

RAPORT STIINTIFIC SI TEHNIC

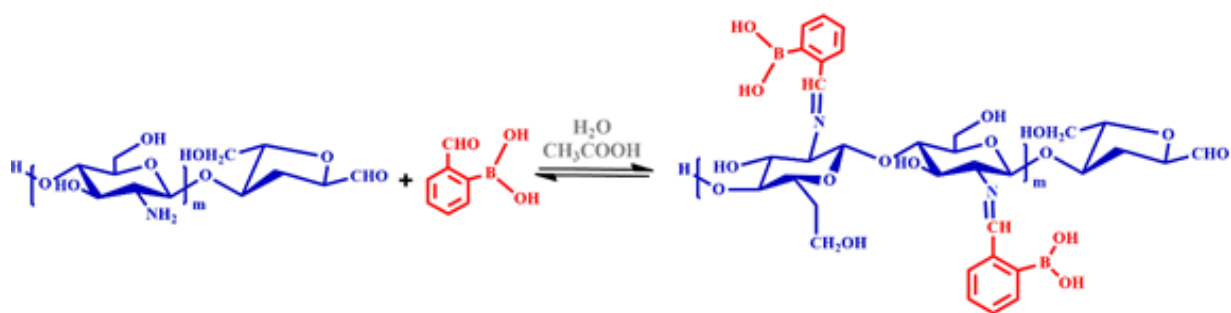
privind

OBTINEREA DE HIDROGELURI PE BAZA DE CHITOLIGOZAHARIDE SI ACID 2-FENILFORMILBORONIC

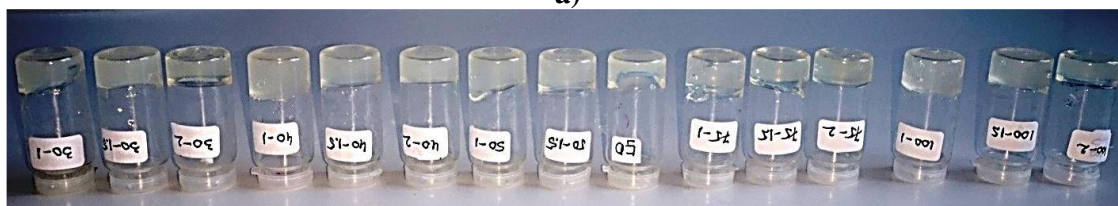
A doua etapa a proiectului *Hidrogeluri pe baza de chitooligozaharide pentru co-eliberarea unor agenti antivirali si antifungici* si-a propus **sinteza si caracterizarea de hidrogeluri pe baza de chitooligozaharide (CHOS), sintetizate si selectate in prima etapa a proiectului**, si acid 2-fenilformilboronic (2-FPBA), prin implementarea a zece activitati conform anexei II din contractul de finantare.

A2.1 Sinteza hidrogelurilor

Au fost sintetizate sase serii de hidrogeluri, fiecare continand trei hidrogeluri, prin reactia de condensare acida a CHOS cu grade de polimerizare diferite cu 2-FPBA (Fig. 1 a,b).



a)



b)

Fig. 1. Demersul sintetic pentru obtinerea hidrogelurilor (a) si imaginea hidrogelurilor obtinute (b)

Pentru a atinge grade diferite de reticulare, au fost utilizate trei rapoarte molare între grupările funcționale amină ale chitooligozaharidelor și funcțiunea aldehydă a 2-FPBA pentru fiecare CHOS: 1/1; 1,5/1 și 2/1 (Tabel 1). De exemplu, procedura experimentală pentru hidrogelurile obținute din CHOS și 2-FPBA, cu un raport molar NH₂/CHO de 1/1 a fost următoarea: 60 mg CHOS au fost dizolvate în 1,5 ml apă și 7,5 μL acid acetic. pH-ul soluției a fost 6,4. După dizolvare, s-a adăugat o soluție de 45,77 mg 2-FPBA în (1,5 ml apă + 2 ml etanol + 7,5 μL acid acetic) sub agitare la 750

rot/min, la 25 °C. În mai puțin de 5 minute, s-a format un hidrogel. Aceeași procedură experimentală a fost aplicată și atunci când s-a folosit un raport molar diferit între cele două funcțiuni ale reactanților.

Tabel 1

Compoziția hidrogelurilor sintetizate

Probe	m CHOS (mg)	V _{vapa*} (mL)	V _{acid} acetic* (μL)	m ₂ - FPBA (mg)	V _{vapa**} (mL)	V _{etanol} (μL)	V _{acid} acetic** (μL)	Raport molar NH ₂ /CHO	Timp de gelifiere (min)
CHOS20-1	60	1.5	7.5	45.77	1.5	2000	7.5	1/1	10
CHOS20-1.5	60	1.5	7.5	30.5	1.5	1500	7.5	1.5/1	15
CHOS20-2	60	1.5	7.5	22.88	1.5	1000	7.5	2/1	120
CHOS30-1	60	1.5	7.5	45.77	1.5	2000	7.5	1/1	10
CHOS30-1.5	60	1.5	7.5	30.5	1.5	1500	7.5	1.5/1	15
CHOS30-2	60	1.5	7.5	22.88	1.5	1000	7.5	2/1	120
CHOS40-1	60	1.5	7.5	45.77	1.5	2000	7.5	1/1	5
CHOS40-1.5	60	1.5	7.5	30.5	1.5	1500	7.5	1.5/1	10
CHOS40-2	60	1.5	7.5	22.88	1.5	1000	7.5	2/1	60
CHOS50-1	60	1.5	7.5	45.77	1.5	2000	7.5	1/1	5
CHOS50-1.5	60	1.5	7.5	30.5	1.5	1500	7.5	1.5/1	10
CHOS50-2	60	1.5	7.5	22.88	1.5	1000	7.5	2/1	60
CHOS75-1	60	1.5	7.5	45.77	1.5	2000	7.5	1/1	5
CHOS75-1.5	60	1.5	7.5	30.5	1.5	1500	7.5	1.5/1	10
CHOS75-2	60	1.5	7.5	22.88	1.5	1000	7.5	2/1	60
CHOS100-1	60	1.5	7.5	45.77	1.5	2000	7.5	1/1	5
CHOS100-1.5	60	1.5	7.5	30.5	1.5	1500	7.5	1.5/1	10
CHOS100-2	60	1.5	7.5	22.88	1.5	1000	7.5	2/1	20

*cantitate utilizată pentru a solubiliza CHOS

**cantitate utilizată pentru a solubiliza aldehida

A2.2 Liofilizarea hidrogelurilor

Cu scopul de a caracteriza hidrogelurile sintetizate din punct de vedere supramolecular și morfologic, acestea au fost liofilizate, conducând la obținerea de xerogeluri. În prealabil, hidrogelurile au fost înghetate în azot lichid iar liofilizarea s-a făcut utilizând un liofilizator Labconco, la 54 °C și 1,510 mbar, timp de 24 de ore.

A2.3 Caracterizarea structurală a hidrogelurilor și xerogelurilor

Caracterizare structurală prin RMN

Spectrele RMN au fost înregistrate cu un Spectrometru Bruker Avance DRX 400 MHz (Bruker, Germania). Pentru înregistrarea spectrelor ¹H-RMN, hidrogelurile au fost preparate în apă deuterată direct în tuburi de RMN.

În toate cazurile, în spectrele hidrogelurilor a apărut deplasarea chimică corespunzătoare protonului imină la 8,6 ppm, dar și deplasarea chimică a protonului aldehydic la 9,94 ppm (Fig. 2 a,b). Aceasta este o consecință a reversibilității reacției de iminare în mediu acid, fiind atinsă o stare de echilibru (Yu et al., 2021). De asemenea, în spectrele ¹H-RMN s-au observat și semnalele

caracteristice protonilor corespunzatori CHOS, ca un pic intens între 3,6-4 ppm, unul la 3,1 ppm corespunzător protonului H2 vecin cu unitățile amină și picuri mai de intensitate mica la 5,4; 4,4; 4,2 și 4,1 ppm corespunzătoare protonilor din unitatea terminală de 2,5-D-manofuranoză.

Raportul dintre integralele protonilor H2 și imină a permis estimarea gradului de iminare al oligomerilor. Așa cum era de așteptat, s-a obținut un grad de substituție mai mare când s-a folosit o cantitate mai mare de aldehydă, atingând valori de 30,8% și 26,4% pentru CHOS20-1 și CHOS20-1,5, în timp ce pentru CHOS20-2 gradul de substituție a fost de 19,5%. Se poate observa, de asemenea, că gradele de polymerizare mai mici ale oligomerilor au favorizat un grad mai mare de substituție. În acele cazuri, vâscozitatea sistemului a fost mai mică, iar grupările amino au fost mai susceptibile la iminare. De aceea, în cazul hidrogelurilor pe bază de CHOS50 s-au obținut grade de iminare mai mici, între 22,4% pentru CHOS50-1 și 15,7% pentru CHOS50-2.

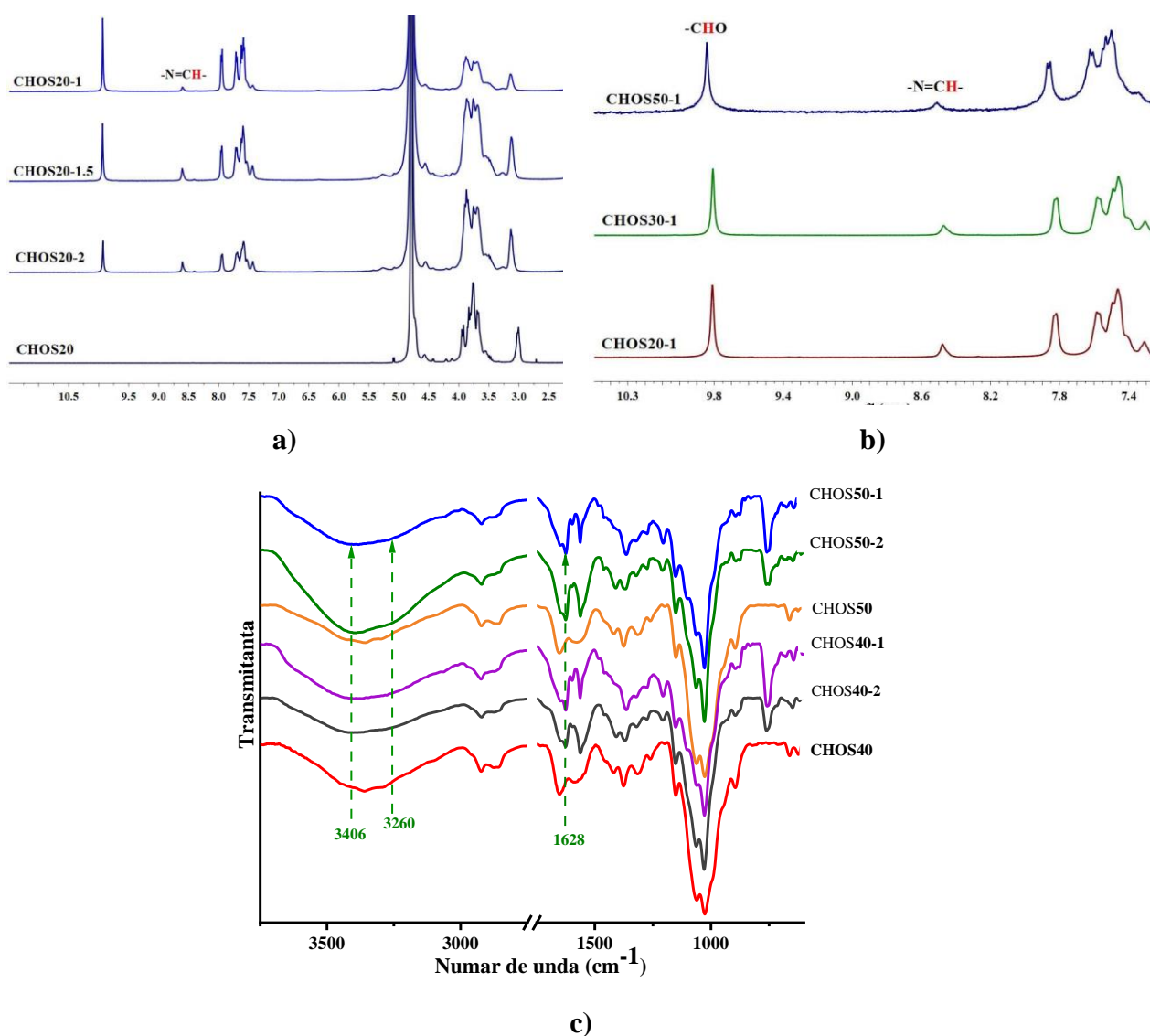


Fig. 2 Spectre RMN ale hidrogelurilor (a,b) și spectre FTIR pentru probe reprezentative de xerogel (c)

Caracterizare structurala prin FTIR

Spectrele ATR-FTIR au fost înregistrate cu un Spectrometru Bruker Vertex 70 (Ettlingen, Germania) în zona 4000-600 cm^{-1} .

Spectroscopia FTIR a fost utilizată pentru a evalua modificările structurale care au apărut în CHOS după reacția cu 2-FPBA. În spectrele xerogelurilor a apărut o nouă bandă la 1628 cm^{-1} , corespunzătoare vibrației de întindere a grupării imina nou formate (Fig. 2c) (Ailincăi, Porzio & Marin, 2020) (Iftime & Marin, 2018). Mai mult, în spectrele FTIR a fost observată apariția unei noi benzi la 1560 cm^{-1} , datorată vibrațiilor de schelet ale legăturilor C=C din unitățile de 2-FPBA. Prezența 2-FPBA a fost confirmată și de benzile de la 760 cm^{-1} , corespunzătoare legăturii B-OH. În comparație cu spectrele RMN s-a remarcat faptul că semnalul aldehidei nu mai este prezent, cel mai probabil deoarece echilibrul de reacție a fost deplasat către produși în timpul liofilizării.

Mai mult, spectroscopia FTIR a indicat unele modificări în arhitectura supramoleculară a oligomerilor, datorită prezenței unităților de 2-FPBA. Analizând regiunea spectrală 3750–2750 cm^{-1} , în care apar vibrațiile de întindere ale grupărilor amină și hidroxil (Marin et al., 2015), în cazul CHOS s-a observat o bandă largă cu două maxime: la ~3240 și 3400 cm^{-1} . În spectrele xerogelurilor, a avut loc o deplasare a acestora către numere de undă mai mari, sugerând unele modificări în mediul legăturilor de hidrogen. Foarte probabil, din cauza iminării, are loc o paralelizare a lanțurilor, ducând la formarea de noi legături de hidrogen intermoleculare (Marin et al., 2014). Pe de altă parte, maximum corespunzător legăturilor de hidrogen intramoleculare este de asemenea deplasat, datorită apariției unor noi legături de hidrogen intramoleculare. Analizând structura derivaților de imino-oligochitosan formați, se poate observa că grupările hidroxil din inelul aromatic al 2-FPBA pot forma noi legături intramoleculare de hidrogen cu atomul de azot bogat în electroni din legătura imină (Adamczyk-Woźniak și colab., 2012).

Toate aceste date au demonstrat că hidrogelarea este o consecință atât a iminării, cât și a formării de noi legături de hidrogen, atât intra- cât și intermoleculare.

A2.4 Caracterizare morfologica

Caracterizarea morfologica a hidrogelurilor obținute a fost realizată prin microscopie electronica de baleiaj (SEM), utilizând un Microscop SEM-EDAX-Quanta 200 (Eindhoven, Germania) iar imaginile obținute au fost procesate utilizând programele Image J și Origin Pro 8. Măsurătorile au fost făcute pe xerogelurile obținute în urma liofilizării hidrogelurilor (Fig. 3).

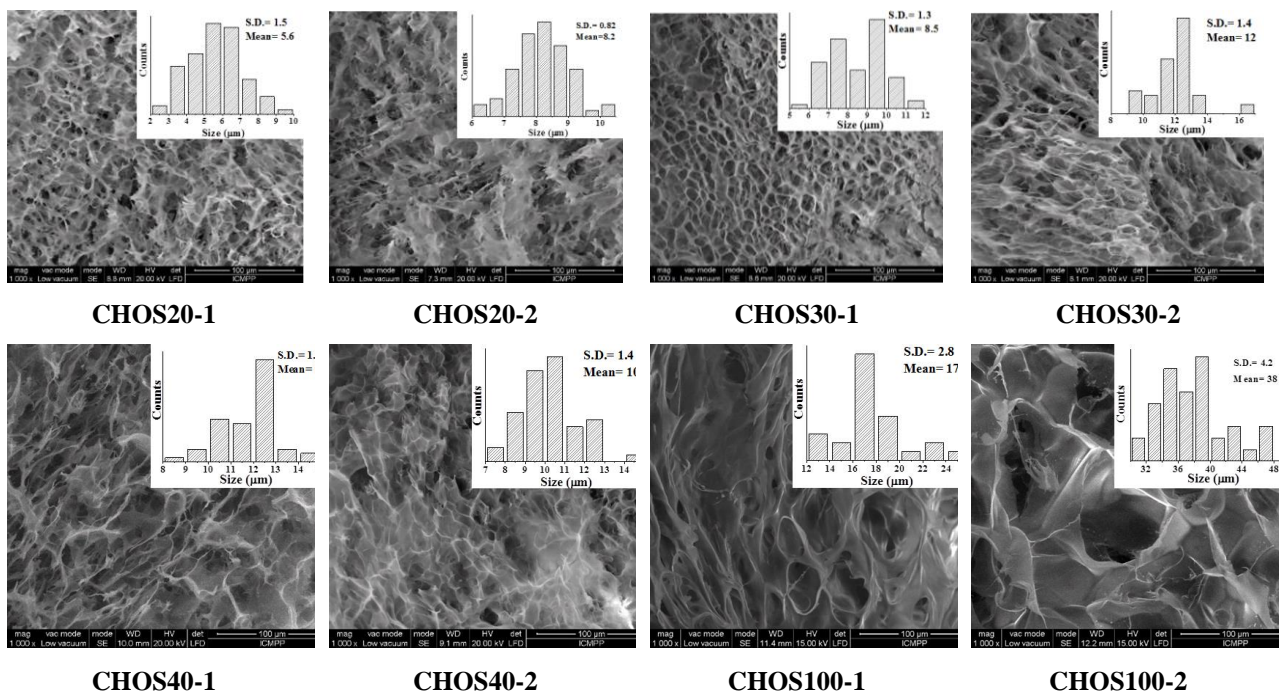


Fig. 3 Imagini SEM ale unor xerogeluri reprezentative si histogramele obtinute in urma prelucrării imaginilor SEM

Toate xerogelurile au prezentat o morfologie de tip burete (Fig. 3), cu pori micrometrici bine definiți. Hidrogelurile pe baza de CHOS cu grade de polimerizare mai mici au prezentat a morfologie mai uniformă cu pori caracterizați prin polidispersitate mai scăzută, confirmată de valorile abaterii standard (Fig. 3). După cum era de așteptat, morfologia hidrogelurilor reticulate cu cantități mai mari de aldehidă a fost mai compactă, cu pori mai mici, atribuiți unei densități mai mari a nodurilor de reticulare.

A2.5 Determinarea comportamentului la umflare

Comportamentul la umflare al hidrogelurilor a fost evaluat în apă și PBS (pH=7,4), pentru probe reprezentative (Fig. 4). Gradul masic de umflare la echilibru (MES) a fost legat de porozitatea hidrogelurilor, cele cu pori mai mari prezentând o capacitate mai mare de a se umfla. Prin urmare, MES-ul a crescut odată cu creșterea lungimii lanțurilor de oligomeri, atingând un maxim pentru CHOS75-2, ~25% în apă și ~9% în PBS și odată cu scăderea gradului de iminare. În toate cazurile, MES-ul a fost atins după 8 ore atât în apă, cât și în PBS. Valorile MES în apă (Fig. 4a) au fost mult mai mari decât în PBS (Fig. 4b), probabil datorită insolubilității CHOS în pH alcalin și conținutului ridicat de săruri al soluției de PBS (Phil et al., 2018).

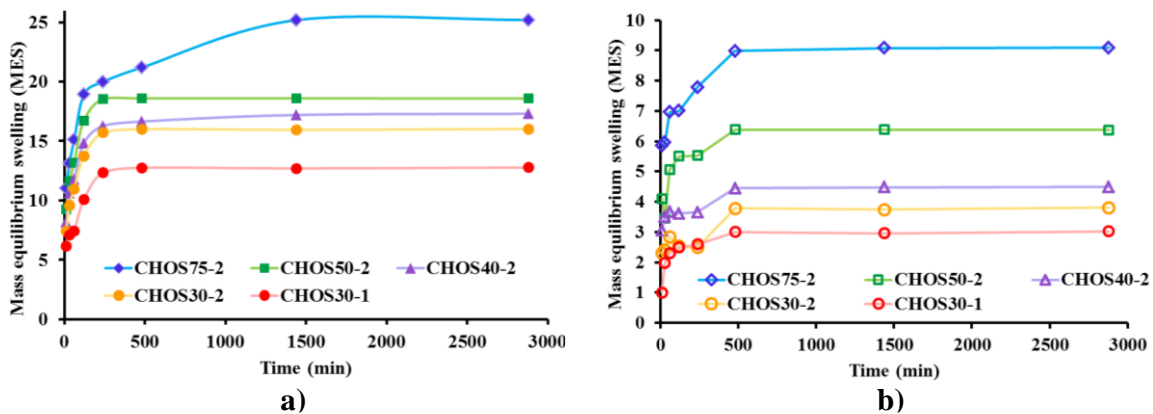


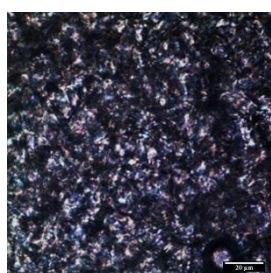
Fig. 4 Valorile MES pentru unele probe reprezentative în a) apă și b) PBS

A2.6 Caracterizare supramoleculara

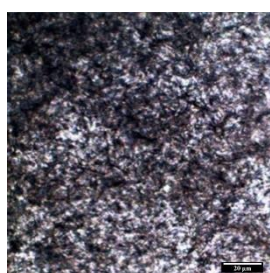
Este cunoscut faptul că hidrogelarea chitosanului cu monoaldehide este guvernată de autoasamblarea derivaților amfifili de imino-chitosan datorită segregării hidrofil-hidrofobe în arhitecturi supramoleculare tridimensionale (Ailincăi, Porzio, et al., 2020; Olaru et al., 2018). Prin urmare, pentru a avea un indiciu asupra structurii supramoleculare a hidrogelurilor, acestea au fost analizate prin microscopie optica in lumina polarizata (POM) și difracție de raze X la unghi larg (WXR)D) utilizand un microscop Leica DM2500 (Hamburg, Germania) si respectiv un Difractometru Rigaku Miniflex 600 cu emisie de CuK α . Determinarile au fost facute pe xerogelurile obtinute in urma liofilizarii.

Difractogramele CHOS au prezentat aceeasi forma ca și chitosanul, semn al caracterului lor semicristalin. Difractogramele xerogelurilor au prezentat trei benzi de difracție, sugerând o arhitectură supramoleculară stratificată, așa cum s-a raportat anterior pe hidrogelurile pe bază de chitosan și monoaldehide (Ailincăi et al., 2016).

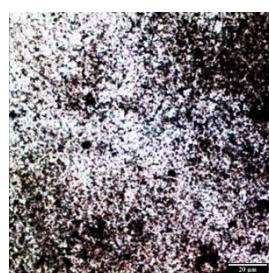
Imaginile POM au demonstrat că toate hidrogelurile au prezentat birefrință sub lumină polarizată (Fig. 5), indicând un grad ridicat de ordonare la nivel supramolecular, așa cum este reprezentat schematic în Fig. 5f. Datele POM au fost confirmate de capacitatea hidrogelurilor de a emite lumină, sub iluminare cu o lampa UV. În comparație cu lumina albastră emisă de soluția de oligomeri (Fig. 5e), hidrogelurile au emis lumină alb-albăstruie, atribuită organizării supramoleculare (Ailincăi & Marin, 2021; Iftime et al., 2017).



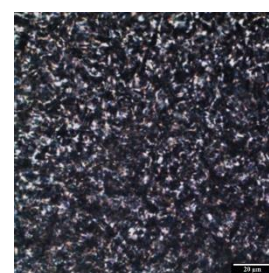
a) CHOS100-1



b) CHOS100- 2



c) CHOS20-1



d) CHOS20-2

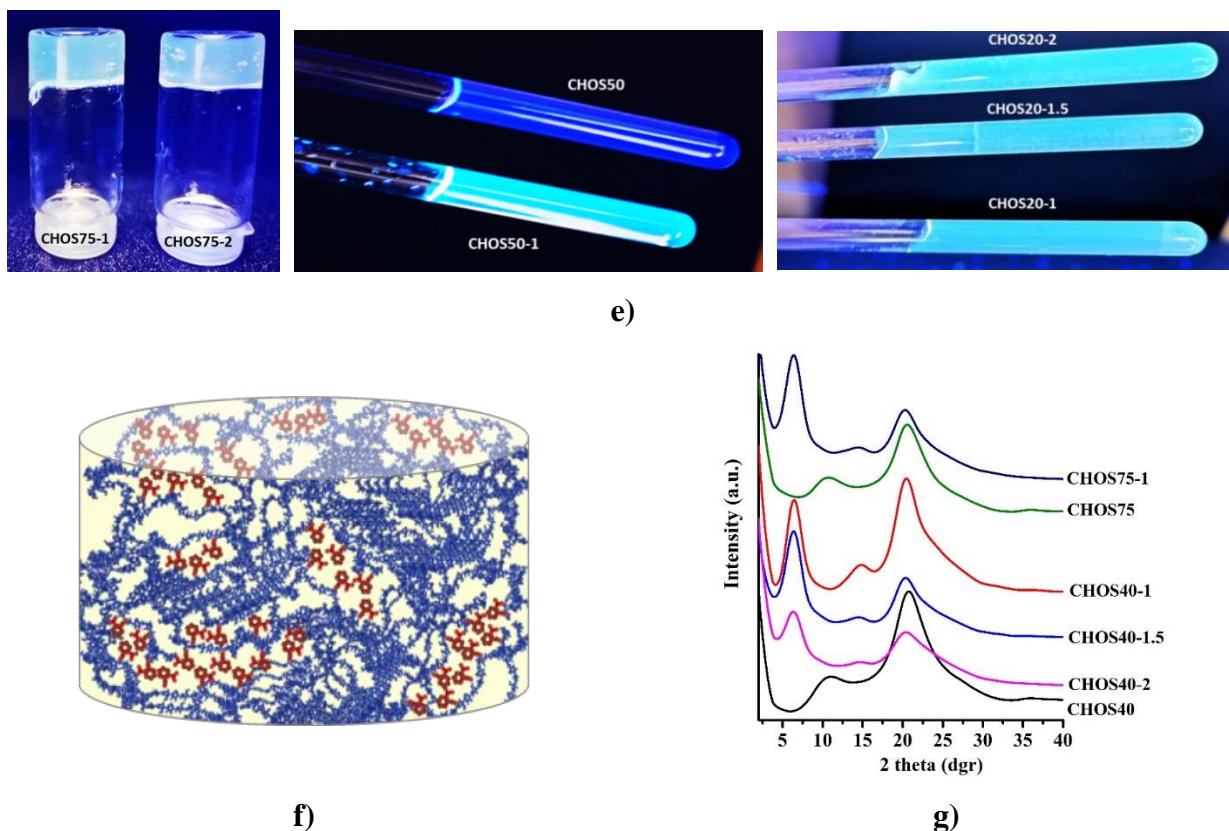


Fig. 5 Imagini POM reprezentative (a-d), emisia hidrogelurilor sub iluminare cu lampa UV (e), reprezentare schematică a arhitecturii supramoleculare a hidrogelurilor (f) și difractograme de raze X pentru probe reprezentative (g)

A2.7 Caracterizare reologica

Comportamentul vasco-elastic al hidrogelurilor a fost analizat utilizând un Reometru MCR302 Anton-Paar GmbH cu sistem Peltier pentru controlul temperaturii. Testele de baleiaj de amplitudine au indicat comportamentul de gel al probelor studiate, cu valori ale modulului elastic (G') peste cele ale modulului vascos (G''), pentru toate probele studiate (Fig. 6).

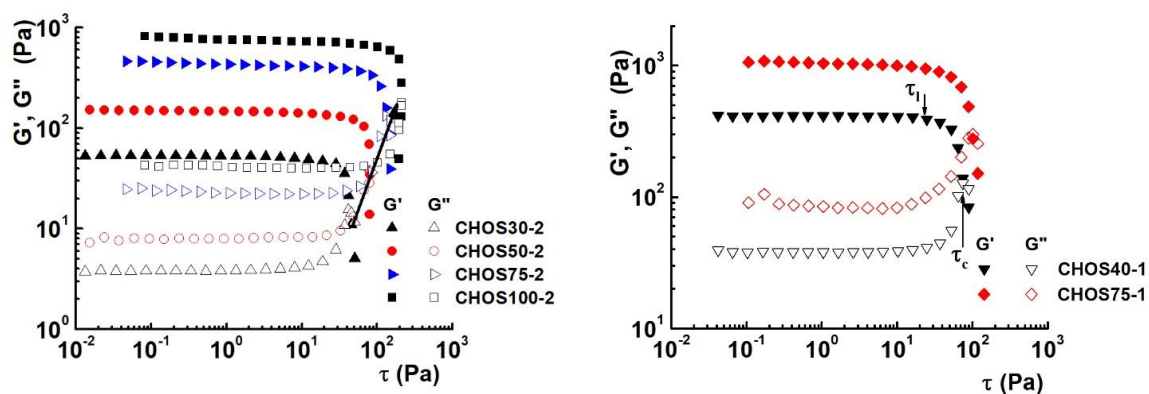


Fig 6. Evoluția parametrilor G' și G'' în funcție de forța de forfecare la temperatura de 37 °C ($\omega=10 \text{ rad}\cdot\text{s}^{-1}$)

Parametrii reologici G' , G'' și energia de coeziune au crescut odată cu creșterea gradului de polimerizare al oligomerilor. Astfel, valorile G' și G'' au crescut cu aproximativ un ordin de mărime prin creșterea gradului de polimerizare de la 14 (CHOS20) la 51 (CHOS100) (Tabelul 2). Legăturile chimice suplimentare, stabilite între lanțurile CHOS prin creșterea cantității de 2-FPBA, au determinat creșterea valorilor G' și G'' (Tabelul 2). Pe de alta parte, teste reologice suplimentare au demonstrat caracterul tixotrop al hidrogelurilor, o caracteristica importanta a acestora în vederea aplicării (Tabel 2).

Tabel 2.

Parametrii reologici pentru probele studiate

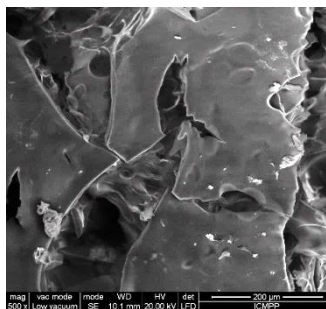
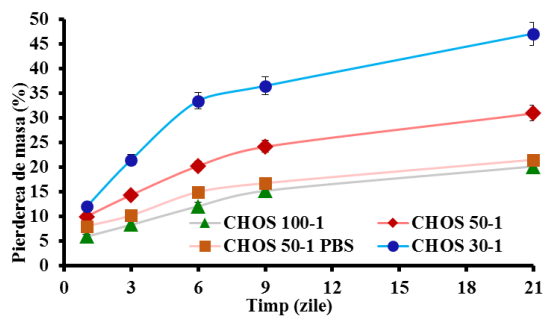
Sample	τ_1 (Pa)	γ_1 (%)	τ_c (Pa)	E_c ($J \cdot m^{-3}$)	G'^a (Pa)	G''^a (Pa)	Grad de revenire ^b (%)
CHOS20-2	2.3	15.8	9.9	1772.4	14.7	3.3	100
CHOS30-2	5.2	9.9	45.5	2569.7	53	3.8	98.7
CHOS40-2	8.4	9.8	37.5	4153.4	86.4	7.8	99.2
CHOS50-2	8.9	6.3	79.1	2817.9	147	7.9	88.0
CHOS75-2	16.2	3.9	131	3215.2	433	22.7	80.0
CHOS100-2	28.4	3.7	211	5626.6	756	40.8	82.7
CHOS40-1	24.7	6.3	74.8	7739.6	414	38.1	100
CHOS75-1	36	3.9	102	7076.6	1040	84.7	84.8

^a G' și G'' la 10 rad/s și 1 Pa;

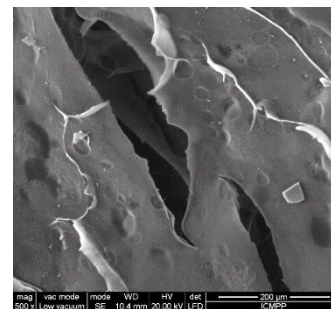
^b determinat după 300 s de la îndepărtarea stresului;

A2.8 Evaluarea *in vitro* a degradării enzimaticе

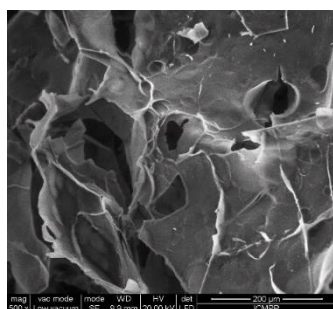
Probe reprezentative au fost supuse degradării enzimaticе în prezenta lizozimei, la pH fiziologic și 37 °C. Probele supuse degradării enzimaticе au fost pe baza de CHOS cu grade diferite de polimerizare, fiind cunoscut faptul că masa moleculară a CHOS este principalul parametru care influențează degradarea. O probă de referință a fost supusă degradării hidrolitice în soluție de PBS fără lizozimă. Rezultatele au fost evaluate în termeni de pierdere de masă prin măsurători gravimetrice și modificări morfologice prin SEM (Fig. 7).



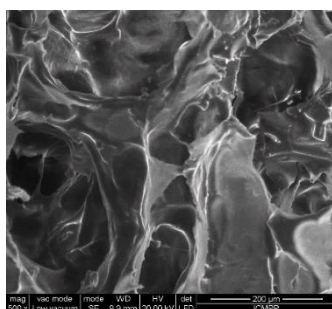
CHOS50-1, 21 zile



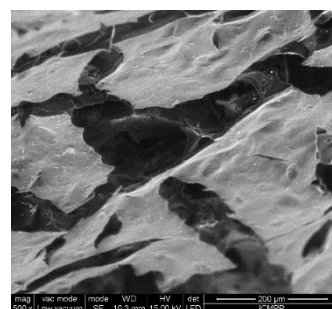
CHOS50-1, 21 zile (PBS)



CHOS30-1, 1 zi



CHOS30-1, 9 zile



CHOS30-1, 21 zile

Fig.7 Rezultatele degradării enzimaticе in termeni de pierdere de masa si schimbari morfologice

În concluzie, hidrogelurile obținute sunt ușor erodabile, întrunind o cerință importantă pentru aplicațiile biomedicale *in vivo*, viteza de eroziune fiind ușor controlată de gradul de polimerizare al CHOS utilizat pentru obținerea hidrogelurilor.

A2.9 Determinarea activitatii antifungice

Activitatea antimicrobiană a fost evaluată pe 9 microorganisme prin metoda Kirby-Bauer. Diametrele zonelor de inhibiție sunt prezentate în Tabelul 3, în timp ce imaginile realizate în timpul măsurătorilor antimicrobiene sunt prezentate în Fig. 8.

Tabel 3

Diametrul zonei de inhibiție pentru probele analizate

Probe	<i>S. aureus</i> ATCC25923	<i>E. coli</i> ATCC25922	<i>C. albicans</i> ATCC90028	<i>C. glabrata</i> ATCC2001	<i>C. parapsilosis</i> ATCC22019	<i>S. cerevisiae</i> ATCC9763	<i>P. chrysogenum</i> ATCC10106	<i>C. cladosporioides</i> ATCC16022	<i>A. brasiliensis</i> ATCC9642
2-FPBA-H1	34.7 ± 1.0	12.4 ± 1.5	37.0 ± 0.2	43.0 ± 0.5	29.5 ± 0.2	47.2 ± 0.3	21.8 ± 9.8	34.2 ± 4.0	32.3 ± 3.0
2-FPBA-H1.5	22.1 ± 0.5	0	38.6 ± 0.5	40.0 ± 0.2	27.6 ± 0.4	46.0 ± 0.6	20.3 ± 1.1	33.9 ± 2.0	30.1 ± 1.0
2-FPBA-H2	21.2 ± 1.0	0	44.0 ± 0.8	46.8 ± 0.1	34.8 ± 0.5	50.0 ± 0.8	19.9 ± 1.4	26.1 ± 0.5	25.0 ± 0.8
CHOS ₁₀₀	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CHOS ₇₅	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CHOS ₅₀	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CHOS ₄₀	8.8 ± 0.8	0	19.8 ± 1.0	21.2 ± 0.5	0	0	0	0	0
CHOS ₃₀	10.7 ± 0.4	0	18.9 ± 0.1	20.4 ± 0.1	0	0	0	0	0
CHOS ₂₀	8.3 ± 0.1	0	19.9 ± 0.5	17.5 ± 0.2	0	0	0	0	0
CHOS ₁₀₀ H1	18.2 ± 0.1	0	25.0 ± 0.5	25.2 ± 0.1	13.3 ± 0.5	36.9 ± 0.1	21.6 ± 0.5	33.5 ± 0.8	16.8 ± 0.8
CHOS ₁₀₀ H1.5	0	0	23.0 ± 0.6	26.8 ± 0.2	15.4 ± 0.1	31.9 ± 0.7	31.0 ± 0.4	32.6 ± 0.1	38.6 ± 0.1
CHOS ₁₀₀ H2	21.6 ± 0.7	0	15.8 ± 0.1	21.3 ± 0.2	9.1 ± 0.6	25.3 ± 0.3	0	29.0 ± 0.6	31.2 ± 0.4
CHOS ₇₅ H1	20.5 ± 0.2	0	27.4 ± 0.7	33.3 ± 0.8	15.6 ± 0.7	36.7 ± 0.1	14.1 ± 0.3	38.9 ± 0.2	27.5 ± 0.4
CHOS ₇₅ H1.5	17.6 ± 0.2	0	19.8 ± 0.8	26.2 ± 0.9	13.7 ± 1.0	33.6 ± 0.6	23.8 ± 0.8	37.3 ± 0.7	29.9 ± 0.5
CHOS ₇₅ H2	14.3 ± 0.6	0	20.3 ± 1.0	23.8 ± 0.5	9.9 ± 0.2	30.3 ± 0.3	0	38.8 ± 0.3	16.0 ± 0.7
CHOS ₅₀ H1	27.5 ± 0.2	0	27.4 ± 1.0	32.8 ± 0.4	19.2 ± 0.4	42.5 ± 0.7	13.3 ± 0.7	37.2 ± 0.8	49.1 ± 0.1
CHOS ₅₀ H1.5	24.4 ± 0.3	0	17.9 ± 0.2	24.3 ± 0.3	12.1 ± 0.8	33.9 ± 0.4	0	34.4 ± 0.3	39.5 ± 0.4
CHOS ₅₀ H2	10.5 ± 0.1	0	15.9 ± 0.3	23.9 ± 0.1	10.7 ± 0.5	31.7 ± 0.1	31.3 ± 0.5	27.6 ± 0.4	36.5 ± 0.3
CHOS ₄₀ H1	26.0 ± 0.1	0	32.7 ± 0.5	38.5 ± 0.4	23.9 ± 0.3	37.3 ± 0.4	28.0 ± 0.5	44.2 ± 0.1	36.8 ± 0.1
CHOS ₄₀ H1.5	25.1 ± 0.1	0	24.5 ± 0.4	32.8 ± 0.6	12.1 ± 0.4	41.5 ± 0.6	0	32.6 ± 0.8	19.7 ± 0.4
CHOS ₄₀ H2	8.2 ± 0.5	0	20.7 ± 0.6	28.9 ± 0.2	9.2 ± 0.2	26.8 ± 0.2	0	29.5 ± 0.2	17.8 ± 0.8
CHOS ₃₀ H1	36.5 ± 0.9	9.6 ± 1.0	35.8 ± 0.7	37.9 ± 0.5	22.0 ± 1.0	38.6 ± 0.4	37.7 ± 0.4	41.5 ± 0.3	33.6 ± 1.0
CHOS ₃₀ H1.5	28.8 ± 0.2	0	22.5 ± 0.3	27.1 ± 0.5	17.2 ± 1.1	26.8 ± 0.6	27.2 ± 0.7	19.3 ± 0.2	31.7 ± 0.5
CHOS ₃₀ H2	20.3 ± 0.4	0	21.9 ± 0.7	23.1 ± 0.4	10.0 ± 1.2	22.7 ± 1.0	23.3 ± 0.4	17.7 ± 0.7	28.8 ± 0.1
CHOS ₂₀ H1	30.3 ± 0.1	0	28.6 ± 0.1	30.6 ± 0.5	16.8 ± 0.2	37.1 ± 1.5	19.5 ± 0.4	32.6 ± 0.6	36.7 ± 0.7
CHOS ₂₀ H1.5	25.6 ± 0.3	0	20.3 ± 1.0	23.4 ± 0.1	12.2 ± 0.3	28.6 ± 0.2	0	36.2 ± 0.8	32.9 ± 0.4
CHOS ₂₀ H2	13.5 ± 0.4	0	18.2 ± 0.9	20.4 ± 0.7	9.2 ± 0.8	28.0 ± 0.1	0	38.0 ± 0.5	35.7 ± 0.1

În toate cazurile, activitatea antifungică a probelor a fost mai mare decât activitatea lor antibacteriană. CHOS testati au prezentat activitate împotriva *S. aureus*, *C. albicans* și *C. glabrata*, în timp ce 2-FPBA a fost foarte eficienta pe toate microorganismele testate. În cazul hidrogelurilor s-

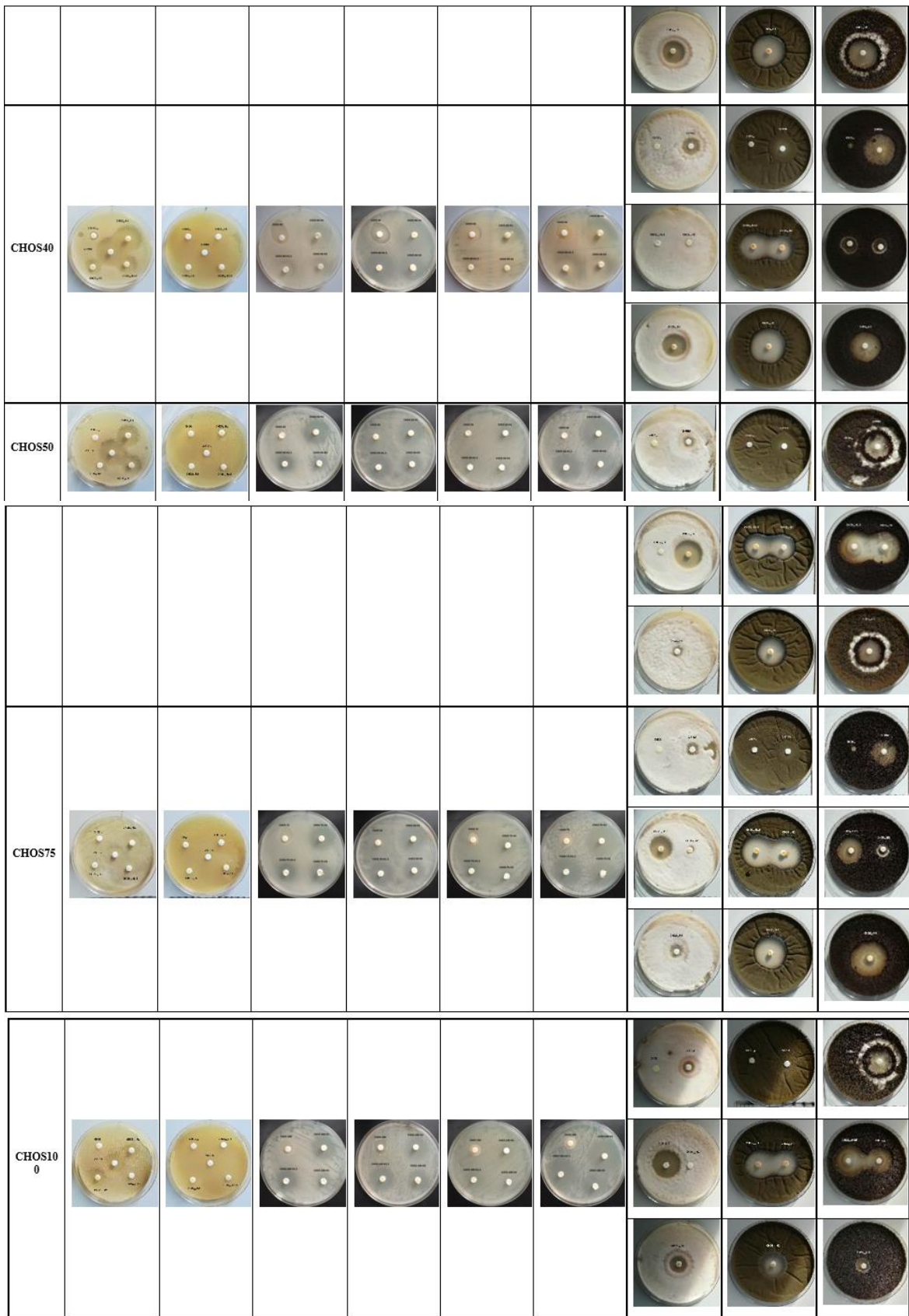


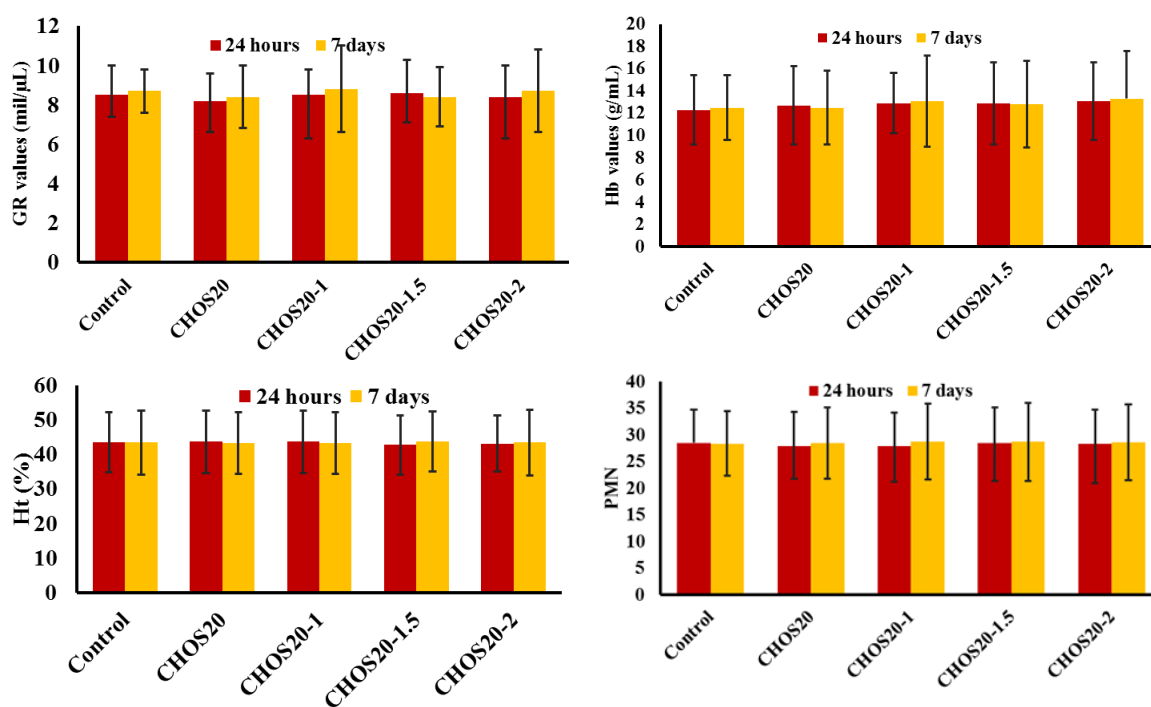
Fig. 8 Poze obtinute in urma testarii activitatii antimicrobiene

A2.10 Determinarea biocompatibilitatii *in vivo*

Pentru a verifica efectele secundare ale administrării hidrogelurilor *in vivo*, au fost efectuate teste pe soareci, prin evaluarea modificărilor hematologice, biochimice și imunologice induse de administrarea lor orală.

Rezultatele testelor hematologice, cuantificate prin determinarea numărului de eritrocite (GR), hemoglobină (Hb) și hematocrit (Ht) nu au indicat modificări semnificative pentru animalele carora le-au fost administrate hidrogelurile, comparativ cu lotul martor, nici la 24 de h, nici la 7 zile în timpul experimentului (Fig. 9). Mai mult, analizând influența hidrogelurilor asupra formulei leucocitare (număr de limfocite, monocite, eozinofile și bazofile) (Fig. 9), s-a observat că acești parametri rămân în intervalul normal, similar cu valorile obținute pentru grupul martor. Aceste date indică absența oricărei reacții inflamatorii sistemice, indicând lipsa de toxicitate a hidrogelurilor sintetizate.

Pe de altă parte, parametrii sistemului imunitar (CO, PC și BC), care dau informații legate de modul în care hidrogelurile administrate sunt percepute de către organism, rămân la valori similare ca la lotul martor, indicând încă o dată, absența oricăror efecte secundare datorate administrării hidrogelurilor. Sunt cazuri în care, chiar dacă formula leucocitară sau parametrii sistemului imunitar raman în limite normale, funcția renală sau hepatică au de suferit, din cauza efectelor secundare ale substantelor administrate. De aceea, pe lângă nivelurile plasmatice ale ureei și creatininei, au fost evaluați și biomarkeri importanți asociați cu funcția renală. Aceste date, alături de cele obținute prin monitorizarea activității ficatului, prin parametrii ALT, AST și LDH indică siguranța în utilizare a materialelor testate pentru bioaplicații.



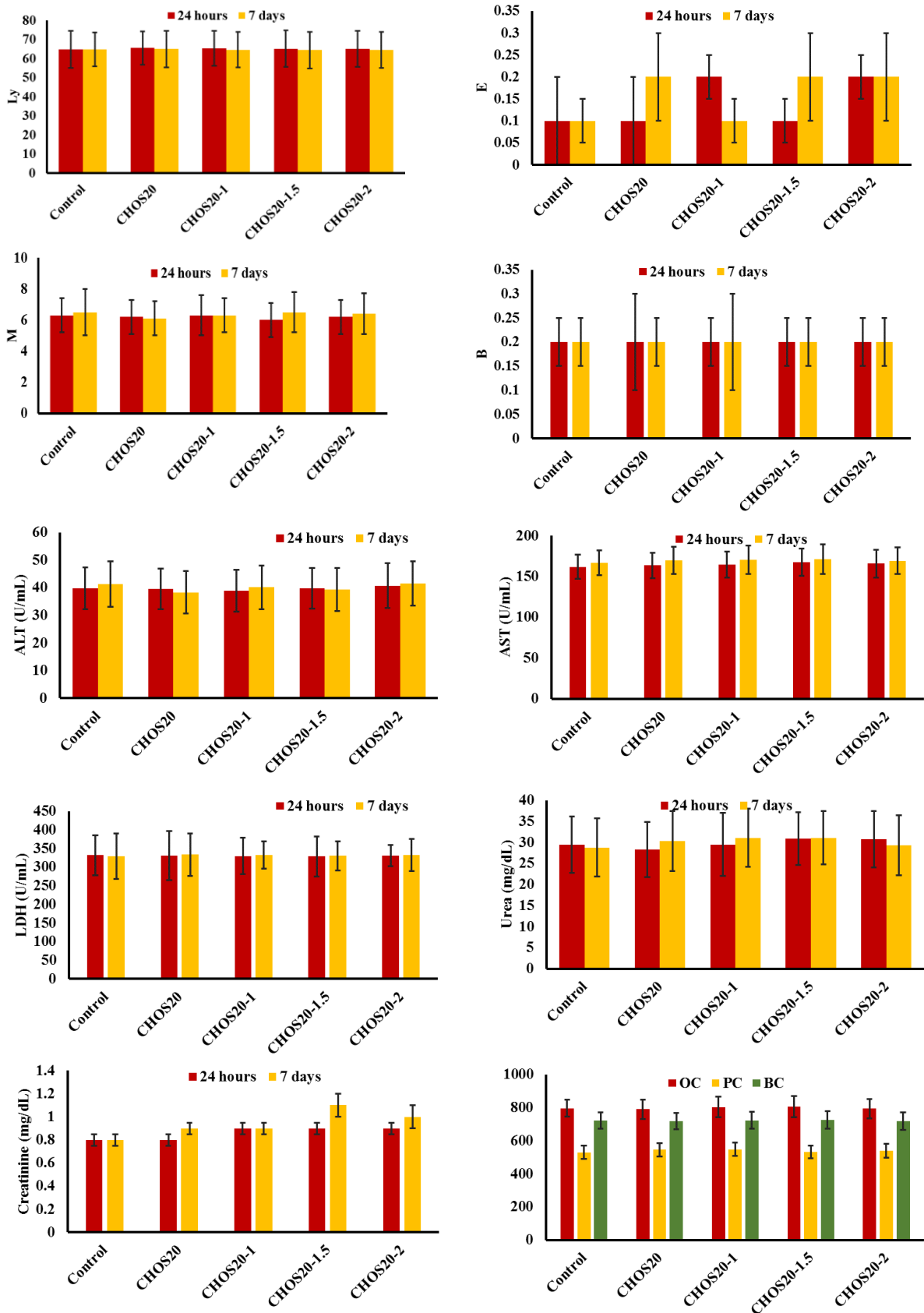


Fig. 9 Variatia parametrilor GR, Hb si Ht, a parametrilor sangelui: ALT, AST, LDH, uree, creatinina si CO, CF si CB in cazul soarecilor carora li s-au administrat hidrogelurile in comparative cu proba control (solutie salina). Valorile sunt exprimate ca medie aritmetica \pm deviatia standbard pentru 6 soareci per grup.

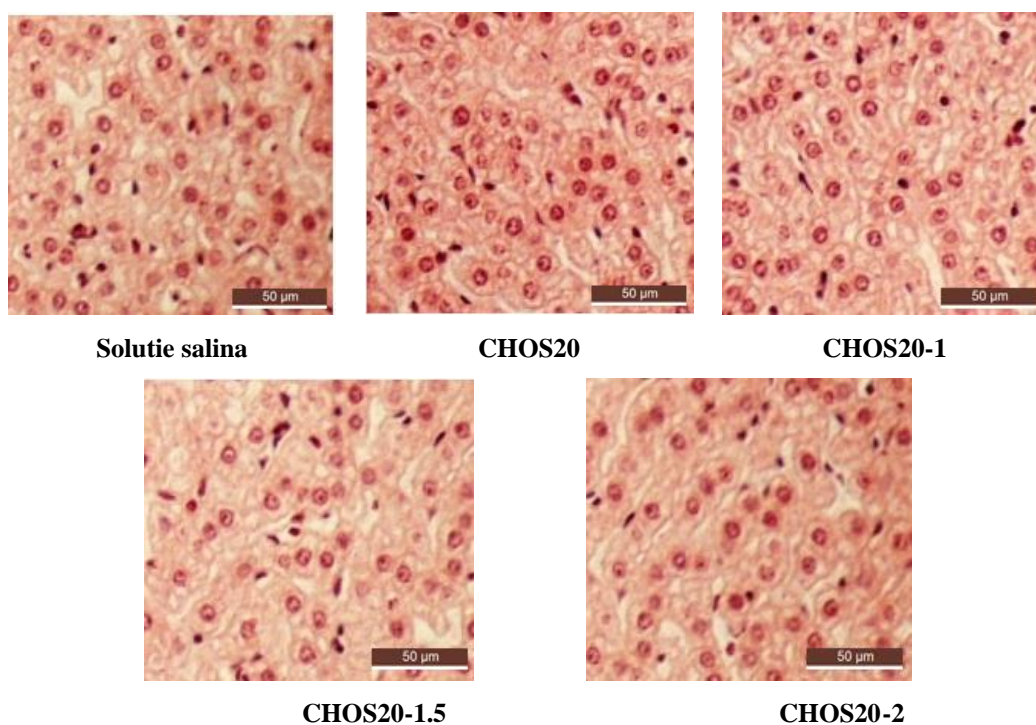


Fig. 10 Imagini de microscopie optica obtinute pe probe de tesut hepatic pentru soareci din lotul martor comparativ cu cei carora li s-au administrat hidrogelurile

De asemenea, investigarea histopatologică a fragmentelor de țesut hepatic obținute de la șoarecii tratați cu hidrogeluri, nu a evidențiat modificări substanțiale ale arhitecturii normale a ficatului, imaginile fiind asemănătoare cu cele obținute din lotul martor, un alt semn al lipsei de toxicitate a hidrogelurilor investigate (Fig. 10).

Prin urmare, hidrogelurile au dovedit un potențial ridicat de utilizare ca biomateriale, rezultatele *in vivo* indicând absența oricăror modificări semnificative în parametrii sanguini și reactivitatea imună a animalelor, după administrarea orală la șoareci.

Pentru a evalua influența hidrogelurilor asupra structurii și viabilității eritrocitelor, au fost efectuate teste de hemocompatibilitate. Pentru comparație, au fost investigate și controlul pozitiv - Triton X-100 și controlul negativ - apă distilată. Astfel, expunerea suspensiei de eritrocite la Triton X-100 a fost urmată de $84,17 \pm 8,73\%$ hemoliză, semnificativă statistic $**p < 0,01$ comparativ cu grupul martor.

Evaluarea impactului hidrogelurilor asupra eritrocitelor a arătat că probele analizate CHOS20, CHOS20-1, CHOS20-1,5, CHOS20-2 au condus la grade scăzute de hemoliza de $2,22 \pm 0,14\%$; $3,06 \pm 0,36\%$; $2,89 \pm 0,45\%$ și respectiv $3,043 \pm 0,04\%$ care indica, o bună biocompatibilitate a hidrogelurilor (Tabel 4).

Tabel. 4

*Hemocompatibilitatea in vitro a hidrogelurilor. Valorile sunt prezentate ca media \pm deviatia standard pentru 6 soareci din grup. ** $p < 0.01$ semnificativ statistic vs controlul negativ*

Grup	Control	Triton X-100	CHOS20	CHOS20-1	CHOS20-1.5	CHOS20-2
% hemoliza	0.02 \pm 0.01	84.17 \pm 8.73**	2.22 \pm 0.14	3.06 \pm 0.36	2.89 \pm 0.45	3.13 \pm 0.04

Astfel, au fost sintetizate si caracterizate 18 hidrogeluri prin reactia de condensare acida a chitooligosaharidelor obtinute in prima etapa a proiectului, cu 2-FPBA. Obtinerea hidrogelurilor a fost o consecinta a iminarii CHOS cu 2-FPBA si a autoasamblarii derivatilor obtinuti datorita segregarii hidrof়il-hidrofob. Sistemele au prezentat degradabilitate enzimatică ridicată, adecvată pentru bioaplicații. Mai mult, hidrogelurile au fost biocompatibile, așa cum au demonstrat testele in vivo pe șoareci, toți parametrii evaluați – hematologici, biochimici și imunologici avand valori normale, similare cu cele obținute pentru grupul control.

Rezultatele acestei etape au fost diseminate prin participarea la doua conferinte internationale cu comunicari orale si prin publicarea unui articol științific in revista Carbohydrate Polymers, Q1, IF=9,381. De asemenea, in urma participării la una din conferinte a fost publicata si o lucrare de tip proceeding in Progress in Organic and Macromolecular Compounds Proceedings.

Astfel, avand in vedere atingerea obiectivelor propuse prin implementarea celor zece activitati corespunzatoare acestei etape a proiectului, se poate concluziona ca gradul de realizare a obiectivelor etapei a II a este de 100%.

Bibliografie

- Adamczyk-Woźniak, A., Cyrański, M. K., Frczak, B. T., Lewandowska, A., Madura, I. D., Sporzyński, A. (2012). *Tetrahedron* 68(19), 3761–3767.
- Ailincăi, D., Marin, L., Morariu, S., Mares, M., Bostanaru, A. C., Pinteala, M., Simionescu, B. C., & Barboiu, M. (2016). *Carbohydrate Polymers* 152, 306–316.
- Ailincăi, D., Porzio, W., Marin, L. (2020). *Polymers* 12(11), 1–16.
- Borys, K.M., Wiczorek, D., Pecura, K., Lipok, J., Adamczyk-Woźniak, A. (2019). *Bioorganic Chemistry*, 91, 103081.
- Goy, R.C., De Britto, D., Assis, O.B.G. (2009). *Polimeros*, 19(3), 241–247.
- Hufnagel D.A., Depas W.H., Chapman M.R. (2015) *Microbiology Spectroscopy*, 3.
- Iftime, M. M., Marin, L. (2018). *Ultrasonics Sonochemistry*, 45, 238–247.
- Iftime, M. M., Morariu, S., & Marin, L. (2017). *Carbohydrate Polymers*, 165, 39–50.
- Marin, L., Ailincăi, D., Mares, M., Paslaru, E., Cristea, M., Nica, V., & Simionescu, B. C. (2015). *Carbohydrate Polymers*, 117, 762–770.

- Marin, L., Moraru, S., Popescu, M. C., Nicolescu, A., Zgardan, C., Simionescu, B. C., Barboiu, M. (2014). *Chemistry- A European Journal*, 20(16), 4814–4821.
- Olaru, A. M., Marin, L., Morariu, S., Pricope, G., Pinteala, M., & Tartau-Mititelu, L. (2018). *Carbohydrate Polymers*, 179, 59–70.
- Raafat, D., Sahl, H. G. (2009). Chitosan and its antimicrobial potential - A critical literature survey. *Microbial Biotechnology*, 186–201.
- Tripathi, S., Mehrotra, G. K., & Dutta, P. K. (2008). *E-Polymers*, 093, 1–7.

Director proiect,
Dr. Daniela Ailincăi

