

# Raport Tehnico-Științific

Etapa I :

**Hidrogeluri compozite pe baza de nanoparticule anorganice si  
colagen cu activitate prelungita pentru prevenirea infecțiilor de plaga**

PN-III-P2-2.1-PTE-2016-0177

**Decembrie 2016**

## **Etapa I : Obținerea colagenului de tip 1 folosit pentru obținerea de hidrogeluri**

**Scopul proiectului** este de a proiecta și obține hidrogeluri colagenice ce conțin nanoparticule anorganice metalice și oxidice cu proprietăți antimicrobiene ce favorizează vindecarea rănilor, activitate particularizată prin dezvoltarea unei tehnologii simple și rapide de obținere într-un singur pas pentru hidrogelurile cu nanoparticule de Ag și respectiv în două etape pentru probele cu ZnO.

**Beneficiile aduse de proiect** sunt legate de posibilitatea de a dezvolta și de a introduce pe piață hidrogeluri (multi)functionale avansate, pe baza de colagen și nanoparticule anorganice cu efect antimicrobian, care să faciliteze vindecarea plagilor cutanate acute și cronice. Utilizarea hidrogelurilor cu colagen este considerată în prezent una dintre strategiile cele mai eficiente în tratamentul plagilor cutanate acute și cronice, acestea având avantajul că favorizează vindecarea rănilor prin menținerea unor parametri optimi de umiditate și aerare. De asemenea, nanoparticulele anorganice metalice și oxidice prezintă numeroase aplicații în domeniul biomedical și industria farmaceutică. De noile produse ar putea să beneficieze persoane vârstnice, paraplezici sau cu diferite alte afecțiuni care presupun imobilitate, boli cronice, dar și persoane active cu diferite răni cronice, arsuri, afecțiuni chimice ale pielii, traume de suprafață sau profunde, traume mecanice, etc. care vor necesita utilizarea hidrogelurilor cu colagen pentru vindecare.

În cadrul acestei etape, s-a urmărit realizarea următoarelor obiective:

- Obținerea colagenului de tip 1 folosit pentru obținerea de hidrogeluri
- Optimizarea metodei de sinteză a hidrogelurilor (multi)functionale pe baza de colagen și nanoparticule de Ag, ZnO și SiO<sub>2</sub>@ZnO
- Documentare, planificare și management al proiectului
- Dezvoltarea unui site web al proiectului

### **1.Obținerea colagenului de tip 1 folosit pentru obținerea de hidrogeluri**

În cadrul Sanimed International Impex s-a optimizat protocolul de obținere a colagenului necesar pentru obținerea de hidrogeluri multifunctionale. Colagenul s-a obținut prin prelucrarea

de tendoane de vacă sau de cal, de origine controlată sanitar-veterinar. Înaintea curățării tendoanelor, acestea s-au spalat cu soluție de acid acetic proaspăt preparată, de 10 ori. Cu ajutorul bisturiului de unică folosință, s-au îndepărtat cheagurile de sânge, pielea cu păr, oasele, mușchii și urmele de grăsime, lăsându-se tendoanele curate. Acestea s-au spalat cu apă distilată (4 – 5 volume de apă, raportate la materia primă) de două ori pe mesele de lucru din inox cu scurgere. Tendoanele curate au fost transferate în recipiente de inox apoi în tocătorul industrial cu sită Sirman. Loturile curățate s-au introdus în baza de date privind trasabilitatea extinsă a produsului. Tendoanele au fost mărunțite cu ajutorul unei mașini electrice de tocat carne, prevăzută cu o sită având diametrul ochiurilor de 3-5 mm, apoi cântărite (doze a câte 540 g fiecare). Extractia colagenului s-a realizat într-un malaxor industrial din oțel inoxidabil (agitator din inox cu două cuve interschimbabile de 50 L Conti), care asigură o viteză de rotație de min 40 rotații/minut. Peste cantitatea cântărită de țesuturi mărunțite s-au adăugat 20 de litri de soluție de pepsină în acid acetic 0,5 M, raportul între pepsină și substanța uscată a țesutului luat în lucru fiind de 1:9. Soluția s-a agitat intermitent timp de 48 ore, la temperatura de 20 - 25 °C. pH-ul mediului de extracție este 2,5-3,5, valoare la care pepsina are activitate enzimatică optimă. Îndepărtarea țesutului nedigerat s-a realizat prin centrifugare (4 °C, 9000 rpm, timp de 15 min). Îndepărtarea acidului acetic din compoziția soluției de colagen s-a făcut prin dializa/diafiltrarea acestuia față de apa distilată. Operația s-a realizat pe două cai:

- a) Prin *dializă*, cu ajutorul sacilor din membrana colagenică, proces în care apa distilată din bazinul de dializă se schimbă zilnic până ce valoarea pH-ului gelului de colagen ajunge la o valoare cuprinsă între 5 și 6, sau
- b) Prin *diafiltrare* pe filtre ceramice de 20 nm, proces în care înlăturarea acidului acetic se face alimentând circuitul de filtrare al instalației cu apă purificată (pH 6,5 – 7,0), în contracurent față de circuitul gelului de colagen.

Gelul de colagen neutralizat a fost repartizat în tăvițe din inox pe loturi și pe categorii de sursă de gel în vederea liofilizării. Prima fază a procesului de liofilizare - congelarea, se efectuează lent, pentru a forma cristale mari de gheață, sau rapid pentru a forma cristale mici. Întrucât în timpul criolizei are loc creșterea volumului specific al apei, fenomen ce poate conduce la modificări ale structurii colagenului nativ, se procedează la o congelare rapidă la temperatura de - 40 °C, timp de 4 ore. A doua fază a liofilizării - uscarea sub vid înalt, determină trecerea apei din forma solidă în formă de vapori. Astfel, după terminarea timpului de congelare s-a dat drumul la pompa

de vid ce intră în componența liofilizatorului și timp de 20 de ore s-a trecut aparatul pe uscare sub vid. Uscarea finală s-a făcut treptat, timp de 10 ore, la temperatura de + 32 °C iar liofilizarea s-a realizat cu liofilizatorul Zirbus.

Produsul liofilizat a fost ulterior supus controlului microbiologic. S-au prelevat sub hota cu flux laminar, cu pipeta se sticlă sterilă (de unică folosință), 2 ml de gel de collagen neutralizat care s-au însămânțat soluția d pe mediu Plate count agar care ulterior a fost incubat 24 de ore la 37 °C. După 24 de ore s-au numărat coloniile și s-a calculat numărul UFC (unități formatoare de colonii) raportat la unitatea de masă/ volum.

Gelul de collagen obtinut a fost de asemenea caracterizat din punct de vedere al continutului de azot. Continutul de azot din gelul de collagen trebuie sa se încadreze în parametri urmatori: azot total (raportat la substanța uscată) trebuie sa fie minim 12% iar substanța proteică (raportat la substanța uscată) min. 68%. Azotul din probă a fost transformat în sulfat de amoniu prin dezagregarea cu acid sulfuric concentrat în prezența unui catalizator (metoda Kjeldahl-descrisa mai jos):

Se cântăresc cca. 6 g din proba de analizat, prelevată din flaconul steril cu gel de collagen neutralizat și se introduc în balonul Kjeldahl. Se adaugă 2 pastile catalizator, o pastilă antispumant și 20 ml acid sulfuric conc. Balonul Kjeldahl se poziționează în lăcașul sistemului de mineralizare și se supune operației de digestie rapidă. După răcire, balonul cu probă se plasează în sistemul automat de distilare rapidă prin antrenare cu vapori Vapodest unde are loc eliberarea amoniacului rezultat în prima etapă. Acesta este captat de soluția de acid boric, care astfel se colorează în verde. Amoniacul colectat în soluția de acid boric se titrează automat cu acid sulfuric 0,1N. Procentul de azot total si substanta proteica se calculeaza cu ajutorul formulelor de mai jos:

$$\text{Azot total \%} = 0,0014 \times V \times 100 / G$$

În care:

0,0014 = cantitatea de de azot corespunzatoare la 1ml soluție de acid sulfuric 0,1N;

V = volumul de acid sulfuric 0,1N folosit la titrare, ml;

G = cantitatea de proba luata in lucru, g.

$$\text{Substanța proteică \%} = \text{azot total \%} \times 6,25$$

Colagenul obtinut s-a caracterizat si din punct de vedere al continutului de substanța grasă (care, raportat la substanța uscată trebuie sa fie de max 3%). Proba supusă analizei (6–7 g gel de

colagen prelevat steril din masa de gel de colagen neutralizat) cântărită cu precizie de 0,0001 g, s-a introdus în cartușul din dotarea analizorului de grăsimi GERHARDT serie 8445140025/8500140028, cartuș care a fost în prealabil cântărit). După introducerea cartușului în paharul de extracție (adus la greutate constantă, la 105 °C, cu 3-4 granule din cuarț), se adaugă 60 ml solvent și se amplasează în locașul echipamentului. Se derulează programul de extracție prestabilit. Paharul de extracție cu substanțele grase se usucă în etuvă la 100 - 110 °C până la greutate constantă.

Procentul de substanța grasă s-a calculat astfel:

$Substanța\ grasă\ \% = G_1/G_2 \times 100$  În care:  $G_1$ = cantitatea de substanță grasă extrasă, g;  
 $G_2$ = cantitatea de probă luată în lucru, g.

Totodată, s-a realizat determinarea conținutului de substanță uscată din gelul de colagen neutralizat (care trebuie să se încadreze în limita de 0,4 - 0,6%) conform protocolului descris mai jos:

Într-o fiolă de cântărire adusă la greutate constantă s-a cântărit cca. 1 g produs cu balanța tehnică și s-a menținut la 100-105°C în etuva timp de 3 ore, după care s-a răcit în exicator și s-a cântărit. S-a continuat uscarea câte 60 minute, răcirea în exicator și cântărirea până la greutate constantă. Diferența dintre cântărirea înainte și după uscare, raportată la 100 g produs, va da conținutul procentual în substanța uscată al probei de analizat:

$Substanța\ uscată\ \% (\% S.U.) = [(m_2 - m_0) / (m_1 - m_0)] * 100$

$m_0$ = masa fiolei goală (g)

$m_1$ = masa fiolei cu produs înainte de uscare (g)

$m_2$ = masa fiolei și a rezidului după uscare (g)

**2.Optimizarea metodei de sinteza a hidrogelurilor (multi)functionale pe baza de colagen si nanoparticule de Ag, ZnO si SiO2@ZnO.** În vederea realizării acestor hidrogeluri multifunctionale este mai întâi necesară obținerea și caracterizarea nanoparticulelor de Ag, ZnO și SiO2@ZnO. În acest sens, în cadrul **Universității Politehnice din București (P2)**- Facultatea de Chimie Aplicată și Știința Materialelor- Departamentul Știința și Ingineria Materialelor Oxidice și Nanomateriale s-a realizat documentația științifică și tehnică necesară obținerii nanoparticulelor de Ag, ZnO și SiO2@ZnO.

## 2.1. Introducere

Materialele nanostructurate se bucură de o atenție sporită grație proprietăților fizico-chimice intrinseci unice și pot reprezenta cea mai bună strategie în combaterea problemelor existente în terapia antimicrobiană (o serie de tulpini bacteriene foarte rezistente sunt capabile să manipuleze cele mai noi și mai puternice generații de antibiotice și să transmită rezistența și la alte specii de microorganisme, devenind agenți patogeni redutabili). Printre aceste proprietăți se numără: suprafața specifică mare (raportată la volum), dimensiuni reduse, modalități specifice de interacție cu țesuturile gazdă, precum și posibilitatea proiectării și optimizării parametrilor de sinteză astfel încât un material să se preteze la varii aplicații. Mai mult, nanosistemele au capacitatea de a combate mecanismele microbiene de căpătare a rezistenței existente [1][2].

Cercetările în domeniu au arătat că metoda de sinteză cât și formele nanoparticulelor obținute stabilesc domeniul de aplicabilitate a acestora. Pentru un control mai bun al dimensiunilor și al distribuțiilor granulometrice, formei și gradului de aglomerare a cristalitelor nanometrice în vederea optimizării metodei de sinteză a hidrogelurilor (multi)funcționale pe bază de collagen și nanoparticule cu proprietăți antimicrobiene, au fost studiate diverse metode de sinteză pentru nanoparticulele de Ag, ZnO și SiO<sub>2</sub>, urmând a fi detaliate.

## 2.2. Nanoparticule de Ag (AgNPs)

Proprietățile specifice ale nanoparticulelor de argint sunt dictate de raportul specific suprafață/volum și presupun manifestarea unor comportamente inedite, dependente de dimensionalitatea acestor structuri. Proprietățile optice, conductivitatea electrică, stabilitatea chimică și activitatea catalitică, activitățile anti-microbiene și anti-inflamatorii specifice AgNPs sunt aspecte care indică aplicabilitatea versatilă a acestora. În domeniul biomedical, utilizarea particulelor nanodimensionate de argint s-a bucurat de rezultate promițătoare într-o serie vastă de potențiale aplicații: sisteme pentru eliberare ținută și controlată a substanțelor active [3], terapie anti-tumorală [4], inginerie tisulară [5] și tratamentul plăgilor tegumentare [6][7].

Datorită versatilității caracteristice, abordările tehnologice de producere a nanoparticulelor de argint vizează atât strategii de tip top-down (sinteză pornind de la metalul masiv), cât și strategii de tip bottom-up (sinteză pornind de la structuri atomice și moleculare). Diversitatea metodelor de sinteză aplicată argintului permite producerea de nanostructuri caracterizate de valori ridicate ale raportului specific suprafață/volum, aspect ce influențează drastic caracteristicile structurale, morfologice și funcționale [8][9]. Metodele avansate de

sinteză a AgNPs consideră principiile fundamentale fizice și chimice, ce favorizează sinteza de structuri de înaltă puritate, cu dimensiuni nanometrice (sub 100 nm) și morfologii controlabile.

Sinteza nanoparticulelor de argint prin metode fizice presupune fenomene simultane de evaporare și condensare a metalului masiv, prin implicarea de diferite surse externe de energie care să favorizeze formarea speciilor metalice în diverse medii gazoase inerte și depunerea ulterioară pe substratul de interes. Numeroase strategii fizice au fost implicate în producerea de AgNPs de înaltă puritate, caracterizate de distribuție dimensională uniformă și morfologie preferențial sferică, precum descărcare în arc electric, implantare ionică, ablație laser, piroliză, pulverizare în radiofrecvență și pulverizare termică [10][11][12].

Strategiile chimice de sinteză a nanoparticulelor de argint implică procese electrochimice controlate de degradare a sărurilor metalice în prezența agenților reducători de origine anorganică sau organică și a stabilizatorilor [13]. Rezultate promițătoare privind obținerea de suspensii stabile de AgNPs au fost raportate utilizând diferiți agenți de stabilizare: aminoacizi și acizi carboxilici, dendrimeri, polimeri și surfactanți. De asemenea, combinarea principiilor fizice și chimice de obținere a nanoparticulelor metalice a favorizat utilizarea cu succes a metodelor de sinteză fizico-chimică în producerea AgNPs. În cazul acestor strategii, energia externă utilizată favorizează producerea fenomenelor electrochimice implicate în procesul de sinteză. Rezultate promițătoare au fost obținute experimental prin utilizarea de ultrasunete, radiație ultraviolet, radiație electromagnetică vizibilă, radiație  $\gamma$  și microunde [14][15][16].

În scopul diminuării sau eliminării inconvenientelor specifice metodelor de sinteză fizică și chimică (costuri ridicate pentru achiziționarea și întreținerea instalațiilor, risc de contaminare biologică), numeroase studii de specialitate au vizat aplicarea de strategii inspirate din natură pentru obținerea AgNPs. Astfel, au fost raportate rezultate favorabile privind sinteza și funcționalitatea nanoparticulelor de argint prin considerarea proprietăților reducătoare și antioxidante caracteristice substanțelor fitochimice [17][18] și prin implicarea mecanismelor de bioreducere specifice microorganismelor, majoritar specii bacteriene [19].

Fără doar și poate, studiul asupra proprietăților anti-microbiene ale nanoparticulelor de argint reprezintă direcția cea mai studiată și versatilă, din punct de vedere al aplicațiilor biomedicale.

Mecanismul anti-microbian al acestor structuri asupra organismelor patogene nu a fost încă pe deplin elucidat, însă datele de literatură menționează trei posibile mecanisme: (i) AgNPs

interacționează puternic cu structurile bogate în sulf și fosfor ale membranei microbiene (datorită afinității ridicate pentru structuri încărcate electric negativ); (ii) AgNPs cauzează dislocarea ionilor vitali din structura membranei microbiene (datorită mecanismelor concurente caracteristice proteinelor intra-/trans-membranare); (iii) prezența AgNPs favorizează apariția stresului oxidativ, datorită formării speciilor reactive de oxigen [20][21]. De asemenea, considerând versatilitatea proceselor de sinteză ce pot fi aplicate acestui metal nobil, AgNPs pot fi înglobate sau depuse pe suprafața unei game largi de materiale (anorganice sau organice, unitare sau compozite, hibride) – utilizând în acest sens mecanisme *in situ* sau *ex situ* de formare a particulelor metalice – în scopul inducerii de proprietăți anti-microbiene (efect biostatic sau biocid, potențial anti-aderent sau inhibitor al biofilmului microbial).

### **2.3.Nanoparticule de ZnO**

Utilizarea particulelor nanodimensionate de ZnO s-a bucurat de rezultate promițătoare într-o serie vastă de potențiale aplicații (eliberarea controlată a medicamentelor, industria cosmeticelor sau dispozitive medicale), în special datorită faptului că nu produce iritarea pielii sau a ochilor și nu există dovezi de carcinogenicitate, genotoxicitate și infertilitate la oameni [22][23]. Oxidul de zinc are o lungă istorie de utilizare ca protecție solară pentru a bloca razele UV, fiind introdus sub formă de nanoparticule pentru această aplicație la sfârșitul anilor 1990. Au existat preocupări cu privire la posibilele efecte adverse asupra sănătății umane sau asupra mediului. Cu toate acestea, dovezile actuale arată că particulele de ZnO sau nanoparticulele nu penetrează celulele pielii viabile, ci rămân pe stratul exterior al pielii intacte (stratum corneum) cu toxicitate sistemică scăzută [24].

Din punct de vedere clinic, ZnO favorizează vindecarea rănilor și păstrează rănille umede și curate. Poate fi folosit în loțiuni sau creme pentru tratarea acneei sau a infecțiilor fungice, iar efectul pe care ZnO îl are în epitelizarea pielii, precum și proprietățile antibacteriene, îl recomandă ca pansament pentru răni. Poate fi utilizat în tratarea diverselor dermatite, iritațiilor cauzate de scutece, contra bășicilor sau inflamațiilor și rănilor deschise.

Există o foarte mare varietate de materiale care conțin zinc disponibile ca intermediari de sinteză (feedstock) și, prin urmare, un număr mare de posibile tehnologii de prelucrare. Din punct de vedere economic, procesele de sinteză pentru ZnO pot fi împărțite în două grupe: metode industriale low-cost de fabricare în masă și metode cu costuri ridicate de sinteză în laborator sau la scară de instalație experimentală. Principalele diferențe tehnologice între



metodele de producție se referă la precursorii de zinc și temperaturile de proces folosite, la unitățile de funcționare utilizate și, desigur, la scara la care sunt efectuate. În plus, o gama largă de tehnici de laborator sau la scară pilot au fost raportate, dar foarte puține dintre acestea prezintă interes comercial real.

Fabricarea nanoparticulelor de ZnO în laborator este de regulă facilă, fără costuri majore sau instalații complexe, motiv pentru care acestea au devenit o alternativă mai bună pentru diverse aplicații biologice. În astfel de cazuri, solubilitatea în apă și biocompatibilitatea nanoparticulelor de ZnO sunt principalele condiții care trebuie analizate și îndeplinite. În general, solubilitatea în apă se obține prin modificarea suprafeței cu liganzi solubili în apă, silanizare sau încapsulare în cadrul unui copolimer bloc – micelle [25].

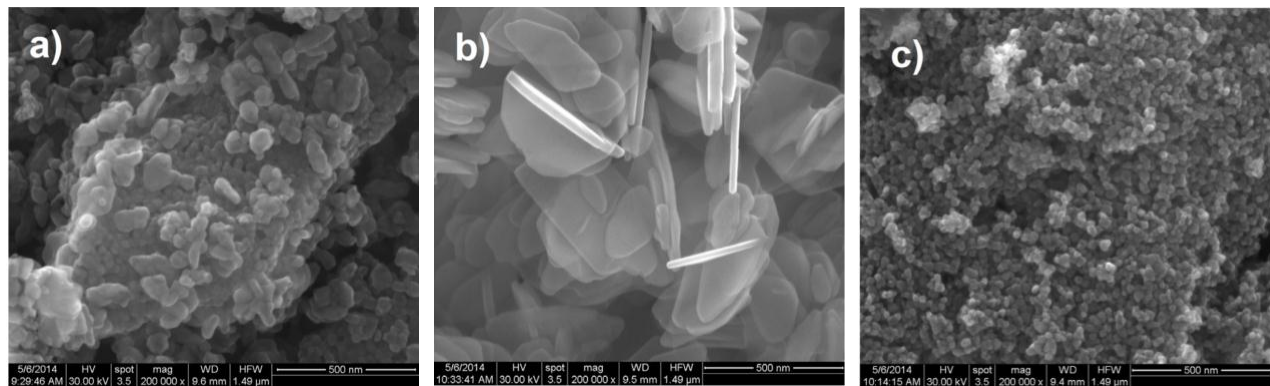
Reddy și colab. au raportat toxicitatea nanoparticulelor de ZnO față de sistemele bacteriene gram - negative (*E. coli*), gram-pozitive (*S. aureus*), și față de celule umane. Sinteza a fost realizată prin hidroliza forțată a acetatului de zinc la 160°C în dietilenglicol. Nanoparticulele de ZnO au arătat o inhibare completă a creșterii *E. coli* la concentrații  $\geq 3,4$  mM, în timp ce creșterea de *S. aureus* a fost complet inhibată la concentrații  $\geq 1$  mM. Aceste observații au confirmat natura toxică a nanoparticulelor de ZnO pentru diferite sisteme bacteriene, ceea ce dovedește posibilitatea aplicării metodei inclusiv pentru hidrogeluri cu activitate antibacteriană [26].

Padmavathy și colab. au raportat sinteza de nanoparticule de ZnO cu diferite dimensiuni și au investigat activitatea antibacteriană a acestora. A fost înregistrată o bioactivitate îmbunătățită pentru particulele cu dimensiuni mai scăzute, comparativ cu forma bulk. S-a observat de asemenea că nanoparticulele de ZnO obținute au fost mai abrazive decât cele din comerț, generând o deteriorare mecanică mai mare a membranei celulare și îmbunătățind efectul anti-bacterian al ZnO. Observațiile și rezultatele raportate au confirmat faptul că nanoparticulele de ZnO pot fi aplicabile pentru dispozitive medicale care sunt utilizate cu nanoparticule împotriva microbilor [27].

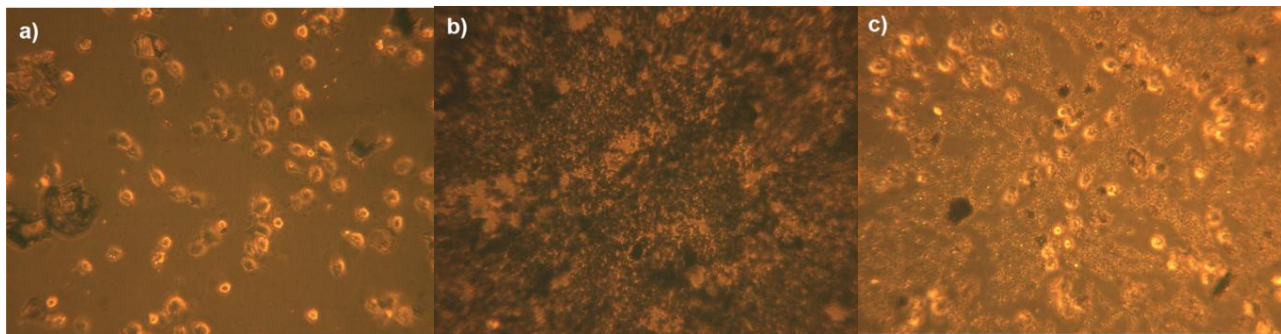
Membrii echipei de cercetare a proiectului au fost implicați în studii ample referitoare la sinteza nanoparticulelor de ZnO prin diverse metode (sol-gel, polioli, hidrotermală etc) și diferențele în structură, compoziție, morfologie și toxicitate care derivă din acestea. Se constată astfel că metoda de sinteză influențează direct morfologia și dimensiunea ZnO (cele mai mici

particule, cu morfologie sferică, fiind obținute prin metoda poliol), având efect indirect și asupra activității biologice asupra celulelor tumorale (figurile 1-2) [28].

Activitatea antimicrobiană demonstrată de către nanoparticulele de ZnO se consideră a fi (ca și în cazul Ag) datorată formării de specii de oxigen reactiv care duc la distrugerea membranei celulare [29].



*Figura 1. Imagini SEM ale pulberii de ZnO obținută prin: a) metoda sol-gel; b) metoda hidrotermală și c) metoda poliol; [28]*



*Figura 2. Imagini de microscopie optică de contrast ale culturii celulare tumorale Human Osteosarcoma tratată cu ZnO obținută prin: a) metoda sol-gel; b) metoda hidrotermală și c) metoda poliol; [28]*

#### **2.4. Sisteme SiO<sub>2</sub>@ZnO**

Silicea este încadrată în categoria materialelor GRAS (generally recognized as safe) de către FDA (US Food and Drug Administration). Indiferent de ruta de sinteză, nanoparticulele de silice prezintă toxicitate scăzută, dimensiuni uniforme și stabilitate chimică excelentă. Acestea, în combinație cu costul scăzut de fabricare, funcționalizarea versatilă și ușurința de preparare la

scară largă, cataloghează SiO<sub>2</sub> drept un material ideal pentru dezvoltarea unor nano-arhitecturi cu aplicații în nanomedicină. Rutele de sinteză pentru nanoparticulele de silice permit obținerea unei varietăți de arhitecturi, fie de sine stătătoare, fie în combinație cu alte materiale. Exemple potrivite ce demonstrează acest lucru îl reprezintă folosirea silicei ca template pentru alte materiale, ca miez în structuri core/shell, ca înveliș pentru protecția nanomaterialelor încapsulate, dar și ca matrice pentru încorporarea altor specii moleculare [30].

Încapsularea altor materiale în nanoparticule de silice este utilă pentru transmiterea proprietăților caracteristice silicei, precum stabilitate ridicată, funcționalizare ușoară și biocompatibilitate, către materialul (oxidul) din interior. Una din metodele cunoscute pentru a realiza înglobarea este procesul Stöber prin care un nano-înveliș de silice este format în jurul unui agent de nucleere al materialului de interes, prin hidroliză și condensarea unor precursori sol-gel. Această metodă permite înglobarea nanoparticulelor de metal sau oxid metalic pentru a crea o serie de sisteme cu aplicații în medicină. Altă modalitate de a atinge acest scop este prin metoda micro-emulsiei inverse, unde micelii sunt folosite pentru a confina particulele de nucleere și a controla depunerea silicei în interiorul miceliilor. Astfel, se pot încapsula nanoparticule hidrofobe sau hidrofile fără necesitatea unui schimb de liganzi și este permis controlul asupra dimensiunii particulelor și o dispersare mai mare [31][32][33].

Funcție de dimensiunea porilor, care este cuprinsă între 2 nm și 50 nm (domeniul de mezopori), se pot aplica metode de sinteză de nanoparticule dimensional controlate în acest interval. Astfel, ZnO poate fi obținut într-un domeniu granulometric monodispers pentru a maximiza atât eficiența sa de absorbant UV pentru protecție solară, cât și proprietatea antimicrobiană prin mărirea suprafeței specifice cu scăderea dimensiunii particulei.

În cadrul echipei de cercetare au fost realizate materiale nanocompozite pe bază de collagen și SiO<sub>2</sub>@ZnO, în vederea tratării infecțiilor cu *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*), o bacterie Gram (+) rezistentă la oxacilină și considerată cea mai comună cauză a infecțiilor de piele și țesut moale. Porozitatea și prezența fibrelor interconectate de collagen, pe care sunt fixate uniform nanoparticulele oxidice (figura 3) au fost considerate benefice regenerării și oxigenării pielii și corelate cu activitatea antibacteriană dovedită prin teste biologice [34][35].

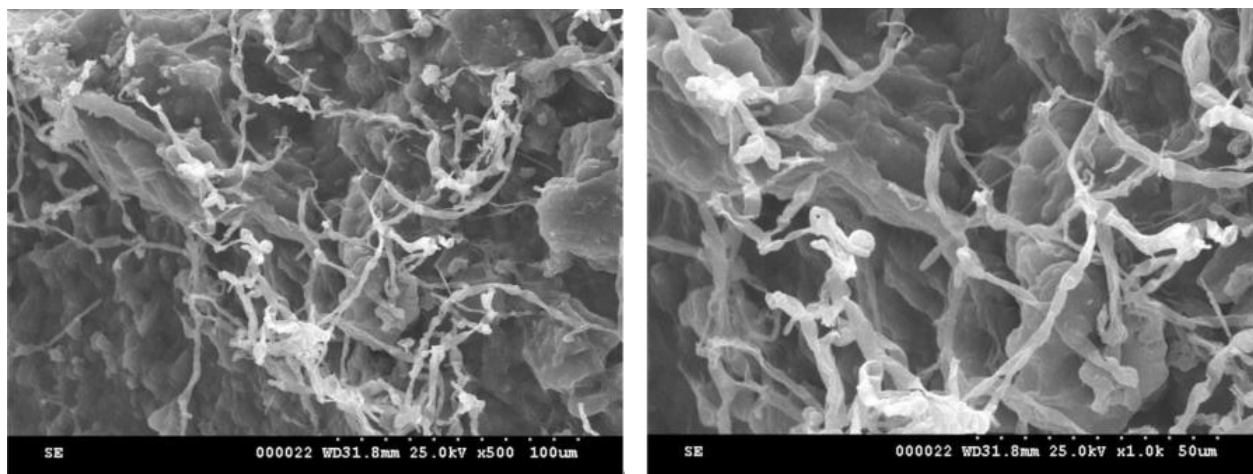


Figura 3. Imagini SEM ale compozitelor Colagen/SiO<sub>2</sub>@ZnO [35]

În vederea sintetizării unui astfel de material hibrid SiO<sub>2</sub>@ZnO, se poate utiliza o rută sol-gel modificată în care sunt necesari reactivi uzuali: azotat de zinc [Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>\*6H<sub>2</sub>O], 1,3-propandiol, tetraetilortosilicat (TEOS) și etanol (EtOH). Azotatul de zinc se amestecă împreună cu etanolul și cu propandiolul, până la obținerea unei soluții limpezi, peste care se adaugă TEOS dizolvat în etanol. După ce gelifierea ia sfârșit (aprox. 3 zile), gelul este uscat la 70 °C pentru 3 ore, după care este încălzit la 140°C, când reacția dintre diol și acetatul de zinc are loc în porii silicei. În urma degajării de NO<sub>x</sub> se formează carboxilat de zinc. În urma încălzirii la 400°C timp de 30 minute, descompunerea carboxilatului de zinc duce la formarea oxidului de zinc în matricea poroasă a silicei cu o repartiție uniformă a dimensiunii acestora [36].

## 2.5. Concluzii și perspective

Date fiind rezultatele din literatura de specialitate referitoare la microorganismele care pot fi distruse cu ajutorul nanoparticulelor de Ag, ZnO și (tabelul 1), preconizăm că hidrogelurile (multi)funcționale pe bază de collagen și astfel de materiale pot rezolva problemele existente în terapia antimicrobiană.

Tabelul 1. Activitatea antimicrobiană a nanoparticulelor de Ag, ZnO și SiO<sub>2</sub>@ZnO [37][35][38]

Nanoparticule	Microorganismele testate	Ruta de sinteză
ZnO	<i>S. aureus</i> și <i>E. coli</i>	Hidroliza acetatului de zinc
ZnO	<i>E. coli</i>	Descompunerea asistată de microunde a acetatului de zinc

ZnO	<i>C. jejuni</i> , <i>E. coli</i> O157:H7, <i>S. enterica</i> serovar <i>Enteritidis</i> <i>Salmonella</i>	Suspensie de ZnO în apă dublu distilată
ZnO	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> și <i>E. coli</i>	Metode chimice în soluție
SiO <sub>2</sub> @ZnO	<i>S. aureus</i>	Sol-gel, urmată de precipitare alcalină
Ag	<i>Vibrio cholerae</i> , <i>E. coli</i>	Reducerea unor săruri de Ag cu frunze de <i>Caltropis procera</i>

În acest scop însă optimizarea tehnologică trebuie să țină seama de exigențelor emise de autoritățile de certificare și în special de cerințele pacienților, funcție de care se impune modificarea anumitor parametri de sinteză a nanoparticulelor metalice și oxidice. Astfel că, pentru reducerea ionilor de Ag<sup>+</sup> la Ag metalic se vor folosi agenți reducători de tipul antioxidanților (acid ascorbic, acid citric etc.), care să evite pe cât posibil reacțiile nedorite la nivelul structurii colagenice. Rutele de sinteză alese vor fi alcătuite din etape care se desfășoară la temperaturi reduse, sub limita de degradare a colagenului. În cazul ZnO și SiO<sub>2</sub>@ZnO, adăugarea colagenului se va efectua după etapa de obținere a nanoparticulelor oxidice, tehnologia de obținere fiind în două etape.

Pentru sintezele în două etape, specifice ZnO și SiO<sub>2</sub>@ZnO, cea mai simplă și eficientă metodă în acest sens este metoda precipitării în mediu bazic. Ca precursori se propune folosirea de TEOS (tetraetilortosilicat) ca sursă de Si, respectiv ZnCl<sub>2</sub> ca sursă de Zn, pentru un mai bun control asupra proceselor chimice secundare. După formarea de oxizi sub formă de pulbere, se urmărește adăugarea acestora în faza neutră a gelului, pentru a evita dizolvarea nanostructurilor oxidice.

### 3. Documentare, planificare si management al proiectului

În etapele urmatoare ale proiectului se va realiza sinteza hidrogelurilor multifunctionale si caracterizarea acestora din punct de vedere al proprietatilor fizico chimice si antimicrobiene.

**Caracterizarea fizico-chimica a hidrogelurilor** de colagen cu nanoparticule metalice si oxidice se va realiza **in cadrul P2** prin metode spectroscopice (FTIR – in special pentru analiza gradului de denaturare a colagenului, UV-Vis – pentru monitorizarea eliberarii sau retinerii ionilor de Ag si ICP-MS - in special pentru cuantificarea continutului); microscopie TEM (cu precadere pentru analiza formei si dimensiunii nanoparticulelor), difractie de raze pentru identificarea fazelor (in

special in cazul Ag si ZnO) si analiza termogravimetrica – in special pentru cuantificarea continutului de umiditate si de colagen. Totodata, analiza gradului de eliberare a nanoparticulelor din constitutia hidrogelurilor (timp/doza). Se va face cu precadere prin spectrometrie de masa cu plasma cuplata inductiv.

**Evaluarea efectului antimicrobian** avut de hidrogelurile nou sintetizate va fi efectuata de catre membrii echipei de cercetare din cadrul **Universitatii Bucuresti (P1)**. Evaluarea viabilitatii si capacitatii de crestere a microorganismelor procariote (bacterii model: Gram negative – *Pseudomonas aeruginosa* si Gram pozitive – *Staphylococcus aureus*) si eucariote (*Candida albicans*) in prezenta hidrogelurilor multifunctionale pe baza de colagen si nanoparticule de Ag, ZnO si SiO<sub>2</sub>@ZnO va fi realizata prin metode calitative si cantitative (ex. cultivarea pe mediu solid in prezenta hidrogelurilor, analiza curbei de crestere in mediu lichid prin analiza spectrofotometrica si numarare de colonii viabile). Analiza capacitatii de aderenta a microorganismelor la hidrogelurile testate va fi realizata printr-o metoda adaptata a microdilutiilor in mediu lichid si microscopie SEM a probelor continand microorganisme aderate pe hidrogeluri. De asemenea, analiza citotoxicitatii hidrogelurilor de colagen functionalizate cu nanoparticule anorganice va fi efectuata in cadrul P1 prin metode de microscopie cu fluorescent si teste de apoptoza.

In vederea realizarii analizelor *in vivo* propuse in proiect, **Institutul de Virusologie Stefan S Nicolau (P3)** va evalua regenerarea tisulara pe model murin. Astfel, vor fi utilizate animale de laborator (*Mus musculus*) in scopul de a evalua regenerarea tisulara a leziunilor. In acest studiu vom utiliza soareci albi de laborator CD1 si soareci CD1-Nude (CD1-Foxn1<sup>nu</sup>). Animalele sunt gazduite in custi conforme cu reglementarile legale de asigurare a spatiului. Accesul la hrana si apa este liber, *ad libitum*. Animalele sunt gazduite in custi ventilate individual, iar conditiile specifice de mediu (temperatura, umiditate, schimburi de aer) sunt asigurate prin centrala termica individuala a biobazei si monitorizate prin sistemul de control *Techniplast Touch Slim Plus IVC SealSafe*. Iluminarea este naturala. Starea de sanatate a animalelor este monitorizata zilnic de personalul de specialitate.

Plagile vor fi induse chirurgical prin excizie cutanata, sub anestezie, conform procedurilor operationale specifice si vor fi evaluate prin analiza morfologica a plagii, inregistrarea ratei si a gradului de vindecare, analiza microscopica a sectiunilor tisulare prelevate la nivelul plagii si a raspunsului inflamator. La finalul experimentelor soarecii utilizati vor fi

sacrificati conform procedurilor operationale specifice de eutanasiere, prin hipoxie, cu expunere la CO<sub>2</sub>, urmata de dislocare cervicala. In realizarea acestui proiect se au in vedere aplicarea principiului inlocuirii, reducerii utilizarii animalelor in proceduri si imbunatatirea metodelor de crestere, adapostire, ingrijire si utilizare a animalelor in proceduri. S-a optat pentru acest model deoarece model murin este utilizat pe scara larga in studiile de inginerie tisulara si medicina regenerativa deoarece reproduce cu fidelitate caracteristicile functionale si structurale ale procesului de vindecare umana, permitand o evaluare cat mai precisa a procesului de regenerare tisulara, de vindecare a plagii si a raspunsului inflamator. Studiile *in vitro*, realizate pe culturi celulare ne permit o caracterizare incompleta a hidrogelurilor obtinute, astfel studiile *in vivo* sunt absolut necesare pentru o caracterizare cat mai completa a proprietatilor acestora dar si a rolului pe care l-ar putea avea in procesul de regenerare tisulara.

Pentru ca numărul de animale utilizat sa fie redus la minim, dintre hidrogeluri obtinute, vor fi testate *in vivo*, pe model animal numai cele care indeplinesc anumite cerinte legate de proprietatile fizico-chimice si la care efectul antimicrobial si antibiofilm a fost demonstrat *in vitro*. Analiza citotoxicitatii hidrogelurilor de colagen si evaluarea raspunsului inflamator vor fi testate initial pe celulelor umane in cultura. Pe soareci se va evalua regenerarea tisulara si raspunsul inflamator numai pentru hidrogelurile selectate in urma evaluarilor realizate pe studii *in vitro*. Utilizarea programelor de statistica vor facilita obtinerea de rezultate relevante pe un numar minim de animale. Experimentele in care se vor utiliza soareci (*Mus musculus*) se vor desfasura in cadrul unei biobaze autorizate. In aceasta etapa, lucrarile proiectului privind experimentele pe animale au fost avizate de catre Comisia de Etica a Institutului de Virusologie (Aviz nr 1139 din 19.10.2016 /proiect NanoColaGel) si de catre Directia Sanitar Veterinara si pentru Siguranta Alimentelor (Autorizatie nr. 310 din 31.10.2016 /proiect NanoColaGel).

#### **4. Dezvoltarea unui site web al proiectului**

In cadrul acestei activitati a fost inițiată baza de date a web site-ului proiectului (<http://nanocolagel.sanimed.ro/>) cu lucrări din literatura de specialitate, care vor sta la baza dezvoltarii, evaluarii si validarii nanohidrogelurilor composite in etapele urmatoare.

#### **Referinte bibliografice:**

- [1] R. Y. Pelgrift and A. J. Friedman, "Nanotechnology as a therapeutic tool to combat microbial resistance," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 65, no. 13, pp. 1803–1815, 2013.
- [2] N. Beyth, Y. Hour-Haddad, A. Domb, W. Khan, R. Hazan, N. Beyth, Y. Hour-Haddad, A. Domb, W. Khan, and R. Hazan, "Alternative Antimicrobial Approach: Nano-Antimicrobial

- Materials,” *Evidence-Based Complement. Altern. Med.*, vol. 2015, pp. 1–16, 2015.
- [3] M. Yadollahi, S. Farhoudian, and H. Namazi, “One-pot synthesis of antibacterial chitosan/silver bio-nanocomposite hydrogel beads as drug delivery systems,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 79, pp. 37–43, 2015.
- [4] G. M. Vlăsceanu, Ș. Marin, R. E. Țiplea, I. R. Bucur, M. Lemnar, M. M. Marin, and E. Andronescu, “Chapter 2 – Silver nanoparticles in cancer therapy,” in *Nanobiomaterials in Cancer Therapy*, 2016, pp. 29–56.
- [5] M. Diba and A. R. Boccaccini, “9 – Silver-containing bioactive glasses for tissue engineering applications,” in *Precious Metals for Biomedical Applications*, 2014, pp. 177–211.
- [6] R. Singla, S. Soni, P. M. Kulurkar, A. Kumari, M. S., V. Patial, Y. S. Padwad, and S. K. Yadav, “In situ functionalized nanobiocomposites dressings of bamboo cellulose nanocrystals and silver nanoparticles for accelerated wound healing,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 155, pp. 152–162, 2017.
- [7] J. L. Velázquez-Velázquez, A. Santos-Flores, J. Araujo-Meléndez, R. Sánchez-Sánchez, C. Velasquillo, C. González, G. Martínez-Castañón, and F. Martínez-Gutierrez, “Anti-biofilm and cytotoxicity activity of impregnated dressings with silver nanoparticles,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 49, pp. 604–611, 2015.
- [8] F. Hubenthal, “Noble Metal Nanoparticles: Synthesis and Optical Properties,” in *Reference Module in Materials Science and Materials Engineering*, 2016.
- [9] A. Reti and S. Mridha, “Silver: Alloying, Properties, and Applications,” in *Reference Module in Materials Science and Materials Engineering*, 2016.
- [10] H. Y. Koo, J. H. Yi, J. H. Kim, Y. N. Ko, Y. J. Hong, Y. C. Kang, and B.-K. Kim, “Size-controlled silver-glass composite powders with nanometer size prepared by flame spray pyrolysis,” *Powder Technol.*, vol. 207, no. 1, pp. 362–369, 2011.
- [11] L. Bai, R. Hang, A. Gao, X. Zhang, X. Huang, Y. Wang, B. Tang, L. Zhao, and P. K. Chu, “Nanostructured titanium–silver coatings with good antibacterial activity and cytocompatibility fabricated by one-step magnetron sputtering,” *Appl. Surf. Sci.*, vol. 355, pp. 32–44, 2015.
- [12] S. Vytykacova, B. Svecova, P. Nekvindova, J. Spirkova, A. Mackova, R. Miksova, and R. Böttger, “The formation of silver metal nanoparticles by ion implantation in silicate glasses,” *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms*, vol. 371, pp. 245–250, 2016.
- [13] L. Wang, J. Zhong, G. Li, and J.-F. Chen, “Preparation of silver nanopowders by a controlled wet-chemical synthesis,” 2016.
- [14] O. S. Oluwafemi, T. Mochochoko, A. J. Leo, S. Mohan, D. N. Jumbam, and S. P. Songca, “Microwave irradiation synthesis of silver nanoparticles using cellulose from *Eichhornia crassipes* plant shoot,” 2016.
- [15] T. Ahmad, I. A. Wani, O. A. Al-Hartomy, A. S. Al-Shihri, and A. Kalam, “Low temperature chemical synthesis and comparative studies of silver oxide nanoparticles,” *J. Mol. Struct.*, vol. 1084, pp. 9–15, 2015.
- [16] M. Banach and J. Pulit-Prociak, “Chapter 12 – Synthesis, characteristics, and biocidal activity of silver nanoparticles,” in *Fabrication and Self-Assembly of Nanobiomaterials*, 2016, pp. 367–399.
- [17] Y. Ren, H. Yang, T. Wang, and C. Wang, “Green synthesis and antimicrobial activity of monodisperse silver nanoparticles synthesized using Ginkgo Biloba leaf extract,” 2016.
- [18] G. R. Sánchez, C. L. Castilla, N. B. Gómez, A. García, R. Marcos, and E. R. Carmona, “Leaf extract from the endemic plant *Peumus boldus* as an effective bioproduct for the green synthesis of silver nanoparticles,” 2016.
- [19] S. Javani, I. Marín, R. Amils, and J. P. Abad, “Four psychrophilic bacteria from Antarctica extracellularly biosynthesize at low temperature highly stable silver nanoparticles with outstanding antimicrobial activity,” *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 483, pp. 60–69, 2015.
- [20] W. K. Jung, H. C. Koo, K. W. Kim, S. Shin, S. H. Kim, and Y. H. Park, “Antibacterial activity and mechanism of action of the silver ion in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 74, no. 7, pp. 2171–8, Apr. 2008.



- [21] S. Prabhu and E. K. Poulouse, "Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects," *Int. Nano Lett.*, vol. 2, no. 1, p. 32, 2012.
- [22] P.-J. Lu, S.-C. Huang, Y.-P. Chen, L.-C. Chiueh, and D. Y.-C. Shih, "Analysis of titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles in cosmetics," *J. Food Drug Anal.*, vol. 23, no. 3, pp. 587–594, 2015.
- [23] H. Mirzaei and M. Darroudi, "Zinc oxide nanoparticles: Biological synthesis and biomedical applications," *Ceram. Int.*, vol. 43, no. 1, pp. 907–914, 2017.
- [24] P. Filipe, J. N. Silva, R. Silva, J. L. Cirne de Castro, M. Marques Gomes, L. C. Alves, R. Santus, and T. Pinheiro, "Stratum Corneum Is an Effective Barrier to TiO<sub>2</sub> and ZnO Nanoparticle Percutaneous Absorption," *Skin Pharmacol. Physiol.*, vol. 22, no. 5, pp. 266–275, 2009.
- [25] L. P. Bauermann, J. Bill, and F. Aldinger, "Bio-friendly Synthesis of ZnO Nanoparticles in Aqueous Solution at Near-Neutral pH and Low Temperature," *J. Phys. Chem. B*, vol. 110, no. 11, pp. 5182–5185, Mar. 2006.
- [26] K. M. Reddy, K. Feris, J. Bell, D. G. Wingett, C. Hanley, and A. Punnoose, "Selective toxicity of zinc oxide nanoparticles to prokaryotic and eukaryotic systems," *Appl. Phys. Lett.*, vol. 90, no. 213902, pp. 2139021–2139023, May 2007.
- [27] N. Padmavathy and R. Vijayaraghavan, "Enhanced bioactivity of ZnO nanoparticles—an antimicrobial study," *Sci. Technol. Adv. Mater.*, vol. 9, no. 3, p. 35004, Jul. 2008.
- [28] O. R. Vasile, I. Serdaru, E. Andronescu, R. Truşcă, V. A. Surdu, O. Oprea, A. Ilie, and B. Ş. Vasile, "Influence of the size and the morphology of ZnO nanoparticles on cell viability," *Comptes Rendus Chim.*, vol. 18, no. 12, pp. 1335–1343, 2015.
- [29] B. Das and M. I. Khan, "Understanding the Antifungal Mechanism of Ag@ZnO Core-shell Nanocomposites against *Candida krusei*," *Sci. Rep.*, vol. 6, p. 36403, Nov. 2016.
- [30] Y. Piao, A. Burns, J. Kim, U. Wiesner, and T. Hyeon, "Designed Fabrication of Silica-Based Nanostructured Particle Systems for Nanomedicine Applications," *Adv. Funct. Mater.*, vol. 18, no. 23, pp. 3745–3758, Dec. 2008.
- [31] E. Halevas, C. M. Nday, E. Kaprara, V. Psycharis, C. P. Raptopoulou, G. E. Jackson, G. Litsardakis, and A. Salifoglou, "Sol-gel encapsulation of binary Zn(II) compounds in silica nanoparticles. Structure-activity correlations in hybrid materials targeting Zn(II) antibacterial use," *J. Inorg. Biochem.*, vol. 151, pp. 150–163, 2015.
- [32] I. M. El-Nahhal, J. K. Salem, S. Kuhn, T. Hammad, R. Hempelmann, and S. Al Bhaisi, "Synthesis & characterization of silica coated and functionalized silica coated zinc oxide nanomaterials," *Powder Technol.*, vol. 287, pp. 439–446, 2016.
- [33] J. El Haskouri, L. Dallali, L. Fernández, N. Garro, S. Jaziri, J. Latorre, C. Guillem, A. Beltrán, D. Beltrán, and P. Amorós, "ZnO nanoparticles embedded in UVM-7-like mesoporous silica materials: Synthesis and characterization," *Phys. E Low-dimensional Syst. Nanostructures*, vol. 42, no. 1, pp. 25–31, 2009.
- [34] F. Vaja, C. Guran, D. Ficai, A. Ficai, and O. Oprea, "Cytotoxic effects of ZnO nanoparticles incorporated in mesoporous silica," *UPB Sci. Bull. Ser. B Chem. Mater. Sci.*, vol. 76, no. 3, pp. 55–66, 2014.
- [35] A. Spoiala, M. G. Albu, A. Ficai, E. Andronescu, G. Voicu, and C. Ungureanu, "THE SiO<sub>2</sub>/ZnO COMPOSITE MATERIALS FOR COSMETIC CREAMS," *Dig. J. Nanomater. Biostructures*, vol. 9, no. 4, pp. 1729–1737, 2014.
- [36] A. C. Grigorie, C. Muntean, T. Vlase, C. Locovei, and M. Stefanescu, "ZnO-SiO<sub>2</sub> based nanocomposites prepared by a modified sol-gel method," *Mater. Chem. Phys.*, 2016.
- [37] A. Sirelkhatim, S. Mahmud, A. Seeni, N. H. M. Kaus, L. C. Ann, S. K. M. Bakhori, H. Hasan, and D. Mohamad, "Review on Zinc Oxide Nanoparticles: Antibacterial Activity and Toxicity Mechanism," *Nano-Micro Lett.*, vol. 7, no. 3, pp. 219–242, Jul. 2015.
- [38] W. Salem, D. R. Leitner, F. G. Zingl, G. Schratte, R. Prassl, W. Goessler, J. Reidl, and S. Schild, "Antibacterial activity of silver and zinc nanoparticles against *Vibrio cholerae* and enterotoxic *Escherichia coli*," *Int. J. Med. Microbiol.*, vol. 305, no. 1, pp. 85–95, Jan. 2015.

