste uleiuri volatile.

VII.1 Metode

Prepararea soluțiilor standard

Pentru a stabili condițiile optime de lucru s-au preparat următoarele soluții:

- soluția folosită pentru complexarea fluconazolului, obținută prin amestecarea unei soluții apoase de clorură cuprică 53 mg/mL cu acetonitril în raport de 1:9 (codificată ACN-Cu(II)-H₂O);
- soluția utilizată pentru obținerea dreptelor de etalonare a fluconazolului în uleiurile esențiale testate, obținută prin dizolvarea fluconazolului în concentrație de 110

mg/mL, 95 mg/mL și 85 mg/mL în ulei esențial de oregano, de cuișoare și respectiv de scorțișoară;

- soluția conținând complexul Cu(II)-fluconazol, obținută prin adăugarea a 0,1 mL de soluție fluconazol de concentrație cunoscută în ulei esențial (de oregano, de scorțișoară sau de cuișoare) la 4 mL soluție ACN-Cu(II)-H₂O.
- soluțiile utilizate ca standard în toate măsurătorile spectrofotometrice efectuate; aceste soluții standard au fost preparate prin dizolvarea a 0,1 mL ulei esențial (de oregano, de scorțișoară sau de cuișoare) în 4 mL soluție ACN-Cu(II)-H₂O.

Procedura recomandată pentru determinarea spectrofotometrică a fluconazolului în prezența uleiurilor volatile (stabilirea lungimii de undă de măsurare). Pentru stabilirea lungimii de undă de măsurare au fost preparate soluții etalon prin dizolvarea fluconazolului în concentrație de 110 mg/mL, 95 mg/mL și 85 mg/mL în ulei esențial de oregano, de cuișoare și respectiv de scorțișoară. Apoi, din aceste soluții s-au prelevat 0,1 mL și s-au amestecat cu 4 mL soluție ACN-Cu(II)-H₂O. S-a înregistrat spectrul de absorbție după 15 minute de la preparare, în intervalul 600–900 nm, față de o soluție standard preparată în aceleași condiții, în cuva de 1 cm.

Validarea metodei spectrofotometrice

Metoda propusă a fost validată prin evaluarea preciziei, liniarității, acurateței și robusteții.

Precizia metodei propuse s-a evaluat prin repetarea determinărilor (n=3) pentru șase concentrații diferite ale soluțiilor de fluconazol în fiecare ulei esențial și anume:

- 0,268 mg/mL, 0,537 mg/mL, 1,072 mg/mL, 1,608 mg/mL, 2,144 mg/mL și 2,680 mg/mL pentru soluțiile de fluconazol în ulei esențial de oregano;
- 0,2073 mg/mL, 0,4146 mg/mL, 0,8293 mg/mL, 1,2439 mg/mL, 1,6585 mg/mL și 2,073 mg/mL pentru soluțiile de fluconazol în ulei esențial de scorțișoară;
- 0,2317 mg/mL, 0,4634 mg/mL, 0,9268 mg/mL, 1,39 mg/mL, 1,854 mg/mL și 2,317 mg/mL pentru soluțiile de fluconazol dizolvat în ulei esențial de cuișoare.

Aceste valori de concentrații se referă la amestecul de 4,1 mL obținut prin adăugarea a 0,1 mL soluție de fluconazol în ulei volatil la 4 mL soluție ACN-Cu(II)-H₂O.

Cele trei probe preparate pentru fiecare concentrație au fost analizate pe parcursul unei zile (*intra-day*).

Liniaritatea metodei propuse a fost investigată prin citirea absorbanței (n=3) pentru cele șase concentrații diferite ale soluțiilor de fluconazol în fiecare ulei esențial, concentrații enumerate mai sus. Valoarea medie a absorbanțelor obținute pentru fiecare concentrație s-a reprezentat grafic în funcție de concentrația fluconazolului în proba evaluată. Ecuațiile dreptelor de etalonare obținute pentru fiecare serie de soluții au fost evaluate din punct de vedere statistic și liniaritatea s-a stabilit pe baza coeficientului de determinare.

Exactitatea (acuratețea) metodei s-a estimat prin metoda adăugării standard (metoda îmbogățirii). Astfel dintr-o soluție de fluconazol în ulei esențial de concentrație cunoscută (87,9 mg/mL în ulei esențial de oregano, 68,00 mg/mL în ulei esențial de scorțișoară și 75,98 mg/mL în ulei esențial de cuișoare) s-au prelevat 0,05 mL, la care s-au adăugat 0,05 mL soluție de următoarele concentrații:

- 0 mg/mL, 29,3 mg/mL, 58,6 mg/mL, 87,9 mg/mL și 117,2 mg/mL fluconazol în ulei esențial de oregano;
- 0 mg/mL, 22,67 mg/mL, 45,34 mg/mL, 68,00 mg/mL și 90,67 mg/mL fluconazol în ulei esențial de scorțișoară;
- 0 mg/mL, 25,32 mg/mL, 50,64 mg/mL, 75,96 mg/mL și 101,28 mg/mL fluconazol în ulei esențial de cuișoare.

Soluția rezultată în volum de 0,1 mL s-a amestecat cu 4 mL soluție ACN-Cu(II)-H₂O, apoi s-a determinat absorbanta soluției finale. Fiecare nivel a fost repetat de 3 ori.

Valorile de absorbantă ale probelor (soluțiile finale conținând complexul FZ-Cu(II) în uleiul esențial) au fost reprezentate grafic în funcție de concentrație, obținându-se dreptele

aferente. Concentrația nominală a probelor (în mg/mL) a fost dată de raportul dintre interceptul la axa x și panta dreptei de regresie.

Robustețea metodei a fost evaluată prin analiza unei soluții de fluconazol de concentrație cunoscută în fiecare ulei esențial (44 mg/mL în ulei esențial de oregano, 34 mg/mL în ulei esențial de scorțișoară și 38 mg/mL în ulei esențial de cuișoare). În scopul verificării robusteții metodei, s-a variat concentrația de Cu(II) în soluția ACN-Cu(II)-H₂O folosită pentru complexarea FZ, după cum urmează: 53 mg/mL, 52 mg/mL, 51 mg/mL, 50 mg/mL și 49 mg/mL.

VII.2 Rezultate și discuții

Procedura recomandată pentru determinarea spectrofotometrică a fluconazolului în prezența uleiurilor volatile (stabilirea lungimii de undă de măsurare)

Obiectivul acestui studiu a fost complexarea fluconazolului cu ionul Cu(II) în vederea obținerii unui compus colorat, astfel încât maximum de absorbție al complexului să nu coincidă cu cel al fluconazolului înregistrat în domeniul UV (FZ este o substanță albă), ci să se situeze în domeniul vizibil, cu mici diferențe dependent de concentrația și intensitatea culorii complexului format.

Prin complexarea fluconazolului cu Cu(II), maximele sale de absorbție se deplasează spre lungimi de undă aparținând domeniului vizibil (700-800 nm), ceea ce permite cuantificarea sa în prezența uleiurilor volatile, deoarece se evită suprapunerea spectrelor pe domeniul de lungimi de undă la care s-a observat că absorb și compușii uleiurilor volatile.

Validarea metodei spectrofotometrice

Precizia metodei s-a determinat prin măsurarea concentrației de fluconazol în fiecare dintre cele trei uleiuri esențiale pe șase nivele de concentrație. Se observă că recuperarea (%) și deviația relativă standard s-au încadrat în următoarele intervale de valori: 96,22-109,25% și respectiv 0,1801-1,5403% pentru probele în ulei esențial de oregano; 98,06-100,97% și respectiv 0,1881-0,9398% pentru probele în ulei esențial de scorțișoară; 99,02-102,27% și respectiv 0,0024-0,0087% pentru probele în ulei esențial de cuișoare.

Liniaritatea. Dreptele de etalonare s-au obținut prin reprezentarea grafică a concentrației FZ *versus* valorile medii de absorbantă corespunzătoare; legea Lambert-Beer a fost respectată pe următoarele domenii de concentrație: 0,268-2,68 mg/mL în cazul uleiului esențial de oregano, 0,2073-2,073 mg/mL în cazul uleiului esențial de scorțișoară și 0,2317-2,317 mg/mL în cazul uleiului esențial de cuișoare (figura 10).

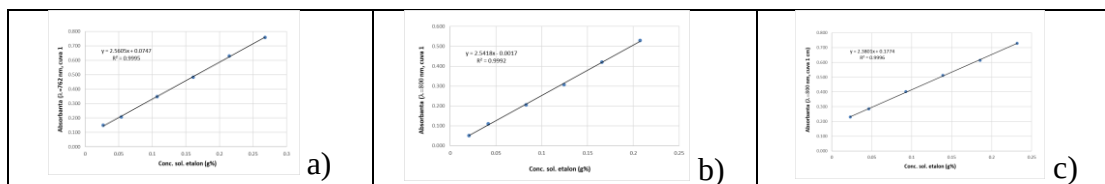


Figura 10. Curbele de etalonare pentru fluconazol în ulei esențial de oregano (a), în ulei esențial de scorțișoară (b) și în ulei esențial de cuișoare (c)

Analiza regresională a datelor de calibrare a fost efectuată prin fitarea acestora în ecuația $y = ax + b$, în care y este absorbanta la lungimea de undă maximă; x este concentrația în g/100 mL; a este panta dreptei și b este interceptul. Din figura 10 se observă că valorile coeficientului de determinare, R^2 , ale celor trei drepte de etalonare au fost mai mari de 0,999 (0,9995 pentru dreapta de etalonare în uleiul esențial de oregano, 0,9992 pentru dreapta de etalonare în uleiul esențial de scorțișoară și 0,9996 pentru dreapta de etalonare în uleiul esențial de cuișoare). Valorile mari ale coeficienților de determinare pentru toate cele trei uleiuri indică o liniaritate excelentă.

Acuratețea (exactitatea). Metoda adărilor standard este una dintre metodele folosite la evaluarea acurateții. Această metodă constă în creșterea concentrației unei probe cu o cantitate cunoscută folosind soluții de concentrații crescătoare. S-a evidențiază faptul că liniaritatea dreptei de regresie obținută cu metoda adărilor standard a fost bună.

Robustețea s-a testat prin efectuarea deliberată de mici variații în condițiile experimentului. Rezultatele de recuperare medie și de deviație relativă standard au fost: 99,276% și respectiv 0,478 pentru uleiul esențial de oregano, 97,952% și respectiv 0,228 pentru uleiul esențial de scorțișoară și 101,637% și respectiv 0,508 pentru uleiul esențial de cuișoare. Valorile medii ale procentului de regăsire (recuperare) fiind apropiate de 100% în condițiile modificării concentrației ionului cupric, indică robustețea metodei pentru toate cele trei uleiuri esențiale.

VII.3 Concluzii

Metoda propusă pentru determinarea solubilității fluconazolului în ulei esențial de oregano, ulei esențial de scorțișoară și ulei esențial de cuișoare este o metodă spectrofotometrică, simplă și la îndemână. Prezintă avantajul că folosește solvenți comuni, precum acetonitrilul. De asemenea, prin folosirea ei se evită erorile ce ar putea să apară din cauza compoziției foarte complexe a uleiurilor volatile în care se dorește determinarea solubilității. În viitor, se pot efectua noi studii în vederea extinderii utilizării acestei metode și pentru alte uleiuri esențiale în care se dorește determinarea solubilității fluconazolului.

CONCLUZII GENERALE

Cercetările ale căror rezultate au fost raportate în teza de doctorat au urmărit fundametarea științifică a utilizării unor sisteme farmaceutice semisolidе biocompatibile conținând fluconazol ca potențiale medicamente sigure și eficiente pentru tratamentul topic al infecțiilor fungice. În acest scop, studiile au fost direcționate spre formularea, prepararea și evaluarea unor noi vehicule semisolidе de tip hidrogel pentru administrarea topică a fluconazolului, utilizând substanțe auxiliare biocompatibile, biodegradabile, netoxice, neiritante și cu activitate antifungică proprie.

Obiectivele generale ale tezei de doctorat au fost următoarele:

- formularea unor preparate farmaceutice semisolidе hidrofилe cu fluconazol, lipsite de toxicitate și bine tolerate, deci cu siguranță la utilizare, prin selectarea unor excipienți din grupul produselor naturale, care s-au dovedit a fi biocompatibile, biodegradabile, netoxice, neiritante și bine tolerate de piele și mucoase;
- creșterea penetrației percutanate a fluconazolului din noile formulări, implicit a biodisponibilității și eficacității terapeutice, prin abordarea a două metode: 1) utilizarea unor promotori de penetrație din grupul surfactanților neionici și al uleiurilor esențiale, ca metodă chimică de mărire a permeabilității pielii; 2) formularea de microemulsii ulei-în-apă, care au fost utilizate drept carrier al substanței medicamentoase;
- evidențierea efectului sinergic al fluconazolului cu excipienții naturali selectați (agentul gelifiant, surfactanții neionici și uleiurile esențiale), a căror activitate antifungică a fost deja demonstrată științific.

Partea generală este structurată în trei capitole, dedicate analizei stadiului actual al cunoașterii în domeniul tehnologiei farmaceutice privind potențialul câtorva produse naturale ca excipienți farmaceutici în noi formulări topice semisolidе biocompatibile. Astfel, sunt prezentate cunoștințele actuale referitoare la proprietățile fizico-chimice, farmaceutico-tehnologice și biologice ale chitosanului ca agent gelifiant, ale esterilor de zaharoză ca surfactanți/emulgatori și acceleratori de penetrare, precum și ale uleiurilor esențiale ca promotori ai penetrației percutanate a substanțelor medicamentoase. Totodată, în această parte,

În capitolul al doilea, sunt trecute în revistă caracteristicile hidrogelurilor pe bază de chitosan și ale microemulsiilor și microemulsiilor-gel pe bază de surfactanți naturali și biopolimeri, ca sisteme farmaceutice semisolide biocompatibile moderne pentru eliberarea topică a substanțelor medicamentoase. Ultimul capitol al părții generale este dedicat motivării alegerii fluconazolului ca substanță medicamentoasă model în studiile experimentale efectuate.

Contribuțiile proprii au fost structurate în cinci capitole din care se pot formula următoarele concluzii generale:

➤ O primă direcție de cercetare a constituit-o dezvoltarea și evaluarea unor sisteme semisolide eficiente de transport și eliberare, pe bază de chitosan în diferite concentrații și conținând diferiți cosolvenți (glicerol, propilenglicol, tetraglicol și polietilenglicol 400), care să fie capabile să încorporeze și să dizolve un număr cât mai mare de substanțe medicamentoase insolubile în apă. Astfel, a fost evaluat efectul tipului și concentrației unor cosolvenți (glicerol, propilenglicol, polietilenglicol 400 și tetraglicol) asupra caracteristicilor fizice și mecanice ale unor hidrogeluri pe bază de 3%, 3,5% și 4% chitosan, ca potențiale vehicule pentru aplicarea topică a unor substanțe medicamentoase greu solubile în apă.

Rezultatele evaluării farmacotehnice a hidrogelurilor pe bază de chitosan atestă faptul că sistemele dezvoltate corespund recomandărilor compendiale specifice formelor farmaceutice bioadezive.

Din analiza reologică a celor 22 hidrogeluri pe bază de chitosan studiate s-a observat că tipul și concentrația cosolventului au avut influență asupra comportamentului la curgere, viscozității, consistenței și capacității de etalare a sistemelor. Pe baza rezultatelor obținute în cadrul acestei etape de preformulare a studiului experimental, considerăm că toate hidrogelurile pe bază de chitosan cercetate pot fi utilizate ca vehicule (baze de unguent) pentru substanțe medicamentoase greu solubile în apă, destinate aplicării dermice. În contextul posibilei utilizări a sistemelor dezvoltate sunt necesare studii suplimentare *in vitro* și *in vivo* de evaluare a eliberării substanțelor medicamentoase și a toleranței.

➤ Cea de-a doua direcție a cercetărilor a constat în formularea și evaluarea unor noi hidrogeluri pentru administrarea topică, sigură și eficientă a fluconazolului. În acest scop, fluconazolul în concentrație de 2% a fost încorporat într-un vehicul hidrogel inovator, care a conținut doi biopolimeri hidrofilii ca agenți formatori de gel (chitosan și hidroxipropilmetilceluloză), cosolvent (tetraglicol asociat sau nu cu alcool izopropilic) și promotori naturali de penetrare (esteri de zaharoză sau uleiuri esențiale).

Selectarea cosolvenților și a promotorilor de penetrație a fost efectuată pe baza unor studii de solubilitate. Au fost preparate și evaluate 6 formulări de hidrogeluri conținând laurat de zaharoză sau palmitat de sucroză în concentrații variabile (0,5-5%) și 4 formulări de hidrogeluri conținând ulei esențial de scorțișoară sau de cuișoare (3% și 5%); pentru fiecare serie a fost preparată și o formulare de control (fără promotor de penetrare).

Rezultatele testelor de control al calității au demonstrat că toate cele 12 formulări de hidrogeluri au corespuns recomandărilor oficiale în ceea ce privește caracterile macroscopice, conținutul de substanță activă și pH-ul. De asemenea, analiza reologică a relevat comportamentul lor pseudoplastic-tixotrop, precum și viscozitatea și capacitatea de etalare satisfăcătoare.

Testul de disponibilitate *in vitro* a substanței medicamentoase, a evidențiat superioritatea următoarelor formulări: hidrogelurile cu 2,5% și respectiv 5% laurat de sucroză din prima serie, precum și hidrogelurile conținând 5% ulei esențial de scorțișoară sau de cuișoare din a doua serie; aceste formulări au produs cele mai mari valori ale vitezei de transfer și de eliberare a FZ prin membrana sintetică hidrofilă, demonstrându-și astfel performanța. Cu excepția hidrogelului cu 2,5% laurat de sucroză, aceste formulări alături de formularea conținând 0,5% laurat de zaharoză asociat cu 10% alcool izopropilic, s-au evidențiat și la testarea permeației *ex vivo* a fluconazolului din hidrogelurile experimentale prin pielea porcine.

Ținând seama și de rezultatele testării activității antimicotice, s-a concluzionat că hidrogelurile cu 5% laurat de sucroză și hidrogelurile conținând 5% ulei esențial de scorțișoară sau de cuișoare sunt vehicule adecvate pentru eliberarea topică a fluconazolului.

De asemenea, s-a desprins și concluzia că lauratul de zaharoză și cele două uleiuri esențiale au acționat ca promotori de penetrare mai ales în concentrație de 5%, concentrație la care efectul lor sinergic cu fluconazolul a fost mai pronunțat.

S-a demonstrat și faptul că variabilele de formulare (tipul și concentrația esterului de sucroză, prezența cosolventului, compoziția chimică și concentrația uleiului esențial) au influențat proprietățile reologice și mecanice ale sistemelor studiate.

➤ Rezultatele obținute în etapa anterioară au încurajat orientarea cercetărilor spre dezvoltarea unor sisteme farmaceutice în compoziția cărora să se asocieze excipienții naturali (chitosan, laurat și palmitat de zaharoză, ulei esențial de cuișoare și ulei esențial de scorțișoară) care au manifestat *in vitro* efect de mărire a penetrației percutanate a fluconazolului și efect antimicotic sinergic cu acesta. Ca urmare, au fost formulate, preparate și caracterizate 10 microemulsii gelificate biocompatibile conținând 2% fluconazol, uleiuri esențiale (ulei de scorțișoară, ulei de oregano și ulei de cuișoare), esteri de zaharoză, alcool izopropilic și chitosan, ca fază uleioasă, surfactanți, cosurfactant și respectiv agent gelifiant.

Selectarea componentelor microemulsiilor s-a realizat pe baza unor studii de solubilitate a fluconazolului în diferite uleiuri grase și uleiuri esențiale, precum și a studiului diagramelor ternare de fază ale sistemelor formate din fază uleioasă-amestec surfactant/cosurfactant-fază apoasă. A fost studiată solubilitatea fluconazolului în două uleiuri grase de sinteză (miristat de izopropil și oleat de etil) și în nouă uleiuri esențiale (de eucalipt, de lemongrass, de cuișoare, de scorțișoară, de mentă, de lavandă, de fenicul dulce și de oregano), pentru care a fost raportată în literatură activitatea antimicotică proprie. Diagramele pseudoternare de fază au fost construite folosind o metodă relativ nouă, metoda diluției în microplacă, care oferă avantajul economiei de timp și de materiale față de metoda convențională de titrare cu apă.

Cele 10 formulări de microemulsii L/H biocompatibile au fost preparate și caracterizate fizico-chimic privind dimensiunea picăturilor, indicele de polidispersie, indicele de refracție, viscozitatea și pH-ul. Întrucât chitosanul (1,9%) a fost utilizat ca agent gelifiant, în faza apoasă a microemulsiilor s-a adăugat acid acetic în concentrație de 2%. Microemulsiile-gel cu fluconazol au fost supuse aceluiași teste de control al calității ca și hidrogelurile studiate în etapa a doua a cercetărilor experimentale.

Conform rezultatelor acestor teste și ale studiului de permeație *in vitro* prin piele porcină, cele mai performante formulări pentru eliberarea topică a fluconazolului au fost considerate două microemulsii-gel pe bază de ulei esențial de scorțișoară și palmitat sau laurat de zaharoză, precum și o formulare de microemulsie-gel pe bază de ulei esențial de oregano și palmitat de zaharoză, având următoarea compoziție procentuală: 10% amestec de ulei esențial-miristat de izopropil în raport 1:1 ca fază uleioasă, 45% S_{mix} (palmitat de zaharoză-alcool izopropilic 1:1,5, laurat de zaharoză-alcool izopropilic 1:2 respectiv palmitat de zaharoză-alcool izopropilic 1:2) ca surfactant-cosurfactant, 1,9% chitosan ca agent gelifiant și acid acetic 2% ca fază apoasă. Aceste formulări au produs cele mai mari valori ale fluxului și vitezei de eliberare, precum și diametre mari ale zonei de inhibare a creșterii fungice (*Candida albicans* spp.). Efect antifungic mai pronunțat sau similar au prezentat și formulările pe bază de ulei esențial de oregano și laurat de zaharoză, precum și formularea pe bază de ulei esențial de cuișoare și palmitat de zaharoză, conținând 10% fază uleioasă.

Studiile efectuate în această etapă au confirmat intervenția variabilelor de formulare (natura și concentrația uleiului esențial, precum și tipul și concentrația esterului de zaharoză) din compoziția microemulsiilor-gel asupra caracteristicilor lor fizice, reologice și de eliberare *in vitro* a substanței active prin membrana sintetică. De asemenea, aceste variabile de formulare au controlat permeația *in vitro* a fluconazolului prin pielea excizată de pe urechea

de porc. Testul de disponibilitate *ex vivo* a FZ prin piele porcină a relevat, prin valorile parametrilor dermato-farmacocinetici, capacitatea microemulsiilor-gel experimentale de a mări penetrația percutanată a substanței active.

Se poate concluziona că aceste microemulsii-gel bicompatibile, pe bază de ulei esențial și surfactant natural (palmitat sau laurat de sucroză) și gelificate cu chitosan, ar putea fi utilizate ca vehicule versatile pentru administrarea topică simultană și eficientă a ambelor grupe de compuși biologic activi (uleiul esențial și fluconazolul). Însă, complexitatea interacțiunilor dintre diferitele faze ale microemulsiilor impune testări suplimentare avansate, preclinice și clinice privind microstructura sistemelor, structura gelică, solubilitatea componentelor în fazele lichide ale microemulsiei, profilul textural, stabilitatea, inocuitatea, disponibilitatea cutanată și eficacitatea terapeutică *in vitro* și *in vivo* a componentelor active.

➤ În ultima parte a tezei este prezentat studiul referitor la elaborarea și validarea unei metode de analiză prin spectrofotometrie în vizibil pentru dozarea fluconazolului în prezența unor uleiuri esențiale (de scorțișoară, de oregano și de cuișoare), prin formarea unui complex colorat al acestuia cu ionul Cu^{2+} . Din analiza spectrelor complexului fluconazol-Cu(II) în prezența uleiurilor volatile, au fost stabilite lungimile de undă corespunzătoare valorilor maxime de absorbantă ale complexului, necesare pentru validarea metodei. Valorile parametrilor specifici obținute la evaluarea preciziei, liniarității, acurateții și robusteții metodei spectrofotometrice elaborate s-au încadrat în limitele prevăzute de standardele în vigoare. Liniaritatea a fost foarte bună pentru următoarele domenii de concentrație a fluconazolului: 0,268-2,68 mg/mL în cazul uleiului esențial de oregano, 0,2073-2,073 mg/mL în cazul uleiului esențial de scorțișoară și 0,2317-2,317 mg/mL în cazul uleiului esențial de cuișoare.

Contribuțiile proprii

Studiile efectuate în cadrul acestei teze de doctorat se concretizează în următoarele contribuții originale:

- abordarea problematicii utilizării fluconazolului încorporat în noi sisteme farmaceutice semisolide biocompatibile, pe bază de excipienți naturali, pentru administrare topică la pacienții cu infecții fungice;
- dezvoltarea unor sisteme farmaceutice dermice semisolide cu fluconazol, cu eliberare și permeație crescută, în premieră națională, sub formă de:
 3. hidrogeluri pe bază de chitosan/hidroxipropilmetilceluloză conținând fluconazol 2% și esteri de zaharoză (laurat de sucroză și palmitat de sucroză) sau uleiuri esențiale (ulei de scorțișoară și ulei de cuișoare) ca promotori de penetrare;
 4. microemulsii topice biocompatibile gelificate cu chitosan, pe bază de uleiuri volatile și esteri de zaharoză, pentru eliberarea fluconazolului.
- elaborarea și validarea unei metode spectrofotometrice în vizibil pentru dozarea fluconazolului în prezența unor uleiuri esențiale.

Direcții viitoare de cercetare

Rezultatele cercetărilor efectuate în cadrul acestei teze vor putea facilita optimizarea formulării unor preparate topice cu fluconazol, sigure și eficiente, având în compoziție excipienți naturali, biocompatibili, biodegradabili, netoxici, neiritanți și cu activitate antifungică proprie. Astfel, preconizăm că vor crește considerabil șansele de succes ale dezvoltării unor produse medicamentoase fiabile comercial, deci se va contribui pe plan național la lărgirea arsenalului terapeutic al infecțiilor fungice.

Mai mult, studiile efectuate și rezultatele acestora deschid pe plan național o nouă direcție de cercetare în domeniul preparatelor farmaceutice topice semisolide, iar pe plan

internațional contribuie la extinderea grupului noilor sisteme farmaceutice topice semisolide cu efect antimicotic, propuse și investigate în ultimii ani.

Ca direcții viitoare de cercetare se pot menționa:

- optimizarea formulării hidrogelurilor pe bază de chitosan/hidroxipropilmetilceluloză și esterii de zaharoză sau uleiuri esențiale (de scorțișoară, de cuișoare și de oregano), precum și a microemulsiilor-gel pe bază de chitosan, esterii de zaharoză și uleiuri esențiale în scopul îmbunătățirii permeației percutanate a fluconazolului din aceste forme farmaceutice topice;
- testări suplimentare avansate, preclinice și clinice privind microstructura sistemelor emulsionate studiate, structura gelică, solubilitatea componentelor în fazele lichide ale sistemului, profilul textural, stabilitatea, inocuitatea, disponibilitatea cutanată și eficacitatea terapeutică *in vitro* și *in vivo* a componentelor active.
- formularea, prepararea și evaluarea *in vitro* și *in vivo* a altor tipuri de transportori micro- și nanoparticulați având în compoziție chitosan, esterii de zaharoză și uleiuri esențiale, în scopul creșterii permeației percutanate a fluconazolului sau a altor antimicotice, utilizate în terapia topică a infecțiilor fungice;
- evaluarea proprietăților bioadezive ale unor formulări topice biocompatibile pe bază de chitosan;
- evaluarea potențialului altor esterii de zaharoză și uleiuri esențiale decât cele selectate în cercetările efectuate, ca excipienți pentru formularea și prepararea unor sisteme farmaceutice topice biocompatibile pentru eliberarea antimicoticelor;
- dezvoltarea unor modele QSAR/QSPR pentru evaluarea cedării fluconazolului din preparate topice biocompatibile;
- eficientizarea tratamentului și îmbunătățirea complianței pacienților, ținând seama de incidența mare a infecțiilor fungice.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Shostak TA, Bilous SB, Hudz N, Kalynyuk TG. Features of the excipients selection for semi-solid dosage forms. *Pharm. Rev.* 2015; 1: 18-21.
2. Russell R. Synthetic excipient challenge all-natural organics offer advantages/challenges to developer and formulators. *Pharm. Tech.* 2004; 28(4): 38-50.
3. Zargar V, Asghari M, Amir Dashti A. A Review on Chitin and Chitosan Polymers: Structure, Chemistry, Solubility, Derivatives, and Applications. *Chem. Bio. Eng. Rev.* 2015; 2(3): 204-226.
4. Teng D. From chitin to chitosan. In Yao K, Li J, Yao F, Yin Y. (eds.). *Chitosan-based hydrogels: functions and applications*. Boca Raton, Florida: CRC Press, 2012, 1-39.
5. Sonia TA, Sharma CP. Chitosan and its derivatives for drug delivery perspective. *Adv. Polym. Sci.* 2011; 243: 23-54.
6. Zhu A, Shen J. Bioactivities of Chitosan and Its Derivatives. În Yao K, Li J, Yao F, Yin Y (eds.). *Chitosan-based hydrogels: functions and applications*, Boca Raton: CRC Press, 2012, 110-172.
7. Okamoto H, Sakai T, Tokuyama C, Danjo K. Sugar ester J-1216 enhancers percutaneous permeation of ionized lidocaine. *J. Pharm. Sci.* 2011; 100(10): 4482-4490.
8. Szűts A, Szabó-Révész P. Sucrose esters as natural surfactants in drug delivery systems-a mini-review. *Int. J. Pharm.* 2012; 433: 1-9.
9. Klang V, Matsko N, Raupach K, El-Hagin N, Valenta C. Development of sucrose stearate-based nanoemulsions and optimisation through gammacyclodextrin. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2011; 79: 58-67.
10. Csizmazia E, Eros G, Berkesi O, Berkó S, Szabó-Révész P, Csányi E. Ibuprofen penetration enhance by sucrose ester examined by ATR-FTIR *in vivo*. *Pharm. Dev. Technol.* 2012; 17(1): 125-128.
11. Csizmazia E, Eros G, Berkesi O, Berkó S, Szabó-Révész P, Csányi E. Penetration enhancer effect of sucrose laurate and Transcutol on ibuprofen. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 2011; 21(5): 411-415.
12. Popovici I. Microemulsii. În Popovici I, Lupuleasa D (ed.). *Tehnologie farmaceutică*, vol. 2. Iași: Polirom, 2017, 286-309.
13. Lawrence MJ, Rees GD. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2012; 64: 175-193.
14. Pappinen S., Urtti A. Microemulsions. In Dragicevic N, Maibach HI (eds.). *Percutaneous Penetration Enhancers Chemical Methods in Penetration Enhancement. Nanocarriers*. Berlin: Springer-Verlag, 2016, 253-261.
15. Schwarz JC, Klang V, Hoppel M, Mahrhauser D, Valenta C. Natural microemulsions: formulation design and skin interaction. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2012; 81:557-562.
16. Nava-Arzaluz MG, Piñón-Segundo E, Ganem-Rondero A. Sucrose Esters as Transdermal Permeation Enhancers. In: Dragicevic N, Maibach H (eds). *Percutaneous Penetration Enhancers Chemical Methods in Penetration Enhancement*. Berlin: Springer Verlag, 2015, 273-290.
17. Muț AM, Vlaia L, Coneac G, Olariu I, Vlaia V, Popoiu C, Hârjău M, Lupuleasa D. Novel topical chitosan/hydroxypropylmethylcellulose-based hydrogels containing fluconazole and sucrose esters: formulation, physicochemical characterization and *in vitro* drug release and permeation. *Farmacia*. 2018; 66(1): 59-69.
18. Muț AM, Vlaia L, Coneac G, Olariu I, Vlaia V, Stănciulescu C, Mitu MA, Szabadai Z, Lupuleasa D. Chitosan/HPMC-based hydrogels containing essential oils for topical delivery of fluconazole: preliminary studies. *Farmacia*. 2018; 66(2): 248-256.

19. Jiang Q, Wu Y, Zhang H, Liu P, Yao J, Yao P, Chen J, Duan J. Development of essential oils as skin permeation enhancers: penetration enhancement effect and mechanism of action. *Pharm. Biol.* 2017; 55(1): 1592-1600.
20. Coneac G, Vlaia V, Olariu I, Muț AM, Anghel DF, Ilie C, Popoiu C, Lupuleasa D, Vlaia L. Development and Evaluation of New Microemulsion-Based Hydrogel Formulations for Topical Delivery of Fluconazole. *AAPS Pharm. Sci.Tech.* 2015; 16(4): 889-904.
21. Todosijević MN, Cekić ND, Savić MM, Gašperlin M, Randelović MR, Savić SD. Sucrose ester-based biocompatible microemulsions as vehicles for aceclofenac as a model drug: formulation approach using D-optimal mixture design. *Colloid Polym. Sci.* 2014; 292(12): 3061-3076.
22. Viuda- Martos M, Ruiz- Navajas Y, Fernández- López J, Pérez- Alvarez JA. Antifungal activities of thyme, clove and oregano essential oils. *J.Food Saf.* 2007; 27(1): 91-101.
23. Siddig IA, Abdalbasit AM, Manal MET, Faridah QZ, Adil HAA, Shamsul K, Yasodha S, Khalijah A. Chemical composition and antioxidant properties of the essential oil of *Cinnamomum altissimum* Kosterm. (Lauraceae). *Arabian J. Chem.* 2017; 10 (1): 131-135.