

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI
ȘCOALA DOCTORALĂ
DOMENIUL FARMACIE**

FORME FARMACEUTICE SEMISOLIDE

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

**Conducător de doctorat
PROF. UNIV. DR. ANDRIEȘ A. ADRIAN**

**Student-Doctorand
TUDOSĂ CONSTANTIN PETRU**

2019

CUPRINS

Introducere	9
I. PARTEA GENERALĂ	12
Capitolul 1. PIELEA, INTERFAȚĂ FARMACOLOGICĂ PENTRU FORMELE FARMACEUTICE SEMISOLIDE	12
1.1. Pielea - elemente de anatomie și fiziologie	12
1.2. Pielea, cale de administrare a medicamentelor	17
1.3. Forme farmaceutice bioadezive semisolide	20
Capitolul 2. ANTIINFLAMATOARE NESTEROIDIENE	22
2.1. Clasificarea antiinflamatoarelor nesteroidiene	22
2.2. Oxicami	23
2.2.1. Piroxicam	24
2.2.2. Meloxicam	26
2.3. Mecanisme de acțiune ale oxicamilor	27
2.4. Efecte adverse ale administrării oxicamilor	31
2.5. Oxicamii și terapia cancerului	36
2.6. Combinații ale piroxicamului și meloxicamului	39
2.6.1. Combinații ale piroxicamului și meloxicamului cu cuprul și cobaltul	42
2.6.1.1. Sinteza și analiza complexilor organo-metalici ai oxicamilor	42
2.6.1.2. Evaluarea eficacității și securității <i>in vitro</i>	43
2.6.1.3. Predicția indicilor terapeutici	45
2.6.1.4. Corelații <i>in silico</i> - <i>in vitro</i>	45
2.6.1.5. Studii ale acțiunii antiinflamatorii locale <i>in vivo</i>	45
2.6.1.6. Corelații <i>in vitro</i> - <i>in vivo</i>	47
Capitolul 3. FORME FARMACEUTICE TOPICE CU OXICAMI	49
3.1. Preparate farmaceutice bioadezive semisolide cu oxicami și derivați ai acestora	50
3.2. Lipozomii și veziculele ultradeformabile pentru administrare topică	51
3.3. Forme farmaceutice și formulări cu oxicami	55
3.4. Compuși utilizați pentru obținerea preparatelor topice cu oxicami	56
3.4.1. Carbomerii	56
3.4.2. Lanolină	57
3.4.3. Alcool oleic	57

3.4.4. Trietanolamina	58
3.4.5. Izopropilmiristat	58
3.4.6. Agaroza	59
3.4.7. Gelatina	60
3.4.8. Fibroina	61
3.4.9. Elastina	62
3.4.10. Alginatul	62
3.4.11. Acidul hialuronic	64
3.4.12. Poli ϵ -caprolactona	67
3.4.13. Acidul polilactic	68
II.CONTRIBUȚII PERSONALE	69
Motivare	69
Capitolul 4. EVALUAREA RELAȚIEI DINTRE COMPORTAMENTUL REOLOGIC ȘI PERFORMANȚELE <i>IN VITRO</i> ALE LIGANZILOR ORGANICI INCLUȘI ÎN FORMULĂRI SEMISOLIDE DE TIP CREMĂ	74
4.1. Introducere	74
4.2. Materiale și metode	75
4.2.1. Prepararea formulărilor semisolide topice de tip cremă	75
4.2.2. Evaluarea profilelor cedare <i>in vitro</i>	76
4.2.3. Determinarea cantitativă a oxicamilor în probele prelevate	77
4.2.4. Analiza parametrilor microstructurali	78
4.3. Rezultate	79
4.3.1. Analiza spectrofotometrică a oxicamilor	79
4.3.2. Profilele de cedare <i>in vitro</i> ale oxicamilor din formulările experimentale	81
4.3.3. Evaluarea comportamentului reologic al cremelor conținând oxicami	85
4.4. Discuții	87
4.5. Concluzii	94
Capitolul 5. DEZVOLTAREA ȘI EVALUAREA <i>IN VITRO</i> A UNOR FORMULĂRI SEMISOLIDE TOPICE DE TIP HIDROGEL POLIACRILIC CONȚINÂND COMPLECȘI ORGANOMETALICI AI COBALTULUI ȘI CUPRULUI	96
5.1. Introducere	96
5.2. Materiale și metode	97

5.2.1. Prepararea hidrogelurilor	97
5.2.2. Analiza preliminară <i>in vitro</i> a permeabilității potențiale a complexilor prin piele	98
5.2.3. Studiul profilelor de cedare <i>in vitro</i> a complexilor organometalici din formulările experimentale	100
5.2.4. Determinarea cantitativă a oxicamilor și a complexilor organometalici în probele prelevate	100
5.2.5. Evaluarea comportamentului reologic	100
5.3. Rezultate	100
5.3.1. Determinarea spectrofotometrică a oxicamilor și a complexilor organometalici	101
5.3.2. Profilele de cedare <i>in vitro</i> ale complexilor organometalici din geluri poliacrilice	104
5.3.3. Evaluarea comportamentului reologic al gelurilor poliacrilice	106
5.4. Discuții	107
5.5. Concluzii	112
Capitolul 6. FORMULAREA A UNOR GELURI TRANSDERMICE CONȚINÂND COMPLECȘI ORGANOMETALICI AI COBALTULUI ȘI CUPRULUI ȘI STUDIUL PERFORMANȚELOR <i>IN VITRO</i>	113
6.1. Introducere	113
6.2. Materiale și metode	114
6.2.1. Compoziția și modul de preparare al formulărilor semisolidе topice conținând poloxamer	114
6.2.2. Procedurile de testare <i>in vitro</i>	115
6.3. Rezultate	115
6.3.1. Profilele de cedare <i>in vitro</i> ale complexilor organometalici din geluri poloxamerice	115
6.3.2. Evaluarea comportamentului reologic al gelurilor poloxamerice	117
6.4. Discuții	118
6.5. Concluzii	125
Capitolul 7. DEZVOLTAREA UNOR FORME SEMISOLIDE TOPICE PENTRU COMPLECȘI AI NEODIMULUI ȘI GADOLINIULUI CU LIGANZI OXICAMI	127

7.1. Introducere	127
7.2. Materiale și metode	127
7.2.1. Selecția compoziției formelor farmaceutice semisolide și metoda de preparare	127
7.2.2. Adaptarea protocolului experimental de testare <i>in vitro</i>	128
7.3. Rezultate	129
7.3.1 Determinarea spectrofotometrică a complexilor neodimului și gadoliniului	129
7.3.2 Determinarea spectrofotometrică a liganzilor organici, ampiroxicam și lornoxicam	134
7.3.3. Evaluarea profilelor de cedare <i>in vitro</i> ale complexilor organometalici ai neodimului	136
7.3.4 Evaluarea profilelor de cedare <i>in vitro</i> ale complexilor organometalici ai gadoliniului și ale liganzilor	144
7.3.5 Studiul comportamentului reologic al formulărilor experimentale	148
7.4. Discuții	154
7.5. Concluzii	161
Capitolul 8. CONCLUZII PRIVIND FORMELE FARMACEUTICE SEMISOLIDE	163
8.1. Concluzii privind evaluarea relației dintre comportamentul reologic și performanțele <i>in vitro</i> ale liganzilor organici incluși în formulări semisolide de tip cremă	163
8.2. Concluzii privind dezvoltarea și evaluarea <i>in vitro</i> a unor formulări semisolide topice de tip hidrogel poliacrilic conținând complecși organometalici ai cobaltului și cuprului	164
8.3. Concluzii privind formularea a unor geluri transdermice conținând complecși organometalici ai cobaltului și cuprului și studiul performanțelor <i>in vitro</i>	164
8.4. Concluzii privind dezvoltarea unor forme semisolide topice pentru complecși ai neodimului și gadoliniului cu liganzi oxicami	165
8.5. Concluzii generale	166
Bibliografie	168
Anexe	185

Introducere

Data fiind incidența crescută a afecțiunilor inflamatorii în rândul populației, una dintre preocupările majore ale cercetătorilor în domeniul farmaceutic și medical, la nivel național și internațional este dezvoltarea de noi medicamente antiinflamatoare cu eficacitate clinică și efecte secundare reduse. În acest sens au fost explorate foarte multe tipuri de structuri chimice pentru lărgirea gamei medicamentelor cu acțiune antiinflamatoare, în scopul dezvoltării terapiei acestui grup de afecțiuni.

O abordare nouă este extinderea studiilor către compușii metalici ai structurilor organice terapeutic active. Scopul unor astfel de studii îl constituie prepararea unor compuși (medicamente) cu activitate farmacologică mai bună decât a liganzilor. Unul din obiectivele acestei linii de cercetare este reprezentat de obținerea unor noi substanțe active și medicamente originale cu acțiune antiinflamatoare pe baza unor combinații complexe ale unor metale cu liganzi oxamicici. Ele pot însuma acțiunea terapeutică a ligandului organic cu cea specifică ionului metalic.

Pornind de la aceste argumente și de la activitatea recunoscută antiinflamatoare / antibacteriană / antitumorală a ionilor de cupru, cobalt și zinc, studiul a urmărit obținerea și caracterizarea unor combinații complexe ale acestor metale cu liganzi din clasa oxamicilor (piroxicam, meloxicam, tenoxicam). Noile substanțe au fost caracterizate în toată complexitatea lor, fizică, chimică, fizico-chimică, dar și farmacologică, prin testate *in vitro* în ceea ce privește citotoxicitatea și activitatea specifică, antiinflamatoare. Includerea lor în diverse forme farmaceutice a fost însoțită de o serie de studii specifice de caracterizare a preparatelor farmaceutice (preclinice, *in vitro* și *in vivo*, toxicologice, farmacologice).

Cercetările au avut ca punct de plecare o serie de studii *in silico* care au condus la realizarea unor modele teoretice de complecși ai unui grup de oxicami cu un număr mai amplu de metale. Rezultatele acestor investigații au stat la baza etapei experimentale de sinteză. S-a demonstrat că din clasa oxamicilor, substanțele cele mai utilizabile pentru complexarea cu metale tranziționale (cobaltul și cuprul) pot fi piroxicamul și meloxicamul, generând chiar posibilitatea potențării activității lor antiinflamatoare.

Proiectarea și apoi sintetizarea acestor structuri cu activitate antiinflamatoare cumulată, a ionilor metalici și a liganzilor oxamicici, a început cu o primă etapă de modulare moleculară. Pentru aceasta, inițial, s-a realizat un studiu de optimizare a geometriilor de coordonare prin folosirea metodei computaționale Molecular Docking. Folosirea a studiilor QSAR (*Quantitative Structure Activity Relationship*) a permis stabilirea modului și gradului de participare a atomilor din acești complecși în procesele

de interacțiune de tip ligand-receptor și implicit, redau relația dintre descriptorii cuanto-moleculari și afinitatea pentru anumite structuri moleculare biologice. Prefigurarea sintezei acestor noi substanțe a fost susținută și de folosirea tehnicilor CADD (*Computer Assisted Drug Design*), care au permis proiectarea unor structuri de complecși cu activitate antiinflamatoare, cu geometrii moleculare tetraedice sau tetraedrice distorsionate.

După selecția și optimizarea sintezei, complecșii rezultați au fost caracterizați din punct de vedere structural printr-o paletă largă de metodologii (analiză elementală, spectroscopie UV-Vis, IR și de masă, ICP-MS). Ulterior, a fost analizată toxicitatea compușilor prin experimente *in vitro*, folosind culturi de celule. Pentru evidențierea citotoxicității bazale s-au folosit culturi de celule aderente: fibroblaste (3T3) și celule endoteliale vasculare umane (HUVEC) sau neaderente: de tip limfoblastic, uman (Celule Jurkat) sau monocitar (U937). Conform datelor preliminare, prezența cuprului în molecula ambilor oxicami generează o scădere a citotoxicității complexului față de liganzi, datorită unei probabile interferențe a metalului cu unele mecanisme de semnalizarea celulară (NFkB). Același set de culturi de celule a fost folosit pentru stabilirea activității antiinflamatoare a complecșilor metal-oxicamici. Mai mult, cercetările efectuate pe culturile de sânge integral, au indicat caracterul de modulator al producției de citokine proinflamatorii la meloxicam și piroxicam, dar și la complecșii lor cuprici și de cobalt. Cercetările au avut ca obiectiv și evaluarea sintezei de citokine proinflamatorii, în contextul modelării reactivității celulare față de procesele inflamatorii folosind modele de testare *in vitro*. De asemenea, din punct de vedere al liganzilor s-a evidențiat un efect protector mai puternic al meloxicamului și complecșilor săi asupra secreției de IL-1beta și a unui efect mai intens al compușilor piroxicamului, în cazul secreției de TNF α și IL-8.

Datele experimentale menționate anterior sunt rezultate ale cercetărilor efectuate de colective multidisciplinare sub coordonarea Institutului Național de Cercetare-Dezvoltare Chimico-Farmaceutică (INCDCF 2008-2011, 2012-2016). Profilele de siguranță și eficacitate promițătoare ale noilor entități au dus la extinderea cercetărilor pentru obținerea unor complecși implicând ioni metalici având profil antitumoral cunoscut (lantanide) și ligand organic din aceeași clasă terapeutică. Prezenta lucrare descrie procedurile de dezvoltare și evaluare *in vitro* a unor forme farmaceutice semisolide cu acțiune locală, regională sau sistemică. Selecția factorilor de compoziție și a parametrilor de operare a ținut cont de particularitățile structurale, farmacologice, fizice și chimice ale complecșilor organometalici.

Capitolul 4.

Evaluarea relației dintre comportamentul reologic și performanțele *in vitro* ale liganzilor organici incluși în formulări semisolide de tip cremă

4.1. Introducere

Unul din avantajele majore ale administrării topice pentru acțiune locală a substanțelor medicamentoase este evitarea reacțiilor adverse la nivel sistemic. Pentru marea majoritate a entităților cu efecte antiinflamatoare, efectul specific se manifestă în straturile mai profunde, iar expunerea este regională. Din punct de vedere al biodisponibilității și bioechivalenței, concentrațiile sistemice pot fi utilizate pentru compararea produselor multisursă atât din punct de vedere al siguranței, cât și al eficacității. Relația dintre concentrația vehiculului, doza aplicată și fracțiile penetrate este extrem de complexă, astfel încât forme farmaceutice total diferite ca factori de compoziție sau mecanisme de eliberare pot fi considerate bioechivalente.

Din punct de vedere al evaluărilor unor complecși organometalici în care ligandul reprezintă o entitate terapeutică bine cunoscută, dezvoltarea unor forme farmaceutice semisolide cu aplicare topică presupune înțelegerea interacțiunilor cu matricea care servește drept vehicul. Conform mențiunilor anterioare, particularitățile fizico-chimice ale oxicamilor pot fi substanțial modificate prin coordinare, proces care implică gruparea responsabilă de funcția acido-bazică.

Celulele utilizate pentru evaluarea profilelor de cedare *in vitro* prin membrane artificiale pot fi considerate sisteme constituite din două compartimente între care are loc un transfer controlat de afinitatea analitului. Compartimentul receptor trebuie să asigure o solubilitate adecvată pentru condiții sink, astfel încât interacțiunile din matricea donorului predomină. În această primă etapă s-a optat pentru condiționarea a patru oxicami, utilizați de INCDCF pentru obținerea de complecși cu acțiune antitumorală și antiinflamatoare, sub formă de creme având o concentrație de 0.5%. Rezultatele testelor difuzionale și reologice au fost interpretate din perspectiva caracteristicilor fizico-chimice ale viitorului ligand organic, estimate cu programe de calcul specializate, dar și a impactului excipienților asupra activității termodinamice.

4.2. Materiale și metode

4.2.1. Prepararea formulărilor semisolide topice de tip cremă

O primă etapă de proiectare a formulărilor semisolide destinate administrării locale a complecșilor organometalici a fost reprezentată de evaluarea performanțelor *in vitro* ale liganzilor, prin selecția a patru oxicami: lornoxicam, meloxicam, piroxicam și tenoxicam.

Pornind de la colaborările cu unități autorizate de fabricare a produselor medicamentoase, au fost utilizate patru compoziții standard de tip cremă, autorizate pentru condiționarea unor entități hidrofobe (valori ale coeficientului de partiție n-octanol apă mai mare de 2). Procesul de preparare a fost similar, constând din prepararea celor două faze, omogenizarea la cald, răcirea treptată până la 25-35°C. Entitatea cu acțiune antiinflamatoare a fost inclusă în faza apoasă, în cadrul căreia umectarea și dispersarea, au fost codificate A, C, D și M.

Prepararea fazei lipofile s-a efectuat prin cântărirea și amestecarea alcoolului cetilic, alcoolului stearilic, vaselinei albe și parafinei lichide în recipiente de capacitate adecvată (material: polipropilenă; volum util, 20 mL). Încălzirea la aproximativ 70°C a fost urmată de omogenizarea la 750 rpm, cu ajutorul unui echipament tip Unguator 2100 (Gako International GmbH, Germania) și a unor agitatoare standard de unică folosință (material: poliamidă; diametru egal cu cel interior al recipientului cilindric). Ulterior a fost încorporat tensioactivul non-ionic. În paralel, faza apoasă a fost preparată prin dispersarea oxycamului în amestecul de apă și propilenglicol. Conservanții de tip esteri de parahidroxi benzoat pot fi dizolvați în apa purificată încălzită la 90°C, iar alcoolul benzilic, un alt excipient frecvent utilizat pentru menținerea integrității microbiologice a cremelor, este dispersat în faza lipofilă la finalul etapei de omogenizare a componentelor. Reunirea celor două faze s-a făcut sub agitare timp de minim 15 minute, ulterior realizându-se răcirea lentă, sub menținerea agitării.

Formulările semisolide topice rezultate au fost menținute în recipientele de preparare, singura procedură aplicată fiind cea de eliminare a aerului prin reducerea volumului. Cremele au fost analizate după un interval de timp de minim 72 de ore.

4.2.2. Evaluarea profilelor cedare *in vitro*

Cele 16 formulări semisolide topice preparate conform protocolului descris anterior au fost analizate prin aplicarea unei metodologii standard de evaluare a profilelor de cedare *in vitro*. S-a utilizat un sistem de celule verticale de difuzie statice, compuse din 12 unități individuale cuplate în serie (Hanson Microette, volum total de 12 mL, Hanson-Teledyne Inc, Statele Unite ale Americii). Descrise în cadrul capitolului compendial 1724 (United States Pharmacopoeia, USP41/NF36, 2018), acestea sunt compuse din două compartimente separate printr-o membrană artificială. Interfața trebuie să fie inertă, respectiv să nu interacționeze cu formularea topică aplicată în compartimentul superior denumit donor sau cu mediul receptor. Acesta din urmă trebuie să asigure o solubilitate adecvată analitului de interes, în acest caz un oxycam hidrofob. Aplicarea modelului Higuchi este dependentă de

utilizarea unei doze pseudo-infinite și de existența condițiilor sink. În acest context, viteza de eliberare a entității active este o proprietate a formulării, fiind dependentă de rezistența difuzională pe care aceasta o întâmpină în transferul între cele două compartimente. S-a optat pentru un mediu hidro-alcoolic în care etanolul absolut a reprezentat 50% (v/v; Rădulescu FS et al, 2015). Pentru evitarea apariției bulelor de aer pe fața internă a membranei, mediul a fost degazat prin filtrare sub vid utilizându-se filtre fabricate din amestecuri de esteri de celuloză cu diametrul mediu declarat al porilor de 0.45 μm. Ulterior, amestecul a fost transferat lent în vasul tampon al sistemului de difuzie, pentru încălzire la o temperatură similară cu cea a pielii umane expusă mediului ($32 \pm 0.5^\circ\text{C}$).

Compartimentul receptor al celulelor a fost umplut sub agitare intensă (1000 rpm, bare magnetice prevăzute cu spirală de omogenizare din oțel inox). Simultan, membrane de polisulfonă (25 mm diametru, pori de 0.45 μm) au fost condiționate prin îmbibare în amestecul hidro-alcoolic utilizat ca mediu receptor, timp de 30 de minute. La finalul acestui interval, excesul de mediu aderent pe cele două fețe ale membranei a fost îndepărtat prin tamponare cu hârtie de filtru. A fost atașat un inel dozator din material slab reactiv (politetrafluoroetilenă, diametru interior 15 mm, grosime 1.5 mm). Cantități de aproximativ 300 mg din fiecare cremă preparată au fost aplicate în spațiul corespunzător compartimentului donor creat astfel. Etalarea s-a efectuat cu ajutorul unei spatule din material plastic, eliminându-se eventuale bule de aer și asigurându-se un contact uniform cu interfața de transfer. Pentru evitarea pierderii de componente volatile pe durata testelor, au fost atașate discuri de sticlă (condiții ocluzive pentru o doză pseudo-infinită). Asamblarea sistemului de testare a continuat prin aplicarea donorului peste sistemul receptor condiționat, cu verificarea etanșeității. Alinierea componentelor prin utilizarea unor inele de aluminiu a fost urmată de atașarea unor cleme. Cele patru creme conținând același oxycam au fost testate simultan, pe câte trei celule verticale de difuzie. Termostatarea unităților individuale s-a efectuat prin cuplarea la un termostat cu recirculare (Lauda E100, EcoLaudaStarEdition, Lauda GmbH, Germania) și amplasarea unui monitor de flux. Un număr de opt probe consecutive au fost prelevate manual la intervale de 30 de minute. Momentul $t=0$ a fost reprezentat de aplicarea tuturor produselor testate și pornirea agitării (600 rpm). Colectarea eșantioanelor de 0.5 mL din mediul receptor s-a efectuat în sistem de tip buclă deschisă, prin injectare de mediu blank și evacuare concomitentă a unui volum egal. Pentru evitarea aplicării unei presiunii crescute și posibila difuzie inversă a mediului receptor, injectarea a fost lentă (aproximativ 1

minut/probă). Totodată, pe durata prelevării agitarea a fost oprită, pentru prevenirea diluării probelor colectate.

4.2.3. Determinarea cantitativă a oxicamilor în probele prelevate

Probele prelevate din compartimentul receptor au fost stocate în tuburi de polipropilenă de 1.5 mL la temperaturi cuprinse între 2-8°C până în momentul analizei. Probe de calibrare corespunzătoare domeniului de concentrații 0.1-100 µg/mL au fost preparate prin diluții succesive cu mediul receptor hidroalcoolic, pornind de la o soluție stoc de 400 µg/mL în metanol (10 mg / 25 mL). Volume de 200 µL din aceste probe au fost transferate pe microplăci UV-Star 96 well (Chimneywell, GrainedBio-One, Kremsmünster, Austria), fără diluare, prima poziție fiind reprezentată de mediul blank. Spectrul de absorbție în domeniul UV a fost achiziționat cu o rezoluție de 1 nm (SpectraMax Plus 84 Plate reader reader, Sunnyvale, CA, SUA), identificându-se ulterior maximul specific fiecărui oxicam. Determinările au fost precedate de termostatarea la 25°C și o secvență de trei agitări consecutive, pentru îndepărtarea eventualelor bule de aer apărute în timpul transferului (Pahonțu E et al, 2017). Prin aplicarea unui protocol specific din cadrul programului de prelucrare a datelor SoftMax software (versiunea 6.4.2; Sunnyvale, CA, SUA), a fost calculată dreapta de regresie corespunzătoare. Absorbbanțele probelor prelevate, procesate conform aceluiași mod de lucru, au fost interpolate pe aceste drepte și convertite în valori ale concentrației. Cantitățile totale cedate au fost estimate prin considerarea volumului individual al celulelor și al prelevărilor succesive.

4.2.4. Analiza parametrilor microstructurali

Pentru analiza comportamentului reologic s-a optat pentru un test de tip buclă de histeresis, efectuat în triplicat pentru patru valori ale temperaturii: 25, 28, 30 și 32°C (termostat TC100, Grant Instruments Cambridge). S-a utilizat un vâscozimetru rotațional de tip Thermo Haake Viscometer®VT550, având un sistem de cilindri coaxiali SV conform DIN53019/ISO3219 (rază de 10.65 mm, lungime de 32.95 mm, grosimea stratului de cremă, gap 0.9 mm). Monitorizarea temperaturii s-a realizat în partea inferioară a cupei, cu ajutorul unui senzor imersat tip Pt100. Volumul probei a fost de 10 mL. Pentru secvența de încărcare, eșantioanele semisolide au fost prelevate din recipientele de preparare cu ajutorul unor seringi de 20 ml (Inkjet Duo, BBraun), având capătul inferior tăiat pentru reducerea deformărilor matricei.

Testul aplicat a fost compus din trei segmente distincte ale vitezelor de forfecare: un prim segment ascendent, cu viteze de forfecare crescătoare în progresie liniară între 0 și 100 sec⁻¹, pentru 120 de secunde; un segment staționar, la 100 sec⁻¹, pentru 30 de secunde;

un segment final descendent, cu viteze de forfecare descrescătoare în progresie liniară între 100 și 0 sec⁻¹, pentru 120 de secunde. Analiza a inclus calculul ariilor de sub curbele aferente fiecărui segment, calculul ariei de tixotropie și aplicarea modelului Legea puterii, Ostwald de Waele: $\sigma = K\dot{\gamma}^n$ sau $\eta = K\dot{\gamma}^{n-1}$, unde σ este tensiunea de forfecare, $\dot{\gamma}$ este viteza de forfecare, η este vâscozitatea, K este indicele de consistență, iar n este indicele de curgere (Siska B et al, 2018). Calculele au fost efectuate automat, prin utilizarea programului HaakeRheoWin versiunea 4.83.0004 (Thermo Fisher Scientific, Germania).

4.4. Discuții

Grupul oxicamilor utilizați în obținerea complexilor organometalici în cadrul proiectelor de cercetare coordonate de către INCDCF în perioada 2008-2016 au valori ale descriptorilor moleculari considerați relevanți pentru evoluția *in vivo*.

Atât masa moleculară (mai mică de 500), cât și valoarea estimată a coeficientului de partiție n-octanol-apă sunt situate în intervalele adecvate pentru absorbția orală. Fenomenele de distribuție sunt dominate de legarea semnificativă de proteine, ceea ce determină timpi de înjumătățire mari. Din punct de vedere biofarmaceutic, blocarea tautomeriei ceto-enolice și coordinarea prin care este obținut complexul organometalic determină modificări substanțiale ale solubilității și partiției prin membranele biologice. Aria suprafeței polare se reduce, ligandul organic expunând mediului arii lipofile, iar caracterul slab acid este anulat. Structura moleculară a oxicamilor permite obținerea de complecși (Xu S et al, 2014). În special entitățile generate prin chelatarea ionilor de cupru au demonstrat o efecte antiproliferative și chemoprotectoare, corelate cu legarea directă de ADN (Roy S et al, 2006). În această primă etapă obiectivul a fost analiza comportamentului *in vitro* al entităților cu activitatea antiinflamatoare cunoscută, prin înglobarea în vehicule semisolide pentru administrare locală. Structura planului experimental, comună pentru patru din cele cinci capitole ale contribuțiilor originale la tema de cercetare, a inclus evaluarea profilelor de cedare *in vitro* și a comportamentului reologic. Cele două seturi de date experimentale au permis analiza naturii interacțiunilor dintre viitorul ligand și matricea lipofilă, modificările aranjamentului intern și a răspunsului la un stres mecanic, dar și a rezultantei globale, viteza de transfer către un mediu lichid care asigură condiții sink.

Datele de literatură existente confirmă impactul major al diferențelor dintre structurile moleculare ale oxicamilor asupra dizolvării în fluidele gastro-intestinale (Dumitrescu IB et al, 2014), cu un rol distinct al valorii pH-ului și al naturii sau concentrației tensioactivului endogen. Administrarea topică prezintă avantajul prezenței

unui volum foarte redus de lichid, cu o capacitate tampon redusă, astfel încât formularea farmaceutică poate modifica, în funcție de compoziție, contextul local. Capacitatea de etalare și mai ales afinitatea entității terapeutice pentru cele două faze în contact sunt factori critici. De reamintit în acest context faptul că vehiculul poate modifica rezistența difuzională a barierei biologice.

Selecția excipienților pentru cele patru baze utilizate în formularea cremelor a ținut cont de compoziții autorizate pe piața locală, asigurând profile de calitate adecvate pentru entități active similare din punct de vedere al structurii moleculare și/sau descriptorilor. Diferențe notabile au fost induse de prezența unor promotori de absorbție de tipul propilenglicolului (într-o cantitate de maxim 10%) sau de caracterul hidro-lipofil. De exemplu, baza codificată D a inclus o cantitate mai mare de alcool stearilic, iar pentru baza M s-a utilizat suplimentar cetil-palmitat. Rezultatele testelor reologice efectuate asupra bazei fără oxicami au confirmat comportamente reologice diferite. În cazul bazei A, creșterea temperaturii în intervalul 25-32°C a indus o scădere de consistență aproximativ proporțională. Această constatare confirmă modificările de structură internă care pot avea loc în momentul administrării. Efectul a fost atenuat în prezența propilenglicolului, deformările asociate traseului ascendent al vitezelor de forfecare fiind similare la 30 și 32°C. Variabilitatea datelor experimentale a fost maximă între 0.1 și 5 sec⁻¹ pentru profilele de curgere ale bazei D. În acest caz, creșterea proporției de alcool stearilic a determinat prezența unei fracții solide mai mari în matricea cremei. Dispersia valorilor vâscozității a reflectat atât limitările dispozitivului experimental (vâscozimetru rotațional) dar și curgerea neuniformă a sistemului dispers. Profilele medii de deformare au confirmat un prag minim al tensiunii de curgere, parametru pe care ghidurile în vigoare îl menționează explicit ca parte a comparării produselor multisursă (EMA, 2018). Relevanța este dublă, atât prin relația cu etalarea la nivelul barierei biologice, cât și pentru prelucrarea în cadrul procesului de fabricație (termenii utilizați fiind de *pourability / processability*).

Înglobarea oxicamilor nu a modificat semnificativ comportamentul reologic, acesta fiind unul pseudoplastic fără evidențierea unor arii de histeresis. Acest rezultat este explicabil prin selecția unui domeniu îngust al vitezelor de forfecare. Dimensiunea particulelor suspendate fiind redusă (sub 10μm, conform unor date preliminare generate prin microscopie optică având ca obiectiv verificarea uniformității distribuției), curgerea nu este modificată. Parametrii de testare trebuie adaptați fiecărui tip de produs și mai ales modificărilor de structură internă care au loc sub influența stresului mecanic. Cel mai frecvent, vehiculele heterogene (creme) suferă fracturi interne care determină profile de

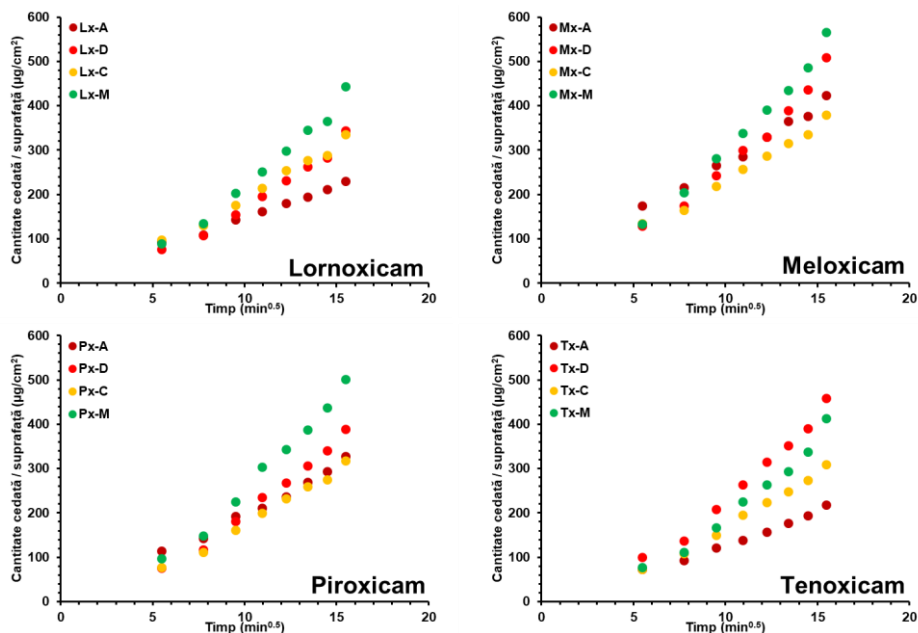
curgere atipice (de exemplu maxime regionale), ca urmare a adeziunii unor straturi de grosimi diferite de fiecare dintre cei doi cilindri. Folosirea sondei de tip SV-DIN a limitat înglobarea bulelor de aer, însă destructurările pe durata încărcării probei pot fi semnificative, chiar dificil de recuperat în cele 5 minute de repaus și termostatare. Extinderea domeniului de viteze de forfecare până la 100 sau 1000 sec^{-1} poate fi considerată biorelevantă, dar induce la rândul său variabilitate. Pe de-o parte, deformările pot fi cvasi-permanente, prin separări de faze, pe de altă parte o fracțiune variabilă a vehiculului poate fi expulzată. Ambele fenomene pot genera o falsă tixotropie. Astfel, datele experimentale permit formularea a două concluzii: i) cele patru creme au comportament pseudoplastic tipic, puțin alterat de prezența oxycamilor parțial suspendați; ii) compoziția bazelor de cremă, inclusiv prezența unor promotori de absorbție, influențează impactul temperaturii asupra profilelor de curgere.

Alegerea formulărilor de tip cremă a fost importantă considerând factorii de variabilitate specifici metodologiilor de cedare *in vitro*. Retro-difuzia sau difuzia inversă poate determina variații ale fracției dizolvate, traduse în deviații de la linearitate ca urmare a modificării continue a caracteristicilor compartimentului donor. Examinarea cremelor la finalul intervalului de testare nu a dus la observarea unor schimbări de aspect. Marea majoritate a ghidurilor emise de agenția americană Food and Drug Administration care include o opțiune *in vitro* de demonstrare a bioechivalenței sunt destinate cremelor, pentru care vitezele de cedare sunt mai reduse (de exemplu, comparativ cu hidrogelurile), depleția mai puțin probabilă în contact cu un mediu apos, iar schimbările de compoziție reduse. De altfel, modelul Higuchi, dezvoltat la începutul anilor 1960, cel pe care se bazează analiza de similaritate a SUPAC-SS (1997), a fost enunțat pe baza unui experiment simplu în care a fost analizat un unguent (Higuchi T, 1961). În cadrul prezentei lucrări, utilizarea unor baze lipofile ca vehicul pentru entități cu solubilitate apoasă redusă, cel puțin în domeniul de pH specific pielii, a permis estimarea partiției între două compartimente sub controlul preponderent al proprietăților fizico-chimice ale oxycamilului. Rădulescu FS et al (2015) au demonstrat existența unei relații între constantele cinetice ale procesului de eliberare din hidrogeluri și indicii de curgere, calculați conform modelului Ostwald de Waele.

Autorii au recurs la aplicarea alternativă a modelului corespunzător unei cinetici de ordin 1 ca urmare a fracțiilor eliberate de oxycami (meloxicam, piroxicam și tenoxicam) mai mari de 30%. Profilele medii obținute în cazul cremelor au fost caracterizate de consistența cedării, cu valori ale coeficientului de corelație mai mari de 0.98. Termenii

corespunzători latenței au fost mai mari, fenomen specific încălzirii stratului de cremă cu o grosime de 1.5 mm (între -1.15 și 4.16 min^{0.5}).

Profilele medii de cedare *in vitro* ale oxicamilor din cele patru formulări semisolidale topice (n=3, deviația standard nu a fost reprezentată)



Relația între descriptorii moleculari și cinetica de cedare a fost dificil de stabilit, întrucât diferiți algoritmi de calcul duc la estimări total diferite ale caracterului lipofil. De exemplu, valoarea coeficientului de partiție n-octanol-apă pentru lornoxicam variază între 0.64 și 3.08, iar pentru tenoxicam între -0.12 și 2.42. Un interes deosebit prezintă comparația între formulări diferite ale aceluiași oxicam. Cu excepția tenoxicamului, vitezele de cedare *in vitro* au crescut în ordinea bazelor A<C<D<M, respectiv prin adăugarea propilenglicolului, creșterea proporției de alcool sterilic și includerea unui excipient emolient suplimentar. Pantele dreptelor de regresie, evaluate ca proprietate specifică a formulării semisolidale în condițiile experimentale alese, sunt comparabile cu cele raportate anterior în cazul hidrogelurilor (Rădulescu FS et al, 2015).

Cazul tenoxicamului dispersat în baza M poate fi explicat prin interacțiuni suplimentare manifestate în interiorul cremei. De altfel, reprezintă singurul exemplu în care deviațiile de la linearitate au fost notabile, cu creșteri aparente ale vitezei de eliberare în intervalul 120-240 de minute. Capitolul compendial 1724 al United States Pharmacopeia menționează situații în care stratul de difuzie avansează în interiorul donorului cu o viteză mai mare decât cea de dizolvare a analitului din particule suspendate. Rolul componentei

suspendate poate fi asociat și unei emulsii în care faza internă uleioasă este stabilizată de cetil-palmitat, ceea ce limitează transferul spre faza continuă.

Corelarea între proprietățile difuzionale și cele reologice, scopul principal al acestor evaluări preliminare, a condus la identificarea unor regiuni optime, într-o abordare similară proiectării calității. Au fost reprezentate valorile vitezei de cedare *in vitro* în funcție de parametrii specifici modelului Ostwald de Waele la aceeași temperatură (32°C). Pentru indici de curgere situați în intervalul 0.60-0.75, respectiv pentru indici de consistență sub 25, procesul de eliberare a decurs cu viteza maximă. Pentru meloxicam și piroxicam, zonele defavorabile din punct de vedere al activității termodinamice au fost dispuse similar și simetric față de regiunea optimă (corespunzător valorilor extreme de consistență și curgere). Din perspectiva evaluărilor ulterioare a complexilor organometalici, caracterul hidrolipofil estimat prin descriptorii moleculari (în special aria suprafeței de polare și coeficientul de partiție n-octanol-apă) s-a corelat în acest caz cu aceeași ordine a vitezei de cedare *in vitro*, independent de tipul de bază.

4.5. Concluzii

1. Pentru analiza interacțiunilor dintre liganzii organici și matrici semisolide destinate administrării topice, au fost dezvoltate formulări experimentale de tip cremă folosind compoziții cu variații controlate ale tipului și cantităților de excipienți, unii având rol de promotori ai absorbției prin piele și mucoase. Profilele reologice și difuzionale au fost interpretate prin corelare cu descriptorii moleculari care influențează permeabilitatea prin barierele biologice.

2. Comportamentul reologic a fost pseudoplastic, cu impact diferit al temperaturii în intervalul 25-32°C. Variabilitatea datelor experimentale, mai mare în domeniul de viteze de forfecare reduse, a fost explicată prin limitările dispozitivului de testare, respectiv prin curgerea neuniformă a sistemului dispers. În unele cazuri, profilele medii de deformare au prezentat un prag minim al tensiunii de curgere, exprimând o capacitate redusă de întindere.

3. Datele experimentale obținute au demonstrat sensibilitatea metodologiilor de cedare *in vitro* față de factorii de formulare, viteza de difuzie prin membrane artificiale inerte fiind dependentă de solubilitatea oxicamilor în faza continuă, cinetica de dizolvare a particulelor suspendate și vâscozitatea matricei semisolide. Cu excepția tenoxicamului, ordinea relativă a vitezei de cedare *in vitro* a fost aceeași în cadrul grupului de baze, reflectând caracterul lipofil și afinitatea oxicamilor cu componentele cremei.

4. Aplicarea modelului Ostwald de Waele a dus la identificarea unor regiuni optime ale parametrilor de curgere corelați cu viteze de cedare *in vitro* maxime (indici de curgere situați în intervalul 0.60-0.75, respectiv valori ale indicilor de consistență sub 25).

5. Condițiile experimentale selectate în cadrul acestei etape pot fi utilizate în analiza unor formulări farmaceutice similare care conțin complecși cu liganzi de tip oxicami, ținând cont de mărirea volumului molecular, reducerea ariei suprafeței polare și mai ales amplificarea caracterului hidrofob.

Capitolul 5.

Dezvoltarea și evaluarea *in vitro* a unor formulări semisolide topice de tip hidrogel poliacrilic conținând complecși organometalici ai cobaltului și cuprului

5.1. Introducere

Agenții macromoleculari formatori de structuri semisolide de tipul carbomerilor sunt polimeri ai acidului acrilic, având în funcție de sort diferite mase moleculare și grade de reticulare. Rolul atribuit uzual este corelat cu aplicarea locală, la nivelul pielii sau mucoaselor ori pentru controlul cedării *in vivo* după administrarea orală (forme farmaceutice cu cedare controlată). Este mai puțin menționat rolul de emulgator, corelat cu un nivel redus al concentrației de 0.1-0.5%. Acest aspect a fost considerat în selecția compoziției emulgelurilor conținând complecșii organometalici hidrofobi. Biocompatibilitatea remarcabilă este dublată de un control adecvat al microstructurii, prin atribute de calitate precum valoarea pH-ului sau agentul de neutralizare utilizat (hidroxid alcalin sau derivat etanolaminic).

Studiile prezentate în capitolul anterior au demonstrat utilitatea evaluărilor reologice și difuzionale pentru înțelegerea relației complexe dintre natura vehicolului semisolid, tipul interacțiunilor specifice unei anumite compoziții și proprietățile fizico-chimice ale entității active aplicate local. În special în cazul piroxicamului și meloxicamului, caracterul lipofil a determinat menținerea relației între viteza de cedare *in vitro* independent de baza de cremă utilizată. În următoarea etapă a planului experimental au fost dezvoltați și analizați, conform unor protocoale adaptate, patru complecși organometalici ai cobaltului și cuprului, având următoarele formule:

$[\text{Cu} \cdot (\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{N}_3\text{O}_4\text{S})_2 \cdot (\text{H}_2\text{O})_2]$, reprezentând complex al cuprului cu ligand piroxicam;

$[\text{Co} \cdot (\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{N}_3\text{O}_4\text{S})_2 \cdot (\text{H}_2\text{O})_2]$, reprezentând complex al cobaltului cu ligand piroxicam;

$[\text{Cu} \cdot (\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}_2)_2 \cdot (\text{H}_2\text{O})_2]$, reprezentând complex al cuprului cu ligand meloxicam;

$[\text{Co} \cdot (\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}_2)_2 \cdot (\text{H}_2\text{O})_2]$, reprezentând complex al cobaltului cu ligand meloxicam.

Selecția carbomerilor pentru obținerea de hidrogeluri a facilitat, pe de-o parte, modificări de solubilitate ale complecșilor prin utilizarea de diferiți agenți de solubilizare, pe de altă parte, alterări microstructurale cu impact potențial asupra rezistenței difuzionale. Acesta a reprezentat o primă încercare de obținere a unor formulări cu administrare locală, luând în considerare faptul că coordonarea determină creșterea riscurilor asociate lipofilității.

5.2. Materiale și metode

5.2.1. Prepararea hidrogelurilor

Pentru prepararea formelor farmaceutice semisolide de tip hidrogel, formatorul de rețea de tip poliacrilic (Carbomer 940, corespunzător unei concentrații finale de 0.5 respectiv 1%) a fost hidratat folosind 75% din cantitatea de apă purificată prevăzută în formulă, timp de minim 24 de ore. Trietanolamina (puritate peste 99%; Triethanolamin zur Synthese, lot EG 20304898, Carl Roth GmbH + Co. KG, Germania) a fost utilizată pentru neutralizare la sfârșitul acestui interval.

Complecșii organometalici ai cobaltului și cuprului cu meloxicam sau piroxicam au fost dispersați într-un amestec de etanol absolut, propilenglicol, Cremophor® EL (PEG-35 Castor oil, polyoxyl 35 Castor oil; lot 78936716K0, BASF SE 67056 Ludwigshafen, Germania) și apă. Ca promotor suplimentar al absorbției fost adăugat izopropil-miristatul, singur sau în asociere standardizată cu lanolină și alcool oleic (Fancol® Iso, HSH Chemie, Germania). Dispersiile complecșilor în sistemele de cosolvenți au generat emulgeluri la adăugarea în matricea semisolidă generată prin hidratarea polimerilor hidrofilii, sub agitare intensă (2000 rpm timp de 10 minute, prin utilizarea unui agitator de tip turbină, într-un sistem de tip Heidolph RZR 2020, Germania). Procesul de preparare s-a desfășurat în recipiente de sticlă având fund rotund (50 mL), pentru a evita aglomerarea complecșilor, și la temperatura camerei, în lipsa unor date privind termostabilitatea analiților de interes.

Concentrațiile finale ale complexului organometalic au fost de 0.05% (formulările codificate F1 și F2), respectiv 0.10% (formulările codificate F3 și F4), justificate prin datele preliminare privind activitatea farmacodinamică specifică și profilul de siguranță. O formulare suplimentară codificată F5 a fost preparată prin creșterea cantităților compușilor la 0.285% (complexul meloxicam-cobalt), respectiv 0.283% (complexul piroxicam-cobalt).

Apa purificată (conductivitate sub 0.05 $\mu\text{S}/\text{cm}$) a fost obținută în cadrul unui sistem SGW Ultraclear UV Plus™, Germania. Restul reactivilor utilizați au fost de puritate analitică (*Propilenglycol*, lot 087K0112, Sigma Aldrich, SUA; *Ethanol absolute for High*

Performance Liquid Chromatography, Chromasolv, lot 91240, Sigma Aldrich, SUA; *Isopropylmyristate, synthesis grade*, lot 91994, ScharlauChemie S.A., Spania).

5.2.2. Analiza preliminară *in vitro* a permeabilității potențiale a complexelor prin piele

Detalii privind analiza preliminară a posibilei absorbții locale sau regionale a complexelor organometalici ai cuprului cu meloxicamul și piroxicamul au fost publicate sub titlul *In vitro assessments of potential topical application for organometallic complexes of copper with oxicams* (Tudosa PC et al, 2017b). Protocolul de lucru a inclus și evaluarea coeficienților de distribuție a liganzilor organici. Soluțiile stoc ale complexelor au fost preparate în dimetil-sulfoxid, având o concentrație de 200 $\mu\text{g/mL}$. Standardele de lucru (80 $\mu\text{g/mL}$) au fost obținute prin diluție cu sisteme tampon fosfat având pH în domeniul fiziologic (5.4 și 7.4) și concentrații de 10, respectiv 50 mM.

Nu au fost observate fenomene de precipitare, nivelul final al solventului organic fiind de 10%. Amestecurile binare utilizate pentru analiza fenomenelor de partiție la echilibru au fost compuse din fracții egale de 600 μL , transferate în tuburi Eppendorf de polipropilenă cu volum total de 1.5 mL. În prealabil, cele două componente au fost saturate reciproc (raport volumic 98:2).

Metodologia de procesare a probelor a inclus agitarea timp de 240 de minute prin utilizarea unui echipament BiosanMultiBio RS-24 (Biosan, Letonia), conform următoarelor secvențe: 100% vibrații, 8 secunde rotații la 90° , 170 de secunde agitare la 5° . Separarea fazelor s-a efectuat prin centrifugare (centrifugă Sartorius Sigma 2-16K, Sartorius GmbH, Germania) timp de 10 minute la 14000 rpm, temperatura fiind de 32°C pentru sistemul tampon cu pH=5.4, respectiv 37°C pentru sistemul cu pH=7.4. Determinarea cantitativă a complexelor sau a ligandului organic în stratul apos s-a realizat prin prelevarea a 400 μL , diluare adecvată și analiză spectrofotometrică. Valoarea coeficientului de distribuție a fost calculată prin logaritmare raportului concentrației analitului în compartimentele organic și apos, fiind notate $\text{LogD}_{7,4}^{\text{n-Oct}}$ și $\text{LogD}_{5,4}^{\text{IPM}}$.

A fost proiectat un protocol suplimentar având ca scop determinarea vitezei de difuzie a complexelor și a celor doi liganzi organici prin membrane artificiale care simulează proprietățile principalei bariere biologice reprezentată de stratul cornos. Astfel, membrane filtrante reprezentate de amestecuri de esteri de celuloză (Teknokroma®, cod TR-200240) cu diametrul mediu declarat al porilor de 0.45 μm au fost îmbibate în cei doi solvenți organici utilizați anterior în evaluarea coeficienților de distribuție, izopropil-miristat și n-octanol. Interfețele lipofile generate după un interval de timp de aproximativ

60 de minute au fost montate în cadrul celulelor verticale de difuzie descrise în capitoul anterior, după îndepărtare excesului de solvent prin spălare lentă cu câte 3 mL de sistem tampon fosfat. Suprafața nu a fost tamponată cu hârtie de filtru, pentru a preveni îndepărtarea lichidului rezident la nivelul porilor. Inelele dozatoare și discurile de sticlă necesare pentru a împiedica fenomenele de evaporare au fost înlocuite cu adaptoare pentru fluide cu vâscozitate redusă. Acestea au fost prevăzute în partea superioară cu capace filetate și garnituri din polimer inert. Volume de 3 mL de soluții având concentrația de 40 $\mu\text{g/mL}$ au fost preparate prin diluția soluțiilor stoc, fiind încălzite la temperatura de lucru (32°C pentru sistemul tampon cu $\text{pH}=5.4$ și membrane îmbibate în izopropil-miristat, respectiv 37°C pentru sistemul tampon cu $\text{pH}=7.4$ și membrane îmbibate în n-octanol).

Prelevarea probelor din mediul receptor s-a efectuat manual, cu ajutorul unor seringi tip Hamilton având volum de 1.0 mL. Schema de colectare a volumelor de 0.5 mL a fost următoarea: 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150 și 180 de minute de la debutul agitării. S-a optat pentru o viteză de rotație a barelor magnetice cu helix de 400 rpm, adecvată pentru omogenizarea rapidă a conținutului mediului receptor, dar și pentru menținerea integrității interfeței lipofile.

5.2.3. Studiul profilelor de cedare *in vitro* a complexilor organometalici din formulările experimentale

Testele de cedare *in vitro* au fost efectuate în condiții similare celor descrise anterior pentru studiul potențialului de permeație prin piele a entităților active sau presupus active. Dozarea formulărilor experimentale s-a realizat prin intermediul inelelor dozatoare, cu ocluzarea compartimentului donor prin discuri de sticlă, inele de aliniere și cleme. Fiecare hidrogel a fost aplicat în triplicat, iar membranele artificiale au fost îmbibate doar în mediul receptor (amestec hidro-alcoolic, 50% etanol absolut în apă purificată, degazat prin filtrare sub vid). Cantitățile totale cedate au fost prelucrate prin aplicarea modelului Higuchi, cu determinarea vitezei de difuzie, a latenței și a coeficientului de corelație (R^2), calculate pentru un număr minim de 5 puncte experimentale (Miron DS et al, 2010).

5.2.4. Determinarea cantitativă a oxicamilor și a complexilor organometalici în probele prelevate

Cuantificarea liganzilor organici și a complexilor s-a efectuat prin aplicarea unei metode spectrofotometrice. Probele de calibrare au fost preparate conform protocolului detaliat pentru soluțiile standard utilizate în determinările coeficienților de distribuție. S-a utilizat un spectrofotometru UV-Vis cu dublu fascicul tip Jasco Spectrophotometer model

V-530, dotat cu program de achiziție și prelucrare a datelor VWS-580 Spectra Manager. Maximele specifice de absorbție au fost în intervalul 355-360 nm.

5.2.5. Evaluarea comportamentului reologic

Evaluarea deformărilor structurilor semisolide ale hidrogelurilor a fost realizată la temperatura de $25 \pm 0.5^\circ\text{C}$ prin aplicarea unor teste de tixotropie. Intervalul vitezelor de forfecare a fost redus ($0-25-0 \text{ sec}^{-1}$), iar analiza comparativă a inclus ariile de sub curbă și parametrii modelului Ostwald de Waele.

5.4. Discuții

Conform datelor de literatură, complexul organometalic al cuprului cu ligand de tip oxicam a fost condiționat anterior prin înglobare în geluri speciale generate de copolimeri izopropilalchilamidici (Tamasi G et al, 2008), în prezența unor segmente ionizabile de tip histidină sau fenilalanină. Mediul apos conținând 5% dimetil-sulfoxid a fost utilizat ca receptor, considerând solubilitatea redusă a entității, se transferă între cele două compartimente separate de membrana artificială. În același timp, matricile semisolide au fost hidratate în prealabil în același solvent organic sau în metanol. Sistemele tampon apoase cu diferite pH-uri au impus precauții speciale, în special prin considerarea fenomenelor de chelatare (de exemplu, formarea complexului citrat-cupru). Metodele de determinare cantitativă au inclus evaluări complexe ale absorbției specifice în domeniul ultraviolet (cu deplasări batocrome, conform rapoartelor preliminare ale INCDCF) și de absorbție atomică. În cadrul prezentului studiu s-a optat pentru menținerea unui amestec hidro-alcoolic (50% etanol absolut) în absența informațiilor privind solubilitatea maximă a celor doi analiți, dar bazat pe concluziile preliminare privind potențialul de transfer prin piele. Sadeghi S. et al (2005) au observat un transport selectiv al ionului Cu^{2+} de către piroxicam, prin membrane lichide de cloroform, care poate fi bazat pe mascarea polarității prin coordinare.

Lee SY et al (1994) au efectuat unul din primele studii ale absorbției intestinale prin perfuzarea complexelor indometacinului cu zincul și cuprul. Rezultatele obținute prin perfuzarea segmentelor jejunale la șobolan au confirmat rolul important pe care îl au tensioactivii endogeni în traversarea barierei intestinale. În analiza realizată de Weder JE et al (2002) este amintit numărul redus de produse farmaceutice autorizate, mai ales de uz veterinar. Ambele documente confirmă caracterul lipofil accentuat al complexelor și sugerează existența unor mecanisme particulare de transfer prin membranele fosfolipidice. Dacă în cazul absorbției orale, gradientul de pH nu are un impact semnificativ asupra permeabilității complexului, iar mediile de dizolvare sunt apoase, pentru aplicarea locală la

nivelul pielii și al mucoaselor etapele critice sunt diferite. Bariera biologică vine în contact direct cu formularea nediluată, pH-ul evoluează relativ rapid de la valori de 5.4 la cele specifice plasmei, iar penetrarea se realizează printr-o succesiune de țesuturi cu densitate, hidro-lipofilicitate și mai ales capacitate de stocare distincte. Efectul excipienților asupra partiției unei entități active între stratul cornos și formularea topică este dependent de concentrație, doză aplicată, activitatea și permeabilitatea acestora.

Dezvoltarea hidrogelurilor a fost precedată de o analiză a potențialului de transfer prin piele pentru complexii cuprului. Membrana biologică a fost înlocuită de interfețe artificiale slab reactive, îmbibate în izopropil-miristat sau n-octanol.

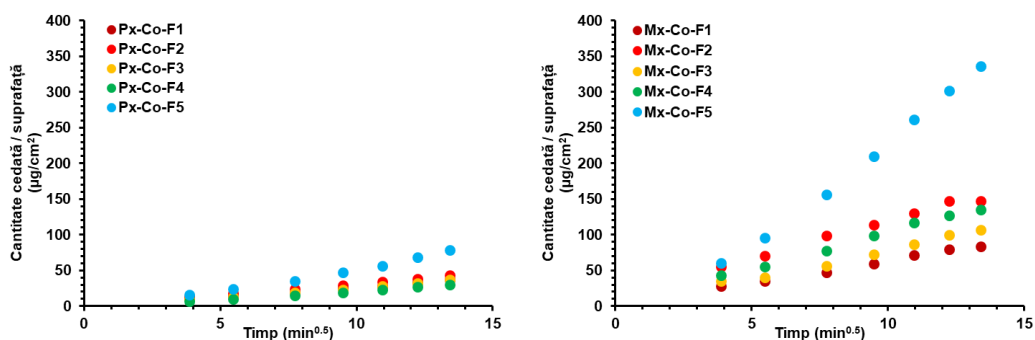
Cu toate limitările asumate prin simplitatea protocolului experimental (durata redusă, lipsa agitării la nivelul donorului, absența controlului asupra stratului organic imobilizat la nivelul membranei sau a informațiilor legate de distribuția diametrului real al porilor), datele par să confirme partiția între două compartimente apoase, separate de un segment lipofil. Saturarea acestuia este destul de rapidă, dacă se consideră latența redusă a proceselor, dar această constatare poate fi valabilă doar în condițiile unui gradient de concentrație mare.

Astfel, pentru formularea gelurilor s-a optat pentru trei niveluri de variație a compoziției: i) concentrația complexului organometalic (0.05, 0.10 și 0.283 sau 0.285%), pentru analiza relației acesteia cu viteza de cedare *in vitro*; ii) concentrația formatorului de rețea, în scopul corelării parametrilor difuzionali cu cei reologici; iii) natura promotorului de absorbție (izopropil-miristat, singur sau în amestec cu lanolină și alcool oleic). Comparativ cu etapa anterioară, procesul de preparare a fost mai simplu, iar tipul și intensitatea agitării au fost modificate. Pe de-o parte, dispersarea inițială a complexului hidrofob s-a realizat la viteze mai mari, pentru a accelera umectarea și, eventual, dizolvarea, pe de altă parte omogenizarea finală s-a efectuat în recipiente cu fund rotund, pentru a favoriza antrenarea fracției nesolubilizate.

Evaluarea relației dintre concentrația complexilor și viteza de cedare *in vitro* a confirmat solubilizarea adecvată în amestecul hidro-alcoolic care înconjoară formatorul de rețea. În cazul entităților având ca ligand organic meloxicamul, dependența este specifică unui sistem multifazic în care dizolvarea din particulele suspendate nu este etapă limitantă. Creșterea de la 6.15 la 29.48 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{min}^{0.5}$, care sugerează proporționalitatea, este dificil de asociat unei performanțe *in vivo*, din două motive. În primul rând, doza aplicată la nivelul pielii sau mucoaselor nu este pseudo-infinită, cu excepția cazului în care gelul reprezintă de fapt un sistem matricial transdermic. Pe de altă parte, amestecul hidro-al-

coolic imprimă o activitate termodinamică cvasi-constantă doar în condiții ocluzive. Modificările de compoziție (ca urmare a partiție sau evaporării excipienților) sunt dificil de coordonat cu transferul prin stratul cornos, în special în cazul substanțelor lipofile cu masă moleculară peste 800 g/mol. O altă observație importantă este legată de valoarea redusă, chiar aparent negativă a latenței procesului difuzional. Reprezintă o caracteristică a sistemelor cu o consistență redusă, pentru care eliberarea fracției dizolvate debutează rapid. De altfel, influența concentrației de carbopol (0.5 sau 1%) a fost extrem de redusă. Natura excipienților lipofili potențiali promotori ai absorbției are un impact semnificativ doar în cazul complexului meloxicam-cobalt. Atât latențele, cât și vitezele de cedare *in vitro* sunt mai mari pentru formulările reprezentând nivelul superior de doză al complexului.

Profilele medii de cedare *in vitro* ale complexșilor organometalici ai cobaltului (n=3)



Comportamentul reologic a fost unul pseudoplastic, cu valori subunitare ale indicilor de curgere. Deformările induse de traseul ascendent al vitezilor de forfecare au fost recuperate rapid, iar ariile de histeresis mici și variabile. Natura complexului organometalic nu a modificat substanțial răspunsul la stresul mecanic în condițiile menținerii temperaturii de 25°C, însă destructurările pot fi amplificate la 32°C. Prezența componentelor lipidice asociate izopropil-miristatului în compoziția excipientului Fancol® Iso a determinat scăderi ale indicilor de consistență, sesizabile doar pentru concentrația de 0.5% a poliacrilatului. Etalarea macromoleculor în direcția de curgere imprimată de mișcarea de rotație a cilindrului intern nu întâmpină o rezistență semnificativă. În același timp, distribuția entităților dizolvate din faza continuă în cea internă pare a fi redusă.

Studiile preclinice disponibile au confirmat activități antiinflamatoare și citotoxice mai pronunțate în cazul complexșilor cobaltului sau cuprului cu ligand meloxicam (de exemplu, modularea secreției de citokine proinflamatorii). Studiile *in vitro* confirmă viteza de eliberare mult mai mare comparativ cu entitățile generate de piroxicam, independent de

formularea farmaceutică. Difuzia mai rapidă, evidențiată și în cazul membranelor hidrofobizate prin îmbibare în n-octanol sau izopropil-miristat, exprimă o solubilitate în medii apoase, dar și un potențial de partiție adecvat prin bistraturifosfo-lipidice mai mare (Tudosă PC et al, 2017b).

Creșterea fracțiilor dizolvate ale complecșilor poate fi obținută prin mărirea cantității de excipienți solubilizanți. În cazul alcoolilor inferiori, care reprezintă o opțiune frecventă, scăderea vâscozității poate fi contracarată, în anumite limite, prin creșterea concentrației de polimer sau prin asocieri de agenți macromoleculari. Proiectarea formulării și aplicarea testelor combinate, reologice și de difuzie, poate semnala impactul asupra solubilității și rezistența difuzională a matricei, doi parametri critici pentru transferul către bariera biologică. În același timp, relevanța pentru performanța *in vivo* este dependentă de cunoașterea influenței asupra permeabilității percutane. Aceasta din urmă este dificil de estimat, chiar și în cazul utilizării eșantioanelor de piele, în absența fluxului sangvin care contribuie la *clearance*-ul regional.

Existența particulelor în suspensie, confirmată prin microscopie optică pentru toate cele cinci tipuri de formulări, presupune existența complexului la un nivel de solubilitate maximă în matricea semisolidă. Deși studiile de transfer prin membrane hidrofobizate au confirmat potențialul de permeabilitate al complecșilor, acesta trebuie corelat în primul rând cu un pronunțat caracter lipofil. *In vivo*, spațiile intercelulare sunt mult mai restrictive steric decât porii unei membrane artificiale având diametru mediu declarat de 0.45 μm. Acest aspect trebuie amintit mai ales în contextul în care permeabilitatea transcelulară este puțin probabilă. Astfel, se poate considera că permeația și penetrarea optime prin piele și mucoase, mai ales pentru atingerea unor concentrații evidente în straturile mai profunde, pot fi atinse doar în condițiile unei eliberări lente, sub controlul vehicolului semisolid. Acesta poate fi de tip matricial hidofil (cu relaxare microstructurală lentă) sau lipofil ocuziv.

5.5. Concluzii

1. A fost analizat potențialul de transfer al complecșilor organometalici ai cobaltului și cuprului prin interfețe hidrofobizate, utilizând un model experimental simplu (membrane artificiale inerte îmbibate în solvenți organici biorelevanți). Rezultatele experimentale au demonstrat o permeabilitate potențială prin bariere biologice, cu o dependență redusă de pH și determinată în special de caracterul lipofil pronunțat al substanțelor.

2. Cei patru complecși au fost incluși în hidrogeluri poliacrilice, în prezența excipienților solubilizanți de tip alcool inferior și a promotorilor de absorbție lipofili

(izopropil-miristat, singur sau în asociere cu lanolină și acid oleic). Solubilizarea a fost parțială, cu posibila distribuție a unei fracții variabile în picăturile fazei interne.

3. Studiile de cedare *in vitro* au dus la obținerea unei relații de proporționalitate între viteza de difuzie și concentrația complexilor, sugerând că etapa limitantă a procesului global nu este viteza de dizolvare din particulele suspendate, ci rezistența microstructurală, parametru dependent de compoziție și de procesul de fabricație.

4. Superioritatea profilelor de eficacitate demonstrată prin studii preclinice în cazul complexilor organometalici cu ligand meloxicam a fost corelată cu solubilitatea crescută în medii apoase, dar și cu potențialul adecvat de partiție prin bistraturifosfo-lipidice.

5. Comportamentul reologic a fost tipic pseudoplastic, influențat de concentrația agentului macromolecular, dar și de natura promotorului de absorbție. Analiza microstructurală poate fi utilizată în optimizarea concentrației de polimer, alături de cantitatea de alcool inferior. Considerând limitările metodologiilor *in vitro*, mai ales capacitatea redusă de simulare a complexității barierei biologice și selectivitatea acesteia față de volumul molecular al substanțelor aplicate local, o posibilă abordare alternativă ar fi selecția unor matrici din care eliberarea să se realizeze lent, controlat.

Capitolul 6.

Formularea a unor geluri transdermice conținând complecși organometalici ai cobaltului și cuprului și studiul performanțelor *in vitro*

6.1. Introducere

Pentru marea majoritate a antiinflamatoarelor nesteroidiene, atingerea unor concentrații optime la nivel regional implică o corelare a vitezei de cedare din forma farmaceutică aplicată local cu permeabilitatea stratului cornos (ca barieră majoră) și *clearance*-ul.

Considerând efectele demonstrate antiinflamatoare și antitumorale ale complexilor organometalici ai cobaltului și cuprului cu liganzi oxicami, dar și riscurile asociate utilizării unor cantități mari de promotori ai absorbției de tip alcooli inferiori volatili, s-a avut în vedere dezvoltarea unor formulări transdermice bioadezive.

Formulările prezentate și analizate în acest capitol reprezintă o abordare diferită comparativ cu sistemele poliacrilice. Formatorul de rețea modifică mecanismul de eliberare, are rol de agent de solubilizare și modifică distribuția internă a complexului.

6.2. Materiale și metode

6.2.1. Compoziția și modul de preparare al formulărilor semisolide topice conținând poloxamer

Metoda de preparare a formulărilor semisolide topice s-a realizat prin adaptarea la caracteristicile și solicitările bloc-copolimerului. Acesta a fost hidratat prin dispersare în majoritatea cantității de apă purificată prevăzută de formulă (aproximativ 90-95%), prin agitare lentă efectuată cu ajutorul unui echipament Heidolph RZR 2020 (Heidolph GmbH, Germania). Pentru a asigura intercomparabilitatea datelor experimentale, dar în special pentru obținerea unei distribuții omogene a complexilor organometalici prezentând o tendință accentuată de agregare, generată nu doar de încărcare electrostatică, dar și de intervalele largi de distribuție dimensională, agitatorul utilizat a fost de tip turbină, iar recipientele au avut un fund rotund. Următoarea etapă a fost reprezentată de stocarea dispersiei obținută anterior la temperaturi de 4-8°C timp de minim 24 de ore. Complecșii cu liganzi oxicami ai cobaltului și cuprului au fost inițial dispersați în amestecuri de etanol absolut și una din cele patru componente lipofile (cu rol multiplu, combinând în diferite proporții accelerarea a transferului paracelular, solubilizarea și destabilizarea temporară a integrității membranare, respectiv efectul emolient cu expandarea domeniilor intralamelare). Omogenizarea combinației celor două faze s-a realizat la rece, menținând agitarea moderată pentru 15 minute. La final, formulările semisolide obținute au fost lăsate în repaus, permițându-se încălzirea lentă la temperatura camerei. Restul cantității de apă a fost transferat în recipiente sub agitare lentă, timp de 5-10 minute.

6.2.2. Procedurile de testare *in vitro*

Comportamentul reologic a fost analizat prin aplicarea procedurii descrise în capitolul anterior: vâscozimetru rotațional dotat cu cilindru tip SV-DIN și volum al probei de aproximativ 10 mL; repaus al probei timp de minim 5 minute înainte de analiză, pentru recuperare structurală; determinări efectuate în triplicat; evaluare prin aplicarea modelului Ostwald de Waele pentru traseul ascendent al vitezelor de forfecare (0-25 sec⁻¹).

Pentru studiul profilelor de cedare *in vitro* au fost utilizate aceleași sisteme de celule verticale de difuzie (Hanson Microette, Hanson Research Inc.). Metoda spectrofotometrică de analiză a cantităților de complex difuzate prin membranele artificiale de polisulfonă a fost modificată. S-a folosit un spectrofotometru Agilent 8453 (Agilent Instruments, Germania), echipat cu 8 cuve de cuarț și detector de tip șir de diode. Maximele specifice de absorbție determinate în mediul receptor hidro-alcoolic au fost următoarele: 366 nm (pentru ambii complecși ai cobaltului), 361 nm (complexul piroxicam-cobalt) și 362 nm

(meloxicam-cobalt). Factorul de diluție aplicat a fost de 4.75 (0.4 mL probă și 1.5 mL mediu).

6.4. Discuții

Poloxamerii sunt bloc-copolimeri ai polioxietilenei și polioxipropilenei, având rol de stabilizanți ai soluțiilor apoase, solubilizanți și emulgatori. Valorile caracteristice ale HLB variază în limite largi în funcție de sort, între 0.5 și 30 (Rowe RC et al, 2009). Din punct de vedere al formulărilor farmaceutice de uz uman, prezintă o compatibilitate crescută cu ioni metalici, ceea ce facilitează condiționarea complexilor și asigură stabilitatea acestora. Soluțiile apoase generate la temperaturi scăzute au proprietăți termoreversibile, inducând vehicule adecvate aplicării locale (Dumortier G et al, 2006). Peste temperatura specifică termogelifierii, cele două segmente ale triblocurilor induc agregate micelare (Juhasz J et al, 1989), prin două fenomene concurente, deshidratarea grupărilor lipofile și hidratarea celor hidrofile (Dumortier G et. al, 1991). Rolul de agent de gelifiere se manifestă la un nivel crescut al concentrației, peste 15%, în timp de funcția de emulgator sau de solubilizant este corelată cu o procent mai mic de 1%. Rowe RC et al (2009) au menționat solubilitatea crescută în apă, etanol absolut și izopropanol, dar nu în propilenglicol. Astfel, în compoziția gelurilor bioadezive pe bază de poloxamer 407 (sort F-127, Pluronic sau Lutrol, BASF Corp.) s-a evitat includerea polioliilor, deși rezultatele prezentate în capitolele anterioare au confirmat utilitatea acestora (ca agent de umectare și în reglarea parametrilor microstructurali). Centrul hidrofob reprezintă un compartiment de distribuție pentru fracția dizolvată, iar structura semisolidă generată la concentrații superioare celei micelare critice stabilizează particulele solide suspendate (Florence AT et al, 2005). În combinație cu esteri ai alcoolului izopropilic sau alte componente lipofile formează vehicule promoatoare ale absorbției percutane (Allen LV et al, 2005).

Selecția acestui tip de formatori de rețea este importantă și din punctul de vedere al acțiunii farmacodinamice. Unul din obiectivele terapeutice declarate ale proiectului în cadrul căruia a fost realizată sinteza complexilor organometalici a fost sinteza unor entități cu acțiune citotoxică, utile în tratamentele oncologice. Bloc-copolimerii polioxietilen-polioxipropilenici manifestă o serie de efecte biologice, multe fără un mecanism elucidat. Astfel, Dumortier G et al (2006) amintesc chemosensibilizarea, prin intermediul fluidizării membranelor celulare, depleției ATP, suprimării sau inhibării efluxului mediat de proteine. Pentru ilustrarea impactului, analiza datelor de literatură specifică o creștere semnificativă a acțiunii doxorubicinei sau daunorubicinei, prin înglobarea în sistemul micelar a substanței medicamentoase. Creșterea penetrării în spațiul intracelular are o relevanță

deosebită în contextul aplicării locale, permițând o reducere a numărului și cantității de promotori (excipienți activi) în faza de proiectare a compoziției formelor farmaceutice semisolide topice. Nu în ultimul rând, complexitatea aparentă a vehiculului indusă de structură și nu de numărul sau interacțiunea fazelor influențează și faza farmacocinetică, prin prelungirea etapei de absorbție (Dumortier G et al, 2006). Prepararea la temperaturi reduse, determinată de reducerea vâscozității și facilitarea omogenizării, este avantajoasă și prin reducerea pierderii componentelor volatile. Numărul redus de componente simplifică viitoare teste comparative față de referința cu profil antiinflamator sau citotoxic, respectiv demonstrarea superiorității față de placebo.

Comportamentul pseudoplastic a fost comun tuturor formulărilor topice și reprezintă o proprietate esențială pentru administrarea *in vivo*. Impactul temperaturii asupra amplitudinii deformărilor nu a fost analizat în cadrul acestui protocol experimental, însă poate fi ușor estimat prin considerarea temperaturilor micelare critice. Încălzirea poate compensa, parțial sau complet, schimbările structurale obținute prin creșterea treptată a vitezelor de forfecare în domeniul $1-25 \text{ sec}^{-1}$. Diferențele de comportament reologic, destul de reduse, pot fi atribuite celor doi factori de compoziție distincți, complexului organometalic și promotorului de absorbție. Expunerea segmentelor lipofile ale ligandului determină schimbări ale interacțiunilor de natură non-covalentă, hidrofobă. Pentru ambele fracții, atât cea dizolvată cât și cea suspendată, distribuția la nivelul fazei majoritare hidroalcoolică este limitată. Predomină dispunerea intramicelară, iar rezistența difuzională la temperatura pielii este teoretic crescută.

Evaluarea profilelor de curgere prin aplicarea modelului Ostwald de Waele a condus la o grupare a celor patru formulări semisolide în două sub-categorii, în funcție de valorile indicelui de curgere. Prezența excipientului Cremophor EL sau a amestecului celor doi tensioactivi non-ionici a dus la obținerea unor vehicule opace. Ambele componente au fost utilizate în concentrații mai mari decât cele micelare critice. Din punct de vedere teoretic, faza internă s-a intercalat în rețeaua tridimensională a bloc-copolimerului, amplificând rigiditatea microstructurală. Creșterea consistenței, respectiv reducerea capacității de etalare sunt limitante ale distribuției către stratul cornos și ale permeabilității, alături de determinantele moleculare ale complecșilor (masa moleculară și lipofilitatea).

Scăderea valorilor indicelui de curgere sub 0.1 a fost dublată de o creștere a variabilității, explicabilă prin limitările dispozitivului experimental (vâscozimetru rotațional cu factor de inerție mare). Interacțiunile de tip lipofil pot fi considerate în explicarea diferențelor între formulările care diferă prin natura complexului (ion metalic și

ligand organic). Totodată, comportamentul reologic distinct a fost reflectat de viteza de cedare *in vitro*, ceea ce a confirmat caracterul discriminatoriu al testului difuzional.

Echilibrul transferului prin membranele artificiale s-a stabilit lent, profilele de cedare *in vitro* având frecvent un aspect atipic. Eliberarea complexilor din matricea semisolidă a fost bifazică, observație explicabilă prin procesele care au loc la nivelul compartimentului donor. Membrana are rol de a separa doza pseudoinfinită de mediul hidroalcoolic receptor. Considerând solubilitatea redusă a celor patru analiți, condițiile sink sunt dificil de realizat prin abordări uzuale (adăugarea unui agent solubilizant de tip alcool sau tensioactiv). Stocarea la nivelul interfețelor (membrană sau componente ale celulelor verticale de difuzie) nu poate fi exclusă, însă nu ar explica o accelerare a difuziei, evidentă după primele 30-60 de minute. Termenii modelului Higuchi corelați cu latența au avut valori pozitive pentru marea majoritate a unităților individuale de testare (46 din 48).

Unul din obiectivele studiului a fost compararea parametrilor cinetici între cele două tipuri de geluri destinate administrării locale, formulate pe baza agenților de tip poliacrilat și poloxamer. Din acest motiv, prelucrarea datelor experimentale s-a efectuat prin includerea tuturor valorilor, fără selecția intervalelor pe faza valorii coeficientului de corelație. În acest caz se poate estima că eliberarea complexilor este influențată de două fenomene succesive. Într-o primă etapă are loc difuzia fracției dizolvate aflată în imediata apropiere a membranei sau în contact direct cu mediul receptor, la nivelul porilor.

Până la depleția acestui strat limitat se desfășoară o retro-difuzie a celor două componente ale receptorului, probabil cu viteze diferite întrucât au determinante distincte. Apa poate fi antrenată în hidratarea suplimentară a segmentelor hidrofile ale bloc-copolimerului, ceea ce poate induce modificări de conformație. Expandarea compartimentului donor se traduce într-o presiune osmotică mai mare. În același timp, sensul în care se desfășoară transferul etanolului este dificil de estimat, dar cu siguranță gradientul de concentrație al analitului are o contribuție diferită pe durata testului.

Vitezele de cedare *in vitro* din sistemele termosensibile generate de poloxameri au fost mai mici decât cele determinate anterior pentru vehiculele poliacrilice (de 1.16 până la 28.81 ori mai mici), iar ordinea relativă s-a menținut cu excepția complexului piroxicam-cupru. Modificarea valorii fracției dizolvate din fiecare analit nu a atenuat impactul determinantelor moleculare. Conform celor menționate anterior, una dintre diferențele semnificative existente între cele două tipuri de formulări semisolide este dată de dependența specifică a vâscozității (și a parametrilor microstructurali în ansamblu) de temperatură. Pentru carbopoli, încălzirea treptată de la temperatura camerei la 32°C induce

o scădere de consistență, respectiv o creștere a capacității de etalare (*spreadability*) ambele favorabile interacțiunii cu stratul cornos și partiției substanței medicamentoase. Inducerea curgerii este precedată de micro-fracturi ale matricei (Metzger G et al, 2014), confirmate din punct de vedere reologic de creșteri ale valorilor modulului vâscos în zona adiacentă regiunii liniare vâscoelastice. Pentru matricile poloxamerice, creșterea de temperatură este asociată unei vâscozități mai mari, cel puțin la temperaturii inferioare celei micelare critice (TMC). Din punct de vedere biofarmaceutic, vitezele de cedare diferite fac posibile mecanisme de eliberare *in vivo* distincte. Gelurile termosensibile au fost asociate unei acțiuni transdermice și prelungite. Difuzia lentă a complexșilor se desfășoară sub controlul microstructurii, iar partiția la nivelul barierei biologice, alături de distribuția până la nivel sistemic are loc în lipsa unei stocări tisulare semnificative. Se poate estima că aplicarea locală a formulării topice lichide (de exemplu, la 2-8°C) pe suprafețe extinse și în strat subțire este urmată de gelifiere *in situ*, cu timpi de rezidență mari și eliberare lentă. Ocluzia prin intermediul unui sistem terapeutic transdermic determină creșteri de temperatură, vasodilatație și intensificare hidratării locale. Toate aceste fenomene favorizează eliberarea controlată.

Complexul meloxicam-cobalt a reprezentat un maxim al vitezei de cedare *in vitro*, independent de tipul formulării, inclusiv de cantitatea de excipienți cu rol solubilizant sau de accelerare a penetrării (11.13, respectiv 29.48 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{min}^{0.5}$, valori maxime la nivelul fiecărui grup; n=3). Corelând datele experimentale, reologice și difuzionale, s-a putut observa că impactul microstructural ale acestei substanțe este cel mai semnificativ. Cele patru formulări au avut un comportament de curgere diferit la vitezele de forfecare extreme, sugerând rolul interacțiunilor de tip lipofil (complex-segmente hidrofobe ale bloc-copolimerului). În realitate, cedările au fost de tip bifazic, valorile coeficientului de corelație pentru aplicarea modelului Higuchi fiind sub 0.98. Cea de-a doua etapă a procesului de eliberare *in vitro* s-a desfășurat cu viteze mult mai mari decât cele calculate pentru întregul interval de testare și a fost controlată de echilibrul între fracția liberă, dizolvată la nivelul fazei majoritare apoase, și cea asociată formatorului de rețea (nu distribuită în interiorul fazei lipofile, intramicelară).

Rezultatele obținute ilustrează particularitățile reologice și difuzionale ale gelurilor termosensibile. Estimarea performanței biologice și implicit a fezabilității transferului la nivel regional și sistemic impune determinări suplimentare a cel puțin doi parametri: concentrația țintă și *clearance*-ul sistemic. Masa moleculară și lipofilicitatea au valori suboptimale, prin comparație cu entitățile utilizate în prezent pentru administrare

transdermică (Prausnitz MR et al, 2008; Alkilani AZ et al, 2015). Considerând obiectivul terapeutic al sintezei celor doi complecși, dar și tabloul complex al efectelor specifice excipienților, stratul cornos și țesuturile adiacente nu reprezintă un loc de acțiune, ci mai degrabă regiuni de tranzit în care rezistența difuzională trebuie redusă. Eliberarea lentă dintr-un vehicul semisolid poate reprezenta un dezavantaj doar în contextul în care nivelul de expunere a țintei este redus. Biocompatibilitatea și bioadeziunea superioare ale poloxamerilor sunt recunoscute (Ricci EJ et al, 2005). Cele patru compoziții pot fi optimizate prin modificări ale tipului sau cantității promotorului de absorbție, dar și prin creșteri ale complexității (numărului și naturii excipienților).

6.5. Concluzii

1. Au fost dezvoltate formulări topice conținând complecși organometalici ai cobaltului și cuprului cu liganzi oxiciami, dispersați în matrici semisolide generate de bloc-copolimeri de tip polioxietilen-polioxipropilenă. Compoziția gelurilor cu posibil profil de eliberare transdermică a fost selectată astfel încât să asigure bioadeziune, biocompatibilitate și un posibil efect ocluziv.

2. Profilele de cedare *in vitro* au fost de tip bifazic, cu o primă etapă lentă determinată direct de fracția dizolvată și o a doua etapă mai rapidă, controlată de componenta asociată formatorului de rețea (nu distribuită în interiorul fazei lipofile, intramicelară). Cinetica de eliberare a fost specifică acestui tip de gel termosensibil, cu valori pozitive ale termenilor de latență și posibilă contribuție a fenomenelor de retro-difuzie.

3. Vitezele de difuzie obținute pentru sistemele de tip poloxamer au fost mai mici decât cele generate de vehiculele poliacrilice, observație corelată cu dependența diferită a parametrilor microstructurali de temperatură. Încetinirea transferului prin membranele artificiale inerte a demonstrat o rigiditate mai mare a matricei semisolide, în condițiile de lucru, amplificată de prezența tensioactivilor non-ionici incluși în concentrații mai mari decât cele micelare critice.

4. Aplicarea modelului Ostwald de Waele a sugerat faptul că atât natura complexului (ligandul oxiciam și ionul metalic), cât și tipul de tensioactiv non-ionic au avut o influență majoră asupra comportamentului reologic.

5. Estimarea performanței biologice și implicit a fezabilității transferului la nivel regional și sistemic impune determinări suplimentare a cel puțin doi parametri: concentrația țintă și clearance-ul sistemic. Cedarea lentă și o adeziune mai puternică locul de administrare, inclusiv tip de rezidență mai mari, pot favoriza distribuția transdermică.

Capitolul 7.

Dezvoltarea unor forme semisolide topice pentru complecși ai neodimului și gadoliniului cu liganzi oxicami

7.1. Introducere

Cantitățile de complecși disponibile pentru dezvoltarea formulărilor semisolide topice au fost extrem de reduse. Astfel, datele experimentale obținute pe parcursul unei etape au fost utilizate prin extrapolare la grupuri de complecși organometalici, cu optimizarea compoziției sau a modului de preparare. S-a presupus că impactul procesului de coordinare asupra caracteristicilor fizico-chimice și, implicit, asupra potențialului de transfer prin piele și mucoase, este unul redus. Ligandul expune matricei regiuni cu polaritate mai redusă, astfel încât interacțiunile cu matricea semisolidă, respectiv cu bariera biologică sunt dominate de hidrofobicitate.

Conform rapoartelor de studiu redactate de către cercetătorii INCDCF, complecșii cu oxicami (piroxicam și meloxicam) ai neodimului sunt structuri mononucleare de tip neelectrolit: $[\text{Nd}(\text{C}_{30}\text{H}_{30}\text{N}_6\text{O}_{10}\text{S}_2)_2(\text{H}_2\text{O})_2]$, $[\text{Nd}(\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{N}_6\text{O}_{10}\text{S}_4)_2(\text{H}_2\text{O})_2]$. Sinteza și caracterizarea complecșilor ampiroxicamului ($[\text{Gd}(\text{C}_{40}\text{H}_{44}\text{N}_6\text{O}_{16}\text{S}_2)_2\text{Cl}_2]\text{Cl}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$) și lornoxicamului ($[\text{Gd}(\text{C}_{26}\text{H}_{22}\text{Cl}_2\text{N}_6\text{O}_{10}\text{S}_4)_2\text{Cl}_2]\text{Cl}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$) cu gadolinu au fost publicate de Niță S. și colaboratorii (2015). Prezența lantanidelor a avut ca obiectiv combinarea acțiunii antitumorale cunoscute, eventual potențate cu efectul antiinflamator al ligandului organic. În această ultimă etapă obiectivul a fost dezvoltarea unor forme farmaceutice semisolide topice pentru cele două grupe de complecși, înglobând majoritatea informațiilor colectate anterior referitoare la rolul formatorilor de rețea, al excipienților și al influenței microstructurale a acestora.

7.2. Materiale și metode

7.2.1. Selecția compoziției formelor farmaceutice semisolide și metoda de preparare

Compozițiile formulărilor semisolide au fost selectate în funcție de rezultatele obținute anterior pentru liganzii de tip oxicami sau pentru complecșii acestora. Astfel, gelurile poloxamerice cu eliberare lentă și presupusă acțiune la nivel regional sau sistemic au fost optimizate prin includerea a doi polioli în concentrație de 5%, propilenglicol și glicerină (formule codificate F1, respectiv F2). Procentul final al formatorului de rețea a fost de 20%, iar procedura de hidratare a fost aceeași cu cea descrisă în capitolul anterior: structurarea lentă în 95% din cantitatea de apă purificată prevăzută de formulă, la temperaturi cuprinse între 4-8°C, timp de minim 24 de ore. Dispersarea complexului

neodimului în componentele alcoolice (10% etanol absolut și 5% polioli) a fost urmată de reunirea celor două faze și omogenizare (250-500 rpm).

Pentru prepararea cremelor (formulările F3 și F4) s-a folosit ca model compoziția bazei M, cea care generase anterior viteze de cedare *in vitro* maxime pentru cei patru oxicami. Au fost implementate următoarele modificări de compoziție: dublarea cantității de propilenglicol de la 10 la 20%, respectiv adăugarea a 10% glicerină.

Baza corespunzătoare compoziției F3 a fost utilizată pentru condiționarea ampiroxicamului, lornoxicamului și a complecșilor acestuia cu gadoliniu (concentrație finală 0.5%, oxicam sau echivalent), după dispersare în faza apoasă a cremei.

7.2.2. Adaptarea protocolului experimental de testare *in vitro*

Din punct de vedere al procedurilor de testare *in vitro*, s-au menținut parametrii operaționali utilizați anterior. Protocolul de evaluare a profilelor de cedare prin membrane artificiale semipermeabile a inclus șapte manevre consecutive, pentru un interval de 180 de minute. Cantități de 300 de mg de gel sau cremă au fost aplicate în condiții ocluzive pe membrane îmbibate în mediu receptor timp de 30 de minute. Testele s-au efectuat în triplicat, utilizând celule verticale de difuzie cu volum total al compartimentului receptor de 12 mL.

Pentru studiul comportamentului reologic, intervalul vitezelor de forfecare a fost identic ($0-25 \text{ sec}^{-1}$), însă perioada de repaus după încărcare a fost prelungită la 12 minute, considerând în special deformările intense specifice gelurilor de poloxamer și rolul polioliilor în aranjamentul microstructural al fazei continue, în cazul cremelor. Durata de aplicare celor trei segmente consecutive ale vitezelor de forfecare a fost de 50, respectiv 10 secunde.

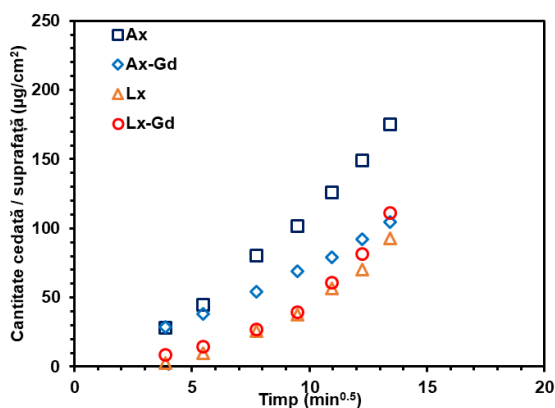
Din punct de vedere al analizei cantitative, soluțiile stoc în dimetil-sulfoxid ale celor doi complecși organometalici ai gadoliniului cu lornoxicamul și piroxicamul au avut o concentrație de 80 $\mu\text{g/mL}$. Diluțiile în mediu receptor hidro-alcoolic (50% etanol absolut în apă purificată) nu au dus la observarea unor fenomene de precipitare. Pentru liganzii organici, dizolvarea s-a realizat inițial în metanol (400 $\mu\text{g/mL}$). Cuantificarea analiților s-a efectuat prin aplicarea de metode spectrofotometrice (spectrofotometru Agilent 8453, dotat cu șir de diode și opt cuve de cuarț având drum optic de 10 mm și program de achiziție a datelor ChemstationG1115AA General Purpose UV-Vis Software).

7.4. Discuții

Una din principalele limitări raportate în testarea *in vitro* a complecșilor organometalici rămâne solubilitatea apoasă extrem de mică. Ashraf A et al (2019) au

confirmat stabilitatea redusă pentru soluții în dimetilsulfoxid, solventul organic fiind implicat în procese de înlocuire a liganzilor organici ai ruteniului sau osmiului cu analogi ai piroxicamului și isoxicamului. Procesul de coordonare are ca parametri critici pH-ul și natura solventului utilizat (Aman F et al, 2017), iar entitățile rezultate se remarcă printr-o masă moleculară mult peste limitele care asigură distribuția prin membranele biologice. Astfel, complexitatea fenomenelor de transfer din formulări semisolide cu aplicare locală este dublată de fenomene limitante specifice. Considerând gradul de similaritate structurală între lornoxicam și tenoxicam, împreună cu valorile apropiate ale vitezei de cedare *in vitro* ($9.09 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{min}^{0.5}$ pentru lornoxicam, respectiv $10.18 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{min}^{0.5}$ pentru lornoxicam-gadolinu) este foarte probabilă disocierea complexului la nivelul matricei semisolide. Pentru ligandul organic nu există dovezi privind medierea transferului prin membrane fosfolipidice, similar complexului piroxicam-cupru, astfel încât profilul farmacodinamic poate fi limitat doar la componenta antiinflamatoare, dezavantajând din punct de vedere biofarmaceutic efectul citotoxic. În același timp, pentru complexul generat de ampiroxicam, cedarea *in vitro* a reflectat în bună măsură creșterea masei moleculare amintită anterior, însoțită de amplificarea caracterului lipofil ($7.89 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{min}^{0.5}$, comparativ cu $15.21 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{min}^{0.5}$ pentru ligand; valori calculate prin aplicarea modelului Higuchi pentru profilul mediu, $n=3$).

Profilele medii de cedare *in vitro* ale oxamicilor și complexelor organometalici ai gadoliului în mediu hidroalcoolic ($n=3$, fără reprezentarea deviației standard)



O posibilă explicație pentru aparenta stabilitate este dată de flexibilitatea ampiroxicamului, indusă de prezența celor 8 legături rotabile. Aria estimată a suprafeței polare este cu 25% mai mare comparativ cu cea a lornoxicamului, ceea ce poate determina o fracție dizolvată mai mare, la nivelul fazei continue.

Contribuția propilenglicolului la performanțele *in vitro* ale formulărilor experimentale a fost estimată prin analiza comparativă cu datele generate în primul capitol al contribuțiilor originale la tema de cercetare (oxicami înglobați în matrici de tip cremă). Polioliilor le este atribuit un rol de promotor al absorbției, imposibil de reflectat în contact cu o membrană inertă din punct de vedere fizico-chimic. Propilenglicolul este menționat în cadrul ghidului preliminar EMA (2018) pentru a ilustra cazul excipienților activi, cu multiple funcții. Umectarea particulelor solide suspendate și creșterea solubilității sunt însoțite de schimbări ale comportamentului de curgere, în funcție de natura vehiculelor topice. În cazul cremelor analizate, schimbarea față de compoziția codificată baza M a fost dublarea cantității de propilenglicol de la 10 la 20%. Această opțiune a fost justificată prin hidrosolubilitatea mult mai redusă a complecșilor neodimului și gadoliniului, conform unor studii preliminare. Din punct de vedere microstructural, cremele au prezentat un comportament independent de natura ligandului sau a complexului organometalic. Menținerea profilului pseudoplastic a fost însoțită de o scădere semnificativă a indicilor de consistență (K).

Bonacucina G et al (2004) au demonstrat că propilenglicolul modifică răspunsul hidrogelurilor la stres mecanic, alterând timpii de relaxare. La nivel microstructural, polioliile sunt implicați în formarea unor rețele complexe pe baza legăturilor de hidrogen (Jensen MH et al, 2016). Acestea pot fi stabilite între diverse componente, inclusiv cu substanța activă. Pentru glicerină (foarte probabil și pentru propilenglicol), aceste rețele sunt ramificate, spre deosebire de cele cu structură preponderent liniară asociată monoalcoolorilor. Testele rotaționale efectuate cu un vâscozimetru dotat cu cilindri concentrici nu poate releva aceste interacțiuni, fiind necesară aplicarea unor deformări controlate extrem de reduse.

Pentru elucidarea mecanismului probabil prin care consistența redusă a bazei de cremă, nemodificată de prezența ligandului sau a complexului organometalic, nu a determinat o viteză de cedare *in vitro* mai mare, formularea codificată Gd-Am a fost analizată cu ajutorul unui reometru tip Haake Mars 40 (Thermo Fisher, Germania), echipat cu un dispozitiv de tip con-placă de 35 mm diametru (2°). Au fost aplicate două tipuri de teste, pentru o grosime a stratului de cremă de 0.101 mm (cu procedură de imersare lentă și recuperare structurală de 300 de secunde), la două temperaturi, 25 și 32±0.20°C. Testul oscilatoriu a fost aplicat prin controlul deformării (interval 0.01-10%) la o frecvență de 1 Hz și prin achiziția a 50 de puncte experimentale în progresie logaritmică. Cel de-al doilea set de evaluări a permis determinarea curbelor de fluaj și a tensiunii critice de curgere.

Ultimul parametru a fost corelat cu factorii de compoziție pentru liganzii dispersați în bazele de cremă.

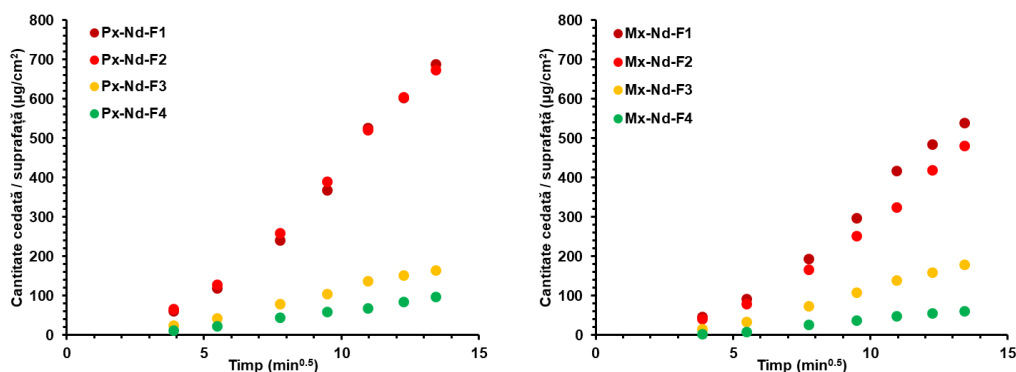
Rezultatele au demonstrat impactul major al temperaturii, implicat riscurile corelării directe între comportamentul reologic studiat în condiții specifică stocării și răspunsul difuzional *in vitro*.

Deși diferențele dintre modulul elastic și cel vâscos sunt mai mici la 32°C, lungimea domeniilor liniare vâsco-elastice a fost sensibil egală. Curbele de fluaj au confirmat amplitudini ale deformărilor de 10 ori mai mari, prin aplicarea unei tensiuni de forfecare de 10 Pa, dar este important profilul recuperării după primele 60 de minute. Regenerarea microstructurii nu atinge un platou, este lentă și continuă. Se poate estima că reformarea rețelei de cosolvenți care poate implica oxamicul, singur sau sub forma complexului organometalic, este parțial responsabilă pentru reducerea cantităților difuzate la nivelul compartimentului receptor.

O confirmare parțială a ipotezei enunțată anterior este dată de rezultatele obținute în cazul formulărilor semisolide conținând complecșii piroxicamului și meloxicamului cu neodim. Cele patru compoziții au reprezentat matrici diferite, generate de bloc-copolimeri (poloxamer 407 în concentrație de 20%, pentru gelurile codificate F1 și F2) și de baza de cremă M modificată. Prezența glicerinei a modificat comportamentul de curgere în special pentru formulările F4, măbind timpii de relaxare și inducând recuperări structurale dependente de timp. Ariile de histeresis au fost cuprinse între $656.98 \pm 167.35 \text{ Pa/s}$ pentru complexul meloxicamului și $789.75 \pm 291.26 \text{ Pa/S}$ pentru cel al piroxicamului. Modelul Oswald de Waele nu a aproximat adecvat datele experimentale în cazul acestor creme (coeficienți de corelație mai mici de 0.99), spre deosebire de formulările F3. Indicii de consistență au avut valori de 6.6 până la 9.2 ori mai mici comparativ cu cele două geluri poloxamerice.

Non-corelarea dintre rezultatelor celor două tipuri de teste a fost evidentă prin evaluarea profilelor de cedare. Modelul de eliberare a fost tipic difuzional în cazul cremelor, cu valori ale termenilor de latență reduse și coeficienți de corelație mai mari de 0.994. Profilele au avut aspect bifazic în cazul gelurilor termosensibile F1 și F2, remarcate anterior pentru formulările similare ale complecșilor organometalici ai cobaltului și cuprului. Astfel, performanța *in vitro* pare să fie influențată în principal de natura vehiculului, nu de interacțiunile cu analitul de interes.

Profilele medii de cedare *in vitro* ale complexelor organometalici ai neodimului
(n=3; deviațiile standard nu au fost reprezentate)



Înlocuirea componentelor lipofile și a tensioactivilor non-ionici cu polioli a redus volumul fazei interne în care complexul avea o distribuție preferențială. Aceasta este limitată la micellele generate de bloc-copolimer. În același timp, apa este implicată majoritar în hidratarea segmentelor hidrofiele ale poloxamerului, astfel încât propilenglicolul sau glicerina acționează preponderent ca agent solublizant sau umectant pentru particulele suspendate. Astfel, sunt explicabile valorile crescute ale vitezei de cedare *in vitro* (46.92-68.50 µg/cm²/min^{0.5})

Protocolul de lucru descris și modul de interpretare a rezultatelor pot fi adaptate în funcție de particularitățile fizico-chimice și de concentrațiile țintă, respectiv de locul de acțiune al fiecărei entități active. Extrapolarea la contextul biologic impune precauții speciale. De exemplu, vitezele de transfer prin membranele biologice sunt relevante pentru interacțiunea substanței cu o anumită matrice. Un transfer rapid către piele sau mucoase poate fi modificat prin transformări ale gelurilor sau cremelor, cum ar fi schimbarea compoziției prin penetrarea excipienților sau evaporarea lor. Existența particulelor aflate în suspensie poate facilita precipitarea la locul de acțiune. Din acest motiv, dar și prin profilul toxicologic, procentul componentelor alcoolice cu rol dual, promotor al absorbției și solubilizant, trebuie optimizat. Dar mai importantă decât proporția acestor excipienți critici este activitatea lor. Pentru entitățile hidrofobe, imobilizarea apei în rețelele fazei continue, influențată de mono sau polioli, este favorabilă difuziei. Datele experimentale prezentate anterior demonstrează acest lucru și justifică includerea parametrului activitatea apei în compararea produselor multisursă (US-FDA, monografia specifică produselor de tip cremă conținând 5% aciclovir, 2016), chiar și în condițiile similarității compoziției calitative și cantitative. La rândul său, procesul de fabricație poate influența interacțiunile dintre componente, modificând natura și intensitatea interacțiunilor. Pentru gelurile de poloxamer, aproape 95% din cantitatea de apă este utilizată pentru hidratarea bloc-co-

polimerului, ceea ce reduce activitatea acesteia. Evaluările microstructurale trebuie să includă o gamă largă de analize oscilatorii și rotaționale, care să reflecte individual elemente ale comportamentului complex al matricilor, la diferite temperaturi și pentru durate sau intensități ale stresului mecanic relevante pentru modul și metoda de administrare.

7.5. Concluzii

1. Proiectarea formelor farmaceutice conținând complecși ai oxicamilor cu lantanide s-a realizat pe baza informațiilor generate anterior în cazul entităților similare având ca ion metallic cobaltul sau cuprul. Matricile semisolide au fost de tip cremă sau geluri poloxamerice, cu mărirea cantității de polioliol având rol multiplu: agent de solubilizare, promotor al absorbției prin barierele biologice și modulator al microstructurii.

2. Modelul de eliberare a fost dependent de natura și compoziția vehiculului. Pentru creme, cedarea *in vitro* s-a realizat după un model tipic difuzional, având latență redusă. În cazul gelurilor generate de bloc-copolimeri, creșterea cantităților de complex recuperate la nivelul compartimentului receptor a fost bifazică și fără dependență semnificativă de tipul ligandului din structura compusului organometalic. Concluzia este diferită de cea formulată în cazul complecșilor cobaltului sau cuprului și are două cauze posibile: diferențele de conformație sau influența polioliolului.

3. Acest tip de excipient poate modifica substanțial distribuția complexului hidrofob în interiorul micelilor, prin reducerea activității apei, implicată preponderent în hidratarea segmentelor hidrofile ale poloxamerului. Astfel, difuzia entității cu activitate antiinflamatoare și antitumorală este favorizată, iar propilenglicolul sau glicerina acționează în special ca agent solublizant sau umectant pentru particulele suspendate.

4. Testele de tixotropie au avut o relevanță redusă în acest caz, confirmând doar comportamentul pseudoplastic fără a oferi o imagine adecvată despre interacțiunile din interiorul fazei continue.

5. Pentru confirmarea modificării mecanismelor de eliberare din matricile semisolide s-au efectuate teste reologice suplimentare, incluzând curbe de fluaj și analize ale regiunilor liniare vâsco-elastice, atât la temperatura ambiantă, cât și la cea specifică pielii. Rezultatele confirmă necesitatea unor evaluări microstructurale mai complexe, capabile să reflecte răspunsul formelor farmaceutice la diferite tipuri și intensități de stres mecanic.

Capitolul 8.

Concluzii privind formele farmaceutice semisolide

8.5. Concluzii generale

1. Solubilitatea redusă a complexșilor organometalici conținând liganzi din grupul oxamicilor reprezintă proprietatea care influențează major atât dezvoltarea de formulări semisolide cu aplicare locală, cât și metodologiile *in vitro* care să reflecte calitatea farmaceutică și potențialele performanțe după administrarea *in vivo*. Utilizarea agenților solubilizanți având funcții multiple, inclusiv de promotori ai penetrării percutane este opțiunea uzuală, însă datele experimentale prezentate confirmă impactul microstructural al acestora. Astfel, este recomandată corelarea profilelor de cedare *in vitro* prin membranele artificiale cu studiul comportamentului reologic.

2. Viteza de eliberare a substanței cu potențială utilitate terapeutică trebuie interpretată în contextul în care compoziția și structura vehiculului pot suferi modificări după administrare. În același timp, stocarea complexului la nivelul diferitelor țesuturi ale pielii poate reduce gradientul de concentrație care controlează procesul de difuzie, ducând la non-corelări *in vitro in vivo*.

3. Solubilitatea complexșilor în geluri sau creme este un parametru important, dar nu critic pentru transferul prin membranele biologice. Dizolvarea a fost incompletă, fracții variabile de particule suspendate fiind observate în cazul tuturor formulărilor experimentale. O aplicație importantă a testelor de cedare *in vitro* este analiza relației dintre concentrație și viteza de difuzie, nu doar din punct de vedere al validării metodei. Obținerea unor profile atipice de eliberare, de exemplu a deviațiilor de la linearitate pentru aplicarea modelului Higuchi, reprezintă schimbări ale matricei pe durata testului, chiar în condiții ocluzive și de doză pseudoinfinită.

4. Identificarea locului de acțiune, local, regional și sistemic, precum și concentrația țintă impun alegerea factorilor de formulare. Gelurile poloxamerice prezintă avantajele bioadeziunii și a solubilizării avansate, iar eliberarea lentă, controlată a complexului poate fi favorabilă unui profil prelungit de acțiune.

5. Studiile efectuate sunt utile din perspectiva condiționării și evaluării unor entități cu un pronunțat caracter lipofil. În mod specific, datele preclinice existente au confirmat activitatea antiinflamatoare și antitumorală a complexșilor organometalici cu liganzioxicami, însoțite sau nu de synergism. Pentru continuarea cercetărilor sunt necesare date experimentale suplimentare referitoare la profilul de siguranță și pentru elucidarea mecanismelor implicate în biodistribuție.

BIBLIOGRAFIE

Tudosă CP, Lupuleasa D, Mitu MA, Hîncu L, Rădulescu FS, Miron DS. *In vitro* evaluation of semisolid topical formulations containing organometallic complexes of copper and cobalt with toxicams. *Studia Universitatis Vasile Goldis Arad, Seria Stiintele Vieții* 2017a;27(2):115-120.

Tudosă CP, Lupuliasa D, Mitu MA, Hîncu L, Rădulescu FS, Miron DS. *In vitro* assessments of potential topical application for organometallic complexes of copper with toxicams. *Farmacia* 2017b;65(6):819-823.

Lista lucrărilor elaborate în cadrul cercetărilor doctorale prezentate la manifestări științifice organizate de asociații profesionale naționale și internaționale

Munteanu AC, Cioacă D, Oprea I, Niță S, Andrieș A, **Tudosă CP**, Drăgănescu D, Bodnar C. Development of genotyping assays for personalized medicine. SoAS 2014: School of Advanced Studies Biowaivers, development of in vitro - in vivo correlations and quality generic drugs, București, 9-11 iulie 2014. Poster P2, rezumat publicat în volumul manifestării (Editura Universitară "Carol Davila" București). ISBN: 978-973-708-773-7.

Bodnar C, Munteanu AC, Cioacă D, Oprea I, Andrieș A, **Tudosă CP**, Drăgănescu D. Detection of inflammatory cytokine gene's polymorphisms in dental medicine. SoAS 2014: School of Advanced Studies Biowaivers, development of in vitro - in vivo correlations and quality generic drugs, București, 9-11 iulie 2014. Poster P3, rezumat publicat în volumul manifestării (Editura Universitară "Carol Davila" București). ISBN: 978-973-708-773-7.

Munteanu AC, Niță S, Cioacă D, Fița AC, Andrieș A, **Tudosă CP**, Drăgănescu D. Elaboration of protocols for direct amplification of genes from gram positive bacteria (*Deinococcus Radiodurans*). SoAS 2014: School of Advanced Studies Biowaivers, development of in vitro - in vivo correlations and quality generic drugs, București, 9-11 iulie 2014. Poster P4, rezumat publicat în volumul manifestării (Editura Universitară "Carol Davila" București). ISBN: 978-973-708-773-7.