

RAPORT ȘTIINȚIFIC FINAL

al proiectului

Hidrogeluri pe baza de chitooligozaharide pentru co-eliberarea unor agenți antivirali și antifungici

Proiectul *Hidrogeluri pe baza de chitooligozaharide pentru co-eliberarea unor agenți antivirali și antifungici* a avut drept **obiectiv general** dezvoltarea unor noi sisteme de eliberare controlată a medicamentelor de tip hidrogel, capabile să elibereze simultan atât agenți antifungici, cât și antivirali, adecvați pentru tratamentul și profilaxia HIV, precum și pentru tratarea co-infecțiilor asociate cu HIV-ul, cum ar fi: Candidoza. Ipoteza de la care a pornit prezentul proiect a constat în asocierea a trei elemente biologice active: (i) tenofovir – medicament cu activitate antivirală, aprobat de FDA pentru tratamentul și profilaxia HIV; (ii) chitooligozaharide (CHOS) – compuși cu solubilitate ridicată, biocompatibilitate îmbunătățită și, de asemenea, biodegradabilitate superioară chitosanului și (iii) aldehida boronică (2-FPBA), o monoaldehidă, care a dovedit deja capacitatea de a induce gelifierea chitosanului, formând hidrogeluri cu proprietăți antifungice puternice împotriva a două tulpini de *Candida*, atât pe plancton, cât și pe biofilm. Astfel, ideea proiectului a fost aceea de a obține sisteme de eliberare controlată a tenofovirului cu efect retard, datorită interacțiunilor care se dezvoltă între medicament și matrice, cu șanse reale de a fi aplicate. Acest subiect este o prioritate de top a Comisiei Europene HORIZON 2020, care subliniază „necesitatea de a dezvolta noi soluții și de a face posibilă încheierea epidemiei (HIV)”.

Acest **obiectiv general** a fost divizat în **patru obiective specifice**, după cum urmează:

1. Sinteza a cel puțin trei chitooligozaharide, cu grade de polimerizare și hidrofilicități diferite.
2. Obținerea a trei serii de hidrogeluri cu grade de reticulare și biodegradabilități diferite
3. Obținerea de sisteme de co-eliberare a unor agenți antifungici și antivirali
4. Diseminarea prin: (i) publicarea/trimiterea la publicare a cel puțin două articole în reviste cu factor de impact >5 și (ii) 3 prezentări la conferințe naționale/internationale

Primul obiectiv al proiectului a fost realizat prin implementarea a patru activități conform anexei II din contractul de finanțare, care au făcut obiectul primului raport de etapă.

Astfel, au fost sintetizate șapte **CHOS** cu grade de polimerizare diferite prin reacția de depolimerizare a chitosanului în mediul omogen, sub acțiunea acidului azotos obținut *in situ* din acid acetic și azotit de sodiu. Chitooligozaharidele obținute au fost caracterizate din punct de vedere structural prin FTIR și RMN și le-a fost determinată solubilitatea. Probele au fost analizate și s-a decis obținerea de hidrogeluri în reacția cu acid 2-formilfenilboronic (**2-FPBA**) pornind de la toate **CHOS** sintetizate, mai puțin **CHOS10**, care are un grad de polimerizare prea mic pentru a genera hidrogeluri cu proprietăți mecanice adecvate pentru aplicații ulterioare. ***Gradul de realizare al obiectivului 1 a fost de 100%.***

Al doilea obiectiv al proiectului și-a propus **sinteza și caracterizarea de hidrogeluri pe baza de chitooligozaharide (CHOS), obținute, caracterizate și selectate în prima etapă a proiectului**, și acid 2-fenilformilboronic (2-FPBA) prin implementarea a zece activități conform anexei II din contractul de finanțare. Rezultatele obținute au fost prezentate pe larg în raportul etapei a doua.

Au fost sintetizate șase serii de hidrogeluri, fiecare conținând trei hidrogeluri prin reacția de condensare acidă a CHOS cu grade de polimerizare diferite cu 2-FPBA. Hidrogelurile au fost caracterizate din punct de vedere structural prin FTIR și RMN, din punct de vedere morfologic prin SEM, din punct de vedere al arhitecturii supramoleculare prin POM și WXR, le-a fost determinat gradul de umflare în apă și PBS și de asemenea degradarea enzimatică în prezența de lizozimă. Testele reologice au demonstrat comportamentul de gel și tixotropia sistemelor obținute. Mai mult, rezultatele testelor antimicrobiene (activitate de 8 microorganisme) și biocompatibilitatea hidrogelurilor, demonstrată prin teste *in vivo* pe șoareci, au indicat potențialul ridicat al acestora pentru bioaplicații.

Astfel, gradul de realizare al obiectivului al doilea a fost de 100%, începând totodată și activitățile de diseminare vizate la Obiectivul 4 prin participarea la două conferințe internaționale cu comunicări orale și prin publicarea unui articol științific în revista Carbohydrate Polymers. De asemenea, în urma participării la una din conferințe a fost publicată și o lucrare de tip proceeding în Progress in Organic and Macromolecular Compounds Proceedings.



Iminoboronate-chitoooligosaccharides hydrogels with strong antimicrobial activity for biomedical applications

Daniela Ailincai^{a,*}, Irina Rosca^a, Simona Morariu^a, Liliana Mititelu-Tartau^b, Luminita Marin^a

^a "Petru Poni" Institute of Macromolecular Chemistry, Gr. Ghica Voda Alley, 41A, Iasi, Romania

^b "Grigore T. Popa" University of Medicine and Pharmacy, Iasi, Romania

ARTICLE INFO

Keywords:
Chitoooligosaccharides
2-Ferrocenylphenylboronic acid
Antimicrobial
Biocompatibility

ABSTRACT

The paper reports hydrogels prepared from chitoooligosaccharides with different polymerization degrees (14 to 51), by crosslinking with 2-ferrocenylphenylboronic acid in three molar ratios of their functionalities. The structural, morphological and supramolecular characterization confirmed a hydrogelation mechanism based on self-assembling of newly formed imine units and porous morphology. Rheological measurements confirmed the formation of thixotropic hydrogels, and swelling tests indicated mass equilibrium swelling values up to 25 in water and 9 in phosphate buffer saline. The monitoring of enzymatic degradability demonstrated the enhancing of biodegradation rate as long as the polymerization degrees of the oligomers decreased, the mass loss increasing from 10% to 43%. *In vivo* and *ex-vivo* biocompatibility investigation on experimental mice showed no cytotoxic effect, and *in vitro* antimicrobial tests revealed remarkable antimicrobial properties on nine strains, with a maximum inhibition diameter of 49 mm on *Aspergillus brasiliensis* and very good results on *Cladosporium cladosporioides*, *Penicillium cryosogenum* and different *Candida* species.

1. Introduction

Systemic infections caused by microorganisms are considered by World Health Organization a global health priority, affecting millions of people worldwide, leading in many cases to death (Minasyan, 2019; Pintner, Booth, Perry, & Teeling, 2012). That is why, in the last years, the urgent need for materials with broad-spectrum antimicrobial activity became self-evident (Qiu et al., 2020). Among the antimicrobial materials, chitosan based hydrogels represent an appropriate starting point for the design of highly efficient antimicrobial systems due to chitosan's inherent bacteriostatic properties (Raafat & Sahl, 2009; Verlee, Mincke, & Stevens, 2017). Diverse hydrogels containing chitosan were reported in the literature, proving promising antimicrobial properties on several microorganisms *per se* or in combination with antimicrobial agents. Injectable hydrogels based on chitosan and glucosamine were reported as being efficient against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, while similar results were obtained using semi-interpenetrating polymer network hydrogels based on chitosan and bacterial cellulose (Du, Yang, Ye, & Li, 2013). Libermann et al. reported physical hydrogels based on chitosan and sulfated polysaccharides with poor antimicrobial properties, whose activity highly increased by

incorporation of ZnCl₂ (Liberman, Ochbaum, Bitton, & Arad, 2021). Similar, high activity against *S. aureus* and *E. coli* was reached by dispersion of silver nanoparticles into a matrix of chitosan crosslinked with triphosphate (Yang et al., 2020). Many chitosan based hydrogels were used as matrix for encapsulation of antibiotics, proving great antimicrobial activity against a broad spectrum of microorganisms, such as *S. aureus*, *E. coli* or *Pseudomonas aeruginosa*, depending mainly on the drug used (Tian, Hua, Tian, & Liu, 2020).

Literature data demonstrates that chitosan's bactericidal activity depends significantly on its molecular weight, shorter chitosan chains presenting higher mobility and, therefore, increased antimicrobial activity (Kingkaew, Kirdponpattara, Sanchavanakit, Pavasant, & Phisalaphong, 2014). Based on the previously described aspects, chitoooligosaccharides (CHOSs), which are actually chitosan's oligomers, gain more attention recently (Li, Xing, Liu, & Li, 2016; Tabassum, Ahmed, & Ali, 2021). Despite their biological properties, CHOSs were less used in hydrogels obtaining, a few studies being reported up to now but with poor investigation of their antimicrobial properties. Hydrogels based on CHOSs and poly(vinyl alcohol) were used for the encapsulation of gallic acid, the systems being very effective against *Propionibacterium acnes*, while hydrogels based on CHOSs and carboxymethyl cellulose

* Corresponding author.

E-mail address: ailincai.daniela@icmpp.ro (D. Ailincai).

<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118727>

Received 20 April 2021; Received in revised form 10 September 2021; Accepted 1 October 2021

Available online 9 October 2021

Imino-Chitosan Hydrogels - Promising Biomaterials for *Candida* Infections' Treatment

Daniela Ailincai¹(✉), Mihai Mares², Andra Cristina Bostanaru², and Luminita Marin¹

¹ "Petru Poni" Institute of Macromolecular Chemistry, Grigore Ghica Voda Alley, Iasi, Romania
ailincai.daniela@icmpp.ro

² "Ion Ionescu de la Brad" University of Life Sciences, Iasi, Romania

Abstract. Biocompatible hydrogels were synthesized from chitosan and 2-formylphenylboronic acid (2-FPBA), by the acid condensation reaction of chitosan's amine groups and aldehyde group of 2-FPBA. FTIR and NMR spectroscopy demonstrated that the hydrogelation is a consequence of the formation of reversible imine linkages between the reagents, while wide angle X-ray diffraction proved the highly ordered supramolecular architecture of the obtained hydrogels. The viscoelastic behavior of the hydrogels was evaluated by rheological measurements, performed at human body temperature. The hydrogels were highly elastic, stiff and strong, with a quite high resistance to deformation and a high recovery degree. The morphology investigation by scanning electron microscopy revealed the samples' porosity, forming sponges-like microstructures, with quite uniform pores size distribution. The antifungal activity of the synthesized hydrogels was evaluated on two *Candida* strains and the obtained results recommend these materials for the treatment of *Candida* infections.

Keywords: Chitosan · Hydrogels · Antifungal properties · 2-formylphenylboronic acid

1 Introduction

Chitosan based hydrogels are materials intensely used for biomedical application, due to their remarkable properties, given by chitosan's intrinsic properties such as: biocompatibility, biodegradability, antitumoral or hypolipidemic activity [1]. Moreover, due to its moderate hydrophilic character, chitosan facilitates cell adhesion, proliferation and cell differentiation, while its antibacterial activity gives it an added value compared to other natural originating polymers [2]. On the other hand, chitosan presents some disadvantages such as poor mechanical properties, while due to its difficulty of being obtained with a high degree of purity, worsens the mechanical properties of the resulted materials, which usually present the inability to maintain their shape [3]. An approach used for diminishing these drawbacks is the obtaining of chitosan-based derivatives in the form of films or hydrogels. Chitosan-based hydrogels can be prepared by both physical and chemical crosslinking [4]. The physically crosslinked hydrogels have the advantage that they are sensitive to temperature, but their application is limited due to their weak

Al treilea obiectiv al proiectului *Hidrogeluri pe baza de chitooligozaharide pentru co-eliberarea unor agenți antivirali și antifungici* și-a propus **sinteza și caracterizarea unor sisteme de eliberare de medicamente prin încapsularea unui medicament antiviral – tenofovir în hidrogelurile sintetizate în etapa a-II-a (hidrogeluri pe baza de chitooligozaharide (CHOS) și acid 2-fenilformilboronic (2-FPBA))**, prin implementarea a șase activități conform anexei II din contractul de finanțare. Pentru simplificare, sistemele de eliberare a medicamentelor vor fi numite în continuare formulări.

Având în vedere că tenofovirusul are o grupare de tip amina care ar putea reacționa cu gruparea aldehidă de la 2-FPBA, a fost verificată această posibilitate prin spectroscopie RMN. Spectrele RMN înregistrate pe amestecul celor două componente în prezența de acid acetic nu au prezentat alte semnale decât cele corespunzătoare celor doi compuși puri, fără apariția altor semnale, indicând că între cele două componente nu a avut loc o reacție chimică.

În continuare, au fost sintetizate 12 formulări prin reacția de condensare acida a oligomerilor obținuți în etapa 1 a proiectului, cu 2-FPBA în prezența medicamentului antiviral tenofovir.

Caracterizarea structurală a sistemelor obținute a fost realizată prin spectroscopie RMN și FTIR. Ambele metode au indicat formarea legăturilor imine între oligomeri și 2-FPBA, chiar și în prezența medicamentului. De asemenea, în spectrele RMN și FTIR ale sistemelor rezultate au fost prezentate și semnale care indică prezența tenofovirusului.

Caracterizarea supramoleculară a formulărilor s-a făcut prin înregistrarea difractogramelor de raze X la unghi larg, comparativ cu sistemele fără medicament sintetizate în etapa a doua a proiectului și cu medicamentul pur. Determinările au fost făcute pe xerogeluri, materialele obținute în urma liofilizării hidrogelurilor. Prin comparație cu oligomerii, difractogramele xerogelurilor de referință au indicat o arhitectură supramoleculară mai ordonată, atribuită segregării hidrofili/hidrofob a derivaților de chitooligozaharide, așa cum s-a demonstrat anterior pentru sistemele bazate pe chitosan și monoaldehide. Nu au fost observate modificări semnificative în difractogramele formulărilor. Mai precis, nu a fost detectat niciun maxim din difractograma TNF, ceea ce indică faptul că medicamentul a fost încapsulat la nivel submicrometric în matricea de hidrogel.

Microscopia de baleiaj (SEM) a indicat morfologia poroasă a formulărilor și a permis determinarea stării în care medicamentul se găsește încapsulat în hidrogeluri. Absența cristalelor

de dimensiuni micrometrice indica o distributie uniforma si fina a TNF-ului in matricea de hidrogel, confirmand datele de raze X.

Prin microscopie optica in lumina polarizata s-a evidentiat birefringenta formularilor in acord cu arhitectura lor foarte ordonata demonstrata anterior prin difractie de raze X. imaginile POM au afisat o textura birefringenta continua, fara cristale evidente, indicand inca o data distributia uniforma a medicamentului in matricea de hidrogel. S-a incercat si cartografierea RAMAN a formularilor insa din cauza faptului ca semnalele spectrale ale matricei si a medicamentului se suprapun, datele nu au fost concludente.

Capacitatea de eliberare a TNF-ului din formulari reprezentative a fost evaluată prin spectroscopie UV-VIS, investigând influența particularităților sistemelor, consecință a diferitelor compoziții ale acestora: lungimea oligomerilor și conținutul diferit de aldehida pentru eliberarea medicamentului TNF. Toate probele au eliberat TNF-ul cu viteze diferite în funcție de particularitățile lor intrinseci: S1 a eliberat medicamentul încapsulat cu cea mai mare viteză datorită solubilității mai mari a oligomerilor, in timp ce proba S12 a eliberat medicamentul încapsulat cel mai lent. Așa cum era de așteptat, toate celelalte probe au avut viteze intermediare de eliberare.

Este cunoscut faptul că procesul de eliberare a unui medicament este unul complex, depinzand de mulți factori, cum ar fi: (i) particularitățile intrinseci ale matricii, (ii) hidrofobicitatea/hidrofilicitatea medicamentului și (iii) interacțiunile dintre matrice și medicamentul încapsulat. Prin urmare, pentru a înțelege procesul de eliberare a TNF-ului din matricea de hidrogel și pentru a evalua factorii determinanti care guvernează acest proces, datele cinetice au fost fitate cu diferite modele matematice precum: modelul cinetic de ordinul zero, modelul cinetic de ordinul întâi, Korsmeyer-Peppas, Higuchi și Hixson Crowell. Toate datele obtinute au indicat faptul că eliberarea medicamentului încapsulat în aceste formulări este un proces complex care evoluează în timp, în prima etapă dizolvarea și difuzia medicamentului fiind forța motrice, în timp ce în a doua etapa, dizolvarea și eroziunea matricei câștigand o importantă mai ridicata.

Ulterior, a fost evaluat preliminar efectul antiviral prin testare „*in vivo*” pe șobolani. Testele au presupus evaluarea hemocompatibilitatii formularilor, a biocompatibilitatii lor si nu în ultimul rand influenta formularilor asupra unor markeri ai sistemului imunitar.. Avand in vedere ca in literatura s-a raportat ca, TNF-ul in combinatie cu agenți antimicrobieni poate duce la creșterea

toxicității renale, au fost evaluate și modificările nivelurilor serice ale ureei și creatininei, markeri importanți pentru funcționalitatea rinichilor. Administrarea formulărilor nu a fost asociată cu modificări semnificative ale ureei și creatininei în comparație cu grupul de control, indicând lipsa nefrotoxicității.

Toate datele obținute în urma testelor *in vivo* relevă faptul că formulările prezintă biocompatibilitate, evidențiată prin absența modificărilor hematologice, a transaminazelor hepatice, a lactatului dehidrogenazei, ureei și creatininei. Astfel, încorporarea aldehidei antifungice 2-FPBA ca agent de reticulare a oligomerilor de chitosan, pentru a acționa ca matrice pentru încapsularea TNF, este benefică pentru a asigura prevenirea/tratarea co-infecțiilor asociate HIV și HIV fără a avea un efect toxic.

De asemenea, pentru a evalua efectul antiviral al TNF-ului în hidrogeluri, s-au monitorizat și doi markeri ai sistemului imunitar: - nivelul seric al interleukinei 6 (IL-6) și valoarea factorului de necroză tumorală alfa (TNF α). Formularile pe baza de TNF au prezentat valori puțin mai ridicate decât martorul fără TNF, de 22,5 vs. 18 și respectiv 2585 vs 2530, datorită efectului antiviral al medicamentului.

*Astfel, au fost sintetizate și caracterizate 12 sisteme de eliberare a medicamentelor prin reacția de condensare acida a chitooligozaharidelor obținute în prima etapă a proiectului, cu 2-FPBA, în prezența tenofovirului ca medicament antiviral. Obținerea sistemelor a fost o consecință a iminării CHOS cu 2-FPBA și a autoasamblării derivaților obținuți datorită segregării hidrofîl-hidrofob, în prezența medicamentului. Sistemele au prezentat o distribuție uniformă a medicamentului încapsulat. Mai mult, hidrogelurile au fost biocompatibile, așa cum au demonstrat testele *in vivo* pe șoareci, toți parametrii evaluați – hematologici, biochimici și imunologici având valori normale, similare cu cele obținute pentru grupul control.*

*Rezultatele acestei etape au fost diseminate prin participarea la două conferințe internaționale cu comunicări orale, prin publicarea unui articol științific în revista *Cellulose Chemistry and Technology* și prin trimiterea unui articol, în curs de evaluare la revista *Carbohydrate Polymers*.*

Astfel, se poate concluziona că gradul de realizare al obiectivului 3 este de 100%, rezultatele obținute în etapa a treia a proiectului ducând și la îndeplinirea Obiectivului 4, prin participarea la două conferințe internaționale și prin publicarea unui articol științific în revista

Cellulose Chemistry and Technology si prin trimiterea unui articol, in curs de evaluare la revista *Carbohydrate Polymers*.

Articol publicat in Cellulose Chemistry and Technology

CHITOSAN OLIGOMERS – SYNTHESIS, CHARACTERIZATION AND PROPERTIES

DANIELA AILINCAI, IRINA ROSCA, LAURA URSU and ANDREI DASCALU

“Petru Poni” Institute of Macromolecular Chemistry,
Grigore Ghica Voda Alley, 41A, Iasi, Romania

© Corresponding author: D. Ailincăi, ailincăi.daniela@icmpp.ro

Received May 6, 2022

The paper presents the synthesis of chitosan oligomers with different polymerization degrees (PD) by chitosan depolymerization in the presence of nitrous acid, aiming to study the correlation between their polymerization degree and their properties. Seven oligomers were synthesized and purified. The oligomers were characterized from the structural point of view by FTIR, NMR and UV-Vis spectroscopy, revealing the formation of shorter chains with an ending unit of 2,5-D-anhydromannofuranose. The morphology evaluation at micro and nano levels by SEM and AFM revealed the granular morphology of the oligomer films, while WXR and POM demonstrated their higher degree of ordering, in comparison with the parent chitosan. The antimicrobial tests showed the potential of the synthesized compounds to be used for biomedical purposes, the oligomers presenting antifungal activity, which increased with the decrease in their polymerization degree, especially against *Aspergillus niger*.

Keywords: chitosan oligomers, antimicrobial properties, granular morphology

INTRODUCTION

Chitosan, a polycationic biopolymer obtained from chitin has attracted a huge interest in the last years.¹⁻³ It presents many advantages, which include availability, low cost, high biocompatibility, biodegradability and ease of chemical modification. Chitosan presents great biological properties, including promotion of wound healing, hemostatic (chitosan bandages are used by paramedics to stop bleeding instantaneously), hypolipidemic and antimicrobial activity, immune enhancement and mucoadhesion. However, in order to benefit from all these biological activities, it is very important to know the metabolism of chitosan in physiological medium.⁴ Studies have demonstrated that this metabolism is significantly influenced by the molecular weight of the polymer. That is why, the researchers have turned their attention to chitosan oligomers, which have the same or even better biological characteristics, without presenting the weaknesses of chitosan. The production of well-defined oligomer mixtures, or even pure oligomers, is of great interest, but it is not straightforward.⁵

Chitosan oligomers, usually named chitoooligosaccharides (CHOSs) are obtained by chitosan depolymerization, which can occur chemically or enzymatically, by acid hydrolysis or by enzymatic hydrolysis.⁶

Enzymatic depolymerization of chitosan involves chitinases and chitosanases, which are able to hydrolyze the glycoside bonds from the chitosan structure. Both enzymes are found in fungi, bacteria and plants,⁷ and the most important difference between them is the fact that chitinases preferentially attack polymers with a high N-acetyl content.^{8,9} When the enzymatic method is used for chitosan depolymerization, the price of the resulted products increases and their applicability at a larger scale is not feasible. That is why, new physical methods, such as microwave,¹⁰ hydrothermal,¹¹ ultrasonication¹² and gamma-rays assisted methods,¹³ have been developed.

Further, in 1957 Horowitz *et al.* prepared CHOSs using a chemical method.^{14,15} They showed that acid hydrolysis of chitosan with concentrated hydrochloric acid is possible and leads to chitosan oligomers with low values of the polymerization degree.¹⁴ After this first success, other depolymerization agents were used, such as nitrous acid, phosphoric acid and hydrofluoric acid.¹⁷

Chitosan depolymerization by nitrous acid is a homogeneous reaction where the number of broken glycosidic bonds is stoichiometric to the amount of nitrous acid used, which makes the reaction easy to control.^{16,17} Even though the reaction has been known for a long time, in the literature there is no exhaustive study from the structural, morphological and supramolecular points of view regarding the

In concluzie, cele patru obiective ale proiectului au fost realizate in proporție de 100%, indicatorii propuși au fost de asemenea realizați prin publicare a doua articole in reviste cu factor de impact cumulat >10 si prin trimiterea unui al treilea articol aflat in evaluare la revista Carbohydrate Polymers si prin participarea la patru conferințe internaționale cu comunicări orale.

Rezultatele acestui proiect ar trebui ar trebui sa aibă un impact puternic din punct de vedere științific, medical și socio-economic, rezultatele proiectului având atât relevanță fundamentală, cât și aplicativă. Sistemele obținute prezintă un potențial ridicat pentru aplicații, datorită designului lor unic, implicând trei componente bioactive legate între ele prin legături imina sau fizice reversibile, având șanse reale de a influența în mod pozitiv calitatea vieții persoanelor care suferă de HIV dar și siguranța umană, prin efectul profilactic.

Principalul rezultat al proiectului este reprezentat de publicații, un articol fiind deja publicat in Carbohydrate Polymers (Q1, FI=10,723) si un al doilea fiind in evaluare la același jurnal.