

**UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE AGRICOLE ȘI MEDICINĂ VETERINARĂ
„ION IONESCU DE LA BRAD” IAȘI
FACULTATEA DE MEDICINĂ VETERINARĂ
ȘCOALA DOCTORALĂ DE MEDICINĂ VETERINARĂ
DOMENIUL DE DOCTORAT: MEDICINĂ VETERINARĂ
SPECIALIZAREA: BOLI PARAZITARE**

TEZĂ DE DOCTORAT

**Conducător de doctorat,
Prof. univ. dr. MIRON Liviu**

**Doctorand,
Andrei-Cristian LUPU**

Anul 2019

**UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE AGRICOLE ȘI MEDICINĂ VETERINARĂ
„ION IONESCU DE LA BRAD” IAȘI
FACULTATEA DE MEDICINĂ VETERINARĂ
ȘCOALA DOCTORALĂ DE MEDICINĂ VETERINARĂ
DOMENIUL DE DOCTORAT: MEDICINĂ VETERINARĂ
SPECIALIZAREA: BOLI PARAZITARE**

TEZĂ DE DOCTORAT

**NANOCONJUGATE UTILIZATE ÎN PROFILAXIA
ȘI TRATAMENTUL UNOR BOLI ALE PEȘTELOR**

**Conducător de doctorat,
Prof. univ. dr. Liviu MIRON**

**Doctorand,
Andrei-Cristian LUPU**

Anul 2019

UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE AGRICOLE ȘI MEDICINĂ VETERINARĂ
„ION IONESCU DE LA BRAD” IAȘI
FACULTATEA DE MEDICINĂ VETERINARĂ
ȘCOALA DOCTORALĂ DE MEDICINĂ VETERINARĂ
DOMENIUL DE DOCTORAT: MEDICINĂ VETERINARĂ
SPECIALIZAREA: BOLI PARAZITARE

DOCTORAL THESIS

NANOCONJUGATES USED IN PROPHYLAXIS AND TREATMENT OF CERTAIN FISH DISEASES

**Conducător de doctorat,
Prof. univ. dr. Liviu MIRON**

**Doctorand,
Andrei-Cristian LUPU**

Anul 2019

Fiecare muncă provocatoare necesită eforturi proprii, precum și îndrumări ale bătrânilor, în special cei care au fost foarte apropiați de inima mea.

Efortul meu smerit este dedicat tatălui și mamei mele a căror afecțiune, iubire, încurajare și rugăciune de zi și noapte, mă fac să reușesc să obțin un astfel de succes și onoare, alături de toți respectații profesori/educatori care au contribuit la formarea mea.

CUPRINS

INTRODUCERE	ix
REZUMAT	xiii
PARTEA I - STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	1
CAPITOLUL 1. PARAZITOZE FRECVENTE ÎN ACVACULTURĂ: BIOLOGIE, DIAGNOSTIC, CONTROL	3
Introducere	3
1.1. Protista	4
1.2. Monogenea	7
CAPITOLUL 2. NANOBIOTEHNOLOGIA	11
2.1. Nanobiologia	11
2.2. Nanomedicina	12
CAPITOLUL 3. TIPURI DE SUBSTANȚE CARRIER	15
3.1. Structurile Ciclodextrinelor	15
3.2. Metodologia de complexare cu ciclodextrine	17
3.3. Caracterizarea complexilor de incluziune cu ciclodextrine	20
3.3.1. Scanarea cu microscopul electronic (SEM)	20
3.3.2. Spectroscopia UV (ultraviolete)	20
3.3.3. Dicroism circular	20
3.3.4. Scanarea calorimetrică diferențiată (DSC-Differential Scanning Calorimetry)	20
3.3.5. Spectroscopie cu radiații Infraroșii (IR)	21
3.3.6. Difractometria cu Raze X (XRD)	21
3.4. Folosirea ciclodextrinelor în tipuri de produse	21
3.4.1. Produse destinate administrării orale	21
3.4.2. Produsele nazale și pulmonare	22
3.4.3. Produse cu administrare/eliberare rectală	23
3.4.4. Eliberarea medicamentului transdermic	23
3.4.5. Produse cu eliberare oculară	23
3.4.6. Produsele cu eliberare parenterală	24
3.5. Principiu activ selectat pentru pentru formare de compuși complecși de incluziune	25
3.6. Concluzii parțiale	26

CAPITOLUL 4. TEHNICI ȘI METODE DE STUDIERE A CARACTERISTICILOR FUNCȚIONALE ALE SISTEMELOR DE EMULSIE	27
Introducere	27
4.1. Stabilitatea emulsiei	28
4.1.1 Observarea vizuală a emulsiei	28
4.1.2 Observarea microscopică a emulsiei	29
4.1.3. Analiza mărimii particulelor	30
4.1.4. Analiza încărcării	32
4.1.5. Proprietăți reologice	32
4.2. Aspectul și morfologia emulsiei	33
4.2.1. Aspectul emulsiei	33
4.2.2. Morfologie.....	34
4.2.3. Încapsularea emulsiei.....	34
4.3. Concluzii parțiale	36
PARTEA II – CERCETĂRI PROPRII	37
CAPITOLUL 5. SCOPUL ȘI OBIECTIVELE CERCETĂRII	39
CAPITOLUL 6. PATOLOGIA IHTIOFAUNEI DIN SISTEMELE DE CREȘTERE INTENSIVE	41
6.1. Factorii care determină apariția bolilor	41
6.2. Protozoare și trematode monogene care afectează grav creșterea intensivă a peștilor	46
6.3. Concluzii parțiale	53
CAPITOLUL 7. SINTEZA ȘI CARACTERIZAREA COMPLEXULUI DE INCLUZIUNE AL β-CICLODEXTRINEI CU DIMINAZENUL ACETURAT	55
Introducere	55
7.1. Material și metodă.....	56
7.1.1. Substanțe folosite.....	56
7.1.2. Prepararea și caracterizarea complexului.....	56
7.2. Rezultate și discuții	57
7.2.1. Studii de solubilitate	57
7.2.2. Gazda folosită pentru complexare	58
7.2.3. Prepararea complexului medicament- β -CD.....	60
7.2.4 Analiza termică.....	60
7.3. Caracterizarea complexilor în stare solidă	66

7.3.1. Calorimetrie de scanare diferențială (DSC)	66
7.3.2. Caracterizare cu IR (FT-IR – Fourier Transform Infrared).....	68
7.3.3. Structura morfologică a cristalelor evaluată prin TEM și AFM	70
7.4. Modelare moleculară.....	72
7.4.1. Analiza teoretică	72
7.5. Concluzii parțiale	78
CAPITOLUL 8. STUDIUL <i>IN VITRO</i> AL DIMINAZENULUI COMPLEXAT CU B-CICLODEXTRINA PENTRU <i>ICHTHYOPHTHIRIUS MULTIFILIIS</i>	81
Introducere	81
8.1. Material și metodă	82
8.2. Rezultate și discuții	84
8.2.1. Analiza <i>in vitro</i> a complexului pentru <i>I. multifiliis</i>	84
8.3. Concluzii parțiale	86
CAPITOLUL 9. STUDIILE <i>IN VIVO</i> PRIVIND INVESTIGAREA COMPLEXULUI BETA-CICLODEXTRINĂ-DIMINAZEN ACETURAT UTILIZAT ÎN TRATAMENTUL CILIATOZELOR.....	89
9.1. Prepararea furajului ce conține medicamentul.....	89
9.2. Caracterizarea hranei pentru animale	90
9.2.1. Determinarea conținutului medicamentos.....	92
9.2.2. Studiile de eliberare	92
9.3. Studii <i>in vivo</i>	92
9.3.1 Materialul piscicol.....	92
9.3.2. Infestația	93
9.3.3. Medicamente și analiză.....	93
9.3.4. Determinarea intensității infecției	94
9.4. Rezultate și discuții	95
CAPITOLUL 10. CONDIȚIONAREA PRAZIQUANTELULUI ȘI FLORFENICOLULUI PENTRU UNELE COINFECTII HETEROLOGICE LA CRAPUL DE CRESCĂTORIE	101
Introducere	101
10.1. Principii activi folosiți în acvacultură.....	102
10.1.1. Farmacologia și mecanismul de acțiune al PZQ ȘI FFC	102
10.1.2. Praziquantelul și florfenicolul folosit în acvacultură	103

10.2. Condiționarea praziquantelului și a florfenicolului	104
10.2.1. Experimentări de măcinare a praziquantelului și a florfenicolului..	104
10.2.2. Prepararea și caracterizarea suspensiilor apoase de praziquantel și florfenicol.....	109
10.2.3. Determinarea stabilității suspensiilor	110
10.3. Concluzii parțiale	114
CAPITOLUL 11. REZULTATE ȘI DISCUȚII	117
CAPITOLUL 12. CONCLUZII FINALE	121
BIBLIOGRAFIE.....	125
ANEXA 1. LISTA ABREVIERILOR.....	136
ANEXA 2. LISTA TABELELOR.....	139
ANEXA 3. LISTA FIGURILOR	143
ANEXA 4. LISTA LUCRARILOR ȘTIINȚIFICE PUBLICATE	149

Table of contents

INTRODUCTION	xi
ABSTRACT	xiii
PART I - CURRENT STATE OF KNOWLEDGE	1
CHAPTER 1. FREQUENT PARASITOSIS IN AQUACULTURE: BIOLOGY, DIAGNOSTIC, CONTROL	3
Introduction.....	3
1.1. Protista	4
1.2. Monogenea	7
CHAPTER 2. NANOBIOTECHNOLOGY	11
2.1. Nanobiology	11
2.2. Nanomedicine	12
CHAPTER 3. TYPES OF CARRIER SUBSTANCES.....	15
3.1. Cyclodextrin structures	15
3.2. The methodology for complexing with cyclodextrins	17
3.3. Characterization of inclusion complexes with cyclodextrins.....	20
3.3.1. Scanning electron microscopy (SEM).....	20
3.3.2. UV Spectroscopy (ultraviolet)	20
3.3.3. Circular dichroism	20
3.3.4. Differential Scanning Calorimetry (DSC).....	20
3.3.5. Infrared Spectroscopy (IR).....	21
3.3.6. X-Ray Diffraction (XRD)	21
3.4. The use of cyclodextrins in product types	21
3.4.1. Products for oral administration	21
3.4.2. Nasal and lung products	22
3.4.3. Products with rectal administration / delivery	23
3.4.4. Transdermal drug release	23
3.4.5. Products with eye release	23
3.4.6. Products with parenteral delivery	24
3.5. Active principle selected for the formation of complex inclusion compounds	25
3.6. Partial conclusions.....	26

CHAPTER 4. TECHNIQUES AND METHODS OF STUDYING THE FUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF EMULSION SYSTEMS	27
Introduction.....	27
4.1. Emulsion stability	28
4.1.1 Visual observation of the emulsion	28
4.1.2 Microscopic observation of the emulsion.....	29
4.1.3. Particle size analysis	30
4.1.4. Load analysis.....	32
4.1.5. Rheological properties	32
4.2. Appearance and morphology of the emulsion.....	33
4.2.1. Appearance	33
4.2.2. Morphology	34
4.2.3. Emulsion encapsulation	34
4.3. Partial conclusions.....	36
PART II – PERSONAL CONTRIBUTION.....	37
CHAPTER 5. RESEARCH PURPOSE AND OBJECTIVES	39
CHAPTER 6. ICHTHIOFAUNA PATHOLOGY OF INTENSIVE FISH BREEDING SYSTEMS	41
6.1. Factors that cause disease	41
6.2. Protozoans and monogenous trematodes that severely affect fish farming	46
6.3. Partial conclusions.....	53
CHAPTER 7. SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF THE INCLUSION COMPLEX OF β-CYCLODEXTRIN WITH DIMINAZENE ACETURATE.....	55
Introduction.....	55
7.1. Material and method.....	56
7.1.1. Substances used	56
7.1.2. Preparation and characterization of the complex.....	56
7.2. Rezults and discussion	57
7.2.1. Solubility studies	57
7.2.2. Host used for complexation.....	58
7.2.3. Preparation of the drug- β -CD complex	60
7.2.4 Thermic analysis.....	60
7.3. Characterization of solid state complexes.....	66

7.3.1. Differential scanning calorimetry (DSC).....	66
7.3.2. IR characterization (FT-IR – Fourier Transform Infrared)	68
7.3.3. Morphological structure of crystals evaluated by TEM and AFM.....	70
7.4. Molecular modeling	72
7.4.1. Theoretical analysis	72
7.5. Partial conclusions.....	78
CAPITOLUL 8. STUDIUL <i>IN VITRO</i> AL DIMINAZENULUI COMPLEXAT CU B-CICLODEXTRINA PENTRU <i>ICHTHYOPHTHIRIUS MULTIFILIIS</i>	81
Introducere	81
8.1. Material și metodă	82
8.2. Rezultate și discuții	84
8.2.1. Analiza <i>in vitro</i> a complexului pentru <i>I. multifiliis</i>	84
8.3. Concluzii parțiale	86
CHAPTER 9. STUDIES OF <i>IN VIVO</i> INVESTIGATION OF BETA-CYCLODEXTRIN DIMINAZENE ACETURATE COMPLEX USED IN CILIATOSIS TREATMENT	89
9.1. Preparing the feed containing the medicine.....	89
9.2. Characterization of animal feed	90
9.2.1. Determination of drug content.....	92
9.2.2. Release studies.....	92
9.3. <i>In vivo</i> studies.....	92
9.3.1 Fish stock	92
9.3.2. Infestation.....	93
9.3.3. Drugs and analysis	93
9.3.4. Determining the intensity of the infestation.....	94
9.4. Rezults and discussion	95
CHAPTER 10. CONDITIONING OF PRAZIQUANTEL AND FLORFENICOL FOR SOME HETEROLOGOUS COINFECTIONS OF FARMED CARP	101
Introduction.....	101
10.1. Active principles used in aquaculture	102
10.1.1. Farmacology and the mechanism of action of PZQ and FFC.....	102
10.1.2. Praziquantel and florfenicol used in aquaculture.....	103
10.2. Conditioning praziquantel and florfenicol	104
10.2.1. Milling experiments of praziquantel and florfenicol.....	104

10.2.2. Preparation and characterization of aqueous suspensions of praziquantel and florfenicol	109
10.2.3. Determination of suspension stability.....	110
10.3. Partial conclusions.....	114
CAPITOLUL 11. REZULTS AND DISCUSSION.....	117
CAPITOLUL 12. FINAL CONCLUSIONS	121
BIBLIOGRAPHY.....	125
ANNEX 1. ABBREVIATIONS LIST	136
ANNEX 2. LIST OF TABLES	139
ANNEX 3. LIST OF FIGURES	143
ANNEX 4. LIST OF SCIENTIFIC PAPERS PUBLISHED	149

INTRODUCERE

Nanobiotehnologia farmaceutică reprezintă un mijloc de diagnostic și de instituire a unor acțiuni terapeutice asupra unor boli. Implicațiile acesteia în domeniul sănătății primesc o recunoaștere considerabilă deoarece oferă tratamente mai rapide și mult mai ieftine. Cu ajutorul nanoconjugatelor este posibil să se realizeze o direcționare și o mișcare mai eficientă a principiilor activi. Diferite sisteme farmaceutice bazate pe nanoconjugate, nanoparticule nanofarmaceutice cum ar fi nanoparticule polimerice, nanoparticule magnetice, lipozomi, nanotuburi de carbon, puncte cuantice, dendrimeri, nanoparticule metalice, biopolimeri etc. au adus schimbări revoluționare în livrarea medicamentelor. Unele informații utile privind baza moleculară a unor boli au fost descoperite utilizând nanoconjugarea. Este demn de remarcat faptul că autoritățile de reglementare ar trebui să prezinte ținte coerente pentru a reduce riscurile cu rezultatele terapeutice. Această teză definește aspectele de încercare de obținere a unor nanoconjugate a unor medicamente, împreună cu tipul și ideea sa generală privind caracterizarea acestora. Toate sistemele au fost concepute sub forma de nanoconjugate ale β -ciclodextrinei pentru anumite tratamente la pești.

Teza ***“Nanoconjugate folosite în profilaxia și tratamentul unor boli ale peștilor”*** - a fost elaborată în perioada 2014-2019 la Facultatea de Medicină Veterinară din Iași și în colaborare cu Institut Național de Cercetare-Dezvoltare pentru Chimie și Petrochimie (ICECHIM) din București, Facultatea de Inginerie Chimică–Universitatea Tehnică “Gheorghe Asachi” din Iași, Stațiunea de Cercetare-Dezvoltare pentru Acvacultură și Ecologie Acvatică din Iași, Facultatea de Chimie - Universitatea de Petrol-Gaze din Ploiești.

Bolile peștilor reprezintă pentru mediul antreprenorial un impas major în fața previziunilor de producție, întrucât multe aspecte patologice împiedică creșterea, dezvoltarea, reproducerea tuturor speciilor utilizate în acvacultura intensivă, iar anumitor categorii de vârstă le poate provoca moartea, oprindu-se astfel cicluri de producție pentru o perioadă îndelungată până la repopularea sistemelor.

Sunt descrise numeroase acțiuni de prevenție sau de terapie a speciilor de pești crescuți în sisteme de acvacultură (viviere flotabile, iazuri, bazine de ciment sau fibră de sticlă, lacuri, heleștee, acvacultură marină, raceway) cunoscându-se 304 produse medical veterinare autorizate în UE pentru tratarea a peste 200 de boli.

În condițiile în care sursa planeară de pește de consum provenit din pescuit (11.6 tone de pește provenit din pescuit din apele interioare + 81.2 milioane de tone de pește provenit din pescuit marin) sau acvacultură (80 milioane tone), consumă 20.5kg/locuitor (în anul 2017), această cantitate fiind în creștere exponențială an la an începând cu deceniul VI al secolului trecut (FAO, 2018).

Scopul tezei este de a încerca prin diferite metode cu caracter profilactic sau curativ, diminuarea sau stoparea evoluției unor bioagresori prin aplicarea unor metode inovative de “design” mediamentos prin utilizarea nanobiotehnologiei.

Obiectivele tezei au fost realizate urmărind o coerență logică a evenimentelor astfel:

1. Determinarea/căutarea unor principii activi care să poată fi complexați.
2. Caracterizarea compusului nou format complex de incluziune (nanoconjugatului): diminazen- β -ciclodextrină.
3. Activitatea biologică a medicamentelor sintetizate asupra agenților parazitari prin testare *in vitro* și apoi *in vivo*.
4. Eficacitatea compușilor conjugați în patologia parazitară a peștilor prin testare *in vivo*.
5. Stabilirea unor medicamente biologic active pentru crearea de emulsii-duble.

Aceste obiective ale tezei de doctorat au fost finalizate prin activități de cercetare recunoscute pe plan național sau internațional astfel :

- 3 lucrări ISI
- 8 lucrări BDI
- 6 Cereri brevet înregistrate la OSIM
- 2 Cărți (coautor)

INTRODUCTION

Pharmaceutical nanobiotechnology represents a means of diagnosing and establishing therapeutic actions against diseases. Its health implications receive considerable recognition because it offers faster and much cheaper treatments. With the help of nanoconjugates, it is possible to achieve a more efficient targeting and delivery of the drugs. Different nanoconjugate-based pharmaceutical systems, nanoparticles such as polymer nanoparticles, magnetic nanoparticles, liposomes, carbon nanotubes, quantum dots, dendrimers, metallic nanoparticles, biopolymers, etc. have revolutionized drug delivery. Some useful information on the molecular basis of some diseases has been discovered using nanoconjugation. It is noteworthy that regulators should present consistent targets to reduce risks with therapeutic outcomes. This thesis defines the aspects of trying to obtain some nanoconjugates of drugs together with its type and general idea of their characterization. All systems were designed as β -cyclodextrin nanoconjugates for certain fish treatments.

The thesis "***Nanoconjugates used in the prophylaxis and treatment of certain fish diseases***" - was elaborated in 2014-2019 at the Faculty of Veterinary Medicine in Iasi and in collaboration with the National Research and Development Institute for Chemistry and Petrochemistry (ICECHIM) in Bucharest, Faculty of Chemical Engineering - "Gheorghe Asachi" Technical University of Iasi, Research and Development Center for Aquaculture and Aquatic Ecology in Iasi, Faculty of Chemistry - Petroleum-Gas University of Ploiesti.

Fish diseases represent a major impediment to the entrepreneurial environment in the face of production forecasts, as many pathological issues hamper the growth, development, reproduction of all species used in intensive aquaculture, and to certain age groups can cause them to die, thus stopping production cycles for for a long time until repopulation of the sites.

Many actions are described to prevent or treat fish species raised in aquaculture systems (floating vines, ponds, cement or glass fiber ponds, lakes, basins, marine aquaculture, raceway), with 304 authorized veterinary medicinal products in EU to treat over 200 diseases.

Given the fact that the world's largest source of fish consumed from fishing (11.6 tonnes of inland fishing + 81.2 million tonnes of fish from marine fishing) or aquaculture (80 million tonnes) consumes 20.5 kg / inhabitant (in 2017), this growing quantity is increasing exponentially from year to year since the decade of the last century (FAO, 2018).

The aim of the thesis is to try through different methods of prophylactic or curative, diminishing or stopping the evolution of some bioaggregators by applying innovative methods of mediation "design" by using nanobiotechnology.

The objectives of the thesis were achieved by following a logical coherence of the events as follows:

1. Determining / searching for drugs that can be complexed.
2. Characterization of the novel inclusion complex (nanoconjugate): diminazene- β -cyclodextrin.
3. Biological activity of synthesized drugs on parasites by *in vitro* and then *in vivo* testing.
4. Efficacy of conjugated compounds in the parasitic pathology of fish by *in vivo* testing.
5. Establishment of biologically active drugs for the creation of double-emulsions.

These objectives of the PhD thesis have been finalized through national or internationally recognized research activities as follows:

- 3 ISI papers
- 8 BDI papers
- 6 Patent applications registered OSIM
- 2 Books (co-author)

REZUMAT

Medicamentele uzuale au devenit insuficiente pentru tratarea peștilor. Nanoconjugatele polimerice hidrofobe și hidrofile au fost dezvoltate pentru administrarea terapeutică în scopul depășirii dezavantajelor terapiei convenționale.

Totodată, noconjugatele polimerice oferă un tratament mai eficient, iar efectele adverse ale acestora sunt reduse. Ciclodextrinele sunt polimeri naturali mai favorabili pentru a prepara sisteme conjugate de eliberare a nanoparticulelor datorită proprietăților lor fizice și chimice. Celelalte avantaje ale ciclodextrinelor sunt: pentru a spori biodisponibilitatea și stabilitatea moleculelor de medicament și a le proteja de factorii fizici, inclusiv pH-ul, temperatura și unele enzime. Acești polimeri unici au capacitatea de a forma nanoconjugate în mediu apos, în mod spontan.

Teza de doctorat intitulată “Nanoconjugate utilizate în profilaxia și tratamentul unor boli ale peștilor”, conform normelor în vigoare, este structurată în două părți, ce conține un număr de 152 pagini: partea I, sub denumirea de “Stadiul actual al cunoașterii” cuprinde un număr de 35 pagini în care sunt prezentate pe de o parte date sintetizate despre diferite patologii ale peștilor, iar apoi pe de altă parte date actuale despre ciclodextrine și emulsii și partea a II-a intitulată “Contribuții personale” în care sunt prezentate rezultatele ce s-au obținut pe parcursul perioadei doctorale.

Prima parte, “Stadiul actual al cunoașterii” este desfășurată în patru capitole și subcapitolele asociate și sunt cuprinse principalele grupe de paraziți care prezintă motive de îngrijorare atât pentru vertebrate, cât și pentru nevertebrate și indică cele mai importante publicații pentru aceste grupuri; ulterior sunt prezentate date din literatura internațională de specialitate cu privire la nanoconjugate ale ciclodextrinelor, cum se formează, structura lor și cel mai important cum formează compuși de incluziune cu anumiți principii activi. Apoi urmează descrierea metodelor de complexare cu aceste ciclodextrine precum și câteva exemple de produse farmaceutice ce conțin acești polimeri. Proiectarea creării unui nanosistem (nanoconjugat) cu ciclodextrine eficient pentru ținta administrării pe cale orală se bazează în mare măsură pe cunoașterea cerințelor clinice și a parametrilor biochimici care modifică profilul farmacocinetic al medicamentului de interes și permite o manipulare deductivă a proprietăților sale fizico-chimice pentru o livrare eficientă și o interacțiune biochimică *in vivo*. Dimensiunile particulelor, proprietățile suprafeței, greutatea moleculară, hidrofobicitatea și încărcătura particulelor au fost toate demonstrate ca proprietăți fizico-chimice importante și reglabile pentru manipularea aplicabilității clinice a nanoconjugatelor administrate pe cale orală.

În capitolul al IV-lea, care este denumit: “Tehnici și metode de studiere a caracteristicilor funcționale ale sistemelor de emulsie” se descriu noțiuni generale despre emulsii precum date actuale despre stabilitatea emulsiei, despre aspectul și morfologia emulsiei, iar în final sunt evidențiate câteva concluzii.

Partea a doua a tezei de doctorat denumită “Cercetări proprii” se desfășoară pe parcursul a opt capitole (V-XII), capitolul V este atribuit descrierii scopului, obiectivelor și activităților studiului propus, urmat de trei capitole în care sunt expuse detaliat toate părțile componente ale fiecărui studiu făcut, iar în final ultimul capitol este desigur pentru concluziile finale în care sunt redate remarcile făcute prin analiza tuturor rezultatelor obținute.

Capitolul al V-lea - “Scopul și obiectivele cercetării”. Argumentarea ce privește importanța cercetărilor ce s-au efectuat vizează câteva aspecte: găsirea unui medicament complexabil cu o ciclodextrină, obținerea unui efect terapeutic asupra unei boli parazitare ale peștilor și anume ihtioftirioza, iar în final realizarea unei compoziții emulsionate pe bază de praziquantel și florfenicol cu proprietăți antibacteriene și antiparazitare pentru tratarea peștilor bolnavi.

În România, infestațiile cu paraziți la pești au descrise într-un număr de studii preponderent în zona Deltei Dunării și mai rar în celelalte zone ale țării. Scopul acestei teze a fost cel de a evalua potențialul terapeutic al unei compoziții medicamentoase pentru ihtioftirioza ciprinidelor crescute în sistem de acvacultură în România, prin cercetări menite să contribuie la îmbunătățirea profilaxiei și combaterii infestației cu *I. multifiliis*. În acest sens, obiectivele propuse au constat în: 1) selecția unui polimer capabil să asigure transportul unui medicament antiprotozoaric; 2) alegerea principiului activ ce urmează să fie complexat cu polimerul; 3) caracterizarea complexului, 4) evaluarea unui studiu *in vitro* la diferite concentrații, și 5) stabilirea eficacității prin testare *in vivo*. Pentru aceasta, au fost realizate activități corespunzătoare obiectivelor propuse și unele cu caracter preliminar sau secundar acestora, într-o ordine logică. Activitățile îndeplinite au vizat serii de analize fizico-chimice, precum și de analize statistice.

În capitolul VI: “Patologia ihtiofaunei din sistemele de creștere intensivă” sunt descriși principalii factori care duc la apariția bolii din acvacultură, iar apoi sunt realizate două studii asupra câtorva boli parazitare de o importanță deosebită din țara noastră.

Un studiu realizat de noi s-a bazat pe diagnosticul de laborator al bolilor parazitare ale ciprinidelor (*Cyprinus carpio*) dintr-un sistem de creștere în policultură din județul Iași, pe o perioadă de șase luni. Acest studiu este o interpretare a coinfecțiilor parazitare la crap crescut în bazine de pământ, înregistrată în iarnă și primăvară (decembrie 2014 până în mai 2015) în sistem de policultură semiintensivă. S-au colectat un total de 55 crapi și s-au detectat stadiile paraziților care rezistă pe timpul iernii. Peștii au fost examinați clinic, zilnic. Diagnosticul parazitologic a fost efectuat prin examinarea microscopică a branhiilor și a raclatului dermic, de la peștii vii și proaspăt morți. Investigațiile noastre au condus la identificarea unui protozoar - *Ichthyophthirius multifiliis*, două trematode monogene - *Gyrodactylus spp.*, *Dactylogyrus spp.* și un copepod *Lerneae cyprinacea*, cu intensitate diferită în funcție de temperatura apei. A mai fost realizat un studiu de caz în care a fost descris un episod de ihtioftirioză la păstrăvul fântânel (*Salvelinus fontinalis*) crescut în bazine de ciment într-o fermă din județul Neamț. Folosind microscopia optică, paraziții au fost identificați la 100% din păstrăvii examinați, la o intensivitate de 13 trofonți/pește. Apariția acestei boli a fost o

surpriză pentru noi, deoarece apa care alimentează rezervorul provine dintr-o sursă subterană și este considerată liberă de entități parazitare. Informațiile anamnezice arată că sursa elementelor invazive (tomitele de *Ichthyophthirius multifiliis*) a fost reprezentată de pești din familia ciprinidelor (*Alburnus alburnus*) introduși ca hrană vie pentru pești.

În capitolul VII - "Sinteza și caracterizarea complexului de incluziune al β -ciclodextrinei cu diminazen aceturat" este analizat compusul complexat o ciclodextrină. Ciclodextrinele - sunt biopolimeri macrociclici cu aplicații potențiale în livrarea țintită a unor principii active micro/macro-moleculare cu efect terapeutic. În ciuda proprietății de includere puternică gazdă-oaspete, lipsa capacității de legare celulară are aplicații limitate în livrarea de medicamente. În acest demers științific s-a ales β -ciclodextrina (β -CD) pentru a forma un compus de incluziune cu diminazen aceturat (DA), care sunt niște molecule bioactive, responsabile pentru activitatea antiprotozoară. Complexul de incluziune al diminazenului aceturat cu β -ciclodextrina a fost realizat și apoi confirmat prin tehnici texturale, termogravimetrice, calorimetrice (DSC), spectroscopice (FT-IR) și microscopice (TEM-microscopie electronică cu transmisie și AFM-microscopie de forță atomică). Pe lângă aceste analize s-au mai realizat și niște analize teoretice și de modelare moleculară cu ajutorul software-ului Material Studio 4.0. Astfel, sistemul propus de incluziune β -Ciclodextrina-Diminazen Aceturat ar putea fi utilizat ca un "carrier" medicamentului specific zonei de distribuție. Acest nanoconjugat a fost obținut prin metoda liofilizării în raport echimolar de 1:1. Apoi s-au realizat o serie de caracterizări ale complexului format (nanoconjugatului), iar destinația lui a vizat studiul efectului antiparazitar asupra protozoarului *I. multifiliis* la crapul de crescătorie.

În capitolul VIII intitulat - "Studiul *in vitro* al diminazenului complexat cu β -ciclodextrina pentru *Ichthyophthirius multifiliis*" - s-a testat efectul *in vitro* al compusului complexat asupra protozoarului. Diminazenul aceturat (DA) este componentul activ a unor medicamente tripanocide utilizate pentru tratamentul animalelor infectate cu tripanosomiază și babesioză. Acesta a fost selectat pentru a forma complexul de incluziune cu β -ciclodextrină pentru a stabili efectul asupra protozoarului *I. multifiliis*. S-au stabilit pașii pentru testare, iar rezultatele au fost promițătoare.

S-au efectuat testele în apă filtrată pentru a permite excluderea automată a posibilității de inactivare parțială sau totală a substanței testate în condițiile date. Această substanță a fost considerată a fi eficientă *in vitro* prin această procedură, și mai departe s-a ajuns la concluzia că este eficient în administrarea băii sau în furajul medicamento pentru peștii infestați. S-au determinat dozele finale care au fost testate: 100, 50, 25, 12.5, 6.2, 3.1, 1.5 și 0.8 ppm (mg/l) pentru substanța diminazen aceturat administrată ca atare și pentru complexul β -ciclodextrină-diminazen aceturat.

În capitolul IX, denumit "Studiile *in vivo* privind investigarea complexului beta-ciclodextrină-diminazen aceturat utilizat în tratamentul ciliatozelor".

Administrarea orală a multor agenți chimici terapeutici rămâne provocatoare datorită insolubilității gastrice și/sau disoluției slabe, permeabilității intestinale

ineficiente și inactivării pre-sistemice. Aceste probleme limitează avantajele confortului tratamentelor obișnuite pe care le oferă medicația obișnuită.

Această parte a tezei se concentrează asupra unor progrese recente și încurajatoare în aplicarea nanoconjugatelor cu β -ciclodextrina pentru administrarea orală a unor medicamente pentru ihtiofizioza peștilor. Este realizată o prezentare generală a ciclodextrinelor și nanotehnologiei farmaceutice în sistemele de administrare orală. Sunt, de asemenea, ilustrate unele strategii fiind exploatate pentru sinteza nanoconjugate puse în aplicare, precum și potențialul de navigare inteligentă a tractului gastro-intestinal (TGI) al peștelui pentru biodisponibilitatea și biodistribuția optimă.

Sunt discutate, de asemenea, perspective pentru utilizarea acestor nanoconjugate din formulările eficiente în medicamente utile din punct de vedere clinic pentru pești.

Pentru testare s-au folosit 3 loturi a câte 7 pești din specia *Cyprinus carpio*. Un lot de control, un lot căruia i s-a dat furaj medicament simplu, un lot cu furaj medicamentat cu complexul diminazen- β -ciclodextrină (DM- β -CD). Rezultatul a fost unul îmbucurător din punct de vedere terapeutic, în sensul că s-a obținut o reducere a numărului de trofonți la finalul celor 10 zile de tratament. După testare s-au realizat un set de analize biochimice la 3 pești din fiecare lot, cu diferențe nesemnificative.

Capitolul X este intitulat "Condiționarea praziquantelului și florfenicolului pentru unele coinfecții heterologice la crapul de crescătorie" și pune în discuție un nou sistem farmaceutic de emulsii cu principii activi frecvent folosiți și anume praziquantelul și florfenicolul. A fost focusată atenția către un sistem care să trateze coinfecțiile la pești deoarece mulți cercetători își îndreaptă atenția doar asupra unui singur agent patogen. O emulsie poate fi definită ca un sistem bifazic format din două lichide nemiscibile, dintre care una este dispersată fin și uniform ca globule prin cea de-a doua fază. Deoarece emulsiile sunt sisteme instabile termodinamic, un al treilea agent, emulgatorul este adăugat pentru a stabiliza sistemul. Dimensiunile lor mici conduc la proprietăți utile, cum ar fi suprafața mare pe unitate de volum, stabilitatea robustă, aspectul transparent și reologia (comportamentul fluidelor non-newtoniene) reglabilă. Emulsiile se găsesc în diverse domenii, cum ar fi livrarea de medicamente, alimente, cosmetice, farmaceutice și sinteza materialelor. În plus, ele servesc ca sisteme model pentru a înțelege dispersiile coloidale nanometrice. Metodele de înaltă și joasă energie sunt utilizate pentru a prepara emulsii, inclusiv omogenizarea la presiune înaltă, ultrasonizarea, temperatura de inversare a fazelor și punctul de inversiune a emulsiei, precum și abordările recent dezvoltate. În acest studiu, rezumăm metodele de preparare a emulsiei, teoriile pentru a prezice dimensiunea picăturilor și aditivii chimici care afectează stabilitatea picăturilor și aplicațiile recente în domeniul bolilor peștilor. S-au preparat emulsii pentru fiecare din cele două medicamente, iar ținta pentru care au fost formate acestea a fost aceea de a obține o eliberare controlată a fiecăruia din cele două principii active. Pentru caracterizare s-a efectuat metoda dynamic light scattering (DLS) care constă în

Realizarea acestor emulsii duble a dus la crearea unei propuneri pentru brevetare.

Capitolul XI denumit “Rezultate și discuții” – rezumă coroborarea tuturor observațiilor și rezultatelor din capitolele enumerate.

Ultimul capitol, capitolul XII, - “Concluzii finale” sunt selectate 13 observații concludente ale cercetărilor ce reies din teză și sunt elaborate câteva remarci după o analiză de ansamblu a datelor prezentate în capitolele anterioare. Rezultatele acestui studiu oferă unele date noi cu privire la tratamentele folosite în acvacultură, prin introducerea de noi formulări cu nanoconjugate. Observațiile făcute pe parcursul acestui studiu semnalează posibilitatea tratamentelor prin implementarea unei noi tehnici de prevenire și control al infestațiilor cu *I. multifiliis* la crapul de crescătorie (*Cyprinus carpio*).

ABSTRACT

Conventional drug delivery systems were insufficient to treat more fish diseases. Hydrophilic and hydrophobic polymeric nanoconjugates have been developed for therapeutic administration to overcome the disadvantages of conventional therapy.

At the same time, polymeric nanoconjugates offer more effective treatment and their adverse effects are reduced.

Cyclodextrins are more favorable natural polymers to prepare conjugated nanoparticle delivery systems due to their physical and chemical properties. The other advantages of cyclodextrins are: to increase bioavailability and stability of drug molecules and protect them from physical factors, including pH, temperature and some enzymes. These single polymers have the ability to form nanoconjugates in aqueous medium spontaneously.

The doctoral thesis entitled "Nanoconjugates used in prophylaxis and treatment of certain fish diseases", according to the rules in force, is divided in two parts, which contain a number of 152 pages; Part I, under the name of "Current State of Knowledge" a number of 35 pages in which data on cyclodextrins and emulsions are summarized and Part II entitled "Personal Contribution" presenting the results obtained during the doctoral period. To these parts are added, according to the norms, the introduction, the abstract and the list of scientific references as well as the integral parts of the thesis such as contents, cover/covers, list of abbreviations and the list of tables of figures.

The first part, "Current state of knowledge", is deployed in four chapters and associated subchapters, starting the main groups of parasites are of concern both for vertebrates and invertebrates, and indicate the most important publications for these groups; Subsequently, international specialized literature on nanoconjugates of cyclodextrins, how they form, their structure and, most importantly, how they form inclusion compounds with certain active principles are presented. Then follow the complexing methodologies with these cyclodextrins as well as some examples of pharmaceutical products containing these polymers. Designing the creation of a nanoscale bonded nanoconjugate with cyclodextrins for the oral route target is largely based on the knowledge of clinical requirements and biochemical parameters that alter the pharmacokinetic profile of the drug of interest and allows a deductive manipulation of its physicochemical properties for an effective delivery and biochemical interaction *in vivo*. Particle sizes, surface properties, molecular weight, hydrophobicity, and particle charge have been demonstrated as important and adjustable physicochemical properties for manipulating the clinical applicability of orally administered nanoconjugates.

In Chapter Four, which is called "Techniques and Methods of Studying the Functional Characteristics of Emulsion Systems", there are some general notions about emulsions. Then, there were recent data on emulsion stability, emulsion appearance and morphology, and finally some extracts.

The Second Part of the doctoral thesis called "Personal Controbutio" is carried out in eight chapters (V-XII), the first chapter is assigned to the description of the purpose, objectives and activities of the proposed study, followed by three chapters in which all parts of each study, and finally the final chapter is of course the final conclusions in which the remarks are reproduced by analyzing all the results obtained.

Chapter Five – "The Purpose and Objectives of Research". The rationale for the importance of the researches that have been carried out concerns several aspects: finding a complex drug with a cyclodextrin, obtaining a therapeutic effect on a parasitic disease of the fish, namely the ichthyophthiriosis, and finally making an emulsified composition based on praziquantel and florfenicol with antibacterial and antiparasitic properties for fish treatment.

In Romania, infestations with fish parasites have been documented in a limited number of studies and conducted mainly in the Danube Delta area and more rarely in other areas of the country. Therefore, the purpose of this thesis was to evaluate the therapeutic potential of a drug composition in cyprinid culture in Romania, through research designed to improve prophylaxis and fight against *I. multifiliis* infestation. In this regard, the proposed objectives were to: select a polymer capable of delivering an antiprotozoan drug, select the active principle to be complexed with the polymer, characterize the complex, evaluate an *in vitro* study at different concentrations, and establish efficacy by testing *in vivo*. For this, a series of activities were carried out for the proposed objectives and some of them with a preliminary or secondary aspects in a successive order. The activities performed covered a series of physico-chemical analyzes as well as statistical analyzes.

Chapter Six " Ichthyofauna Pathology Of Intensive Fish Breeding Systems " reflects the main factors leading to the occurrence of aquaculture disease, and then some parasitic diseases of particular importance in our country are described in two studies.

A study conducted by us was based on the laboratory diagnosis of cyprinids (*Cyprinus carpio*) parasitic diseases in a polyculture growing system in Iasi County for a period of six months. This study is an interpretation of parasitic co-infections, recorded in winter and spring (from December 2014 to May 2015) in cyprinid ground ponds, from a semiintensive polyculture system. A total of 55 carp fish were collected to detect the stages of parasites that resist during winter. The fish were examined daily for clinical signs. The parasitological diagnosis was performed by microscopic examination of gills and dermal scrapes from dead fish. Our investigations have led to the identification of a protozoan - *Ichthyophthirius multifiliis*, two monogenic trematodes - *Gyrodactylus spp.*, *Dactylogyrus spp.* And a *Lerneia cyprinacea* copepod with different intensity depending on the water temperature. A case study has also been carried out describing an episode of ichthyophthiriosis in trout (*Salvelinus fontinalis*) from a fish farm in Neamț County. Using optical microscopy, parasites were identified in 100% of the examined trout, at an intensity of 13 trophons / fish. The emergence of this disease was a surprise to us because the water that supplies the reservoir comes from an underground source and is considered free of parasitic entities. Anamnestic

information shows that the source of the invasive elements (*Ichthyophthirius multifiliis*) was represented by three fish from the family of Cyprinides (*Alburnus alburnus*) introduced as living fish food.

In Chapter Seven – “Synthesis and Characterization of Diminazene Aceturate Inclusion Complex”, the complex inclusion compound with a cyclodextrin is characterized and discussed. Cyclodextrins - are macrocyclic biopolymers with potential applications in targeted delivery of therapeutically active micro/macro-molecular active principles. Despite the host-guest strong inclusion property, the inherent lack of cellular binding capacity has limited applications in drug delivery. In this scientific paper, β -cyclodextrin (β -CD) was chosen to form a complex inclusion compound with diminazene aceturate (DA), which are bioactive molecules, widely distributed in some cells and responsible for antiprotozoal activity. The inclusion complex of diminazene aceturate with β -cyclodextrin was performed and then confirmed by textural, thermogravimetric, calorimetric (DSC), spectroscopic (FT-IR) and microscopic techniques (TEM-transmission electron microscopy and AFM-atomic force microscopy) . Besides these analyzes, some theoretical and molecular modeling analyzes were carried out using Material Studio 4.0 software. Thus, the proposed β -Cyclodextrin/Diminazene Aceturate inclusion system could be used as a delivery carrier for the drug-specific distribution area. This nanoconjugate was obtained by the equimolar ratio of co-evaporation of 1: 1. Then a series of characterizations of the complex formed (nanoconjugate) were made and its purpose was to obtain an effect on a parasite (*I. multifiliis*) in farmed carp.

Chaper Eight entitled “*In vitro* Study of Complexed Diminazen with B-Cyclodextrin for *Ichthyophthirius Multifiliis*” - reveals the expected effect of the complex DM- β -CD inclusion compound by *in vitro* testing on the *I. multifiliis* protozoa. Here again, some details about cyclodextrins are then focused on diminazen aceturate, an antiparasitic compound. Diminazene aceturate(DA) is the active ingredient of trypanocid drugs used to treat animals infected with tripanosomiasis and babesiosis. It was selected to form the β -Cyclodextrin inclusion complex to establish the effect on the *I. multifiliis* protozoa. Test steps have been set and the results were promising. Tests in filtered water were performed to allow automatic exclusion of the possibility of partial or total inactivation of the test substance under the given conditions. This substance was considered to be effective *in vitro* by this procedure, and it was further concluded that it was effective in administering the bath or in medicated feed for infested fish. The final doses tested were: 100, 50, 25, 12.5, 6.2, 3.1, 1.5 and 0.8 ppm (mg/l) for diminazene aceturate administered as such and for the complex β -cyclodextrin/diminazen aceturate.

In Chapter Nine, called “Studies Of *In Vivo* Investigation Of Beta-Cyclodextrin Diminazene Aceturate Complex Used In Ciliatosis Treatment ”. Oral administration of many therapeutic chemical agents remains challenging due to poor gastric insolubility and/or weak dissolution, inefficient intestinal permeability and pre-systemic inactivation. These issues limit the benefits of comfort and increase the degree of compliance they offer in the treatment of many diseases. Cyclodextrin nanoconjugates

have emerged as promising agents for the drug-specific construction of these oral administration nanosystems capable of optimizing the desired physicochemical properties and pharmacokinetic parameters without compromising safety.

This part of the thesis focuses on recent and encouraging advances in the application of β -cyclodextrin nanoconjugates for the oral administration of some drugs for fish ichthyohptiriasis. A general overview of cyclodextrins and pharmaceutical nanotechnology in oral administration systems is provided. Some strategies being exploited for the implemented nanoconjugate synthesis as well as the smart gastrointestinal tract (TGI) navigation potential for bioavailability and optimal biodistribution are also illustrated.

Perspectives are also discussed to translate these nanoconjugates from clinically useful drug-friendly formulations.

Three groups of 7 *Cyprinus carpio* fish were used for testing. A control group, a lot to which I was given a simple medication feed, a group of medicated feed with the diminazen/ β -cyclodextrin complex. The result was a therapeutically satisfactory, meaning that a reduction in the number of trophons was achieved at the end of the 10 days of treatment. After testing, a set of biochemical analyzes was performed on 3 fish from each lot, with insignificant differences.

Chapter Ten is titled "Conditioning of Praziquantel and Florfenicol for Some Heterologous Coinfections in Farmed Carp" and discusses a new pharmaceutical system of emulsions with commonly used active principles, namely praziquantel and florfenicol. We have directed our attention to a system that treats some fish coinfectives because many scientists are focusing on just one pathogen ignoring others. An emulsion can be defined as a two-phase system consisting of two immiscible liquids, one of which (dispersed phase) is dispersed finely and uniformly in the second phase (continuous phase). Since emulsions of thermodynamically unstable systems, a third agent, the emulsifier is added to stabilize the system. Their small size results in useful properties, such as the large surface area per unit volume, robust stability, clear transparent appearance and adjustable rheology. Emulsions are found in various fields, such as drug delivery, food, cosmetics, pharmaceuticals and materials synthesis. In addition, they serve as model systems to understand nanoscale colloidal dispersions. High and low energy methods are used to prepare emulsions, including high pressure homogenization, ultrasonication, phase reversal temperature and emulsion inversion point, as well as recently developed approaches. In this study, we summarize emulsion preparation methods, theories to predict droplet size and chemical additives that affect droplet stability and recent applications in the field of fish diseases. Emulsions were prepared for each of the two drugs, and the target for which they were formed was to obtain a controlled release of each of the active principles. For characterization dynal light scattering (DLS) was performed.

The realization of these double emulsions led to the creation of a patent application.

Chapter Eleven called "Results and Discussions" - summarizes the corroboration of the observations and remarks in this thesis.

The last chapter, Chapter Twelve, “Final Conclusions”, where 13 concluding observations of the research are conceived and some remarks are made after an overall analysis of the data presented in the previous chapters. The results of this study provide new data on treatments used in aquaculture by introducing new nanoconjugates. Observations made during this study signaled the possibility of treatments and the need to implement a new technique for the prevention and control of infestations with *I. multifiliis* in farm carp (*Cyprinus carpio*).

PARTEA I - STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII
PART I - CURRENT STATE OF KNOWLOEDGE

CAPITOLUL 1. PARAZITOZE FRECVENTE ÎN ACVACULTURĂ: BIOLOGIE, DIAGNOSTIC, CONTROL

CHAPTER 1. FREQUENT PARASITOSIS IN AQUACULTURE: BIOLOGY, DIAGNOSTIC, CONTROL

Introducere

Este remarcabil faptul pentru că o proporție semnificativă (~60%) din organismele de pe Pământ sunt paraziți o anumită perioadă de timp sau chiar întreaga lor viață. Utilizând tehnologii emergente, cum ar fi amplificarea ADN-ului din mediu (eADN), s-au găsit și au fost descriși un număr mare de paraziți (Bass și colab., 2015).

Așadar este foarte probabil ca fiecare specie de pește să găzduiască cel puțin o specie parazitară în timpul vieții sale și este rară găsirea unei specii de pești de acvacultură care nu posedă cel puțin un parazit. Chiar și sistemele închise, recirculante, adesea văzute ca panaceu pentru a minimiza problemele bolii printr-o bună biosecuritate, pot fi supuse infestațiilor parazitare (Gratzek și col., 1983; Jørgensen și col., 2009; Moestrup și colab. 2014; Noble și colab., 1997). Infestațiile cu paraziți în fermă pot fi devastatoare având consecințe socio-economice, ecologice și de bunăstare grave (Shinn și col., 2015). Pierderile economice într-o fermă piscicolă pot fi directe prin mortalitatea efectivului, creșterea costurilor, eliminării mortalității, a ratei scăzute de creștere, a costurilor veterinare suportate și a unei reparații sau a unei degradări a produsului în timpul procesării. Indirect, preocupările privind bunăstarea efectivului din crescătorie, creșterea sensibilității la alte infestații și potențialele norme legislative, precum și imposibilitatea de a muta stocurile infestate în alte locuri, înseamnă că orice infestație presupune luarea unor măsuri de control adecvate rapide și corecte. Paraziții cu cicluri de viață directe sau cu cicluri simple de viață cu stadiu infestant transmis prin apă tind să domine în cadrul acvaculturii. Acest lucru este exemplificat în infestații cu protozoare, monogene și crustacee parazite. Paraziții cu stadii de dezvoltare în apă includ, de asemenea, grupul *Myxozoarelor* și *Digenelor* și aceștia pot atinge proporții epizootice într-o fermă, chiar și cu o bună biosecuritate. În ciuda schimbărilor în practicile fermierilor și a utilizării strategiilor de intervenție și de control, modificările preconizate de climă și necesitatea creșterii producției alimentare rezultă că este foarte probabil ca bolile parazitare să fie problematice (Callaway și col., 2012).

Practica actuală a acvaculturii și a speciilor crescute în întreaga lume este extrem de variată și reflectă diversitatea creșterii vertebratelor și nevertebratelor privind habitatele, ecologia și biologia lor. Nimeni nu poate oferi o acoperire cuprinzătoare a tuturor speciilor de paraziți care influențează activitățile bazate pe acvacultură, modulul de diagnosticare sau metodele de combatere a acestor infecții/infestații și, prin urmare,

acest capitol reprezintă o încercare de a furniza principii generale și rațiunea fundamentală pentru luarea deciziilor, oferind în același timp exemple globale și locale, acolo unde este posibil. Capitolul cuprinde principalele grupe de paraziți care prezintă motive de îngrijorare atât pentru vertebrate, cât și pentru nevertebrate și indică cele mai importante publicații pentru aceste grupuri. Există totuși câteva grupe de paraziți comensali, în afara scopului prezentului capitol, care rareori provoacă probleme la fermă. Acestea includ, dar nu se limitează la *Aspidogastrea*, *Diptera*, *Hirudinea*, *Oligochaeta*, *Ostracoda*, *Temnocephala* și *Turbellaria*, printre altele. Capitolul cuprinde de asemenea, metode de diagnostic, cu câteva considerații și abordări privind strategiile de tratament, metodele de profilaxie și practica de gestionare a fermelor.

1.1. Protista

Taxonomie și biologie

Protozoarele din acest Regn sunt un grup mare de organisme care parazitează majoritatea, dacă nu toate, grupurile de animale (și plante). Grupurile tipice care se găsesc pe sau în animalele acvatice includ reprezentanți ai flagelatelor (*Amyloodinium*, *Cryptobia*, *Gymnodinium*, *Hexamita*, *Ichthyobodo*, *Piscinoodinium*, *Spironucleus*, *Trypanosoma*, *Trypanoplasma*), amoebelor sau rizopodelor (*Vermamoeba*, *Paramoeba*, *Thecamoeba*) (*Perkinsus*), apicomplexilor (*Aggregata*, *Eimeria*, *Goussia*, *Haemogregarina*, *Margolisiella*, cercozoni (*Bonamia*, *Haplosporidium*, *Marteilia*, *Paramarteilia*) și ciliatelor (*Anophryoides*, *Apiosoma*, *Capriniana*, *Chilodonella*, *Cryptocaryon*, *Epistylis*, *Ichthyophthirius*, *Tetrahymena*, *Trichodina*, *Uronema*).

Ciclul biologic

În general, protozoarele au cicluri de viață simple, reproducându-se prin fisiune binară, cu transmitere pe și în interiorul gazdei. În plus, unele protozoare folosesc vectori și/sau gazde intermediare în transmitere. Acestea includ lipitorile din ciclul de viață al tripanosomelor, crustaceele și oligochetele din ciclurile biologice ale coccidiilor și obiecte neanimate/substratele din ciclul de viață al *Ichthyophthirius multifiliis*, *Cryptocaryon irritans* și *Amyloodinium ocellatum* (Palladini G., 2017).

Sănătate publică

Marea majoritate a protozoarelor, deși creează probleme animalelor acvatice, nu sunt în general considerate a fi de interes zoonotic. Deși *Cryptosporidium parvum* (zoonotic) a fost identificat la mai multe specii de pești, riscul transmiterii prin pește nu a fost demonstrat în mod neechivoc (Koinari și col., 2013; Reid și col., 2010). Unele crustacee poartă paraziți zoonotici precum *Giardia duodenalis* și *C. parvum* (Giangaspero și col., 2014; Willis și colab., 2013), pe care probabil îi obțin prin procesul de micro filtrare în timpul hrănirii urmată de sechestrarea ulterioară în țesuturile lor.

Patogeni semnificativi din cadrul grupului

Majoritatea problemelor asociate cu protozoarele în acvacultură se datorează în principal capacității lor de transmitere fără a fi nevoie de o gazdă intermediară. În multe cazuri, focarele din ferme piscicole sunt rezultatul unui stres crescut la peștii

gazdă sau a unei calități scăzute a apei și, prin urmare, manipularea factorilor de mediu în vederea reducerii acestora poate contribui la atenuarea rezultatului letal al infestației. Dinoflagelatul *Amyloodinium ocellatum* și flagelatul de apă dulce *Ichthyobodo necator*, care apar pe branhiile gazdei, au fost implicați în pierderea masivă a peștilor de crescătorie (Isaksen și col., 2011). Speciile parazite în sânge *Trypanosoma spp.* și *Trypanoplasma spp.* apar la peștii marini și de apă dulce, considerate de importanță economică. Acestea includ *Trypanosoma carassii* și *Trypanoplasma borreli* la crap, *Trypanoplasma salmositica* la salmonide și *T. bullocki* într-o gamă largă de pești marini. Peștii infectați sunt anemici și adesea prezintă exoftalmie și ascită. O problemă majoră în creșterea somonului este cauzată de amoeba facultativă *Paramoeba* (sin. *Neoparamoeba*) *perruans*, agentul cauzator al amebiazei (AGD) care provoacă moartea peștilor infectați (Mitchell și Rodger, 2011). Omologii de apă dulce, cum ar fi *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Protacanthamoeba*, *Rhogostoma*, *Vannella* și *Vermamoeba*, au fost asociați cu mortalitate ridicată la păstrăvul curcubeu, *Oncorhynchus mykiss*, în Republica Cehă, Germania și Italia (Dyková și Tým, 2016; Dyková și col., 2010; Quaglio și col., 2016). La fel de îngrijorătoare sunt și ciliatele care au determinat mortalitate la un număr de gazde vertebrate și nevertebrate, sălbatică și de crescătorie, cel mai important fiind ciliatul peritrich *Ichthyophthirius multifiliis*. Deși unele ciliate sunt ectocomensale inofensive, în condiții nefavorabile de mediu sau de stres, *Trichodina spp.*, *Uronema spp.* și *Epistylis spp.* pot crește rapid numărul, ducând la morbiditate și mortalitate. În plus, ciliatul de apă dulce *Ichthyophthirius multifiliis* este devastator pentru peștii de crescătorie și sălbatici, cauzând “boala petelor de griș” asupra căreia ne-am îndreptat și noi atenția în această teză.

Protozoarele prezintă capacitatea de a se reproduce rapid (ex. *Chilodonella spp.* în Basson și Van As, 2006), etape de viață flexibile și rezistente (ex. *Ichthyophthirius multifiliis* în Dickerson, 2014), ceea ce le-a permis acestora să colonizeze ubicvist mediile acvatice.

Printre protozoarele peștilor, *Ichthyophthirius* și *Trichodina* sunt două dintre cele mai predominante genuri parazite la nivel global (Lom și Dykova, 1992). *Ichthyophthirius multifiliis* este unul dintre cei mai contagioși paraziți ciliați ai peștilor. Acest parazit produce pierderi economice semnificative în domeniul acvaculturii, creșterii peștilor ornamentali și la populațiile de pești sălbatici, la care provoacă o mortalitate în masă (Matthews, 2005).

Este posibil ca transportul peștilor să fi jucat un rol în răspândirea *I. multifiliis* pe plan internațional. S-a sugerat că *I. multifiliis* a fost inițial endemic în Asia și introdus în Europa în Evul Mediu prin dezvoltarea culturii de crap și în alte țări, inclusiv în SUA, prin importul de pește “goldfish” (Hoffman, 1970). *Ichthyophthirius multifiliis* este acum larg răspândit în toate apele continentale, cu o arie geografică care se extinde de la tropice spre regiunile temperate în toată Europa și până la Cercul Polar (Matthews, 2005; Nigrelli și colab., 1976).

Multe specii de pești gazdă sunt susceptibile la *I. multifiliis*. Până în prezent se știe faptul că a fost raportat la peste 79 de specii de pești din 25 de familii, deși se

consideră că acesta poate infesta toți peștii de apă dulce din aproape toate regiunile unde există crescătorii piscicole, precum și în populațiile de pești invazivi de la tropice și regiunile subarctice. În plus, studiile au raportat epizootii în Australia, Bolivia, Canada, Africa de Sud și Uganda, în zonele native ale parazitului după introducerea peștilor exotici infestați cu *I. multifiliis* (Trujillo-González A., 2018).

Speciile de *Trichodina* spp. sunt paraziți ciliați oportuniști care prezintă specificitate scăzută de gazdă și pot infesta o gamă largă de pești din același mediu (Dove și O'Donoghue, 2005). Unele specii sunt mai răspândite *Trichodina acuta*, *T. heterodentata*, *T. mutabilis* și *T. nigra* (Basson și Van As, 2006). Distribuția ubicvistă a lui *T. mutabilis* a fost asociată cu introducerea transcontinentală a ciprinidelor exotice care sunt purtătoare de parazit (Basson și Van As, 2006). De exemplu, se presupune că *T. mutabilis* și *T. reticulata* au fost introduse în Australia după eliberarea ciprinidelor importate (ex. *Cyprinus carpio*, și *Carassius auratus*; Dove și O'Donoghue, 2005).

Identificare

Taxonomia și identificarea protozoarelor se bazează pe morfologia diferitelor etape ale vieții. Cu toate acestea, diversitatea trăsăturilor morfologice a determinat utilizarea instrumentelor moleculare pentru a diferenția speciile și genurile din cadrul subregnului Protista. Flagelatele au în mod obișnuit unul sau mai mulți flageli, în general un singur nucleu și forma corpului polimorfă. Diferențierea speciilor de paraziți s-a putut realiza utilizând și criterii precum: mărimea parazitului, speciile gazdă și organul țintă. Amoeba este, de asemenea, pleomorfă și, în mod tradițional, descrisă pe baza dimensiunii, formei și a altor caracteristici, existând o dependență de elemente moleculare care ajută la distingerea speciilor. Pentru apicomplecși, structura și aranjamentul oocistului și sporocistului sunt de o importanță primordială în ceea ce privește determinarea speciilor și genurilor. Ciliatele, după cum sugerează și numele, posedă organite locomotorii extracitoplasmice (cili) în timpul uneia sau mai multor etape ale vieții. Aranjamentul și poziția cililor pe suprafața corpului au importanță taxonomică. Cercozonii sunt diferențiați pe baza numărului, aranjamentului și mărimii celulelor, precum și a morfologiei sporilor, pentru tipurile sporogene (Palladini G., 2017).

Metode de diagnostic

Așa cum s-a descris mai sus, protozoarele sunt identificate în principal folosind caracteristici morfologice, majoritatea speciilor fiind descrise pe această bază. Tehnicile utilizate includ metode de microscopie, contrastul de fază în câmp luminos și microscopia prin contrastul de interferență diferențială. Preparatele colorate, fixe și permanente, frotiurile și amprente de sânge și țesut pot fi făcute pentru a ajuta diagnosticul. Pentru unele specii, precum *Uronema* și *Tetrahymena*, metoda de impregnare cu azotat de argint (Foissner, 2014) este fundamentală pentru a arăta meridianele ciliare, ca și pentru colorarea flagelilor în cazul grupelor de protozoare flagelate. Histologia și colorația Giemsa au fost utilizate pentru a localiza infestațiile și a descrie patologia asociată. Modificările de la microscopia ușoară includ utilizarea hibridizării *in situ* (ISH), a anticorpilor și lectinelor monoclonale și policlonale pentru a facilita vizualizarea protozoarelor în secțiunile histologice. Microscopia electronică de

transmisie este folosită pe scară largă pentru a diagnostica protozoarele, deoarece structurile celulare interne sunt importante în determinarea speciilor și genurilor. În sfârșit, instrumentele moleculare (RT-PCR, NGS sunt esențiale și cu o importanță crescândă în descrierea noilor specii; Palladini G., 2017).

1.2. Monogenea

Taxonomie și biologie

Monogenele sunt trematode parazite din clasa Monogenea [sin. *Monogenoidea*] și cele două subclase, *Monopisthocotylea* [sin. *Polyonchoinea*] și *Polyopisthocotylea* [sin. *Oligonchoinea*], cu peste 5500 de specii aparținând la mai mult de 750 genuri de monogene. Acestea se găsesc în special în sistemul urogenital al anurelor și chelonienilor. Unele speciile sunt, de asemenea, înregistrate în narine la ton (*Nasicola* spp.), în stomacul tilapiei (*Enterogyrus* spp.), în celom și în sistemul urogenital la pisica de mare (*Monocotyle* spp.), în inimă și sistemul circulator al peștilor (*Amphibdella* spp.), în mantaua calamarilor (*Isancistrum* spp.), ca hiperparaziți pe copepozi (de exemplu *Udonella* pe *Lepeophtheirus*).

Monogenele variază în mărime de la cca. 200 micrometri până la 4 cm lungime (de obicei 0,3-20 mm); prezintă un grad ridicat de specificitate de gazdă, poate fi vivipar sau ovipar, sunt hermaphrodite, se atașează de gazdă prin intermediul unui organ posterior muscular specializat sau opisthaptor care are o gamă variabilă de cârlige mari și mici de fixare, cleme sau structuri epidermice (adică spini tegumentali sau scuamodiscuri); numărul, forma și configurația sunt chei în identificarea și separarea speciilor. Organele copulatorii pot conține de asemenea elemente sclerotizate și armături care contribuie la identificarea lor. Paraziți din subclasa Monopisthocotylea locuiesc în mod obișnuit în tegument și crevasele tegumentare; sunt fito/algofagi epidermali, deși există unele excepții, în special *Dactylogyrus*, care este un hematofag ce se găsește în mod obișnuit pe branhiile ciprinidelor. Aceștia pot sau nu să posedă pete oculare (0-4), majoritatea sunt mobili, se deplasează într-o manieră asemănătoare cu lipitoarea, atașându-se de gazdă cu ajutorul cârligelor de fixare a opisthaptorului și secrețiilor adezive ale prohaptorului (partea anterioară a corpului); de obicei posedă un adevărat vagin, dar nu are un canal genital-intestinal. *Gyrodactylus* spp. prin comparație, de obicei parazitează branhiile gazdelor și sunt mai puțin mobile, se hrănesc cu sânge și mucus, larvele posedă pete oculare care dispar la adult; au în mod obișnuit o singură pereche de cârlige, dar cele marginale sunt înlocuite cu cleme care pot varia între 0 și 200 de perechi și posedă un canal intestinal genital (Palladini G., 2017).

Ciclul biologic

Monogenele au o singură gazdă definitivă în ciclurile lor de viață, totuși, etapele imature a două specii de monogene, *Gotocotyla acanthura* și *Pricea multae*, pot utiliza opțional gazde intermediare care sunt transmise către gazda lor finală. Fenomenul cel mai interesant în reproducerea monogenelor este poliembrionia, datorită căruia este posibilă prezența mai multor generații pe un pește parazitat. Majoritatea monogenelor

produc ouă, în afară de genurile de *Gyrodactylus*, care sunt vivipare. Ouăle variază foarte mult în morfologia lor și pot fi operculate sau neoperculate; poartă unul sau două procese polare sau filament, se pot agăța cu partea terminală, poartă spiculi sau picături lipicioase, pot fi așezate singure, în lanțuri sau depozitate ca mase de ouă care pot pluti, pot fi scufundate sau ancorate pe substrat cu adeziv sau pot fi imediat atașate pe branhiile gazdei (Kearn, 1986). În fiecare ou se dezvoltă un singur oncomiracidium, iar viteza de dezvoltare este dependentă de temperatură (de exemplu, 4-5 zile pentru *Dactylogyrus* la 25°C; 54 zile pentru *Entobdella hippoglossi* la 5°C). Diseminarea ouălor poate fi stimulată de o varietate de factori de mediu sau de parametrii chimici de la potențialele gazde în imediata vecinătate. Larva sau oncomiracidiumul care iese dintr-un ou are în mod obișnuit o lungime de 250-300 micrometri și posedă cili și ochi. Oncomiracidiumul se învârtă apoi în căutarea unei gazde, folosind o mișcare de înot activ ($1\text{-}5\text{mm/s}^{-1}$) și scufundare pasivă, deoarece este purtat de curentul de apă. La atașare, ciliul se pierde, ca și ochii, la unele specii din ord. Polyopisthocotylea, pe măsură ce parazitul atinge stadiul matur.

Sănătate publică

Nu există specii monogene care prezintă un risc pentru sănătatea umană.

Patogeni semnificativi din cadrul grupului

Infestațiile cu monogene la peștii crescuți în sistemele de acvacultură, pot provoca efecte economice grave (Shinn și colab., 2015, Thoney și Hargis, 1991). Paraziții monogeni semnificativi includ specii precum: *Benedenia seriola*, *Cichlidogyrus* spp., *Dactylogyrus* spp., *Diplectanum aequans*, *Diplozoon* spp., *Gyrodactylus* spp., *Lamellodiscus* spp., *Microcotyle* spp., *Neobenedenia melleni*, *Sparicotyle chrysophrii* și *Zeuxapta seriola*.

Monogenele sunt paraziți renumiți în acvacultură cu morfologie variată care le asigură supraviețuirea (Kearn și Whittington, 2015). Trăsăturile includ mecanisme multiple de reproducere, inclusiv oviparitatea (Whittington și Chisholm, 2008), viviparitatea (Harris and Tinsley, 1987), reproducerea izolată (Dinh Hoai și Hutson, 2014), camuflaj (Whittington, 1996) și răspunsuri comportamentale diferite în funcție de gazdă și de mediu care favorizează succesul crescut al infestației (Whittington and Ernst, 2002). Există peste 246 de specii monogene care infestază peștii în Asia de sud-est, dintre care 69 au fost raportate la ciprinide, cu *Ancyrocephalus*, *Dactylogyrus*, *Gyrodactylus* și *Paradiplozoon* fiind cele mai dominante genuri (Lim, 1998). *Dactylogyrus* spp. sunt paraziți obișnuiți ai ciprinidelor de crescătorie în Asia de Sud-Est și au fost asociați cu pierderi economice în acvacultură (Ling și col., 2016). *Dactylogyrus anchoratus*, *D. intermedius* și *D. vastator* sunt considerate specii dominante care infestază *Carassus auratus* și *Cyprinus carpio*, cu înregistrări la peștii importați din Asia de sud-est infestați fie cu una, fie cu toate cele trei specii dactilogiride (Mousavi și col., 2009). Înregistrările sugerează că *D. anchoratus*, *D. formosus* și *D. vastator* poate infesta mai multe grupe de pești. Mai precis, s-a raportat că *D. anchoratus* infestază pești din familiile *Esocidae*, *Gasterosteidae*, *Percidae* și *Salmonidae*, iar *D. vastator* infestază familiile de *Esocidae* și *Cobitidae*. Cu toate acestea, *Dactylogyrus* spp. are specificitate de mare de gazdă, desi majoritatea sunt

raportate la o singură gazdă - ciprinidele. Esocidele, gasterosteidele, percidele și salmonidele nu fac parte din *Cypriniformes* (Nelson și col., 2016), de aceea și paraziții acestora sunt diferiți de cei ai ciprinidelor. Semnalarea parazitării cu *D. anchoratus* și *D. vastator* la alte familii, cu excepția ciprinidelor, trebuie să fie verificate deoarece implică faptul că *D. anchoratus* și *D. vastator* prezintă o specificitate mai mică a gazdei sau că paraziții au fost identificați incorect. Cu toate acestea, *D. anchoratus*, *D. extensus*, *D. intermedius* și *D. vastator* au fost raportați ca fiind paraziți introduși în ecosistemele naturale asociate comerțului ciprinidelor în SUA și Puerto Rico, Australia, Iran și respectiv Italia (Trujillo-González A., 2018).

Gyrodactylus spp. a fost detectat la peștii invazivi în Australia, Canada, Cehia, Anglia, Italia, Japonia, Letonia, Rusia, Spania, SUA și Serbia și Muntenegru. *Gyrodactylus spp.* are fie o specificitate de gazdă mare (71% - 409 specii de *Gyrodactylus* descrise infestază o singură gazdă), fie o specificitate scăzută (*Gyrodactylus alviga* raportat la 16 gazde) (Bakke și col., 2002), demonstrându-se astfel o plasticitate ecologică importantă pentru difuzibilitatea parazitului în sistemele de acvacultură. Deși speciile de *Gyrodactylus* sunt potențial patogene (Bakke și col., 2002), patogenitatea acestora fiind variabilă, iar moartea gazdei indusă de paraziți depinde de speciile gazdă, de intensitatea parazitării și mărimea parazitului, dar și de alți factori de mediu (Bakke și col., 2007). Bogăția specilor din genul *Gyrodactylus* a fost explicată viviparitatea parazitului, ciclul direct al vieții fără stadiul de transmitere specializat, precum și datorită poliembrioniei. Mai important, prezența de *Gyrodactylus spp.* în medii exotice a fost legată de comerțul cu specii de pești vii. În mod specific, co-introducerea speciilor *Gyrodactylus elegans*, *G. gurleyi*, *G. kobayashii* și *G. longocuminatus* au fost direct legate de comerțul cu ciprinide vii: goldfish (*Carassius auratus*) și crapi (*Cyprinus carpio*), în Italia, Statele Unite, Canada și Anglia. Cu toate acestea, *Gyrodactylus* rămâne un gen mai puțin studiat în afara sferei acvaculturii (Bakke și col., 2002), și se cunosc puține lucruri despre capacitatea lui de a-și modifica gazda în medii non-native. Este posibil ca *Gyrodactylus spp.* să se confrunte cu oportunitatea de a infesta diferite gazde din cauza stilului de viață vivipar (facilitată prin amestecarea speciilor de pești) (Bakke și col., 2002), în contrast cu formele preimaginale foarte specializate (oncomiracidii) ale altor monogene. *Gyrodactylus* ocupă rapid fauna nativă în cazurile în care gazdele invazive și native sunt strâns legate. Sunt necesare cercetări suplimentare pentru a înțelege pe deplin impactul lor potențial în mediile native după co-infecțiile datorate comerțului fără o prealabilă carantină a peștilor (*Gyrodactylus spp.*) (Trujillo-González A., 2018).

Identificare

Forma și configurația elementelor opisthaptorului și ale aparatului copulator sunt cheia diferențierii morfologice și identificării speciilor. Majoritatea monopistocotilienilor posedă una sau două perechi de ancore poziționate central, conectate prin una sau două bare și, de obicei, 14-16 cârlige marginale mici distribuite în jurul periferiei opisthaptorului. Trematodele din ord. Platyopisthocotylea posedă cleme sclerotizate, aranjamentul scheletului fiind o caracteristică-cheie în clasificarea lor. Clemele pot fi structuri deschise "simple", care pot (sau nu) purta o coloană central,

care să se atașeze la gazdă prin aspirație sau pot fi articulate și în mod independent capabile să se prindă de branhiile gazdei lor (Palladini G., 2017).

Metode de diagnostic

Monogenele se pot mișca sau pot cade de pe gazdele moarte, ceea ce impune o analiză a peștilor paraziți în stare proaspătă, imediat după eutanasiere. Mulți monogeni mici vor fi distruși prin înghețare și decongelare, astfel că examinarea gazdelor care au fost ulterior înghețate este necorespunzătoare. Anatomia monogenilor poate fi determinată într-o varietate de moduri; metoda aplicată depinde de structurile care sunt în curs de investigare. Paraziții mari, întregi, pot fi aplatizați și examinați în viață utilizând o cutie albă sau fixați între două lame de sticlă înainte de colorarea de rutină pe bază de hematoxilină sau pe bază de carmin pentru a vizualiza structura internă (Justine, 2005). Armătura haptorului și cele ale organelor de reproducere pot fi examinate direct, cu pierderea anatomiei interne, prin:

- montarea exemplarelor vii pe lame de sticlă și apoi fixarea, colorarea și curățarea probelor *in situ* cu glicerină și picrat de amoniu;
- digestia proteolitică sau cu lactofenol (Justine, 2005);
- folosind coloranți bazați pe cromotrope 2R sau fluorescenți pentru a vizualiza cârligele bogate în sulf ale monopistocotiliienilor și proteinele de fixare a poliopistocotiliienilor (García-Vásquez și col., 2012, Kritsky și col., 1978; Milne și Avenant-Oldewage, 2006).

Eșantioanele pregătite pentru microscopie ușoară sunt vizibile în mod obișnuit utilizând contrastul de fază sau contrastul diferențial de interferență (DIC sau Normarski). În secțiunile histologice, monogenele se găsesc în mod obișnuit ancorate în tegumentul peștilor sau fixate pe branhiile peștelui. Prezența altor formațiuni anatomice (ouă în uterul paraziților - poliembrionia) sau elementelor scheletice ale aparatului de atașare sau copulație, care apar luminoase sub microscopia de contrast de fază, pot de asemenea facilita identificarea lor. Metodele moleculare includ amplificarea și secvențierea regiunilor informative ale genomului paraziților (Littlewood și Bray, 2001; Mendoza-Palmero și col., 2015; Pouyaud și colab., 2006).

CAPITOLUL 2. NANOBIOTEHNOLOGIA

CHAPTER 2. NANOBIOTECHNOLOGY

2.1. Nanobiologia

Nanobiologia și nanobiotehnologia sunt termeni care apar la intersecția dintre nanotehnologie și biologie.

Materialele cu dimensiuni cuprinse între $1 \times 10^{-9} \text{m}$ și $100 \times 10^{-9} \text{m}$ sunt numite "nanomateriale" indiferent de natura lor, fie că sunt ceramice, polimeri, metale sau compozite. Atunci când un material are dimensiuni la scară nanometrică, proprietățile sale de suprafață sunt diferențiate în relație cu proprietățile materialului la o scară mult mai mare. Aceste diferențe apar deoarece rapoartele suprafață/volum sau rapoartele de aspect nu sunt liniare pentru diferitele scale dimensionale și acest lucru este în parte responsabil pentru proprietățile diferențiate prezentate de nanomaterial (Aldo E. J., 2014). Aceste proprietăți diferite pot fi transferate la alte materiale prin introducerea de nanomateriale într-o matrice de natură diferită și dimensiuni nanometrice diferite, dar negenerând un material nanocompozit. În general, alegerea polimerului ca matriță este de preferat deoarece majoritatea au proprietăți termice și mecanice apreciable (Schneider P., 2009).

Aria interesantă a nanobiologiei a luat amploare la intersecția dintre cele două lumi: fizică și biologică. Lumea biologică reprezintă, pentru mulți dintre noi, scara "macro". Plantele, animalele și oamenii cu care interacționează aceasta au, de obicei, dimensiuni de la milimetri la centimetri sau metri și pot fi observate cu ochiul liber. Privind la nivel celular putem observa celule de zeci de micrometri (a milioana parte dintr-un metru). Mergând și mai jos, componentii biologici precum ADN-ul și membranele celulare au dimensiuni de 2-3 nanometrii (a miliarda parte dintr-un metru), în timp ce proteinele, la fel ca și anticorpii au cam 5-10nm în dimensiune. Din moment ce toate lucrurile vii au în comun aceste componente (ADN, proteine și membrane), biologia este, și a fost întotdeauna, reprezentată și prin dimensiunea ei nanometrică.

Nanobiologia, ca obiect de studiu, semnifică fuziunea cercetărilor biologice cu ajutorul nanotehnologiilor cum ar fi nanodispozitivele, nanoparticulele sau fenomene specifice nanometrice. Deși cercetătorii din biologia moleculară lucrează cu biomolecule de decenii, nanobiologia nu a fost definită ca disciplină până când cercetătorii au început să facă un efort concentrat de a utiliza cunoștințele nanotehnologiei pentru a aborda problemele biologice. Ca o fuziune între nanotehnologie și biologie, nanobiologia cuprinde o gamă largă de teme de cercetare, care pot fi împărțite în două categorii de bază : 1) nanotehnologii aplicate sistemelor biologice; 2) dezvoltarea nanotehnologiilor inspirate din biologie.

Pentru a înțelege mai bine nano-Biologia ca un domeniu de studiu, este util să privim la unele dintre subiectele generale de cercetare, care sunt studiate atât în mediul academic și comercial. În termeni foarte generali, aceste domenii de studiu pot fi împărțite în structuri și sisteme nanobiologice, biomimetică, nanomedicină, biologie moleculară și biologie interfacială. Prin gruparea cercetării în aceste domenii de studiu, putem observa modalitățile generale în care nanotehnologia și biologia sunt aduse împreună pentru scopuri comune de cercetare (en.wikipedia.org).

2.2. Nanomedicina

Nanomedicina este un domeniu de studiu larg care cuprinde multe dintre celelalte domenii de cercetare din cadrul nanobiologiei. Pentru scopurile noastre putem defini nanomedicina ca știință care evaluează sisteme și procese la scara nanometrică. Se utilizează metode nanometrice de eliberare a unor medicamente în scopuri terapeutice sau de diagnosticare a unor boli. Avantajele din cadrul nanotehnologiei încep să fie valorificate de domeniul medical. Nanoparticulele și substanțele realizate prin inginerie-nano au fost folosite pentru realizarea medicamentelor, iar unele sisteme similare (nanoconjugatele) au fost folosite pentru a viza agenții cauzatori de boli. În plus, nanoparticulele, cum ar fi punctele cuantice fluorescente, încep să fie explorate pentru imagistică avansată de diagnosticare. Cercetarea din nanomedicină vizează următoarele: livrarea de nanomedicamente și terapeutică; nanodispozitive de detectare, formare de imagini, și de aplicare în scopuri analitice; nanoparticule și etichetarea punctelor cuantice pentru diagnosticare; terapii bazate pe nanoparticule pentru anumite boli.

Rolul tradițional al ciclodextrinelor(CD) în industria farmaceutică a fost acela de a spori solubilitatea în apă, de a asigura stabilitatea fizico-chimică și fiziologică și productivitatea diferitelor ingrediente farmaceutice active (Loftsson și Brewster, 1996; Loftsson și Duchêne, 2007; Rajewski și Stella, 1996). Datorită aranjamentului lor structural (fig. 3.1.), CD captează și formează complexe de incluziune cu diferite molecule farmaceutice active prin interacțiuni non-covalente, gazdă-ospete, modificând astfel proprietățile lor fizico-chimice și comportamentul *in vivo* (Marques, 2010). Alte forme complexate de asociere au fost de asemenea descrise în literatură, iar natura acestor interacțiuni influențează utilitatea ciclodextrinelor ca purtători (*carrier*) de medicamente (Loftsson și col., 2004).

Din punct de vedere al administrării pe cale orală a medicamentului, CD au crescut concentrația produșilor farmaceutic activi care ajung în circulația sistemică sau la locul țintă dorit, din tubul gastro-intestinal. Acest lucru a condus la un efect net pozitiv asupra activității farmacologice și a rezultatelor finale ale tratamentului (Loftsson și colab., 2004a; Salústio și colab., 2011). Cu toate acestea, progresele din nanotehnologia farmaceutică au creat în ultimele două decenii oportunități vaste pentru utilizarea nanoconjugatelor (nanosistemelor) complexe ale CD pentru a modifica și livra eficient medicamentele. Principalul avantaj al nanoconjugatelor cu CD este furnizarea de funcționalități hibride necesare pentru a manipula eficient mecanismele biologice, fizico-chimice și complexe care influențează biodisponibilitatea și

biodistribuția optimă a medicamentului (Bilensoy și Hincal, 2010). Această multifuncționalitate este deosebit de dorită în terapia pe cale orală. În mod tipic, este de așteptat ca un nanoconjugat oral ideal să optimizeze solubilitatea gastrică și/sau permeabilitatea intestinală, să asigure eliberarea controlată/țintită a medicamentului, să moduleze o reducere a efectelor secundare și să protejeze ingredientul farmacologic activ de inactivarea pre-sistemică. În timp ce acest conjugat al medicamentului pe cale orală este destul de dificil de realizat, versatilitatea unui polimer ca CD permite construirea nanoconjugatului „carrier” capabil să optimizeze proprietățile fizico-chimice dorite și parametrii farmacocinetici (Zhang și Ma, 2013).

Utilizarea multifuncțională a ciclodextrinelor în nanomedicină este subliniată de patru proprietăți importante. În primul rând, moleculele de CD sunt capabile să protejeze ingredientele farmacologic active de interacțiunile specifice și nespecifice cu mediul fiziologic (Aranda și col., 2013; Ishikawa și col., 2005). În al doilea rând, ele pot interacționa cu membranele biologice pentru a spori permeabilitatea medicamentului (Aranda și col., 2013). În al treilea rând, ele au capacitatea de a modula rata și locul de eliberare a medicamentelor (Hirayama și Uekama, 1999); și, în al patrulea rând, acestea sunt "recunoscute, în general, ca fiind sigure (*safe*)"; această clasificare de siguranță reduce sau elimină complet efectele adverse sau hipersensibilitate asociată excipienților observate în unele nanosisteme polimerice (Gelderblom și colab., 2001, Hoffman, 2013, Shah și colab., 2013). Astfel, CD sunt considerate purtători ideali pentru livrarea medicamentului și pentru umplerea golurilor curente în modelul de administrare orală a medicamentului. În prezent, o atenție considerabilă a cercetării se concentrează asupra utilizării nanotehnologiei pentru a construi diferite arhitecturi structurale ale CD adaptate pentru încărcarea optimă a medicamentelor și biofuncționalități superioare.

În lucrarea de față, încercăm ca metodă inovativă [prin utilizarea nanotehnologiei], complexarea unui sistem carrier cu o meloculă de medicament în vederea construirii unui nanoconjugat ca produs biofarmaceutic în vederea administrării lui pentru profilaxia și eventual terapia unor protozooze invazive la peștii de cultură și cei utilizați în acvaristică. Deasemeni, au fost urmărite după crearea unui nou design medicamentos, rezultatele testării *in vitro* și *in vivo* a produsului realizat, deschizând astfel perspectivele utilizării metodei nanoconjugării pentru complexarea de noi molecule în vederea tratării unor boli la pești.

În cele din urmă, vor fi rezumate cercetările realizate până în prezent, fiind discutate perspectivele viitoare pentru aplicarea clinică a nanoconjugatelor, acestea devenind astfel din ce în ce mai populare.

CAPITOLUL 3. TIPURI DE SUBSTANȚE CARRIER

CHAPTER 3. TYPES OF CARRIER SUBSTANCES

3.1. Structurile Ciclodextrinelor

Ciclodextrinele (CD) sunt oligozaharide ciclice a unei glucopiranoze, conținând o cavitate centrală relativ hidrofobică și o suprafață exterioară hidrofilică. Din cauza lipsei de rotație liberă în jurul legăturilor de conexiune a unităților glucopiranozice, ciclodextrinele nu sunt perfect cilindrice, dar au o formă de trunchi de con. Cavitatea internă a ciclodextrinelor este căptușită cu atomi de hidrogen și poduri de oxigen glicozidic, care produc o densitate mare de electroni și îi conferă un caracter oarecum hidrofoab (Duca G., 2008). Ca rezultat al structurii și formei lor moleculare, posedă o capacitate unică de a acționa ca niște containere moleculare prin înglobarea unei molecule oaspete (*host*) în cavitatea lor internă. În timpul realizării unui complex CD-medicament nu se formează sau rup legături covalente, iar, în soluții apoase, complexe se disociază rapid și moleculele de medicament libere rămân în echilibru cu molecule legate în cavitatea ciclodextrinelor. Ciclodextrinele naturale sunt formate din 6, 7, sau 8 unități glucopiranozice și sunt denumite α , β (fig.3.1.) și, respectiv γ -ciclodextrină. De asemenea, au fost raportate cazuri de ciclodextrine care conțin 9, 10, 11, 12 și 13 unități de glucopiranoză. Sute de ciclodextrine modificate au fost preparate și s-a dovedit că pot avea aplicații în cercetare, dar numai câțiva dintre acești derivați, cei care conțin hidroxipropil, metil, și substituenții sulfobutileter au fost utilizați în comerț ca noi excipienți farmaceutici. CD recunosc compușii oaspeți hidrofoabi, de formă și mărime care se potrivesc cu cavitatea, pentru a forma complexe de incluziune. Pe baza acestui fenomen, CD au fost folosite pe scară largă în industrie și mediul academic ca și compuși funcționali cu capacitate de recunoaștere moleculară (Dodziuk H., 2006). În această teză studierea CD implică: istoric, caracteristici de bază și comportament de includere cu un medicament antiparazitar și aplicații în acvacultură.

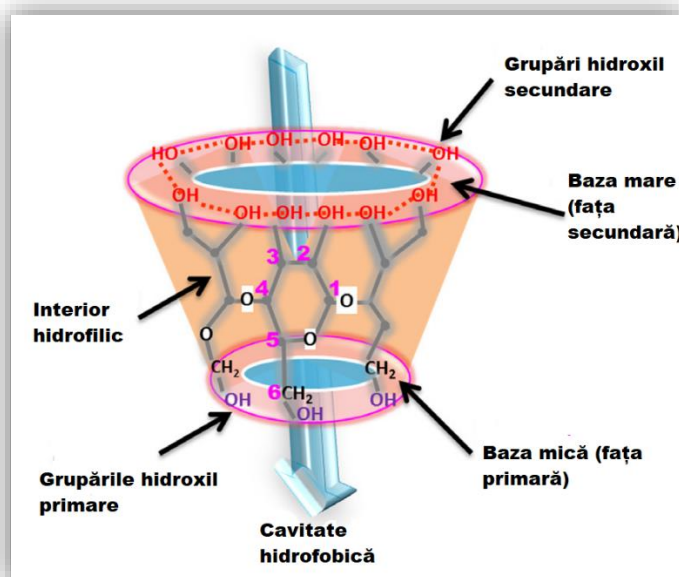


Fig. 3.1. Reprezentarea convențională pentru ciclodextrinele native (CD) ca un con trunchiat cu o cavitate hidrofobă (culoare albastră) care poate găzdui medicamente hidrofobe (Abdel S. H. M., 2018)

Fig. 3.1. Conventional representation of a cyclodextrin (CD) as a truncated cone with a hydrophobic cavity (blue colour) that can carry hydrophobic drugs (Abdel S. H. M., 2018)

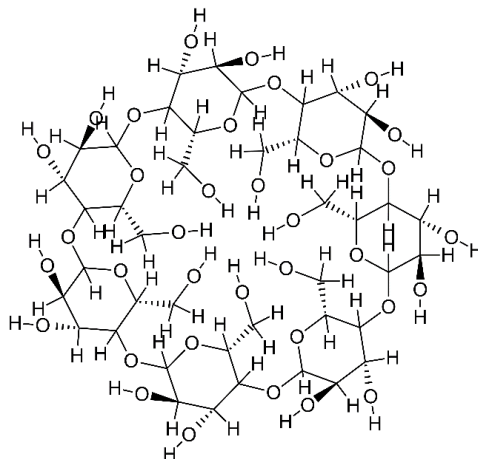


Fig. 3.2. β -ciclodextrina ($C_{42}H_{70}O_{32}$)

Fig.3.2. β -cyclodextrin ($C_{42}H_{70}O_{32}$)

Conform fondului istoric al CD realizate de Szejtli (Szejtli J., 1996), cercetarea pe CD a fost dezvoltată în trei perioade recunoscute, adică perioada de descoperire (1891-1935), perioada de explorare (1936-70) și utilizarea (1970-prezent). În perioada de descoperire, cercetarea a fost realizată fără elucidarea structurii chimice exacte a CD produsului cristalin produs prin digestia amidonului cu *Bacillus amylobacter*. În ultimele decenii ale perioadei de descoperire, era evident că CD și derivații lor formează complexe cu diferiți compuși organici, deși majoritatea datelor publicate nu sunt fiabile din cauza utilizării compușilor impuri și a metodelor experimentale

inadecvate. În perioada de explorare, structura chimică a CD a fost elucidată și s-au determinat metodele de preparare pe scară largă a acestora. Ca rezultat, pe măsură ce au fost înțelese proprietățile chimice și fizice ale CD, cercetarea fundamentală a progresat considerabil. Pe baza acestor constatări, în această perioadă au fost publicate câteva articole de revizuire pe ciclodextrine. (French D., 1957; Thoma J., 1965; Caeser G., 1968) Cu toate că toxicitatea CD a fost subliniată într-un articol de revizuire (French D., 1957), aproape că nu s-au elaborat studii aplicate pe CD. La începutul perioadei de utilizare, studiile toxicologice competente au confirmat faptul că CD sunt practic netoxice. Aceste studii au declanșat cercetarea aplicațiilor CD. Prin urmare, volumul producției de CD a crescut și prețul acestora a scăzut. În consecință, CD au fost aplicate pe scară largă într-o varietate de domenii, incluzând alimentație, cosmetică, produse farmaceutice, agenți antibacterieni și utilizarea ecologică (Hasidzume A., 2017).

Utilizarea CD pentru a crește stabilitatea fizică și chimică a medicamentelor în soluție și în alte forme de dozare a fost bine cercetată în literatură (Loftsson și Brewster, 1996). În general, CD pot spori stabilitatea sau pot cataliza degradarea unor molecule de medicamente.

Tabel 3.1./Table 3.1.

Structurile generale ale ciclodextrinelor și abrevierile lor (după Stella V., 2008)
General structures of cyclodextrins and their abbreviations (after Stella V., 2008)

Ciclodextrina	Abreviația	R	n
<i>α-ciclodextrina</i>	α-CD	H	4
<i>β-ciclodextrina (fig.3.2.)</i>	β-CD	H	5
<i>γ-ciclodextrina</i>	γ-CD	H	6
<i>Carboximetil-β-ciclodextrina</i>	CM-β-CD	CH ₂ CO ₂ H or H	5
<i>Carboximetil-etil-β-ciclodextrina</i>	CME-β-CD	CH ₂ CO ₂ H, CH ₂ CH ₃ or H	5
<i>Dietil-β-ciclodextrina</i>	DE-β-CD	CH ₂ CH ₃ or H	5
<i>Dimetil-β-ciclodextrina</i>	DM-β-CD	CH ₃ or H	5
<i>Glucosil-β-ciclodextrina</i>	G ₁ -β-CD	Glucosyl or H	5
<i>Hidroibutenil-β-ciclodextrina</i>	HBU-β-CD	CH ₂ CH(CHCH ₂)OH or H	5
<i>Hidroietil-β-ciclodextrina</i>	HE-β-CD	CH ₂ CH ₂ OH or H	5
<i>Hidroxiopropil-β-ciclodextrina</i>	HP-β-CD	CH ₂ CHOHCH ₃ or H	5
<i>Hidroxiopropil-γ-ciclodextrina</i>	HP-γ-CD	CH ₂ CHOHCH ₃ or H	6
<i>Maltosil-β-ciclodextrina</i>	G ₂ -β-CD	Maltosyl or H	5
<i>Metil-β-ciclodextrina</i>	M-β-CD	CH ₃ or H	5
<i>Random metil-β-ciclodextrina</i>	RM-β-CD	CH ₃ or H	5
<i>Sulfobutileter-β-ciclodextrina</i>	SBE-β-CD	(CH ₂) ₄ SO ₃ Na or H	5

3.2. Metodologia de complexare cu ciclodextrine

Metode pentru obținerea “compușilor complecși de incluziune cu ciclodextrinele”(CCIC).

Cele mai aplicate metode pentru obținerea compuşilor complecși de incluziune ai ciclodextrinelor(“CCIC”) cu principii medicamentoase biologice active sunt:

amestecarea, frământarea, coprecipitarea, coevaporarea și liofilizarea (Boldescu V., 2008).

Amestecarea- reprezintă cea mai simplă metodologie de producere a unui compus complex de incluziune. Cei doi constituenți se cern în prealabil pentru a se obține pulberi fine cu dimensiuni egale ale particulelor. Apoi, constituenții se amestecă în raportul echimolar selectat corespunzător până ce se formează o masă omogenă.

La nivelul producerii pe scară industrială, pentru a obține complecși de incluziune prin amestecare se pot utiliza utilaje tehnologice speciale cu rol în procesele de preparare a materiei prime în industria farmaceutică. În felul acesta, pentru cernere se pot utiliza niște ciururi (site) care cu un câmp electromagnetic, cu dezechilibru sau inerțiale. Pentru realizarea procesului de amestecare se mai pot folosi malaxoare cu acțiune centrifugă cu con rotitor. Aplicarea acestora permite atingerea unei omogenizări calitative într-un timp mai scurt, cu un randament bun și cheltuieli minime de energie (Boldescu V., 2008).

Pentru creșterea randamentului, amestecul poate fi supus măcinării prin vibrație. Gradul de măcinare care poate fi atins cu aceste mori vibratoare de tip inerțial este foarte mare: diametrul particulelor obținute prin pulverizare uscată atinge între 85-5 μm . Durata optimă a procesului de măcinare este cuprinsă între 30 minute și 1 oră, depinzând de frecvența de micro-vibrație a morii precum și de densitatea constituenților.

În general, în cazul formării unui compus complex de incluziune se pornește de la doi candidați cristalini, iar produsul rezultat este o substanță amorfă. Acest grad de amorficitate este considerat drept factor de evaluare al randamentului procesului de incluziune.

Frământarea poate fi considerată o extindere a metodei precedente de obținere a "CCIC" (Boldescu V., 2008).

Amestecul celor doi constituenți se supune măcinării umede prin adăugarea, pe parcursul decurgerii procesului, a unui volum minim de soluție de etanol (raportul etanol-apă=1:1) în moara vibratoare. Pasta omogenă obținută în rezultatul acestei etape se usucă la temperatura camerei și, dacă este nevoie, se supune unei măcinări uscate. În general, prin intermediul acestei metode se obține un randament de încapsulare mai bun în comparație cu metoda măcinării.

O altă metodă de obținere a "CCIC" o reprezintă - coprecipitarea. Metoda constă în prepararea prealabilă a 2 soluții care au aceeași concentrație molară de medicament (substanță activă) și ciclodextrină. Avantajul acestei metode presupune faptul că pentru obținerea celor 2 soluții se pot utiliza solvenți diferiți. În modul acesta, în cazul ciclodextrinei solventul este apa, iar în cazul medicamentului (substanță activă) singurul criteriu pe care trebuie să-l îndeplinească solventul este solubilitatea acestuia în apă.

Apoi, după formarea celor 2 soluții, soluția de ciclodextrină se încălzește până la aproximativ 55°C și se amestecă cu același volum al soluției ce conține medicamentul. Amestecul obținut este agitat continuu timp de 24h la temperatura camerei până la atingerea echilibrului în sistem. Datorită entalpiei negative a procesului

de formare a compuşilor complecşi de incluziune cu ciclodextrina, solubilitatea mai mare a principiilor active medicamentoase în soluţii cu ciclodextrine se observă la temperaturi scăzute.

După precipitarea complexului format, soluţia se decantează, iar precipitatul obţinut este spălat, după care se usucă şi se supune unei măcinări uscate (Boldescu V., 2008).

O modificare a metodei de coprecipitare o reprezintă coevaporarea. Procesul se realizează la fel ca şi în cazul coprecipitării, până la obţinerea amestecului lichid la temperatura camerei. Apoi, soluţia este filtrată şi amestecul de solvenţi se înlătură lent într-un evaporator rotativ la temperatura de aprox. 55-60°C, reziduul se usucă la temperatura camerei şi se supune măcinării uscate.

Una dintre cele mai eficiente şi avansate metode de obţinere a "CCIC" este: liofilizarea. În esenţă, metoda de includere prin liofilizare presupune parcurgerea următoarelor etape: dizolvarea constituenţilor, amestecarea lor, agitarea până la atingerea echilibrului în sistem, filtrarea, congelarea amestecului format şi liofilizarea. Solventul (sau amestecul de solvenţi) se sublimă sub vid timp de 24h, iar apoi produsul obţinut este supus cernerii în vederea obţinerii unei pulberi omogene (Boldescu V., 2008).

Deşi toate tehnicile descrise pot fi aplicate şi realizate la un nivel industrial, acestea deseori includ aplicarea proceselor de lungă durată, cu utilizarea cantităţilor mari de solvenţi. În afară de acestea, procesele descrise nu pot fi efectuate continuu. Un alt impediment în obţinerea "CCIC" la scară industrială constă în aceea că ciclodextrinele sunt supuse degradării termice, sau caramelizării, ceea ce poate accelera în unele cazuri degradarea „substanţei-oaspete” incluse în ele. Astfel, pentru creşterea vitezei procesului de formare a "CCIC" este periculoasă aplicarea temperaturilor înalte (Boldescu V., 2008).

Există necesitatea de a aplica metodele cele mai convenabile de obţinere a "CCIC" la nivelul industrial, care vor fi eficiente din punctul de vedere al duratei de timp şi consumului materialelor auxiliare.

Una dintre metodele eficiente ar putea fi tratarea amestecului de ingrediente active şi ciclodextrină cu microunde. Este cunoscut faptul că substanţa ce se află în câmpul electric în prezenţa microundelor se încălzeşte datorită polarizării moleculelor individuale din componenţa ei. Principiul pe care se bazează încălzirea amestecului constă în absorbţia energiei de către dipolii permanenţi şi induşi aflaţi în el. În rezultatul absorbţiei energiei, moleculele încep să vibreze şi fricţiunile lor produc căldură.

Nu toate molecule au structuri favorabile pentru absorbţia acestui tip de energie. În general, substanţele polare cu constantele dielectrice mari absorb mai multă energie decât substanţele nepolare. Cu toate acestea, intensitatea vibraţiei rezultate depinde parţial de structura moleculelor (forma, mărimea, legăturile intramoleculare), vâscozitatea materialului şi temperatură (Boldescu V., 2008).

Atwater spune că dintre ciclodextrinele naturale, α -ciclodextrinele practic nu absorb microundele, iar β -ciclodextrinele şi γ -ciclodextrinele sunt susceptibile la

frecvență mai mare de 4 GHz, particular în limitele 5 și 12 GHz, cu un maximum la aproape 7,5 MHz.

Aplicarea microundelor contribuie la utilizarea mai efektivă a energiei, ceea ce va face tehnologia de obținere a "CCIC" mai favorabilă din punctul de vedere al protecției mediului ambient și reducerii cheltuielilor la întreprinderile de producție.

În studiul din această teză a fost luată în considerare metoda liofilizării datorită ușurinței cu care poate fi realizată.

3.3. Caracterizarea complexelor de incluziune cu ciclodextrine

Aceste procedee se folosesc pentru a afla dacă s-a format într-adevăr un complex de incluziune sau există doar un amestec între ciclodextrină și medicamentul oaspete.

3.3.1. Scanarea cu microscopul electronic (SEM)

Foarte adesea, studiul unui complex de incluziune începe prin observarea lui folosind SEM (scanning electron microscopy). Pentru observare, probele sunt fixate pe un tub de alamă și se acoperă cu un strat subțire de cupru, aur sau aliaj aur-paladiu pentru a conduce mai bine electricitatea. O evaluare și o comparare bună, presupune observarea și evaluarea probelor la aceeași magnificație. În orice caz, este dificil să concluzionăm formarea unei incluziuni, datorită schimbării morfologice care apare între amestec și produsul obținut. Procesul de preparare, în general, are o mare influență asupra caracteristicilor produsului.

3.3.2. Spectroscopia UV (ultraviolete)

Deoarece este o metodă foarte simplă, spectrul de absorbție a ultravioletelor (UV) a fost utilizat pentru a studia complexii de incluziune. Ciclodextrinele nu prezintă absorbantă semnificativă UV, astfel încât creșterea absorbției observate într-o soluție oaspete/CD este rezultatul perturbației electronilor cromofori ai oaspetelui prin includerea sa în ciclodextrine.

3.3.3. Dicroism circular

Fiind molecule simetrice, ciclodextrinele nu au activitate dicroică, dar o pot modifica pe a moleculelor oaspete prin perturbarea polarității micromediului rezultat de la incluziune.

3.3.4. Scanarea calorimetrică diferențiată (DSC-Differential Scanning Calorimetry)

Această analiză este adesea efectuată la materialele prime și produsele rezultate din procesul de preparare a complexului. De fapt, atunci când moleculele oaspete sunt incluse în cavitatea ciclodextrinelor, punctele lor de topire, fierbere, sublimare, de obicei, trec la o temperatură diferită sau dispar în intervalul de temperatură la care se descompune ciclodextrina. În general, probele sunt încălzite într-un vas sigilat de la 25 la 250°C, 300°C, sau chiar și 400°C la o rată de 5 sau 10°C/min. O tavă goală este luată ca referință. Ciclodextrinele, în special "β-CD", conțin

molecule de apă (H_2O) în interiorul cavității lor. Aceasta este eliberată atunci când temperatura crește. Într-un recipient sigilat, prezența vaporilor poate perturba observarea unor intervale termice suplimentare, în special în cazul în care rata de scanare este prea rapidă (Figueiras, 2007).

3.3.5. Spectroscopie cu radiații Infraroșii (IR)

Analiza cu radiații infraroșii (IR) poate oferi informații interesante la producții nou formate prin asocierea unui medicament oaspete la o ciclodextrină. Această analiză se efectuează pe pulberile incluse într-un disc de KBr.

3.3.6. Difractometria cu Raze X (XRD)

Difracția cu Raze X (XRD) permite o apreciere a eficienței procesului de incluziune, datele din literatură evidențiind fie o amorfizare a medicamentului oaspete prin complexare cu ciclodextrină, fie o intensificare majoră a stării lui de cristalinitate (Russel și col., 2000).

3.4. Folosirea ciclodextrinelor în tipuri de produse

Tabel 3.2./Table 3.2.

Produse conjugate cu ciclodextrine destinate diferitelor tipuri de administrări
(după *Guideline on excipients in the label and package leaflet of medicinal products for human use*, 2003)

Conjugated products with cyclodextrins for different types of administration. (după *Guideline on excipients in the label and package leaflet of medicinal products for human use*, 2003)

	α -CD	β -CD	γ -CD	HP- β -CD	SBE- β -CD	RM- β -CD
Orale		X	X	X	X	
Nazale						X
Rectale		X		X		
Dermice		X	X	X		
Oculare		X		X		X
Parenterale	X			X	X	

Legendă: α -CD : alfa-ciclodextrina; β -CD: beta-ciclodextrina; HP- β -CD: hidroxi-propil-beta-ciclodextrina; SBE- β -CD : sulfo-butir-eter-beta-ciclodetrina; RM- β -CD: random-metil-beta-ciclodextrina

3.4.1. Produse destinate administrării orale

Disponibilitatea administrării *per os* a ciclodextrinelor este foarte scăzută la animale și oameni (0,1-3%), cu excepția Random Metil-beta-Ciclodextrinei, care are o biodisponibilitate de 12% la șobolani. Din cauza naturii lor voluminoase și hidrofilice, doar cantități nesemnificative de ciclodextrine sunt absorbite la nivelul tractusului gastro-intestinal prin difuziune pasivă (Stella V.J., 2008). Solubilitatea medicamentelor dată de ciclodextrine poate crește, de asemenea, viteza de dizolvare și astfel îmbunătățește disponibilitatea medicamentelor administrate pe cale orală cu permeabilitate ridicată și solubilitate scăzută (Brewster M. E. și Loftsson T., 2007). Interacțiunea ciclodextrinelor ingerate cu absorbția vitaminelor solubile în grăsimi sau

alți nutrienți lipofilici nu este de așteptat, deoarece formarea complexilor de incluziune este un proces reversibil, γ -CD este ușor de digerat în intestinul subțire, iar studiile privind α -CD și β -CD care sunt slab digerabile au arătat că biodisponibilitatea vitaminelor (A, D și E) nu este afectată (Bellringer, 1995).

Ciclodextrinele administrate pe cale orală în doze mari (>1000 mg/kg/zi) pot cauza diaree reversibilă și largirea cecumului la animale. Aceste efecte reprezintă răspunsuri fiziologice adaptative la o încărcare mare de carbohidrați slab digerabili și alți nutrienți osmotici activi, ai căror relevanță pentru oameni este minimă (Stella V.J., 2008).

Toate ciclodextrinele primare sunt acceptate ca aditivi alimentari și sunt în general „recunoscute ca fiind sigure”. În calitate de supliment alimentar, doza orală zilnică de α -CD poate ajunge la 6000 mg/zi, de β -CD 500 mg/zi, și pentru γ -CD 10000 mg/zi, și HP- β -CD 8000 mg/zi (Loftsson T., 2010).

3.4.2. Produsele nazale și pulmonare

Ciclodextrinele în doze ridicate pot crește permeabilitatea prin acțiunea directă asupra membranelor mucoaselor și intensifică absorbția medicamentului și/sau biodisponibilitatea. Aceste efecte pot fi cauzate de solubilitatea lipidelor membranare prin complexarea lor cu ciclodextrinele, care au abilitatea de a perturba integritatea membranei. Cu toate acestea, spre deosebire de detergenți, ciclodextrinele nu pătrund în membrană, dar solubilizează componentele acesteia, prin urmare efectele perturbatoare sunt ușoare și reversibile (Challa R., 2005). Ciclodextrinele sunt slab absorbite prin membranele mucoaselor, dar concentrațiile mai mari necesare pentru obținerea unei permeabilități substanțiale de sporire a medicamentelor, pot facilita, de asemenea, propria lor absorbție. De exemplu, când 80 mM (mili moli) de DM- β -CD au fost administrați la șobolani, un procent relativ crescut de 16% DM- β -CD a fost recuperat din urină (Hipler U.C., 2007).

Administrarea nazală a complexilor cu ciclodextrină solubili în apă oferă o creștere rapidă a nivelului de medicament în circulația sistemică, evitând metabolizarea hepatică și intestinală. Efectele ciclodextrinelor asupra epiteliului nazal par a fi de o importanță minoră pentru creșterea absorbției, deoarece ciclodextrinele și-ar putea pierde din abilitățile de interacționare cu membranele atunci când au cavitățile ocupate.

Ciclodextrinele îmbunătățesc transportul medicamentelor pulmonare, dar sunt de asemenea și ele absorbite. Când β -CD, RM- β -CD și HP- β -CD au fost administrate intratraheal la iepuri, biodisponibilitatea ciclodextrinelor a fost de 66%, 74% și respectiv 80% (Irie T., 1997).

Folosirea mucoasei nazale pentru transportul medicamentelor este o abordare nouă pentru livrarea sistemică a medicamentelor cu eficacitate ridicată și cu o biodisponibilitate orală scăzută, datorită distrugerii extensive la nivel gastro-intestinal și efectului de prim pasaj hepatic.

Ciclodextrinele au abilitatea de a spori transportul medicamentelor și livrarea acestora prin membrane biologice fără a afecta funcția lor de barieră, o proprietate ce

face ca ciclodextrinele să faciliteze pătrunderea medicamentelor intranazale. Pentru a putea fi folosite ca excipienți în livrarea medicamentelor pe cale nazală, ciclodextrinele ar trebui să aibă următoarele caracteristici: -să nu prezinte niciun efect local sau sistemic; -să nu interfereze cu funcțiile nazale muco-ciliare; -să nu prezinte efect citostatic; - să fie non-iritante și non-alergice; - să sporească permeabilitatea medicamentului prin epiteliul nazal într-un mod reversibil (Committee For Human Medicinal Products, 2014).

3.4.3. Produse cu administrare/eliberare rectală

Atunci când supozitoarele oleaginoase ce conțin beta-ciclodextrină, random metil-betaciclodextrină sau hidroxipropil-betaciclodextrină s-au aflat în rectumul șobolanilor, cantități mari intacte de hidroxipropil-betaciclodextrină sau random metil-betaciclodextrină au fost excretate în urină după 24 de ore de la administrare.

Studiile recente arată că mucoasa rectală poate fi folosită ca zonă potențială pentru eliberarea medicamentelor care au un gust amar și grețos, au metabolizare în ficat și se degradează la pH-ul intestinal. Este o cale ideală de administrare a medicamentelor la pacenții inconștienți, copii și sugari. Totuși, mucoasa rectală oferă o zonă foarte limitată pentru absorbție rezultând o eliberare necontrolată a medicamentelor (Irie T., 1997).

3.4.4. Eliberarea medicamentului transdermic

Eliberarea medicamentului printr-un sistem transdermic reprezintă un mijloc mai sofisticat și mai fiabil de administrare prin piele, pentru efecte locale cât și sistemice. În prepararea cosmeticelor, folosirea câteodată a surfactanților ca solubilizatori întâlnește câteva dezavantaje, cum ar fi iritația cutanată, nebulozitatea și spumigarea preparatului. Pentru a fi utilizați ca excipienți în eliberarea transdermică a medicamentului, ciclodextrinele trebuie să îndeplinească următoarele: - să fie inerte din punct de vedere terapeutic; - să nu interfereze cu funcțiile normale ale pielii, cum ar fi protecția la căldură, umiditate, radiații sau altele; - să nu modifice pH-ul pielii; - să nu interacționeze cu orice componență a pielii și nici să provoace iritații ale pielii (Guideline For Residual Solvents, 1995).

3.4.5. Produse cu eliberare oculară

Ciclodextrinele cresc solubilitatea în apă a medicamentului, intensifică absorbția oculară, îmbunătățesc stabilitatea apoasă și reduc iritația locală. Ciclodextrinele intensifică penetrabilitatea în globul ocular prin transportul moleculelor lipofice insolubile de medicament prin stratul apos de mucină și astfel cresc disponibilitatea medicamentului la suprafața lipofilică a ochiului (Stefansson, 2002). Alfa-ciclodextrina (α -CD) poate fi capabilă de transportul medicamentului prin straturile corneei. De asemenea, α -ciclodextrina ar putea interfera direct cu structurile membranei, în special prin straturile cu celule epiteliale lipidale cauzând un fel de destabilizare a barierei, rezultând o permeabilitate intensificată pentru ea și pentru molecula de medicament (Siefert, 1997).

3.4.6. Produsele cu eliberare parenterală

Ciclodextrinele administrate intravenos dispar rapid din circulația sistemică și sunt excretate intacte la nivel renal. Ciclodextrinele absorbite sistemic sunt distribuite în compartimentele extracelulare. Clearance-ul plasmatic total pentru HP- β -CD și SBE- β -CD la toate speciile testate este asemănător cu rata de filtrare glomerulară. $T_{1/2}$ variază de la 20 la 100 minute. Doar RM- β -CD are un timp de înjumătățire mai mare (7h), comparativ cu ciclodextrinele derivate, probabil datorită capacității de a interacționa cu membranele celulare.

Tabel 3.3./Table 3.3.

Câteva exemple de produse farmaceutice ce conțin ciclodextrine (Kurkov S., 2013)

Some examples of pharmaceutical products containing cyclodextrins (Kurkov S., 2013)

MEDICAMENT/CICLODEXTRINA	DENUMIRE COMERCIALĂ	FORMULA FARMACEUTICĂ	COMPANIA (ȚARA)
A-CYCLODEXTRIN (ACD)			
CEFOTIAM-HEXETIL HCL	Pansporin T	Tabletă	Takeda (Japonia)
PGE ₁	Prostavastin	Soluții parenterale	Ono (Japonia); Schwarz (Europa)
B-CYCLODEXTRIN (BCD)			
CEPHALOSPORIN	Meiact	Tabletă	Meiji Seika (Japonia)
DEXAMETHASONE	Glymesason	Unguent, tabletă	Fujinaga (Japonia)
MELOXICAM	Mobitil	Tabletă și supozitor	Medical Union Pharmaceuticals (Egipt)
NICOTINE	Nicorette	Tablete sublinguale	Pfizer (Europa)
NITROGLYCERIN	Nitropen	Tabletă sublinguală	Nihon Kayaku (Japonia)
OMEPRAZOLE	Omebeta	Tabletă	Betafarm (Europa)
PGE ₂	Prostarmon E	Tabletă sublinguală	Ono (Japonia)
PIROXICAM	Brexin, Flogene, Cicladon	Tabletă, supozitor	Chiesi (Europa); Aché (Brazilia)
2-HYDROXYPROPYL-B-CYCLODEXTRIN (HPBCD)			
HYDROCORTISONE	Dexocort	Soluție	Actavis (Europa)
INDOMETHACIN	Indocid	Soluție oculară	Chauvin (Europa)
ITRACONAZOLE	Sporanox	Soluții orale și i.v.	Janssen (Europa, SUA)
SULFOBUTYLETHER B-CYCLODEXTRIN SODIUM SALT (SBEB CD)			
MAROPITANT	Cerenia	Soluție parenterală	Pfizer Animal Health (SUA)
VORICONAZOLE	Vfend	Soluție i.v.	Pfizer (SUA, Europa, Japonia)
ZIPRASIDONE MESYLATE	Geodon, Zeldox	Soluție i.m.	Pfizer (SUA, Europa)
RANDOMLY METHYLATED B-CYCLODEXTRIN (RMB CD)			
CLORAMPHENICOL	Clorocil	Soluție oculară	Oftalder (Europa)
INSULIN		Spray nazal	Spania
2-HYDROXYPROPYL-Γ-CYCLODEXTRIN (HPΓCD)			
DICLOFENAC SODIUM SALT	Voltaren	Soluție oculară	Novartis (Europa)
TC-99 TEOBOROXIME	CardioTec	Soluție i.v.	Bracco (SUA)

Multe dintre medicamente au fost complexate cu ciclodextrine, dar puțini compuși complexați s-au utilizat la pești.

Dintre acestea, pentru terapia antiparazitară la pești a fost studiată complexarea Triclabendazolului cu β -ciclodextrina pentru a vedea efectul asupra protozoarului ciliat *Ichthyophthirius multifiliis* la păstrăvul curcubeu. Complexarea s-a realizat prin metoda framântării și s-au obținut rapoarte stoechiometrice de 1:1, 1:2, 1:3. Tratamentul s-a efectuat pe grupuri de câte 10 pești: unul martor și unul infestat natural. Medicamentul complexat a fost administrat sub formă de furaj granulat. Acesta a fost comparat cu medicamentul administrat ca atare (necomplexat) în furaj. În urma administrării în hrană a unor doze adecvate de triclabendazol și complex, s-a observat o reducere a gradului de infestare, precum și o micșorare în dimensiune a trofonților la animalele tratate (Luzardo-Alvarez A., 2003).

3.5. Principiu activ selectat pentru formarea de compuși complecși de incluziune

În studiu s-a efectuat complexarea diminazenului aceturat (DA) cu o substanță de tip carrier: beta-ciclodextrina (β -CD).

Diminazenul aceturat sau Berenilul (fig. 3.3.) a fost un tratament foarte folosit în tripanosomiaza și babesioză. Deși compusul a fost pe piață din 1955, mecanismele de acțiune sunt puțin înțelese. În timp ce raportările timpurii arată că Berenilul posedă proprietăți tripanolitice și tripanostatice, unele studii arată că poate afecta sistemul imunitar al gazdei. Studiile recente demonstrează că tratamentul cu Berenil reduce producția de citokine proinflamatorii (IL-6, IL-12 și TNF) *in vivo* și *in vitro* prin stimularea cu *Trypanosoma congolense*, lipopolizaharide (LPS). Abilitatea Berenilului de a deregla căile majore intracelulare de semnalizare ce conduc la producerea de citokine proinflamatorii indică faptul că poate fi utilizat în tratamentul bolilor ce produc în exces citokine proinflamatorii (Shiby K., 2014).

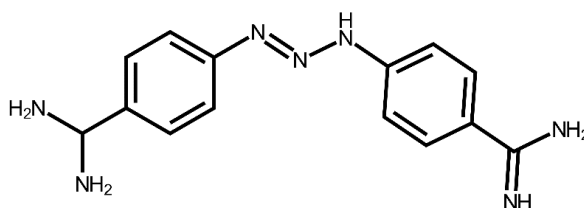


Fig. 3.3. Diminazen: Diminazen (p-[(E)-p-(Diaminomethyl)phenylazoamino]benzenecarboxamidine)

Fig. 3.3. Diminazene: Diminazen (p-[(E)-p-(Diaminomethyl)phenylazoamino]benzenecarboxamidine)

În această teză s-a realizat crearea de noi complecși compuși de incluziune ai ciclodextrinelor. Testările au fost efectuate în prealabil și s-a recurs la aplicarea unei terapii la pești cu tratamentul pe bază unui complex antiparazitar.

Rezultatele au fost centralizate și analizate urmărind aplicabilitatea metodelor de terapie la peștii de acvacultură.

3.6. Concluzii parțiale

Introducerea nanoconjugatelor în spațiul farmaceutic a revoluționat posibilitățile de eliberare a medicamentelor direct la țintă, crescând totodată posibilitățile de descoperire a unor noi tratamente cu o specificitate crescută și cu mai puține efecte secundare. Nanomedicamentele (nanoconjugatele) au permis o creștere a performanței biologice și farmacologice precum și oferirea unor alternative noi pentru formule moleculare și compuși proveniți din biotehnologie.

1.Compuși complecși de incluziune ai substanțelor medicamentoase antiparazitare împreună cu ciclodextrinele posedă proprietăți avantajoase comparativ cu substanțele farmaceutice inițiale.

2.Îmbunătățirea farmacocineticii antiparazitarelor are un impact pozitiv nu numai asupra organismului peștelui, dar și într-un mod indirect, asupra mediului înconjurător.

3.Tehnologiile de obținere a compușilor complecși de incluziune cu ciclodextrine pot fi aplicate și la nivel industrial, însă după unele modificări în procesele tehnologice.

4.Cele mai avantajoase metode de obținere a compușilor complecși de incluziune presupun tratarea soluției reactante cu microunde și liofilizarea consecutivă a amestecului obținut, însă în fiecare caz concret trebuie să fie analizate și alte metode de obținere a acestora.

CAPITOLUL 4. TEHNICI ȘI METODE DE STUDIERE A CARACTERISTICILOR FUNCȚIONALE ALE SISTEMELOR DE EMULSIE

CHAPTER 4. TECHNIQUES AND METHODS OF STUDYING THE FUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF EMULSION SYSTEMS

Introducere

Deoarece sistemele alimentare sunt matrici complexe de diferite componente care nu sunt întotdeauna bine amestecate unele cu altele, sistemele ulei-apă și/sau aer-apă sunt găsite în mod obișnuit și ar putea fi stabilizate folosind agenți adecvați de emulsifiere sau de stabilizare a suprafeței. Astfel, înțelegerea științei și tehnologiei sistemelor de emulsie este vitală pentru cercetători, deoarece multe alimente naturale și prelucrate, cum ar fi laptele, salata, dressing-ul, înghețata, băuturile răcoritoare și prăjiturile, sunt parțial sau exclusiv făcute din emulsie (McClements D., 2015). Emulsia formată din diferite ingrediente și condiții de prelucrare prezintă un spectru larg de caracteristici fizice și chimice care le permit să furnizeze sisteme alimentare cu funcții importante în care stabilitatea, textura, gustul, mirosul, aspectul și răspunsul biologic pot fi reglate în mod eficient pentru a îndeplini cerințele pentru orice produs specific. Datorită apariției sale largi în sistemele alimentare, emulsia a devenit acum un vehicul popular de livrare pentru ingredientele funcționale, cum ar fi: culoarea, aroma, conservanții, vitaminele, mineralele și substanțe farmaceutice nutritive standardizate (Dickinson E., 2009). Stabilitatea și eficacitatea componentelor menționate mai sus ar putea fi îmbunătățite în mod eficient după ce au fost conținute în sistemul de emulsie, din care ar putea fi protejate și eliberate în sistemul biologic optim. În funcție de tipul de ingrediente utilizate și de cerințele diferitelor aplicații, emulsia este un sistem foarte versatil, care poate fi proiectat la diferite dimensiuni, structuri de suprafață și proprietăți electrochimice. Multe studii au demonstrat cu succes dezvoltarea sistemelor bazate pe emulsie, iar rezultatele au fost deja sintetizate în numeroase rapoarte publicate (Ting Y., 2014; McClements D., 2007; Ting Y., 2013).

Procesul de producere a emulsiei, care se obține prin aplicarea unei cantități suficiente de energie la interfața ulei/apă se numește omogenizare și presupune descompunerea uleiului vrac în picături mici. În general, cu cât trebuie atinsă dimensiunea mai mică, cu atât este mai mare consumul de energie necesar (McClements D., 2010). Ca și în cazul macroemulsiei, agitarea simplă de mare viteză este capabilă să formeze picături de câțiva micrometri. Pentru a reduce în continuare mărimea picăturilor la nivel de submicron, este necesară o intrare mai mare a energiei și ar putea fi furnizată de diferite mecanisme de rupere, inclusiv sisteme rotor-stator, de înaltă presiune, membrane și ultrasunete (Schultz S., 2004). Un alt aspect important

al sistemului de emulsie este selecția agentului tensioactiv (emulgator), care poate determina nu numai cea mai mică dimensiune realizabilă, dar și stabilitatea și caracteristicile de suprafață ale picăturilor de emulsie, prin alternarea combinației materialelor active de suprafață și a condițiilor de procesare ale sistemului de emulsie, care poate avea diferite caracteristici fizice și chimice ce pot să îndeplinească cerințele aplicațiilor țintă în produsele alimentare sau în multe alte domenii (Dickinson E., 2010).

Pentru ca cercetătorii să proiecteze și să producă în mod eficient sisteme de emulsie care ar putea satisface nevoile lor specifice de aplicare, este esențial să se realizeze matricea emulsiei și caracteristicile picăturii acesteia, care ar putea influența puternic proprietățile fizico-chimice, funcționale și senzoriale ale unui astfel de sistem. Caracteristicile precum dimensiunea, morfologia, reologia, încărcarea și capacitatea de încapsulare ar putea fi studiate și evaluate utilizând instrumente analitice și metodologii standardizate (McClements D., 2007). În această teză de doctorat, ne-am propus să comparăm diferite tehnici și metode analitice utilizate în mod obișnuit pentru a evalua aspectul, morfologia, sarcina de suprafață a unui sistem de emulsie ce poate fi utilizat în combaterea unor boli la pești. Caracteristicile selectate în această teză sunt parametrii care sunt cel mai frecvent evaluați atunci când se determină calitatea și se precizează dacă sunt adecvați pentru o aplicație potențială. Scopul acestui studiu este de a furniza un ultim rezumat al caracterizării generale ale celor două sisteme de emulsie, iar rezultatele pot fi utilizate ca referință de către cercetătorii care lucrează în domeniul științei acvaculturii sau ihtiopatologiei.

4.1. Stabilitatea emulsiei

O emulsie este compusă din două lichide nemiscibile, în care unul dintre ele este dispersat ca picături în celălalt lichid numit faza continuă (McClements D., 2015).

Stabilitatea emulsiilor se referă la capacitatea emulsiilor de a rezista schimbărilor în proprietățile lor fizico-chimice în timp (McClements D., 2015). Mecanismele care conduc la instabilitatea emulsiei includ separarea gravitațională (creamuirea/sedimentare), flocularea, coalescența, maturarea Ostwald și inversarea fazelor (fig. 4.1.). Stabilitatea emulsiilor este influențată de materialele lor compoziționale și de condițiile de prelucrare, la care s-ar putea dezvolta diferite caracteristici ale picăturilor pe care le conțin. Caracteristicile importante ale picăturilor includ concentrația, mărimea, încărcarea, interacțiunile și comportamentul reologic (McClements D., 2015; Friberg S., 2003). Din acest motiv, sunt necesare instrumentele analitice și metodologiile experimentale pentru a furniza informații cu privire la aceste caracteristici.

4.1.1 Observarea vizuală a emulsiei

Stabilitatea emulsiei afectează aspectul produselor, iar cea mai mare parte a instabilității emulsiei poate fi observată direct de către ochiul uman liber. În acest sens, observarea vizuală este probabil cea mai simplă, mai ieftină și mai rapidă metodă de a evalua separarea gravitațională a emulsiei fără instrumente analitice costisitoare

(Guzey D., 2006). Separarea gravitațională ar putea fi clasificată în două mecanisme: cremarea și sedimentarea (McClements D., 2015; Friberg S., 2003). Cremarea are loc atunci când faza dispersată care are o densitate mai mică decât faza continuă se mișcă în sus și are ca rezultat un strat gros separat. În schimb, sedimentarea are loc dacă faza dispersată are o densitate mai mare decât faza continuă, determinând picăturile să se deplaseze în jos. Gradul de cremare sau sedimentare poate fi evaluat prin observarea grosimii stratului de cremare sau sedimentare cu ochiul liber și apoi prin măsurarea și înregistrarea instrumentală. Cu toate acestea, observarea vizuală nu este adecvată pentru a studia alte fenomene de instabilitate, cum ar fi flocularea, coalescența și maturarea Ostwald. Adesea, stratul de cremare este observat numai atunci când gradul de cremare este considerabil. Astfel, stadiul inițial al stabilității emulsiei necesită de obicei ajutorul altor instrumente analitice pentru a face o observație precisă.

4.1.2 Observarea microscopică a emulsiei

Deoarece observarea vizuală nu este suficient de capabilă să studieze cele mai multe mecanisme de instabilitate, precum și picăturile mai mici de 100 μm (Russ J., 2004), microscopia este utilizată pentru a observa picăturile care nu pot fi văzute cu ochiul liber și pentru a examina factorii care influențează stabilitatea emulsiei. De exemplu, folosind microscopul, s-ar putea observa cu ușurință distribuția și dimensiunile picăturilor, obținându-se astfel informații despre cauza instabilității sistemului de emulsie.

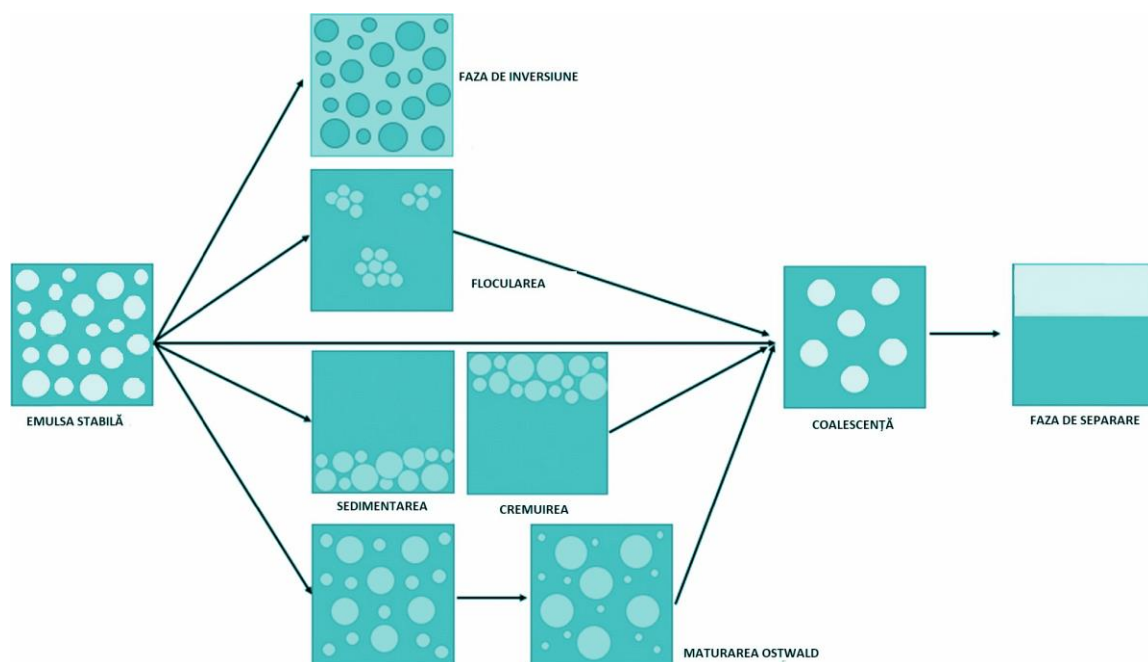


Fig. 4.1. Reprezentarea schematică a mecanismelor de instabilitate în sistemul de emulsie (Hu Y-T., 2017)

Fig. 4.1. Schematic representation of instability mechanisms in the emulsion system (Hu Y-T., 2017)

Emulsia este nefloculată dacă picăturile sunt distribuite omogen în imagine cu o dimensiune relativ mică. Dimpotrivă, o emulsie floculată poate fi identificată atunci când picăturile de dimensiuni egale, se adună aproape una de cealaltă fără a se uni în altele mai mari. Cu toate acestea, emulsia poate trece prin coalescență sau maturare Ostwald dacă sunt prezente în același timp picături mici și mari. Pentru a servi necesitatea unor examinări diferite, au fost dezvoltate diferite tipuri de microscopii, inclusiv optică, electronică, de forță atomică și microscopie fluorescentă confocală, pentru a caracteriza stabilitatea emulsiei. Cu toate acestea, microscopia are mai multe dezavantaje (Aguilera J., 1999): 1) eșantionul pentru observarea microscopiei necesită, de obicei, proceduri de preparare, cum ar fi diluarea și împrăștierea diapozitivelor, care pot modifica structura emulsiilor originale; 2) măsurătorile de microscopie sunt adesea consumatoare de timp; 3) rezultatele sunt subiective și dificil de standardizat între diferitele laboratoare; și 4) de multe ori sunt necesare analize multiple pe diferite regiuni pe un singur diapozitiv de probă pentru date fiabile. În consecință, este optimă combinarea informațiilor din alte surse analitice, cum ar fi dimensiunea particulelor și încărcarea de suprafață, cu observarea microscopiei pentru a realiza mecanismele corecte de instabilitate.

4.1.3. Analiza mărimii particulelor

Conform legii lui Stoke (Hunter R., 2001), mărimea particulelor fazei dispersate influențează stabilitatea unui sistem de emulsie, care este compus din două lichide nemiscibile cu o densitate distinctă. În acest sens, emulsia cu rezistență și control mai mare la cremare nu ar trebui să conțină doar particule cu dimensiuni reduse, ci și distribuite omogen cu un număr relativ mic de variații, adică așa-numita distribuție a dimensiunii particulelor (particle size distribution - PSD)

$$AV_{STOKES} = -2gr^2(\rho_2 - \rho_1)/9\rho_1$$

În ecuație, v_{STOKES} reprezintă viteza de smântânire, r este raza particulei, g este accelerația gravitațională, ρ_1 și ρ_2 reprezintă densitatea celor două faze, și h este vâscozitatea forfecată a sistemului țintă. În conformitate cu legea lui Stoke, stabilitatea emulsiei ar crește odată cu diminuarea dimensiunii picăturilor. Prin urmare, stabilitatea emulsiilor originale și gradul de separare a gravitației după un anumit interval de timp ar putea fi studiate prin determinarea mărimii picăturii și a concentrației acestora în diferite regiuni ale înălțimii probei în condițiile de temperatură și timp specificate. În acest sens, cremarea apare atunci când concentrația picăturilor crește în regiunea superioară a probei, în timp ce sedimentarea are loc atunci când particulele se acumulează în regiunea inferioară.

Există numeroase tehnici de dimensionare a particulelor instrumentale, inclusiv retrodifuzia luminii (împrăștierea luminii statice sau dinamice – DLS – Dynamic Light Scattering), numărarea impulsurilor electrice și spectrometria cu ultrasunete, care sunt utilizate în mod obișnuit (McClements D., 2015). Aceste instrumente au mai multe avantaje: 1) sunt ușor de utilizat; 2) sunt complet automatizate; și 3) furnizează informații substanțiale despre dimensiunea picăturilor într-o perioadă scurtă. Chiar și

așa, factorii utilizați pentru a converti datele experimentale în PSD trebuie să fie aleși cu atenție, deoarece diferite instrumente sunt operate sub principii fizice distincte.

Metoda retrodifuziei luminii măsoară atât concentrația și mărimea picăturilor, prin detectarea procentului cât și a unghiului luminii retroscrise atunci când un fascicul monocromatic de lumină infraroșie apropiată este direcționat prin eșantion (Chu B., 1974).

Metoda statică a retrodifuziei luminii funcționează pe baza teoriei difuziei luminii a lui Mie (Wriedt T., 2012) folosind caracteristici ale particulelor atribuite cu precizie, cum ar fi indicii de refracție, formă și dimensiune, pentru a determina dimensiunea particulei în intervalul de la 100 nm până la 1000 μm (McClements D., 2007). Între timp, tehnica retrodifuziei dinamice a dispersiei luminii (DLS) măsoară fluctuația intensității luminii retrodifuzate la un moment dat, presupunând că particulele mai mici se mișcă mai repede decât cele mai mari și creează o rată mai mare a intensității floculării. Instrumentele de dispersie a luminii dinamice funcționează de obicei folosind un anumit unghi de retrodifuzie (fix sau variabil) și apoi transformă matematic conversia intensității floculării în PSD, care se utilizează pentru a detecta particule de dimensiuni de 3 nm până la 5 μm (McClements D., 2007). Pentru ambele tipuri de instrumente de dispersie a luminii, informațiile privind distribuția mărimii sunt mai precise dacă concentrația particulelor este scăzută, ceea ce ar putea împiedica apariția unor efecte multiple de împrăștiere. Fenomenul de dispersie multiplă este o problemă obișnuită care provoacă o supraestimare a mărimii particulelor și, prin urmare, eșantionul este, de obicei, diluat înainte de a fi supus măsurării dispersiei luminii (Muller R., 1992).

Tehnicile de numărare a impulsurilor electrice măsoară dimensiunea și distribuția picăturilor emulsiei prin detectarea amplitudinii variației conductivității electrice atunci când emulsia trece printr-o mică deschidere în electrod (McClements D., 2001). Deoarece uleiul are o conductivitate electrică mult mai scăzută decât apa, curentul electric scade de fiecare dată când trece o picătură de emulsie. Mărimea picăturii emulsiei ar putea fi calculată pe baza faptului că particulele mai mari se mișcă mai lent și creează impulsuri electrice mai mari. Această metodă este potrivită pentru măsurarea particulelor cu un diametru cuprins între 0,4 μm și 1200 μm (McClements D., 2007).

În plus, eșantioanele utilizate pentru această metodă analitică ar trebui diluate, deoarece măsurarea este puternic afectată dacă este prea concentrată și nu permite trecerea netedă a particulelor singulare în tubul de sticlă. Astfel, această metodă, în particular, este potrivită pentru analiza mărimii particulelor, dar nu pentru studierea floculării sistemului, deoarece diluția va descompune particulele adunate și va duce la interpretarea greșită a stabilității eșantionului.

Spectrometria ultrasonică, spre deosebire de metoda retrodifuziei luminii și tehnicile de numărare a impulsurilor electrice, poate fi utilizată pentru măsurarea probei cu o concentrație mai mare de particule de până la 50% (Babick F., 1998). Spectroscopia ultrasonică este capabilă să determine diametrele particulelor în intervalul de la 10 nm până la 1000 μm la concentrații relativ mari de picături (McClements D., 2007).

4.1.4. Analiza încărcării

Un alt factor important care afectează stabilitatea și comportamentul fizico-chimic al emulsiei este încărcătura electrică de pe suprafața picăturii. Mărimea și semnul încărcăturii pe particula de emulsie dispersată derivă din caracteristica de ionizare a moleculei de emulsifiant absorbant de pe suprafața sa (McClements D., 2015). Mai mult, caracteristica de încărcare este, de cele mai multe ori, sensibilă la pH și la prezența altor specii încărcate în faza apoasă înconjurătoare. Astfel, sarcina de suprafață a picăturii deseori determină natura interacțiunii dintre picături și alte specii încărcate în apropiere. Forțele electrostatice repulsive apar între picăturile cu același semn de sarcină de suprafață, care vor descuraja floclarea particulelor și vor inhiba propagarea majorității căilor de instabilitate a emulsiei (McClements D., 2015; Friberg S., 2003). Dimpotrivă, forțele atractive electrostatice apar atunci când particulele cu încărcături opuse intră în contact și, în funcție de mărimea forței de atracție, fenomenul instabilității picăturilor poate rezulta din mecanisme destabilizatoare diferite. Adică, picăturile tind să se adune aproape una de alta, dar nu se îmbină fizic într-o particulă mai mare atunci când magnitudinea forței atractive este slabă. Cu toate acestea, coalescența apare atunci când forțele atractive sunt puternice, ducând la apariția unei picături mai mari în detrimentul celor mai mici. În consecință, încărcarea particulelor ar putea afecta puternic stabilitatea emulsiei și, astfel, devine deosebit de important pentru anchetatori să studieze proprietățile electrice ale picăturilor conținute într-un sistem de emulsie.

Pentru a servi acest scop, două instrumente analitice disponibile în comerț sunt utilizate pentru a măsura încărcătura electrică și distribuția acesteia pe suprafața picăturilor de emulsie: tehnici microelectroforetice și spectroscopie electroacustică.

Tehnici microelectroforetice măsoară caracteristicile electrochimice ale unei suprafețe de picături bazate pe viteza și direcția picăturii încărcate într-o mișcare a emulsiei atunci când se aplică un câmp electric (Beckett R., 1990).

Spectroscopia electroacustică operează într-un mod similar celor mai multe tehnici ultrasonice, care, de obicei, nu sunt distrugătoare față de proba analizată.

4.1.5. Proprietăți reologice

Conform legii Stoke (Hunter R., 2001), rezistența emulsiei sistem este mai mare când crește vâscozitatea. Astfel, proprietățile de curgere ale emulsiilor, cunoscute și ca comportamente reologice, sunt atributele fizice necesare care afectează în mod semnificativ calitatea acestor produse. Pentru un control mai bun al produselor, multe instrumente analitice, inclusiv dispozitivele de forfecare și de compresie, sunt dezvoltate pentru a monitoriza și caracteriza comportamentul reologic a unui sistem de emulsie (Tadros T., 2004). Pe lângă rolul important al stabilității produselor, caracteristicile reologice sunt de asemenea factori importanți atunci când se evaluează eficiența amestecării, consumul de energie, evaluarea pompelor, etc, oferind astfel soluții unor probleme tehnice întâlnite în timpul procesului de fabricație.

Factorii care ar putea afecta proprietățile reologice ale emulsiile includ vâscozitatea și compoziția chimică (pH, concentrația electrolitului etc.) a fazei continue,

a fracției volumice a fazei dispersate, a caracteristicilor picăturilor (distribuția mărimii, deformabilitatea, vâscozitatea internă, concentrația și interacțiunea particulelor) și elasticitatea filmului emulgator, care depinde de concentrația și tipul de emulgator utilizat (Tadros T, 1994). Proprietățile de curgere ale emulsiilor ar putea fi descrise și specificate la mai multe module. De exemplu, proprietățile vâscoelastice liniare sunt în mod obișnuit caracterizate de module de stocare și de pierdere dependente de frecvență, precum și de module de fluaj în funcție de timp. Vâscozitatea la tăiere, o proprietate neliniară la starea de echilibru, este considerată un efect Weissenberg.

În plus, pot fi investigate și prezise efectele diferiților parametri asupra reologiei emulsiilor pe baza *ecuației microstructurii/vâscozității Krieger-Dougherty*.

Un reometru sau un vâscozimetru este un instrument important pentru măsurarea proprietăților reologice ale emulsiilor. În funcție de concepte și aplicații, reometrele care utilizează forța de deformare prin forfecare pot fi proiectate pentru a studia lichide, solide sau alte eșantioane vâscoelastice care oferă informații despre vâscozitate, stres de randament, modul de elasticitate și comportamentul la fracturare (Doi Y., 1994).

4.2. Aspectul și morfologia emulsiei

Emulsifierea dă produselor alimentare aspectul caracteristic și proprietățile senzoriale care influențează în mod semnificativ percepția consumatorului asupra unor astfel de produse. Deoarece senzația umană este complexă, procesoarele de hrană necesită, de obicei, standarde numerice pentru un control mai bun al calității. În plus, standardele de calitate devin și mai importante atunci când producătorii dezvoltă formularea de produse noi sau adaptează procedurile inovatoare de procesare. Prima impresie a consumatorului față de orice produs alimentar se formează de obicei atunci când cumpărătorul îi vede aspectul exterior. Astfel, o prezentare standardizată este esențială pentru producătorii de alimente pentru a-și putea asigura achiziția repetată de produse alimentare de către clienți. Deoarece calitățile vizuale pot fi influențate cu ușurință de culoarea produsului, transmiterea de lumină, consistența fluxului, prezența și absența separării fazelor și sedimentarea este deosebit de important ca produsul să includă emulsia ca parte a matricei sale. Astfel, în această secțiune, sunt analizate metodele analitice utilizate pentru a studia aspectul, precum și macro- și micromorfologia sistemului de emulsie (Yin-Ting H., 2016).

4.2.1. Aspectul emulsiei

Aspectul emulsiei depinde de interacțiunile sale, cum ar fi împrăștierea, absorbția, reflectarea și transmiterea, cu undele luminoase din regiunea vizibilă a spectrului electromagnetic (Kerker M., 1969). Atunci când un fascicul de lumină iradiază suprafața emulsiei, cea mai mare parte a luminii este transmisă în sistemul de emulsie, o parte din ea fiind împrăștiată prin particule de emulsie și o parte a acesteia fiind absorbită de cromofori fie în faza continuă, fie în faza dispersată (Hutching J., 1999). Cantitatea de lumină care este împrăștiată determină în principal ușurința emulsiei, care poate fi percepută ca turbiditate și opacitate. Prin contrast, fracția și

lungimea de undă a luminii absorbite de sistem determină culoarea emulsiei, cum ar fi albastru, verde, roșu sau galben (Wyszecki G., 1982). Conform aspectelor menționate mai sus, combinația de luminozitate, turbiditate și culoare formează cea mai mare parte din aspectul emulsiei produsului. Astfel sunt prezentate metodele utilizate pentru a evalua turbiditatea, luminozitatea și culoarea emulsiei.

4.2.2. Morfologie

Morfologia/microstructura emulsiei, nu a putut fi observată fără ajutor odată ce aceasta este mai mică de 100 μm (Russ J., 2004; Aguilera J., 1999). Prin urmare, diferite tipuri de microscopie sunt utilizate pentru a observa și pentru a obține informații structurale pe suprafața și interiorul emulsiei. Chiar dacă emulsia simplă este un amestec de două lichide nemiscibile, astfel de sisteme sunt în mod obișnuit modificate pentru a deține diferite caracteristici care servesc funcții specifice, incluzând stabilizarea, încapsularea, protejarea și controlul cineticii de eliberare și creșterea absorbției componentelor alimentare. În acest sens, diferite tipuri de sisteme de emulsie, cum ar fi emulsie nanosizată, emulsie lipidică solidă, emulsie auto-emulsifiantă, emulsie strat-cu-strat, emulsie rezistentă la umflare, emulsie pe gel și emulsie sensibilă la pH.

Studiul structurii emulsiei utilizând tehnici microscopice este folosit în special pentru a obține informații directe și fiabile. Mai mult, observația microscopică poate furniza, de asemenea, informații utile privind distribuția dimensiunii particulelor emulsiei și progresia instabilității. În secțiunea următoare, sunt rezumate și comparate diferite tipuri de tehnici microscopice în ceea ce privește utilizarea lor pentru diferite probe și condiții.

4.2.3. Încapsularea emulsiei

În ultimele decenii, oamenii de știință au depus eforturi uriașe pentru a descoperi ingrediente bioactive care promovează sănătatea din surse naturale. Acești compuși bioactivi sunt în prezent cunoscuți ca și substanțe farmaceutice nutritive standardizate, care includ compuși într-un spectru larg de structuri chimice cum ar fi proteine, peptide, polizaharide, fibre, acizi grași și fenoli (Andlauer W., 2002; Ramaa C., 2006). Eficacitatea substanțelor farmaceutice nutritive standardizate de a promova condiții de sănătate mai bune și de a preveni dezvoltarea bolilor cronice au fost cercetate și publicate în numeroase lucrări. Pentru a obține beneficii asupra sănătății de la substanțele farmaceutice nutritive standardizate este necesară o administrare repetată a acestora și astfel cel mai fezabil mod de a consuma astfel de compuși în populația generală este pe calea orală, deoarece este neinvaziv și convenabil pentru un program de dozare liberală (Ting Y., 2014).

Cu toate acestea, compușii bioactivi izolați din surse naturale adesea nu pot fi adăugați direct în sistemele alimentare din următoarele motive: 1) incompatibilitatea cu matricea produselor alimentare; 2) degradarea rapidă în timpul procesării alimentelor; și 3) vulnerabilitatea la activitatea de digestie în sistemul biologic (Ting Y., 2014).

Astfel, aceste ingrediente bioactive trebuie adesea încapsulate pentru o mai bună protecție și o încorporare mai ușoară în matricea alimentară. De exemplu,

proteinele bioactive s-ar putea degrada rapid în tractul gastro-intestinal (TGI) ca urmare a instabilității lor în mediul acid și vor fi digerate de enzimele proteolitice. Mai mult, compușii hidrofobi, cum ar fi flavonoidele, au o solubilitate apoasă scăzută care determină provocări în ceea ce privește încorporarea lor în alimente, precum și absorbția în tractusul digestiv. Din fericire, multe studii de cercetare au arătat, de asemenea, că absorbția compușilor hidrofobi crește semnificativ biodisponibilitatea lor în sistemul biologic atunci când sunt consumați cu lipide. Iar, emulsiile care conțin lipide în matricea lor se întâlnesc frecvent în multe alimente, devenind un vehicul favorabil pentru încapsulare, în care substanțele farmaceutice nutritive standardizate pot fi protejate, stabilizate și integrate în sistemele de alimentație (Fang Z., 2010).

Pe lângă substanțele farmaceutice nutritive standardizate, compușii aromatici ce pot fi volatili sau ușor oxidați sunt o altă categorie compusă care poate fi încorporată în sistemul de emulsie pentru o conservare mai bună a aromelor în produsele alimentare (Madene A., 2006). Compușii aromatizanți încapsulați, cum ar fi citratul, au demonstrat o stabilitate mai bună și o retenție mai lungă a aromelor lor caracteristice (Yang X., 2011).

Pentru a evalua eficiența unui sistem pe bază de emulsie atunci când se încapsulează compușii bioactivi, parametrii incluzând eficiența încapsulării, stabilitatea la depozitare și profilul de eliberare sunt de interes specific în rândul anchetatorilor. Pentru a determina acești parametri, este necesar să se cuantifice cantitatea de compuși țintă rămași în sistemul de emulsie imediat după procesare, la un moment specific de depozitare și în timpul digestiei. Atunci când se determină eficiența încapsulării, cantitatea de componente bioactive conținute în bariera unitară a unui astfel de sistem este cuantificată relativ la concentrația inițială de intrare. Mai târziu, profilurile de eliberare semnifică cantitatea de componente eliberate de barieră la un moment dat sau de mediu, care poate fi, de asemenea, un alt factor critic atunci când se descrie comportamentul încapsulării în mediul biologic. Ca un exemplu, Choi și alții (Choi M., 2010) au încapsulat uleiul de pește cu β -ciclodextrină folosind o metodă de difuzie a emulsiei în care au definit acești parametri esențiali, incluzând eficiența încărcării, eficiența încapsulării și conținutul de încărcare după cum urmează:

$$\text{Încărcare reală (g)} = \frac{1}{4} \text{ Conținut total (g) - conținut liber (g)}$$

$$\text{Eficiența încapsulării (\%)} = \frac{1}{4} \left[\frac{\text{Încărcare efectivă (g)}}{\text{Total conținut (g)}} \right] \times 100$$

$$\text{Încărcare conținut (\%)} = \frac{1}{4} \left[\frac{\text{Încărcare efectivă (g)}}{\text{Masă totală de sistem (g)}} \right] \times 100$$

Referitor la aceste ecuații, încărcarea mai mare a componentelor țintă din barieră (picături de emulsie) este în mod pozitiv legată de eficiența de încapsulare mai mare. Unul dintre mecanismele interesante este reprezentat de proprietățile cu eliberare la țintă, în care sistemul se va dezintegra într-un anumit moment sau loc și astfel va elibera moleculele într-un timp și într-o locație desemnate (Madene A., 2006). Prin urmare, pentru a evalua succesul unui sistem de emulsie în îndeplinirea funcționalității sale țintă în sistemul alimentar, este foarte important ca investigatorii să cuantifice concentrația compușilor bioactivi în sistem și în mediul înconjurător. Pentru

a evalua compuşii conţinuţi în sistem, mai multe metode comune utilizate în diferite laboratoare sunt rezumate în următoarele secţiuni.

4.3. Concluzii parţiale

Deoarece o mare varietate de produse conţin o emulsie ca parte a matricei lor, a fost rezonabil să se selecteze emulsia ca un vehicul convenabil pentru a încorpora ingrediente funcţionale (substanţe biologic active) care pot oferi rezultate cu calităţi fizico-chimice, senzoriale, nutritive şi de promovare a sănătăţii.

Acestă parte a tezei a evidenţiat caracteristicile comune care ar putea afecta calitatea şi eficacitatea sistemului de emulsie desemnat pentru a-şi îndeplini cerinţa de a servi ca mediu de adăugare a valorii la sistemele alimentare existente pentru acvacultură. Se oferă şi se compară o imagine de ansamblu a tehnicilor şi metodelor utilizate pentru analiza şi studierea acestor caracteristici. Datorită complexităţii sistemului emulsionabil, evaluarea anumitor caracteristici critice necesită de obicei mai multe mijloace analitice pentru a furniza informaţii imparţiale cu privire la astfel de sisteme delicate.

Pentru a obţine o bună înţelegere a diferitelor metode analitice s-au luat decizii pentru a selecta mijloacele cele mai eficiente de obţinere a informaţiilor utile care au contribuit la dezvoltarea unui sistem eficient de emulsie pentru utilizarea în tratamentele unor boli la peşti.

PARTEA II – CERCETĂRI PROPRII
PART II – PERSONAL CONTRIBUTION

CAPITOLUL 5. SCOPUL ȘI OBIECTIVELE CERCETĂRII

CHAPTER 5. RESEARCH PURPOSE AND OBJECTIVES

Scopul tezei propuse a fost acela de a obține noi formulări chimice și anume compuși complecși de incluziune cu β -cilodextrina a unui medicament antiprotozoaric - Diminazenul aceturat. Apoi s-a încercat obținerea unei emulsii duble pentru două principii active folosite frecvent în acvacultură și anume florfenicolul și praziquantelul pentru combaterea coinfecțiilor bacteriene, cu scopul de a fi eliberate controlat în bazinele piscicole.

Cadrul instituțional în care s-au realizat cercetările tezei de doctorat au fost:

Facultatea de Medicină Veterinară – Clinica de Parazitologie și Boli Parazitare din cadrul Universității de Științe Agricole și Medicină Veterinară “Ion Ionescu de la Brad” din Iași

Institutul Național de Cercetare-Dezvoltare pentru Chimie și Petrochimie (ICECHIM) din București.

Facultatea de Inginerie Chimică – Departamentul de Chimie din cadrul Universității Tehnice “Gheorghe Asachi” din Iași.

Stațiunea de Cercetare-Dezvoltare pentru Acvacultură și Ecologie Acvatică – Universitatea “Al. I. Cuza” din Iași

Facultatea de Chimie - Universitatea de Petrol-Gaze din Ploiești.

În mod inductiv rezultatele din această teză au avut ca și scop prevenirea și combaterea unor boli ale peștilor, acesta fiind un subiect de interes și de mare importanță pentru desfășurarea unei bune activități în cadrul fermelor piscicole.

În plus, la nivel global există o preocupare insistentă asupra descoperirii, nu numai de tratamente, dar și alte alternative profilactice ce vizează domeniul acvaculturii (Valladão G., 2015).

Obiectivele și activitățile prin care s-au realizat aceste studii au fost următoarele:

- Determinarea/căutarea unor principii activi care să poată fi complexați
- Stabilirea unor medicamente biologic active pentru crearea de emulsii-duble.
- Caracterizarea compusului nou format complex de incluziune: diminazen- β -cilodextrină în raport de 1:1.
- Activitatea biologică a medicamentelor sintetizate asupra agenților parazitari prin testare *in vitro*.
- Eficacitatea compuşilor conjugați în patologia parazitară a peștilor prin testare *in vivo*.

LUPU Andrei-Cristian

- Studiu privind formarea emulsiei duble cu praziquantel (PQZ) și florfenicol (FFC).
- Analiza statistică.

CAPITOLUL 6. PATOLOGIA IHTIOFAUNEI DIN SISTEMELE DE CREȘTERE INTENSIVE

CHAPTER 6. ICHTHIOFAUNA PATHOLOGY OF INTENSIVE FISH BREEDING SYSTEMS

6.1. Factorii care determină apariția bolilor

Faptul că diferite tipuri de schimbări din mediu sunt stresante și reduc rezistența peștilor la infecții și alte boli a devenit mai bine înțeles în ultimii ani. Experiența din domeniul piscicol și al gestionării incubatoarelor a arătat că o mare varietate de boli bacteriene, parazitare sau de altă natură devin o problemă numai dacă peștii sunt ținuți în condiții de mediu nefavorabile pentru specia respectivă. Astfel de condiții nefavorabile includ supraaglomerarea, fluctuațiile de temperatură, fluctuațiile de salinitate, oxigenul dizolvat inadecvat, concentrațiile mari de gaze dăunătoare precum hidrogenul sulfurat, dioxidul de carbon și amoniacul, manipularea excesivă sau abuzivă, nivelele subletale ale materialelor toxice etc. Exemple de boli mediate de stres la peștii de apă caldă și rece (Kumar și col., 1996) sunt: septicemia hemoragică bacteriană (*Aeromonas hydrophila*) Ihtioftirioza (*Ichthyophthirius multifiliis*), Ichthyobodoza (*Ichthyobodo necatrix*) etc. Peștii din acvacultura de mare intensitate sunt afectați în permanență de fluctuațiile de mediu. Practicile managementului neștiințific, împreună cu frica peștilor rezultată, pot avea un impact deosebit asupra mecanismului homeostatic limitat al majorității peștilor. Stresul care depășește capacitatea peștilor de a se adapta devine letal. În cazul în care stresul este mai puțin sever, acesta poate predispune peștii la boli fiziologice sau infecțioase dacă există prezența agenților patogeni (Wedemeyer, 1970). Boala bacteriană a branhiilor (*Myxobacteria*), septicemia hemoragică (*Aeromonas* și *Pseudomonas spp.*) și furunculoza (*Aeromonas salmonicida*) sunt boli infecțioase ale peștilor de cultură cunoscute ca fiind rezultatele schimbărilor negative ale factorilor de mediu (Raman R. P., 2013).

Temperatura apei

Sănătatea peștilor sau a unei anumite specii cu densitate mare în acvacultură este influențată în mare măsură de capacitatea sa de a se adapta la variațiile de temperatură ale apei ambiante. Fiecare specie este caracterizată de o variație a temperaturii în care aceștia prosperă.

Schimbările treptate ale temperaturii apei cauzează rareori probleme asupra sănătății peștilor, totuși, schimbările bruște pot provoca un stres sever. Un astfel de stres indus de temperatură poate să fie suficient de mare pentru a reduce rezistența peștilor la unele boli și crește sensibilitatea acestora la infecții și infestații. Peștii

infecțați subclinic sunt mult mai sensibili la schimbările de temperatură decât peștii sănătoși și mortalitatea apărută este datorată infecțiilor cu *Aeromonas hydrophila* (Haley și colab., 1967). Allanson și colab., (1971) au demonstrat că peștii tilapia (*Tilapia mossambica*) devin dezorientați când temperatura scade încet de la 25°C la 11°C și devin comatoși după 5 zile la această temperatură. Ei au concluzionat că moartea apare din cauza colapsului osmoregulator și insuficienței renale (Raman R. P., 2013).

pH-ul

Valoarea scăzută a pH-ului mărește susceptibilitatea peștilor la diverse boli. Neess (1949) a raportat că la valoarea pH-ului de sub 5,5, crapul dezvoltă hipersensibilitate la bacteriile acvatice. În apa acidă, *Catostomus commersoni* a prezentat o dificultate în ceea ce privește hrănirea și o pierdere în greutate (Beamish, 1972). Scăderea pH-ului reduce fecunditatea și fertilitatea ouălor la pești (Mount 1973, Ruby și col., 1977, Menendez, 1976). Schaperclaus (1956) a raportat că dacă valoarea pH-ului apei iazului scade la 4,8-5 pentru un anumit timp, crapul este supus infecțiilor microbiene sau infestațiilor parazitare. Peștii în apă acidă secretă mai mult mucus și astfel, devin mai hipersensibili la infecțiile microbiene și uneori prezintă decolorarea branhiilor. Viabilitatea peștelui este în mare măsură dependentă de pH. Experimentele pe ouăle de biban și de babușcă au arătat că puietul la babușcă a murit la pH 4.7, iar la biban la același pH, a avut un succes de incubație de numai 28%. La pH de 5.7, 50% din bibani au supraviețuit stadiului inițial de puiet. Pe de altă parte, numai 14% din peștii de babușcă au rămas în viață (Milbrink și Johansson, 1975). Creșterea pH-ului peste intervalul optim determină la pești un stres asemănător cu cel provocat de apele acide. Apele foarte alcaline corodează branhiile și aripioarele peștelui. Ouăle de păstrăvi sunt distruse atunci când valorile pH-ului depășesc 10. Ouăle sunt umflate și conținutul are o culoare albicioasă. Racii mor la valori ale pH-ului de aproximativ 10.2 (Bandt, 1946). La pH 11, corneea multor pești devine opacă, mulți dintre supraviețuitori devin orbi la unul sau la ambii ochi (Seymour și Donaldson, 1953).

Deficitul de oxygen

Bazinele de cultură sunt deseori periculoase din cauza oxigenului deoarece capacitatea lor de a menține oxigenul dizolvat este mică. În timp ce un litru de aer conține 210 cm³ de O₂ și 790 cm³ de N₂ (inclusiv cantități mici de gaze rare), conținutul de oxigen al apei reprezintă un procent mic al conținutului atmosferic și un litru de apă la 20°C conține numai 6,3cm³ de oxigen (=8,9 mg de O₂). Coeficientul de absorbție pentru oxigen la 20°C este de aproximativ 1/32 și este dependent de temperatură. Coeficientul de absorbție scade odată cu creșterea temperaturii, astfel încât valoarea oxigenului în aceste condiții scade și invers. Dacă oxigenul este consumat, acesta poate fi absorbit relativ încet din atmosferă de către suprafața calmă a apei și difuzat în straturile adânci ale apei.

Cerința de oxigen a diferitelor specii de pești este destul de variabilă și depinde de mai mulți factori cum ar fi greutatea peștilor, temperatura apei, consumul de hrană și activitatea. Atunci când există deficiență de oxigen, mecanismul de apărare al peștilor nu mai este menținut la un nivel optim, crescând riscul unei posibile infestații

parazitare, în special cu endoparaziți, deoarece aceștia se găsesc cel mai adesea în cavitatea corporală și în țesuturi și, prin urmare, sunt adaptați la un mediu cu oxigen redus. În cazul deficienței de oxigen, numărul de eritrocite crește la început și scade după aceea. Conținutul de proteine din plasmă scade și, împreună cu acesta, capacitatea de a forma anticorpi (Reichenbach-Klinke, 1975). Lloyd (1961) a raportat că o concentrație scăzută de oxigen în mediul înconjurător poate spori efectele stresante ale altor substanțe toxice sau poate crește probabilitatea bolii. Regăsirea ouălor și dezvoltarea lor ulterioară sunt în special amenințate de deficitul de oxigen. Furnizarea inadecvată de oxigen împiedică ovulația și, în ultima etapă, duce la deces de embrioni. Dacă concentrația de oxigen în apă este scăzută chiar și după ecloziune, puietul are o creștere redusă. Einsele (1956) a raportat că puietul de *Salmo gairdneri* este afectat la 5 mg/l de oxigen, riscul de asfixiere apare la 3 mg/l și mortalitatea are loc la 2 mg/l. Deși mulți pești pot supraviețui fizic la niveluri scăzute de oxigen, cel puțin pentru perioade limitate, aproape orice reducere sub saturația aerului va cauza unele efecte adverse asupra creșterii, reproducerii, activității sau altor funcții fiziologice. Deși probabil nu există nicio limită superioară a concentrației de oxigen dizolvat, care să se aplice tuturor peștilor sau situațiilor culturale ale peștilor, există un acord general cu privire la limita inferioară: 4 ppm pentru speciile de apă caldă și 5 ppm pentru salmonide, sub care condițiile sunt considerate nefavorabile pentru sănătate.

Toxicitatea la nitriți

Nitriții sunt omniprezenți în apă. Nitriții apar prin denitrificarea nitraților sau prin nitrificarea amoniului. Wedemeyer și Yasutake (1978) au arătat că toxicitatea nitriților este determinată de acidul azotic (HNO_2) ca o consecință a constantei de disociere în funcție de pH, temperatură și duritatea apei.

La pești, toxicitatea HNO_2 conduce la methemoglobinemie, care cu un conținut de methemoglobină de 5% din conținutul de hemoglobină duce la deficit fiziologic de oxigen. Deteriorările rezultate din HNO_2 pot produce o culoare violetă în branhiile, hipertrofia epiteliului branhial, alcaloza metabolică și dispnee. Concentrația HNO_2 cea mai mare permisă pentru păstrăv este 0,002 mg/l, iar pentru crap 0,004 mg/l (Schreckenabh și Spangenberg, 1983).

Caracteristicile dioxidului de carbon

Dioxidul de carbon este un component natural al aerului și este de 28 de ori mai solubil în apă decât oxigenul (Spotte, 1979). Apare în apă, în principal, ca produs de descompunere organică. Dioxidul de carbon poate fi găsit în trei forme strâns legate în apă: CO_2 (dioxid liber de carbon), HCO_3^- (bicarbonat ion) și CO_3^{2-} (carbonat ion), concentrația fiecăruia depinzând de pH.

Când CO_2 se dizolvă în apă, se formează H_2CO_3 , care apoi disociază în HCO_3^- dacă apa este alcalină. Apare opusul și majoritatea bicarbonatului este transformat în H_2CO_3 în apă acidă. H_2CO_3 este instabil termodinamic și se descompune în CO_2 și apă.

Dioxidul de carbon poate acționa ca un factor limitator, de exemplu, în timpul transportului peștilor sau în menținerea peștilor în sisteme închise cu apă reciclată și și în alte sisteme de acvacultură, unde concentrația de CO₂ poate fi uneori foarte ridicată. La peștele activ, pe măsură ce concentrația de CO₂ crește, rata metabolică scade, adică, consumul de oxigen scade. Deoarece CO₂ scade afinitatea sângelui pentru oxigen și reduce capacitatea de transport, un conținut crescut de CO₂ în apă ridică pragul de asfixiere al peștilor.

Cantitatea dorită de CO₂ liber pentru creșterea optimă a peștilor și a practicilor de cultură variază între 1,5 până la 3,0 mg/l. Efectele dăunătoare ale CO₂ asupra peștilor de apă dulce apar când acesta depășește concentrațiile de aproximativ 3,0 ppm și anestezia are loc la aproximativ 10 ppm (CIFE, 1997). Schaperclaus (1991) a raportat că păstrăvii curcubeu care sunt crescuți în incubatoare cu conținut ridicat de CO₂ în apă de multe ori suferă de nefrocalcinoză. Pe de altă parte, conținutul de CO₂ prea scăzut în apă poate fi, de asemenea, fatal pentru puietul de crap. Dacă această cantitate de CO₂ liberă în apă este mai mică de 1 mg/l, aceasta duce la sindromul de hiperventilare la alevinii crapului. Consecința este reprezentată de o destabilizare a echilibrului acido-bazic și pe durata întreținerii acestora se instalează o alcaloză respiratorie sau după prima ingestie de alimente bogate în proteine există posibilitatea instalării unei acidoze metabolice excesive (Schaperclaus, 1991). Cu toate acestea, CO₂ dizolvat poate fi, de asemenea, util în cultura iazului, deoarece scade concentrația de amoniac datorită scăderii pH-ului.

Stresul

Stresul este un factor psiho-somatic major în izbucnirea bolilor peștilor. Au fost aduse contribuții substanțiale pentru a analiza stresul din mediu și impactul acestuia asupra sănătății peștilor; totuși, majoritatea acestor contribuții sunt rezultatele câtorva aspecte ale stresului și ale factorilor aferenți (Raman R. P., 2013).

Peștii sunt animale poikilotermice. Existența și performanța lor sunt dominate de calitatea mediului înconjurător. În timp ce lacurile și mările beneficiază de condiții relativ uniforme, în locurile cu apă mai puțină, cum ar fi iazurile, bazine de ciment, incubatoare, acvarii etc. în care sunt crescuți peștii, condițiile sunt variabile. Fermierul efectuează multe proceduri cum ar fi calcararea, conservarea, plasarea, sortarea, transportul, stocarea, hrănirea, prelevarea probelor, tratarea, transferul din apă dulce spre apă sărată sau invers, care poate provoca foarte mult stres. Pe măsură ce intensitatea culturii este din ce în ce mai mare pentru a obține o producție ridicată de pește, densitatea stocării, fertilizarea și rațiile furajere, precum și alte proceduri asociate creșterii cresc, ducând la creșterea stresului asupra peștilor și deteriorarea calității apei care determină o izbucnire a bolilor (Raman R. P., 2013).

Densitatea mare

Suprapopularea înseamnă stocarea unui număr mare de pești într-un spațiu limitat care depășește capacitatea de susținere a unei cantități de apă. Suprapopularea a fost recunoscută ca fiind unul dintre cei mai importanți factori predispozanți de stres pentru apariția diferitelor focare de boală. Numărul de pești care se poate crește cu

succes într-un anumit volum de apă depinde de zona iazului, nivelul oxigenului dizolvat, rata metabolică și alimentația peștilor, încărcătura patogenă și frecvența schimbului de apă. Această supraaglomerare crează un stres major printre speciile de pești concurenți pentru alimente, spațiu și oxigen dizolvat (Raman R. P., 2013).

Capacitatea lacului/bazinului se bazează pe necesarul de oxigen, care este direct proporțional cu temperatura apei și mărimea peștilor. Aglomerarea facilitează foarte mult transmiterea pe orizontală a bolilor contagioase ale peștilor. Densitatea mare a populației poate duce, de asemenea, la apariția unor boli în mod indirect. Creșterea la cote de înaltă densitate a peștilor poate duce la supraaglomerarea surselor naturale de vitamine și substanțe nutritive esențiale în cuști/bazine. Sindromul “bola spatelui rupt”, care apare la diferitele specii de pești de crescătorie, reflectă o deficiență în disponibilitatea sursei naturale de vitamina C (Lovell, 1973). Cu excepția cazului când hrana se suplimentează cu vitamina C, peștii din cuști/bazine pot dezvolta fracturi la coloana vertebrală. Când peștilor le este permis să circule liber în apă, ei găsesc surse ample de vitamine pentru a-și satisface nevoile. Reducerea densității populațiilor îmbunătățește condițiile de mediu pentru pești și face ca transmiterea paraziților între pești să fie mai puțin probabilă (Raman R. P., 2013).

Patologie cu difuzie în populații aglomerate tehnologic

Similar cu alte animale, peștii pot suferi de diferite boli. Aproape toți peștii sunt purtători de agenți patogeni și paraziți. Aceștia sunt principalii agenți care produc mortalitate la pești, mai ales la peștii juvenili. Patologia peștilor cuprinde: infecții virale, infecții bacteriene, infecții fungice, infestări cu protozoare, trematode, infecții cu mușchi etc. Peștii sunt, de asemenea, expuși la diferiți poluanți de mediu, inclusiv medicamente și substanțe chimice. Cele mai comune boli ale peștilor, în special în iazurile de apă dulce, sunt: columnaris, boala bacteriană a branhiilor, dropsy, putregaiul cozii, infestări fungice, constipație, anorexie, chilodonela, ergasilus, tuberculoză, glugea, henneguya, hexamita, girodactiloza și boala neon-tetra etc (Raman R. P., 2013). Antibioticele și antiparazitarele sunt frecvent utilizate pentru a controla bolile peștilor cauzate de bacterii și paraziți, dar există un risc crescut de a dezvolta tulpini de bacterii rezistente la antibiotic, precum și riscuri de reziduuri de antiparazitare.

Funcțiile imunitare nespecifice, cum ar fi: activitatea bacteriolitică și funcția leucocitelor peștilor, au fost îmbunătățite de către unele plante medicinale. Plantele au fost folosite ca medicamente tradiționale pentru controlul bolilor bacteriene, virale, fungice și a altor boli.

Alimentația

Absența unui ingredient natural esențial într-un iaz poate fi o condiție de mediu care provoacă o boală nutrițională. În creșterea somnului s-a presupus mult timp că, dacă peștii sunt ținuti în iazurile de pământ și li se va furniza doar diete comerciale incomplete, aceștia și-ar putea găsi suficiente alimente pentru a-și satisface toate cerințele. Acest lucru s-a dovedit a fi eronat; multe deficiențe nutriționale au devenit

evidente, în special în viviere. Deficiențele nutritive au fost recent analizate de Lovell (1975), Snieszko (1972) și Ashley (1972).

Dintre bolile nutriționale, disvitaminozele sunt probabil cele mai cunoscute deoarece unele semne ale bolii sunt spectaculoase. La pești, ca și la alte animale, deficiențele de vitamine cresc adesea susceptibilitatea la boli infecțioase (în special la *Aeromonas hydrophila*) și infestații ectoparazitare. Somonii anemici au fost mai vulnerabili la ihtioftirioză decât cei ai căror anemie a fost vindecată cu vitaminele A și B suplimentare (Malikova et al., 1961).

Lovell (1975), arată reacțiile pe care le-a manifestat somnul în disvitaminoze. Carcinogenii din produsele alimentare pot duce la neoplazii. Epizootiile recente ale hepatoamelor induse de aflatoxină, o micotoxină din contaminarea cu *Aspergillus flavus*, au oferit o oportunitate excelentă de studiu (Ashley, 1969).

6.2. Protozoare și trematode monogene care afectează grav creșterea intensivă a peștilor

Peștii pot suferi de diverse tipuri de boli provocate de protozoare, trematode monogene, etc (peste 200 de boli). Unele dintre aceste boli au fost discutate în această teză.

Un studiu realizat de noi s-a bazat pe diagnosticul de laborator al bolilor parazitare ale ciprinidelor (*Cyprinus carpio*) dintr-un sistem de creștere a policulturii din județul Iași, pe o perioadă de șase luni. Acest studiu este o interpretare a coinfecțiilor parazitare, înregistrate în iarnă și primăvară (din decembrie 2014 până în mai 2015) în bazine de pământ cu ciprinide, dintr-un sistem de policultură semiintensivă. Am colectat un total de 55 crapi, care au fost transportați în laborator și aclimatizați în rezervoare de sticlă cu apă cu o capacitate de 120 l (maxim 15 pești), pentru a detecta stadiile paraziților care rezistă pe timpul iernii. Parametrii de calitate a apei au fost monitorizați cu Aquanal-Fishwater Lab de la Sigma-Aldrich. Peștii au fost examinați zilnic pentru a putea fi observate semnele clinice. Diagnosticul parazitologic a fost efectuat prin examinarea microscopică a branhiilor și a raclatului dermic, de la peștii morți. Investigațiile noastre au condus la identificarea unui protozoar - *Ichthyophthirius multifiliis*, două trematode monogene - *Gyrodactylus spp.*, *Dactylogyrus spp.* și un copepod *Lerne cyprinacea*, cu intensitate diferită în funcție de temperatura apei. *Lerne cyprinacea* a fost găsită în timpul iernii imediat după recoltarea peștilor (ianuarie și februarie) cu o intensivitate medie de 13 paraziți/pește. S-a identificat o infestație parazitară cu *Gyrodactylus spp.*, *Dactylogyrus spp.* și *Lerne cyprinacea*, care indică starea igienică necorespunzătoare a apei.

Evoluția patologică a peștilor (boli bacteriene, virale sau parazitare) poate provoca scăderea calității peștelui, dezvoltarea lentă și mortalitate ridicată. Pierderile economice rezultate din evoluția bolii pot atinge chiar și 100% atunci când acestea nu sunt identificate la timp și nu se aplică măsurile corespunzătoare (FAO, 2012). Evenimentele patologice pot avea efecte catastrofale în acvacultură. De exemplu, un episod de *Ichthyophthirius multifiliis* care afectează peștii juvenili poate produce o rată a mortalității între 75% și 100% în maxim două săptămâni dacă temperatura apei

favorizează dezvoltarea parazitului. Odată ce boala este instalată, combaterea și reducerea pierderilor este aproape imposibilă (Noga, 2010). Virusurile și bacteriile sunt răspândite prin fecale, fluidele biologice, echipament, recipiente și unelte, dar pot fi transferate și prin păsările piscivore sau paraziți hematofagi. Contaminarea are loc pe cale orizontală: prin apă, peștii infestați adulți sau/și sedimentele, obiecte. În contaminarea verticală, ouăle peștilor sunt contaminate cu bacterii sau virusuri (Savu, 2011). Pentru paraziți, elementele infestante sunt mobile, înoată în apă liberi și sunt purtate de aceasta. Acest studiu este o interpretare a coinfecțiilor parazitare, înregistrate din iarnă până în primăvară, la crapul comun, dintr-un sistem de policultură semiintensivă. Aclimatizarea a fost făcută pentru a detecta etapele parazitare care rezistă în timpul iernii. Evoluția bolii parazitare la pești depinde de temperatura apei și prin creșterea acestui parametru evaluăm prezența formei de rezistență parazitare. Bolile parazitare restricționează dezvoltarea industriei acvaculturii cauzând pierderi importante pentru agricultori (Bondad-Reantoso și colab., 2005).

Material și metodă. Această cercetare a fost efectuată începând cu luna noiembrie 2014-până în mai 2015, pe ciprinide de la o fermă de pește de tip policultură din județul Iași. Materialul biologic utilizat a fost reprezentat de crapul juvenil (*Cyprinus carpio*) cu greutate medie de 92 g (între 64g și 120g). Colectarea peștilor s-a efectuat lunar, în funcție de starea de sănătate a acestora, ajungându-se la un total de 55 de pești, ce reprezintă 11% din numărul total de pești examinați clinic. După colectare, s-au efectuat raclate dermice, iar peștii au fost transferați în laborator și aclimatizați în acvarii de sticlă (120 l) cu apă declorinată 70% și de 30% apă din bazinul de creștere. Hrănirea a fost făcută zilnic, cu hrană pe bază de pește ("Crap 250" de la Evialis) conform recomandărilor producătorului (1% din greutatea corporală). Examinarea clinică a peștilor a fost efectuată când s-a realizat recoltarea și apoi zilnic pentru cei aclimatizați. Ciprinidele cu semne clinice de boală au fost supuse unui diagnostic parazitologic care a fost efectuat prin examinarea microscopică a branhiilor și raclatului pielii. Monitorizarea parametrilor fizico-chimici ai apei a fost efectuată la fiecare 2-3 zile, utilizând kitul Aquanal-Fishwater Lab de la Sigma-Aldrich și, când a fost necesar, ajustarea s-a făcut prin înlocuirea apei într-un volum total de 70%. Gradul de infestare parazitare a fost măsurat ca numărul de paraziți pe pește examinat. Speciile parazite au fost identificate pe baza caracteristicilor morfologice (Jones și col., 2005; Noga 2010).

Rezultate și discuții. După examinarea clinică a peștilor din bazinul de creștere, nu s-au observat semnale semnificative. Inițial s-au observat semne respiratorii după 14 zile de aclimatizare și au constatat în: agitație și dispnee caracterizată prin mișcări respiratorii excesive, aerofagie. După noi investigații microscopice au fost diagnosticate următoarele boli parazitare: una protozoară-ichtiofitirioza (*Ichthyophthirius multifiliis*)(fig. 6.1.), două trematodoze - dactilogiroza (*Dactylogyrus spp.*)(fig. 6.3.) și girodactiloza (*Gyrodactylus spp.*)(fig.6.4.), și lerneoză - o infestație cu copepodul *Lerneia cyprinacea* - (fig. 6.5.).

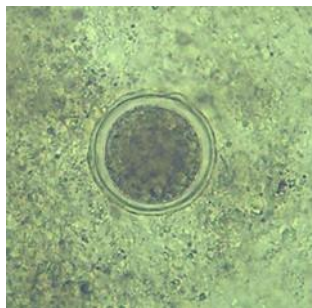


Fig. 6.1. *Ichthyophthirius multifiliis* –tomont din mucus (x20)

Fig. 6.1. *Ichthyophthirius multifiliis* – tomont from the mucus (x20)

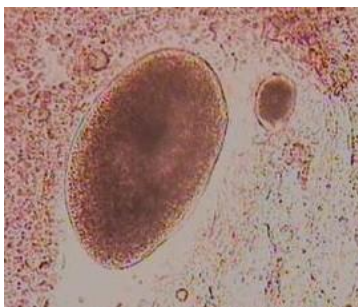


Fig. 6.2. *Ichthyophthirius multifiliis* – trofont din raclat branhial(x40)

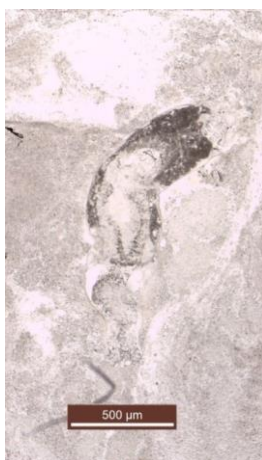
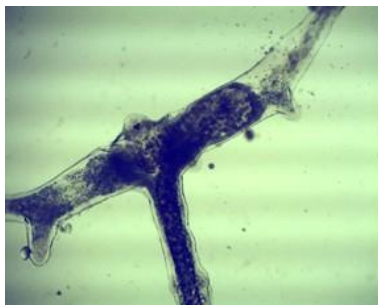
Fig. 6.2. *Ichthyophthirius multifiliis* – trophont from the branchial scrape(x40)

Dintre cele patru specii de paraziți, cea mai mare intensivitate a fost observată în cazul protozoarului ciliat *Ichthyophthirius multifiliis*. Dacă în decembrie s-au identificat 20 de trofonti/pește, în lunile de primăvară intensivitatea crește, ajungând la un număr 10 ori mai mare (120 trofonti/pește) în mai 2015.



Fig. 6.3. *Dactylogyrus* spp: cu prezența petelor oculare (x20)

Fig. 6.3. *Dactylogyrus* spp: with presence of ocular spots (x20)

Fig. 6.4. *Gyrodactylus* spp: cu prezența cârligelor embrionare(x20)Fig. 6.4. *Gyrodactylus* spp: presence of embrionar hooks(x20)Fig. 6.5. *Lernea cyprinacea* – partea anterioară (cefalotorace) (x40)Fig. 6.5. *Lernea cyprinacea* – anterior part (cefalotorax) (x40)

După examinarea parazitologică a peștilor, s-a demonstrat prezența coinfecției parazitare omoloage, caracterizată prin dezvoltarea simultană a patru entități parazitare: *Ichthyophthirius multifiliis*, *Gyrodactylus* spp., *Dactylogyrus* spp. și *Lernea cyprinacea* (fig.6.5.). Prezența celor două trematode monogene nu este surprinzătoare și apare adesea în fermele de policultură, având în vedere că 95% dintre acestea sunt specii ectoparazite (Euzet și Combez, 1998). Acest lucru este, de asemenea, confirmat de noi datorită faptului că 90% din peștii examinați au fost infestați cu aceste două specii. Putem să includem în fenomenul de co-infecție, în timpul iernii, identificarea protozoarului *Ichthyophthirius multifiliis*, chiar dacă s-a făcut după o perioadă de aclimatizare când temperatura apei a crescut de la 6°C la 23°C.

Ichthyophthirius multifiliis este cunoscut ca un protozoar cu un grad ridicat de patogenitate, care poate determina o mortalitate de până la 100% a stocului de pește, astfel încât identificarea tomonților (adulti) și a trofontilor (elemente invazive) în frotiurile din raclatele dermice este suficientă pentru diagnosticarea bolii și pentru instituirea unui tratament rapid, înainte de apariția mortalității ridicate. Peștii mici (puietul) sunt cei mai sensibili la boală, la care moartea are loc în 2-3 zile în caz de infestație cu 50-100 tomite (Noga, 2010). Capacitatea de a se adapta variațiilor

termice, pH-ului apei, salinității și speciilor este foarte crescută, acesta fiind motivul pentru care este dificil de controlat și eradicat, în fermele de policultură. Protozoarul ciliat *Ichthyophthirius multifiliis* se dezvoltă la un interval termic cuprins între 3°C și 27°C, iar ciclul de viață se scurtează odată cu creșterea temperaturii apei. Acest lucru este observat în cercetarea noastră prin creșterea de 10 ori a numărului de paraziți/pește observat în luna mai. Această creștere este urmată de scurtarea perioadei de incubatie la 5 zile, la peștii care au fost aclimatizați la 23°C. Dacă în timpul iernii a fost posibilă identificarea stadiilor *Ichthyophthirius multifiliis* (trofont și tomont) după 14 zile de aclimatizare, în primăvara (martie-mai), acest parazit a fost descoperit în raclatele dermice care au fost efectuate imediat după recoltarea peștilor. Identificarea, în timpul iernii, a cilatului *Ichthyophthirius multifiliis*, la peștii aclimatizați, confirmă prezența "tomonților"- care sunt stadiile de rezistență în apă.

Dactilogiroza și girodactiloza au fost identificate pe toată perioada de cercetare, atât în raclatele dermice, cât și în branhice efectuate imediat după colectarea peștilor și în cele efectuate după aclimatizare. Aceste trematodoze au fost identificate la cea mai înaltă intensitate în primăvară și s-a înregistrat în martie 2015 un număr de 32 de paraziți/pește pentru *Dactylogyrus spp.* și în aprilie 28 de paraziți/pește pentru *Gyrodactylus spp.* Este bine cunoscut faptul că temperatura este un factor-cheie pentru dezvoltarea trematodelor monogene (Hirazawa și col., 2010), ceea ce a fost confirmat în probele noastre. Identificarea copepodului *Lerne cyprinacea* a fost efectuată în timpul iernii în timpul examenului necropsic după colectarea peștilor. Intensivitatea maximă a infestării a fost observată în ianuarie și a fost de 13 paraziți/pește, cu tendința de scădere cu creșterea temperaturii apei. Prin urmare, în luna martie intensivitatea infestării a scăzut la 3 paraziți/pește. În lunile următoare acest parazit nu a putut fi identificat, chiar și în condiții de laborator.

A mai fost realizat un studiu de caz care descrie un episod de ihtioftirioză la păstrăvul fântânel (*Salvelinus fontinalis*) care provine de la o fermă piscicolă din județul Neamț. Diagnosticul a fost efectuat pe baza unor semne clinice, examinarea microscopică (x40) a raclatului pielii și a branhiilor și pregătirea unui frotiu prin metoda "squash" (presarea între două lame) din branhiile. Folosind microscopia optică, paraziții au fost identificați la 100% din păstrăvii examinați, cu o intensivitate de 13 trofonti/pește. Apariția acestei boli a fost o surpriză pentru noi, deoarece apa care alimentează rezervorul provine dintr-o sursă subterană și este considerată liberă de entități parazitare. Informațiile anamnezice arată că sursa elementelor invazive (tomitele de *Ichthyophthirius multifiliis*) a fost reprezentată de trei pești din familia ciprinidelor (*Alburnus alburnus*) introduși ca hrană vie pentru păstrăvi.

Ihtioftirioza, denumită "boala petelor de griș" sau "boala petelor albe", este o boală protozoară provocată de un ciliat – "*Ichthyophthirius multifiliis*". Această boală este extrem de contagioasă, se răspândește rapid, cu evoluție fulgerătoare, în special în bazinele supraaglomerate. *Ichthyophthirius multifiliis* este cel mai cunoscut protozoar găsit pe pește, nu are specificitate de gazdă, dar nu poate supraviețui fără aceasta, fiind capabil să infesteze peștii marini sau de apă dulce; dacă boala nu este tratată, poate provoca o mortalitate de 100%. În mod obișnuit, *I. multifiliis* este transmis

în iaz prin intermediul unor plase de pescuit nesterile, pești purtători sau prin sursa de apă reprezentată de un râu sau un curs natural. Adulții au o mărime de 0,5 până la 1,5 mm, sunt ciliate uniforme, au 2-4 micro-nuclee și un macro-nucleu în formă de potcoavă care poate fi observat la paraziții în stadiul de dezvoltare mai avansată. Aceștia părăsesc peștii infestați, trec la stadiul de tomont care cade pe fundul bazinului și se transformă în chist cu pereți subțiri. În interiorul chistului, după multe diviziuni rezultă peste 2.000 de tomite mici, acestea fiind elementele invazive ale parazitului. Atunci când tomitele sunt eliberate, se alungesc, devin trofonti, înoată către o gazdă și pătrund în epiteliu folosind un înot puternic și o glandă penetrantă producătoare de hialuronidaze. După penetrare, aceștia se hrănesc cu țesut epitelial în timp ce sunt protejați de mucusul peștilor împotriva vreunui tratament chimic. Răspunsul imun primar împotriva lui *Ichthyophthirius multifiliis* este de a crește producția de mucus și este dat de imunoglobulina T (IgT). După imunizarea intraperitoneală, cercetătorii au observat un răspuns imun crescut prin hiper-productivitatea mucusului (von Gersdorff Jørgensen, 2008). Este cunoscută acțiunea anticorpilor în declanșarea factorului complement, dar nu se cunoaște acțiunea complementului împotriva ihtioftiriozei (Alishahi și Buchmann 2006). Deoarece numai etapele de la teront și de la tomont sunt sensibile la tratamentele prin îmbăieri, este important să cunoaștem ciclul de viață al lui *Ichthyophthirius multifiliis*, astfel încât să îl putem întrerupe. Ciclul de viață al acestui ciliat este condiționat de temperatura apei: la 5°C este nevoie de 20 de zile pentru a fi încheiat și numai 3-4 zile la 20°C. De asemenea, poate rezista la pH între 6-10 și la concentrația de oxigen dizolvat de 0,6-0,8 mg/l (Olsen et al., 2011). Această caracteristică face ca protozoza să fie foarte dificil de tratat.

Material și metodă. Acesta este un studiu de caz de ihtioftirioză la păstrăvul fântânel dintr-o fermă mică de pești din județul Neamț. Ihtioftirioza a apărut în vară (august 2015) la păstrăvul fântânel (*Salvelinus fontinalis*) de 24 de luni. Peștii au fost introduși cu 3 luni înainte apariția primului semn clinic al bolii. Alimentarea a fost făcută cu furaje granulate, după recomandările producătorului și furaje vii. Păstrăvul fântânel se păstrează în bazine de beton cu o capacitate de 500 de pești/rezervor, dar cu o populație de numai 100 de pești/rezervor. Apa este furnizată dintr-o sursă subterană printr-o pompă electrică care asigură un debit de 13 l/minut. De asemenea, sterilizările UV ale apei sunt aplicate printr-un sistem care recirculă apa de la nivelul mediu al tancurilor. Aerarea se obține prin pomparea aerului atmosferic în rezervoare, iar temperatura este menținută cât mai redusă posibil prin recircularea apei.

Diagnosticul a fost efectuat în fermă, pe baza semnelor clinice. Confirmarea a fost făcută prin examinarea microscopică a raclatului pielii și a branhiilor și pregătirea unui frotiu din branhiile prin metoda "squash". Monitorizarea parametrilor fizico-chimici ai apei a fost efectuată cu kitul Aquanal-Fishwater Lab de la Sigma-Aldrich și prin utilizarea metodei standard acreditate pentru examinarea cantitativă. Toate examenele para-clinice au fost efectuate la Laboratorul Național Sanitar Veterinar și de Siguranță Alimentară Iași.

Rezultate și discuții. Observarea clinică a păstrăvului a condus la identificarea semnelor clasice: prezența tulburării respiratorii caracterizate prin mișcarea extremă a operculului, aerofagia, înotul la suprafața apei și izolarea peștilor bolnavi. Examenul anatomo-patologic, a relevat leziuni cum ar fi: prezența petelor albe cu localizare dermică, hipersecreție de mucus și necroză branhiilor (fig.6.6). Mortalitatea înregistrată după 6-7 zile de evoluție clinică a fost de 40%.



Fig. 6.6. Hipersecreția de mucus cu localizare dermică
Fig. 6.6. Mucus hyper-secretion with dermal localization

Diagnosticul etiologic a fost stabilit prin microscopie optică unde s-au observat stadiile de dezvoltare ale paraziților: trofont (fig.6.7.), tomite și tomonți. Paraziții au fost identificați la 100% din peștii examinați, cu o intensivitate de 13 trofonți/pește. Această valoare mică se datorează faptului că examinarea paraclinică a fost făcută după transportul la temperatura de refrigerare (4-8°C timp de 3 ore), știind că după 30 de minute aceste ciliate (trofonți) abandonează gazda și se transformă în stadii de rezistență (tomont) (Noga, 2010).

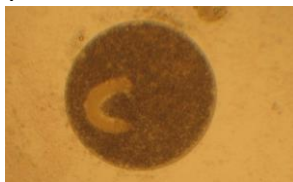


Fig. 6.7. Trofont de *Ichthyophthirius multifiliis*
Fig. 6.7. Trophont of *Ichthyophthirius multifiliis*

Analizând parametri fizico-chimici ai apei din bazinele de creștere au rezultat următoarele date: pH=8,13; NO₂=0,043 mg/l; NO₃=0,58 mg/l; NH₄=0,28 mg/l. Acești parametri s-au încadrat în parametrii normali pentru creșterea păstrăvului. Adaptabilitatea parazitului la variația fizico-chimică a apei, în special a temperaturii, este foarte ridicată, iar apariția patologiilor poate avea efecte catastrofale în acvacultură (Alishahi și Buchmann, 2006). De exemplu, un episod de *Ichthyophthirius multifiliis* care afectează peștii juvenili poate produce o rată a mortalității de 75-100% în maxim două săptămâni dacă temperatura apei favorizează dezvoltarea parazitului. Odată ce boala este instalată, lupta pentru reducerea pierderilor este aproape imposibilă (Woo și Bruno, 2006; Miron L., 1999).

Pentru stabilirea parazitului într-un bazin este necesară identificarea unui trofont de *Ichthyophthirius multifiliis*, iar tratamentul constă în ruperea ciclului de viață al paraziților prin manipularea mediului și prin modificarea parametrilor fizico-chimici ai apei (Shin și col., 2009). Acest lucru este greu de realizat și de aceea se recurge la "stamping-out" și apoi repopularea cu pești sănătoși. De asemenea, terapia medicamentoasă nu trebuie exclusă în special pentru infestațiile masive, prin băile de

scurtă sau lungă durată cu formalină, în funcție de gradul de infestare, asupra concentrației alese și nu în ultimul rând asupra posibilităților structurale ale fermelor (Noga, 2010). Utilizarea sterilizării cu ultraviolete (UV) pentru a distruge stadiile de *Ichthyophthirius multifiliis* este recomandată la o doză de 100.000 $\mu\text{Wsec/cm}^2$, cu dezavantajul distrucției bacteriilor denitrificatoare benefice (Young, 2011). În cazul nostru, dezinfectarea a fost făcută din mijlocul rezervorului, în strat gros, iar sterilizarea UV a fost ineficientă.

6.3. Concluzii parțiale

1. Studiul s-a încheiat prin două publicații : a) *Winter Parasitic Co-Infections In Common Carp (Cyprinus Carpio) From A Polyculture System* - Ramona GHIORGHIASA, Manuela MIRON, Andrei LUPU, Elena ISAN, Liviu MIRON
b) *Parasitosis With Atypical Occurrence in Brook Trout Salvelinus Fontinalis M* - Ramona GHIORGHIASA, Elena ISAN, Manuela MIRON, Dan TIHULCĂ, Andrei LUPU, Liviu MIRON
2. Deoarece terapia medicamentoasă este atât de dificilă, am recomandat aplicarea metodelor de depopulare și dezinfecție și am analizat posibilitatea introducerii unei noi terapii împotriva acestui parazit.
3. S-a confirmat prezența în timpul iernii a cilitului *Ichthyophthirius multifiliis*, pe peștii care au fost aclimatizați în laborator. Odată cu creșterea temperaturii apei, înmulțirea este exponențială cu apariția primelor semne ale bolii, ceea ce demonstrează gravitatea foarte mare a acesteia. De aceea, noi ne-am îndreptat atenția către această parazitoză în încercarea de a aduce noi soluții în combaterea și profilaxia ei.
4. Efectele pe termen lung ale strategiilor de gestionare a paraziților au atras atenția în industria acvaculturii.
5. Majoritatea cercetărilor s-au concentrat asupra modului de reducere a pierderilor economice cauzate de infestările parazitare ale peștilor de fermă, iar soluțiile sunt în principal determinate de propunerea unor nanoconjugate care vizează parazitul direct sau reducerea transmiterii infestației.

CAPITOLUL 7. SINTEZA ȘI CARACTERIZAREA COMPLEXULUI DE INCLUZIUNE AL β -CICLODEXTRINEI CU DIMINAZENUL ACETURAT

CHAPTER 7. SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF THE INCLUSION COMPLEX OF β -CYCLODEXTRIN WITH DIMINAZENE ACETURATE

Introducere

Ciclodextrinele (CD) sunt biopolimeri macrociclici cu aplicații potențiale în livrarea agenților terapeutici micro și macro-moleculari. În ciuda proprietății de includere puternică gazdă-oaspete, lipsa inerentă a capacității de legare celulară are aplicații limitate în livrarea de medicamente. În studiul nostru am combinat β -ciclodextrină (β -CD) cu diminazen aceturat (DM), care sunt molecule bioactive, distribuite larg pe unele celule și responsabile pentru activitatea antiprotozoară. Complexul de incluziune al DM cu β -CD a fost confirmat prin tehnici texturale, termogravimetrice, calorimetrice, spectroscopice și microscopice. Astfel, sistemul propus de incluziune β -CD-DM ar putea fi utilizat ca un purtător de livrare ("carrier") a medicamentului specific zonei de distribuție.

Diminazenul aceturat (DM) este o diamidină aromatică derivată din Surfen C, care a fost utilizat ca agent anti-tripanolitic în ultimele decenii (Peregrine, 1993). În plus față de activitățile sale antiparazitare, o mare parte din studiile recente au constatat în beneficiile potențiale ale diminazenului aceturat la animalele cu astm, leziuni gastrice, accident vascular cerebral ischemic și uveită (Dhawale V., 2016; Souza L., 2016; Bennion D., 2015; Zheng, C., 2015). Prin urmare, valorile terapeutice ale DM sunt cu mult mai mari decât se credea inițial și astfel a reprezentat mai mult interes pentru cercetare (Kuriakose S., 2014). Cu toate acestea, efectele potențiale ale DM asupra tulburărilor hepatice rămân necunoscute (Pu G., 2018).

Mecanismele farmacologice care stau la baza efectelor benefice ale DM rămân în mare parte necunoscute, dar proprietățile antiinflamatorii ale DM au fost recent sugerate a fi asociate cu beneficiile sale farmacologice (Qiu Y., 2014).

Ciclodextrinele (CD) sunt oligozaharide formate din șase, șapte sau opt unități de glucopiranoză care sunt conectate prin legătura 1, 4-glicozidică și au capacitatea de a forma complexe de incluziune atât cu molecule-oaspete hidrofile cât și hidrofobe (Szejtli J., 1988). Complexele de incluziune gazdă-oaspete CD-medicament au capacitatea de a crește solubilitatea apoasă a medicamentelor slab solubile în apă, stabilitatea și mascarea gustului inacceptabil al medicamentelor (Crini G., 2014; Guo Z., 2017; Loftsson, T., 2004). În sistemul modern de administrare a medicamentelor,

ciclodextrinele sunt alegerea moleculelor gazdă supramoleculare pentru prepararea purtătorilor de medicamente în diferite forme farmaceutice și nanoconjugate (Hartlieb K., 2016; Mejia-Ariza R., 2017; Wang, Y., 2017). Incluziunile necovalente rezultate sau complexe gazdă-oaspete sunt de interes științific și tehnologic actual datorită proprietăților fizice, chimice și biologice. Astfel de legături necovalente pot îmbunătăți efectiv solubilitatea în apă a oaspeților, biodisponibilitatea și stabilitatea; ele pot regla, de asemenea, eliberarea moleculelor oaspete (Loftsson, T, 2007).

Obiectivul acestui studiu a fost reprezentat de investigarea structurii moleculare a complexului diminazen aceturat/ β -CD prin analiza BET, analiza termogravimetrică, metodele DSC, FT-IR, modelare moleculară, TEM și AFM și găsirea unei noi corelații între structură și caracteristici.

7.1. Material și metodă

7.1.1. Substanțe folosite

Diminazenul aceturat (puritate > 97%) și β -ciclodextrina (puritate > 98%) au fost cumpărate de la Sigma-Aldrich. Toți ceilalți reactivi (DMSO, PEG 400 și tampon fosfat) au avut o calitate analitică. Apa utilizată a fost dublu distilată și deionizată.

7.1.2. Prepararea și caracterizarea complexului

Analiza complexului diminazenului aceturat cu β -ciclodextrina a fost realizată la Institut Național de Cercetare-Dezvoltare pentru Chimie și Petrochimie (ICECHIM) din București.

După confirmarea și caracterizarea formării complexului în soluție, am continuat cu prepararea complexului în stare solidă. În acest scop, am folosit metoda liofilizării, care de obicei oferă randamente foarte bune față de alte metode, dar care are aplicații la scară industrială, având în vedere simplitatea acesteia. În plus, caracteristicile amestecului rezultat prin liofilizare îi oferă posibilitatea medicamentului-oaspete de a fi ușor inclus în timpul fabricării hranei pentru animale.

Așa cum s-a menționat, complexul de incluziune β -ciclodextrină cu diminazen aceturat a fost obținut prin metoda de liofilizare. Pentru a determina eficacitatea complexării cu diminazen aceturat, au fost amestecate în diferite proporții apă și acid acetic glacial 50:50 ca agent de umectare. Studiile preliminare au indicat necesitatea de a reduce pH-ul agentului de umectare pentru a facilita dizolvarea parțială a medicamentului îmbunătățind astfel formarea complexului; într-adevăr, formarea complexului nu are loc dacă agentul de umectare este doar apă. Acidul acetic a fost ales având în vedere volatilitatea sa ridicată, astfel încât este eliminat rapid din complex, minimizând problemele de toxicitate.

Pentru prepararea complexelor de incluziune diminazenul aceturat și β -ciclodextrina au fost amestecate în proporții adecvate și apoi au fost măcinate. Ulterior, s-a adăugat agentul de umectare. Pasta astfel obținută s-a uscat într-o etuvă la 40°C timp de 24 de ore și s-a obținut fracția 200-500 μ m care s-a utilizat pentru testele

ulterioare. Folosind această metodă, am preparat amestecuri de diminazen aceturat și β -ciclodextrină în rapoarte molare de 1:1.

Complexul diminazen aceturat/beta-ciclodextrină (DM/ β -CD) a fost sintetizat într-un mixer echipat cu un senzor de temperatură (senzor Heidolph Heidolph Instruments), iar evaporarea solventului a fost efectuată prin metoda liofilizării (FD), (ALPHA 1-2 LD). Proporția dintre diminazen aceturat și β -ciclodextrină a fost în conformitate cu raportul echimolar. Pentru a produce o soluție 0,5% pulberea de diminazen aceturat a fost dizolvată în DMSO, iar cea de β -CD în apă distilată. Complexele s-au format într-un mediu apos. Pentru îmbunătățirea solubilității substanței active s-au utilizat PEG 400 și un tampon fosfat. Soluțiile au fost amestecate timp de 30 minute într-un malaxor echipat cu un senzor de temperatură, până la omogenizarea completă, apoi complexul obținut a suferit evaporarea solventului timp de 3 ore, la 45°C, la o temperatură constantă cu direcție. După evaporarea solventului, complexul a fost liofilizat timp de 12 ore (Blanco J., 1991).

Caracteristicile textuale ale complexului de incluziune au fost determinate prin analiza BET pe instrumentul Autosorb1Quantacrome. Astfel suprafața specifică (SBET) a fost determinată prin metoda BET în porțiunea liniară a izotermei adsorbție-desorbție. Analiza termogravimetrică a fost determinată prin desorbția termică a dietilaminei pe un aparat DuPont Instruments Thermal Analyst 2000/2100 cuplat cu un analizor termogravimetric modul 951. Măsurătorile de calorimetrie de scanare diferențială (DSC) s-au efectuat utilizând un DSC 823 (Mettler Toledo). Proba a fost împachetată în cutii de aluminiu, plasată în celula DSC și apoi încălzită la o viteză de 10°C/min de la temperatura camerei la 200°C, menținută două minute la 200°C, apoi răcită la temperatura ambiantă.

Spectrele FT-IR ale complexului s-au obținut pe un spectrometru FT-IR Jasco 610 cu metoda ATR, în intervalul de la 4000 până la 550 cm^{-1} , la o rată de scanare de 4 $\text{cm}^{-1} \text{ s}^{-1}$, cu o medie de 128 măsurători pentru fiecare spectru. Imaginile FT-IR ale complexului au fost obținute prin utilizarea unui microscop Thermo iN10 MX FT-IR operat în modul de reflexie. Toate spectrele au fost obținute în modul de reflexie, utilizând un detector de imagini răcite (MCT Array) prin adăugarea simultană a 16 spectre la o rezoluție spectrală de 8 cm^{-1} , în timp ce timpul de achiziție a fost de 3s/scanare. Analiza morfologică a complexului a fost determinată prin microscopie electronică de transmisie (TEM) utilizând un sistem Tecnaï G2 F20 TWIN Cryo-TEM, sistem 2015 - FEI Company™ cu emisie de câmp 200 kV S/TEM și cu lentilă TWIN și electron de emisie de câmp de luminozitate ridicată (FEG).

7.2. Rezultate și discuții

7.2.1. Studii de solubilitate

Studiile de solubilitate ale substanțelor în monoterapie sau în prezența β -ciclodextrinei au fost realizate prin metoda Higuchi și Connors (1965). Excesul de medicamente a fost adăugat în tuburi conținând 10 ml de apă sau o soluție apoasă de β -ciclodextrină (0-16 mM). Tuburile sunt agitate la 80 cicluri/min timp de 5 zile într-o

baie de apă la $20^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Când s-a atins un echilibru, tuburile sunt centrifugate timp de 5 minute la 5000 rpm, apoi supernatantul este filtrat prin membrane de nitrat de celuloză (mărimea porilor 0,45 μm) pentru a elimina suspensia materialelor. Cantitatea de medicament din soluție este determinată prin spectrofotometrie UV la 306 nm. Constanta de stabilitate este calculată de la regiunea liniară inițială a diagramei de solubilitate în fază, așa cum este descris de Higuchi și Connors (1965).

7.2.2. Gazda folosită pentru complexare

Gazda este reprezentată în toate cazurile de molecula de β -Ciclodextrină (fig. 7.1.).

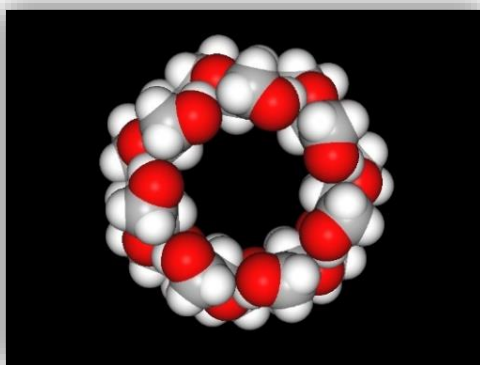


Fig. 7.1. β -Ciclodextrina (soft. MarvinSketch)

Fig. 7.1. β -Ciclodextrin (soft. MarvinSketch)

Ciclodextrinele (CD) sunt substanțe compuse din molecule de zahar (α -D-glucopiranoză) legate împreună într-o formă de inel, și anume oligozaharide ciclice. Acestea se numesc de asemenea ciclo-amiloză, ciclomaltoză sau dextrina lui Schardinger și sunt non-reductive în natură. Nomenclatura CD se bazează pe numărul de unități de glucoză din structura lor, astfel încât CD cu 6 unități de glucoză se numește α -CD, CD cu 7 unități se numește β -CD și una cu 8 unități este numită γ -CD. Unitățile de glucopiranoză din CD sunt legate prin legăturile -1-4.

β -ciclodextrinele au fost selectate pentru studiu ca o dovadă a conceptului realizat, cu un accent primar pe înțelegerea interacțiunilor electrostatice (fig. 7.2. (a), (b), (c), (d)) care stabilizează complexe rezultate.

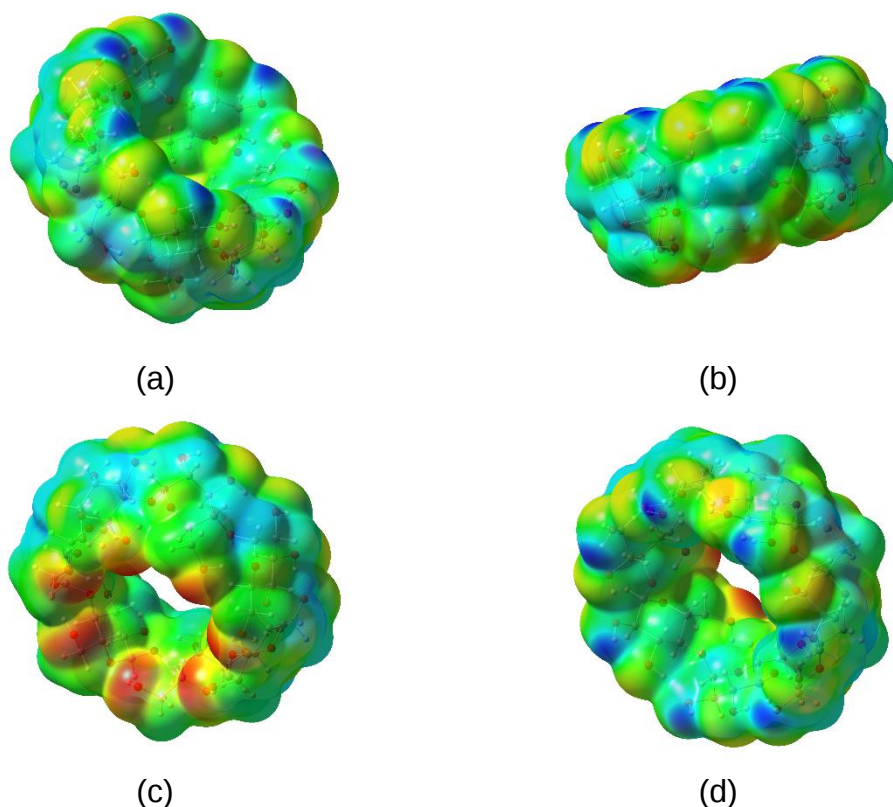


Fig. 7.2. β -Cyclodextrina cu harta potențialului electrostatic (MEP) (img. Soft. Molden)
 Fig. 7.2. β -Cyclodextrin with electrostatic potential map (MEP) (img. Soft. Molden)

Reprezentările privind potențialul electrostatic molecular (MEP) și identificarea distribuției potențialelor electrostatice în aceste molecule de ciclodextrină, care identifică "zonele" care sunt mai "pozitive" sau mai "negative": zona roșie corespunde suprafețelor potențiale mai electronegative, iar cea albastră cu un potențial mai electropozitiv (fig. 7.2.).

Potențialele electrostatice moleculare generate în acest fel s-au dovedit a fi foarte utile în înțelegerea interacțiunilor moleculare.

Formarea legăturilor de unități de glucopiranoză oferă CD o formă conică (Arun și col., 2008). Există legături de hidrogen între grupările 2-OH și 3-OH în jurul marginii exterioare. Aceste legături sunt cele mai slabe în α -CD și cele mai puternice în γ -CD. În jurul marginii de jos, grupările 6-OH pot forma, de asemenea, legături de hidrogen, dar legăturile sunt destabilizate prin efecte dipolare și nu sunt în mod normal prezente în cristalele CD. În α -CD, legătura de hidrogen este pură 3-OH (donor), 2-OH (acceptor). Dar în β și γ -CD, legătura se schimbă între acesta și 3-OH (acceptor), 2-OH (donator). Ciclodextrinele sunt structuri amfipatice în care grupele 3-OH și 2-OH sunt expuse pe marginea mai largă și pe marginea exterioară a grupei 6-OH. Partea exterioară a cavității este captușită de aceste grupări hidrofile și suprafața interioară

este căptușită de atomi anomerici de oxigen. Astfel CD au o cavitate interioară hidrofobă și o suprafață exterioară hidrofilă (Zhou și Ritter, 2010).

Pentru studiul nostru, am hotărât să lucrăm cu β -CD, despre care s-a constatat că se comportă cel mai bine în scopuri medicale, deoarece formele α și γ au arătat niveluri de toxicitate considerabile. Am ales β -CD datorită mai multor factori care determină interacțiunea medicament/ciclodextrină. De exemplu, interacțiunile ionilor dintre moleculele de medicament și ciclodextrină pot îmbunătăți eficacitatea și stabilitatea încărcăturii complexelor în comparație cu conjugatele de medicament încărcate negativ sau neîncărcate. În plus, temperaturile crescute pot ajuta la destabilizarea conjugatului medicament/ciclodextrină (Nurunnabi M., 2017).

7.2.3. Prepararea complexului medicament- β -CD

Complexul de incluziune cu un raport molar de 1:1 a fost preparat prin dizolvarea a 1,7 g de diminazen aceturat și 3,74 g de β -ciclodextrină în 40 ml de apă.

Pentru prepararea complexelor de incluziune, medicamentul și β -ciclodextrina au fost amestecate în proporții adecvate și apoi au fost măcinate. Ulterior s-a adăugat agentul de umectare (Blanco și colab., 1991). Soluția a fost introdusă în agitator timp de 3 ore la temperatura camerei. După aceea, amestecul a fost concentrat sub vid și uscat în cuptor timp de 48 de ore pentru a se obține complexul pentru testele ulterioare. Folosind această metodă au fost preparate amestecuri de medicament și ciclodextrină într-un raport molar de 1: 1.

7.2.4 Analiza termică

Scopul acestei analize este acela de a determina și monitoriza schimbări ale proprietăților chimice sau fizice ale complexului nou format.

O parte din analizele complexului diminazenului aceturat cu β -ciclodextrina a fost realizată la Institutul Național de Cercetare-Dezvoltare pentru Chimie și Petrochimie (ICECHIM) din București.

Izoterma adsorbției/desorbției și curbele de distribuție a dimensiunilor de pori pentru complexul diminazen aceturat/beta-ciclodextrină sunt prezentate în figura 7.3 Volumul inert adsorbit este mult mai mic decât în cazul solidelor poroase, ceea ce evidențiază gradul ridicat de utilizare a cavității ciclodextrinei. Izotermul este specific pentru procesul de condensare capilară pe materiale solide macroporoase cu conținut scăzut de pori. Curba de histerezis arată un volum de adsorbție inert mai mare decât volumul de desorbție inert, probabil datorită unei afinități mai mari de gaz inert pentru anumite zone ale cavităților β -ciclodextrinei cu polaritate scăzută.

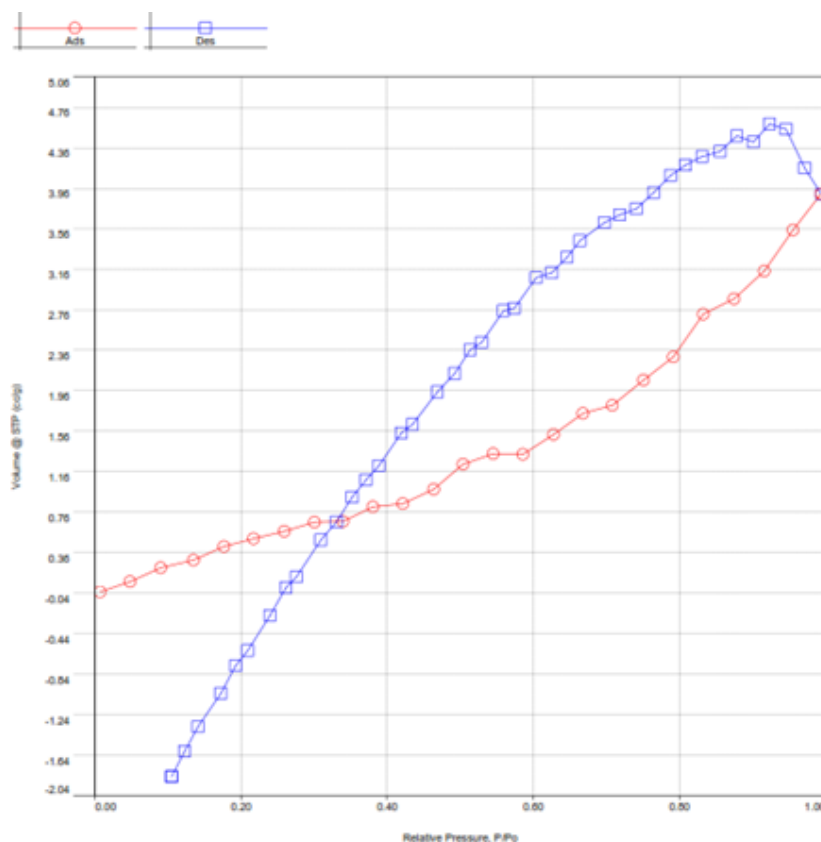


Fig. 7.3. Izoterma adsorbției/desorbției și curbele de distribuție a dimensiunilor de pori pentru complexul dimerazene acetat/ β -ciclodextrină

Fig. 7.3. Adsorption/desorption isotherm and pore size distribution curves for dimerazene acetate/ β -cyclodextrin

Distribuția dimensiunilor porilor evidențiază prezența mezoporiilor și în special a macroporiilor (fig.7.4.). Proprietățile textuale (suprafața BET, volumul porilor și diametrul mediu al porilor) ale eșantionului sunt rezumate în tabelul 7.1. Se poate observa o suprafață foarte mică și un volum de pori foarte mic. Diametrul mediu al porilor este specific pentru mesopori, ceea ce demonstrează că majoritatea cavităților β -ciclodextrinei au fost ocupate, deoarece diametrul cavităților β -ciclodextrinei (0,78 nm) este mult mai mic decât diametrul mediu al porilor determinat experimental (3,901 nm).

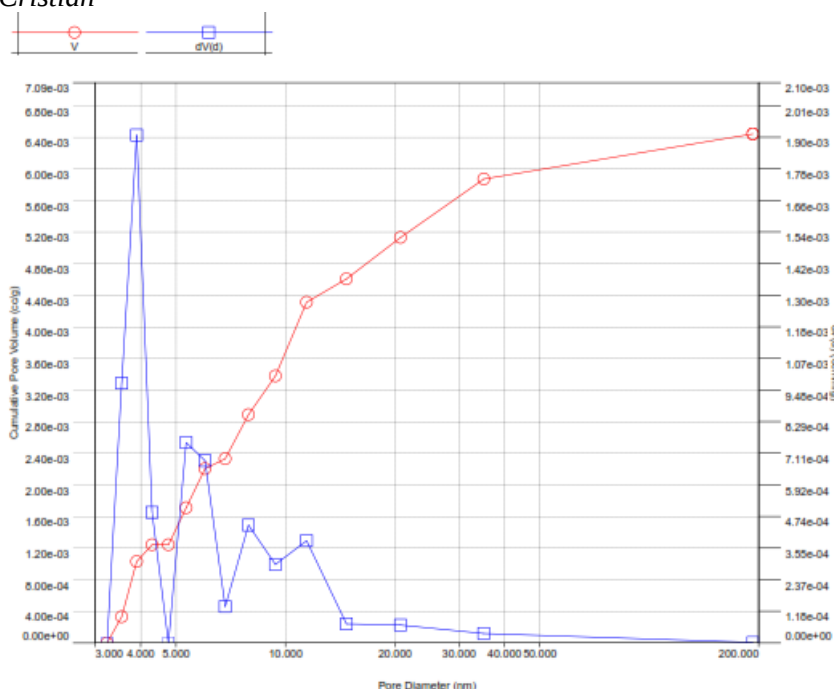


Fig. 7.4. Dimensiunile porilor ale complexului diminazen aceturat- β -ciclodextrină
 Fig. 7.4. The pore dimensions of the diminazene aceturate- β -cyclodextrin complex

Tabel 7.1./Table 7.1.

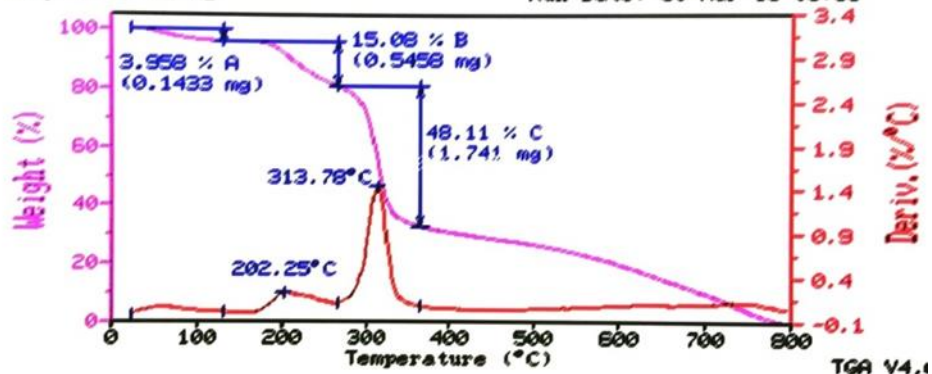
Caracteristicile texturale ale complexului diminazen aceturat- β -ciclodextrina
Textural characteristics of diminazene aceturate - β -cyclodextrin complex

Suprafața specifică zonei, m ² /g	Volumul total al porilor, cm ³ /g	Diametrul mediu al porilor, nm
3.135	0.006	3.901

Stabilitatea complexului de incluziune a fost determinată atât în prezența gazului inert cât și în prezența aerului. Figura 7.5. prezintă analiza termogravimetrică pentru complexul diminazen aceturat/ β -ciclodextrină. Curbele de pierdere de masă din aer și inerte sunt similare, ceea ce demonstrează o stabilitate ridicată la oxidare a complexului de incluziune. Există o pierdere de masă de aproximativ 4% la temperaturi de până la 160°C, ceea ce corespunde evaporării solvenților, o pierdere de masă de aproximativ 15% la temperaturi de până la 250°C și o pierdere de masă de peste 40% la 350°C. Pierdere de masă care are loc în intervalul de temperatură de 200-250°C este probabil datorată deshidratării ciclodextrinei și la temperaturi de 250-350°C, probabil la degradarea dextrinului (Lupu A. și col., 2019).

Sample: BETA-CD CA
Method: ramp 10°C/min N2

TGA File: B-CD-CA.01
Run Date: 30-Mar-18 09:33



Sample: BETA-CD CA
Method: ramp 10°C/min air

TGA File: B-CD-CA.02
Run Date: 30-Mar-18 11:48

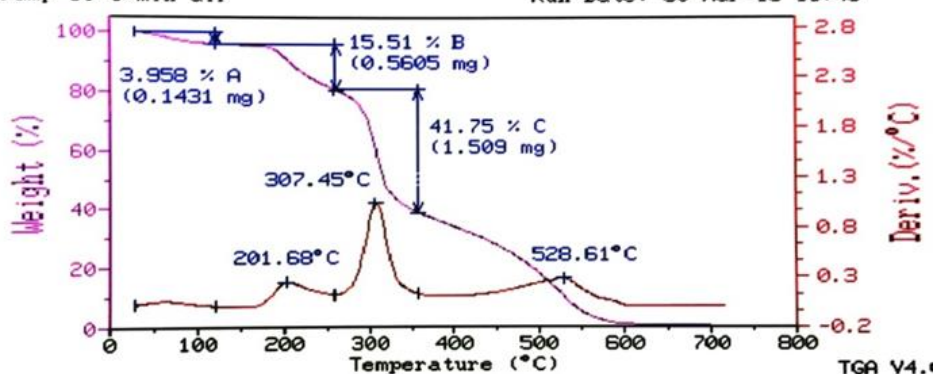


Fig. 7.5. Analiza termogravimetrică în gaz inert și în aer sintetic pentru complexul diminazen aceturat / complexul β-ciclodextrină

Fig. 7.5. Thermogravimetric analysis in inert gas and in synthetic air for diminazene aceturate/β-cyclodextrin complex

Un alt set de analize termogravimetrice au fost făcute la Facultatea de Inginerie Chimică din cadrul Universității Gheorghe Asachi din Iași pentru a evalua și măsura schimbările masei probei (complexului) pe parcursul unui program de temperatură bine stabilit, într-o atmosferă controlată.

Analiza termogravimetrică (TGA) și analiza termogravimetrică derivată (DTG) s-au efectuat sub debit de azot (20 cm³/min) la o viteză de încălzire de 10°C/min de la 25 la 900°C cu un model TGA/SDTA 851 de Mettler Toledo. Masa inițială a probelor a fost de 2,2-3,5 mg.

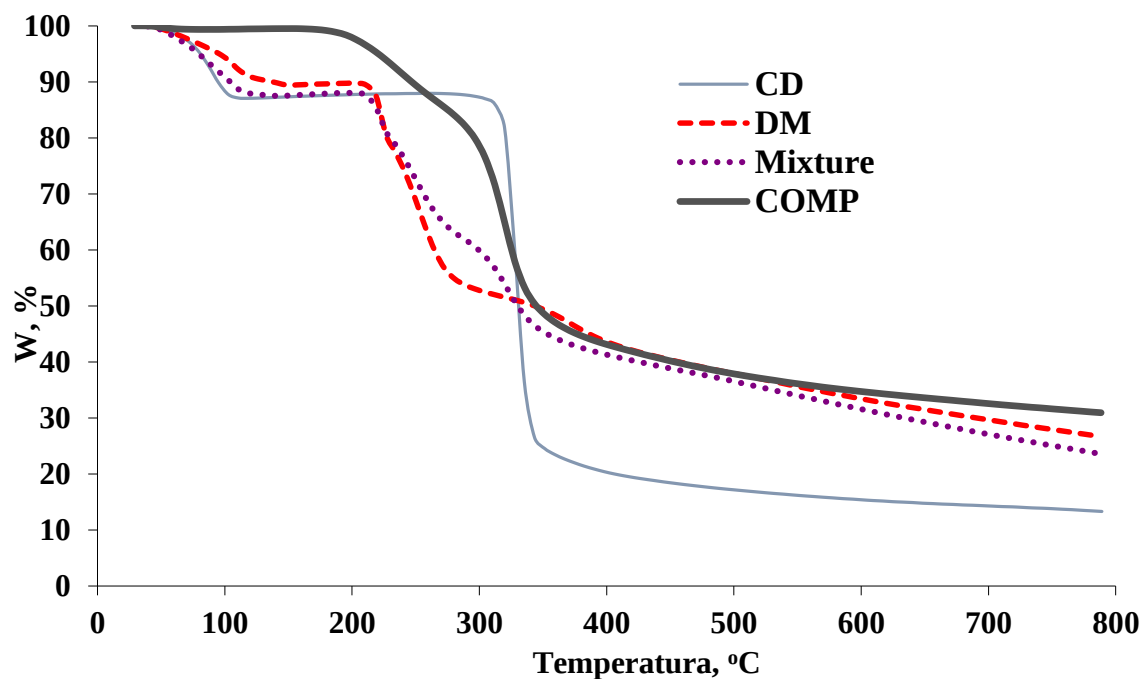
Au fost evaluate termogramele pentru probele: ciclodextrină (CD), diminazen (DM), amestec fizic ciclodextrină-medicament (amestec) și complex solid de diminazen-ciclodextrină (COMP). Curbele TG și DTG prezentate în figurile 7.6 și 7.7 au permis stabilirea principalelor caracteristici termo-gravimetrice prezentate în tabelul 7.2.

Tabel 7.2./ Table 7.2.

Caracteristici Termogravimetrice Thermogravimetric characteristics						
<i>Proba</i>	<i>Stage</i>	<i>T_{onset}</i>	<i>T_{peak}</i>	<i>T_{endset}</i>	<i>W%</i>	<i>Reziduu</i>
CD	I	46	89	103	12.90	13.30
	II	317	329	340	73.80	
DM	I	42	106	146	10.47	25.91
	II	216	228	234	8.88	
	III	234	253	277	28.94	
	IV	342	372	550	25.80	
Amestec	I	49	95	117	12.56	22.16
	II	214	227	235	5.80	
	III	235	250	270	21.24	
	IV	304	322	440	38.24	
COMP	I	205	239	295	18.27	30.90
	II	295	320	390	50.83	

T_{onset} – debutul temperaturii la care începe degradarea termică, T_{endset} – temperatura la care se termină procesul de degradare, T_{peak} – la care viteza de degradare atinge valoarea maximă, W%, reziduu - cantitatea de probă degradată, care rămâne la o temperatură mai mare de 800 ° C

Rezultatele obținute indică faptul că dacă pierderile de masă în intervalul 40-140°C, cauzate de prezența umidității și a unor urme de solvenți, sunt neglijate, se poate afirma că descompunerea termică a CD are loc într-o etapă, cu $T_{peak} = 329^\circ\text{C}$. Această etapă se întâlnește atât în cazul amestecului fizic CD-DM, cât și al complexului COMP. Descompunerea DM are loc printr-o serie de trei etape cu $T_{peak} = 228^\circ\text{C}$, 253°C și 372°C . După cum rezultă din tabelul 7.2., primele două etape de descompunere pot fi găsite și în amestecul fizic. Formarea complexului (COMP) este confirmată de modul diferit în care descompunerea termică are loc în intervalul de temperatură de 200-300°C, comparativ cu DM și amestecul fizic (fig. 7.6. și fig. 7.7.). În cazul complexului, identificăm și cea mai mare cantitate de reziduu, care rămâne la o temperatură constantă de 800°C.



Legendă: CD-ciclodextrina; DM-diminazen; Mixture-amestec; COMP-complex.

Fig. 7.6. Curbele TG ale probelor analizate

Fig. 7.6. TG curves of analysed samples

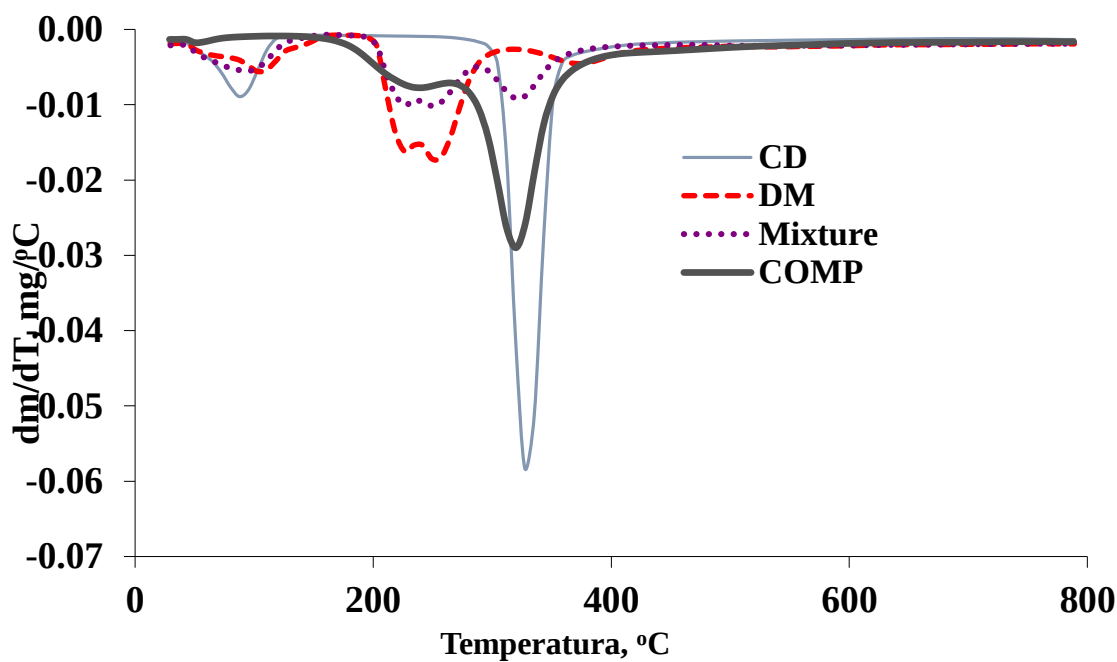


Fig. 7.7. Curbele DTG ale probelor analizate

Fig. 7.7. DTG curves of analysed samples

7.3. Caracterizarea complexelor în stare solidă

Complexele obținute prin metoda de liofilizare au fost caracterizate prin, FT-IR, calorimetrie de scanare diferențială (DSC).



Fig. 7.8. Diminazen aceturat complexat (A)

Fig. 7.8. Complexed diminazene aceturate (A)



Fig. 7.9. Diminazen aceturat necomplexat (B)

Fig. 7.9. Uncomplexed diminazene aceturate (B)

7.3.1. Calorimetrie de scanare diferențială (DSC)

DSC este o metodă de analiză a stabilității complexului expunerii la temperatură a probelor complexate. Aceasta este o tehnică utilizată pentru studiul tranzițiilor termice ale complexului format (schimbările care au loc în complex la creșterea controlată a temperaturii).

Tuburile de aluminiu conținând 1-2 mg de produs au fost introduse într-un aparat Shimadzu DSC50 DSC (aer gaz, interval de temperatură 50-250°C, viteză de încălzire 10°C/min). DSC este o tehnică utilă care ne permite să determinăm tranziții de temperatură, cum ar fi topirea, fierberea, deshidratarea sau cristalizarea, care pot să apară în materialul de probă, ducând la o reacție endotermică sau exotermă.

Curbele termice obținute prin DSC furnizează informații despre stabilitatea complexului și, implicit, a temperaturii de degradare a unuia dintre componente (fig. 7.10.). Prezența fenomenelor exoterme la temperaturi de până la 146,4°C, precum și apariția unor interacțiuni mai puternice între cele două componente ale compusului de incluziune la temperatura de circa 160°C determină procese endoterme, cum ar fi schimbări de fază sau chiar degradări.

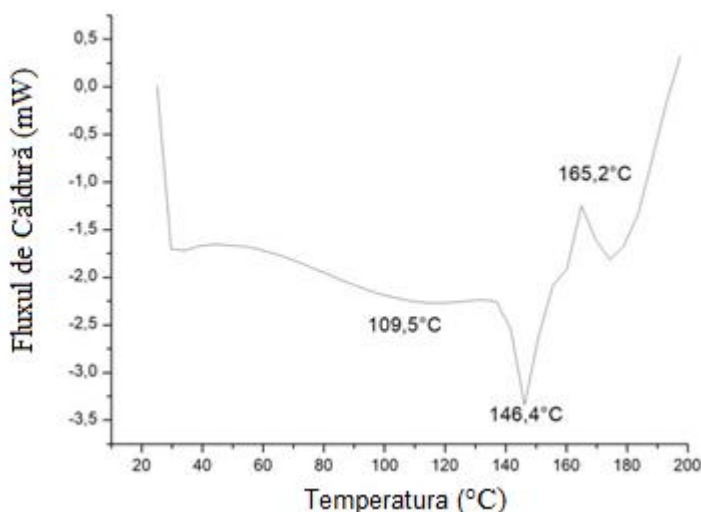


Fig. 7.10. Analiza DSC a complexului diminazen aceturat/ β -ciclodextrină
 Fig. 7.10. DSC analysis of diminazene aceturate/ β -cyclodextrin complex

Analiza regiunii plane a diagramei în faza de solubilitate a indicat faptul că raportul medicament- β -ciclodextrină în complexul din soluție este de 1:1.

Pentru a determina caracteristicile produsului obținute prin liofilizare, s-a folosit calorimetria de scanare diferențială (DSC). Aceasta prezintă urme pentru Diminazen, β -ciclodextrină și diferitele amestecuri de liofilizat. Urmele DSC pentru β -ciclodextrină prezintă fenomene termice caracteristice pentru acest excipient, rezultând pierderea moleculelor de apă din interiorul cavității (endoterma largă care apare între temperatura ambientală și 140°C) și de la tranziția reversibilă la 220°C. Ciclodextrina se topește și se descompune la temperaturi de peste 250°C. Traseul DSC pentru Diminazen a prezentat o endotermă la diferite grade de temperatură, corespunzând topirii lui.

Toate amestecurile testate (1:1) au prezentat endoterma de fuziune a medicamentului (diminazen), indicând prezența acestuia liber cristalin. De fapt, produsul este un complex în raport echimolar de 1:1 și exces de ciclodextrină liberă. Mai mult, examinarea rezultatelor prezentate indică faptul că punctul de topire scade odată cu creșterea proporției de ciclodextrină, sugerând că s-a format o dispersie solidă între cele două componente. Prezența excesului de ciclodextrină poate crește astfel rata de dizolvare, chiar dacă medicamentul nu este complexat.

Pe baza acestor rezultate, am selectat proporția 1:1 pentru studiile *in vitro*, deoarece această proporție a asigurat că tot medicamentul se află în formă complexată. În plus, utilizarea excesului de ciclodextrină este obișnuită în prepararea complexelor de incluziune.

7.3.2. Caracterizare cu IR (FT-IR – Fourier Transform Infrared)

Pentru a confirma existența complexului de incluziune, a fost efectuată o spectroscopie cu infraroșu (FT-IR) și graficul arată ca în imaginea de jos (fig. 7.11.).

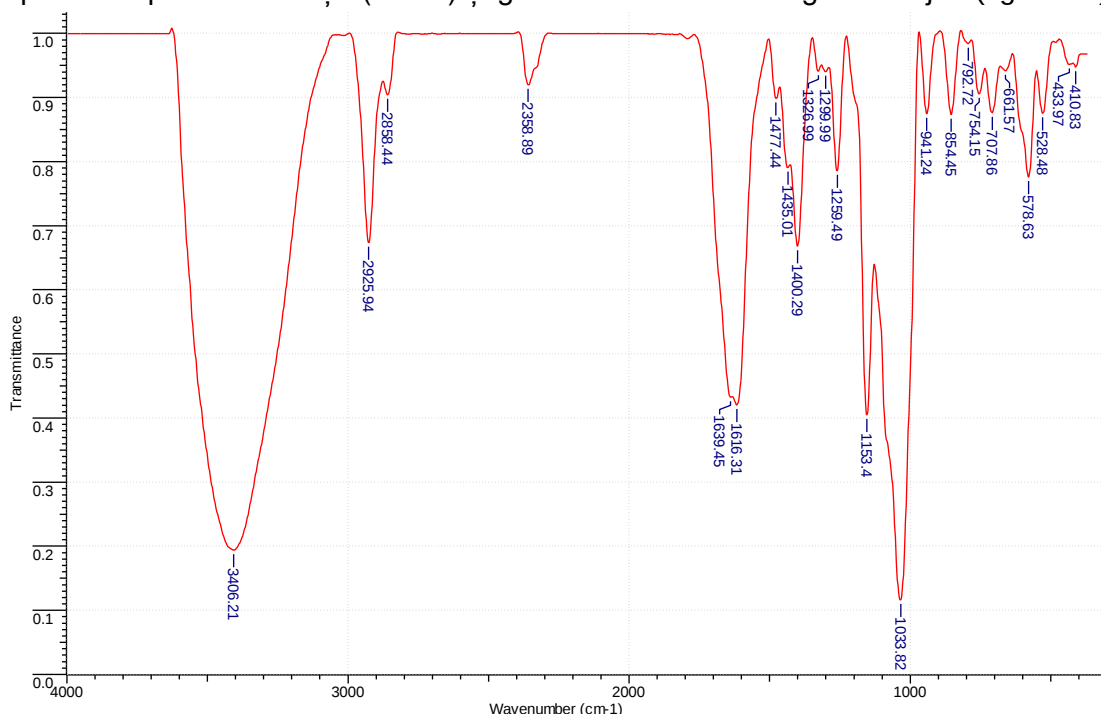


Fig. 7.11. Spectrele IR pentru complexul diminazen aceturat/ β -ciclodextrină

Fig. 7.11. IR spectra for diminazene aceturate/ β -cyclodextrin complex

Variația formei, trecerii și intensității vârfurilor de absorbție a IR ale oaspeților sau gazdei poate furniza suficiente informații pentru apariția incluziunii. Graficul a prezentat spectrele IR ale diminazenului, β -CD și complexului lor de incluziune. Spectrul IR al diminazenului a prezentat benzile sale caracteristice. A existat o bandă de absorbție foarte puternică la 1616 cm^{-1} pentru vibrațiile de întindere C=O. Banda de absorbție la 1400 cm^{-1} a fost indicată pentru vibrația de întindere a C-C în molecula diminazenului. 941 cm^{-1} a fost pentru banda de absorbție C-H în sistemul conjugat C. Spectrele IR ale complexului de incluziune sunt similare cu β -CD datorită cantității reduse de diminazen în sistem. Totuși, s-au găsit câteva variații ale spectrelor. Banda de absorbție la 1639 cm^{-1} a dispărut sau a fost deplasată la numerele de valori mici din complexul de incluziune diminazen/ β -CD, indicând faptul că vibrația de întindere C=O a fost restricționată după formarea complexului de incluziune. $1400\text{ (}1477\text{)}\text{ cm}^{-1}$ a fost puternic slăbit, indicând faptul că majoritatea moleculelor de diminazen au fost incluse de β -CD, dar poate a fost inclusă doar o parte din diminazen. Imaginile FT-IR ale suprafeței complexe DM- β -CD arată că acest complex este eterogen, imagine (fig. 7.12.), care identifică zonele verzi care au un spectru ușor diferit față de restul eșantionului. Zonele "verzi" din imaginea video corespund intensității crescute a

benzilor la 1067, 1093, 1213, 1273, 1415, 1450, 1495, 1620, 1650, 1700 etc. Zonele înconjurare sunt identice.

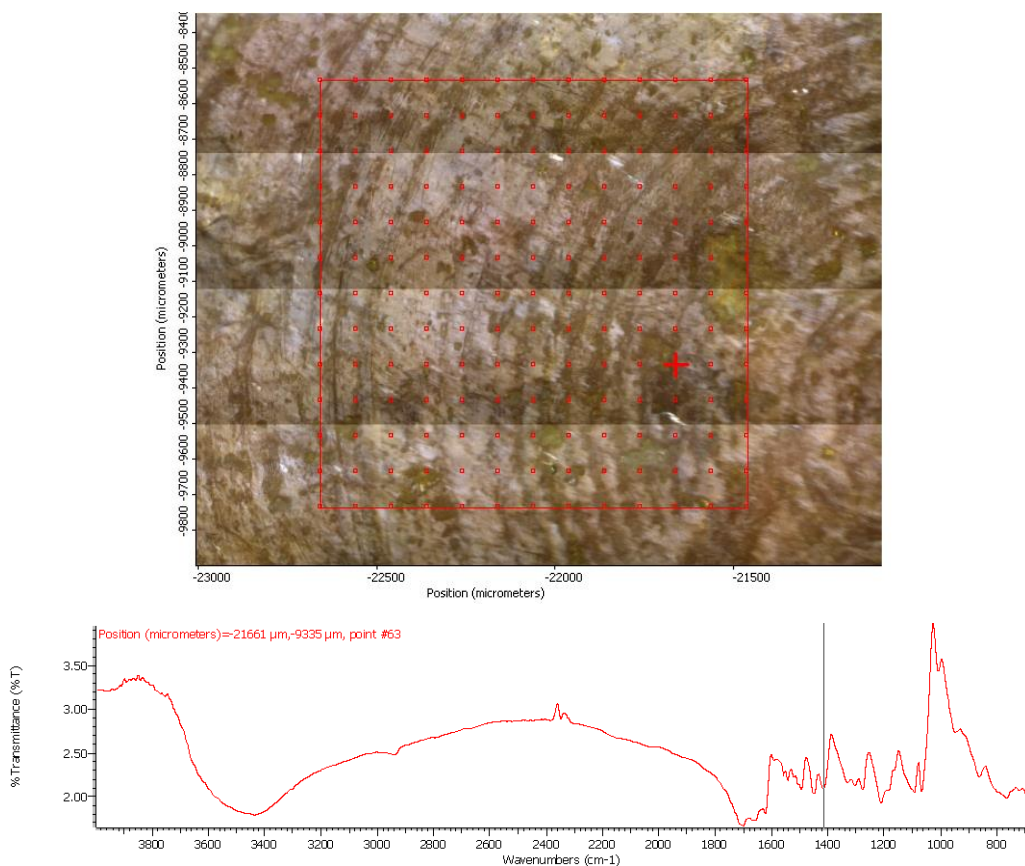


Fig. 7.12. Imagini FTIR ale suprafeței complexului DM- β -CD

Fig. 7.12. FTIR images of the complex DM- β -CD surface

Prin mărirea rezoluției spațiale, obținem imaginile video și FT-IR de mai jos, spectrul fiind neschimbat. Se poate observa cu ușurință că zona verde este ovaloidă, $250\mu\text{m} \times 100\mu\text{m}$, suprapunerea video și FT-IR fiind foarte bune, ceea ce confirmă faptul că această culoare diferită a videoclipului se datorează unei heterogenități compuse (fig. 7.13.).

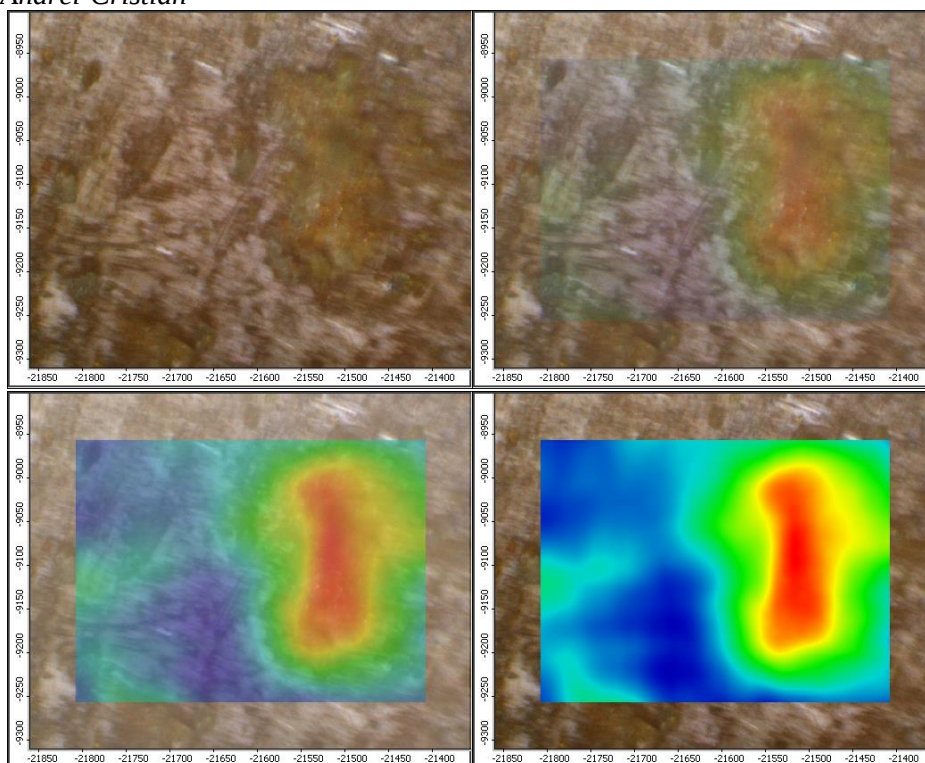


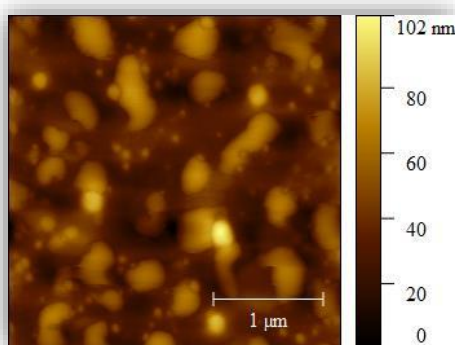
Fig. 7.13. Imagini FT-IR ale suprafeței complexului DM- β -CD cu rezoluție spațială mărită
 Fig. 7.13. FT-IR images of the complex DM- β -CD surface with enlarged spatial resolution

În zona albastră, pe baza spectrului FT-IR, poate fi identificată prezența unei ciclodextrine, dar baza de date nu conține informații despre zona roșie a imaginii FT-IR.

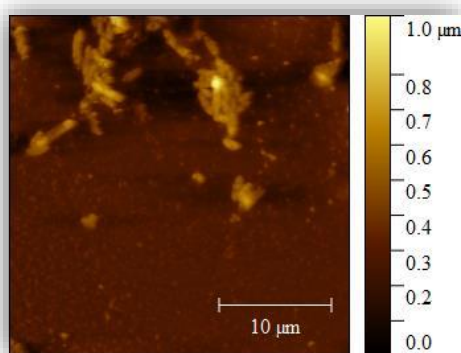
7.3.3. Structura morfologică a cristalelor evaluată prin TEM și AFM

Aceste investigații morfo-structurale au fost realizate și investigate prin AFM și TEM. Astfel, cu ajutorul AFM s-a realizat o examinare de înaltă rezoluție a structurii suprafeței complexului în starea sa inițială.

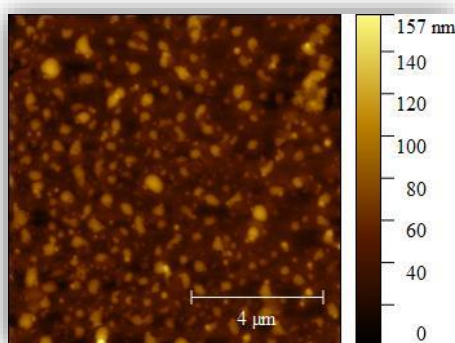
Sinteza complexului diminazen aceturat/ β -ciclodextrină (DA/ β -CD) s-a realizat, iar substanțele au fost utilizate într-un raport echimolar de 1:1, ținând cont de masa moleculară a fiecărui produs (515,531 g/mol pentru diminazen și 1134,98 g/mol pentru β -ciclodextrină), cantitățile fiind de 1 g de diminazen aceturat și 2,2 g de beta-ciclodextrină). Pulberea de diminazen aceturat s-a dizolvat în DMSO pentru a produce o soluție 0,5% și β -CD a fost dizolvată în apă distilată pentru a produce o soluție apoasă 0,5%. Soluțiile au fost amestecate timp de 30 minute într-un malaxor echipat cu un senzor de temperatură, până la omogenizarea completă, apoi complexul obținut a fost supus evaporării solventului timp de 3 ore la 45°C la o temperatură constantă cu direcție. După evaporarea solventului, complexul a fost uscat la temperatura camerei timp de 12 ore. Apoi s-a trecut la evaluarea structurii morfologice a cristalelor formate (fig. 7.14 și fig. 7.15)



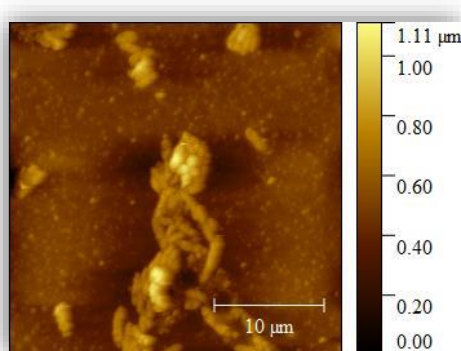
a



b



c



d

Fig. 7.14. Complexul liofilizat diminazen / beta-CD înregistrat prin microscopie de forță atomică.

Imaginile AFM ale complexelor rotunde globuloase aplatizate cu dimensiuni diferite.

Fig. 7.14. The diminazen / beta-CD lyophilized complex recorded by atomic force microscopy. AFM images of round globular complexes flattened with different sizes

Figura 7.15. prezintă imaginile TEM ale complexului DM- β -ciclodextrină. Din analizele TEM se observă, pe baza diferenței de culoare, alternanța dintre cele două componente ale complexului de incluziune și forma și mărimea compusului de incluziune.

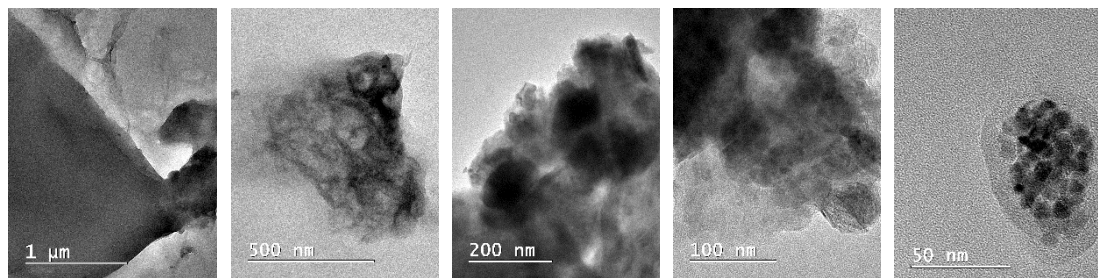


Fig. 7.15. Imagini TEM pentru complexul DM- β -CD

Fig. 7.15. TEM images for the complex DM- β -CD

7.4. Modelare moleculară

S-au realizat calcule teoretice pentru a obține informații generale despre aranjamentul geometric al structurii complexelor de incluziune DA- β -CD și pentru a evidenția interacțiunile intermoleculare dintre gazdă și oaspete. În timp ce în studiile experimentale și evaluarea eficienței tratamentului, medicamentul este utilizat în forma de sare diaceturată corespunzătoare, simulările au luat în considerare doar partea terapeutică a medicamentului diminazen (DM) (Peregrine A., 1993)

Tehnica de înglobare moleculară a fost utilizată pentru a obține o perspectivă a interacțiunii dintre DM și β -CD. Structura β -CD folosită în această lucrare a fost generată de coordonate precise pentru a obține o structură completă (GaussView 5). Coordonatele tridimensionale ale DM au fost generate folosind Materials studio 4.0 package.

Înglobarea moleculară a fost efectuată utilizând MaterialStudio 4.0 și funcția Centroid. Situl de legare a fost definit ca fiind o sferă cu o rază de 20 Å centrată pe cavitatea β -CD. Toate figurile de modelare moleculară au fost realizate și au fost utilizate pentru generarea reprezentării PDF3D a complexului între DM și β -CD.

Bazele de date PubChem și PDB (Protein Data Bank) au furnizat structurile inițiale ale diminazenului și ale β -ciclodextrinei.

Optimizarea energiilor potențiale a fost făcută pentru a aduce complexele la o geometrie stabilă. În acest scop, a fost utilizat modulul VAMP, un pachet semi-empiric orbital molecular capabil să prezică geometrii, încălzirea formării, momente dipol și quadripol și așa mai departe. Metoda semi-empirică a fost utilizată pentru a reduce timpul de calcul pentru sistemul studiat. Toleranța de convergență aleasă a fost setată pe Medium cu criteriul de convergență a criteriilor de gradient de 0,4 kcal/mol/Å. PM3 NDDO Hamiltonian a fost selectat deoarece acest lucru este recomandat în sistemele biologice, unde este important să se reproducă legăturile de hidrogen. PM3 (Stewart J., 1989) sa dovedit a fi o metodă superioară de evaluare a legăturii de hidrogen în comparație cu AM1 (Dewar și colab., 1985). Mai mult, PM3 păstrează forma circulară a ciclodextrinelor (Li și colab., 2000) Structurile conformaționale au fost simulate având în vedere moleculele găsite în vid la 0K.

7.4.1. Analiza teoretică

Pentru a construi sistemele inițiale a fost utilizată opțiunea Best Fit Plane (fig. 7.17.). Centrul sistemului de referință a fost considerat centrul planului β -CD. Centrele imaginare ale celor două molecule au fost definite utilizând opțiunea "Centroid".

Crearea complexului de incluziune presupune intrarea lui DM în β -CD ca o alunecare liniară. Odată ce are loc suprapunerea celor două centre, se urmărește o rotație a DM, căutând cea mai bună orientare.

Calea de inserție a moleculei oaspete (DM) în gazdă (β -CD), care descrie procesul de formare a complexelor de incluziune β -CD: DM = 1:1, a fost realizată luând în considerare cele două căi de mișcare:

a) Molecula oaspete intră în gazdă prin deschiderea mai mare (baza mare) și există și în marginea îngustă, cu partea H1 (fig.7.16.). Această deplasare liniară de-a lungul axei definește distanțe diferite între DM și β -CD.

b) Când moleculele gazdă și oaspete sunt poziționate cu centroizii lor suprapuși, oaspetele se rotește în jurul axei OX. Această schimbare rotativă generează diferite orientări unghiulare ale moleculei gazdă inclusă în cavitatea CD).

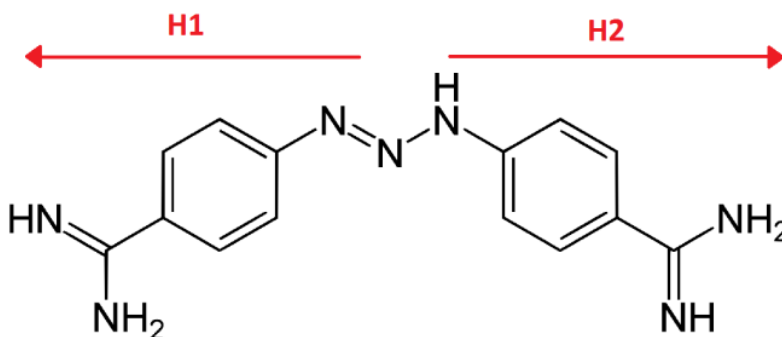


Fig. 7.16. Notările celor două părți ale moleculei de diminazen
Fig. 7.16. The notations of the two parts of the diminazene molecule

Pentru a vedea modul de construire a complexului de incluziune, intrarea DM în CD a fost simulată, prin baza mare, prin deplasarea de la stânga la dreapta. Geometriile de echilibru au fost obținute prin variația distanței X (Å) dintre centrul imaginar al β -ciclodextrinei și centrul imaginar al DM de-a lungul axei OX. Distanța dintre centroizii celor două molecule, gazdă și oaspete, a fost considerată în intervalul (-16, 18) Å. În figura 7.19. se observă variația minimelor energetice. Dacă distanța dintre centroizi este în intervalul (-10, 10) Å, un capăt DM este în interiorul cavității ciclodextrinei. La -12 și, respectiv, 12 Å, minimele energetice au valori mai mici decât cele discutate anterior, astfel încât energia este nefavorabilă în comparație cu compușii de incluziune. Faptul că nu se apropie de 0 indică prezența unor legături intramoleculare suficiente între DM și β -CD, chiar dacă molecula DM nu mai este inclusă în CD. Dacă centroizii sunt la distanțe mai mari de 14 Å, atunci moleculele sunt suficient de distanțate astfel încât să nu existe interacțiuni intramoleculare. Căldura de formare pentru aceste cazuri se apropie de valoarea 0.

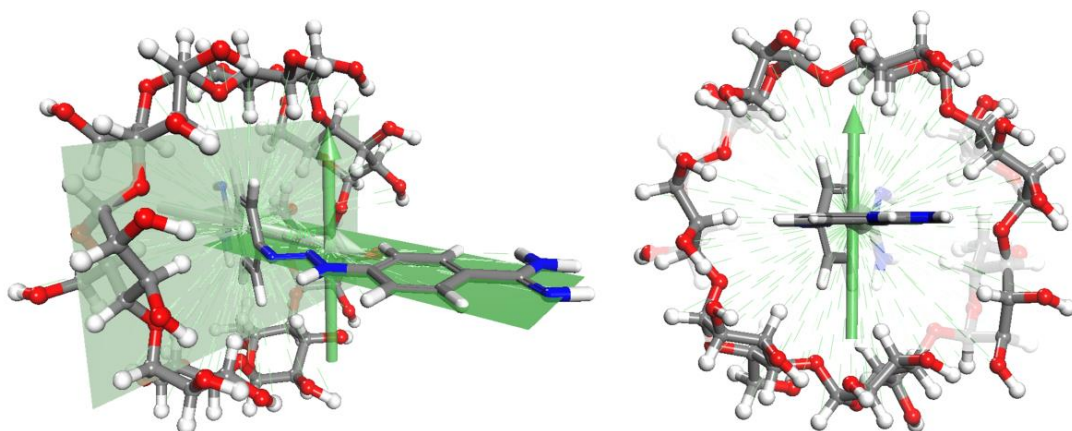


Fig. 7.17. Reprezentarea incluziunii CD-DM (H1) la distanța de 4Å (Vedere laterală stângă, vedere perpendiculară pe planul drept al β-CD; CD-reprezentare CPK, DM-reprezentare stick)

Fig. 7.17. Representations of the inclusion CD-DM (H1) at the distance of 4Å (side-left view, perpendicular view on the right β-CD plane; CD-representation CPK, DM-stick representation)

Valorile negative ale energiei confirmă formarea complexelor de incluziune, unele mai stabile decât altele. Valoarea energetică a formării complexe a fost calculată prin formula:

$$\Delta E = E_{\text{COMP}} - (E_{\text{CD}} + E_{\text{DM}})$$

unde E_{COMP} este valoarea căldurii de formare a complexului CD-DM

și E_{CD} , E_{DM} reprezintă valorile formării de căldură a β-CD, respectiv DM-ului

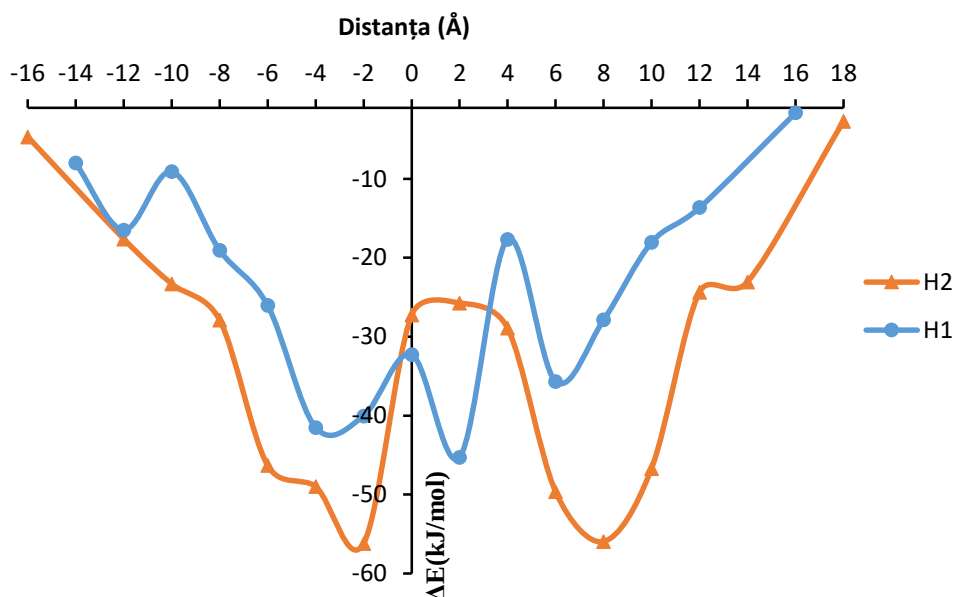


Fig. 7.18. Dependența energiei de formare a complexului pe distanța dintre centrozii gazdei și oaspete pentru ambele direcții de includere a diminazenui în marginea secundară a ciclodextrinei

Fig. 7.18. Dependence of formation energy of the complex on the distance between the centroids of host and guest for both inclusion directions of diminazene in the cyclodextrin secondary edge

Pentru ambele cazuri, cand DM pătrunde prin baza mică a CD fie cu partea H1, fie cu H2, cei mai stabili complecși sunt cei care au centroidul DM în interiorul CD la o distanță de 2, respectiv $-2\text{\AA}$ (valorile energetice sunt $-45,2$ și $-56,19$ kJ/mol) față de sistemul de referință. Următorii complecși cu energii scăzute sunt aceia în care molecula oaspete este parțial inclusă în molecula gazdă, având capătul H2 în interiorul CD, iar H1 în afara bazei mari ($-55,9$ kJ/mol) sau a celei mici ($-41,5$ kJ/mol).

Deși ar exista posibilitatea formării de legături de hidrogen între DM și CD, acest tip de legătură apare doar o singură dată în complecșii cu energiile $-45,2$ și $-55,9$ kJ/mol (legatura de hidrogen s-a calculat pentru o distanță maximă de $3\text{\AA}$) (fig. 7.19). Mai mult decât atât, numărul legăturilor de hidrogen formate în CD din complecși nu diferă de cel al ciclodextrinei singulare. Acest fapt conduce la concluzia că acești complecși de incluziune sunt stabiliizați prin efect hidrofob.

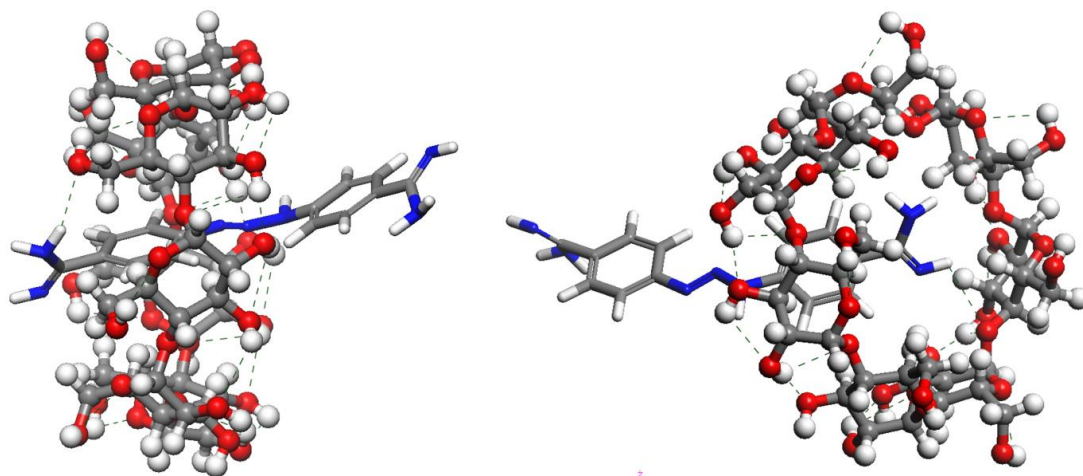


Fig. 7.19. Minimile energetice ale complecșilor cu energie $-45,2$ (stânga) și $-55,9$ kJ/mol (dreapta). Legăturile de hidrogen sunt reprezentate prin linie punctată. În primul caz legătura de H se formează între H diminazenului și un O primar, iar în al doilea caz legătura se formează între H diminazenului și un O glicozidic.

Fig. 7.19. Energy minima of the complexes with energy of $-45,2$ (left) and $-55,9$ kJ/mol (right). Hydrogen bonds represented by dotted line. In the first case the H bond is formed between H from diminazene and a primary O, and in the second case the bond is formed between H from diminazene and a glycosidic O.

A doua modalitate de căutare a minimului energetic a fost prin rotația în jurul axei OX a planului moleculei de DM, pornind de la cele două structuri cu centroide suprapuse. Unghiul Θ definit de axa perpendiculară a planului diminazenului și axa OY a variat cu 30° în intervalul $0-330^\circ$, considerând că molecula de DM pătrunde în β -CD cu capătul H1 și H2 (fig. 7.20).

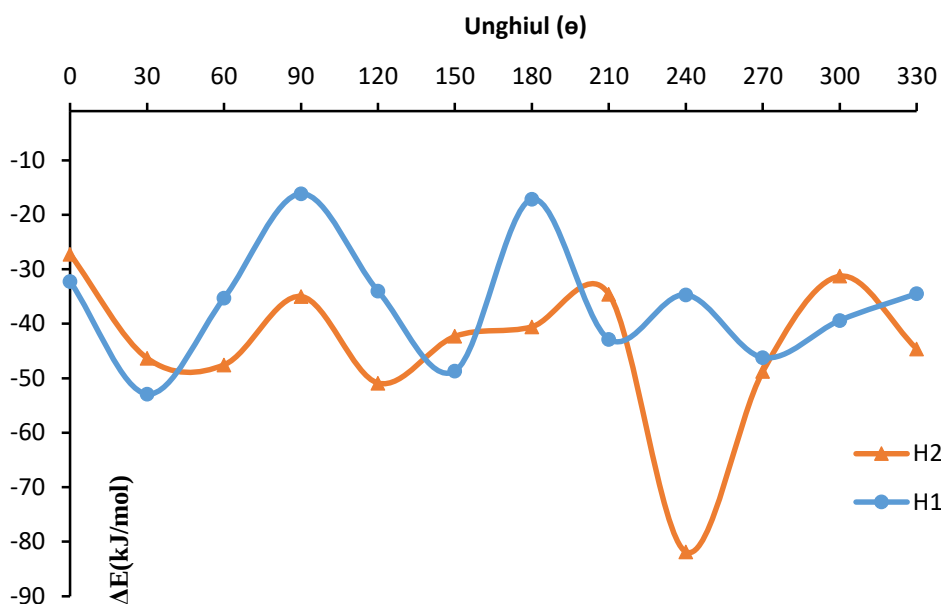


Fig. 7.20. Dependența energiei de formare a complexului pe orientarea moleculei DM (centrozii se suprapun, au fost luate în considerare ambele posibilități de includere prin bază mică)

Fig. 7.20. Dependence of energy of formation of the complex on the orientation of DM molecule (centroids overlap, both possibilities for inclusion on the small basis were considered)

Chiar dacă în cazul H1 se observă o stabilizare ușoară prin variația unghiului Θ față de structura de plecare, valoarea cea mai scăzută a energiei de formare, -81,8 kJ/mol, și deci complexul cel mai stabil se obține tot pentru cazul H2 cu orientarea de 240° față de structura de plecare (fig. 7.21. a).

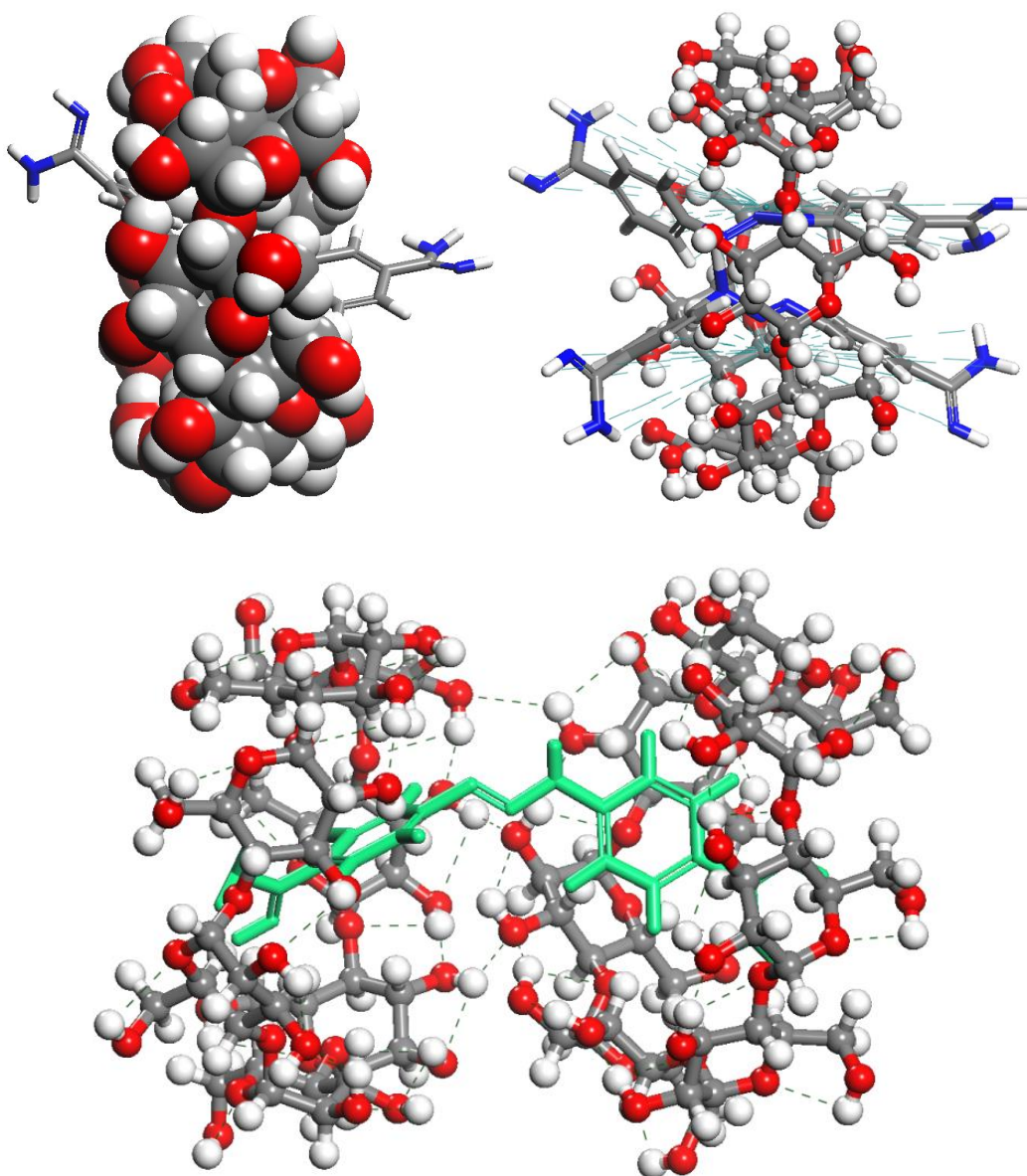


Fig. 7.21. Structuri de minim energetic ale CD:DM 1:1 (a) (CD-reprezentare CPK, DM-reprezentare stick), 1:2 (b) (cu reprezentarea centroidelor pentru moleculele de DM), 2:1 (c) (legaturile de H sunt reprezentate prin linie punctata, iar molecula de DM este reprezentata stick verde).

Fig. 7.21. Minimum energy structures of CD:DM 1:1; a) CD-representation CPK, DM-stick representation, 1:2; b) with the representation of the centroids for molecules of DM, 2:1; c) the H bonds are represented by a dotted line, and the DM molecule is represented by a green stick.

Deoarece cavitatea β -CD este suficient de mare pentru a include două molecule de diminazen, s-a calculat și energia unui astfel de compus. S-a considerat astfel complexul cu centroidele celor trei molecule pe aceeași linie, astfel încât să nu existe “close contact” între ele. Cele două molecule de DM au fost introduse cu capăt

diferit prin baza mare. După minimizare energia complexului este 175,4 kJ/mol, ceea ce indică că acest ansamblu este unul instabil datorită repulsiilor sterice (fig. 7.21. b).

Un alt caz considerat a fost acela al unei complexări de tip CD:DM=2:1, molecula de DM pătrunzând prin baza mare a celor două CD. Minimul energetic (fig. 7.21. c) are valoarea -84,4 kJ/mol, indicând o ușoară stabilizare față de minimul energetic al structurii cu geometria 7.21.a. În acest caz se formează mai multe legături de hidrogen intra- și intermoleculare între CD, dar niciuna între DM și CD.

7.5. Concluzii parțiale

1. β -CD are cavitatea suficient de largă pentru formarea de complecși de incluziune cu diverse medicamente.

2. Formarea complexului de incluziune beta-ciclodextrina-diminazen aceturat s-a pus în evidență prin analiza termică, dar și prin modelare moleculară. Comparatia între valorile energetice ale geometriilor de echilibru indică formarea unor complecși stabili atât pentru raportul de complexare CD:DM=2:1 cât și pentru 1:1.

3. În studiul de față, complexul de incluziune diminazen aceturat/ β -ciclodextrină a fost preparat prin metoda liofilizării și a fost caracterizat.

4. Izoterma curbei de adsorbție/desorbție pentru complexul diminazen aceturat/beta-ciclodextrină evidențiază un volum inert adsorbit mai scăzut decât în cazul solidelor poroase, ceea ce demonstrează gradul înalt de utilizare a cavității β -ciclodextrinice.

5. Distribuția dimensiunilor porilor este mai mare decât diametrul cavităților β -ciclodextrinei, ceea ce demonstrează că majoritatea cavităților β -ciclodextrinei au fost ocupate, deoarece diametrul cavităților β -ciclodextrinei (0,78 nm) este mult mai mic decât diametrul mediu a porilor determinat experimental (3.901 nm).

6. Stabilitatea complexului de incluziune a fost determinată atât în prezența inertului cât și în prezența aerului. Analiza termogravimetrică pentru complexul diminazen aceturat/beta-ciclodextrină, în aer și inert, este similară, ceea ce demonstrează o stabilitate ridicată la oxidarea complexului de incluziune.

7. Existența complexului de incluziune a fost confirmată prin spectroscopia cu IR. Intensitatea vârfurilor adsorbției (IR intensity) au arătat informații suficiente pentru prezența incluziunii.

8. Imaginile FT-IR ale suprafeței complexului DM- β -CD arată ca acest complex este eterogen. A fost identificată prezența unei ciclodextrine, dar baza de date nu conține informații despre o parte a zonei imaginii FT-IR.

9. Din analizele TEM se observă, pe baza diferenței de culoare, alternanța dintre cele două componente ale complexului de incluziune și forma și mărimea compusului de incluziune.

10. Microscopia de forță atomică oferă informații structurale ale complexului ce relevă formațiuni globuloase rotunde și isolate care nu își schimbă structura la aplicarea AFM.

11. Studiul acesta s-a încheiat prin publicarea unui articol în Revista de Chimie: **Andrei-Cristian LUPU**, Mihaela BOMBOȘ, Gabriel VASILIEVICI, Liviu Dan MIRON, *Synthesis and characterization of inclusion complex of diminazene aceturate with β -cyclodextrin*, (acceptata pentru publicare în Revista de Chimie, vol. 70, nr. 7. 2019 - IF 1.412).

CAPITOLUL 8. STUDIUL *IN VITRO* AL DIMINAZENULUI COMPLEXAT CU B-CICLODEXTRINA PENTRU *ICHTHYOPHTHIRIUS MULTIFILIIS*

CAPITOLUL 8. IN VITRO STUDY OF DIMINAZENE ACETURATE COMPLEXED WITH B-CICLODEXTRINA FOR ICHTHYOPHTHIRIUS MULTIFILIIS

Introducere

Ciliatul histiofag "*Ichthyophthirius multifiliis*" poate provoca mortalitate la puietul de crap de crescătorie "*Cyprinus carpio*" precum și alte specii de pești. În studiul prezent s-a analizat o substanță cu efect antiparazitar (diminazen aceturat) și complexul acesteia cu o ciclodextrină (β -ciclodextrina) pentru a observa activitatea lui împotriva acestui agent patogen *in vitro*. Scopul acestui studiu este acela de a pune în evidență potențialul terapeutic al diminazenului. Complexul s-a dovedit a fi eficient (adică a ucis toți paraziții într-o perioadă de testare de 6-8 de ore). Administrarea în apa filtrată sugerează că acești compuși nu pot fi eficienți în administrarea sub formă de băi. Având în vedere aceste constatări, în studiul de față s-a analizat utilitatea potențială a chimioterapiei ca o strategie pentru controlul ciliatozelor la peștii de crescătorie.

Diminazenul este o diamidină aromatică de origine sintetică legată de o punte triazenică. Procedura experimentală pentru sinteza acestui compus și a altor diazoaminobenzeni a fost raportată de Hochst (Hochst, 1954) având obiectivul principal a combate bolile cauzate de protozoare transmise prin sânge, cum ar fi *Trypanosoma sp.* și *Babesia sp.* Diminazenul este, de asemenea, cunoscut ca și diminazen aceturat atunci când constituie o formulare farmaceutică care conține doi compuși de sare aceturată (Atsriku și col., 2002). Procedura experimentală pentru sinteza diminazenului aceturat derivă din caracteristicile fizico-chimice ale diminazenului, cum ar fi instabilitatea și insolubilitatea în soluții apoase.

Deoarece diminazenul aceturat a fost utilizat timp de decenii în tratamentul tripanosomiozei animalelor, unele specii din genul *Trypanosoma*, cum ar fi *T. congolense*, dezvoltă toleranță și rezistență (Moti și col., 2015). Din acest motiv, în ultimii ani, în mai multe studii s-au căutat noi aplicații farmacologice și s-au investigat alternative pentru a îmbunătăți succesul în tratamentul pentru tripanosomoză folosind noi medicamente în asociere cu agentul chimioterapeutic diminazen aceturat (Mbaya, 2009; Tonin, 2011).

În ciuda literaturii științifice existente care abordează acest subiect de mai bine de 50 de ani, câteva articole au discutat în detaliu activitățile chimice/farmacologice ale diminazenului aceturat. Două articole de revizuire vaste (Peregrine, 1993) au

evidențiat funcțiile sale farmacologice, cea mai recentă fiind cea a lui Kuriakose și colab. (Kuriakose, 2014), care raportează importanța farmacologică pentru modularea sistemului imunitar.

Prin urmare, diminazenu aceturat a fost ținta studiilor cu privire la potențialul său terapeutic și a reprezentat un mare interes în dezvoltarea de noi cercetări. Astfel, având în vedere potențialul farmacologic al diminazenu, scopul acestui studiu a fost de a evidenția efectele farmacologice ale acestuia prin includerea într-o ciclodextrină (β -ciclodextrina) și utilizarea complexului împotriva unor protozoare parazite acvatice cum ar fi *Ichthyophthirius multifiliis*.

Ichthyophthirius multifiliis este un protozoar care produce “boala petelor de griș” și reprezintă un pericol major pentru fermierii și acvariștii din întreaga lume. Stadiul infestant al parazitului invadează pielea și branhiile peștelui, pătrunde în epiderm și se situează deasupra lamei bazale (Ventura, 1985). Aici se transformă în stadiul de trofont care se hrănește cu țesut până când ajunge la o dimensiune de 0,5-1,0 mm și este vizibil macroscopic (Buchmann, 2001). Trofontul se desprinde de pe pește și se transformă într-un tomont, care caută pe fundul bazinului suprafețe pentru a se închista sub formă de tomocist în care are loc reproducerea asexuată. Atunci când trofontul părăsește activ gazda-pește, acesta perforază epiderma și epiteliul bazal, ceea ce modifică procesele de osmoreglare și poate crea porți de intrare pentru agenți microbieni oportuniști care produc infecții secundare (Matthews, 2005).

Agenții chimio-terapeutici utilizați pentru a controla *I. multifiliis* cauzează preocupări privind siguranța alimentară și prezintă o potențială toxicitate pentru mamifere și mediu (Reverter și colab., 2014). De exemplu, utilizarea verdului de malachit a fost interzisă în mai multe țări la peștii dați spre consum din cauza efectelor sale carcinogene și teratogene asupra oamenilor (Shinn și col., 2012). Vaccinarea a fost privită ca o potențială prevenire a ihtioftiriozei în acvacultură (Jørgensen, 2017; Xu și col., 2009). Cu toate acestea, anticorpii sunt specifici serotipului și protejează numai pești împotriva *I. multifiliis* cu același serotip de antigeni (Wang și Dickerson, 2002). În prezent, nu există disponibile vaccinuri comerciale împotriva lui *I. multifiliis* (Dickerson și Findly, 2014). O abordare alternativă a controlului *I. multifiliis* este utilizarea de produse naturale (Fu și colab., 2014, Liu și colab., 2017, Zhang și colab., 2013).

Au mai fost utilizate diferite tratamente pentru combaterea parazitului cu medicamente acceptate în conformitate cu noua legislație privind toxicitatea și carcinogenitatea substanțelor aplicate.

În acest studiu, am evaluat eficacitatea DA în forma unui complex cu β -CD comparativ cu forma sa simplă, pentru a obține un efect *in vitro* asupra protozoarului *Ichthyophthirius multifiliis*.

8.1. Material și metodă

Substanțele folosite, diminazenu aceturat (DA) (puritate > 97%) și β -ciclodextrina (puritate > 98%) au fost achiziționate de la Sigma-Aldrich. Toți ceilalți reactivi au avut calitate analitică. Apa utilizată a fost dublu distilată și deionizată.

Toate experimentele și etapele de manipulare s-au efectuat la 22°C. Peștii au fost prelevați de la “Stațiunea de Cercetare-Dezvoltare pentru Acvacultură și Ecologie Acvatică” a Univ. “Al. I. Cuza” din Iași. Crapii au fost infestați natural cu *I. multifiliis* (fig. 8.1.) și au fost anesteziați cu ulei de cuișoare (0,3ml/L), iar probele de mucus s-au colectat prin raclarea tegumentului. Mucusul a fost dispersat într-un vas Petri conținând apă dechlorinată. Sub un stereomicroscop, trofonții vii (fig. 8.1.) au fost preluați cu o pipetă Pasteur și plasați într-un alt vas Petri conținând apă dechlorinată. Acest pas s-a repetat de două ori pentru a separa trofonții de mucusul din jur.



Fig. 8.1. Trofonții de *I. multifiliis* (x20)

Fig. 8.1. Trophonts of *I. multifiliis* (x20)

Folosind diminazen aceturat și complexul β -CD-diminazen aceturat, s-a preparat o soluție stoc de 100 mg/ml în dimetil-sulfoxid (DMSO) și s-a diluat la concentrațiile necesare folosind apă dechlorinată. pH-ul apei dechlorinate nu a fost afectat de adăugarea substanțelor rămânând în intervalul de 7,5-8,0. Pentru testele *in vitro*, s-au adăugat 2 ml de soluție de testare în godeurile plăcilor de microtitrare, peste care s-a introdus un număr de 100 trofonți. Controalele au fost făcute în apă dechlorinată conținând concentrațiile adecvate de DMSO. După 6 ore, trofonții viabili și neviabili au fost numărați sub un stereomicroscop, iar mișcarea și structura intactă s-au considerat a fi criterii de viabilitate. Plăcile de microtitrare au fost reincubate timp de încă 12 ore. Numărarea trofonților s-a realizat la un microscop Motic 40X cu ajutorul camerei de numărare Bürker-Türk.

Din compuși s-au preparat soluții stoc sau suspensii de compuși pulbere în apă distilată sau dimetilsulfoxid (DMSO). Stocurile rezultate sau soluțiile achiziționate comercial au fost diluate în soluție salină fiziologică bazată pe fosfat (PBS, pH 7,2) sau în apă la concentrațiile finale utilizate în screening. Testele efectuate în apa filtrată permit excluderea automată a posibilității de inactivare parțială sau totală a substanței testate în condițiile date. O substanță considerată a fi eficientă *in vitro* prin această procedură, poate fi eficientă și în administrarea prin îmbăieri sau în furajul medicamentat la peștii infestați.

Ciliatele în faza exponențială tardivă sau în faza platou timpurie a culturii au fost concentrate prin centrifugare la 650 x g timp de 5 minute și apoi resuspendate în PBS sau în apă filtrată. După numărarea într-un hemocitometru s-au adăugat 10 μ l de suspensie de ciliate conținând ~100 ciliate în fiecare godeu de plăci de microtitrare cu 96 de godeuri conținând 90 μ l ale antiprotozoarului candidat la doza necesară în PBS sau în apa filtrată. Dozele finale testate au fost: 100, 50, 25, 12.5, 6.2, 3.1, 1.5 și 0,8

ppm pentru substanțele testate rămase. Fiecare determinare a fost efectuată în două exemplare. Pentru a exclude posibilele efecte ale solventului, în compuşii dizolvați în DMSO, au fost incluse și godeuri duplicate cu PBS sau apă filtrată conținând cea mai mare concentrație de DMSO utilizată (până la 2,5%). Plăcile s-au incubat la 18°C timp de 24 de ore. Verificarea motilității ciliare precum și integritatea protozoarelor după incubare s-a efectuat utilizând un microscop Motic din dotare. Concentrația minimă letală (CML) pentru fiecare medicament a fost definită ca fiind cea mai mare diluție de medicament la care 100% din ciliate au fost lizate sau lipsite de motilitate (nu a existat nici o dovadă a mișcării cililor utilizând un obiectiv de 40X).

8.2. Rezultate și discuții

Deși efectele asupra morfologiei celulare au fost diferite, majoritatea substanțelor au avut activitate și au indus modificări precum rotunjirea și vacuolizarea celulelor parazitare înainte de eventuala liză. În testele cu β -CD-diminazen aceturat, toate ciliatele au murit după 6 ore cu doze de 100 și respectiv 80 ppm. În studiile *in vitro* similare, diminazen aceturat s-a dovedit a fi eficient și împotriva altor agenți patogeni ai peștilor, cum ar fi *Gyrodactylus* spp. Acest compus nu este utilizat în mod obișnuit în acvacultură pentru controlul paraziților ectodermici. Cu toate acestea, considerăm că diminazenul este adecvat pentru tratamentul acestei boli, având în vedere ectoparazitismul lui *Ichthyophthirius multifiliis*. Diagnosticul într-un focar de ciliatoză datorat lui *Ichthyophthirius multifiliis* se bazează pe prezența numeroaselor ciliate în tegument și în branhii. În astfel de cazuri, capacitatea respiratorie a peștilor este compromisă în mod serios, iar tratamentul nu va fi eficient, moartea peștilor având loc prin sufocare determinată de reducerea disponibilității oxigenului. Cu toate acestea, având în vedere eficacitatea sa pentru uciderea formelor libere ale ciliatului, tratamentul poate fi utilizat în acvacultură în scop profilactic.

Substanța medicamentoasă folosită a fost diminazenul aceturat sau Berenilul. Acesta a fost un medicament foarte folosit în tripanosomiaza și babesioză. Deși compusul este pe piață din 1955, mecanismele sale de acțiune sunt puțin înțelese. În timp ce raportările timpurii arată că diminazenul posedă proprietăți tripanolitice și tripanostatice, unele studii arată că poate afecta sistemul imunitar al gazdei. Studiile recente arată că tratamentul cu Berenil reduce producția de citokine proinflamatorii (IL-6, IL-12 precum și TNF) *in vivo* și *in vitro*. Abilitatea diminazenului de a deregla căile majore intracelulare de semnalizare ce conduc la producerea de citokine proinflamatorii, indică faptul că poate fi utilizat în tratamentul bolilor ce produc în exces citokine proinflamatorii (Shiby K., 2014).

8.2.1. Analiza *in vitro* a complexului pentru *I. multifiliis*

Complexul β -CD-diminazen aceturat a prezentat cea mai mare activitate împotriva lui *Ichthyophthirius multifiliis* (MLC=80 ppm). Acest produs inhibă transportul de electroni asociat cu fosforilarea oxidativă și, astfel, privează celula de sursa sa de energie. β -CD-Diminazen aceturat are, de asemenea, activitate letală "*in vitro*"

împotriva *Tetrahymena pyriformis*, un alt ciliat patogen. Cu toate acestea, în ciuda eficacității sale “*in vitro*”, o serie de factori trebuie luați în considerare în realizarea testelor care vizează determinarea capacității terapeutice “*in vivo*”. În primul rând, administrarea prin îmbăieri trebuie efectuată cu prudență, deoarece acest compus este foarte toxic pe această cale (Schmahl și colab., 1989). În al doilea rând, diminazenu aceturat prezintă o absorbție intestinală mai slabă în comparație cu β -CD-diminazenu aceturat (Swan, 1999), astfel încât toleranța administrării orale în alimente poate fi mai mare decât toleranța administrării prin îmbăiere.

Tabel 8.1./Table 8.1.

Eficacitatea substanței complexate la diferite doze (mortalitate după 6 h)
The efficacy of complexed drug at different doses (mortalities after 6 h)

Doza (ppm)	Control	DA	β -CD-DA
1,5	0	12	1
3,1	1	19	5
6,2	1	25	8
12,5	1	32	17
25	1	35	30
50	1	34	80
100	32	87	100

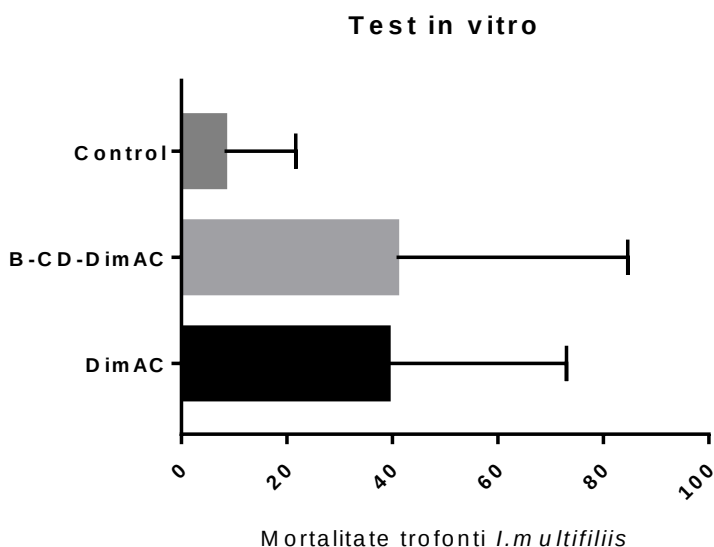


Fig. 8.2. Eficacitatea substanțelor după 6h
 Fig. 8.2. Effectiveness of substances after 6h

Mai mult, β -CD-diminazen aceturat poate fi un candidat bun pentru controlul ciliatozelor cauzate nu doar de *Ichthyophthirius multifiliis*, ci și de alte protozoare care parazitează în țesuturi (Schmahl și colab., 1989). Mecanismul de acțiune nu este clar, deși s-a sugerat că acestea pot acționa asupra enzimelor, afectând sinteza pirimidinei.

Deși s-a demonstrat că administrarea medicamentelor prin îmbăiere la pești este foarte eficientă împotriva anumitor paraziți intracelulari sau tisulari, putem presupune că eficacitatea complexului ar fi mai semnificativă prin adăugarea lui în furaj. Prin urmare, administrarea orală a trebuit să fie inclusă în cercetările noastre pentru a putea evalua rezultatele eficacității “*in vivo*”.

8.3. Concluzii parțiale

Complexul β -CD-diminazen aceturat s-a dovedit a fi eficient împotriva ciliatelor lizându-le în 6-8 de ore la doze destul de mari (CML= aprox. 80 ppm în ambele cazuri). Numeroși autori au raportat eficacitatea îmbăierii pentru tratarea ectoparaziților și infestațiilor cu protozoare subepidermice ale peștilor. Mai mult decât atât, administrarea continuă de diminazen în hrana peștilor este o țintă eficientă pentru eliminarea trofontilor ciliatului *Ichthyophthirius multifiliis* care parazitează în tegumentul peștilor. În acest caz, compusul necomplexat provoacă ruptura membranei alveolare externe și modifică digestia intracelulară. Mecanismul substanței antiprotozoarice nu este precis cunoscut și pare să difere de la un organism la altul. Cu toate acestea, la alte protozoare, diminazenul aceturat datorită structurii sale chimice care conține două grupuri cationice identice (diamidina dicationică), prezintă o mare afinitate pentru secvențele de perechi de baze adenină-timină în ADNc, ducând astfel la interacțiuni necovalente (interacțiuni electrostatice și legături de hidrogen). În genomul mitocondrial, diminazenul aceturat interacționează puternic cu canelura minoră a dublului helix, astfel încât această diamidină dicationică compromite procesele esențiale de replicare și induce modificări în ribozomi, membranele mitocondriale și transportul aminoacizilor (Kuriakose și col 2012, Sow și col., 2012, Caramelo-Nunes C., 2011). Datorită capacității acestui compus de a produce mortalitate *in vitro* pentru *Ichthyophthirius multifiliis*, precum și posibile efecte asupra diviziunii celulare similare ca la alte protozoare sugerează că eficacitatea lui *in vivo* trebuie analizată independent.

În concluzie, complexul de incluziune testat s-a dovedit eficient împotriva *Ichthyophthirius multifiliis in vitro*. Având în vedere aceste rezultate, eficacitatea *in vivo* a acestui compus merită în mod clar atenție. Cu toate acestea, trebuie avut în vedere faptul că pot apărea diverși factori care să influențeze succesul măsurilor chimioterapeutice asupra ciliatozelor la crapul de crescătorie sau la alți pești. În primul rând, *Ichthyophthirius multifiliis* este o specie extrem de virulentă care se divizează rapid (prin diviziune binară) și care migrează prin țesuturi. În al doilea rând, doar câțiva agenți chimioterapeutici au fost acceptați pentru utilizarea în acvacultură de către

organele legislative din diverse țări, ceea ce face ca alegerea medicamentelor pentru tratamentul bolilor infecțioase sau parazitare ale peștilor, inclusiv ciliatoza, să fie dificilă.

În cele din urmă, faptul că acest complex de incluziune din studiul prezent a arătat o activitate crescută *in vitro*, înseamnă că poate fi destul de eficient și în administrarea pe cale orală (într-un furaj medicamentat), dar acest lucru este foarte greu de realizat la peștii aflați într-un stadiu avansat al bolii.

Acest studiu s-a încheiat prin publicarea articolului: **Andrei-Cristian Lupu**, Alin Barbacariu, Constantin Roman, Andrei-Alexandru Cîmpan, Raluca Mîndru, Gabriela-Victoria Martinescu, Liviu Dan Miron, (2018) - *In vitro study of diminazene aceturate complex with β -cyclodextrin for Ichthyophthirius multifiliis*, Lucr. ȘT. USAMV Iași, seria Medicină Veterinară, Ed. "Ion Ionescu de la Brad" Iași, vol. 61/2018, ISSN 2393-4603, p. 58-64.

CAPITOLUL 9. STUDIILE *IN VIVO* PRIVIND INVESTIGAREA COMPLEXULUI BETA-CICLODEXTRINĂ-DIMINAZEN ACETURAT UTILIZAT ÎN TRATAMENTUL CILIATOZELOR

CHAPTER 9. STUDIES OF *IN VIVO* INVESTIGATION OF BETA-CYCLODEXTRIN DIMINAZENE ACETURATE COMPLEX USED IN CILIATOSIS TREATMENT

9.1. Prepararea furajului ce conține medicamentul

S-a preparat mai întâi un amestec omogen al complexului de medicamente și al furajelor comerciale cu ajutorul unui mojar și pistil. Furajele comerciale folosite pentru crap au fost granule de la Aller Aqua A/S® (componente sangvine, DDGS, făină de pene, făină de pește, făină de pasăre, rapiță, ulei de rapiță, soia, concentrat proteic de floarea-soarelui, triticale, vitamine).

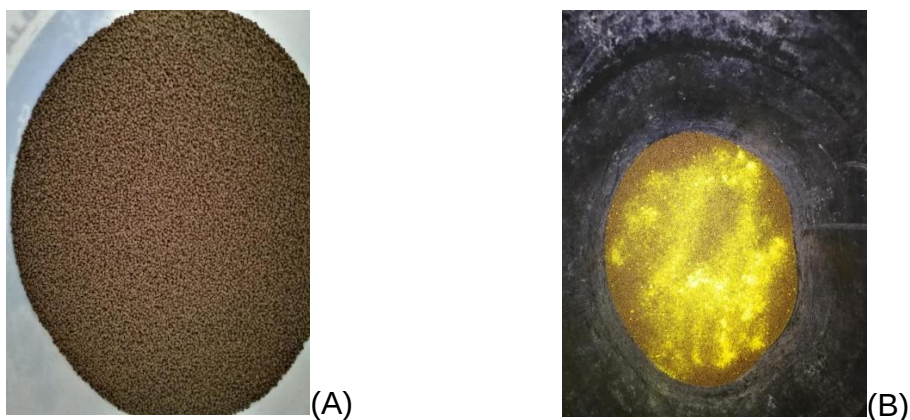


Fig. 9.1. Furajul folosit pentru includerea medicamentului (A) – Furajul de crap înainte de turnarea complexului; B) - Furajul de crap după turnarea complexului

Fig. 9.1. The feed used for the inclusion of the drug (A) – simple carp feed before pouring the complex; B) – The carp feed after pouring the complex)

Furajul s-a măcinat într-o moară cu lamă. Amestecul a fost umezit cu apă pentru a obține o consistență adecvată pentru extrudarea ulterioară, apoi a fost extrudat (într-un extruder - fig. 9.2.) folosind cilindru cu un orificiu de 2 mm. Granulele obținute au fost uscate într-un cuptor timp de 24 de ore. Acestea au greutatea medie de 0,2g/granulă, iar un kilogram de furaj conține în jur de 5000 de granule.

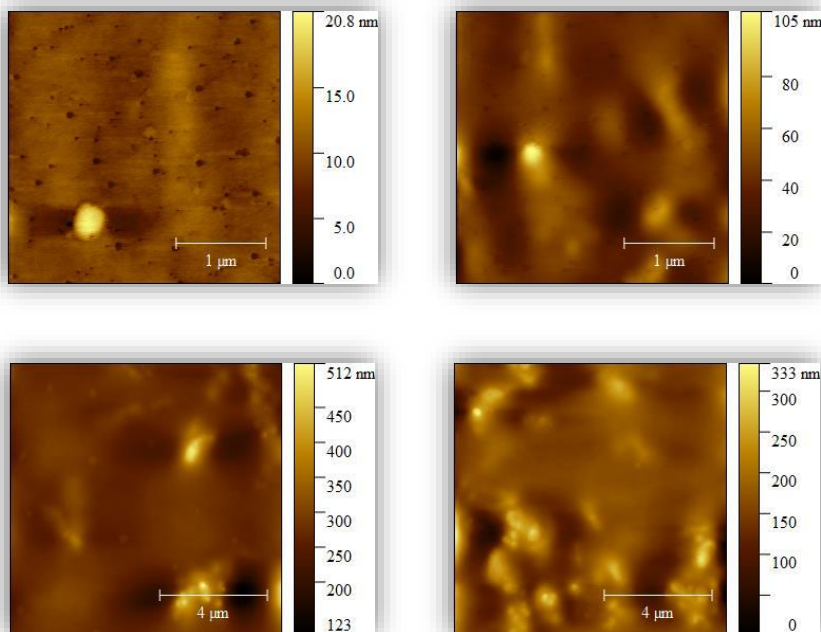


Fig. 9.2. Extruderul folosit pentru granularea furajului medicamentat
 Fig. 9.2. The extruder used for medicated feed granulation

9.2. Caracterizarea hranei pentru animale

Conținutul de medicament din hrană poate fi determinat prin spectrofotometrie la 306 nm. Au fost efectuate teste de eliberare de 15 minute (15 minute fiind timpul maxim estimat de compactare a furajului) pentru a determina dacă pot fi pierdute cantități semnificative de medicament după eliberarea în apă înainte de ingestie.

Stabilirea substanței în furaj s-a evaluat folosind microscopia de forță atomică (AFM-Atomic Force Microscopy) (fig. 9.3, fig. 9.4.) pentru a vizualiza medicamentul și complexul din furaj.



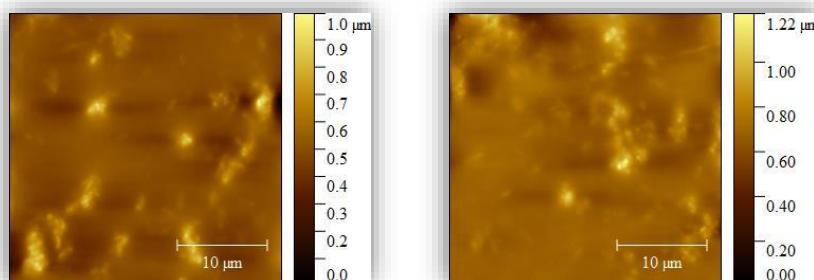


Fig. 9.3. Imagine AFM Furaj medicamentat - Complex diminazene aceturat/ β - ciclodextrina
 Fig. 9.3. AFM Image medicated feed –Diminazene aceturate/ β -cicoldextrine complex

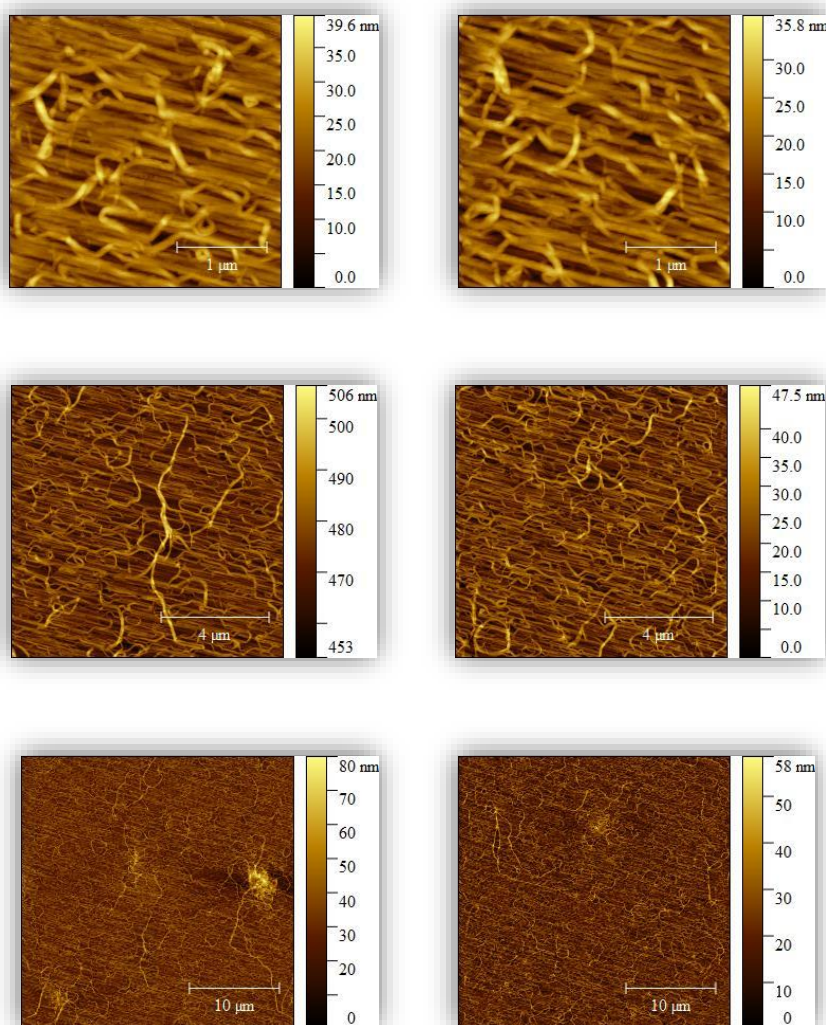


Fig. 9.4. Imagine AFM cu Furaj medicamentat diminazene aceturat simplu (necomplexat)
 Fig. 9.4. AFM Image medicated feed with simple (uncomplexed) diminazene aceturate

9.2.1. Determinarea conținutului medicamentos

Hrana (15 mg) conținând medicament a fost cântărită, măcinată și menținută timp de 24 de ore în 500 ml de amestec de apă și acid acetic 1:50 v/v (pentru a asigura dizolvarea completă a medicamentului). Probele au fost apoi centrifugate la 2000 rpm timp de 10 minute la temperatura camerei și filtrate prin membrane de azotat de celuloză (mărimea porilor 0,45 μ m). Conținutul de medicament a fost determinat în filtrat prin spectrofotometrie UV la 306 nm.

9.2.2. Studiile de eliberare

Furajul (15 mg) care conține medicamentul a fost plasat într-un pahar ce conținea 500 ml de apă și a fost supus unei agitări magnetice lente. După 15 minute, s-a luat un subeșantion și s-a centrifugat. După filtrare s-a îndepărtat supernatantul, medicamentul a fost cuantificat prin spectrofotometrie UV.

9.3. Studii *in vivo*

9.3.1 Materialul piscicol

Peștii (*Cyprinus carpio*) au fost obținuți de la o fermă piscicolă locală (fig. 9.5.) (Stațiunea de Cercetare-Dezvoltare pentru Acvacultură și Ecologie Iași) și au fost aclimatizați timp de cel puțin 36 de ore într-un rezervor de 250L, cu aerare și temperatură constantă ($19 \pm 1^\circ\text{C}$, pH 6,5). Ciclul natural lumină-întuneric a fost simulat (14-16 ore lumină, 8-10 ore întuneric), peștii fiind hrăniți zilnic cu o hrană comercială.



Fig. 9.5. *Cyprinus carpio* - puiet

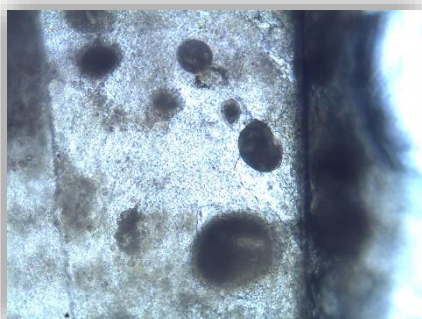
Fig. 9.5. *Cyprinus carpio* - juvenile

9.3.2. Infestația

Peștii utilizați pentru analizare au fost infestați natural cu *I. multifiliis*, dar și cu alți paraziți. Aceștia prezentau semne clinice specifice bolii, care a fost confirmată ulterior prin examinarea raclatului dermic la microscop (Motic x20)(fig. 9.6.).



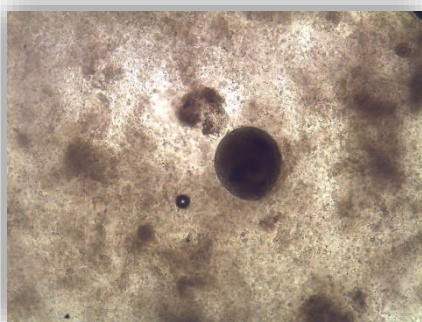
A)



B)



C)



D)

Fig. 9.6. Trofonți de *I. multifiliis* colectați de la peștii luați în studiu(x20)

Fig. 9.6. Trophonts of *I. multifiliis* taken from the experimental fish(x20)

9.3.3. Medicamente și analiză

Tratamentul cu diminazen și compusul complex de incluziune cu β -ciclodextrina al acestuia a fost efectuat pe grupuri de 7 pești infestați și menținuți în rezervoare de 180L. Testele de control simultan (7 pești care au primit furaje identice, dar fără medicament) au fost de asemenea efectuate. Condițiile rezervorului (sursa de apă, debitul, aerarea, pH, temperatură, ciclu lumină/întuneric) au fost identice cu cele din perioada de acclimatizare. Peștii pentru testare au primit furaje conținând medicament (5g/kg furaj) zi de zi pe tot parcursul experimentului. În toate cazurile, furajele furnizate au fost 1,7-2% din greutatea corporală pe zi. De-a lungul perioadei

de testare, peștii au fost monitorizați în mod regulat pentru a se asigura că mănâncă alimentele și pentru a verifica semnele de toxicitate.

Nu au existat diferențe semnificative în greutatea inițială (Tabel 9.1.) ($P < 0,05$). Peștii au consumat furajele în mod voluntar la începutul studiului în toate grupurile. Peștii recoltați sunt puietși din specia *Cyprinus carpio* cu masele corporale între 78 -101 g.

Tabel 9.1. / Table 9.1.

Masele peștilor selectați pentru studiu
Fish masses selected for study

LOT MARTOR		LOT EXPERIMENTAL	
Nr.	PENTRU	CU DIMINAZEN	CU COMPLEX β -CD-
Crt.	CONTROL	ACETURAT	DIMINAZEN
1.	82,32 g	86,35 g	87,19 g
2.	78,83 g	91,02 g	101, 95 g
3.	93,24 g	88,33 g	87,95 g
4.	82,22 g	81,48 g	88, 04 g
5.	88, 37 g	95,66 g	95,15 g
6.	97, 82 g	99,07 g	94,22 g
7.	79,35 g	82,77 g	97,11 g

La 24 de ore după terminarea testului, peștii au fost anesteziați cu ulei de cuișoare (*Eugenia caryophyllata*)(40mg/l sau 2mL/L) pentru determinarea intensității infecției.

În prima serie de analize a fost comparată eficacitatea furajului ce conține medicament necomplexat și furajului ce conține complexul β -ciclodextrină-medicament (în ambele cazuri cu 5g medicament/kg furaj) pentru tratarea infestației cu *I. multifiliis*. Pentru aceste teste s-au folosit pești infestați în mod natural, permițând evaluarea eficacității tratamentului.

În cadrul testelor s-a început tratamentul imediat și s-a continuat timp de 10 zile. Durata infestației cu *I. multifiliis* este variabilă de aproximativ de 9-10 zile și este dependentă de temperatură(Tojo și col, 1994; Tojo și Santamarina, 2001). Aceste analize testează astfel eficacitatea medicamentului împotriva diferitelor etape din ciclului de viață al parazitului.

9.3.4. Determinarea intensității infecției

Peștii au fost anesteziați prin imersie în apă cu ulei de cuișoare (*Eugenia caryophyllata*) (2 ml/L) într-un bazin separat de 150 L, până când respirația a devenit slabă. Probele de mucus au fost prelevate prin răzuirea ușoară a unei părți a suprafeței

corporale a peștilor (piele și aripioare). Probele de mucus au fost apoi examinate la microscop (Motic 100x). În cazul peștilor infestați în mod natural, intensitatea infestației a fost înregistrată pe o scală de cinci puncte după examinarea întregului câmp.

9.4. Rezultate și discuții

Interacțiunile în soluție dintre medicament și β -ciclodextrină au fost investigate prin examinarea diagramei în faza de solubilitate. După cum se poate observa, solubilitatea crește odată cu creșterea concentrației de β -ciclodextrină, indicând faptul că aceste complexe de incluziune au o solubilitate apoasă limitată. Cu toate acestea, solubilitatea în echilibru a complexului este mai mare decât cea a medicamentului singur.

În comparație cu valorile obținute pentru complexe de incluziune cu ciclodextrină ale altor medicamente, constanta de stabilitate în cazul nostru are o valoare ridicată, datorată interacțiunilor puternice dintre β -ciclodextrină și medicament. Deși ridicată, această constantă de stabilitate se încadrează în intervalul optim pentru îmbunătățirea biodisponibilității medicamentelor slab solubile; valorile sub acest interval implică disocierea excesivă în soluție, conducând la precipitarea medicamentului, în timp ce valorile foarte mari implică disociere inadecvată, astfel încât concentrațiile libere de medicament rămân insuficiente pentru o absorbție eficientă.

Forma de dozare selectată (adică hrana care conține medicamentul) necesită ca granulele furajere să rămână în apă până când sunt ingerate. În aceste condiții este foarte important să existe pierderi minime de medicament din forma dozată în primele câteva minute de la contactul cu apa; pierderile de medicament ar putea conduce la contaminarea apei. Componentele principale ale furajului (făină, proteine, uleiuri etc.) și procedurile utilizate la fabricarea acestuia (tipic extrudare) favorizează eliberarea neglijabilă sau foarte lentă. Odată ingerat, mediul gastrointestinal favorizează dezagregarea și digestia, ceea ce duce la eliberarea componentelor solubile conținute în granulă. Pentru a confirma acest lucru, s-a determinat cantitatea de medicament eliberată în primele 15 minute în contact cu apa la o temperatură apropiată de cea a rezervoarelor de creștere (20°C), cu agitare ușoară. Rezultatele noastre indică faptul că atât granulele care conțineau doar medicamentul necomplexat, cât și granulele realizate cu complexul nu au eliberat cantități semnificative de medicament în această perioadă. Important este ca peștele să consume toate granulele (peleții) în decurs de 15 minute.

După confirmarea faptului că medicamentul nu se pierde din granule în apă, s-au efectuat teste în care crapul infestat a primit o hrană ce conține un medicament sau un complex. Hrana care conținea complexul a fost mâncată rapid și nu s-a observat nici o dovadă a palatabilității scăzute; prin contrast, furajele care conțineau numai medicamentul (diminazen aceturat) au fost respinse uneori. Acesta este, desigur, un aspect important pentru un tratament administrat în hrana pentru animale. Se cunoaște

capacitatea ciclodextrinei de a ascunde gustul nedorit al medicamentelor, cum ar fi gustul amar, care se întâlnește și în cazul diminazenuului.

Rezultatele tratamentului administrat peștilor sub formă de furaje care conțin medicamentul sau complexul. După cum se poate observa, peștii netratați au menținut intensități ridicate ale infestațiilor, iar 2 din cei 7 pești au murit în timpul perioadei de testare de 10 zile. La peștii tratați cu diminazen necomplexat, nu a apărut mortalitate, dar intensivitatea infestațiilor a rămas ridicată la toți peștii pe tot parcursul perioadei de testare. Prin contrast, la peștii tratați cu diminazen complexat, intensivitatea infestațiilor a scăzut la zero pentru 3 din cei 7 pești și la niveluri foarte scăzute la ceilalți 4 pești (Tabelul 9.2.).

Tabel 9.2./Table 9.2.

Rezultatele tratamentului peștilor cu furajul care conține Diminazen aceturat (DM) sau DM- β -Ciclodextrina (în ambele cazuri 5g medicament/kg furaj, timp de 10 zile)

The results of treatment of fish with feed containing Diminazen aceturate (DM) or DM- β -Cyclodextrin (in both cases 5g drug/kg feed for 10 days)

Nr. exemplar crap	DM-β- Ciclodextrina	DM	Control
1	+	+++	+++
2	+	+++	+++
3	±	+++	+++
4	±	+++	+++
5	-	++	++
6	-	+++	M
7	-	++	M

Materialul piscicol utilizat în aceste teste (7pești per grup) a fost infestat natural cu protozoarul *I. multifiliis*. Legendă: zero (-) niciun trofont detectat; foarte mic ($\pm$), un singur trofont; redus (+) 2-10 trofonți; moderat (++) 11-50 trofonți; ridicat (+++) >50 trofonți; (M) pește mort.

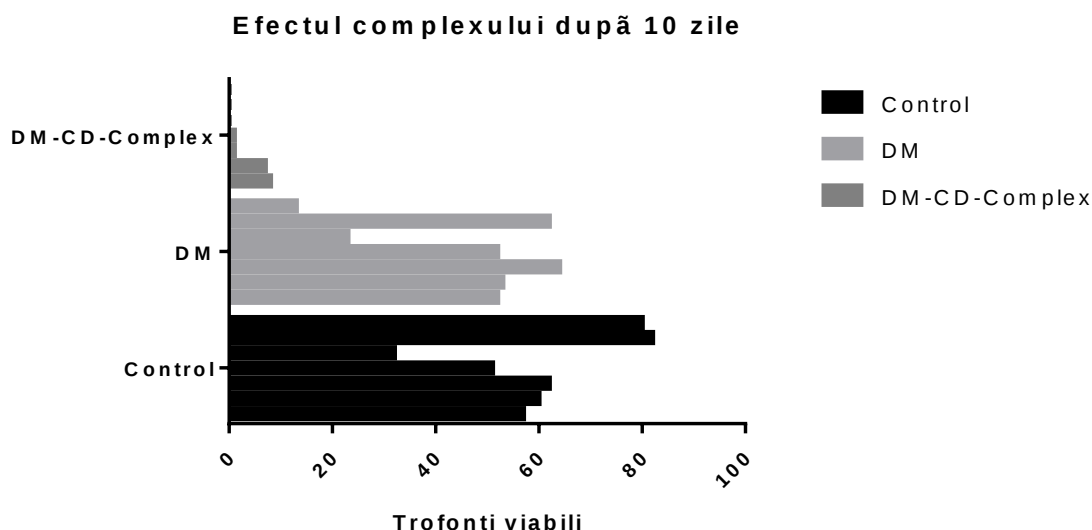


Fig. 9.7. Analiza viabilității trofontilor după 10 zile de tratament cu furaj medicamentat

Fig. 9.7. Analysis of trophon viability after 10 days of treatment with medicated feed

În figura 9.7. se observă intensivitatea crescută a încărcăturii cu paraziți la primele două grupuri (din cei 7 pești/grup) față de grupul în care am folosit în furaj complexul Diminazen- β -Ciclodextrină.

În prezent, în laboratorul nostru se desfășoară studii pentru a investiga acest fenomen și pentru a determina dozele și timpul necesar tratamentului pentru eliminarea completă a parazitului.

În concluzie, rezultatele preliminare sugerează că aceste complexe de incluziune ale ciclodextrinei cu antiparazitarul ales sunt o opțiune promițătoare pentru tratamentul ihtioftiriozei la crapul de crescătorie. Deoarece *I. multifiliis* este un parazit localizat în tegument, acesta este greu influențat de acțiunea medicamentelor. Complexele de incluziune a ciclodextrinei îmbunătățesc eficacitatea medicamentului, evită necesitatea utilizării tratamentelor prin imersie, care adesea nu pot fi autorizate din perspectiva problemelor de sănătate publică și de mediu.

La finalul experimentului s-au selectat câte 3 pești din fiecare lot și li s-au recoltat sânge prin puncția cordului pentru a efectua un set de analize biochimice. Acestea au fost realizate pe un bioanalizor ABAXIS la un cabinet local. Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelul 9.3. Scopul acestor analize a fost de a evalua valorile indicilor biochimici serici (enzime, metaboliți și minerale) la peștii selectați pentru a stabili dacă unele valori s-au modificat în urma executării tratamentului. Eșantioanele serice au fost analizate pentru albumine, proteine totale, globuline, raport albumine/globuline, calciu, glucoza, azot uree seric, amilaza, colesterol, alanine aminotransferaza, bilirubină totală, fosfatază alcalină, creatinină și creatinin-kinaza utilizând un analizor chimic automatizat Abaxis. Rezultatele obținute au fost comparate

cu cele obținute în alte lucrări pe profilul biochimic seric al speciilor peștilor de apă dulce.

Tabel 9.3./ Table 9.3.

Analiza biochimică la 24 de ore de la terminarea tratamentului
Biochemical analysis 24 hours after completion of treatment

Analiza	Lot Martor			DA			DA-β-CD complex		
	M1	M2	M3	D1	D2	D3	C1	C2	C3
ALB (g/dL)	1.6	1.4	1.6	1.6	1.5	1.3	1.9	1.5	1.7
TP (g/dL)	3.5	2.9	3.4	3.7	3.2	2.8	3.7	3.5	4.1
GLO (g/dL)	1.9	1.5	1.8	2.1	1.7	1.5	1.8	2.0	2.4
A/G	0.8	0.9	0.9	0.8	0.9	0.9	1.1	0.8	0.7
Ca2+ (mg/dL)	9.4	8.1	7.7	8.7	7.2	6.8	5.6	7.8	8.5
GLU (mg/dL)	83	97	102	72	110	114	195	124	121
BUN (mg/dL)	3.03	1.73	3.10	1.63	3.68	3.96	0.80	3.27	2.28
AMY (U/L)	67	197	72	44	146	189	467	155	130
CHOL (mg/dL)	304	218	315	268	352	283	432	351	315
ALT (U/L)	170	81	46	120	76	109	209	150	71
TBIL (mg/dL)	0.18	0.21	0.20	0.12	0.21	0.29	0.30	0.28	0.22
ALP (U/L)	55	28	35	38	50	14	68	40	42
CRE (mg/dL)	0.67	0.78	0.83	0.59	0.71	0.79	0.51	0.76	0.38
CK (U/L)	1258	1670	2231	1781	1869	1852	2420	2130	1792

Legendă: ALB – albumina; TP – Proteinele totale; GLO – Globulinele; A/G – raport Albumine / Globuline; Ca2+ - Calciu; GLU – Glucoza; BUN – Blood Urea Nitrogen; AMY – Amilaza; CHOL – Colesterol; ALT – Alanine Aminotransferaza; TBIL – Bilirubina totală; ALP – Fosfataza alcalină; CRE – Creatinina; CK – Creatin kinaza

În urma coroborării datelor s-au observat foarte puține modificări semnificative ale profilului biochimic la peștilor selectați.

Scăderea bilirubinei totale la peștii infestați se datorează unei disfuncții a ficatului; această disfuncție determină ficatul să secrete o cantitate mai mică de bilirubină în sânge. Această hipobilirubinemie a fost raportată atât la peștii infestați în condiții naturale de mediu, cât și la peștii infestați în condiții experimentale (Chaturvedi L., 1993).

Creșterea glicemiei la peștii infestați cu protozoare poate fi cauzată de declinului brusc al glicogenului hepatic sau de scăderea sintezei glicogenului din glucoză.

Condiția hiperglicemică la peștii stresați (datorită infestării/infecției) poate apare datorită afectării nivelului hormonal din sânge implicat în metabolismul carbohidraților. Inhibiția colinesterazei din suprarenale, care crește nivelul corticosteroizilor și stimulează transformarea glicogenului în glucoză, produce la peștii stresați în cele din urmă hiperglicemie (Haidar A., 2012). Astfel, hiperglicemia la peștii parazițați *I. multifiliis* pare să fie cauzată de o scădere a producerii insulinei precum și de creșterea corticosteroizilor și stimularea glicogenogenezei. Această hiperglicemie se datorează metabolizării depozitelor de glicogen din ficat pentru eliberarea energiei.

Nivelul transaminazei serice este ușor crescut, dar fără vreo semnificație toxică dată de medicament.

Aceste studii s-au finalizat prin publicarea unui articol: **Andrei-Cristian Lupu**, Alin Barbacariu, Constantin Roman, Raluca Mîndru, Gabriela-Victoria Martinescu, Andrei-Alexandru Cîmpan, Liviu Dan Miron (2018) - *In vivo study of conjugated diminazene aceturate for ichthyophthiriosis of farmed carp*, Lucr. ȘT. USAMV Iași, seria Medicină Veterinară, Ed. "Ion Ionescu de la Brad" Iași, vol. 61/2018, ISSN 2393-4603, p. 65-75.

CAPITOLUL 10. CONDIȚIONAREA PRAZIQUANTELULUI ȘI FLORFENICOLULUI PENTRU UNELE COINFEȚII HETEROLOGICE LA CRAPUL DE CRESCĂTORIE

CHAPTER 10. CONDITIONING OF PRAZIQUANTEL AND FLORFENICOL FOR SOME HETEROLOGOUS COINFECTIONS OF FARMED CARP

Introducere

Subiectul coinfețiilor la animalele acvatice a beneficiat de puțină atenție, deși aceste infecții sunt frecvent întâlnite în natură. Coinfețiile presupun infectarea gazdei cu doi sau mai mulți agenți patogeni diferiți din punct de vedere genetic, dar care sunt capabili să producă concomitent efecte nefavorabile asupra gazdei (Cox F., 2001). Alți termeni au fost folosiți cândva pentru a descrie coinfețiile și anume: boli polimicrobiale, infecții complicate, infecții concomitente, infecții mixte, infecții multiple, infecții duble, infecții secundare și super-infecții (Bakaletz L., 2004).

Mulți cercetători s-au concentrat doar pe infecții unice, clasificând celălalt agent ca oportunist și ignorându-l în cele mai multe cazuri, așa că în acest capitol ne vom axa pe distrugerea infecțiilor cauzate de mai multe organisme. În timpul episoadelor de coinfeție, interacțiunile dintre agenții infecțioși duc la rezultate variate: încărcarea unuia sau a ambilor agenți patogeni poate fi crescută sau una scăzută și cealaltă crescută și invers (Cox F., 2001). Mediile naturale în care trăiesc animalele sunt variate și conțin o multitudine de microorganisme, inclusiv specii parazitare și non-parazitare, coinfeția fiind un fenomen frecvent întâlnit. Există, prin urmare, o necesitate considerabilă de a investiga interacțiunile care apar în timpul infecțiilor mixte și efectele nocive ale acestora, mecanismele patogenezei, prognosticul și tratamentul bolilor peștilor (Johnson P., 2012).

Infestațiile parazitare cresc riscul de apariție a bacteriilor secundare și pot acționa ca un vehicul pentru transmiterea agenților patogeni bacterieni (Holzer A., 2012). Această interacțiune sinergică a fost demonstrată în numeroase studii experimentale (Bandilla M., 2006) care au arătat rate crescute de mortalitate la peștii coinfectați cu paraziți/bacterii. Acest efect sinergic a fost explicat ca urmare a stresului cauzat de paraziți, care reduc rezistența peștilor la alte infecții secundare bacteriene (Bowers J., 2000), precum și de efectele dăunătoare cauzate de parazitul care a oferit bacteriilor o cale de intrare. În unele cazuri, paraziții captează bacteriile și le inoculează gazdei în timp ce se hrănesc (Bowers J., 2000).

O atenție sporită ar trebui să fie îndreptată asupra prevenirii infestației parazitare la pești pentru a reduce mortalitatea datorată infecției bacteriene secundare

În acest capitol ne-am îndreptat atenția asupra unui studiu de condiționare a praziquantelului (PZQ) și florfenicolului (FFC) utilizat pentru infestația cu trematode monogene cutanate observate la crapul de crescătorie coinfectat bacterian. Acest lucru s-a realizat în vederea evaluării eficacității acestor medicamente condiționate utilizând o metodă de administrare pe diferite căi îmbunătățite. Consider că acest studiu ar ajuta la crearea unei formule mai eficiente de PZQ și FFC folosite pentru tratarea infestațiilor cu monogene la pești, respectiv coinfecțiilor bacteriene ale acestora.

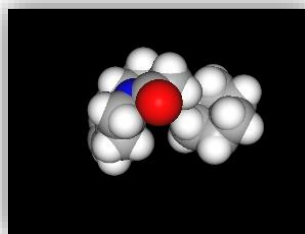
10.1. Principii active folosiți în acvacultură

10.1.1. Farmacologia și mecanismul de acțiune al PZQ ȘI FFC

Praziquantelul (PZQ) (fig. 10.1.) este utilizat pe scară largă ca agent chimioterapeutic pentru tratarea helminților în crescătoriile de pești. Este eficient împotriva monogenelor care infestază branhiile, pielea și cavitățile branhiale (Hirazawa N, 2013), larvele și digenele închistate care afectează ochii (Bylund G., 1981) și pielea (Mitchell AJ., 1995), precum și împotriva cestodelor intestinale (Sanmartin D., 1989) ale peștilor.



a



b

Fig. 10.1. Molecula de Praziquantel - $C_{19}H_{24}N_2O_2$: a-Reprezentare plană; b-Reprezentare 3D (soft Chemdoodle 8.1)

Fig. 10.1. Praziquantel molecule - $C_{19}H_{24}N_2O_2$: a-Plane representation; b- 3D representation (soft Chemdoodle 8.1)

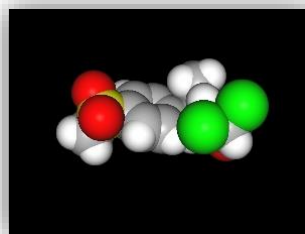
Făcând parte din categoria peștilor de crescătorie, crapul (*Cyprinus carpio*), este o specie importantă din punct de vedere economic. În România, crapul are o răspândire largă în domeniul acvaculturii, acoperind diferite zone din regiunile de est și nord-vest și zonele de apă dulce din regiunile centrale și sudice. Mai multe studii au arătat că salinitatea apei din mediu poate influența acumularea și eliminarea substanțelor chimice din pește. Diferența în farmacocinetică influențează eficacitatea PZQ în acvacultură, în special pentru tratarea infestațiilor cu monogene la crapul de crescătorie.

Florfenicolul (FFC) (fig. 10.2.) este un derivat de tiamfenicol cu același mecanism de acțiune ca și cloramfenicolul (inhibarea sintezei proteinelor). Cu toate acestea, este mai activ decât cloramfenicolul sau tiamfenicolul și poate fi mai bactericid

asupra unor agenți patogeni decât s-a crezut anterior. Florfenicolul are un spectru larg de activitate antibacteriană care include toate organismele sensibile la cloramfenicol, bacili gram-negativi, cocci gram-pozitivi și alte bacterii atipice cum ar fi micoplasma.



a



b

Fig. 10.2. Molecula de Florfenicol - $C_{12}H_{14}Cl_2FNO_4S$: a-Reprezentare plană; b-Reprezentare 3D (soft Chemdoodle 8.1)

Fig. 10.2. Florfenicol molecule - $C_{12}H_{14}Cl_2FNO_4S$: a-Plane representation; b- 3D representation (soft Chemdoodle 8.1)

Florfenicolul este foarte lipofil, asigură concentrații suficiente pentru tratarea agenților patogeni intracelulari și traversează unele bariere anatomice (penetrarea barierei hemato-encefalice) (Mark G., 2016).

Farmacocinetica medicamentului la animalele acvatice poate fi afectată de diferiți factori de mediu, cum ar fi temperatura apei, pH-ul și salinitatea. Cu toate acestea, efectul salinității este adesea neglijat, în special la peștii de apă dulce. Mai mult, pentru a îmbunătăți calitatea musculaturii la crap, peștii sunt adesea plasați în apă sărată pentru o perioadă de timp înainte de valorificare.

10.1.2. Praziquantelul și florfenicolul folosit în acvacultură

Praziquantelul (PZQ) este un antihelmintic frecvent utilizat pentru unii paraziți la oameni și animale, cum ar fi schistozomioza. Medicamentul este, de asemenea, utilizat pentru tratarea paraziților la pești și aprobat pentru utilizarea în acvacultură împotriva lui *Benedenia seriola*, un trematod cu localizare în tegument la peștele *Seriola lalandi*. Administrarea pe cale orală a PZQ, amestecat în mod obișnuit cu granule alimentare comerciale, se dovedește a fi eficace împotriva câtorva paraziți ai peștilor, printre care se numără *B. seriola* și *Neobenedenia girellae* (Hirazawa și col., 2004, Williams și col., 2007).

Cu toate acestea, PZQ este extrem de amar și are o palatabilitate scăzută pentru pești, ceea ce face ca administrarea orală să fie dificilă (Sitja-Bobadilla et al., 2006, Williams și col., 2007; Yamamoto și col., 2006). Prin urmare, tehnica de hrănire trebuie reevaluată pentru utilizarea practică a PZQ în acvacultură. În plus, eficacitatea PZQ poate fi diferită între speciile de paraziți și între peștii gazdă (Poynton și col., 1997), astfel evaluarea medicamentului ar trebui să fie efectuată folosind sistemul țintă gazdă/parazit.

Florfenicolul este un agent antibacterian semi-sintetic cu structură chimică și spectru de activitate antibacteriană similară cu tiamfenicolul. Atât florfenicolul cât și tiamfenicolul sunt analogi de cloramfenicol în care gruparea p-nitro din inelul aromatic este substituită cu o grupare sulfonilmetil. Florfenicolul și tiamfenicolul nu sunt asociate cu efecte toxice secundare așa cum se întâmplă în cazul cloramfenicolului. Bacteriile sunt rezistente la cloramfenicol și tiamfenicol din cauza producerii enzimei de inactivare a medicamentului și anume acetiltransferaza, care este susceptibilă la florfenicol (Burka și col., 1997). Florfenicolul se leagă la subunitatea ribozomală 50S bacteriană și inhibă sinteza proteinelor la etapa peptidiltransferazei. Investigațiile *in vitro* cu florfenicol au demonstrat o activitate puternică împotriva mai multor bacterii patogene pentru pești. S-a demonstrat eficacitatea *in vivo* împotriva furunculozei la somon și a vibriozei clasice la cod (Nordmo și col., 1998, Samuelsen și Bergh, 2004). *Yersinia ruckeri*, cu toate acestea, pare să aibă o rezistență naturală împotriva acestui agent (Burka și colab., 1997).

Rezistența bacteriană față de florfenicol poate fi mediată atât de gene cromozomiale, cât și de plasmide. Mărirea rezistenței agenților patogeni la pești nu este în general cunoscută, dar s-a raportat că, în ciuda utilizării pe scară largă, rezistența la florfenicol nu pare să apară frecvent (Michel și colab., 2003).

10.2. Condiționarea praziquantelului și a florfenicolului

10.2.1. Experimentări de măcinare a praziquantelului și a florfenicolului

Stabilizarea suspensiei celor două medicamente presupune reducerea dimensiunilor acestora în vederea diminuării tendinței de depunere. În scopul reducerii dimensiunilor particulelor a fost utilizată o moară planetară de laborator cu bile (Fritsch Pulverisette 6) prevăzută cu un vas din inox cu capacitatea de 500 mL și 10 bile din inox cu diametrul de 20 mm, cu greutatea de 30 g/bilă. Experimentele de măcinare în moara planetară cu bile s-au realizat la un raport masic produs solid/bile de 1/3, la turația de 500 rpm cu 10 bile de oțel timp de 30 minute. Procesul de măcinare a fost unul umed și s-a realizat în prezența acidului sorbic și a doi aditivi antiaglomeranți, uleiul vegetal de floarea soarelui (probele P1 și F1) și respectiv ulei de ricin etoxilat (probele P2 și F2).

În vederea caracterizării solidelor măcinate acestea au fost suspendate într-un solvent nepolar. Dimensiunile particulelor preparate și distribuția dimensiunilor acestora au fost determinate utilizând un sistem de măsurare a dimensiunii particulelor prin difuzia dinamică a luminii (DLS) cu un instrument Malvern-Zetasizer NanoZS (Red badge). În acest scop probele s-au dispersat în heptan la o concentrație de 1,6g/100mL solvent. Rezultatele obținute sunt prezentate în figurile 10.2.-10.5. și tabelele 10.1.-10.4.

Analiza DLS a celor două probe de florfenicol este prezentată în figurile 10.3. și 10.4. și în tabelele 10.1. și 10.2. Din figura 10.3. se observă că în urma măcinării florfenicolului în prezența uleiului de ricin etoxilat s-au obținut particule cu dimensiuni scăzute și cu o distribuție bimodală a mărimii particulelor.

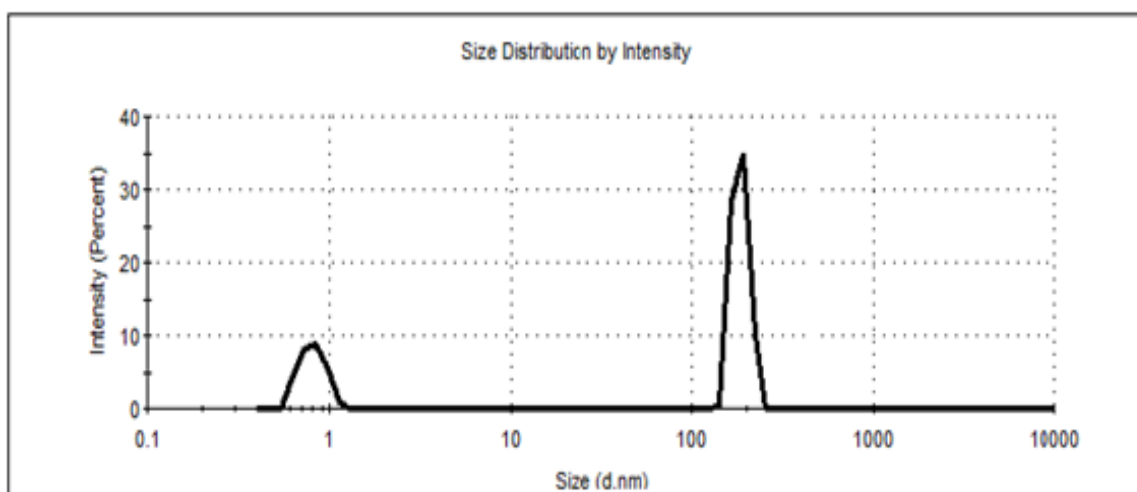


Fig. 10.3. Distribuția mărimii particulelor de florfenicol măcinate în prezența uleiului de ricin etoxilat
 Fig. 10.3. Distribution of the particle size of ground florfenicol in the presence of ethoxylated castor oil

În tabelul 10.1. este prezentat diametrul mediu al particulelor de florfenicol măcinate în prezența uleiului de ricin etoxilat și intensitatea celor două picuri.

Tabel 10.1./Table 10.1.

Caracteristicile particulelor de florfenicol măcinate în prezența uleiului de ricin etoxilat

Characteristics of milled florfenicol particles in the presence of ethoxylated castor oil

Picul	Dm, nm	Intensitatea picului, %
P1	0,8028	26,8
P2	184,1	73,2

Se observă că proba P1 de florfenicol prezintă o distribuție bimodală cu o intensitate de aproximativ trei ori mai mare a picului cu diametru mediu de 184 nm față de picul cu diametru mediu de 0,8028 nm.

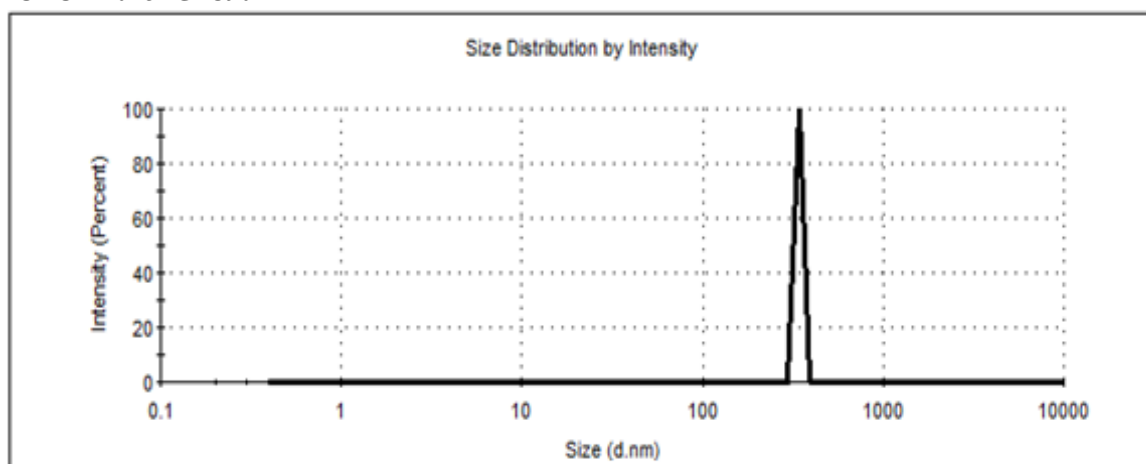


Fig. 10.4. Distribuția mărimii particulelor de florfenicol măcinate în prezența uleiului de floarea soarelui
 Fig. 10.4. Distribution of particle size of ground florfenicol in the presence of sunflower oil

Din figura 10.4. se observă că în urma măcinării florfenicolului în prezența uleiului de floarea soarelui s-a obținut o distribuție unimodală a mărimii particulelor. Diametrul particulelor de florfenicol înregistrează valori mai mici decât în cazul măcinării în prezența uleiului de ricin etoxilat.

În tabelul 10.4 este prezentat diametrul mediu al particulelor de florfenicol măcinate în prezența uleiului de floarea soarelui.

Tabel 10.2./Table 10.2.

Caracteristicile particulelor de florfenicol măcinate în prezența uleiului de floarea soarelui

Characteristics of milled florfenicol particles in the presence of sunflower oil

Picul	Dm, nm	Intensitatea picului, %
P1	342,0	100,0

Se observă că diametrul mediu al particulelor de florfenicol are valori mult mai mari decât în cazul măcinării în prezența uleiului de ricin etoxilat.

Analiza DLS a celor două probe de praziquantel este prezentată în figurile 10.5 și 10.6 și în tabelele 10.3. și 10.4. Din figura 10.5 se observă că în urma măcinării praziquantelului în prezența uleiului de floarea soarelui s-au obținut particule cu dimensiuni mai mari decât în cazul probei de florfenicol măcinată în prezența aceluiași aditiv. De asemenea, spre deosebire de particulele de florfenicol, în cazul particulelor de praziquantel distribuția mărimii particulelor este unimodală și nu bimodală.

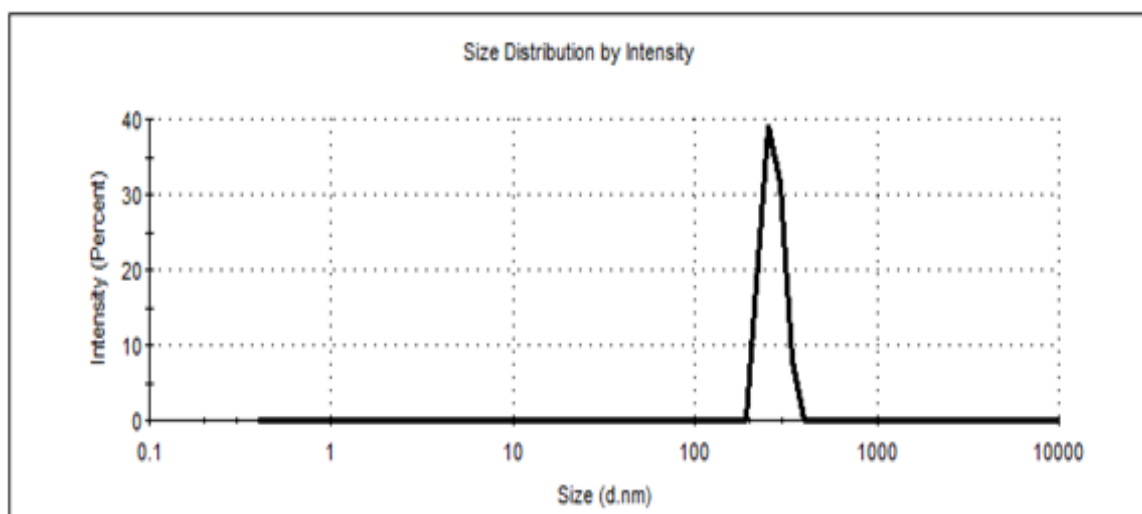


Fig. 10.5. Distribuția mărimii particulelor de praziquantel măcinate în prezența uleiului vegetal de floarea soarelui

Fig. 10.5. Distribution of the particle size of ground praziquantel in the presence of sunflower plant oil

Diametrul mediu al particulelor de praziquantel măcinate în prezența uleiului de floarea soarelui este prezentat în tabelul 10.3. Se observă că particulele de praziquantel au un diametru mediu mai mare decât în cazul probei de florfenicol măcinată în prezența aceluiași aditiv.

Tabel 10.3./Table 10.3.

Caracteristicile particulelor de praziquantel măcinate în prezența uleiului de floarea soarelui

Characteristics of milled praziquantel particles in the presence of sunflower oil

Picul	Dm, nm	Intensitatea picului, %
P1	267,3	100,0

Analiza DLS a probei de praziquantel măcinată în prezența uleiului de ricin etoxilat este prezentată în figura 10.6 și în tabelul 10.4. Din figura 10.6 se observă că în urma măcinării praziquantelului în prezența uleiului de ricin etoxilat s-au obținut particule cu dimensiuni care variază pe un domeniu mai larg decât în cazul probei de praziquantel măcinată în prezența uleiului de floarea soarelui. De asemenea, distribuția mărimii particulelor este unimodală ca și în cazul probei de praziquantel măcinată în prezența uleiului de floarea soarelui.

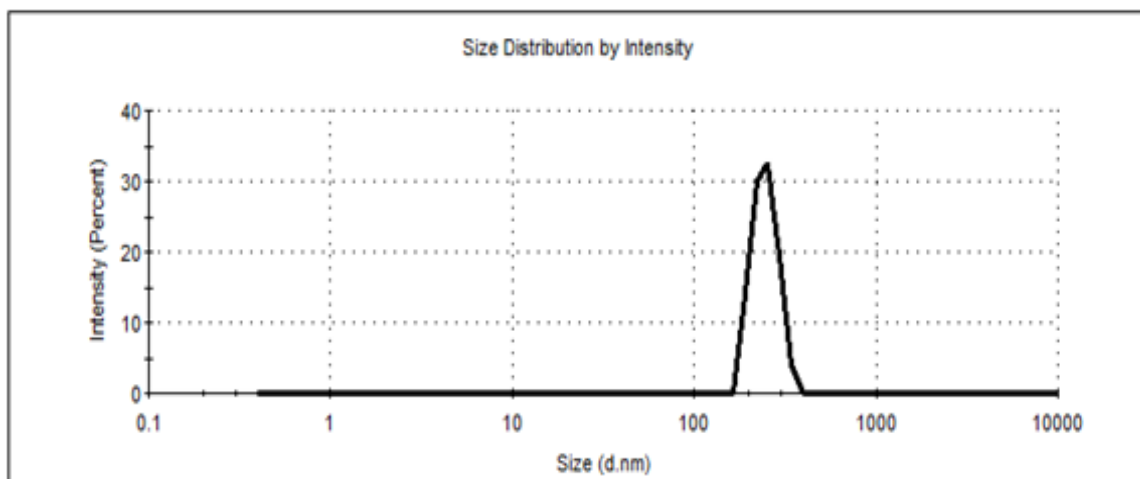


Fig. 10.6. Distribuția mărimii particulelor de praziquantel măcinate în prezența uleiului de ricin etoxilat
 Fig. 10.6. Distribution of the size of ground praziquantel particles in the presence of ethoxylated castor oil

Din tabelul 10.4. se observă că particulele de praziquantel au un diametru mediu mai mic decât în cazul probei de praziquantel măcinată în prezența uleiului de floarea soarelui.

Tabel 10.4./Table 10.4.

Caracteristicile particulelor de praziquantel măcinate în prezența uleiului de ricin etoxilat

Characteristics of milled praziquantel particles in the presence of ethoxylated castor oil

Picul	Dm, nm	Intensitatea picului, %
P1	246,8	100,0

Analiza DLS a celor patru probe evidențiază două tipuri de distribuții ale mărimii particulelor: distribuție bimodală în cazul probei de florfenicol măcinată în prezența uleiului de floarea soarelui și distribuție unimodală în cazul celorlalte trei probe.

Diametrul mediu al particulelor măcinate de praziquantel a fost mai mare decât cel al probelor de florfenicol.

Realizarea procesului de măcinare în prezența uleiului de ricin etoxilat favorizează obținerea unor valori mai scăzute a diametrului mediu al particulelor decât în cazul măcinării în prezența uleiului de floarea soarelui.

10.2.2. Prepararea și caracterizarea suspensiilor apoase de praziquantel și florfenicol

Dispersarea în apă a celor două medicamente are ca scop obținerea unor suspensii cu o stabilitate ridicată care prin dozarea în apă să permită o distribuție uniformă a acestora în bazinele de apă respective. Prepararea suspensiilor s-a realizat prin atomizarea a două faze: faza apoasă care conține substanțe tensioactive și faza organică care conține suspensia de medicament și acid sorbic măcinată și diluate într-o fază uleioasă (uleiul de floarea soarelui sau uleiul de ricin etoxilat). Procesul de atomizare s-a realizat la o turație maximă a atomizorului de 8000 rot/min.

Mod de lucru: Se dispersează medicamentul și acidul sorbic măcinat anterior în faza uleioasă (uleiul de floarea soarelui sau uleiul de ricin etoxilat). Se adaugă emulgatorii în apă prin agitare utilizând un agitator UltraTurax (IKA). Peste faza apoasă sub agitare la 3000 rpm se adaugă treptat dispersia în ulei etoxilat. Emulsia formată se menține la 8000 rpm timp de 30 min.



Fig. 10.7. Instalația de preparare a suspensiei de medicament

Fig. 10.7. Apparatus for preparation of drug suspension

Compușii cu caracter tensioactiv utilizați pentru stabilizarea acestor suspensii sunt sorbitan monooleat polietoxilat cu 20 EO (Tween 80), lauril-eter-sulfatul de sodiu (EMAL), alcool gras C10-C12 etoxilat-propoxilat (Alc 1) și alcool gras C12-C14 etoxilat (Alc 2).

Suspensiile apoase de praziquantel au fost preparate conform rețetelor prezentate în tabelul 10.5. În cazul probei Pp1 la prepararea fazei organice s-a utilizat uleiul vegetal de floarea soarelui, iar în cazul probelor Pp2 și Pp3 s-a utilizat uleiul de ricin etoxilat.

Tabel 10.5./Table 10.5.

Rețetele utilizate la prepararea suspensiilor apoase de praziquantel
Recipes used to prepare praziquantel aqueous suspensions

Proba	Component, g							
	Praziquantel	Acid sorbic	Ulei	Apa distilata	Tween 80	Alc 1	EMAL	Alc 2
Pp1	3.2	0.3	15.0	78.5	3.0	0	0	0
Pp2	3.2	0.3	15.0	78.5	0	0	2.0	1.0
Pp3	3.2	0.3	15.0	78.5	2.0	1.0	0	0

Suspensiile apoase de florfenicol au fost preparate conform rețetelor prezentate în tabelul 10.6. Faza uleioasă utilizată în cazul probei Pf1 la prepararea suspensiei apoase de medicament a fost uleiul vegetal de floarea soarelui, iar în cazul probelor Pf2 și Pf3 a fost uleiul de ricin etoxilat.

Tabel 10.6./Table 10.6.

Rețetele utilizate la prepararea suspensiilor apoase de florfenicol
Recipes used to prepare aqueous suspensions of florfenicol

Proba	Component, g							
	Florfenicol	Acid sorbic	Ulei	Apă distilată	Tween 80	Alc 1	EMAL	Alc 2
Pf1	3.2	0.3	15.0	78.5	0	0	2.0	1.0
Pf2	3.2	0.3	15.0	78.5	0	0	2.0	1.0
Pf3	3.2	0.3	15.0	78.5	2.0	1.0	0	0

10.2.3. Determinarea stabilității suspensiilor

Stabilitatea în timp a sistemelor disperse, precum suspensiile de medicamente, poate fi evaluată prin metoda transmisiei, respectiv difuziei luminii. S-a utilizat un aparat TurbiscanLab cu software dedicat pentru înregistrarea și interpretarea datelor: Tlab Turbisoft Formulaction. Proba analizată este introdusă într-un vas cilindric de sticlă dedicat, baleiat la intervale prestabilite de timp cu o rază de lumină cu lungime de unda 880 nm, în aer. Doi senzori optici (vezi fig. 10.8.), dispuși corespunzător primesc lumina transmisă prin proba (detector dispus la 180° față de sursa de lumină), respectiv lumina împrăștiată prin difuzie (detector dispus la 45° față de sursa de lumină).

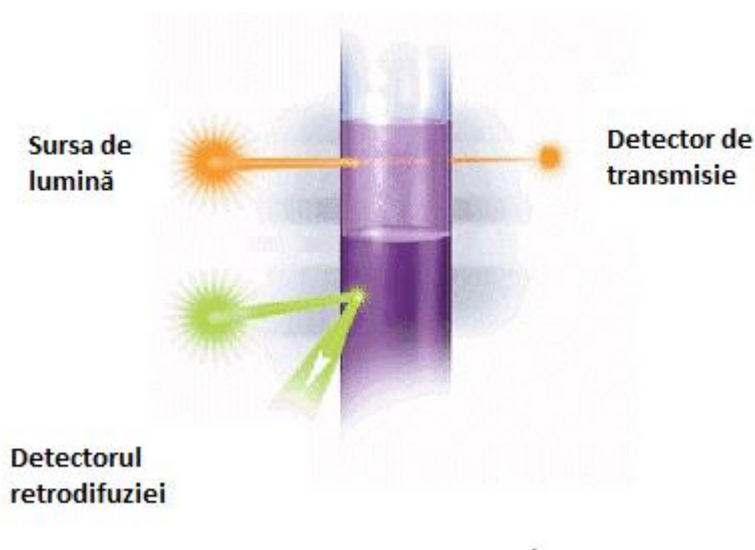


Fig. 10.8. Principiul de masurare al metodei utilizând TurbiscanLab
 Fig. 10.8. The principle of measuring the method using TurbiscanLab

Mostra de analizat este introdusă într-o celulă de analiză din sticlă de formă cilindrică. Echipamentul scanează vertical proba supusă analizei cu o rezoluție de $20\mu\text{m}$ utilizând o rază de lumină. Este prevăzut cu o combinație de senzori ce înregistrează simultan valori atât pentru transmisia luminii, utile pentru probe transparente, cât și pentru difuzia luminii (probe opace), fiind detectat astfel orice fenomen de destabilizare a compozițiilor analizate.

Evaluarea stabilității suspensiilor preparate s-a realizat pe o durată de 14 ore înregistrând între 5 și 14 curbe pentru fiecare probă.

Profilurile de transmisie și de difuzie ale suspensiilor de praziquantel (Pp1, Pp2, Pp3) sunt prezentate în figurile 10.9. și 10.11.

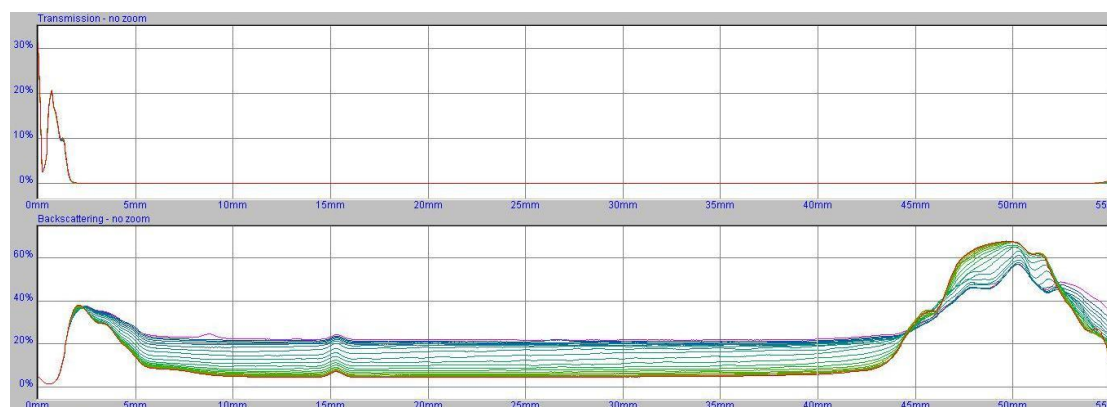


Fig. 10.9. Profilurile de stabilitate pentru proba Pp1
 Fig. 10.9. Stability profiles for sample Pp1

Se observă o suprapunere totală a curbelor de transmisie, în timp ce curbele de difuzie se diferențiază pe întreaga perioadă studiată, ceea ce demonstrează că suspensia de praziquantel pe bază de ulei vegetal de floarea soarelui este instabilă în timp (fig. 10.9.).

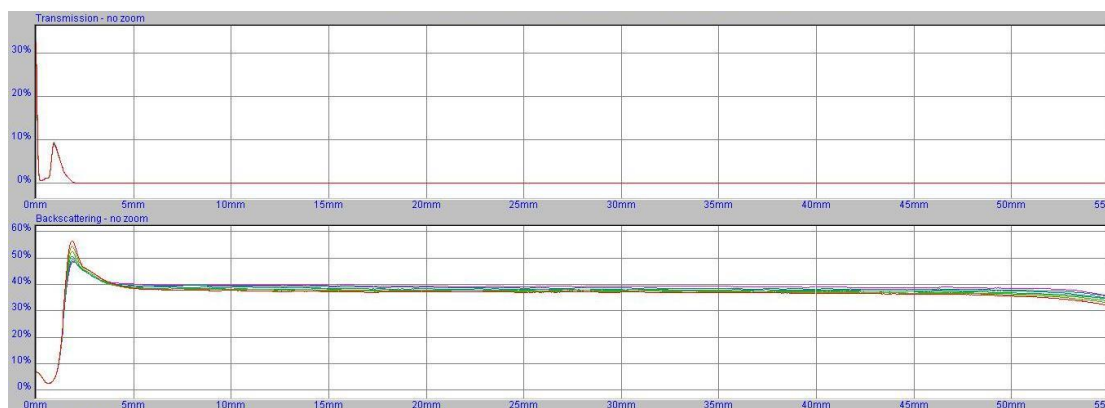


Fig. 10.10. Profilurile de stabilitate pentru proba Pp2

Fig. 10.10. Stability profiles for sample Pp2

În cazul probei Pp2 pe bază de ulei de ricin etoxilat se observă o suprapunere totală a curbelor de transmisie și o suprapunere aproape totală a curbelor de difuzie pe întreaga perioadă studiată, ceea ce demonstrează că suspensia de praziquantel pe bază de ulei de ricin etoxilat este relativ stabilă (fig. 10.10).

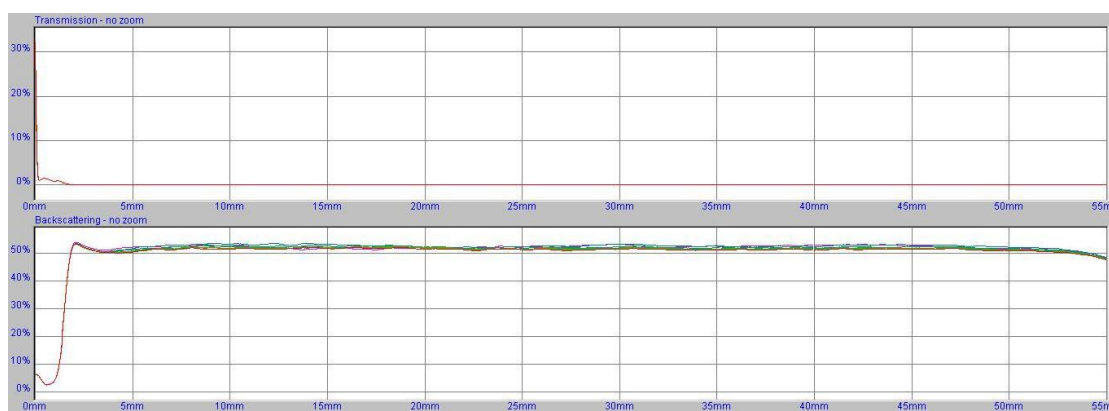


Fig. 10.11. Profilurile de stabilitate pentru proba Pp3

Fig. 10.11. Stability profiles for sample Pp3

Se observă o suprapunere totală a curbelor de transmisie și difuzie pe întreaga perioadă studiată, ceea ce demonstrează că suspensia de praziquantel pe bază de ulei de ricin etoxilat în prezența tensioactivelor de tip sorbitan monooleat polietoxilat cu 20 EO și alcool gras C10-C12 etoxilat-propoxilat este stabilă (fig. 10.11.).

Profilurile de transmisie și de difuzie ale suspensiilor de florfenicol (Pf1, Pf2, Pf3) sunt prezentate în figurile 10.12. și 10.14.

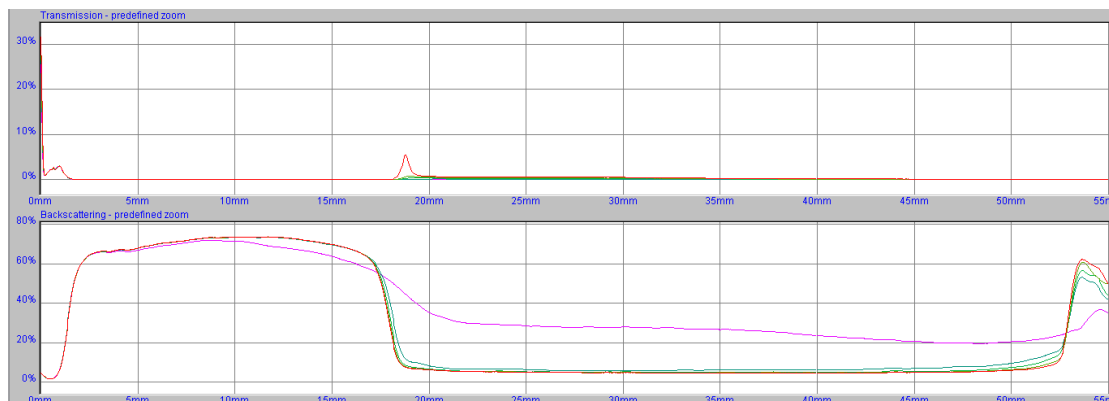


Fig. 10.12. Profilurile de stabilitate pentru proba Pf1

Fig. 10.12. Stability profiles for sample Pf1

Se observă o suprapunere aproape totală a curbelor de transmisie în timp ce curbele de difuzie se diferențiază pe întreaga perioadă studiată, manifestând o separare de faze imediat după preparare, ceea ce demonstrează că suspensia de florfenicol pe bază de ulei vegetal de floarea soarelui este instabilă în timp (fig. 10.12.).

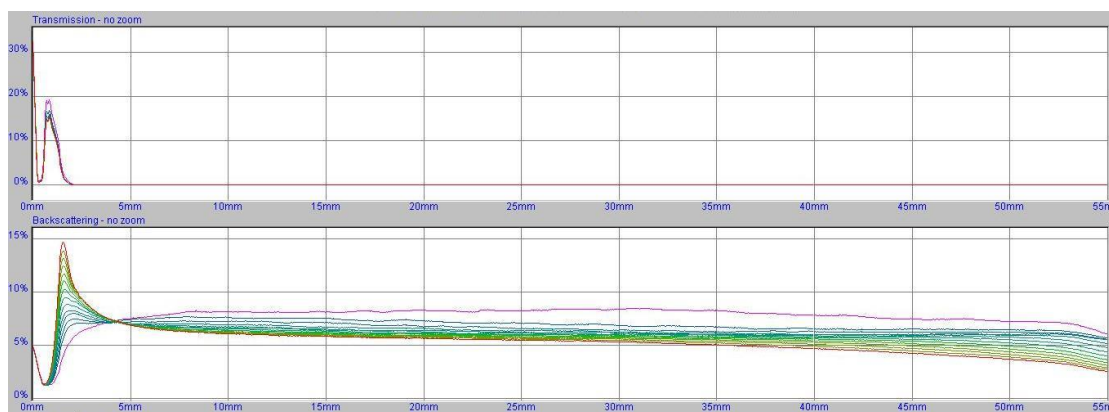


Fig. 10.13. Profilurile de stabilitate pentru proba Pf2

Fig. 10.13. Stability profiles for sample Pf2

În cazul probei Pf2 pe bază de ulei de ricin etoxilat (fig. 10.13) se observă o suprapunere totală a curbelor de transmisie și o suprapunere aproape totală a curbelor de difuzie pe întreaga perioadă studiată, cu o tendință de separare care devine mai evidentă spre zona superioară a probei de suspensie. Această tendință de separare demonstrează că suspensia de florfenicol pe bază de ulei de ricin etoxilat preparată în

prezența amestecului de tensioactive lauriler sulfat de sodiu și alcool gras C12-C14 etoxilat prezintă o stabilitate scăzută.

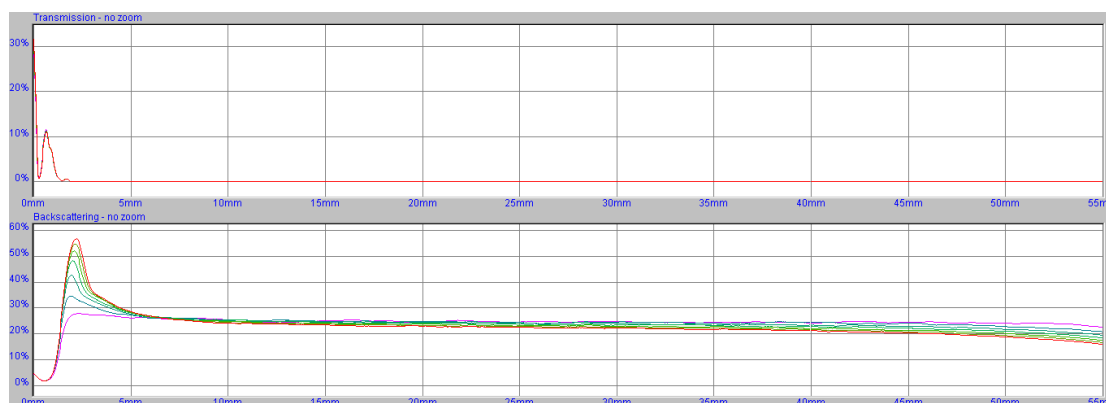


Fig. 10.14. Profilurile de stabilitate pentru proba Pf3

Fig. 10.14. Stability profiles for sample Pf3

În cazul suspensiei de florfenicol pe bază de ulei de ricin etoxilat în prezența tensioactivelor de tip sorbitan monooleat polietoxilat cu 20 EO și alcool gras C10-C12 etoxilat-propoxilat (fig. 10.14.), se observă o suprapunere totală a curbelor de transmisie pe întreaga perioadă studiată. Curbele de difuzie prezintă o tendință de separare care se evidențiază spre zona superioară a probei de suspensie ceea ce demonstrează că suspensia de florfenicol pe bază de ulei de ricin etoxilat în prezența tensioactivelor de tip sorbitan monooleat polietoxilat cu 20 EO și alcool gras C10-C12 etoxilat-propoxilat este parțial stabilă.

10.3. Concluzii parțiale

1.Suspensiile de praziquantel și florfenicol pe bază de ulei vegetal de floarea soarelui prezintă o stabilitate scăzută.

2.Utilizarea sorbitanului monooleat polietoxilat cu 20 EO, în prezența uleiului de ricin etoxilat, la prepararea suspensiilor de praziquantel și florfenicol a favorizat îmbunătățirea stabilității acestor suspensii.

3.Suspensiile de praziquantel preparate în prezența uleiului de ricin etoxilat prezintă o stabilitate mai bună decât cele de florfenicol.

4.Acest preparat de PZQ și FFC se poate folosi în tratamentul unor coinfecții heteroloage la pești de tip parazit/bacterie.

5.Suspensia preparatului de PZQ și FFC se poate administra atât în hrana peștilor (furaaj medicamentat), cât și prin difuzie în apă, având o eliberare controlată. Calea de administrare preferată rămâne totuși calea orală.

6.Acest capitol a condus la crearea unei propuneri pentru brevetare precum și la crearea unei lucrări științifice acceptată pentru publicare :

- Andrei-Cristian LUPU, Mihaela BOMBOȘ, Cristian-Alin BARBACARIU, Constantin ROMAN, Raluca MÎNDRU, Gabriela Victoria MARTINESCU, Liviu Dan

MIRON, - *Conditioning of praziquantel and florfenicol for some heterologous coinfections of farmed carp*, (acceptata pentru publicare in Revista de Chimie, vol. 70, nr. 7.2019 - IF 1.412).

- Cerere de brevet: LUPU Andrei Cristian, MIRON Liviu Dan, BOMBOȘ Dorin – *Procedeu De Obținere A Unei Compoziții Emulsionate Pe Bază De Florfenicol Și Praziquantel Cu Proprietăți Antibacteriene Și Antiparazitare Pentru Tratarea Peștilor* (cerere Brevet Ro A2019/00076 07-02-2019)

CAPITOLUL 11. REZULTATE ȘI DISCUȚII

CHAPTER 11. RESULTS AND DISCUSSION

Complexul diminazen aceturat/beta-ciclodextrină (DM/ β -CD) a fost sintetizat într-un mixer echipat cu un senzor de temperatură (senzor: Heidolph Instruments) iar evaporarea solventului s-a efectuat prin metoda liofilizării (FD), (ALPHA 1-2 LD). Proporția dintre diminazen aceturat și β -ciclodextrină a fost în conformitate cu raportul echimolar. Pulberea de diminazen aceturat a fost dizolvată în DMSO pentru a produce o soluție 0,5% și β -CD a fost dizolvat în apă distilată pentru a produce o soluție apoasă 0,5%. Complexele s-au format într-un mediu apos. Pentru îmbunătățirea solubilității substanței active s-a utilizat PEG 400 și un tampon fosfat. Soluțiile au fost amestecate timp de 30 minute într-un malaxor echipat cu un senzor de temperatură până la omogenizarea completă, apoi complexul obținut a suferit evaporarea solventului timp de 3 ore, la 45° C. După evaporarea solventului, complexul a fost liofilizat timp de 12 ore. În acest scop, s-a folosit metoda de liofilizare, care oferă randamente foarte bune de incluziune (Blanco și colab., 1991) și care este atractivă pentru aplicații la scară industrială, având în vedere simplitatea sa. În plus, caracteristicile amestecului de liofilizare oferă posibilitatea de a fi inclus cu ușurință în hrana (nutrețul) animalelor în momentul fabricării (în mod tipic bazată pe granulare și proceduri de extrudare).

Pentru studiul nostru, am considerat să lucrăm cu β -CD, despre care s-a constatat că se comportă cel mai bine în scopuri medicale, deoarece formele α și γ au arătat niveluri de toxicitate considerabile. S-a ales β -CD datorită mai multor factori care determină interacțiunea medicament/ciclodextrină. De exemplu, interacțiunile ionilor dintre moleculele de medicament și ciclodextrină pot îmbunătăți eficacitatea și stabilitatea încărcăturii complexelor în comparație cu conjugatele de medicament încărcate negativ sau neîncărcate. În al doilea rând, temperaturile crescute pot ajuta la destabilizarea conjugării medicament-ciclodextrină.

β -CDa are cavitatea suficient de largă pentru formarea de complecși de incluziune cu diverse medicamente.

Formarea complexului de incluziune beta-ciclodextrina-diminazen aceturat s-a pus în evidență prin analiza termică, FT-IR, DSC, TEM , AFM dar și prin modelare moleculară. Comparăția între valorile energetice ale geometriilor de echilibru indică formarea unor complecși stabili atât pentru raportul de complexare CD:DM=2:1 cât și pentru 1:1.

Izoterma curbei de adsorbție/desorbție pentru complexul diminazen aceturat/beta-ciclodextrină evidențiază un volum de gaz inert adsorbit mai scăzut decât în cazul solidelor poroase, ceea ce demonstrează gradul înalt de utilizare a cavității β -ciclodextrinice.

Distribuția dimensiunilor porilor este mai mare decât diametrul cavităților β -ciclodextrinei, ceea ce demonstrează că majoritatea cavităților β -ciclodextrinei au fost ocupate, deoarece diametrul cavităților β -ciclodextrinei (0,78 nm) este mult mai mic decât diametrul mediu al porilor determinat experimental (3.901 nm).

Existența complexului de incluziune a fost confirmată prin spectroscopia cu IR. Intensitatea vârfurilor adsorbției (IR intensity) a dat informații suficiente pentru prezența incluziunii.

Stabilitatea complexării este redată și prin imaginile FT-IR care arată că acest complex este eterogen.

Pentru modelare moleculară s-a realizat tehnica de înglobare moleculară și a fost utilizată pentru a obține o perspectivă a interacțiunii dintre DA și β -CD. Structura β -CD folosită în această teză a fost generată de coordonate precise pentru a obține o structură completă (soft. GaussView 5). Coordonatele tridimensionale ale DA au fost generate folosind BIOVIA MaterialsStudio 4.0 package și funcția Centroid.

Diminazenul aceturat a fost ținta studiilor cu privire la potențialul său terapeutic și a atras un mare interes în dezvoltarea cercetării pe care am realizat-o. Astfel, având în vedere potențialul farmacologic al diminazenului, obiectivul acestui studiu a fost de a dezvolta efectele sistematice și farmacologice prin includerea acestuia într-o ciclodextrină (β -ciclodextrina) și utilizarea complexului împotriva unor protozoare ale peștilor cum ar fi *Ichthyophthirius multifiliis*.

În testele cu β -CD-diminazen aceturat, toate ciliatele au murit după 6 ore la doze de 100 și respectiv 80 ppm. Mai mult, β -CD-diminazen aceturat poate fi un candidat bun pentru controlul ciliatozelor cauzate nu numai de *Ichthyophthirius multifiliis*, ci și împotriva altor protozoare care parazitează în țesuturi.

Forma de dozare selectată (adică hrana care conține medicamentul) necesită ca granulele furajere să rămână în apă până când sunt ingerate. În aceste condiții, este foarte important să existe pierderi minime de medicament din forma dozată în primele câteva minute de la contactul cu apa: aceasta ar conduce nu numai la pierderea de medicament, ci și la contaminarea apei. Componentele principale ale furajului (făină, proteine, uleiuri etc.) și procedurile utilizate la fabricarea acestuia (tipic extrudare) favorizează eliberarea neglijabilă sau foarte lentă. Odată ingerat, mediul gastrointestinal favorizează dezagregarea și digestia, ceea ce duce la eliberarea componentelor solubile conținute în granulă. Pentru a confirma acest lucru, s-a determinat cantitatea de medicament eliberată în primele 15 minute în contact cu apa la o temperatură apropiată de cea a rezervoarelor de creștere (20°C), cu agitare ușoară. Rezultatele noastre indică faptul că nici granulele ce conțineau doar medicamentul necomplexat, nici granulele realizate cu complexul nu au eliberat cantități semnificative de medicament în această perioadă. Important este ca peștele să consume toate granulele în decurs de 15 minute.

După ce s-a confirmat faptului că medicamentul din granule nu se pierde în apă, s-au efectuat teste în care crapul infestat a primit o hrană ce conține un medicament sau un complex. Hrana care conținea complexul a fost mâncată rapid și nu am observat nici o dovadă a palatabilității scăzute; prin contrast, furajele care

conțineau numai medicamentul (diminazen aceturat) au fost uneori respinse. Acesta este, desigur, un aspect important pentru un tratament care se administrează în hrana pentru animale. Se cunoaște capacitatea ciclodextrinei de a ascunde gustul nedorit al medicamentelor, cum ar fi gustul amar întâlnit în cazul diminazenului.

Conform rezultatelor, se poate observa că peștii netratați au menținut intensități ridicate ale infecțiilor, iar doi din cei șapte pești au murit în timpul perioadei de testare de zece zile. La peștii tratați cu diminazen necomplexat, nu a apărut mortalitate, dar intensitatea infestațiilor a rămas ridicată la toți peștii pe tot parcursul perioadei de testare. Prin contrast, la peștii tratați cu diminazen complexat, intensitățile infestațiilor au scăzut la zero pentru trei din cei șapte pești și la niveluri foarte mici la ceilalți patru pești.

În această teză a mai fost studiată crearea unei compoziții emulsionabile pe bază de praziquantel și florfenicol cu efect terapeutic pentru coinfecții la pești. Prepararea acestora este descrisă în capitolul zece.

Suspensiile de praziquantel și florfenicol pe bază de ulei vegetal de floarea soarelui prezintă o stabilitate scăzută.

Utilizarea sorbitanului monooleat polietoxilat cu 20 EO, în prezența uleiului de ricin etoxilat, la prepararea suspensiilor de praziquantel și florfenicol a favorizat îmbunătățirea stabilității acestor suspensii.

Suspensiile de praziquantel preparate în prezența uleiului de ricin etoxilat prezintă o stabilitate mai bună decât cele de florfenicol.

Acest preparat emulsionabil de PZQ și FFC se poate folosi în tratamentul unor coinfecții heteroloage de tip parazit/bacterie la pești. Se poate utiliza atât la peștii ornamentali cât și la cei de acvacultură.

Suspensia preparatului de PZQ și FFC se poate administra atât în hrana peștilor (furaj medicamentat), cât și prin difuzie în apă, având o eliberare controlată.

CAPITOLUL 12. CONCLUZII FINALE

1. În cercetarea de față, compusul complex de incluziune cu β -cilodextrina al diminazenui aceturat (Berenil) a fost realizat prin metoda liofilizării și a fost caracterizat.

2. Formarea complexului de incluziune beta-ciclodextrina-diminazen aceturat s-a pus în evidență prin analiza termogravimetrică, DSC, FT-IR AFM, TEM dar și prin modelare moleculară. Comparația între valorile energetice ale geometriilor de echilibru indică formarea unor complecși stabili atât pentru raportul de complexare CD:DM=2:1 cât și pentru 1:1.

3. Metoda de obținere a complecșilor de incluziune pentru a fi introduși într-un furaj granulat pentru pești este ușor de folosit și are o aplicabilitate rapidă.

4. Aceste complexe de incluziune ale β -ciclodextrinei cu un medicament farmaceutic antiparazitar sunt realizate pentru tratamentul ihtioftiriozei la crapul de crescătorie.

5. Pentru confirmarea complexului de incluziune format s-a utilizat spectroscopie cu infraroșu (FT-IR).

6. Complexul de incluziune testat s-a dovedit eficient împotriva *Ichthyophthirius multifiliis in vitro*. Compușii diminazen aceturat și β -CD-diminazen aceturat și-au arătat activitatea lor antiprotozoară care a fost dovedită prin uciderea ciliatelor în 6-8 ore de la expunere.

7. Rezultatele tratării (*in vivo*) peștilor cu furajele care conțin medicamentul sau complexul au indicat faptul că peștii netratați și-au păstrat intensitățile ridicate ale infestațiilor, iar doi din cei șapte pești au murit în timpul perioadei de testare. La peștii tratați cu diminazen necomplexat nu s-a înregistrat mortalitate dar intensivitatea infestațiilor a rămas ridicată. În schimb, la peștii tratați cu diminazen complexat, intensitățile infestațiilor au scăzut la zero pentru trei din cei șapte pești și la niveluri foarte mici la ceilalți patru pești.

8. Complexul se poate administra în furaj (furaj medicamentos) și în scop profilactic deoarece nu produce efecte toxice așa cum reiese din profilurile biochimice studiate.

9. Complexele de incluziune a β -ciclodextrinei îmbunătățesc eficacitatea medicamentului, evită necesitatea utilizării tratamentului medicamentos prin imersie în apă, care adesea nu poate fi autorizat datorită problemelor din domeniul sănătății publice și de mediu.

10. Pentru crearea emulsiilor se folosesc materii prime biodegradabile ecologice, respectiv substanțe medicamentoase precum praziquantel și florfenicol, solvenți ai unor esteri ai glicerinei cu acizi carboxilici inferiori, emulgatori de tip esteri ai sorbitolului etoxilat cu acizi grași și ulei de ricin etoxilat.

11. Crearea emulsiei îmbunătățește dispersarea celor două principii active în apa lacurilor/bazinelor pentru pești prin formularea sub formă de emulsie dublă de tip emulsie inversă dispersată într-o emulsie direct.

12. Compoziția emulsionabilă de praziquantel și florfenicol se poate administra pentru tratamentul unor co-infecții heterologice de tip parazit/bacterie la pești.

13. Suspensia preparatului de praziquantel și florfenicol se poate administra atât în hrana pentru pești (furaj medicamentat), cât și prin difuzarea acesteia în apă, având o eliberare controlată.

ELEMENTE DE ORIGINALITATE:

- 1) Remarcăm ca și element de originalitate selecția substanței medicamentoase (diminazen aceturat) pentru complexare cu β -ciclodextrina pentru realizarea unui furaj granulat medicamentos.
- 2) Realizarea unui procedeu de obținere a unei compoziții emulsionate pe bază de praziquantel și florfenicol cu proprietăți antibacteriene și antiparazitare pentru tratarea peștilor, care a fost depus pentru omologare și brevetare A2019/00076.
- 3) Publicarea în reviste de circulație internațională a rezultatelor cercetărilor: 3 lucrări ISI, 4 lucrări BDI și 1 cerere de brevet înregistrată;

Considerăm o contribuție inovativă a acestei teze aplicabilitatea rezultatelor obținute prin recomandarea utilizării unor tratamente la fermele piscicole în scopul prevenirii și/sau tratării infestațiilor cu paraziți la crapul de crescătorie.

CHAPTER 12. FINAL CONCLUSIONS

1. In the present study, the complex inclusion compound with β -cyclodextrin of diminazene aceturate (Berenil) was made by the lyophilization method and was characterized.

2. The formation of the beta-cyclodextrin-diminazen acetate inclusion complex was highlighted by thermogravimetric analysis, DSC, FT-IR AFM, TEM and molecular modeling. The comparison between the energy values of the equilibrium geometries indicates the formation of stable complexes for both the complexity ratio CD: DM = 2: 1 and for 1: 1.

3. The method of obtaining inclusion complexes to be introduced into a granular feed for fish is easy to use and has a rapid applicability.

4. These inclusion complexes of β -cyclodextrin with a pharmaceutical antiparasitic drug are made for the treatment of ichthyophthiriosis in farmed carp.

5. Infrared spectroscopy (FT-IR) was used to confirm the inclusion complex.

6. The tested inclusion complex proved to be effective against *Ichthyophthirius multifiliis* *in vitro*. The diminazen acetate and β -CD-diminazen complex have shown their antiprotozoaric activity which has been demonstrated by killing the ciliates within 6-8 hours after exposure.

7. The results of fish (*in vivo*) treatment with feed containing the drug or complex indicated that untreated fish retained high levels of infestation and two of the seven fish died during the test period. In fish treated with non-complexed diminazen there was no mortality, but the intensity of infestations remained high. In contrast, in fish treated with complex diminazen, infestation intensities have fallen to zero for three of the seven fish and very low levels for the other four fish.

8. The complex can be administered in feed (medicated feed) and for prophylactic purposes because it does not produce toxic effects as it appears from the studied biochemical profiles.

9. Inclusion complexes of β -cyclodextrin improve the efficacy of the drug, avoiding the need for medical treatment by immersion in water, which often can not be authorized due to public health and environmental problems.

10. Biodegradable organic raw materials, such as praziquantel and florfenicol, solvents of glycerol esters with lower carboxylic acids, ethoxylated sorbitol esters of fatty acids and ethoxylated castor oil are used to create emulsions.

11. Emulsion formation improves the dispersion of the two active principles in fish lakes/basins by formulating in the form of a double emulsion of the reverse emulsion type dispersed in a direct emulsion.

12. The emulsifiable composition of praziquantel and florfenicol may be administered for the treatment of parasitic / bacterial heterologous co-infections in fish.

13. The suspension of the preparation of praziquantel and florfenicol can be administered both in fish feed (medicated feed) and by its diffusion into water, having a controlled release.

ORIGINALITY ELEMENTS:

- 1) We note as an element of origin the selection of drug substance (diminazene aceturate) for complexation with β -cyclodextrin to produce a granular medicated feed.
- 2) Carrying out a process for obtaining a praziquantel and florfenicol emulsified composition with antibacterial and antiparasitic properties for the treatment of fish which has been submitted for approval and patent application A2019 / 00076.
- 3) Publication of research results in international circulation journals: 3 ISI papers, 4 BDI papers and 1 registered patent application;

We consider an innovative contribution of this thesis to the applicability of the results obtained by recommending the use of treatments at fish farms in order to prevent and / or treat parasitic infestations in farmed carp.

BIBLIOGRAFIE

1. Abdel Salam H. M., Nedal Y. Abu-Thabit, (2018) - *Stimuli responsive polymeric nanocarriers for drug delivery applications Types and triggers*, Woodhead Publishing Series in Biomaterials, Vol. 1, p. 555-557.
2. Aguilera J. M., Stanley D. W., (1999) - *Microstructural principles of food processing and engineering*. New York: Springer Science & Business Media.
3. Aldo E., J., Alexandre Fioravante De Siqueira, Caroline S. D., Felipe S. B., Flávio C. And Leandra E. K. S., (2014) - *Utilization of Composites and Nanocomposites Based on Natural Rubber and Ceramic Nanoparticles as Control Agents for Leishmania braziliensis*, "Leishmaniasis - Trends in Epidemiology, Diagnosis and Treatment", book edited by David M. Claborn, ISBN 978-953-51-1232-7, Published: March 19.
4. Alishahi M., Buchmann K., (2006) – *Temperature-dependent protection against Ichthyophthirius multifiliis following immunization of rainbow trout using live theronts*, Diseases of Aquatic Organisms, vol. 72, p. 269-273
5. Andlauer W., Furst P., (2002) - *Nutraceuticals: a piece of history, present status and outlook*. Food Res. Int.; 35:171-6.
6. Aranda, C., Urbiola, K., Ardoy, A.M., Fernández, J.M.G., Mellet, C.O., de Ilarduya, C.T., (2013) -. *Targeted gene delivery by new folate–polycationic amphiphilic cyclodextrin–DNA nanocomplexes in vitro and in vivo*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 85, 390-397.
7. Ashley L. M., (1969) - *Experimental fish neoplasia.*, P. 23-43 in O. W. Neuhaus and J. E. Halver (eds.), Fish in Research. Academic Press, New York and London.
8. Ashley L. M., (1972) - *Nutritional Pathology.*, P. 439-537 in J. E. Halver (ed.) Fish Nutrition. Academic Press, New York and London.
9. Atsriku C., D.G. Watson, J.N.A. Tetley, M.H. Grant, G.G. Skellern, (2002) - *Determination of diminazen acetate in pharmaceutical formulations by HPLC and identification of related substances by LC/MS*, J. Pharm. Biomed. Anal. 30 979–986.
10. Atwater J. E., (2000) - *Complex permittivity of cyclomaltooligosaccharides (cyclodextrins) over microwave frequencies to 26 GHz II* Carbohydrate Research –, - N o 327. - P.219-221.
11. Babick F., Hinze F, Stintz M, Ripperger S. (1998) - *Ultrasonic spectrometry for particle size analysis in dense submicron suspensions*. Part Part Syst Charact;15:230-6.
12. Bakaletz L.O., (2004) - *Developing animal models for polymicrobial diseases*. Nat Rev Microbiol 2:552–568.
13. Bakke, T.A., Cable, J., Harris, P.D., (2007) - *The biology of gyrodactylid monogeneans: the "Russian-doll killers"* Adv. Parasitol. 64, 161–376.
14. Bakke, T.A., Harris, P.D., Cable, J., (2002) - *Host specificity dynamics: observations on gyrodactylid monogeneans*. Int. J. Parasitol. 32, 281–308.
15. Bandilla M., Valtonen E. T., Suomalainen L. R. , Aphalo P. J., Hakalahti T., (2006) - *A link between ectoparasite infection and susceptibility to bacterial disease in rainbow trout.*, Int J Parasitol 36:986–990.
16. Bandt, H.J., (1946) - *Über verstärkte Schädwirkung auf Fische, insbesondere über erhöhte Giftwirkung durch Kombination von Abwassergiften* (on the intensified harmful effects on fishes, especially due to increased toxicity of the combination of waste water poisons). Beitr Wasser Abwasser und Fischerechemie, Flusswasser Untersuchungsamt, Magdeburg, 1: 15-23.
17. Bass, D., Stentiford, G.D., Littlewood, D.T.J. și Hartikainen, H., (2015) - *Diverse applications of environmental DNA methods in parasitology*. Trends in Parasitology, 31, 499–513.
18. Basson, L., Van As, J.G., (2006) - *Trichodinidae and other ciliophorans (Phylum Ciliophora)*. In: Woo, P.T.K. (Ed.), *Protozoan and Metazoan Infections*, second ed. In: Fish diseases and disorders, vol. 1. CABI Publishing, Wallingford, UK, pp. 154–182.

19. Beamish, R.J., (1972) - *Lethal pH for the white sucker Catostomus commersoni* (Lacepede). Trans. Am. Fish. Soc., 2: 355-358.
20. Beckett R., Le N.P., (1990) - *The role of organic matter and ionic composition in determining the surface charge of suspended particles in natural waters*. Colloids Surf;44:35-49.
21. Bellringer M. E., Smith T. G., Read R., Gopinath C. și Olivier P. H., (1995) - *β -Cyclodextrin: 52-Week Toxicity Studies in the Rat and Dog*. *Fd Chem Toxic* Vol 33 No 5, 367-376.
22. Bennion, D.M., Haltigan, E.A., Irwin, A.J., Donnangelo, L.L., Regenhardt, R.W., Pioquinto, D.J., Purich, D.L., Sumners, C., (2015) - *Activation of the neuroprotective angiotensin converting enzyme 2 in rat ischemic stroke*, *Hypertension*,66, p.140.
23. Bilensoy, E., Hincal, A.A., (2010) - *Cyclodextrin Based Nanomaterials in Pharmaceutical Field*. *Pharmaceutical Sciences Encyclopedia*.
24. Blanco, J., Vila-Jato, J.L., Otero, F., Anguiano, S., (1991) - *Influence of method of preparation on inclusion complexes of naproxen with different cyclodextrins*, *Drug Dev. Ind. Pharm.*,17, p. 943.
25. Boldescu V., (2008) - *Nanostructurile pe bază de ciclodextrine în tehnologia medicamentelor*, *Revistă științifică a Universității de stat din Moldova, STUDIA UNIVERSITATIS*, nr. 2(12).
26. Bondad-Reantaso, M.G., Subasinghe, R.P., Arthur, Jr., Ogawa, K., Chinabut, S., Adlard, R., Tan, Z. and Shariff, M., (2005) - *Diseases and health management in Asian aquaculture*. *Veterinary Parasitology*, vol. 132, no. 3-4, p. 249-272.
27. Bowers J. M., Mustafa A., Speare D. J., Conboy G. A., Brimacombe M., Sims D. E., Burka J. F., (2000) - *The physiological response of Atlantic salmon, Salmo salar L., to a single experimental challenge with sea lice Lepeophtheirus salmonis.*, *J Fish Dis* 23:165–172.
28. Brewster M.E. și Loftsson T. (2007) - *Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers*. *Advanced Drug Delivery Reviews* 59: 645–666.
29. Buchmann K., J. Sigh, C.V. Nielsen, M. Dalgaard, (2001) - *Host responses against the fish parasitizing ciliate Ichthyophthirius multifiliis*, *Vet Parasitol* 100(1-2) 105-16.
30. Burka, J.F., K.L. Hammell, T.E. Horsberg, G.R. Johnson, D.J. Rainnie și D.J. Speakers, (1997) - *Drugs in salmonid aquaculture - A review*. *J. Vet. Pharmacol. Therap.*, 20, 334-348.
31. Bylund G, Sumari O., (1981) - *Laboratory tests with Droncit against diplostomiasis in rainbow trout, Salmo gairdneri Richardson*. *J Fish Dis.*;4:259–64.
32. Caeser, G. V., (1968) - *In Starch and Its Derivatives*; Radley, J. A., Ed., 4th ed.; Chapman and Hall: London; p 290.
33. Callaway, R., Shinn, A.P., Grenfell, S.E., și col. (2012) - *Review of climate change impacts on marine aquaculture in the UK and Ireland*. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 22, 389–421.
34. Caramelo-Nunes C., Tente T., Almeida P., Marcos J.C., Tomaz C.T., (2011) - *Specific berenil–DNA interactions: an approach for separation of plasmid isoforms by pseudo-affinity chromatography*, *Anal. Biochem.* 412 153–158.
35. Central Institute of fisheries education (CIFE), (1997) - *Training manual on recent advances in management of water quality parameters in aquaculture*, CAS in fisheries science.183 pp.
36. Challa R., Ahuja A., Ali J. și Khar R.K., (2005) - *Cyclodextrins in drug delivery: an updated review*. *AAPS PharmSciTech* 6 (2): 329-357.
37. Chaturvedi L. D., Agarwal K., (1993) - *Haematological changes in Heteropneustes fossilis following exposure to alachlor and rogor*. *Advance Biosphere*, 12 (11): 85-92.
38. Choi M. J., Ruktanonchai U, Min SG, Chun JY, Soottitawat A., (2010) - *Physical characteristics of fish oil encapsulated by β -cyclodextrin using an aggregation method or polycaprolactone using an emulsified diffusion method*. *Food Chem*;119:1694e703.
39. Chu B., (1974) - *Laser light scattering*. New York: Academic Press.
40. Cox FEG, (2001) - *Concomitant infections, parasites and immune responses*. *Parasitology* 122:S23–S38.
41. Crini, G., (2014) - *A History of Cyclodextrins*, *Chemical Reviews*, 114(21), p.10940-10975;
42. De-Hai Xu, Phillip H. Klesius, Eric Peatman, Zhanjiang Liu, (2011) - *Susceptibility of channel catfish, blue catfish and channel blue catfish hybrid to Ichthyophthirius multifiliis*, *Aqua*. Vol. 311 p. 25–30.

43. Dewar M. J. S.; Zoebisch E. G.; Healy E. F.; Stewart J. J. P., (1985) - *Development and Use of Quantum Mechanical Molecular Models*. 76. AM1: A New General Purpose Quantum Mechanical Molecular Model., J. Am. Chem. Soc., 107, 3902–3909
44. Dhawale V. S., Amara V. R., Karp EP. A., Malek V., Patel D., Tikoo K., (2016) - *Activation of angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) attenuates allergic airway inflammation in rat asthma model*, Toxicol. Appl. Pharmacol., 306, p.16.
45. Dickerson H.W., R. C. Findly., (2014) - *Immunity to ichthyophthirius infections in fish: a synopsis*, Dev. Comp. Immunol., 43, pp. 290-299.
46. Dickinson E., (2009) - *Hydrocolloids as emulsifiers and emulsion stabilizers*. Food Hydrocoll;23:1473-82.
47. Dickinson E., (2010) - *Food emulsions and foams: stabilization by particles*. Curr Opin Colloid Interface Sci;15:40-9.
48. Dinh Hoai, T., Hutson, K. S., (2014) - *Reproductive strategies of the insidious fish ectoparasite, Neobenedenia sp. (Capsalidae: Monogenea)*. PLoS One 9. e108801.
49. Dodziuk, H., (2006) - *Cyclodextrins and Their Complexes: Chemistry, Analytical Methods, Applications*; Wiley-VCH: Weinheim.
50. Doi Y., Gray F.M., Buchholz F.L., Graham A.T., Striegel A., Yau W.W., Kirkland J.J., Bly D.D., Gordon Jr M.J., Archer R.D., (1994) - *Rheology: principles, measurements, and applications*. New York: Wiley-VCH;.
51. Dove, A.D.M., O'Donoghue, P.J., (2005) - *Trichodinids (Ciliophora: Trichodinidae) from native and exotic Australian freshwater fishes*. Acta Protozool. 44, 51–60.
52. Duca G., Boldescu V., (2008) - *Cyclodextrins - fields of application*. Part I., Chemistry Journal of Moldova. General, Industrial and Ecological Chemistry. 2008, 3 (2), 30-37
53. Duchêne, D., Cavalli, R., Gref, R., (2016) - *Cyclodextrin-based polymeric nanoparticles as efficient carriers for anticancer drugs*. Current pharmaceutical biotechnology, 17, 248-255.
54. Dyková, I. și Týmł, T. (2016) - *Testate amoeba Rhogostoma minus Belar, 1921, associated with nodular gill disease of rainbow trout, Oncorhynchus mykiss (Walbaum)*. Journal of Fish Diseases, 39, 539–546.
55. Dyková, I., Kostka, M., Wortberg, F., Nardy, E. și Pecková, H., (2010) - *New data on aetiology of nodular gill disease in rainbow trout, Oncorhynchus mykiss*. Folia Parasitologica, 57, 157–163.
56. Einsele, W. (1956) - *Neue Erkenntnisse und Wege bei der Erbrutung von Forelleneiern (Advances in hatching methods of trout eggs)*, Osterr. Fishrii, 9: 93-101.
57. Euzet, L. and Combes, C., (1998) - *The selection of habitats among the monogenea*. International Journal for Parasitology, vol. 28, no. 10, p. 1645-1652.
58. Fang Z, Bhandari B., (2010) - *Encapsulation of polyphenolse a review*. Trends Food Sci Technol;21:510e23.
59. Figueiras, A., Carvalho, R.A., Ribeiro, L., Torres- Labandeire, J.J. Varga, F.J.B. (2007) – *Solid state characterization and dissolution profiles of the inclusion complexes of omeprazole with native and chemically modified β -cyclodextrin*. Eur. J. Pharm. Biopharm., 67,531-539.
60. Foissner, W., (2014) - *An update of 'basic light and scanning electron microscopic methods for taxonomic studies of ciliated Protozoa.'* International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 64, 271–292.
61. French, D., (1957) - *Adv. Carbohydr. Chem.*, 12, 189–260.
62. Friberg S., Larsson K., Sjoblom J., (2003) - *Food emulsions*. Boca Raton, FL: CRC Press.
63. Fu Y.W., Zhang Q.Z., D.H. Xu, J.H. Liang, B. Wang, (2014) - *Antiparasitic effect of cynatratoside-C from Cynanchum atratum against Ichthyophthirius multifiliis on grass carp*, J. Agric. Food Chem., 62, pp. 7183-7189.
64. García-Vásquez, A., Shinn, A.P. and Bron, J.E., (2012)-*Development of a light microscopy stain for the sclerites of Gyrodactylus von Nordmann, 1832 (Monogenea) and related genera*. Parasitology Research, 110, 1639–1648.

65. Gelderblom, H., Verweij, J., Nooter, K., Sparreboom, A., (2001) - *Cremophor EL: the drawbacks and advantages of vehicle selection for drug formulation*. European Journal of Cancer 37, 1590-1598.
66. Giangaspero, A., Papini, R., Marangi, M., Koehler, A. V. and Gasser, R.B., (2014) - *Cryptosporidium parvum* genotype IIa and *Giardia duodenalis* assemblage A in *Mytilus galloprovincialis* on sale at local food markets. International Journal of Food Microbiology, 171, 62–67.
67. Gratzek, J.B., Gilbert, J.P., Lohr, A.L., Shotts, E.B. și Brown, J., (1983) - *Ultraviolet light control of Ichthyophthirius multifiliis Fouquet in a closed fish culture recirculation system*. Journal of Fish Diseases, 6, 145–153.
68. Guo, Z., Wu, F., Singh, V., Guo, T., Ren, X., Yin, X., Zhang, J., (2017) - *Host guest kinetic interactions between HP-β-cyclodextrin and drugs for prediction of bitter taste masking*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 140, p.231.
69. Guzey D., McClements D. J., (2006) - *Influence of environmental stresses on O/W emulsions stabilized by b- lactoglobulinepectin and b-lactoglobulinepectinechitosan membranes produced by the electrostatic layer-by-layer deposition technique*. Food Biophys;1:30-40.
70. Haidar A., Ansari K. K., (2012) – *Comparison Of Haematological And Biochemical In Healthy And Monogenean Infected Common Carp, Cyprinus Carpio*, Annals of Biological Research, 3, (4): 1843-1846.
71. Harris, P., Tinsley, R., (1987) - *The biology of Gyrodactylus gallieni (Gyrodactylidae), an unusualviviparous monogenean from the African clawed toad, Xenopus laevis*. J. Zool. 212, 325–346.
72. Hartlieb, K. J., Holcroft, J. M., Moghadam, P. Z., Vermeulen, N. A., Algaradah, M. M., Nassar, M. S., Stoddart, J. F., (2016) - *A Versatile Separation Medium*, Journal of the American Chemical Society, 138, no.7, p.2292.
73. Hashidzume, A., Takashima, Y., Yamaguchi, H., & Harada, A., (2017) - *Cyclodextrin. Comprehensive Supramolecular Chemistry II*, 269–316. doi:10.1016/b978-0-12-409547-2.13829-6.
74. Hipler U. C., Schönfelder U., Hipler C., Elsner P., (2007) - *Influence of cyclodextrins on the proliferation of HaCaT keratinocytes in vitro*. J Biomed Mater Res A. 2007 Oct;83(1):70-9.
75. Hirayama, F., Uekama, K., (1999) - *Cyclodextrin-based controlled drug release system*. Advanced drug delivery reviews 36, 125-141.
76. Hirazawa N., Akiyama K., Umeda N., (2013) - *Differences in sensitivity to the anthelmintic praziquantel by the skin-parasitic monogeneans Benedenia seriola and Neobenedenia girellae*. Aquaculture;404-405:59–64.
77. Hirazawa, N., Mitsuboshi, T., Hirata, T., Shirasu, K., (2004) - *Susceptibility of spotted halibut Verasper variegatus (Pleuronectidae) to infection by the monogenean Neobenedenia girellae (Capsalidae) and oral therapy trials using praziquantel*, Aquaculture 238, 84–94.
78. Hirazawa, N., Takano, R., Hagiwara, H., Noguchi, M. and Narita, M., (2010) - *The influence of different water temperatures on Neobenedenia girellae (Monogenea) infection, parasite growth, egg production and emerging second generation on amberjack Seriola dumerili (Carangidae) and the histopathological effect of this parasite on fish skin*. Aquaculture, vol. 299, no. 1-4, p. 2-7.
79. Hochst M.M., (1954) - *Basic diazoaminobenzene compounds*. US2673197.
80. Hoffman, A.S., (2013) - *Stimuli-responsive polymers: Biomedical applications and challenges for clinical translation*. Advanced drug delivery reviews 65, 10-16.
81. Hoffman, G.L., (1970) - *Intercontinental and transcontinental dissemination and transfaunation of fish parasites with emphasis on whirling disease (Myxosoma cerebralis)*. In: Snieszko, S.F. (Ed.), A Symposium on Diseases of Fish and Shellfish. American Fisheries Society, Washington DC, pp. 69–81 (Special Publication no. 5).
82. Holzer A. S., Sommerville C., Wootten R., (2006) - *Molecular studies on the seasonal occurrence and development of five myxozoans in farmed Salmo trutta L*. Parasitology 132:192–204.
83. <http://www.nanotech-now.com/columns/?article=097>.
84. Hunter R. J., (2001) - *Foundations of colloid science*. Oxford, UK: Oxford University Press.

85. Hutching J. (1999) - *Food color and appearance*. 2nd ed. Gaithersburg, MD: Aspen Publishing, Inc.;
86. Irie T., Uekama K. - *Pharmaceutical applications of cyclodextrins. III. Toxicological issues and safety evaluation*. J Pharm Sci. 86(2):147-62, 1997.
87. Isaksen, T.E., Karlsbakk, E., Watanabe, K. and Nylund, A., (2011) - *Ichthyobodo salmonis sp. n. (Ichthyobodonidae, Kinetoplastida), an euryhaline ectoparasite infecting Atlantic salmon (Salmo salar L.)*. Parasitology, 138, 1164–1175.
88. Ishikawa, M., Yoshii, H., Furuta, T., (2005) - *Interaction of modified cyclodextrins with cytochrome P-450*. Bioscience, biotechnology, and biochemistry 69, 246-248.
89. Johnson P. T., Hoverman J. T., (2012) - *Parasite diversity and coinfection determine pathogen infection success and host fitness*. Proc Natl Acad Sci U S A 109:9005–9012.
90. Jones, A., Bray, RA. and Gibson, DI. (Eds), (2005) - *Keys to the Trematoda*. Vol. 2. Wallingford: CAB International. 745 p.
91. Jørgensen L.V.G., (2017) - *The fish parasite Ichthyophthirius multifiliis - host immunology, vaccines and novel treatments*, Fish. Shellfish. Immunol., 67, pp. 586-595
92. Jørgensen Louise von Gersdorff, Egemen Nemli, Rasmus D. Heinecke Martin K. Raida, Kurt Buchmann, (2008) - *Immune-relevant genes expressed in rainbow trout following immunisation with a live vaccine against Ichthyophthirius multifiliis*, Diseases of Aquatic Organisms, vol. 80, p. 189–197.
93. Jørgensen, T.R., Larsen, T.B. and Buchmann, K. (2009) - *Parasite infections in recirculated rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) farms*. Aquaculture, 289, 91–94.
94. Justine, J.L., (2005) - *Species of Pseudorhabdosynochus Yamaguti, 1958 (Monogenea: Diplectanidae) from Epinephelus fasciatus and E. merra (Perciformes: Serranidae) off New Caledonia and other parts of the Indo-Pacific Ocean, with a comparison of measurements of specimens prepare*. Systematic Parasitology, 62, 1–37.
95. Kearn, G., Whittington, I., (2015) - *Sperm transfer in monogenean (Platyhelminthes) parasites*. Acta Parasitol. 60, 567–600.
96. Kearn, G.C., (1986) - *The eggs of monogeneans*. Advances in Parasitology, 25, 175–273.
97. Kerker M., (1969) - *The scattering of light*. New York: Academic Press;
98. Koinari, M., Karl, S., Ng-Hublin, J., Lymbery, A.J. and Ryan, U.M., (2013) - *Identification of novel and zoonotic Cryptosporidium species in fish from Papua New Guinea*. Veterinary Parasitology, 198, 1–9.
99. Kritsky, D.C., Leiby, P.D. and Kayton, R.J., (1978) - *A rapid stain technique for the haptor bars of Gyrodactylus species (Monogenea)*. Journal of Parasitology, 64, 172–174.
100. Kuriakose S., H.M. Muleme, C. Onyilagha, R. Singh, P. Jia, J.E. Uzonna, (2012) - *Diminazen aceturate (Berenil) modulates the host cellular and inflammatory responses to trypanosoma congolense infection*, PLoS One 7 e48696.
101. Kuriakose S., J.E. Uzonna, (2014) - *Diminazen aceturate (Berenil), a new use for an old compound?* Int. Immunopharmacol. 21;342–345.
102. Kuriakose Shiby, Helen Muleme, Chukwunonso Onyilagha, Emeka Okeke, Jude E Uzonna, (2014) - *Diminazen aceturate (Berenil) modulates LPS induced pro-inflammatory cytokine production by inhibiting phosphorylation of MAPKs and STAT proteins*, SagePub., doi.org/10.1177/1753425913507488.
103. Kurkov V. S., K., Loftsson T., (2013) - *Cyclodextrins*, doi: 10.1016/j.ipharm.2012.06.055.
104. Li X-S, Liu L, Mu T-W, Guo Q-X, (2000) - *A Systematic Quantum Chemistry Study on Cyclodextrins*, Monatshefte fur Chemie, 131, 849-855.
105. Lim L.H.S., (1998) - *Diversity of monogeneans in Southeast Asia*. Int. J. Parasitol. 28, 1495–1515.
106. Ling F., Tu, X., Huang, A., Wang, G., (2016) - *Morphometric and molecular characterization of Dactylogyrus vastator and D. intermedius in goldfish (Carassius auratus)*. Parasitol. Res. 115, 1755–1765.
107. Littlewood, D.T.J. și Bray, R.A., (2001) - *Interrelationships of the Platyhelminthes*, Taylor and Francis, London.

108. Liu Y.M., Zhang Q.Z., D.H. Xu, Y.W. Fu, D.J. Lin, S.Y. Zhou, J.P. Li, (2017) - *Antiparasitic efficacy of curcumin from Curcuma longa against Ichthyophthirius multifiliis in grass carp*, Vet. Parasitol., 236, pp. 128-136
109. Llyod, R. (1961) - *Effect of dissolved oxygen concentrations on the toxicity of several poisons to rainbow trout (Salmo gairdneri)*. J. Exp. Biol., 38: 447-445.
110. Loftsson T., Brewster M.E., (2010) - *Pharmaceutical applications of cyclodextrins: basic science and product development*. J. Pharmacy and Pharmacology. 62: 1607-1621.
111. Loftsson, T. M.E. Brewster, (2011) - *Pharmaceutical applications of cyclodextrins: effects on drug permeation through biological membranes*, J. Pharm. Pharmacol., 63 , pp. 1119–1135.
112. Loftsson, T., Brewster, M. E., Másson, M., (2004) - *Role of cyclodextrins in improving oral drug delivery*, American Journal of Drug Delivery, 2, no.4, p.261.
113. Loftsson, T., Brewster, M.E., (1996) - *Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 1. Drug solubilization and stabilization*. Journal of pharmaceutical sciences 85, 1017-1025.
114. Loftsson, T., Brewster, M.E., Masson, M., (2004a) - *Role of cyclodextrins in improving oral drug delivery*. American Journal of Drug Delivery 2, 261-275.
115. Loftsson, T., Duchêne, D., (2007) - *Cyclodextrins and their pharmaceutical applications*. International Journal of Pharmaceutics, 329, no.1–2, p.1.
116. Loftsson, T., Masson, M., Brewster, M.E., (2004b) - *Self association of cyclodextrins and cyclodextrin complexes*. Journal of pharmaceutical sciences 93, 1091-1099.
117. Lom, J., Dykova, I., (1992) - *Protozoan Parasites of Fishes*. Elsevier, Amsterdam, p. 315.
118. Lovell R. T., (1975) - *Nutritional deficiencies in intensively cultured catfish*. P. 721-731 in W. E. Ribelin and G. Migaki (eds.) The Pathology of Fishes. Univ. Wasconsin Press, Madison.
119. Lupu A.C, M. Bomboș, G. Vasilievici, L. D. Miron, (2019) - *Synthesis and characterization of inclusion complex of diminazene aceturate with β -cyclodextrin*, Revista de Chimie, vol. 70, nr. 7. 2019 - IF 1.412, Bucharest - Romania ISSN: 0034-7752, Vol. 70 (1).
120. Lupu Andrei-Cristian, Alin Barbacariu, Constantin Roman, Andrei-Alexandru Cîmpan, Raluca Mîndru, Gabriela-Victoria Martinescu, Liviu Dan Miron, (2018) - *In vitro study of diminazene aceturate complex with β -cyclodextrin for Ichthyophthirius multifiliis*, Lucr. ȘT. USAMV Iași, seria Medicină Veterinară, Ed. "Ion Ionescu de la Brad" Iași, vol. 61/2018, ISSN 2393-4603, p. 58-64.
121. Lupu Andrei-Cristian, Alin Barbacariu, Constantin Roman, Raluca Mîndru, Gabriela-Victoria Martinescu, Andrei-Alexandru Cîmpan, Liviu Dan Miron, (2018) - *In vivo study of conjugated diminazene aceturate for ichthyophthiriosis of farmed carp*, Lucr. ȘT. USAMV Iași, seria Medicină Veterinară, Ed. "Ion Ionescu de la Brad" Iași, vol. 61/2018, ISSN 2393-4603, p. 65-75.
122. Luzardo-Álvarez A., Martínez-Mazagatos J., M.T. Santamarina-Fernández, F. J. Otero-Espinar, J. Blanco-Méndez, (2003) - *Oral pharmacological treatments for ichthyophthiriosis of rainbow trout (Onchorynchus mykiss)*, Volume 220, Issues 1–4, Pages 15-25.
123. M. Ventura, I. Paperna, (1985) - *Histopathology of Ichthyophthirius-multifiliis infections in fishes*, Journal of Fish Biology 27(2) 185-203.
124. Madene A, Jacquot M, Scher J, Desobry S., (2006) - *Flavour encapsulation and controlled release a review*. Int J Food Sci Technol;41:1e21.
125. Malikova, E. M., S. O. Apine, și R. E. Shaldaeva., (1961) -Tr. Nauchno-Issled. Inst. Rybn. Khoz. Latvusk. 3: 445-452. (Ref. Zh. Biol. 1962, 7172; Transl. Biol. Abstr. 45, No. 32062, 1964.).
126. Mark G. Papich DVM, M. S. DACVCP, (2016) - in *Saunders Handbook of Veterinary Drugs* (Fourth Edition),.
127. Marques, H.M.C., (2010) - *A review on cyclodextrin encapsulation of essential oils and volatiles*. Flavour and Fragrance Journal 25, 313-326.
128. Martin Del Valle E. M., (2004) - *Cyclodextrins and their uses :a review*, Process Biochemistry Volume 39, Issue 9, Pages 1033-1046.
129. Matthews, R.A., (2005) - *Ichthyophthirius multifiliis Fouquet and ichthyophthiriosis in freshwater teleosts*. In: Advances in Parasitology. Elsevier Science and Technology, San Diego, pp. 159–241.
130. Mbaya A.W., M.M. Aliyu, C.O. Nwosu, V.O. Taiwo, U.I. Ibrahim, (2009) - *Effects of melarsamine hydrochloride (Cymelarsan®) and diminazene aceturate (Berenil®) on the pathology of experimental*

- Trypanosoma brucei* infection in red fronted gazelles (*Gazella rufifrons*), Vet. Parasitol. 163 140–143.
131. McClements D, Chantrapornchai W, Clydesdale F., (1998) - *Prediction of food emulsion color using light scattering theory*. J Food Sci;63:935-9.
 132. McClements D. J., (2007) - *Critical review of techniques and methodologies for characterization of emulsion stability*. Crit Rev Food Sci Nutr;47:611-49.
 133. McClements D. J., Li Y., (2010) - *Structured emulsion-based delivery systems: controlling the digestion and release of lipophilic food components*. Adv Colloid Interface Sci;159:213-28.
 134. McClements DJ, Decker EA, Weiss J., (2007) - *Emulsion-based delivery systems for lipophilic bioactive components*. J Food Sci;72:R109-24.
 135. McClements DJ., (2001) - *Emulsion droplet size determination*. Curr Prot Food Anal Chem;50(2):117-20.
 136. McClements DJ., (2006) - *Ultrasonic measurements in particle size analysis*. In: Meyers RA, editor. Encyclopedia of analytical chemistry. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd;.
 137. McClements DJ., (2015) - *Food emulsions: principles, practices, and techniques*. Boca Raton, FL: CRC Press;.
 138. Mejia-Ariza, R., Grana-Suarez, L., Verboom, W., Huskens, J., (2017) - *Cyclodextrin-based supramolecular nanoparticles for biomedical applications*, Journal of Materials Chemistry B, 5, no.1, p.36.
 139. Mendoza-Palmero, C., Blasco-Costa, I. și Scholz, T., (2015) - *Molecular phylogeny of Neotropical monogeneans (Platyhelminthes: Monogenea) from catfishes (Siluriformes)*. Parasites and Vectors, 8, 164.
 140. Menendez, R., (1976) - *Chronic effects of reduced pH on brook trout (Salvelinus fontinalis)*. J. Fish. Res. Bd. Can., 33: 118-123.
 141. Michel, C., B. Kerouault și C. Martin., (2003) - *Chloramphenicol and florfenicol susceptibility of fish-pathogenic bacteria isolated in France: comparison of minimum inhibitory concentration, using recommended provisory standards for fish bacteria*. J. Appl. Microbiol., 95(5), 1007–1014.
 142. Milbrink, G. and Johansson, N., (1975) - *Effects of acidification on roe of roach, Rutilus rutilus L., and perch, Perca fluviatilis L., with special reference to the Avaa lake system in eastern Sweden*, Inst. Freshw. Res. Drottningholm, Report, 54: 52-62.
 143. Milne, S.J. și Avenant-Oldewage, A. (2006) - *The fluorescent detection of Paradiplozoon sp. (Monogenea: Diplozoidae) attachment clamps' sclerites and integumental proteins*. Onderstepoort Journal of Veterinary Research, 73, 149–152.
 144. Miron L., (1999) - *Tratamente antiparazitare la Salmonidele crescute intensiv pe lacurile Montane din România, Lacurile de acumulare din România, Vol. 2, p. 107-116*.
 145. Mitchell A. J., (1995) - *Importance of treatment duration for praziquantel used against larval digenetic trematodes in sunshine bass*, J Aquat Anim Health;7:327–30.
 146. Mitchell, S.O. și Rodger, H.D., (2011) - *A review of infectious gill disease in marine salmonid fish*. Journal of Fish Diseases, 34, 411–432.
 147. Moestrup, Ø., Hansen, G., Daugbjerg, N., și colab., (2014) - *The dinoflagellates Pfiesteria shumwayae and Luciella masanensis cause fish kills in recirculation fish farms in Denmark*. Harmful Algae, 32, 33–39.
 148. Moti Y., R. De Deken, E. Thys, J. Van Den Abbeele, L. Duchateau, V. Delespaux, (2015) - *PCR and microsatellite analysis of diminazen acetate resistance of bovine trypanosomes correlated to knowledge, attitude and practice of livestock keepers in South-Western Ethiopia*, Acta Trop. 146 45–52.
 149. Mount, D.I., (1973) - *Chronic effects of low pH on fathead minnow survival, growth and reproduction*. Wat. Res., 7: 987-993.
 150. Mousavi, H.E., Mood, S., Omrani, B., Mokhayer, B., Ahmadi, M., Soltani, M., Mirzargar, S., Masoumian, M., Pazooki, J., (2009) - *Gill ectoparasites of goldfish (Carassius auratus, pearl scale variety) imported into Iran*. Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol. 29, 175–183.

151. Muller R, Heinemann S., (1992) - *Fat emulsions for parenteral nutrition: I. Evaluation of microscopic and laser light scattering methods for the determination of the physical stability*. Clin Nutr;11:223-36.
152. Nelson, J.S., Grande, T.C., Wilson, M.V.H., (2016) - *Fishes of the World*, fifth ed. John Wiley & Sons, New Jersey, p. 752.
153. Nigrelli, R.F., Pokorny, K.S., Ruggieri, G.D., (1976) - *Notes on Ichthyophthirius multifiliis, ciliate parasitic on freshwater fishes, with some remarks on possible physiological races and species*. Trans. Am. Microsc. Soc. 95, 607–613.
154. Noble, A.C., Herman, R.L., Noga, E.J. and Bullock, G.L., (1997) - *Recurrent amoebic gill infestation in rainbow trout cultured in a semiclosed water recirculation system*. Journal of Aquatic Animal Health, 9, 64–69.
155. Noga E., (2010) - *Fish Disease: Diagnosis and Treatment 2nd edition*, Wiley-Blackwell, San Francisco, California, ISBN: 978-0-813-80697-6.
156. Nordmo, R., J. M. Holth Riset, K. Varma, H. I. Sutherland și E. S. Brokken., (1998) - *Evaluation of florfenicol in Atlantic salmon, Salmo salar L.: efficacy against furunculosis due to Aeromonas salmonicida and cold water vibriosis due to Vibrio salmonicida*. J. Fish Dis., 21, 288–296.
157. Nurunnabi M, Revuri V, Huh K.M, Lee Y., (2017) - *Polysaccharide based nano/micro formulation: an effective and versatile oral drug delivery system*. Nanostructures for Oral Medicine, 409-433 (Elsevier Press).
158. Olsen M., Kania Per W., Heinecke R. D., Skjoedt K., Rasmussen K. J., Buchmann K., (2011) - *Cellular and humoral factors involved in the response of rainbow trout gills to Ichthyophthirius infections: Molecular and immunohistochemical studies*, Fish & Shellfish Immun.30, p.859-869
159. Paladini G., Longshaw M., Gustinelli A. and Andrew P. Shinn, (2017) - *Parasitic Diseases in Aquaculture*, DOI: 10.1002/9781119152125.ch4., Diagnosis and Control of Diseases of Fish and Shellfish, pp-38-107.
160. Peregrine, A.S., Mamman, M., (1993) - *Pharmacology of diminazene: a review*, Acta Trop. 54 , p.184.
161. Pouyaud, L., Desmarais, E., Deveney, M. and Pariselle, A., (2006) - *Phylogenetic relationships among monogenean gill parasites (Dactylogyridea, Ancyrocephalidae) infesting tilapiine hosts (Cichlidae): Systematic and evolutionary implications*. Molecular Phylogenetics and Evolution, 38, 241–249.
162. Poynton, S. L., Campbell, T. W., Palm, H. W., (1997) - *Skin lesions in captive lemon sharks Negaprion brevirostris (Carcharhinidae) associated with the monogenean Neodermophthirius harkemai Price, 1963 (Microthoriidae)*. Diseases of Aquatic Organisms 31, 28–32.
163. Pu, G , Xin, Y., Jing, Li , Jiang , R., Dai, J., Zhang,L., (2018) - *Diminazene aceturate alleviated lipopolysaccharide/D-galactosamine-induced fulminant hepatitis in mice*, Biomedicine & Pharmacotherapy, 98, p. 142.
164. Qiu, Y., Shil, P.K., Zhu, P., Yang, H., Verma, A, . Lei, B., Li, Q., (2014) - *Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) activator diminazene aceturate ameliorates endotoxin-induced uveitis in mice*, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 55, p.3808.
165. Quaglio, F., Perolo, A., Bronzatti, P., și colab., (2016) - *Nodular gill disease in farmed rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) in Italy*. Journal of Fish Diseases, 39(9), 1139–1142.
166. Rajewski, R.A., Stella, V.J., (1996) - *Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 2. In vivo drug delivery*. Journal of pharmaceutical sciences 85, 1142-1169.
167. Ram Prakash Raman, Makesh Marappan, (2013) - *ENVIRONMENTAL STRESS MEDIATED DISEASES OF FISH: AN OVERVIEW*, Advances in Fish Research, Vol.-V, Pages 141–158.
168. Ramaa C, Shirode A, Mundada A, Kadam V. (2006) - *Nutraceuticals an emerging era in the treatment and prevention of cardiovascular diseases*. Curr Pharm Biotechnol;7:15e23.
169. Reichenbach Klinke, H.H. (1975) - *Die Mitwirkung von Umweltfaktoren (Temperatur, Sauerstoff, Licht, pH) bei der Bekämpfung von Parasiten (combination of environmental factors (temperature, oxygen, light, pH) in the control of parasites)*. Fisch und Umwelt, 1: 151-153.
170. Reid A., Lymbery A., Ng J., Tweedle S. și Ryan, U., (2010) - *Identification of novel and zoonotic Cryptosporidium species in marine fish*. Veterinary Parasitology, 168, 190–195.

171. Reverter M., Bontemps N., D. Lecchini, B. Banaigs, P. Sasal., (2014) - *Use of plant extracts in fish aquaculture as an alternative to chemotherapy: current status and future perspectives.*, Aquaculture, 433, pp. 50-61
172. Ribeiro, L. S. S., Ferreira, D. C., Veiga, F. J. B., (2003) - *Physicochemical investigation of the effects of water soluble polymers on vinpocetine complexation with β -cyclodextrin and its sulfobutyl ether derivative in solution and solid state.* Eur. J. Pharm. Sci., 20, 253-266.
173. Ruby, S.M., Aczel, J. and Craig, G.R., (1977) - *The effects of depressed pH on oogenesis in flagfish *Jordanella floridae*.* Wat Res., 111: 757-762.
174. Russ J. C., (2004) - *Image analysis of food microstructure.* Boca Raton, FL: CRC Press.
175. Russel, C., Spulverda-Carreno, Rodriguez, Rodriguez-Baeza, M., Alderete, J.B., (2000) – *Inclusion complex of the antiviral drug Acyclovir with cyclodextrin in aqueous solution and in solid phase,* Quimica Nova. 23(6):749-753.
176. Salústio, P.J., Pontes, P., Conduto, C., Sanches, I., Carvalho, C., Arrais, J., Marques, H.M.C., (2011) - *Advanced Technologies for Oral Controlled Release: Cyclodextrins for Oral Controlled Release.* AAPS PharmSciTech 12, 1276-1292.
177. Samuelsen, O. B. and Ø. Bergh., (2004) - *Efficacy of orally administered florfenicol and oxolinic acid in the treatment of Vibriosis in cod (*Gadus morhua* L.).* Aquaculture, 235, 26–37.
178. Sanmartin Duran M. L., Caamano-Garcia F., Fernandez Casal J., Leiro J., Ubeira F. M., (1989) - *Anthelmintic activity of praziquantel, niclosamide, netobimin and mebendazole against *Bothriocephalus scorpii* naturally infecting turbot (*Scophthalmus maximus*).* Aquaculture;76:199–201.
179. Savu M, Niculae M., Cadar D., Kiss T., Krupaci F., Andru C., Bordeanu A., (2011) - *Environmental Microbiota Related to Bacterial Carriage in Cultivated Trout (*Oncorhynchus mykiss* and *Salvenilus fontinalis*),* Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Veterinary Medicine, Vol.1 no. 68.
180. Schaperclaus, W. (1991) - *Fish Diseases Vol.2* Oxonian Press Pvt. Ltd., New Delhi and Calcutta, XVI+ 597 –1398 p.158 Advances in Fish Research.
181. Schaperclaus, W., (1956) - *New moglichkeiten zur Bekämpfung von Infektionskrankheiten bei Aquarienfischen (New possibilities for the control of infectious diseases in aquarium fishes).* Aquarien-Terrarien-Ztg., 9: 213-215.
182. Schmahl, G., Mehlhorn, H., Taraschewski, H., (1989) - *Treatment of fish parasites. 5. The effects of sym. Triazinone (toltrazuril) on fish parasitic Ciliophora (*Ichthyophthirius multifiliis*)* Fouquet, 1876, Apiosoma amoebae Grenfell, 1884, Trichodina sp. Ehrenberg, 1831). Eur. J. Protist. 24, 152–161.
183. Schneider P, Schmidt G., (2009) - *Nanocomposite polymer hydrogels.* Colloid Polym Sci. ;287: 1-11.
184. Schreckenabh, K. și Spangenberg, R., (1983) - *Das Auftreten von stickstoffverbindungen bei der Satzkarpfenproduktion und ihre Toxizität (The formation of nitrogenous compounds and their toxicities in the production of young carp),* Z. Binnenfischerei, DDR, 30: 115-122.
185. Schultz S, Wagner G, Urban K, Ulrich J., (2004) - *High-pressure homogenization as a process for emulsion formation.* Chem Eng Technol;27:361-8.
186. Seymour, A.H. și Donaldson, J.R., (1953) - *Occurrence of high mortality among Chinook salmon fry after the recharge of a charcoal filter.* Prog. Fish Culturist, 15: 121-125.
187. Shah, S., Prematta, T., Adkinson, N.F., Ishmael, F.T., (2013) - *Hypersensitivity to polyethylene glycols.* The Journal of Clinical Pharmacology 53, 352-355.
188. Shinn A.P., Picon-Camacho, Bawden R., Taylor N.G.H., (2009) - *Mechanical control of *Ichthyophthirius multifiliis* Fouquet, 1876 (Ciliophora) in a rainbow trout hatchery,* Aquacultural Engineering, vol.41, p. 152–157
189. Shinn, A.P., Pratoomyot, J., Bron, J.E., Paladini, G., Brooker, E.E. and Brooker, A.J. (2015) - *Economic costs of protistan and metazoan parasites to global mariculture.* Parasitology, 142, 196–270.

190. Siefert B. And Keipert S., (1997) - *Influence of Alpha-Cyclodextrin and Hydroxyalkylated β -Cyclodextrin Derivatives on the In Vitro Corneal Uptake and Permeation of Aqueous Pilocarpine-HCl Solutions*. J Pharmaceut Sciences 86 (6): 716-720.
191. Sitja-Bobadilla A., Felipe D.E., Alvarez Pellitero M. C., , P., (2006) -. *In vivo and in vitro treatments against Sparicotyle chrysophrii (Monogenea: Microcotylidae) parasitizing the gills of gilthead sea bream (Sparus aurata L.)*. Aquaculture 261, 857–863.
192. Snieszko, S. F., (1972) - *Nutritional fish diseases*. P.403-437 in J. E. Halver (ed.) Fish Nutrition. Academic Press, New York and London.
193. Souza L. K., Nicolau L. A., Sousa N.A., Araujo T.S., Sousa F. B., Costa D. S., Souza F. M., Pacifico D. M., Martins C. S., Silva R.O., Souza M.H., Cerqueira G.S., Medeiros J.V., (2016) - *Diminazene aceturate, an angiotensin-converting enzyme II activator, prevents gastric mucosal damage in mice: role of the angiotensin-(1–7)/mas receptor axis*, Biochem. Pharmacol., 112 , p.51.
194. Sow A., I. Sidibé, Z. Bengaly, T. Marcotty, M. Séré, A. Diallo, H.S. Vitouley, R.L. Nebié, M. Ouédraogo, G.K. Akoda, P. Van den Bossche, J. Van Den Abbeele, R. De Deken, V. Delespaulx, (2012) - *Field detection of resistance to isometamidium chloride and diminazen aceturate in Trypanosoma vivax from the region of the Boucle du Mouhoun in Burkina Faso*, Vet. Parasitol. 187 105–111.
195. Spotte, S.H., (1979) - *Fish and invertebrate culture, second edn*. John Willy and Sons, New York.
196. Stefansson E., Loftsson T., (2002) - *Cyclodextrins in the eye drop formulations: enhanced topical delivery of corticosteroids in the eye*. Acta Ophthalmol Scand. 80 (2): 144-150.
197. Stella V.J. și H.E, Q., (2008) - *Cyclodextrins*. Toxicol Pathol 36, 30-42.
198. Stewart J. J. P., (1989) - *Optimization of Parameters for Semiempirical Methods II. Applications*, J. Comput. Chem. 10, 2, 209–220
199. Stokes D., Thiel B., Donald A., (1998) - *Direct observation of water/oil emulsion systems in the liquid state by environmental scanning electron microscopy*. Langmuir;1:4402-8.
200. Szejtli, J., (1988) - *Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry*, Chemical Reviews, 98, no.5, , p.1742.
201. Szejtli, J., Osa, T., (1996) – *Cyclodextrins*, Eds.; Pergamon: Oxford,; pp 1–3.
202. Tadros T., (2004) - *Application of rheology for assessment and prediction of the long-term physical stability of emulsions*. Adv Colloid Interface Sci;108:227-58.
203. Tadros T.F., (1994) - *Fundamental principles of emulsion rheology and their applications*. Colloids Surf A Physicochem Eng Asp;91:39-55.
204. Thoma, J. A.; Stewart, L., (1965) - In *Starch, Chemistry and Technology*; Whistler, R. L., Paschall, E. F., Eds.; Academic Press: New York; pp 209–249.
205. Thoney, D.A. and Hargis, W.J., (1991) - *Monogenea (Platyhelminthes) as hazards for fish in confinement*. Annual Review of Fish Diseases, 1, 133–153.
206. Ting Y, Jiang Y, Ho CT, Huang Q., (2014) - *Common delivery systems for enhancing in vivo bioavailability and biological efficacy of nutraceuticals*. J. Funct Foods; 7:112e28.
207. Ting Y., Xia Q., Li S., Ho C.T., Huang Q. (2013) - *Design of high-loading and high-stability viscoelastic emulsions for polymethoxyflavones*. Food Res Int;54:633-40.
208. Tonin A.A., A.S. Da Silva, M.M. Costa, M.A. Otto, G.R. Thomé, K.S. Tavares, L.C. Miletti, M.R. Leal, S.T.A. Lopes, C.M. Mazzanti, S.G. Monteiro, M.L. de La Rue, (2011) - *Diminazen aceturate associated with sodium selenite and vitamin E in the treatment of Trypanosoma evansi infection in rats*, Exp. Parasitol. 128 243–249.
209. Trujillo-González A., Becker J. A., Kate S. Hutson, (2018) - *Parasite Dispersal From the Ornamental Goldfish Trade*, Advances in Parasitology, Vol. 100, Elsevier Ltd ISSN:0065-308X.
210. Valladão G. M.R., Sílvia Umeda Gallani, Pilarski F., (2015) - *Phytotherapy as an alternative for treating fish disease*, January , DOI: 10.1111/jvp.12202, Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics 38(5).
211. Wang X., Dickerson H.W., (2002) - *Surface immobilization antigen of the parasitic ciliate Ichthyophthirius multifiliis elicits protective immunity in channel catfish (Ictalurus punctatus)*, Clin. Vaccine Immunol., 9, pp. 176-181

212. Wang, Y., Liu, Y., Liang, J., Zou, M., (2017) - *A cyclodextrin-core star copolymer with Y-shaped ABC miktoarms and its unimolecular micelles*, Rsc. Advances, 7, no.19, , p.11691.
 213. Wedemeyer, G.A. și Yasutake, W.T., (1978) - *Prevention and treatment of nitrite toxicity in Juvenile steelhead trout (Salmo gairdneri)*. J. Fish Res. Board Can. 35: 822-827.
 214. Whittington, I.D., (1996) - *Benedeniine Capsalid monogeneans from Australian fishes: pathogenic species, site-specificity and camouflage*. J. Helminthol. 70, 177–184.
 215. Whittington, I.D., Chisholm, L.A., (2008) - *Diseases caused by Monogenea*. In: Eiras, J.C., Segner, H., Wahlii, T., Kapoor, B.G. (Eds.), Fish Diseases. Science Publishers Inc, New Hampshire, pp. 683–816.
 216. Whittington, I.D., Ernst, I., (2002) - *Migration, site-specificity and development of Benedenia lutjani (Monogenea: Capsalidae) on the surface of its host, Lutjanus carponotatus (Pisces: Lutjanidae)*. Parasitology 124, 423–434.
 217. Williams, R.E., Ernst, I., Chambers, C.B., Whittington, I.D., (2007) - *Efficacy of orally administered praziquantel against Zeuxapta seriola and Benedenia seriola (Monogenea) in yellowtail kingfish Seriola lalandi*. Diseases of Aquatic Organisms 77, 197–203.
 218. Willis, J.E., McClure, J.T., Davidson, J., McClure, C. and Greenwood, S.J., (2013) - *Global occurrence of Cryptosporidium and Giardia in shellfish: Should Canada take a closer look?* Food Research International, 52, 119–135.
 219. Woo P. T. K., D. W. Bruno, (2006) - *Fish diseases and disorders*, Vol. 1, Protozoan and Metazoan Infection, 2nd edition.
 220. Wriedt T. (2012) - *Mie theory: a review*. In: Hergert W, Wriedt T, editors. The Mie theory. Berlin: Springer;. p. 53-71.
 221. Xu D.H., Klesius P.H., Shoemaker C.A., (2009) - *Effect of immunization of channel catfish with inactivated trophonts on serum and cutaneous antibody titers and survival against Ichthyophthirius multifiliis*. Fish. Shellfish. Immunol., 26, pp. 614-618
 222. Yamamoto Shinji, Sho Shirakashi, Satoshi Morimoto, Katsuya Ishimaru, Osamu Murata. (2011) - *Efficacy of oral praziquantel treatment against the skin fluke infection of cultured chub mackerel, Scomber japonicus*, Aquaculture 319(1):53-57.
 223. Yang X, Tian H, Ho CT, Huang Q., (2011) - *Stability of citral in emulsions coated with cationic biopolymer layers*. J Agric Food Chem;60:402e9.
 224. Yin-Ting Hu, Yuwen Ting, Jing-Yu Hu, Shu-Chen Hsieh., (2016) - *Techniques and methods to study functional characteristics of emulsion systems*, Journal of food and drug analysis 25, p.16-26.
 225. Zhang Q.Z., D.H. Xu, P.H. Klesius., (2013) - *Evaluation of an antiparasitic compound extracted from Galla chinensis against fish parasite Ichthyophthirius multifiliis*, Vet. Parasitol., 198, pp. 45-53.
 226. Zhang, J., Ma, P.X., (2013) - *Cyclodextrin-based supramolecular systems for drug delivery: recent progress and future perspective*. Advanced drug delivery reviews 65, 1215-1233.
 227. Zheng, C., Lei, C., Chen, Z., Zheng, S., Yang, H., Qiu, Y., Lei, B., (2015) - *Topical administration of diminase aceturate decreases inflammation in endotoxin-induced uveitis*, Mol. Dream., 21, p.403.
- Alte surse:
- ***CALIFORNIA DEPARTMENT OF PESTICIDE REGULATION PUBLIC REPORT 2007-8
 - ***GUIDELINE FOR RESIDUAL SOLVENTS (CPMP/ICH/283/95).
 - ***GUIDELINE ON EXCIPIENTS IN THE LABEL AND PACKAGE LEAFLET OF MEDICINAL PRODUCTS FOR HUMAN USE' (CPMP/463/00 Rev.1). July 2003.
 - FAO, (2011) - *Diagnostics, Prevention and Therapy of Fish Diseases and Intoxication*.
 - FAO, (2018) – *The State of world fisheries and aquaculture*.
 - www.wikipedia.com

ANEXA 1. LISTA ABREVIERILOR

ANNEX 1. ABBREVIATIONS LIST

°C – grad Celsius
μm – micrometru
ADN – adenzinotrifosfat
AFM – Atomic Force Microscopy/Microscopie de forță atomică
Å, Å – Angstrom
AM1 - Austin Model 1
BET – Brunauer-Emmett-Teller theory
Br – brom
C – carbon
CD – ciclodextrină
CME-β-CD - Carboximetil-etil-β-ciclodextrina
CM-β-CD - Carboximetil-β-ciclodextrina
DE-β-CD - Dietil-β-ciclodextrina
DLS – Dynamic Light Scattering
Dm – diametrul mediu
DM – diminazen aceturat
DMSO – dimetil-sulfoxid
DM-β-CD - Dimetil-β-ciclodextrină
DSC - Differential Scanning Calorimetry
DTG – analiză termogravimetrică diferențială
E_{CD} - reprezintă valorile formării de căldură a CD
E_{COMP} - valoarea căldurii de formare a complexului
E_{DM} - reprezintă valorile formării de căldură a DM-ului
EMAL – lauril-eter-sulfatul de sodiu
FFC – flourfenicol
Fig. – figura
g – gram
G₁-β-CD - Glucosil-β-ciclodextrina
G₂-β-CD - Maltosil-β-ciclodextrina
GHz – gigaherți
H – hidrogen
HBU-β-CD - Hidroxibutenil-β-ciclodextrina
HE-β-CD - Hidroxietil-β-ciclodextrina
HP-β-CD - Hidroxipropil-β-ciclodextrina
HP-γ-CD - Hidroxipropil-γ-ciclodextrina
IL – interleukina
IR – infraroșu/infrared

K – grad Kelvin
Kcal - kilocalorie
kJ – kilojoule
l – litru
LPS - lipopolizaharide
m – metru
m² – metru pătrat
mg - miligram
MHz – megaherți
min. – minut
Mixture – amestec
ml - mililitru
mm - milimetru
mM - milimoli
Mol – mol
M-β-CD - Metil-β-ciclodextrina
N – azot
nm – nanometru
O – oxigen
OH - hidroxil
PBS – Phosphate buffered saline
PDB – protein data bank
PEG 400 – polietilen glicol 400
pH – potențialul de hidrogen
PM3 - Parameterized Model number 3
Ppm – părți per milion
PZQ – praziquantel
RM-β-CD - Random metil-β-cyclodextrina
Rpm – rotații pe minut
S – secundă
SBE-β-CD - Sulfobutyleter-β-cyclodextrina
SEM - *Scanning Electron Microscopy*
T_{1/2} – timpul de înjumătățire
TEM – microscopie electronică prin transmisie/Transmission Electron Microscopy
T_{endset} – temperatura la care se termină procesul de degradare,
TG – termogravimetric
TGI – tractusul gastro-intestinal/gastro-intestinal tube
TNF – factorul de necroză tumorală
T_{onset} – debutul temperaturii la care începe degradarea termică
T_{peak} – la care viteza de degradare atinge valoarea maximă,
Tween 80 – sorbitan monooleat polietoxialt cu 20 EO
UV – radiații ultraviolete
W% - reziduu - cantitatea de probă degradată,

LUPU Andrei-Cristian

XRD – X Ray Diffractometry/difractometrie cu raze X

α – alfa

α -CD - alfa-cyclodextrina

β – beta

β -CD - beta-cyclodextrina

γ - gamma

γ -CD - gamma-cyclodextrina

Θ - teta

ANEXA 2. LISTA TABELELOR

Tabel 3.1. Structurile generale ale ciclodextrinelor și abrevierile lor (după STELLA V., 2008).....	17
Tabel 3.2. Produse conjugate cu ciclodextrine destinate diferitelor tipuri de administrări (după <i>Guideline on excipients in the label and package leaflet of medicinal products for human use</i> , 2003).....	22
Tabel 3.3. Câteva exemple de produse farmaceutice ce conțin ciclodextrine (Kurkov S., 2013).....	24
Tabel 7.1. Caracteristicile texturale ale complexului diminazen aceturat - β -ciclodextrina.....	62
Tabel 7.2. Caracteristici Termogravimetrice	64
Tabel 8.1. Eficacitatea substanței complexate la diferite doze (mortalități după 6h).....	85
Tabel 9.1. Masele peștilor selectați pentru studiu.....	94
Tabel 9.2. Rezultatele tratamentului peștilor cu furajul care conține Diminazen aceturat (DM) sau DM- β -Ciclodextrina (în ambele cazuri 5g medicament/kg furaj, timp de 10 zile).....	96
Tabel 9.3. Analiza biochimică la 24 de ore de la terminarea tratamentului.....	98
Tabel 10.1. Caracteristicile particulelor de florfenicol măcinate în prezența uleiului de ricin etoxilat.....	105
Tabel 10.2. Caracteristicile particulelor de florfenicol măcinate în prezența uleiului de floarea soarelui.....	106
Tabel 10.3. Caracteristicile particulelor de praziquantel măcinate în prezența uleiului de floarea soarelui.....	107
Tabel 10.4. Caracteristicile particulelor de praziquantel măcinate în prezența uleiului de ricin etoxilat.....	108

Tabel 10.5. Rețetele utilizate la prepararea suspensiilor apoase de praziquantel.....	110
Tabel 10.6. Rețetele utilizate la prepararea suspensiilor apoase de florfenicol	110

ANNEX 2. LIST OF TABLES

Table 3.1. General structures of cyclodextrins and their abbreviations (after STELLA V., 2008).....	17
Table 3.2. Conjugated products with cyclodextrins for different types of administration.(după <i>Guideline on excipients in the label and package leaflet of medicinal products for human use</i> , 2003).....	22
Table 3.3. Some examples of pharmaceutical products containing cyclodextrins (Kurkov S., 2013).....	24
Table 7.1. Textural characteristics of diminazene aceturate - β -cyclodextrin complex	62
Table 7.2. Thermogravimetric characteristics.....	64
Table 8.1. The efficacy of complexed drug at different doses (mortalities after 6 h).....	85
Table 9.1. Fish masses selected for study.....	94
Table 9.2. The results of treatment of fish with feed containing Diminazen aceturate (DM) or DM- β -Cyclodextrin (in both cases 5g drug / kg feed for 10 days).....	96
Table 9.3. Biochemical analysis 24 hours after completion of treatment.....	98
Table 10.1. Characteristics of milled florfenicol particles in the presence of ethoxylated castor oil.....	105
Table 10.2. Characteristics of milled florfenicol particles in the presence of sunflower oil.....	106
Table 10.3. Characteristics of milled praziquantel particles in the presence of sunflower oil.....	107
Table 10.4. Caracteristicile particulelor de praziquantel măcinate în prezența uleiului de ricin etoxilat.....	108
Table 10.5. Recipes used to prepare praziquantel aqueous suspensions.....	110

Table 10.6. Recipes used to prepare aqueous suspensions of florfenicol.....	110
---	------------

ANEXA 3. LISTA FIGURILOR

Fig. 3.1. Reprezentarea convențională pentru ciclodextrinele native (CD) ca un con trunchiat cu o cavitate hidrofobă (culoare albastră) care poate găzdui medicamente hidrofobe (Abdel Salam H.M., 2018).....	16
Fig. 3.2. β -ciclodextrina ($C_{42}H_{70}O_{32}$).....	16
Fig. 3.3. Diminazen (p -[(E)- p -(Diaminomethyl) phenylazoamino] benzenecarboxamidine).....	25
Fig. 4.1. Reprezentarea schematică a mecanismelor de instabilitate în sistemul de emulsie (Hu Y-T., 2017).....	29
Fig. 6.1. <i>Ichthyophthirius multifiliis</i> –tomont din mucus (x20).....	48
Fig. 6.2. <i>Ichthyophthirius multifiliis</i> – trofont din raclat branhial(x40).....	48
Fig. 6.3. <i>Dactylogyrus spp</i> : cu prezența petelor oculare (x20).....	48
Fig. 6.4. <i>Gyrodactylus spp</i> : cu prezența cârligelor embrionare(x20).....	49
Fig. 6.5. <i>Lerneia cyprinacea</i> – partea anterioară (cefalotorace) (x40).....	49
Fig. 6.6. Hipersecreția de mucus cu localizare dermică.....	52
Fig. 6.7. Trofont de <i>Ichthyophthirius multifiliis</i>	52
Fig. 7.1. β -Ciclodextrina (soft. MarvinSketch).....	58
Fig. 7.2. β -Cyclodextrina cu harta potențialului electrostatic (MEP) (img. Soft. Molden)	59
Fig. 7.3. Izoterma adsorbției/desorbției și curbele de distribuție a dimensiunilor de pori pentru complexul diminazen aceturat/ β -ciclodextrină.....	61
Fig. 7.4. Dimensiunile porilor ale complexului diminazen aceturat- β -ciclodextrină.....	62
Fig. 7.5. Analiza termogravimetrică în gaz inert și în aer sintetic pentru complexul diminazen aceturat / complexul β -ciclodextrină.....	63
Fig. 7.6. Curbele TG ale probelor analizate.....	65
Fig. 7.7. Curbele DTG ale probelor analizate.....	65
Fig. 7.8. Diminazen aceturat complexat (A)	66

Fig. 7.9. Diminazen aceturat necomplexat (B).....	66
Fig. 7.10. Analiza DSC a complexului diminazen aceturat/ β -ciclodextrină.....	67
Fig. 7.11 Spectrele IR pentru complexul diminazen aceturat/ β -ciclodextrină.....	68
Fig. 7.12. Imagini FT-IR ale suprafeței complexului DM- β -CD.....	69
Fig. 7.13. Imagini FT-IR ale suprafeței complexului DM- β -CD cu rezoluție spațială mărită.....	70
Fig. 7.14. Complexul liofilizat diminazen / beta-CD înregistrat prin microscopie de forță atomică. Imaginile AFM ale complexelor rotunde globuloase aplatizate cu dimensiuni diferite.....	71
Fig. 7.15. Imagini TEM pentru complexul DM- β -CD.....	71
Fig. 7. 16. Notările celor două părți ale moleculei de diminazen.....	73
Fig. 7.17. Reprezentarea incluziunii CD-DM (H1) la distanța de 4Å (Vedere laterală stângă, vedere perpendiculară pe planul drept al β -CD; CD-reprezentare CPK, DM-reprezentare stick).....	74
Fig. 7.18. Dependența energiei de formare a complexului pe distanța dintre centrozii gazdei și oaspete pentru ambele direcții de includere a diminazenului în marginea secundară a ciclodextrinei.....	74
Fig. 7.19. Minimile energetice ale complexilor cu energie -45,2(stânga) și -55,9 kJ/mol (dreapta).....	75
Fig. 7.20. Dependența energiei de formare a complexului pe orientarea moleculei DM (centrozii se suprapun, au fost luate în considerare ambele posibilități de includere prin bază mică).....	76
Fig. 7.21. Structuri de minim energetic ale CD:DM 1:1 (a) (CD-reprezentare CPK, DM-reprezentare stick),1:2 (b) (cu reprezentarea centroidelor pentru moleculele de DM), 2:1 (c)(legaturile de H sunt reprezentate prin linie punctata, iar molecula de DM este reprezenata stick verde).....	77
Fig. 8.1. Trofonții de <i>I. multifiliis</i> (x20)(original).....	83
Fig. 8.2. Eficactatea substanțelor după 6h.....	85
Fig. 9.1. Furajul folosit pentru includerea medicamentului (A) – Furajul de crap înainte de turnarea complexului; B) - Furajul de crap după turnarea complexului.....	89
FIG. 9.2. Extruderul folosit pentru granularea furajului medicamentat.....	90
Fig. 9.3. Imagine AFM Furaj medicamentat - Complex diminazen aceturat/ β -ciclodextrina.....	91

Fig. 9.4. Imagine AFM cu Furaj medicamentat diminazene aceturat simplu (necomplexat).....	91
Fig. 9.5. <i>Cyprinus carpio</i> – puiet.....	92
Fig. 9.6. Trofonți de <i>I. multifiliis</i> colectați de la peștii luați în studiu(x20).....	93
Fig. 9.7. Analiza viabilității trofonților după 10 zile de tratament cu furaj medicamentat.....	97
Fig. 10.1. Molecula de Praziquantel - $C_{19}H_{24}N_2O_2$: a-Reprezentare plană; b-Reprezentare 3D (soft Chemdoodle 8.1).....	102
Fig. 10.2. Molecula de Florfenicol - $C_{12}H_{14}Cl_2FNO_4S$: a-Reprezentare plană; b-Reprezentare 3D (soft Chemdoodle 8.1).....	103
Fig. 10.3. Distribuția mărimii particulelor de florfenicol măcinate în prezența uleiului de ricin etoxilat.....	105
Fig. 10.4. Distribuția mărimii particulelor de florfenicol măcinate în prezența uleiului de floarea soarelui.....	106
Fig. 10.5. Distribuția mărimii particulelor de praziquantel măcinate în prezența uleiului vegetal de floarea soarelui.....	107
Fig. 10.6. Distribuția mărimii particulelor de praziquantel măcinate în prezența uleiului de ricin etoxilat.....	108
Fig. 10.7. Instalația de preparare a suspensiei de medicament.....	109
Fig. 10.8. Principiul de măsură al metodei utilizând TurbiscanLab.....	111
Fig. 10.9. Profilurile de stabilitate pentru proba Pp1.....	111
Fig. 10.10. Profilurile de stabilitate pentru proba Pp2.....	112
Fig. 10.11. Profilurile de stabilitate pentru proba Pp3.....	112
Fig. 10.12. Profilurile de stabilitate pentru proba Pf1.....	113
Fig. 10.13. Profilurile de stabilitate pentru proba Pf2.....	113
Fig. 10.14. Profilurile de stabilitate pentru proba Pf3.....	114

ANNEX 3. LIST OF FIGURES

Fig. 3.1. Conventional representation of a cyclodextrin (CD) as a truncated cone with a hydrophobic cavity (blue colour) that can carry hydrophobic drugs (Abdel Salam H. M., 2018).....	16
Fig. 3.2. β -ciclodextrin ($C_{42}H_{70}O_{32}$).....	16
Fig. 3.3. Diminazen (p -[(E)- p -(Diaminomethyl) phenylazoamino] benzenecarboxamidine).....	25
Fig. 4.1. Schematic representation of instability mechanisms in the emulsion system (Hu Y-T., 2017).....	29
Fig. 6.1. <i>Ichthyophthirius multifiliis</i> –tomont from the mucus (x20).....	48
Fig. 6.2. <i>Ichthyophthirius multifiliis</i> – trophont from the branchial scrape (x40).....	48
Fig. 6.3. <i>Dactylogyrus spp</i> : with presence of ocular spots (x20).....	48
Fig. 6.4. <i>Gyrodactylus spp</i> with presence of embrionar hooks(x20).....	49
Fig. 6.5. <i>Lernaea cyprinacea</i> – anterior part (cefalotorax) (x40).....	49
Fig. 6.6. Mucus hyper-secretion with dermal localization.....	52
Fig. 6.7. Trophont de <i>Ichthyophthirius multifiliis</i>	52
Fig. 7.1. β -Ciclodextrin (soft. MarvinSketch).....	58
Fig. 7.2. β -Cyclodextrin with electrostatic potential map (MEP) (img. Soft. Molden). ..	59
Fig. 7.3. Adsorption/desorption isotherm and pore size distribution curves for dimerazene aceturate/ β -cyclodextrin.....	61
Fig. 7.4. The pore dimensions of the diminazene aceturate- β -cyclodextrin complex.....	62
Fig. 7.5. Thermogravimetric analysis in inert gas and in synthetic air for diminazene aceturate/ β -cyclodextrin complex.....	63
Fig. 7.6. TG curves of analysed samples.....	65
Fig. 7.7. DTG curves of analysed samples.....	65
Fig. 7.8. Complexed Diminazene aceturate (A)	66
Fig. 7.9. Uncomplexed Diminazene aceturate (B).....	66
Fig. 7.10. DSC analysis of diminazene aceturate/ β -cyclodextrin complex.....	67

Fig. 7.11. IR spectra for diminazene aceturate/ β -cyclodextrin complex.....	68
Fig. 7.12. FTIR images of the complex DM- β -CD surface.....	69
Fig. 7.13. FT-IR images of the complex DM- β -CD surface with enlarged spatial resolution.....	70
Fig. 7.14. The diminazene / beta-CD lyophilized complex recorded by atomic force microscopy. AFM images of round globular complexes flattened with different sizes.....	71
Fig. 7.15. Fig. 7.15. TEM images for the complex DM- β -CD.....	71
Fig. 7.16. The notations of the two parts of the diminazene molecule.....	73
Fig. 7.17. Representations of the inclusion CD-DM (H1) at the distance of 4 Å (side-left view, perpendicular view on the right β -CD plane; CD-representation CPK, DM-stick representation).....	74
Fig. 7.18. Dependence of formation energy of the complex on the distance between the centroids of host and guest for both inclusion directions of diminazene in the cyclodextrin secondary edge.....	74
Fig. 7.19. Energy minima of the complexes with energy of -45,2(left) and -55,9 kJ/mol (right).....	75
Fig. 7.20. Dependence of energy of formation of the complex on the orientation of DM molecule.....	76
Fig. 7.21. Minimum energy structures of CD:DM 1:1; a) CD-representation CPK, DM-stick representation, 1:2; b) with the representation of the centroids for molecules of DM, 2:1; c) the H bonds are represented by a dotted line, and the DM molecule is represented by a green stick.....	77
Fig. 8.1. Trophants of <i>I. multifiliis</i> (x20).....	83
Fig. 8.2. Effectiveness of substances after 6h.....	85
Fig. 9.1. The feed used for the inclusion of the drug (A) – simple carp feed before pouring the complex; B) – The carp feed after pouring the complex).....	89
Fig. 9.2. The extruder used for medicated feed granulation.....	90
Fig. 9.3. AFM Image medicated feed –Diminazene aceturate/ β -cyclodextrine complex.....	91
Fig. 9.4. AFM Image medicated feed with simple (uncomplexed) diminazene aceturate.....	91

Fig. 9.5. <i>Cyprinus carpio</i> – juvenile.....	92
Fig. 9.6. Trophonts of <i>I. multifiliis</i> taken from the experimental fish(x20).....	93
Fig. 9.7. Analysis of trophon viability after 10 days of treatment with medicated feed.....	97
Fig. 10.1. Praziquantel molecule - $C_{19}H_{24}N_2O_2$: a-Plane representation; b- 3D representation (soft Chemdoodle 8.1).....	102
Fig. 10.2. Florfenicol molecule - $C_{12}H_{14}Cl_2FNO_4S$: a-Plane representation; b- 3D representation (soft Chemdoodle 8.1).....	103
Fig. 10.3. Distribution of the particle size of ground florfenicol in the presence of ethoxylated castor oil.....	105
Fig. 10.4. Distribution of particle size of ground florfenicol in the presence of sunflower oil.....	106
Fig. 10.5. Distribution of the particle size of ground praziquantel in the presence of sunflower plant oil.....	107
Fig. 10.6. Distribution of the size of ground praziquantel particles in the presence of ethoxylated castor oil.....	108
Fig. 10.7. Apparatus for preparation of drug suspension.....	109
Fig. 10.8. The principle of measuring the method using TurbiscanLab.....	111
Fig. 10.9. Stability profiles for sample Pp1.....	111
Fig. 10.10. Stability profiles for sample Pp2.....	112
Fig. 10.11. Stability profiles for sample Pp3.....	112
Fig. 10.12. Stability profiles for sample Pf1.....	113
Fig. 10.13. Stability profiles for sample Pf2.....	113
Fig. 10.14. Stability profiles for sample Pf3.....	114

ANEXA 4. LISTA LUCRARILOR ȘTIINȚIFICE PUBLICATE

ANNEX 4. LIST OF SCIENTIFIC PAPERS PUBLISHED

In reviste ISI

Prim autor / coautor

(5 , din care 3 in domeniul tezei,)

1. **Andrei-Cristian LUPU**, Mihaela BOMBOȘ, Cristian-Alin BARBACARIU, Constantin ROMAN, Raluca MÎNDRU, Gabriela Victoria MARTINESCU, Liviu Dan MIRON, - *Conditioning of praziquantel and florfenicol for some heterologous coinfections of farmed carp*, (acceptata pentru publicare in Revista de Chimie, vol. 70, nr. 7.2019 - **IF 1.412**).

2. **Andrei-Cristian LUPU**, Mihaela BOMBOȘ, Gabriel VASILIEVICI, , Liviu Dan MIRON, *Synthesis and characterization of inclusion complex of diminazene aceturate with β -cyclodextrin*, (acceptata pentru publicare in Revista de Chimie, vol. 70, nr. 7. 2019 - **IF 1.412**).

3. **Andrei-Cristian LUPU**, Andra-Cristina BOSTĂNARU, Mihai MAREȘ, Laura URSU, Constantin ROMAN, Raluca MÎNDRU, Liviu Dan MIRON, *Ultrastructural aspects of Yersinia ruckeri cells after treatment with non-thermal plasma-activated water*, Revista de Chimie, ISSN: 0034-7752, vol. 70 (1) nr. 7. pp.118-121, 2019 - **IF 1.412**).

Alte publicații:

4. Omar SADIK, Lia Mara DITU, Irina GHEORGHE, Gratiela GRADISTEANU PIRCALABIORU, Coralia BLEOTU, OTILIA BANU, Nicoleta MEREZEANU, **Andrei Cristian LUPU**, Veronica LAZAR, Mariana CARMEN CHIFIRIUC, (2017)- *adherence and Biofilm Formation in Candida albicans Strains Isolated from Different Infection Sites in Hospitalized Patients*, Revista de Chimie, Vol. 68, no. 12, December, 2017, pp.2832-2835 (**IF 1.412**).

5. Ana Vasić, Nemanja Zdravković, Dragoș Aniță, Jovan Bojkovski, Mihai Marinov, Alexander Mathis, Marius Niculaua, Elena Luanda Oșlobanu, Ivan Pavlović, Dušan Petrić, Valentin Pflüger, Dubravka Pudar, Gheorghe Savuța, Predrag Simeunović, Eva Veronesi, Cornelia Silaghi and the SCOPES AMSAR training group (Adriana Aniță, Ioana Alexandra Anton, Andrei Cimpan, Lavinia Ciucă, Luciana Crivei, Aleksandar Cojkić, Darko Davitkov, Vladimir Draskovic, Bojan Gajic, Uroš Glavinić, Maria-Larisa Ivănescu, Mihaela Kavran, **Andrei-Cristian Lupu**, Raluca Pride, Daniela Porea, Radiša Prodanović, Oliver Radanović, Cristian Raileanu, Stefan Raileanu, Marko Ristanić, Constantin Roman, Ljubodrag Stanišić, Slavica Vaselek, Miloje

Đurić.), (2019) - *Species diversity, host preference and arbovirus detection of Culicoides (Diptera: Ceratopogonidae) in South-Eastern Serbia*, Parasites and Vectors, 2019 12:61, (IF 3.62).

In reviste cotate BDI

Prim autor/coautor (8)

Domeniul tezei:

1. **Andrei-Cristian LUPU**, Alin BARBACARIU, Constantin ROMAN, Raluca MÎNDRU, Gabriela-Victoria MARTINESCU, Andrei-Alexandru CÎMPAN, Liviu Dan MIRON, *In vivo study of conjugated diminazene aceturate for ichthyophthiriosis of farmed carp*, Lucr. ȘT. USAMV Iași, seria Medicină Veterinară, Ed. "Ion Ionescu de la Brad" Iași, vol. 61/2018, ISSN 2393-4603, p. 65-75.

2. **Andrei-Cristian LUPU**, Alin BARBACARIU, Constantin ROMAN, Andrei-Alexandru CÎMPAN, Raluca MÎNDRU, Gabriela-Victoria MARTINESCU, Liviu Dan MIRON, (2018) - *In vitro study of diminazene aceturate complex with β -cyclodextrin for Ichthyophthirius multifiliis*, Lucr. ȘT. USAMV Iași, seria Medicină Veterinară, Ed. "Ion Ionescu de la Brad" Iași, vol. 61/2018, ISSN 2393-4603, p. 58-64.

3. Ramona GHIORGHIASA, Manuela MIRON, **LUPU Andrei**, Elena ISAN, MIRON Liviu, (2015) - *Winter parasitic co-infections in common carp (Cyprinus carpio) from a polyculture system*. Lucr.șt.USAMV Iași, 58 (17),197-202 ISSN 1454-7406; (CABI).

4. Ramona GHIORGHIASA, Elena ISAN, Manuela MIRON, Dan TIHULCĂ, **LUPU Andrei**, MIRON Liviu, (2015) - *Parasitosis with atypical occurrence in plowed meadows Salvelinus fontinalis* M. Lucr.șt.USAMV Iași, 58 (17), 203-206, ISSN 1454-7406; (CABI).

Alte publicații:

1. Constantin ROMAN, Lavinia CIUCĂ, Raluca MARDARE (MÎNDRU), **Andrei-Cristian LUPU**, Andrei-Alexandru CÎMPAN, Maria-Larisa IVĂNESCU, Olimpia IACOB, Dumitru ACATRINEI, Liviu Dan MIRON, (2017) - *Observations regarding in vitro hatching of Raillietina spp. (Cestoda: Cyclophyllidae) onchosphere*, Lucr. ȘT: - Medicina Veterinara, Universitatea de Științe Agricole și Medicina Veterinara Ion Ionescu de la Brad Iasi, Vol. 60 (4); pp. 477-480 (ISSN 1454-7406).

2. **Andrei-Cristian LUPU**, Marius Gabriel PETRESCU, (2018) - *Equipment for water ozonization in fish breeding ponds*, 8th INTERNATIONAL MULTIDISCIPLINARY SCIENTIFIC SYMPOSIUM "UNIVERSITARIA SIMPRO 2018", section 3 (8), Petroșani Ed. Universitas Publishing House, ISSN: 2344-4754, pp.433-435.

3. **Andrei-Cristian LUPU**, Marius Gabriel PETRESCU, (2018) - *Plant for improving water quality in juvenile fish ponds*, 8th INTERNATIONAL MULTIDISCIPLINARY SCIENTIFIC SYMPOSIUM "UNIVERSITARIA SIMPRO 2018", section 3 (8), Petroșani Ed. Universitas Publishing House, ISSN: 2344-4754, section 3 (9), pp.437-440.

4. **Andrei-Cristian LUPU**, Marius Gabriel PETRESCU, (2018) - *Mobile autonomous aerator*, 8th INTERNATIONAL MULTIDISCIPLINARY SCIENTIFIC

SYMPOSIUM "UNIVERSITARIA SIMPRO 2018", section 3 (8), Petroșani, Ed. Universitas Publishing House, ISSN: 2344-4754, section 3 (10) pp.441-444.

Cărți (coautor) (2):

- Miron Liviu, Dumitru Acatrinei, Olimpia Iacob, Larisa Ivanescu, Lavinia Ciuca, Constantin Roman, Raluca Mindru, **Andrei Lupu**, Andrei Cimpan, Gabriela Martinescu, Elena Velescu, Mioara Matei, Carmen Manciu, Alina Manole, Doina Azoicai, Florentina-Manuela Miron, Gianina-Ana Massari, Anca Colibaba, Cintia Colibaba, Stefan Colibaba, Elza Gheorghiu, Andreea Ionel (2016-2019) – HANDBOOK of main zoonotic diseases identified in 4 EU countries: Romania, Italy, Croatia and Lithuania, ZOE/Zoonosis Online Education Project 2016-1-RO01-KA203-024732.
- Florinel Lupu, Marius Gabriel Petrescu, Octavian Pântea, **Andrei Cristian Lupu**, (2017) - SUBSTANȚE CHIMICE PERICULOASE. ABORDĂRI LEGISLATIVE.

Cereri de brevet (6):

- **LUPU Andrei Cristian**, 2018 – INSTALAȚIE ENTRU OZONIZAREA AEI ÎN BAZINELE PISCICOLE (Device for water ozonization in fish ponds) (**cerere Brevet Ro A2018/00251 din 11-04-2018**).
- **LUPU Andrei Cristian**, ANTOHI Constantin Marin, LUPU Florinel, 2018 – INSTALAȚIE PENTRU ÎMBUNĂȚĂȚIREA CALITĂȚII APEI DIN BAZINELE PISCICOLE DE CEȘTERE (Device for improving the quality of water in growing ponds) (cerere Brevet Ro A2018/00348 din 17-05-2018).
- **LUPU Andrei Cristian**, ANTOHI Constantin Marin, LUPU Florinel, 2018 – AERATOR MOBIL AUTONOM ENERGETIC (Mobile energetic autonomous aerator) (**cerere Brevet Ro A2018/00349 17-05-2018**).
- **LUPU Andrei Cristian**, ANTOHI Constantin Marin, VICOVEANU Dimitrie, LUPU Florinel – INSTALAȚIE PENTRU PROTECȚIE (**cerere Brevet Ro A2018/ 00500**).
- ANTOHI Constantin Marin, **LUPU Andrei Cristian**, PETRESCU Marius Gabriel, LUPU Florinel, 2019 – GENERATOR ELECTRIC CU FUNCȚIONARE ÎN MEDII OSCILANTE SAU INERȚIALE (**cerere Brevet Ro A2019/00080 11-02-2019**)
- **LUPU Andrei Cristian**, MIRON Liviu Dan, BOMBOȘ Dorin – PROCEDEU DE OBȚINERE A UNEI COMPOZIȚII EMULSIONATE PE BAZĂ DE FLORFENICOL ȘI PRAZICUANTEL CU PROPRIETĂȚI ANTIBACTERIENE ȘI ANTIPARAZITARE PENTRU TRATAREA PEȘTELOR (**cerere Brevet Ro A2019/00076 07-02-2019**)

Premii (5):

- PREMIUL AUTORITĂȚII DE PROTECȚIE A MEDIULUI DIN ROMÂNIA, se acordă pentru invenția : INSTALAȚIE ENTRU OZONIZAREA APEI ÎN BAZINELE PISCICOLE, Laureat al Premiului Juriului Târgului Internațional de

Invenții și Idei Practice – 2018, Chișinău –Rep. Moldova INVENT-INVEST 2018.

- DIPLOMA and GOLD MEDAL, Awarded in the recognition of high scientific contribution and loyalty to the XXII-th International Salon of Research, innovation and technological transfer INVENTICA 2018 , Iasi, Ro for DEVICE FOR IMPROVING THE QUALITY OF WATER IN GROWING PONDS.
- DIPLOMA and GOLD MEDAL, Awarded in the recognition of high scientific contribution and loyalty to the XXII-th International Salon of Research, innovation and technological transfer INVENTICA 2018 , Iasi, Ro for DEVICE FOR OZONIZATION IN FISH PONDS.
- DIPLOMA and GOLD MEDAL, Awarded in the recognition of high scientific contribution and loyalty to the XXII-th International Salon of Research, innovation and technological transfer INVENTICA 2018 , Iasi, Ro for AERATOR MOBIL AUTONOM ENERGETIC.
- DIPLOMA de EXCELENȚĂ, se acordă pentru invenția: Aerator mobil autonom energetic, la Salonul de invenții "PRO-TEHNICA" Baia-Mare, Asociația Iustin Capră, 2018.