

Raport stiintific

privind rezultatele obtinute in cadrul proiectului

“Pansamente pentru vindecarea inteligenta a ranilor”

Contract NR. 47/2021, perioada 1 ianuarie 2021 – 31 decembrie 2021

Proiectul si-a propus realizarea de fibre dublu functionalizate prin iminare cu doua aldehide cu proprietati complementare, antimicrobiene si de imbunatire a activitatii antimicrobiene, in vederea realizarii de bandaje resorbabile pentru vindecarea ranilor. Proiectul a propus atingerea acestui obiectiv principal prin realizarea a 8 activitati. Activitatile au fost realizate conform Anxei -Plan de realizare din anexa contractului 47/2021, si rezultatele au fost disseminate in conformitate cu planul de activitati propus, asa cum va fi expus in cele ce urmeaza.

1.1.Obtinerea de fibre de chitosan prin electrofilare

Fibrele de chitosan au fost obtinute prin electrofilarea unui amestec de chitosan (126 kDa, DA=97%)/PEO (1000 kDa) (2/1, w/w) dintr-o solutie 2.1% in acid acetic 80%, aplicand un voltaj de 0.7 kV, un debit de 0.4 mL/h, o distanta ac-colector de 10 cm, si o rotatie a colectorului de 800 rpm. Fibrele obtinute au fost spalate intr-o solutie de NaOH 5% pentru indepartarea acidului acetic, spalate apoi cu apa pana la pH neutru pentru indepartarea PEO-ului, si apoi uscate prin liofilizare.

1.2.Functionalizarea fibrelor de chitosan prin reactia de iminare cu doua aldehide bioactive

Fibrele de chitosan obtinute prin indepartarea PEO-ului au fost reactionate in sistem heterogen cu aldehida boronica (2FPBA) si citral, in diverse rapoarte molare a gruparilor functionale amina/aldehida (Tabel 1), prin imersarea fibrelor de chitosan intr-o solutie a celor 2 aldehide, si mentinerea acestora la 55 °C timp de 24 ore. Cand timpul a expirat, vasul de reactie a fost descoperit permitand evaporarea etanolului. In final fibrele au fost spalate cu etanol de trei ori consecutiv pentru indepartarea aldehydelor nereactionate, si uscate in vacuum la 50°C, 24 h.

Tabel 1. Parametri de reactie pentru obtinerea fibrelor functionalizate si codul produsilor

Cod	C0	C0.25	C0.5	C0.75	C1
NH ₂ /CHO ₂ FPBA/CHO _{citral} raport molar	1/0/1	1/0.25/0.75	1/0.5/0.5	1/0.75/0.25	1/1/0
CS/2FPBA/Citral Greutate (g)	0.1593/ 0/ 0.1512	0.1535/ 0.0037/ 0.1183	0.3142/ 0.1435/ 0.1599	0.1541/ 0.1118/ 0.0424	0.1639/ 0.1585/ 0
GC (%)	-*	11	22	39	56
R (%)	-*	44	44	52	56

GC: grad de conversie a gruparilor amina ale chitosanului in grupari imina generate de 2FPBA; R: randament de reactive; *nu a putut fi determinat

Schema de reactie a fibrelor de chitosan cu cele doua aldehide este redata in Figura 1.

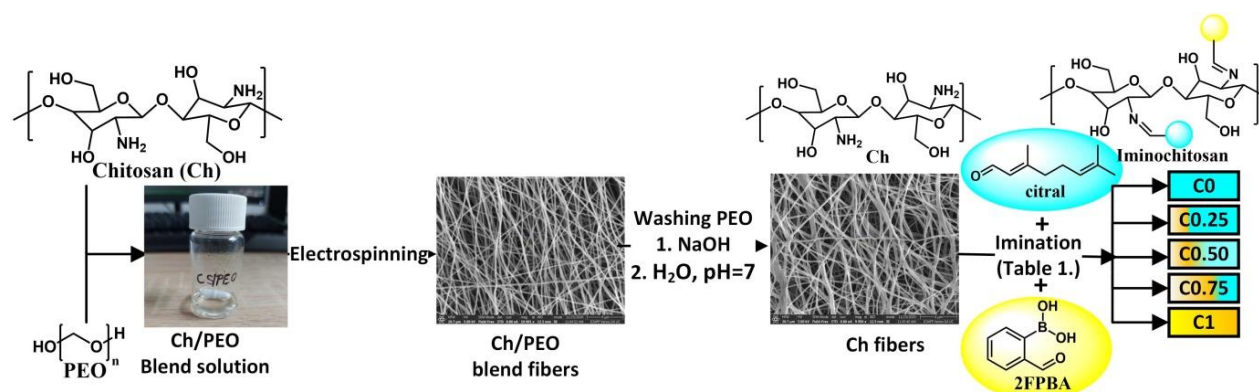


Figura 1. Obtinerea de fibre dublu iminate de chitosan

1.3. Caracterizarea fibrelor din punct de vedere structural

Gradul de transformare a gruparilor amina in legaturi imina a fost calculat din spectrele RMN inregistrate pe solutiile obtinute prin dizolvarea fibrelor in HCl 16%, cu ecuatiile: $\eta = (A_{\text{CH=O}} / (A_{\text{H2}} * 0.97)) * 100$, unde $A_{\text{CH=O}}$ reprezinta integrala protonului aldehydic si A_{H2} integrala protonului 2 din chitosan. Trebuie precizat faptul ca prin dizolvare in acid clorhidric echilibrul reactiei de iminare cu 2FPBA a fost complet deplasat catre reactanti, in timp ce legatura imina din citral nu a fost afectata, parte din fibre ramanand practice nedizolvate. Rezultatele acestor calcule sunt prezentate in Tabelul 1.

Dubla iminarea a fibrelor de chitosan a fost confirmata prin spectroscopie FTIR care a aratat benzi de vibratii specifice pentru cele doua legaturi imina, la 1634 cm⁻¹, si respectiv 1649 cm⁻¹. In plus, au fost decelate in spectru benzi specifice legaturii duble din nucleul aromatic al 2FPBA (1564 cm⁻¹) si ale unitatii de acid boronic (760 cm⁻¹) (Figura 2).

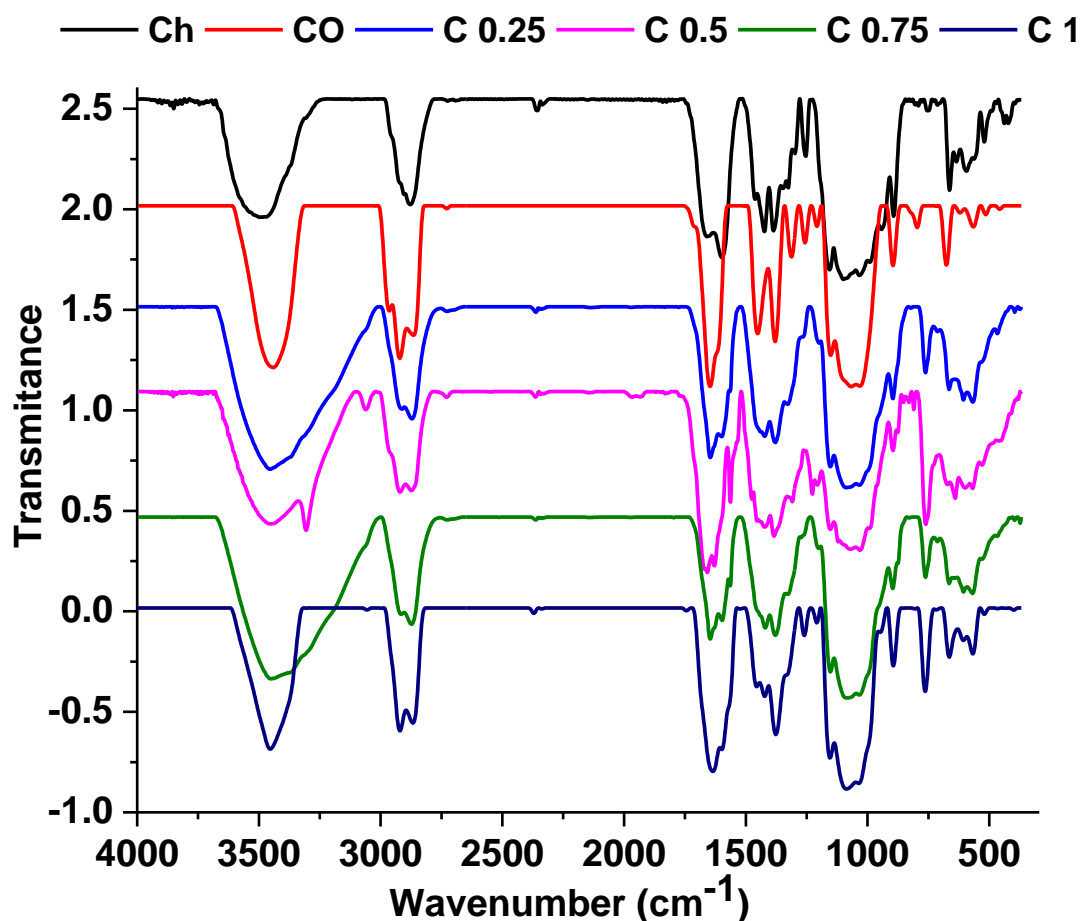


Figura 2. Spectre FTIR ale derivatilor iminati si chitosanul martor.

Spectrele ^1H -RMN au aratat deplasările chimice specifice protonilor din alchida 2FPBA (7.5-8 ppm pentru protonii aromatici, 9.8 ppm pentru protonul din gruparea alchida, 1-2 ppm pentru protoni alifatici din citral) si chitosan (2.9 – 4 ppm) (Figura 3).

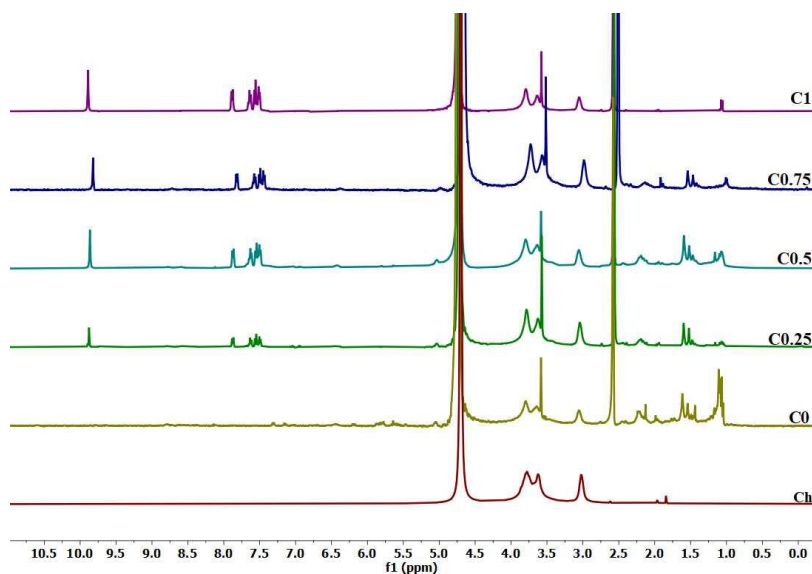
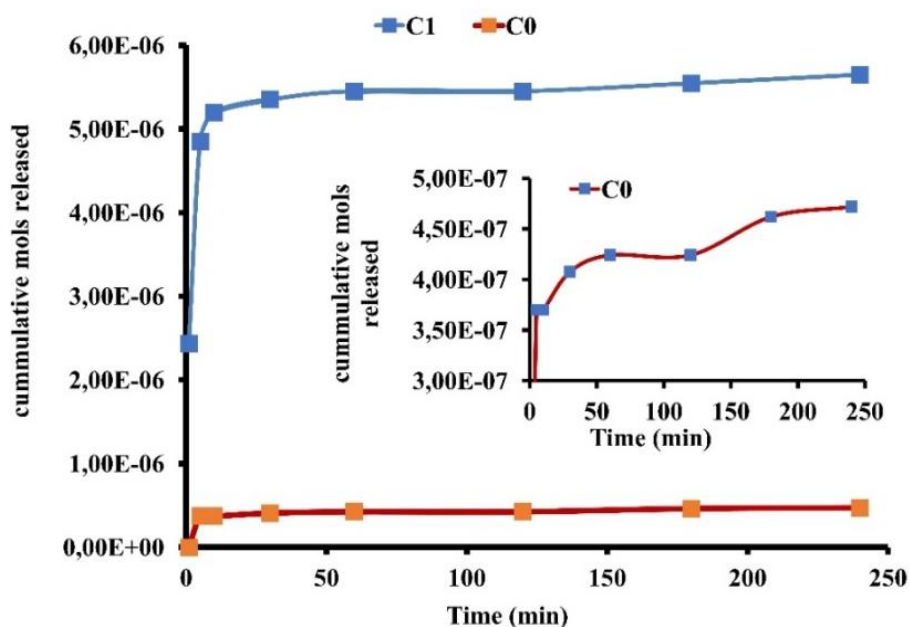
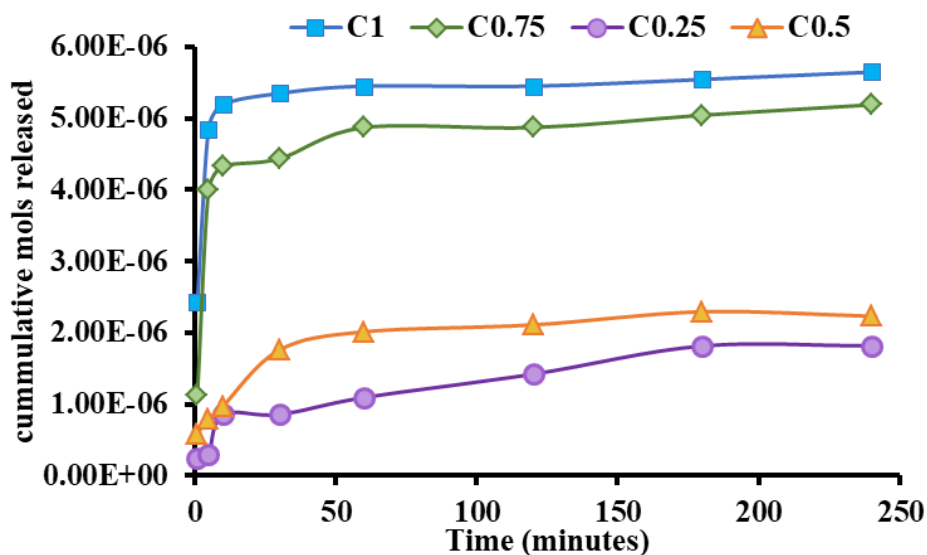


Figura 3. Spectrele ^1H -RMN ale solutiilor de fibre dizolvate in D_2O -HCl 16%

In plus, caracterul dinamic al legaturii imina a fost investigat prin spectroscopie UV-vis, prin masurarea benzilor de absorbtie a celor doua aldehide (Figura 4). Asa cum se poate remarca, aldehida boronica se elibereaza de 10 ori mai rapid decat citralul, cel mai probabil datorita hidrofilicitatii mai mari.



a)

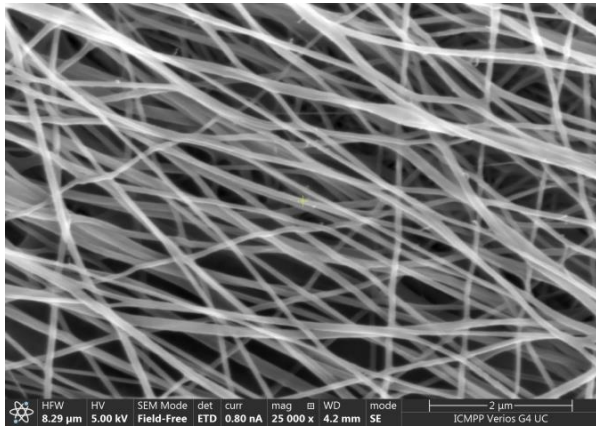


b)

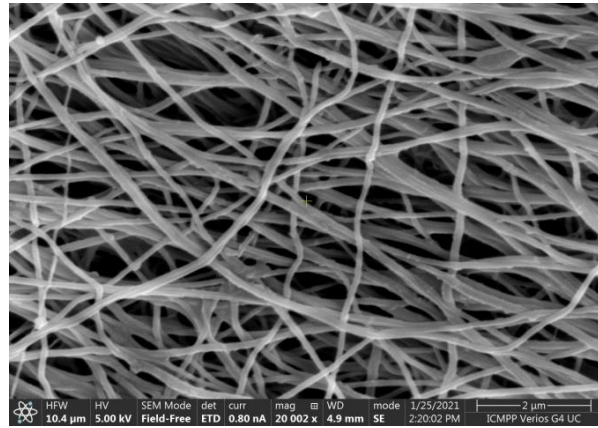
Figura 4. a) Elibearea cumulativa a celor 2 aldehide in 24 ore (inset: eliberarea citralului din fibrele C0). b) Eiberarea cumulativa a 2FPBA in 24 ore. Pentru o comparare cat mai corecta, cantitatea de aldehida eliberata a fost exprimata in moli.

1.4 Caracterizarea fibrelor din punct de vedere supramolecular si morfologic

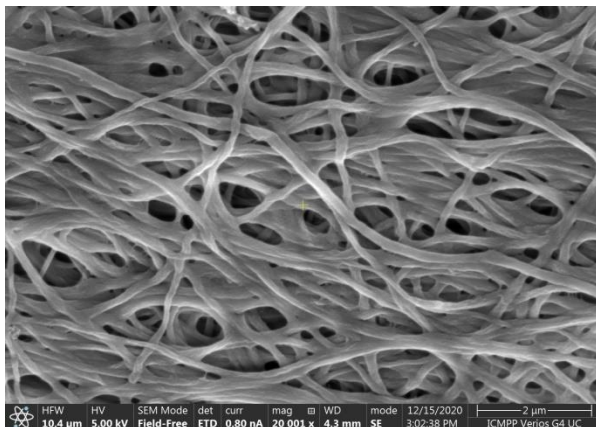
In urma iminariii se observa un diametru mai mare pentru fibrele functionalizate cu citral, in comparatie cu cele functionalizate cu aldehida boronica, fapt pus pe seama hidrofobicitatii citralului, care a dus la o functionalizare predominant la suprafata fibrelor (Figura 5).



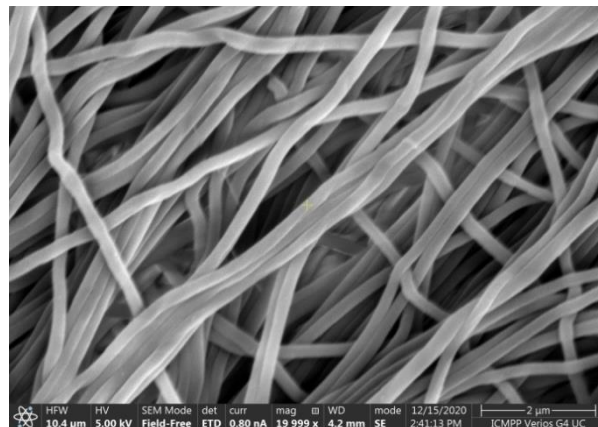
a) CS, 197 ± 36 nm



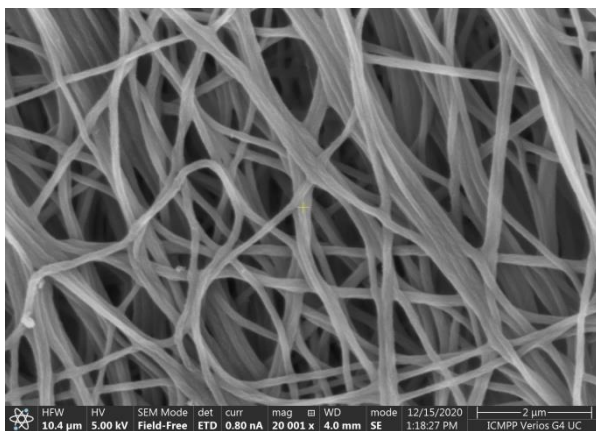
b) C1, 129.95 ± 69



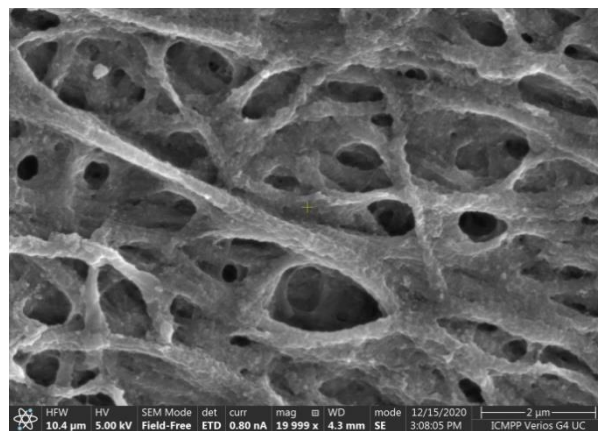
c) C0.25, 131.29 ± 26



d) C0.5, 147 ± 59



e) C0.75, 141.24 ± 33



f) C0, 176.82 ± 54

Figura 5. Imagini SEM ale fibrelor de chitosan si fibrelor de chitosan functionalizate

Analiza la nivel nanometric a fibrelor de chitosan prin analiza AFM, a indicat natura rugoasa a fibrelor, sugerand faptul ca indepartarea PEO-ului a condus la formarea de nanopori in interiorul acestora (Figura 6).

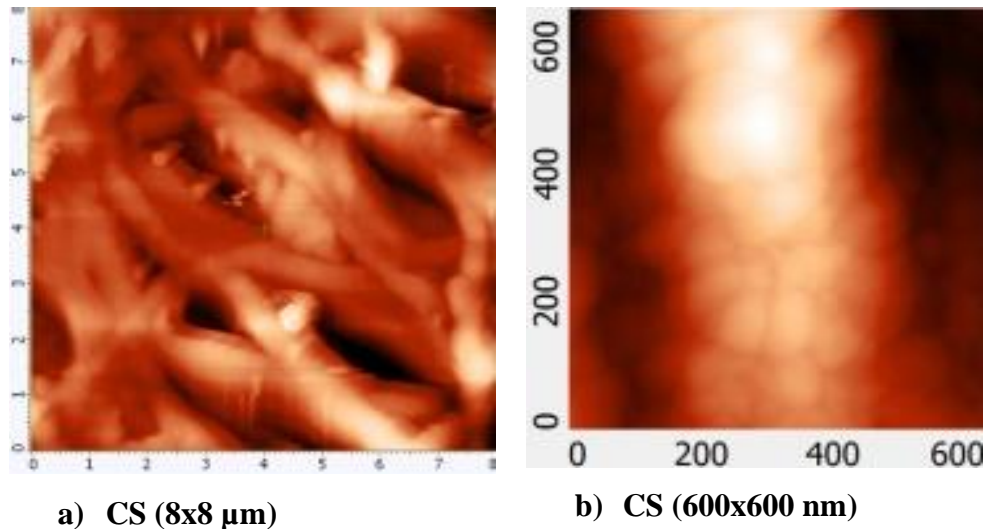


Figura 6. Imagini AFM ale fibrelor de chitosan functionalizate

Microscopia optica in lumina polarizata a fibrelor a aratat birefringenta specifica fazelor ordonate, indicand faptul ca lanturile de chitosan se aliniaza in timpul electrofilarii, si aceasta stare ordonata nu s-a pierdut prin iminare (Figura 7).

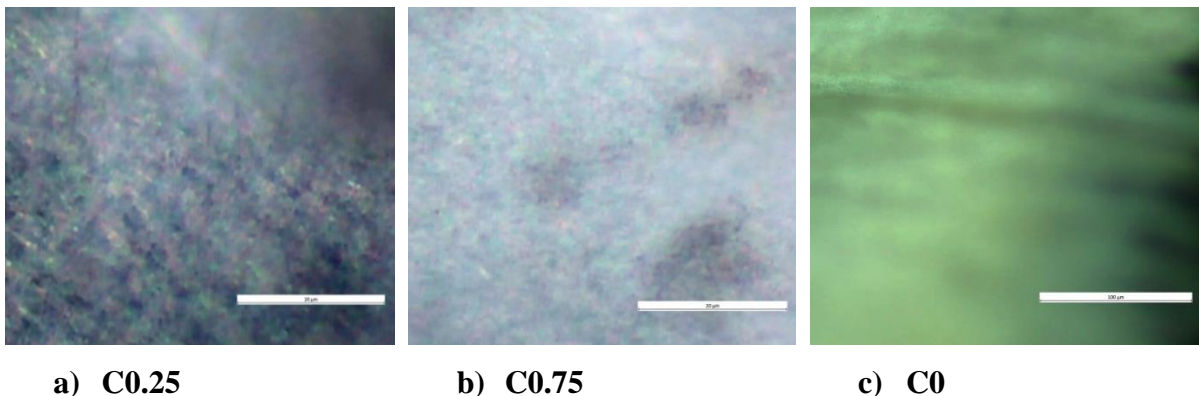
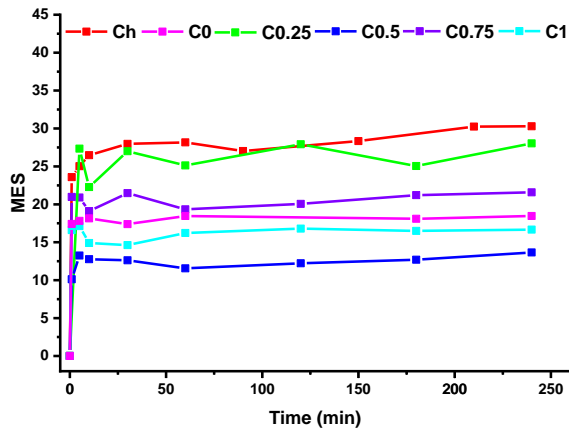


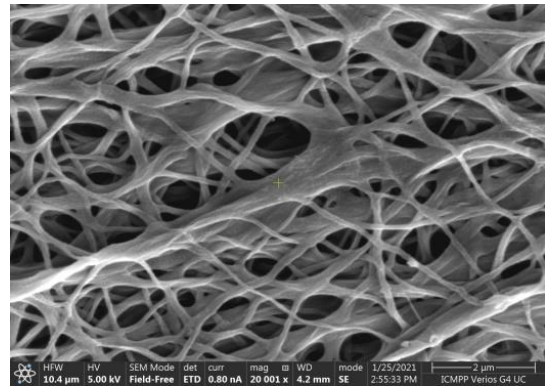
Figura 7. Imagini POM ale fibrelor functionalizate

1.5 Determinarea gradului de umflare

Umflarea fibrelor a fost investigata in PBS de pH 7.4, prin determinarea umflarii masice la echilibru (MES). Reprezentarea grafica a MES-ului in timp, a indicat faptul ca functionalizarea cu citral a diminuat capacitatea de umflare a fibrelor, cel mai probabil datorita hidrofobicitatii mari a acestuia (Figura 8). Imaginile SEM ale fibrelor dupa procesul de umflare nu a aratat diferente morfologice notabile, indicand faptul ca umflarea nu a afectat fibrele.



a)

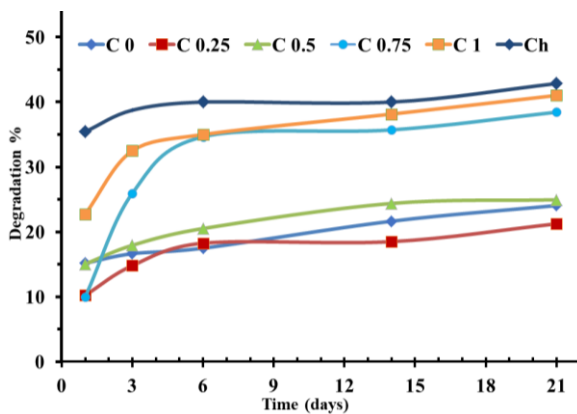


b)

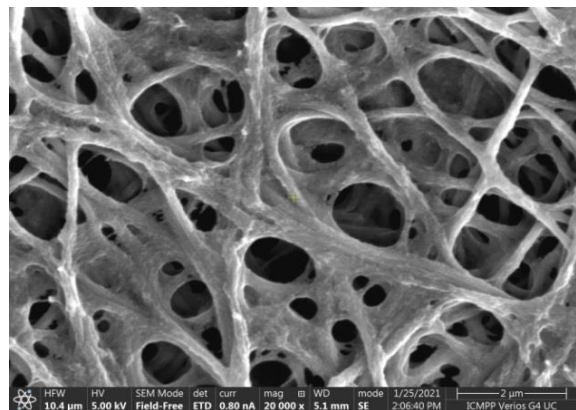
Figura 8. Reprezentarea grafica a gradului de umflare a fibrelor studiate si o imagine SEM reprezentativa pentru fibrele **C0.5** dupa umflare

1.6 Determinarea biodegradabilitatii

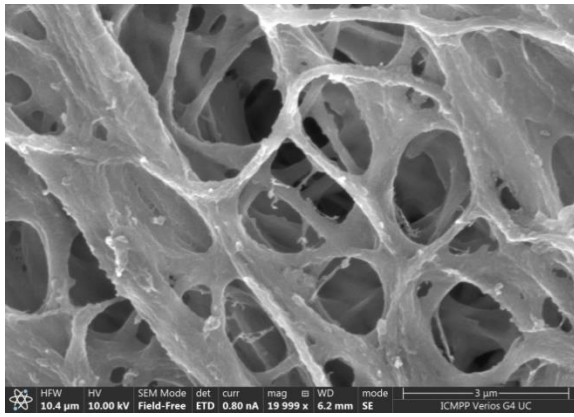
Biodegradarea fibrelor a fost testata in mediu care mimeaza exudatul ranilor, in solutie tampon care contine lizozima. Reprezentarea grafica a pierderii de masa in timp a indicat faptul ca prezenta citralului conduce la o intarziere a degradarii fibrelor, cel mai probabil datorita hidrofobicitatii/insolubilitatii acestuia (Figura 9). Analiza SEM a fibrelor pastrate timp de 21 de zile in mediul de degradare a aratat deteriorarea acestora la suprafata, sugerand ca degradarea avanseaza progresiv dinspre exterior spre interior.



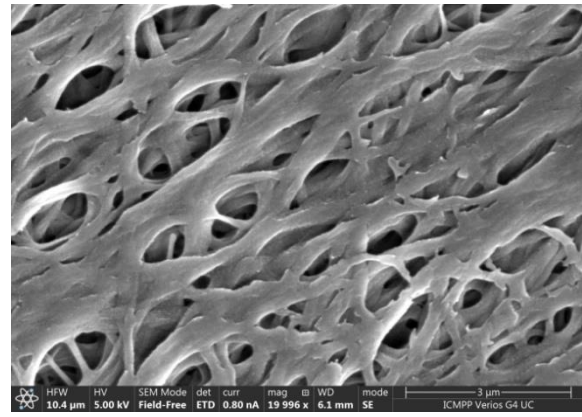
a)



b) C0



c) C1



d) C0.5

Figura 9. Reprezentarea grafica a pierderii de masa in timp a fibrelor studiate si imagini SEM a fibrelor la finalul experimentului

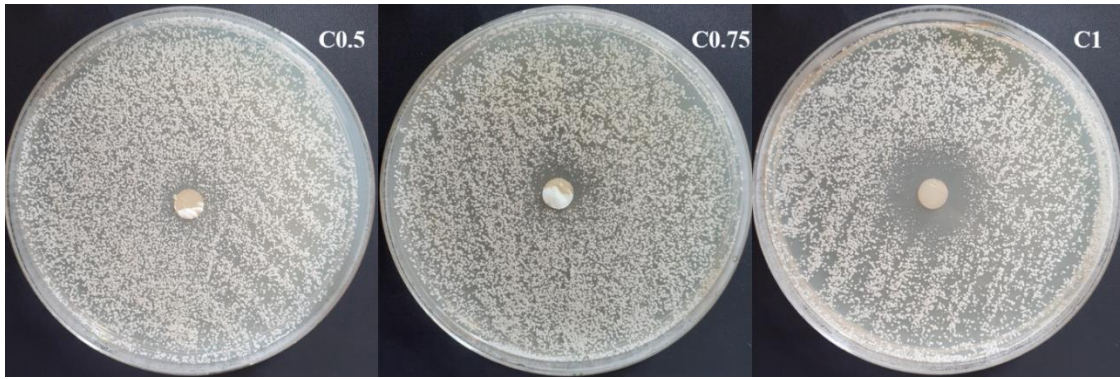
1.7 Determinarea preliminara a activitatii antimicrobiene

Determinarea activitatii antimicrobiene a fibrelor a fost realizata prin teste in vitro pe tulpini bacteriene si fungice intalnite frecvent in ranile cronice: tulpini de bacterii Gram- pozitive (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212), tulpini de bacterii Gram-negative (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031) si tulpini de fungi (*Candida albicans* ATCC 10231, *Candida albicans* ATCC90028, and *Aspergillus brasiliensis* ATCC 9642).

Toate fibrele in contact cu microorganismele au aratat doar bacterii izolate pe suprafata indicand ca acestea au avut capacitatea de a stopa dezvoltarea de bacterii, demonstrand faptul ca pot actiona ca bariera fizica impotriva infectiilor. In plus, fibrele au inhibat cresterea fungilor in jurul lor, activitate pusa pe seama caracterului dinamic al legaturii imina care a permis eliberarea de aldehida 2FPBA in mediul umed microbiologic (Tabel 2, Figura 10).

Tabel 2. Zona de inhibitie a cresterii fungilor in jurul fibrelor

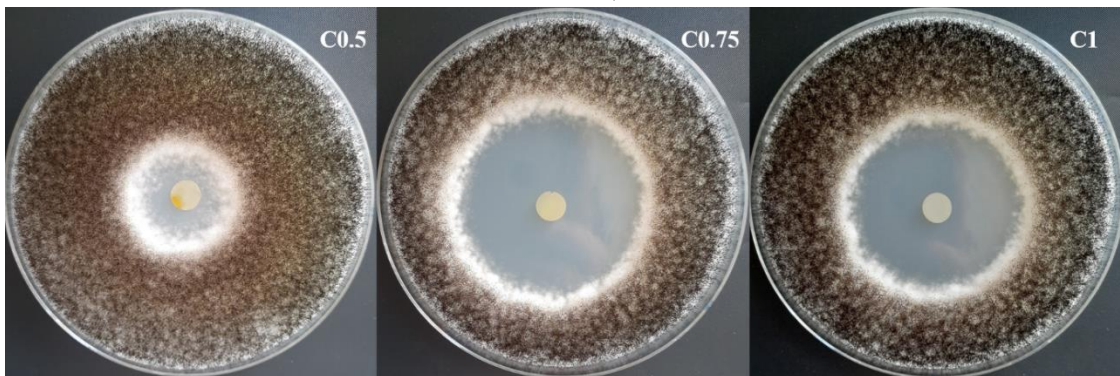
Strain	Inhibition zone (mm)					
	Ch	C0	C0.25	C0.5	C0.75	C1
<i>C. albicans</i>	-	-	-	6.34 ± 0.21	11.78 ± 0.12	19.21 ± 0.05
<i>C. glabrata</i>	-	-	-	14.19 ± 0.21	19.11 ± 0.08	26.23 ± 0.14
<i>A. brasiliensis</i>	-	-	-	24.12 ± 0.11	49.91.32 ± 0.12	49.47 ± 0.21



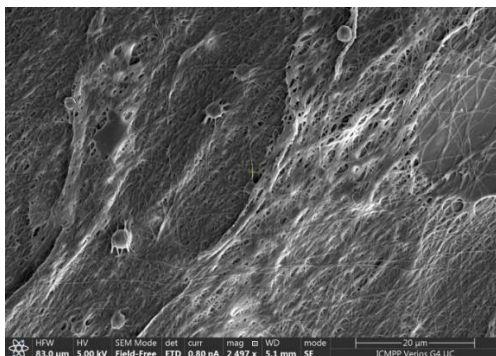
a)



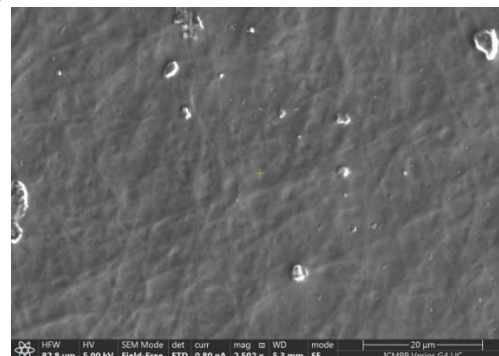
b)



c)



d)



e)

Figura 10. Activitatea antifungică a fibrelor împotriva a) *C. albicans*, b) *C. glabrata* and c) *A. brasiliensis*. Imagini SEM a fibrelor C0.5 după 24 ore de contact cu d) *S. aureus* și e) *C. albicans*

In plus, biocompatibilitatea fibrelor a fost investigate pe fibroblasti (NHDF) in conformitate cu ISO 10993-5:2009(E). Toate fibrele au aratat viabilitate celulara mai mare de 70%, fapt ce demonstreaza ca pot fi utilizate in siguranta in contact direct cu aceste celule specifice ranilor (Figura 11).

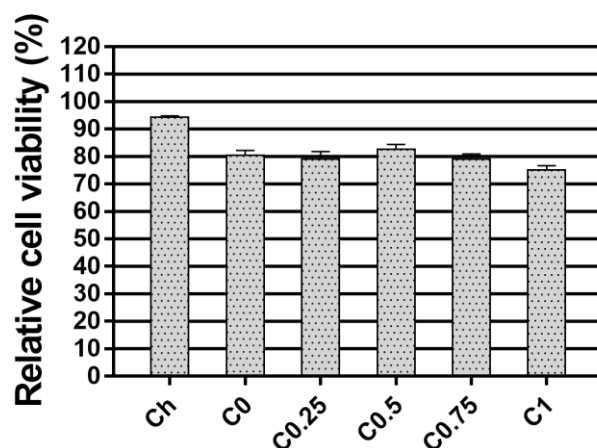


Figura 11. Viabilitatea celulara a celulelor NHDF in contact cu fibrele

1.8. Diseminarea rezultatelor

Rezultatele obtinute si prezentate in acest raport de cercetare au fost redactate sub forma unei lucrari stiintifice care a fost trimisa si acceptata spre publicare in jurnalul *Reactive and Functional Polymers*:

Ramona Lungu, Alexandru Anisie, Irina Rosca, Andreea-Isabela Sandu, Daniela Ailincăi, Luminita Marin, “Double functionalization of chitosan-based nanofibers towards biomaterials for wound healing”, *Reactive and Functional Polymers* 167, 2021, 105028.