

Raportare stiintifica

privind rezultatele obtinute in cadrul proiectului

Nanomateriale ecologice pe baza de chitosan pentru aplicatii de interes contemporan
Contract de executie PN-III-P4-ID-PCE-2020-2717, NR. PCE 2/2021

Etapa 1 - Electrofilare de nanofibre de chitosan/chitosan cuaternizat

Rezumatul etapei

Etapa I a acestui proiect a propus obtinerea de nanofibre de chitosan/chitosan cuaternizat si evaluarea proprietatilor lor in vederea aplicarii. Implementarea acestei etape a cuprins 10 activitati, care vor fi descrise in continuare.

Raport stiintifico-tehnic

Act 1.1 - Preparare de chitosan (C) cu grad de deacetilare si masa moleculara controlate

In vederea obtinerii de chitosan cu masa si grad de deacetilare controlate, chitina comerciala a fost deacetilata prin hidroliza in mediu basic, o metoda recomandata de literatura de specialitate, ca fiind mai eficienta si mai putin costisitoare in comparatie cu hidroliza enzimatica. Hidroliza a fost efectuata prin suspendarea chitinei intr-o solutie de NaOH (50%) si incalzire sub agitare in atmosfera de azot. Pentru a obtine grade de deacetilare diferite, amestecul de reactie a fost incalzit la doua temperaturi diferite, si timpii de reactie au fost variati intre 2 si 8 ore. Au rezultat astfel 8 esantioane de chitosan, cu un randament de reactie cuprins in intervalul 76 – 83%, neafectat de durata reactiei. Gradul de deacetilare a celor 8 esantioane a fost calculat din spectrele ^1H -RMN, din raportul integralelor protonului acetil (2.04 ppm) si a protonilor H2-H6 a chitosanului (3.89 – 3.15 ppm) (Figura 1). S-a observat ca gradul de deacetilare a variat de la 84 la 92%, in functie de temperatura si durata reactiei.

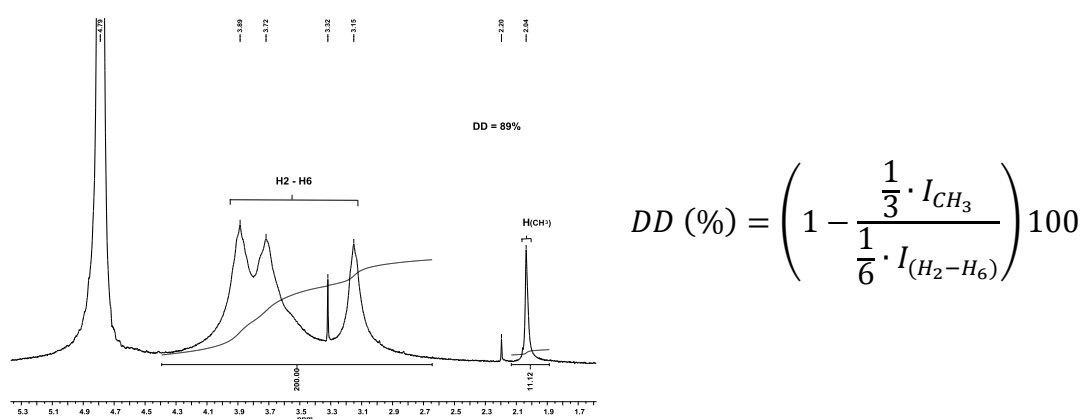


Figura 1. Spectru reprezentativ ^1H -RMN si formula de calcul a DD

In paralel s-a efectuat modificarea masei si gradului de deacetilare a chitosanului prin hidroliza bazica a acestuia, prin tratarea chitosanului cu NaOH 50%, in raport masic chitosan/NaOH de 1/25, pentru 24 ore, la 95°C.

Comparand costul celor doua metode, s-a constatat ca hidroliza bazica a chitosanului este o metoda mai ieftina si mai eficienta de control a proprietatilor fizico-chimice a chitosanului, si drept urmare aceasta metoda a fost adoptata pentru a obtine chitosan pentru obtinerea de nanofibre.

Act 1.2 - Preparare de chitosan substituit cu saruri cuaternare de amoniu (QSC)

Prepararea de derivati QSC cu grade diferite de substitutie (3 esantioane), cu grupari cuaternare de amoniu in lantul lateral prin reactia chitosanului cu clorura de glicidiltrimetilamoniu in apa (mediu heterogen) pentru a conduce substitutia la unitatile amina si hidroxil ale chitosanului

In vederea prepararii celor 3 esantioane, au fost realizate mai multe sinteze, prin varierea rapoartelor molare intre reactanti si a conditiilor de reactie (temperatura). Concret, au fost variate rapoartele de combinare a chitosanului cu glicidil trimetilamoniu (GTMAC), calculat pentru un raport al unitatilor glucozamina si GTMAC cuprins intre 1.12/1 si 2,5/1. Produsii au fost caracterizati structural prin metoda 1H-RMN si FTIR, s-a stabilit solubilitatea lor in apa si gradul de cuaternizare prin titrare conductometrica. S-a stabilit ca gradul de cuaternizare a derivatilor solubili in apa a variat de la 43 la 52,9 %. Trei esantioane au fost selectate pentru testele de electrofilare.

Sinteza de derivati QSC cu grade diferite de substitutie (3 esantioane), cu grupari cuaternare de amoniu in lantul lateral prin reactia chitosanului cu clorura de glicidiltrimetilamoniu in mediu acid pentru a favoriza reactia de substitutie preponderent la unitatile amina.

Sintezele descrise mai sus au fost reluate, cu diferenta ca reactia a fost realizata in mediu omogen (mediu acid) in solutie de acid acetic. Spectrele 1H-RMN ale produsilor nu au permis atribuirea exacta a prezentei gruparilor de glicidiltrimetilamoniu. Gradele de cuaternizare nu au diferit substantial fata de cele obtinute in mediu heterogen, fiind usor mai ridicate. Trei esantioane au fost selectate pentru testele de electrofilare.

Prepararea de derivati QSC cu grade diferite de substitutie (3 esantioane), cu grupari cuaternare de amoniu in lantul lateral, preponderent localizate la atomii de oxigen primar ai chitosanului, prin reactia chitosanului protejat la gruparea amina cu clorura de glicidiltrimetilamoniu

In vederea obtinerii chitosanului modificat la gruparea hidroxil primara s-a aplicat un protocol de lucru care a implica o etapa preliminara de protejare a gruparii amina a chitosanului prin reactia de iminare, sinteza propriuzisa a derivatului cuaternizat si o etapa de deprotejare a gruparii amina in solutie acida de acid clorhidric. Sinteza a fost realizata pentru conditii de reactie diferite (temperatura, timp de reactie). Spectrele RMN nu au fost concludente cu privire la site-ul la care a avut loc substitutia, iar gradul de cuaternizare a fost de apprx. 43%. Trei esantioane au fost selectate pentru testele de electrofilare.

Prepararea de derivati de chitosan cu grade diferite de substitutie (3 esantioane), cu gruparea de sare cuaternara de amoniu pozitionata pe atomul de azot al chitosanului

In vederea obtinerii de chitosan cuaternizat cu grade de substitutie diferite, au fost realizate sinteze in conditii diferite, implicand aplicarea repetata a protocolului de lucru (1, 2x) sau sinteza prin intermediul unui derivat dimetilal obtinut in prealabil. Au fost obtinute trei esantioane de produsi cu grade diferite de cuaternizare, dimetilare, monometilare, care au fost utilizate in continuare pentru electrofilare

Act 1.3 - Electrofilare de fibre de chitosan/chitosan cuaternizat

Esantioanele de chitosan cuaternizat obtinute la activitatea Act. 1.3. au fost utilizate pentru electrofilare de fibre C/QSC. Pentru stabilirea conditiilor optime de electrofilare, au fost facute incercari prin varierea concentratiei acidului acetic (50-90%), raportului de combinare a chitosanului cu derivatii cuaternizati, concentratiei solidelor in solvent, masa chitosanului, tipului de derivat cuaternizat si a conditiilor de electrofilare: voltaj, debit, distanta ac-colector. Electrofilarea a fost realizata pentru 60 de blenduri (cate 5 rapoarte de masa pentru fiecare din cele 12 probe de chitosan cuaternizat selectate). S-a stabilit ca conditiile cele mai favorabile electrofilarii de chitosan/chitosan cuaternizat sunt: utilizarea de: (a) chitosan de masa mica (70 kDa); (b) chitosan cuaternizat in lant lateral; (c) concentratia acidului acetic de 80%; (d) concentratia solidelor in solvent in jur de 3% in functie de masa chitosanului, in timp de parametrii electrofilarii (debit, voltaj, distanta ac-colector) trebuie adaptati la vascozitatea si gradul de cuaternizare. Analiza datelor obtinute ne-a permis sa tragem urmatoarele concluzii: (1) Randamentul de electrofilare a fibrelor chitosan/chitosan cuaternizat este mic in toate cazurile, cel mai probabil datorita densitatii mari de sarcina pe lanturile macromoleculare care conduce la o repulsie a lanturilor si prin urmare o mare dificultate de „incalcire” a lor, fapt pentru care o cantitate mare de solutie se pierde prin cadere gravimetrica sau electrospray; (2) chitosanul cuaternizat pe lant lateral electrofileaza mai bine, cel mai probabil datorita faptului ca lanturile laterale asigura o ecranare a sarcinilor; (3) chitosanul de masa mica favorizeaza electrofilarea; concentratia optima a acidului acetic este 80%; raportul masic optim a celor doua componente este de 75/25. Pentru a stabili conditiile pentru a creste randamentul de electrofilare s-a decis ca in continuare sa fie realizate studii ale solutiilor supuse electrofilarii pentru a stabili interactiunile in solutie si obtinere de chitosan cuaternizat cu lanturi laterale mai lungi.

In paralel, pentru a studia proprietatile fibrelor de chitosan/chitosan cuaternizat care necesita cantitati mari de fibre, s-a recurs la electrofilarea lor indirecta, constand in adaugarea a 10% PEG in amestecul chitosan/chitosan cuaternizat, si indepartarea PEG-ului prin spalare cu etanol a fibrelor. Electrofilarea s-a facut pentru amestecuri de chitosan/chitosan cuaternizat utilizand probele de chitosan cuaternizat obtinute la activitatea 2 care au dat cea mai buna electrofilare in amestec cu chitosanul obtinut la activitatea 1, in rapoarte de masa de la 95/5 la 50/50 si adaos de 10% PEG, in solutii 80% de acid acetic (sau dupa caz mai mici), iar parametrii echipamentului de electrofilare (voltaj, debit, distanta ac-colector, viteza de rotatie a colectorului) au fost variati pentru a atinge stabilizarea jetului. Caracterizarea fibrelor obtinute este prezentata in continuare.

Act 1.4 - Caracterizarea morfologica a fibrelor C/QSC

Morfologia fibrelor a fost apreciata din imaginile micrometrice a fibrelor obtinute prin microscopie electronica de baleiaj (SEM). S-a concluzionat ca derivatii de chitosan cuaternizati in lanturi laterale au electrofilat mai bine decat cei cuaternizati la gruparea amina. S-a remarcat deasemeni ca derivatii cu continut mare de chitosan conduc la fibre cu polidispersitate mare a diametrului, cel mai probabil datorita fortelor de repulsie mari intre lanturi provocate de prezenta sarcinilor pozitive.

Gradul de cristalinitate a fibrelor a fost apreciat din masuratori de difractie de raze X, care au indicat natura lor semicristalina, cel mai probabil datorita alinierii lanturilor macromoleculare in timpul electrofilarii. Natura lor semicristalina a fost indicata si de imaginile POM care au aratat birefringenta puternica.

Analiza termogravimetrica a indicat faptul ca cei doi polimeri au format amestecuri omogene, fara segregari de faza.

Act 1.5 - Determinarea solubilitatii

Gradul de solubilizare a fibrelor a fost investigat prin teste de solubilitate in apa acida cu diverse concentratii (0, 0,1, 0,2, 0,3%) pentru o concentratie a fibrelor de 5mg/ml. Testele au indicat ca utilizarea chitosanului cuaternizat conduce la o crestere a solubilitatii direct proportional cu cantitatea acestuia, si cu cresterea dilutiei.

Cinetica de umflare a fibrelor a fost testata in apa si PBS, prin calcularea umflarii masice la echilibru a aratat o umflare rapida a fibrelor (in primele minute ale testului) si o mentinerea mai indelungata a gradului de umflare pentru fibrele cu continut de chitosan cuaternizat la gruparile amina.

Act 1.6 - Biodegradarea fibrelor

Determinarea biodegradabilitatii fibrelor a fost urmarita in mediu care simuleaza conditiile fiziologice (solutie de lizozima in solutie tampon de pH 7.4, la 37 °C), prin masuratori de pierdere in greutate si vizualizarea eroziunii prin SEM. Asa cum era de asteptat degradarea fibrelor cu continut mare de chitosan cuaternizat are loc mai rapid, datorita interferentei solubilizarii.

Act 1.7 - Biocompatibilitatea fibrelor

Determinarea biocompatibilitatii *in vitro* a fibrelor a fost realizata prin teste MTS (ISO 10993-1:2009) pe fibroblasti. Toate esantioanele de fibre au aratat viabilitate relativa mai mare de 70%, indicand faptul ca ele pot fi folosite ca dispozitive medicale. S-a constatat ca viabilitatea celulara se imbunatateste odata cu scaderea cantitatii de chitosan cuaternizat.

Pe de alta parte, determinarea biocompatibilitatii *in vivo* pe soareci experimentali, nu a aratat modificari ale parametrilor sangelui, activitatii ficatului, rinichilor si sistemului imunitar. La sfarsitul investigatiei, fibrele nu au mai fost gasite la locul implantarii, si nici nu au fost observate modificari ale tesutului, demonstrand faptul ca ele au fost biodegradate in timpul investigarii si ca nu au creat inflamatie locala. S-a concluzionat ca nanofibrele sunt biocompatibile si biodegradabile, fapt ce le face potrivite pentru aplicatii biomedicale.

Act 1.8 - Activitatea antimicrobiana

Activitatea antimicrobiana a fibrelor a fost testata pe bacteriile *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27583 si fungii *Candida albicans* ATCC 90028, care sunt tulpini reprezentative pentru infectiile nozocomiale. Testele au fost realizate prin metoda difuziei discului, in acord cu metoda ISO pentru evaluarea textilelor medicale (ISO 20645: 2004). In mod surprinzator, contrar datelor de literatura care arata ca chitosanul si chitosanul cuaternizat au activitate antibacteriana buna, fibrele nu au aratat zone de inhibitie a cresterii coloniilor. Cu toate acestea, ele nu au permis dezvoltarea de colonii la contactul direct, indicand ca pot actiona ca bariera fizica antibacteriana/antifungica.

Act 1.9 - Proprietati mecanice

Toate esantioanele de fibre rezista la teste mecanice de intindere si tractiune realizate in laborator. Ele au fost capabile sa sustina greutati de pana la 50g. Testele de determinare a proprietatilor mecanice DMA nu au putut fi realizate pana la momentul raportarii datorita unor probleme la echipament, ele fiind programate in decursul lunii decembrie 2021.

Act 1.10 – Bioadezivitatea

In vederea determinarii adezivitatii fibrelor au fost realizate studii de mucoadezivitate prin evaluarea interactiunii fibrelor cu mucina prin masuratori de modificare a potentialului zeta si transmitantei (UV-vis). Testele au confirmat forte de interactiune puternice intre fibrele studiate si mucina, indicand o buna mucoadezivitate si respectiv bioadezivitate.

Concluzii:

Toate activitatile prevazute in planul de realizare a proiectului (Anexa II / la contractul de finantare nr. PCE 2 / 2021, Cod proiect: PN-III-P4-ID-PCE-2020-2717) pentru etapa I a proiectului au fost realizate.

Datele referitoare la obtinerea de chitosan cuaternizat au fost prezentate sub forma unei comunicari orale la simpozionul national „ICMPP – Open Door To The Future Scientific Communications Of Young Researchers, MacroYouth’ 2021”. Datele referitoare la obtinerea si caracterizare fibrelor de chitosan/chitosan cuaternizat, NCG si respectiv NCC au fost colectate sub forma a doua drafturi de lucrari care vor fi elaborate si trimise spre publicare. Datele privitoare la influenta compozitiei, concentratiei acidului acetic, a masei moleculare a chitosanului, gradului si tipului de cuaternizare a chitosanului si parametrilor sistemului de electrofilare asupra randamentului si morfologiei nanofibrelor de chitosan/chitosan cuaternizat au fost sistematizate sub forma unei baze de date. Ele vor fi completate cu studii de interactiune in solutie si cu date de literatura privind electrofilarea unor polimeri incarcati cu sarcini, si trimise la publicare.

**Director Proiect,
Dr. Habil. Luminita Marin**

