

Sinteza termosenzitivnih hidrogelova na bazi poli(*N*-izopropilakrilamida), inkapsulacija i praćenje kontrolisanog otpuštanja paracetamola

Ispitivana je potencijalna upotreba termosenzitivnih hidrogelova inkapsuliranih paracetamolom kao sistema za kontrolisano otpuštanje leka. Negativna termosenzitivnost hidrogelova iskorišćena je kao okidač za kontrolisano otpuštanje antipiretika. Sintetisani su negativno termosenzitivni hidrogelovi na bazi poli(*N*-izopropilakrilamida): poli(*N*-izopropilakrilamid) (PNIPA), interpenetrirajuća polimerna mreža poli(*N*-izopropilakrilamida) (IPN PNIPA) i poli(*N*-izopropilakrilamid) kopolimerizovan sa butil-metakrilatom (PNIPAcobMA). Ovi hidrogelovi su inkapsulirani paracetamolom i praćeno je kontrolisano otpuštanje paracetamola na temperaturama između normalne i povišene telesne temperature (od 36 do 42 stepena celzijusa). HPLC analizom kinetike otpuštanja leka potvrđeno je da PNIPA i PNIPAcobMA hidrogelovi nisu dovoljno termosenzitivni u željenom opsegu temperatura. Analizom kinetike otpuštanja leka kod IPN PNIPA hidrogelova uočena je odlična termosenzitivnost u uskom opsegu temperatura, i dobijena linearna zavisnost oslobođene koncentracije leka sa vremenom u prvom vremenskom periodu, koji je i ključan za njegovo delovanje. Ovo ukazuje da se IPN PNIPA hidrogelovi potencijalno mogu koristiti kao sistem za kontrolisano otpuštanje paracetamola.

Uvod

Paracetamol je lek koji se koristi za snižavanje povišene telesne temperature. Lek se uglavnom primenjuje tek kad se telesna temperatura poveća, što izaziva određeni period čekanja na njegovo dejstvo pod temperaturom, imajući na umu da se maksimalne koncentracije paracetamola u plazmi postižu nakon pola do dva sata. Takođe, primenjuje se i kada je povećanje telesne temperature usled bolesti očekivano, pre povišenja, da bi se izbegli simptomi bolesti, što može dovesti do nuspojava.

Moguće rešenje ovog problema je kontrolisano otpuštanje leka. Jedan od načina za takvo kontrolisanje je pomoću hidrogelova (Nazar 2012). Hidrogelovi su trodimenzionalne polimerne mreže koje mogu da upiju velike količine vode ili vodenih rastvora, čak do 90% njegove mase. Termosenzitivni hidrogelovi reaguju na promenu temperature zbog čega mogu imati široku primenu, poput kontrolisanog otpuštanja lekova. Postoje pozitivno i negativno termosenzitivni hidrogelovi. Naglo bubrenje ili odavanje vode pri promeni temperature dovodi i do otpuštanja supstance iz unutrašnjosti hidrogela. Negativno termosenzitivni hidrogelovi su oni koji se na višim temperaturama skupljaju i otpuštaju svoj sadržaj, a na nižim bubre (Qiu i Park 2001) (slika 1).

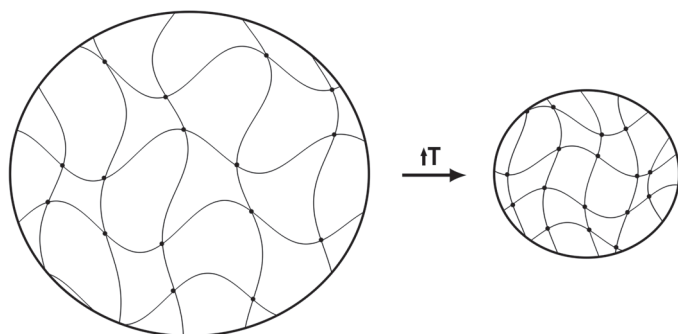
Cilj ovog rada je sinteza negativno termosenzitivnih hidrogelova i ispitivanje efikasnosti otpuštanja inkapsuliranog paracetamola na temperaturama između 36 i 42 stepena celzijusa.

Materijal i metode

Ovo istraživanje se sastoji iz sinteze tri tipa termosenzitivnih hidrogelova na bazi poli(*N*-izopropilakrilamida). Hidrogelovi su inkapsulirani paracetamolom, i posmatrano je kontrolisano

Dunja Arsenijević (2000), Beograd, učenica 3. razreda Treće beogradske gimnazije

MENTOR: Anamarija Nikoletić, student Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu



Slika 1. Shema otpuštanja lekova po sistemu prekidača (hidrogel se skuplja zbog povišenja temperature i dolazi do otpuštanja leka)

Figure 1. Scheme of on-off drug release system (hydrogel shrinks due to a rise in temperature causing drug release)

otpuštanje leka na temperaturama između telesne i povišene telesne temperature.

Neophodne hemikalije. Za potrebe ovog eksperimenta korišćene su sledeće hemikalije: *N*-izopropilakrilamid (NIPAm, Sigma Aldrich), *N,N'*-metilenbisakrilamid (MBAA, Sigma Aldrich), butil-metakrilat (BMA, sintetisan), amonijum-persulfat (APS, Sigma Aldrich), *N,N,N',N'*-tetrametiletilen diamin (TEMED, Sigma Aldrich).

Sinteza BMA. Butil-metakrilat je sintetisan dodavanjem 15 mL metilen-hlorida, 10 mL trietilamina i 4.9 mL butanola u balon koji je postavljen u ledeno kupatilo i ukapavano je 5 mL metakriloil-hlorida rastvoreno u 10 mL metilen-hlorida. Nakon 15 minuta balon je izvađen iz ledenog kupatila i sadržaj je mešan sat vremena na sobnoj temperaturi. Nakon toga je butil-metakrilat ekstrahovan iz smeše dodavanjem 10 mL vode i 10 mL HCl, organski sloj je osušen anhidrovanim Na_2SO_4 . Nakon filtriranja, rastvor je uparen do suva, pri čemu je dobijen BMA.

Sinteza polimera

1. Sinteza PNIPAA-co-BMAm. U vijalici je rastvoreno 50 mg NIPAAm, 24 μL BMAm, 0.9 mg MBAAm i 0.9 mg APS sa 280 μL destilovane vode, i produvan je argon tokom 10 minuta. Nakon što je dodato 36 μL TEMED kao redoks inicijatora, polimerizacija je trajala 24 h na sobnoj temperaturi (Caykara *et al.* 2006). Dobijeni hidrogel je ispiran destilovanom vodom radi uklanjanja neizreagovanih monomer.

2. Sinteza PNIPAAm. U vijalicu je dodato 17 mg NIPAAm, 0.34 mg MBAAm (2% mase u odnosu na NIPAAm) i 0.2 mg APS. Razblaženi su sa 260 μL vode, i zatim je dodato 0.2 μL

TEMED. Kroz rastvor je produvan argon tokom 5 minuta i polimerizacija je trajala 3 h (Zhang *et al.* 2004). Ovaj postupak je ponovljen do dobijanja željenog broja hidrogelova.

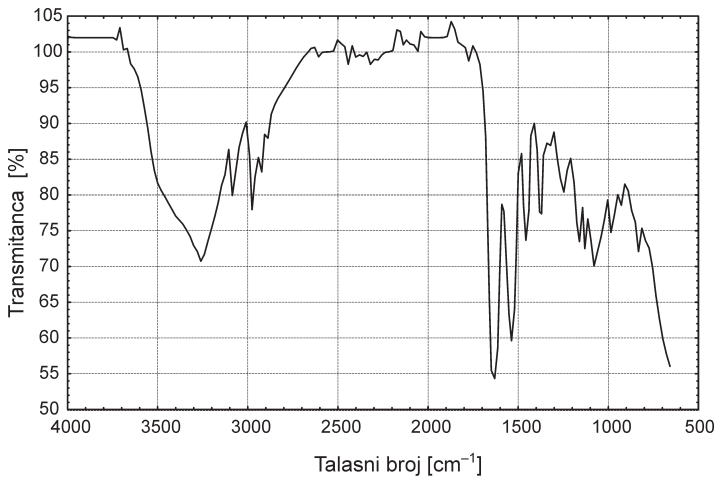
3. Sinteza IPN PNIPAA. Za sintezu IPN PNIPAA nastavljena je polimerizacija PNIPAA hidrogela. Nakon 3 h hidrogelovi su izvađeni iz vijalica i odvojeno postavljeni u čaše sa destilovanom vodom, i voda je menjana na svakih sat vremena tokom 5 h, da bi se sprali neizreagovali monomeri sa hidrogela, što je praćeno spektrofotometrijski (Thermo Scientific, Evolution 60 UV-Visible spectrophotometer), gde je posmatran nestanak pika kome pripada NIPAA. Kada se spektar uzorka poklapao sa slepom probom koju čini destilovana voda, nastavljena je dalja polimerizacija. Napravljen je monomerni rastvor tako što je u vijalicu dodato 0.75 mg NIPAAm i 0.15 mg MBAAm, i dodato je 220 μL vode. U ovaj rastvor su dodati mokri hidrogelovi, produvan je argon tokom nekoliko minuta, vijalice su zatvorene i odložene dok hidrogel nije upio većinu rastvora (najmanje 6 h). Zatim je u vijalice dodato 0.3 mg APS i 0.75 μL TEMED, produvan je argon kroz rastvor iznad hidrogela, i vijalica je zatvorena i odložena na 22 h. Hidrogelovi su potom izvađeni iz vijalica i postavljeni u vodu da se isperu od neizreagovanih hemikalija.

Kontrolisano otpuštanje leka. Hidrogelovi su nakon ispiranja izvađeni iz vode i tokom 5 h bili potopljeni u 10 mL rastvora paracetamola u fosfatnom puferu, čija je pH 7.4. Nakon toga hidrogelovi su isprani destilovanom vodom i potopljeni u 1 mL fosfatnog pufera u ependorfu, postavljenog u termostat. Ispitivano je otpuštanje paracetamola na 36, 38, 40, 41 i 42 stepena celzijusa. Uzeti su alikvoti datog rastvora na 5, 10, 15, 20, 30, 45 minuta, 1, 2 i 3 časa. Instrument

koji je korišćen za analizu uzoraka je HPLC hromatograf. Za HPLC je korišćena metoda koji ima sledeće parametre: Hypersil Gold kolonu (50 × 3 mm), protok od 1 mL/min, UV detekciju na 243 nm. Kao eluent upotrebljeni su voda i metanol (90 : 10).

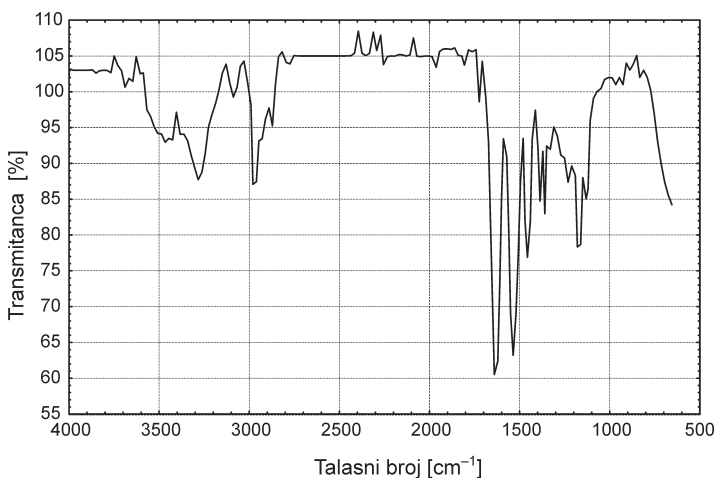
Rezultati

Nakon sušenja hidrogelova do konstantne mase, snimljeni su FTIR spektri (Thermo Scientific Nicolet iS10). Na slikama 2–4 prikazani su spektri PNIPA, PNIPAcOBMA i IPN PNIPA hidrogela. Svi FTIR spektri se poklapaju sa spektrima iz literature (Seddiki *et al.* 2012).



Slika 2. FTIR spektar PNIPA

Figure 2. FTIR spectrum of PNIPA



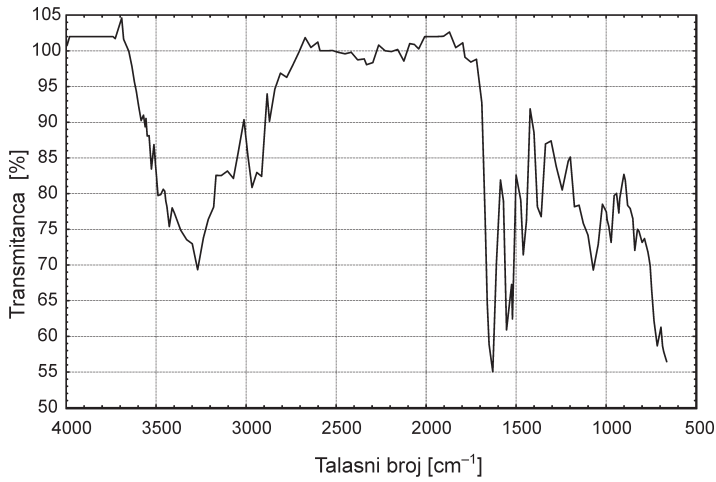
Slika 3. FTIR spektar PNIPAcOBMA

Figure 3. FTIR spectrum of PNIPAcOBMA

Otpuštanje paracetamola iz IPN PNIPA hidrogelova

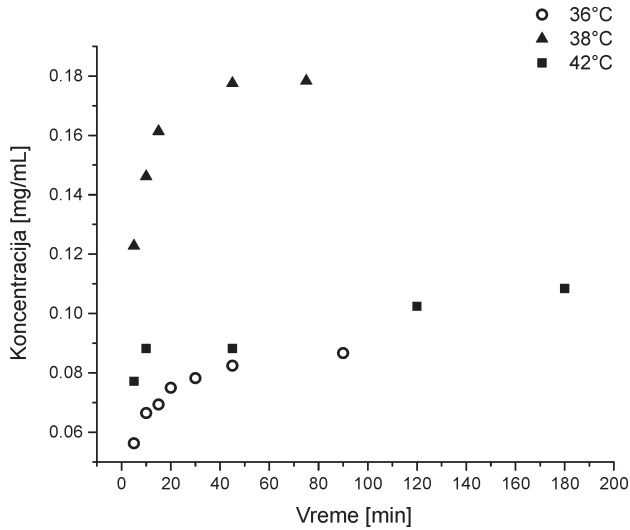
Prikazani su rezultati kontrolisanog otpuštanja paracetamola na temperaturama od 36, 38 i 42 stepena (slika 5). Sa datog grafika možemo videti da je zavisnost koncentracije otpuštenog leka od vremena linearna u prvom vremenskom periodu, koji je i ključan za efektivno dejstvo leka. Lek se postepeno oslobađa tokom vremena, i tek nakon jednog sata vrednost oslobođenog leka postaje konstantna.

Prikazana je srednja vrednost procenta otpuštenog paracetamola, na određenim temperaturama, za IPN PNIPA hidrogel (slika 6). Iz



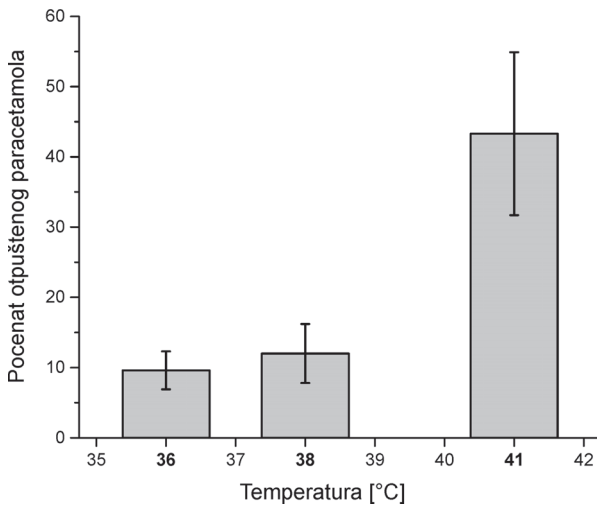
Slika 4. FTIR spektar IPN PNIPA

Figure 4. FTIR spectrum of IPN PNIPA



Slika 5. Prikaz kontrolisanog otpuštanja paracetamola na temperaturama od 36, 38 i 42 stepena

Figure 5. Controlled release of paracetamol at 36, 38 and 42 degrees



Slika 6. Srednja vrednost otpuštenog paracetmola za IPN PNIPA hidrogel (vertikalnim crtama je označena standardna devijacija)

Figure 6. Average value of released paracetamol from IPN PNIPA hydrogel (vertical bars denote standard deviation)

datih rezultata možemo da uočimo veliku promenu u otpuštanju paracetamola između 38 stepeni i 41 stepena, čime se dokazuje termosenzitivnost datog hidrogela. Eksperiment je ponovljen još 3 puta.

Otpuštanje paracetamola iz PNIPA hidrogelova

Ispitivana je i termosenzitivnost PNIPA hidrogelova za koji se pokazalo, u skladu sa literaturom, da se otpuštanje paracetamola ne menja sa porastom temperature u datom opsegu. Srednja vrednost promene procenta otpuštenog paracetamola iz PNIPA hidrogelova pri povišenju temperature, zasnovana na maksimalnoj vrednosti količine otpuštenog leka iznosi 0.45% (standardna devijacija je 0.32). Otpuštanje je praćeno na temperaturama od 36, 38 i 41 stepeni. Eksperiment je rađen u duplikatu.

Otpuštanje paracetamola iz PNIPAcobMA hidrogelova

Udeo otpuštenog paracetamola pri različitim temperaturama prikazan je u tabeli 1. U skladu sa time da PNIPA hidrogel nije termosenzitivan u datom opsegu temperatura, njegovom kopolimerizacijom očekivano je minimalno povećanje termosenzitivnosti.

Tabela 1. Procenat otpuštenog paracetamola iz PNIPAcobMA hidrogela

Temperatura	Udeo otpuštenog paracetamola (%)
36	4.6
38	5.5
41	8.3

Tabela 2. Masa otpuštenog paracetamola iz različitih hidrogelova na temperaturi od 41°C

Hidrogel	Masa otpuštenog paracetamola na 1 g hidrogela (mg)
PNIPA	2.7
PNIPAcobMA	6.4
IPN PNIPA	21.3

U tabeli 2 prikazane su mase otpuštenog paracetamola na 1 g hidrogela iz različitih tipova hidrogelova. Uočeno je da, u skladu sa najvećom osetljivosti na temperaturu, IPN PNIPA hidrogel otpušta najviše paracetamola.

Zaključak

IPN PNIPA hidrogelovi su pokazali odličnu termosenzitivnost i veliku razliku u koncentraciji otpuštenog leka u zavisnosti od toga da li je telesna temperatura povišena. Takođe, praćenjem otpuštanja na određene vremenske periode, uviđeno je da se lek otpušta kontinualno, čemu se teži kod kontrolisanog otpuštanja lekova. Da bi dati hidrogelovi mogli da imaju primenu u smanjivanju telesne temperature, potrebno je naredna istraživanja usmeriti ka ispitivanju maksimalne količine paracetamola hidrogel može da inkapsulira.

Literatura

- Caykara T., Kiper S., Demirel G. 2006. Thermosensitive poly(N-isopropylacrylamide-co-acrylamide) hydrogels: Synthesis, swelling and interaction with ionic surfactants. *European Polymer Journal*, **42**: 348.
- Nazar H. 2012. Preparation and Evaluation of a Thermosensitive Hydrogel for the Nasal Delivery of Insulin. PhD thesis. University of Portsmouth, Winston Churchill Ave, Portsmouth PO1 2UP, UK
- Qiu Y., Park K. 2001. Environment-sensitive hydrogels for drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **53**: 321.
- Seddiki N., Aliouche D. 2012. Synthesis, rheological behavior and swelling properties of copolymer hydrogels based on poly(N-isopropylacriladmid) with hydrophilic monomers. *Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia*, **27** (3): 447.
- Zhang X. Z., Wu D. Q., Chu C. C. 2004. Synthesis, characterization and controlled drug release of thermosensitive IPN-PNIPAAm hydrogels. *Biomaterials*, **25**: 3793.

Dunja Arsenijević

Synthesis of Poly(*N*-Isopropylacrylamide) Based Thermosensitive Hydrogels, Encapsulation with Paracetamol and Controlled Drug Release

The potential use of paracetamol encapsulated negatively thermosensitive hydrogels as a controlled drug release system was studied. Negative thermosensitivity was used as a trigger for controlled drug release of the antipyretic. Poly(*N*-isopropylacrylamide) based negatively thermosensitive hydrogels were synthesized: poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNIPA), interpenetrating polymer network poly(*N*-isopropylacrylamide) (IPN PNIPA) and poly(-isopropylacrylamide) copolymerized with butyl methacrylate (PNIPAcobMA). These hydrogels were encapsulated with paracetamol by placing

them in a paracetamol solution, and the drug diffused into the hydrogel. Controlled release of paracetamol was observed between regular and elevated body temperature, in the range between 36 and 42 degrees. Samples were taken at predetermined time periods for 3 h after the exposure of encapsulated hydrogels to different temperatures. By HPLC analysis of paracetamol samples released from PNIPA and PNIPAcobMA hydrogels, it was determined that they are not thermosensitive enough in the desired temperature range. By analysis of drug samples released from IPN PNIPA hydrogel, great thermosensitivity in a small temperature range was observed. Linear dependence of loaded drug concentration with time, in the first time period, crucial for its action, was proven. The results show that IPN PNIPA can be used as a drug release system, because the drug releases continually, while most of the drug is released in the first time period, by linear dependence, which is desired when forming these systems. 