

## **Raportare științifică**

privind rezultatele obținute în cadrul proiectului

**“Bandaj resorbabil cu eliberare controlată de norfloxacin pentru vindecarea arsurilor”**

**NR. 538PED/2020**

### **Etapa 3 - Optimizarea bandajelor**

#### ***Act 3.1 - Caracterizarea bandajelor optimizate***

Bandajele optimizate obținute în etapa 2 au fost caracterizate morfologic și din punct de vedere al gradului de umflare.

Caracterizarea lor morfologică a implicat analiza bandajelor optimizate prin analiza termogravimetrică (ATG) care a demonstrat îndepărtarea totală a PEO-ului, sorptie dinamică de vapori de apă (DVS) care a demonstrat natura lor mezoporoasă, microscopie de baleiaj (SEM), microscopie de forță atomică (AFM) și microscopie în lumină polarizată (POM) care au adus informații cu privire la diametrul fibrelor, topografia și gradul de cristalinitate. Astfel, înlăturarea totală a PEO-ului din fibrele de C/PEO a fost demonstrată prin dispariția etapei de degradare de la 300 la 400 °C. În plus, curbele ATG a probelor iminate au prezentat o deplasare a temperaturii de descompunere spre valori mai ridicate, corespunzătoare unei stabilități termice îmbunătățite comparativ cu probele ce nu au fost supuse reacției de iminare.

Natura mezoporoasă a fibrelor rezultă prin înlăturarea PEO-ului din fibrele de C/PEO a fost demonstrată prin DVS. În urma acestui experiment s-a obținut o izotermă de pseudo-tip II, cu o buclă de histerezis de tip H, care este asociată cu prezența unor pori de dimensiuni mici, cu un grad de curbură scăzut, formă a porilor anticipată în cazul înlăturării lanțurilor de PEO. Calculul dimensiunii porilor utilizând valorile obținute pentru sorpția maximă de apă a condus la valori cuprinse între 2-3 nm pentru fibrele de chitosan, în concordanță cu definiția unui material mezoporos.

Încărcarea fibrelor cu norfloxacin a dus la scădere a diametrului porilor, sugerând încapsularea medicamentului în interiorul acestora.

Imaginile SEM au arătat fibre continue, cu un diametru mediu mai mic de 200 nm, fără mărgelile, încâlcite, care formează un material super poros cu micro- și submicro- pori. Fibrele au

avut o topografie rugoasa in acord cu incarcarea medicamentului in interiorul porilor si au prezentat birefringenta puternica in lumina polarizata, indicand natura lor semicristalina.

In mediu umed, probele au indicat o absorbtie maximă a umidității de 35 % pentru o umiditatea relativă de 85 % în cazul probelor de chitosan, care scade progresiv până la o valoare de 25 % după încărcarea cu norfloxacin și 20 % după procesul de iminare. Umiditatea a fost adsorbită în timpul creșterii umidității relative, iar atunci când aceasta a scăzut s-a observat o desorbție complete, sugerand capacitatea fibrelor de a juca rol de intermediar în transferul de umiditate dintre rana umedă și mediul uscat. Valorile maxime ale adsorbției umidității sunt comparabile cu cele ale pansamentelor comerciale utilizate pentru tratarea rănilor.

Atunci când bandajele au fost imersate în medii cu pH-ul diferit, caracteristice evolutiei pH-ului exudatului in timpul vindecarii răni, s-a observant umflarea lor rapida, atingand valori ale gradului de umflare comparabil cu al pansamentelor comerciale Kalstotat și Exufiber, pansamente recomandate pentru răni acute și cronice care exudează abundant (ex. arsurile). Capacitatea de umflare a fost influentata puțin de pH-ul mediului, indicand faptul ca probele pot asigura o drenare eficienta a exudatului pe parcursul vindecarii.

### ***Act 3.2 - Eliberarea in vitro a norfloxacinului din bandajele optimizate***

Fibrele au prezentat o eliberare controlată a antibioticului timp de 8 ore, eliberarea fiind corelată cu pH-ului mediului: pentru un pH mai mare s-a înregistrat o rată de eliberare mai mare, în concordanță cu solubilitatea mai bună a norfloxacinului în pH alcalin. S-a observat că iminarea probelor a încetinit eliberarea medicamentului. Astfel, se poate considera că iminarea a avut un efect de ”sigilare” a fibrelor, datorită deplasării echilibrului reacției de iminare către produșii de reacție atunci când pH-ul mediului este unul bazic.

### ***Act 3.3 - Determinarea activitatii antimicrobiene a bandajelor optimizate***

Activitatea antimicrobiană a fost determinată pe tulpini microbiene reprezentative infecțiilor rănilor, cum ar fi bacteriile Gram-negative și cele Gram-pozitive, tulpini de drojdie și de fungi. Pentru a mima exudatul răni, alicote de lizozimă cu o concentrație specifică răni infectate (4830 u/mL) au fost adăugate atât probelor studiate cât și probelor martor. Chiar dacă se consideră că lizozima are rol în protejarea rănilor de infecții și că este eficienta în special în cazul bacteriilor Gram-pozitive, în condiții experimentale, aceasta nu a prezentat activitate, indiferent de specia studiată. Analiza comparativă a rezultatelor au arătat că probele au o activitate

antimicrobiană puternică cu un spectru larg de acțiune împotriva tuturor agenților patogeni studiați, această activitate fiind rezultată prin contribuția fiecărui component.

#### ***Act 3.4 - Determinarea eficienței bandajelor optimizate în vindecarea arsurilor acute***

Capacitatea de vindecare a fibrelor a fost studiată pe răni dermice profunde la șobolani și monitorizate timp de 25 de zile, prin calcularea parametrilor macroscopici (aspect, suprafață, escară, epitelizare), și criteriile microscopice (coagulare, staturile celulare, angiogeneza, celulele inflamatorii, depozitele de fibrină, epitelizare). Scăderea suprafeței răni și caracteristicile histologie au fost evaluate la perioade diferite de timp în comparație cu un pansament non-aderent (tifon și vaselină), ca control negativ.

Toate probele studiate au prezentat diferențe semnificative statistic în rata contracturii, în comparație cu controlul pozitiv. În ceea ce privește calitatea țesutului nou format, cel mai bun rezultat a fost observat pentru probele cu conținut de antibiotic, iminate indicând combinația de chitosan, norfloxacin și AB, ca fiind benefică pentru regenerarea rapidă a țesuturilor.

În comparație cu controlul negativ, care a arătat evoluția naturală a arsurii dermale profunde, toate probele au favorizat o vindecare mai rapidă, cu o sinteză fibrilară mai intensă, fapt atribuit în principal chitosanului. Probele care conțin norfloxacin și sunt iminate au prezentat scoruri superioare pentru etapa de maturare și epitelizare, cu cea mai scăzută inflamație, având un răspuns mai bun în mod constant pe tot parcursul vindecării răni.

#### ***Act 3.5 - Determinarea eficienței bandajelor optimizate în vindecarea arsurilor infectate***

Studiile au fost reluate pe răni infectate. Aplicarea probelor de chitosan martor nu au oprit infecția și șobolanii experimentali au murit la momente diferite ale experimentului. Prin contrast, probele cu norfloxacin sigilate cu AB, după ce în prima etapă arată o evoluție mai lentă a vindecării, probabil datorită combaterii infecției, ulterior au avut o evoluție aproape similară cu cazul rănilor ne-infectate, cel mai probabil datorită faptului că în mediul basic al exudatului medicamentul a fost eliberat rapid iar eliberarea aldehidei a fost stimulată de consumul ei în timpul anihilării tulpinilor de *S. aureus*.

#### ***Act 3.6 - Diseminarea rezultatelor prin participare la manifestări tehnico-științifice***

Rezultatele obținute în cadrul proiectului au fost prezentate sub formă de 3 prezentări orale și 1 poster la următoarele manifestări științifice:

1. *Chitosan imination: an opportunity towards biomaterials with broad application spectrum*, Luminita Marin, Daniela Ailincăi, Manuela Maria Iftime, Anda-Mihaela Craciun, Andrei Bejan, Alexandru Anisie, Bianca Iustina Andreica, 7th International Congress on Biomaterials and Biosensors (BIOMATSEN) Muğla, 22 - 28 Aprilie 2022 – **invited lecture**
2. *Bandages based on chitosan nanofibers for burn healing applications*, Sandu Cibotaru, Daniela Ailincăi, Alexandru Anisie, Luminita Marin, 12th International Conference on Materials Science and Engineering (BRAMAT 2022), Universitatea Brasov-Romania, March 9-11, 2022 - **oral presentation**
3. *Drug delivery systems based on imino-chitosan nanofibers for burn healing applications*, Sandu Cibotaru, Daniela Ailincăi, Alexandru Anisie, Luminita Marin, European Polymer Congress 2022, Prague, Czech Republic, June 26 - July 1, 2022 -**poster**
4. *Biodegradable chitosan based nanofibers with broad spectrum antimicrobial activity for wound healing applications*, L. Marin, D. Ailincăi, S. Cibotaru, A. Anisie, I. Rosca, L. Mititelu-Tartau, European Polymer Congress 2022, Prague, Czech Republic, June 26 - July 1, 2022 - **oral presentation**

**Act 3.7 - Diseminarea pe scară largă prin comunicarea și publicarea națională sau internațională a rezultatelor**

Parte din datele obtinute au fost redactate si publicate sau trimise spre publicare sub forma de pucrari stiintifice:

1. *Imination of Microporous Chitosan Fibers—A Route to Biomaterials with “On Demand” Antimicrobial Activity and Biodegradation for Wound Dressings*, Alexandru Anisie, Irina Rosca, Andreea-Isabela Sandu, Adrian Bele, Xinjian Cheng, Luminita Marin, *Pharmaceutics* 2022, 14, 117, <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14010117>
2. *Biocompatible Chitosan-Based Hydrogels for Bioabsorbable Wound Dressings*, Ramona Lungu, Maria-Alexandra Paun, Dragos Peptanariu, Daniela Ailincăi, Luminita Marin, Mihai-Virgil Nichita, Vladimir-Alexandru Paun, Viorel-Puiu Paun, *Gels* 2022, 8(2), 107; <https://doi.org/10.3390/gels8020107>
3. *Mesoporous chitosan nanofibers loaded with norfloxacin and coated with phenylboronic acid perform as active dressings to accelerate the healing of burn wounds*, Daniela Ailincăi, Sandu

Cibotaru, Alexandru Anisie, Corneliu G. Coman, Aurelian Sorin Pasca, Irina Rosca, Andreea-Isabela Sandu, Liliana Mititelu-Tartau, Luminita Marin – trimisa la publicare

### ***Act 3.8 - Cerere de brevet***

Formulara optima pentru vindecarea arsurilor a fost redactata sub forma unui brevet si trimisa la OSIM pentru inregistrare.

“Netesuta de chitosan cu co-eliberare controlata de antibiotic si principii active”, Luminita Marin, Alexandru Anisie, Ailincă Daniela, Sandu Cibotaru, Bianca Andreica, Irina Rosca, Nr. inregistrare CBI : A / 00478 / 08.08.2022

### ***Concluzii***

***Toate activitatile si indicatorii propusi pentru etapa 3 a proiectului au fost realizate. Mai mult, in timp ce etapa 3 a proiectului si-a propus ca indicatori:***

- ***1 raport de cercetare***
- ***1 lucrare stiintifica***
- ***1 prezentare la o manifestare stiintifica internationala/nationala***
- ***1 cerere de brevet***

***rezultatele bogate obtinute au permis o diseminare mai larga sub forma a 2 lucrari stiintifice deja publicate si o a 3-a trimisa deja spre publicare, 4 prezentari la manifestari stiintifice internationale sub forma unei conferinte, 2 prezentari orale si 1 poster, si 1 brevet stiintific.***

29.10.2022

***Director de proiect  
Dr. Habil. Luminita Marin***

