



# **RAPORT DE ACTIVITATE**

## **Hidrogeluri compozite cu nanoparticule anorganice**

**Conf. Dr. Ing Denisa FICAI**

**2017**

## CUPRINS

### STUDIU DE LITERATURA

<b>1. Introducere.....</b>	<b>3</b>
<b>1.1. Chitosanul (CH) .....</b>	<b>5</b>
<b>1.2. Nanoparticule de Ag (NPAg) .....</b>	<b>9</b>
<b>1.3. Nanoparticule de Zn (NPZn) .....</b>	<b>9</b>
<b>1.4. Acid usnic(AU).....</b>	<b>10</b>

### STUDIU EXPERIMENTAL

<b>2. Materiale si metode.....</b>	<b>11</b>
<b>2.1. Prepararea nanoparticulelor antibacteriene prin electrospinning.....</b>	<b>11</b>
<b>2.1.1. Sinteza si caracterizarea materialelor compozite CH 1%.....</b>	<b>12</b>
<b>2.1.2. Sinteza si caracterizarea materialelor compozite CH 1% / NPZnO 1%.....</b>	<b>12</b>
<b>2.1.3. Sinteza si caracterizarea materialelor compozite CH 1%/AU 1%.....</b>	<b>12</b>
<b>2.1.4. Sinteza si caracterizarea materialelor compozite CH1%/NPZnO1%/UA1%....</b>	<b>12</b>
<b>2.1.5. Sinteza si caracterizarea materialelor compozite CH1%/NPAg 1%.....</b>	<b>13</b>
<b>2.1.6. Sinteza si caracterizarea materialelor compozite CH1%/NPAg1%/UA1%.....</b>	<b>13</b>
<b>2.3. Testarea activității antimicrobiene.....</b>	<b>14</b>
<b>2.3.1. Metode calitative de testare.....</b>	<b>14</b>
<b>2.3.2. Metode cantitative de testare.....</b>	<b>14</b>
<b>3. Rezultate si discuții.....</b>	<b>16</b>
<b>3.1. IR.....</b>	<b>16</b>
<b>3.2. SEM.....</b>	<b>20</b>
<b>3.3. Grad de gonflare .....</b>	<b>22</b>
<b>3.3. Testarea activității antimicrobiene .....</b>	<b>24</b>
<b>Concluzii.....</b>	<b>29</b>
<b>Bibliografie.....</b>	<b>29</b>

**Scopul acestui studiu** este de a obține și testa hidrogeluri pe baza de chitosan ce conțin nanoparticule anorganice metalice și oxidice (Ag și ZnO) dar și compuși naturali precum Acidul Usnic – AU. Dacă hidrogelurile au rolul principal de a asigura vindecarea rănilor rolul nanoparticulelor și a acidului usnic este acela de a potența activitatea antimicrobiană a hidrogelurilor, știut fiind faptul că unii polimeri, și în special chitosanul, manifestă și activitate antimicrobiană.

**Beneficiile aduse în cadrul acestui studiu** sunt legate de sintetiza, caracterizarea și evaluarea hidrogelurilor (multi)functionale, pe baza de chitosan/NP/AU cu efect antimicrobian, care să faciliteze vindecarea plagilor cutanate. Utilizarea hidrogelurilor cu chitosan alături de cele cu colagen este considerată în prezent una dintre strategiile cele mai eficiente în tratamentul plagilor, acestea având avantajul că favorizează vindecarea rănilor prin menținerea unor parametri optimi de umiditate și aerare, iar nanoparticulele anorganice metalice și oxidice alături de acidul usnic prezintă avantajul tratamentului infecțiilor sau prevenirea apariției acestora având numeroase aplicații în domeniul biomedical și industria farmaceutică.

## **1. Introducer**

Infecția bacteriană rămâne una dintre cele mai grave complicații pentru sănătate umană și poate duce la moarte în unele cazuri grave [1]. Previziunile sumbre în domeniu sunt legate de evoluția incidentei și severității acestor infecții estimându-se că, în 2030 mortalitatea indusă de infecțiile cu tulpini rezistente să depășească mortalitatea cauzată de cancer. Acesta este motivul principal pentru care cercetările în domeniu s-au intensificat extrem de mult, direcțiile de cercetare fiind dezvoltarea de noi principii active dar și dezvoltarea de rute de administrare mai eficiente. Din acest motiv, au fost depuse eforturi ample, susținute pentru găsirea de noi antibiotice cu toxicitate redusă raportată la celula gazdă și un spectru larg împotriva unei largi diversități de agenți patogeni care să nu inducă rezistență. Numai agenții antimicrobieni și peptidele singure suferă de toxicitate ecologică, activitate antimicrobiană pe termen scurt și instabilitate și degradare proteolitică. Pentru a depăși astfel de dezavantaje, agenții antimicrobieni sunt deseori încorporați fizic sau conjugați chimic cu polimeri biocompatibili, cum ar fi hidrogelurile,

având drept scop sporirea eficacității și specificității lor antimicrobiene, reducerea citotoxicității lor, prelungirea biostabilității și biodisponibilității și, nu în ultimul rând, a promovării altor proprietăți fizico-chimice biomimetice [1].

Hidrogelurile reprezintă o clasă de materiale moi, de origine sintetică și / sau naturală, de interes deosebit pentru aplicații medicale cum ar fi ingineria tisulară, medicina regenerativă și sistemele cu eliberare controlată de substanțe biologice active [2-12] datorită proprietăților lor fizice, chimice și biologice compatibile cu cele ale țesuturi biologice [13-17]. Hidrogelurile sunt reticulate fizic sau chimic cu agenți naturali sau sintetici cu formare de rețele tridimensionale (3D), care pot fi turnate în diferite forme și să rețină cantități mari de apă (până la 4000% raportată la greutatea lor uscată), deși nu sunt hidrosolubile. Proprietățile lor de reținere a apei apar în principal din prezența grupărilor hidrofile, cum ar fi grupările amido, amino, carboxil și hidroxil, în lanțuri de polimeri; gradul de gonflare depinde de compoziția polimerului, porozitate și, în plus, de densitatea și natura agentului de reticulare. Conținutul de apă al hidrogelurilor creează o structură foarte poroasă, moale și elastică consistența și o tensiune interfațială scăzută în contact cu apa sau cu fluide biologice. Aceste caracteristici fac proprietățile hidrogelului mai apropiate de cele ale țesuturilor biologice decât orice alt biomaterial sintetic. Hidrogelurile cu proprietăți antimicrobiene s-au obținut utilizând strategii diferite (descrise în secțiunile următoare) care pot fi rezumate în două metodologii principale [18]. O primă metodologie implică utilizarea unor suporturi nativ antimicrobiene în timp ce altele implică încărcarea acestora cu substanțe antimicrobiene. Hidrogelurile pot fi folosite ca suporturi pentru încărcarea moleculelor antimicrobiene, așa cum este prezentat în Tabelul 1. Acestea pot fi de natură diferită, cum ar fi nanoparticule (de obicei, aur sau argint), antibiotice sau alți agenți antimicrobieni. O atenție deosebită revine utilizării agenților naturali.

Tabel 1: Aplicații ale diferitelor tipuri de hidrogeluri [1]

Hidrogeluri	Aplicații	REF.	
Hidrogeluri antimicrobiene încărcate cu:	Nanoparticule de Ag	Pansamente pentru rani și acoperiri de suprafață	[19]
	Nanoparticule de Au	Pansamente pentru plăgi	[20, 21]
	Antibiotice	Pansamente pentru rani și acoperiri pentru implanturi	[22]
	Agenti antimicrobieni	Pansamente pentru rani și acoperiri de suprafață	[21, 23]
Hidrogeluri inerente active pe baza de:	Peptide	Pansamente pentru rani și acoperiri de suprafață	[24]
	Chitosan	Pansamente pentru rani și acoperiri de suprafață și utilizări chirurgicale	[25]
	Polimeri sintetici	Pansamente pentru răni și acoperiri de suprafață	[26]

Hidrogelurile pot fi proiectate pe baza materialelor care prezintă activitate antimicrobiană intrinsecă [27]. Cele mai relevante exemple de materiale antimicrobiene folosite pentru fabricarea hidrogelurilor includ peptidele antimicrobiene, chitosanul sau polimerii sintetici cu grupe funcționale antimicrobiene de tipul grupărilor cuaternare de amoniu, N-halamine, etc.)[28].

Chitosanul este o polizaharidă liniară, semicristalină compusă din (1 → 4) -2-acetamido-2-deoxi-β-D-glucan (N-acetil D-glucozamină) deoxi-p-D-glucan (D-glucozamină) [29]. Structura acestui polimer este ilustrată în figura 1. Ca atare, chitosanul nu este prezent în mod extensiv în mediu - totuși, el poate fi ușor derivat din deacetilarea parțială a unui polimer natural: chitina (figura 2).

Gradul de deacetilare (DD) al chitosanului, care indică numărul de grupe amino de-a lungul lanțurilor, se calculează ca raportul dintre D-glucozamină și suma D-glucozaminei și N-acetil D-glucozaminei. Pentru a fi numit "chitosan", chitina dezacetilată trebuie să conțină cel puțin 60% din reziduurile de D-glucozamină [30, 31] (care corespunde unui grad de deacetilare de 60). Deacetilarea chitinei se realizează prin hidroliză chimică în condiții alcaline severe sau prin hidroliză enzimatică în prezența unor enzime specifice, printre care deacetilaza chitinei [32-34].

### 1.1. Chitosanul (CH)

Chitosanul este netoxic, biocompatibil și biodegradabil. Se utilizează în livrarea de medicamente, sistemele de eliberare celulară și ortopedie, vindecarea rănilor, oftalmologie, farmacii și vindecarea osului[35]. Prezintă activitate antimicrobiană împotriva bacteriilor, fungiilor și drojdiilor. Este hipoalergenic, are proprietăți

hemostatice asigurând o coagulare rapidă a sângelui, acționează ca fixator de grăsimi prin legarea la lipidele alimentare. Chitosanul posedă, de asemenea, alte activități biologice ce includ proprietăți bacteriostatice și fungistatice care sunt utile pentru tratamentul deschis al rănilor[36].

S-a demonstrat că proprietățile antifungice ale chitosanului pot fi influențate de un număr de factori cum ar fi greutatea moleculară, tăria ionică și pH-ul mediului de dizolvare. De asemenea, în funcție de starea fizică, chitosanul poate avea proprietăți antimicrobiene foarte diferite, cum ar fi dacă chitosanul este prezent sub formă de filme, hidrogeluri, acoperiri, în soluție sau în combinație cu alte materiale [37].

De-a lungul timpului, au fost propuse diferite teorii pentru a explica mecanismul de acțiune prin care chitosanul își manifestă activitatea antimicrobiană și antifungică [38]. Deși mecanismul exact nu a fost încă elucidat, ipoteza de scurgere intracelulară este larg acceptată [38-40]. În acest mecanism au loc interacțiuni între moleculele de chitosan încărcate pozitiv și suprafața celulei bacteriene încărcată negativ. Aceste interacțiuni conduc la permeabilitatea membranei modificate, la întreruperea membranei microbiene și, ulterior, la scurgerea proteinelor și a altor constituenți intracelulare [37, 38, 41] care cauzează moartea celulelor [38, 42, 43]. La concentrații mai mici de 0,2 mg / ml, încărcătura pozitivă a chitosanilor scade, chitosanul încărcat pozitiv se leagă de suprafața bacteriană încărcată negativ pentru a provoca aglutinarea, în timp ce la concentrații mai mari, numărul sarcinilor pozitive ale suprafeței bacteriene este mai mare, pentru a le menține în suspensie [38].

De asemenea, s-a demonstrat experimental că activitatea antimicrobiană a chitosanului este limitată la condițiile acide. În cazul unui pH neutru, are loc pierderea încărcărilor pozitive ale grupărilor amino din structura chitosanului, și prin urmare restricționează utilizarea chitosanului ca agent antimicrobian la pH neutru [38, 43].

Du și colab. [44] au demonstrat că proprietățile antimicrobiene și antifungice ale chitosanului au fost îmbunătățite prin încărcarea chitosanului cu diferite metale Ag, Cu, Au și oxizi metalici ZnO, TiO<sub>2</sub>. Dintre toate metalele antimicrobiene, argintul este bine cunoscut pentru eficiența sa importantă la o gamă largă de microorganisme, pe lângă unele avantaje de prelucrare, cum ar fi stabilitatea la temperaturi ridicate și volatilitatea scăzută [45].

În plus față de acestea, nanoparticulele de aur și nanoparticule de oxid de zinc au evidențiat, de asemenea, proprietăți antibacteriene excelente [46, 47]. Un studiu comparativ a fost raportat de Hernández-Sierra și colab. [46] în care atât proprietățile bactericide cât și bacteriostatice ale nanoparticulelor de argint, oxid de zinc și nanoparticule de aur au fost investigate asupra tulpinilor *S. mutans*. În ciuda proprietăților bune ale celor trei nanoparticule studiate, autorii au evidențiat un efect antimicrobian mai mare împotriva *S. mutans* atunci când se utilizează nanoparticule de argint. Astfel, au fost necesare concentrații mai scăzute decât în cazul nanoparticulelor de aur sau de oxid zinc. Acesta este un factor important care ar permite atingerea unei toxicități reduse.

Atât hidrogelurile sintetice cât și cele naturale au fost folosite ca suport pentru încorporarea nanoparticulelor [48]. De exemplu, au fost obținute hidrogelurile sintetice încărcate cu nanoparticule metalice pornind de la poli (N-vinil pirolidonă) (PVP) [49], alcool poli(vinilic) (PVA) [50] sau acidul poli (acrilamidă-co-acrilic) [51]. Polimerii naturali, cum ar fi gelurile naturale pe bază de chitosan, colagen, alginat [52, 53], au fost de asemenea utilizați pentru a încapsula nanoparticule de argint.

Au fost raportate diferite metodologii care încorporează nanoparticule cu proprietăți antibacteriene în cadrul unui hidrogel care este cel mai important în ceea ce privește următoarele[1].

### ***1.1.1. Formarea hidrogelului în prezența nanoparticulelor***

Această metodologie, utilizată de Yu și colab. [49] se bazează pe încorporarea nanoparticulelor în hidrogeluri prin utilizarea ciclurilor de îngheț-dezgeț. Aceștia au descris prepararea hidrogelurilor de alcool polivinilic / poli (N-vinil pirolidonă) (PVA-PVP) purtând nanoparticule de argint utilizând această abordare. Această metodologie a permis fabricarea de hidrogeluri fără agregarea semnificativă a nanoparticulelor de argint. Mai mult, Travan și colab. [54] au realizat încorporarea NPs de argint în într-o soluție polizaharidică derivată din chitosan bioactiv. Această soluție este un chitosan substituit cu lactoză, 1-deoxilatil-1-il chitosan, numit "Chitlac". Odată ce nanoparticulele au fost dispersate în soluția Chitlac, aceasta din urmă a fost amestecată cu o soluție de alginat, formând astfel hidrogelul final. Rolul polizaharidelor ramificate Chitlac este crucial în formarea și stabilizarea NPs de argint.

### 1.1.2. **Fabricarea simultană a hidrogelurilor și a nanoparticulelor**

Fullenkamp și colab. [55] au folosit această strategie pentru fabricarea unui hidrogel antibacterian care eliberează argint. În strategia prezentată în Figura 8, hidrogelul antibacterian permite simultan formarea nanoparticulelor de argint și reticularea gelului. În acest scop, s-au sintetizat polimeri polietilenglicol (PEG) solubili în apă care conțin grupări reactive de catechol. Azotatul de argint (precursorul nanoparticulelor de argint) oxidează grupele catechol conducând la reticulare covalentă. Interesant, această oxidare și, prin urmare, formarea hidrogelului se produc simultan cu reducerea Ag (I). Hidrogelurile rezultate au arătat că inhibă creșterea bacteriilor, fără a afecta în mod semnificativ viabilitatea celulelor.

În plus, Gonzalez-Henriquez și colab. [56, 57] au generat, de asemenea, nanoparticule *in situ* încorporate într-o matrice de hidrogel care acționează ca un container și stabilizator în timpul formării nanoparticulelor. Această metodă a fost realizată utilizând AgNO<sub>3</sub> ca sursă de argint. În plus, pentru sinteza hidrogelului s-au utilizat monomerul hidroxietilmetacrilat (HEMA), agenții de reticulare dietilenglicolmetacrilat (DEGDMA) și diacrilatul de polietilenglicol (PEGDA) și un fotoinițiator (Irgacure 651 sau 2959). Amestecul de reacție a fost iradiat cu o lampă UV la 365 nm, facilitând formarea simultană a hidrogelului și a nanoparticulelor de Ag. Această procedură sporește stabilitatea NPs de argint și îmbunătățește de asemenea dispersia acestora. Analizele cantitative arată că anumite tipuri de hidrogel prezintă o proprietate biocidă importantă, prin reducerea a 99,9% din bacteria *E. coli*.

În concluzie, independent de abordarea de fabricare utilizată (descrisă mai sus), trebuie luate în considerare două aspecte cruciale în prepararea hidrogelurilor antimicrobiene care utilizează nanoparticule. Primul aspect implică dispersia nanoparticulelor. Îmbunătățirea dispersiei nanoparticulelor este asigurată de modificarea suprafeței nanoparticulelor și o dispersie spațială mare pentru a evita aglomerarea particulelor metalice. Ca rezultat, interacțiunile dintre hidrogel și nanoparticule sunt îmbunătățite, sporind interacțiunea materialului cu mediul său înconjurător, unde sunt localizate bacteriile [58]. Al doilea aspect important care necesită o analiză este citotoxicitatea asociată cu nanoparticulele utilizate. Diferitele alternative raportate



urmăresc reducerea citotoxicității nanoparticulelor la celulele mamifere, menținând în același timp activitatea antimicrobiană. Das și colab. [59] au propus utilizarea contraionului hidrogelurilor hidrofilici cu încărcare pozitivă.

### **1.1.3. Nanoparticule de Ag (NPAg)**

Încă din antichitate, nanoparticulele de Ag au fost utilizate ca agent antibacterian datorita efectului puternic inhibitor asupra bacteriilor și fungilor. De-a lungul timpului o atenție deosebită s-a acordat asupra studiului proprietăților antimicrobiene ale nanoparticulelor de argint fiind direcția cea mai studiată, din punct de vedere al aplicațiilor biomedicale scopul fiind acela de a obține un efect bactericid puternic utilizând o cantitate minimă de nanoparticule de Ag [60-64].

Mecanismul antimicrobian 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[65].

De asemenea, considerând versatilitatea proceselor de sinteză, nanoparticulele de Ag pot fi înglobate sau depuse pe suprafața unei game largi de materiale (compozite sau hibride organice sau anorganice) în scopul inducerii de proprietăți anti-microbiene (efect biostatic sau biocid, potențial anti-aderent sau inhibitor al biofilmului microbial). Conform datelor de literatură, sinteza nanoparticulelor de argint se poate face utilizând metode fizice, chimice și biologice.

### **1.2. Nanoparticule de ZnO (NPZnO)**

Datorită proprietăților fotocatalitice deosebite dar și a proprietăților antimicrobiene și antiseptice deosebite nanoparticulele de ZnO au fost utilizate cu succes într-o serie vastă de potențiale aplicații medicale[66-68]. Oxidul de zinc este utilizat cu succes ca agent de protecție solară, 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.

Reddy și colab.[68] au studiat toxicitatea nanoparticulelor de ZnO față de diferite bacterii gram - negative (*E. coli*), gram-pozitive (*S. aureus*), și fungi prezentând o inhibare completă a creșterii *E. coli* la concentrații  $\geq 3,4$  mM, și *S. aureus* a fost 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. Padmavathy și colab.[69] 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 particulele grosiere. De asemenea, s-a observat 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. Deasemenea, este folosit în creme utilizate în tratarea diverselor dermatite, iritațiilor cauzate de scutece, contra bășicilor sau inflamațiilor și rănilor deschise, deoarece nanoparticulele de ZnO nu penetrează celulele pielii viabile, ci rămân pe stratul exterior al pielii intacte (stratum corneum) cu toxicitate sistemică scăzută [24] favorizând vindecarea rănilor.

### 1.3. Acidul Usnic (AU)

Substanța chimică organică cunoscută și sub denumirea de dibenzofuran care se regăsește în mod natural în mai multe specii de licheni, poate fi extrasă și din planta *Laba Ursului*. Este utilizat cu succes în medicina, parfumerie, produse cosmetice. Acidul usnic posedă o gamă largă de proprietăți: este un puternic antibiotic eficient împotriva bacteriilor *Staphylococcus*, *Streptococcus* și *Pneumococul*, *Mycobacterium tuberculosis*. Prezintă proprietăți antivirale, antiprotozoare, antimicotice, antiinflamatorii și analgezice. Este folosit cu succes în creme, pudre, paste de dinți, apa de gură, deodorante, șampoane și produse de protecție solară fiind utilizat ca ingredient activ, în altele - ca un conservant.

## STUDIU EXPERIMENTAL

### 2. Materiale si metode

Toate substantele chimice: chitosan (Aldrich Chemistry), acid acetic glacial –  $\text{CH}_3\text{COOH}$  - (Silal Trading), acid usnic -  $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_7$  (Roth), acetat de zinc -  $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_4\text{Zn}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (Sigma Aldrich), azotat de argint –  $\text{AgNO}_3$  (Sigma Aldrich), au fost utilizate fără purificare.

Spectrele în infraroșu (FTIR) au fost înregistrate cu ajutorul unui spectrometru Nicolet iS 50 FT-IR, echipat cu un detector DTGS care furnizează informații cu o sensibilitate ridicată în intervalul  $4000\text{ cm}^{-1}$  până la  $100\text{ cm}^{-1}$  și o unitate ATR cu diamant. Spectrele au fost realizate în modul iS50 ATR în intervalul  $40\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$  cu o rezoluție de  $4\text{ cm}^{-1}$ . Microscopia electronică de baleaj (SEM) a fost realizată utilizând un dispozitiv QUANTA INSPECT F SEM, cuplat cu un detector EDS (spectrometru de dispersie a energiei) și cu un tun de emisie de câmp (FEG), a cărui rezoluție este de 1,2nm.

#### 2.1. Prepararea nanoparticulelor antibacteriene prin electrospinning

##### 2.1.1. Sinteza si caracterizarea materialelor compozite CH 1%

Soluția de chitosan a fost preparată prin dizolvarea a 1,049 g de chitosan într-o soluție apoasă de acid acetic (100 ml acid acetic cu 50 ml apă distilată sub agitare continuă timp de 12 ore, la temperatura camerei.

Soluția de chitosan obținută a fost depusă pe hârtie de copt utilizând o un sistem injectomat ce acționează o seringă având un ac de calibru 21. Condițiile de lucru în care s-au obținut materialele au fost următoarele: tensiunea de accelerare 11.06 kV, puterea de încălzire a probei de 0.506kW, timpul de depunere 60 minute, debitul soluției de 10 ml/h, obținându-se filme de 80 mm lățime, viteza de rotație a tamburului este de 140 rpm, iar

viteza de baleiere a acului este de 40 mm/s. Anodul alimentării cu tensiune a fost conectat cu vârful seringii și catodul atașat la placa acoperită de hârtia de copt pe care s-au depus fibrele electrofilate. Materialele obținute au fost ulterior uscate, sub vid, la 60 °C peste noapte pentru a îndepărta acidul acetic și apa eventual rămas după electrospinning.

Pentru stabilirea condițiilor de depunere optime au fost realizate mai multe încercări în timpul cărora au fost variați diverși parametri de depunere: viteza de depunere, tensiunea, temperatura de lucru și durata depunerii.

### ***2.1.2. Sinteza și caracterizarea materialelor compozite CH 1% / NPZnO 1%***

Materialele compozite de tip CH1%/NPZnO 1% au fost preparate prin dizolvarea a 1,049 g de chitosan și 0.0234g (CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>Zn într-o soluție apoasă de acid acetic (100 ml acid acetic cu 50 ml apă distilată sub agitare continuă timp de 12 ore la temperatura camerei.

Soluția astfel obținută a fost depusă pe hârtie de copt în aceleași condiții în care au fost obținute și materialele pe baza de chitosan 1%. După depunere, filmul obținut a fost introdus în soluție de NaOH 5N pentru obținerea nanoparticulelor de ZnO și ulterior spălate cu apă pentru îndepărtarea soluției de NaOH în exces de pe suprafața membranei. Materialele obținute au fost uscate sub vid la 60 °C peste noapte pentru a îndepărta acidul acetic și apa eventual rămas după electrospinning

### ***2.1.3. Sinteza și caracterizarea materialelor compozite CH 1%/AU 1%***

Materialele compozite de tip CH1% /AU1% au fost preparate prin dizolvarea a 1,049 g de chitosan și 0.01 Acid usnic într-o soluție apoasă de acid acetic (100 ml acid acetic cu 50 ml apă distilată sub agitare continuă timp de 12 ore la temperatura camerei. Soluția astfel obținută a fost depusă pe hârtie de copt în aceleași condiții în care au fost obținute și materialele pe baza de chitosan 1%.

### ***2.1.4. Sinteza și caracterizarea materialelor compozite CH1%/NPZnO1%/UA1%***

Materialele compozite de tip CH1%/NPZnO1% /UA1% au fost preparate prin dizolvarea a 1,049 g de chitosan, 0.0236g (CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>Zn și 0.01g Acid usnic într-o soluție apoasă de acid acetic (100 ml acid acetic cu 50 ml apă distilată sub agitare

continuă timp de 12 ore la temperatura camerei. Soluția astfel obținută a fost depusă prin electrospinning pe hârtie de copt în aceleași condiții în care au fost obținute și materialele pe baza de chitosan 1%. După depunere, membrana obținută a fost introdusă în soluția de NaOH 5N pentru obținerea nanoparticulelor de ZnO și ulterior spălate cu apă pentru îndepărtarea soluției de Na OH după suprafața membranei. Materialele obținute au fost uscate sub vid la 60 ° C peste noapte pentru a îndepărta acidul acetic și apa eventual rămasă după electrospinning.

#### **2.1.5. Sinteza și caracterizarea materialelor compozite CH1%/NPAg 1%**

Materialele compozite de tip CH/ NP CH 1% / NPAg 1% au fost obținute prin dizolvarea a 1.0049g chitosan în 100 ml suspensie de acid acetic și NPAg (150 ml acid acetic și 75 ml suspensie coloidală de Ag) sub agitare la temperatura camerei timp de 12 ore. Soluția astfel obținută a fost depusă pe hârtie de copt în aceleași condiții în care au fost obținute și materialele pe baza de chitosan 1%. Materialele obținute au fost uscate sub vid la 60 ° C peste noapte pentru a îndepărta acidul acetic și apa eventual rămasă după electrospinning

#### **2.1.6. Sinteza și caracterizarea materialelor compozite CH1%/NPAg1%/UA1%**

Materialele compozite CH1%/NPAg1%/UA1% au fost obținute prin dizolvarea a 1.0049g chitosan și 0.01 AU în 100 ml suspensie de acid acetic și NPAg (150 ml acid acetic și 75 ml suspensie coloidală de Ag) sub agitare la temperatura camerei timp de 12 ore. Soluția astfel obținută a fost depusă pe hârtie de copt în aceleași condiții în care au fost obținute și materialele pe baza de chitosan 1%. Materialele obținute au fost uscate sub vid la 60 ° C peste noapte pentru a îndepărta acidul acetic și apa eventual rămasă după electrospinning

Materialele obținute sunt prezentate în Tabelul 2.

Tabel 2.

Codificarea probelor	Conținut de chitosan	Conținut de usnic acid	Conținut de ZnONP	Conținut de AgNP
CH1%	1%	-	-	-
CH1% / AU1%	1%	1%	-	-

CH1% /NPZnO1%	1%	-	1%	-
CH1%/ NPZnO1%/AU1%	1%	1%	1%	-
CH1% /NPAg1%	1%	1%	-	1%
CH1%/ NPAg1%/AU1%	1%	1%	-	1%

### **2.3. Testarea activității antimicrobiene**

Tulpinile utilizate pentru acest studiu au fost obținute din colecția de tulpini a Laboratorului de Microbiologie, Facultatea de Biologie, Universitatea din București.

#### **2.3.1. Metode calitative de testare**

##### **Metoda disc-difuzimetrica adaptata**

Testul utilizează metoda difuzimetrică adaptată (conform recomandărilor CLSI, 2015). Pe suprafața mediului Mueller Hinton (fără glucoză) agarizat 2% (pH = 7.2 - 7.4) (pentru speciile bacteriene), respectiv a mediului Sabouraud agarizat cu adaus de cloramfenicol (pentru speciile levurice), cu grosimea de 4 mm repartizat în placi Petri ( $\emptyset = 10$  cm) s-a însămânțat “în pânză” un inocul standardizat reprezentat de o suspensie de celule microbiene realizată în apă fiziologică sterilă (AFS) din culturi de 18-24 h cu densitate standard de  $1,5 \times 10^8$  UFC/ml ajustată nefelometric cu etalon McFarland 0,5 (pentru celulele bacteriene), respectiv densitate de  $3 \times 10^8$  UFC/ml ajustată nefelometric cu etalon McFarland 1 (pentru celulele levurice). Culturile microbiene de 18-24 h se obțin prin însămânțarea tulpinilor studiate pe mediu solid TSA (*Trypticase Soy Agar*), respectiv YPG (*Yeast Pepton Glucose*). Ulterior, la suprafața mediului însămânțat in pânză se dispun eșantioanele de testat (tăiate sub forma unor discuri cu diametrul de 6mm). Plăcile sunt incubate timp de 16-18h la 37°C pentru a permite dezvoltarea microorganismelor și difuzia liberă a compușilor activi din materialele testate. Rezultatele se interpretează prin evaluarea dimensiunii diametrelor zonelor de inhibiție a creșterii.

#### **2.3.2. Metode cantitative de testare**

##### **Creșterea microorganismelor planctonice in prezenta materialelor**

Pentru testarea efectului materialelor obtinute asupra cresterii microorganismelor in mediu lichid (culture planctonice), materialele obtinute au fost taiate la dimensiunile de 1cm/1cm si sterilizate prin expunere la radiatii UV timp de 20 min pe fiecare parte. Cate un fragment de material steril a fost depus individual intr-un godeu al unei placi cu 6 godeuri sterile. Peste materialele depuse, in godeuri s-au adaugat 2 mL mediu lichid (bullion simplu pentru bacterii si YPG lichid pentru levuri) si ulterior 50  $\mu$ L suspensie microbiana de densitate 0.5 McFarland (bacterii) sau 1McFarland (levuri). Placile cu 6 godeuri astfel pregatite, au fost incubate la 37°C timp de 24h. Dupa expirarea timpului de incubare 200 $\mu$ L din suspensiile microbiene obtinute au fost transferati in placi cu 96 godeuri sterile si turbiditatea culturilor microbiene a fost masurata spectrophotometric la 600nm.

#### **Evaluarea formarii de Biofilme – material solid functionalizat**

Pentru testarea efectului suprafetelor obtinute asupra producerii de biofilme, materialele obtinute au fost taiate la dimensiunile de 1cm/1cm si sterilizate prin expunere la radiatii UV timp de 20 min pe fiecare parte. Cate un fragment de material steril a fost depus individual intr-un godeu al unei placi cu 6 godeuri sterile. Peste materialele depuse, in godeuri s-au adaugat 2 mL mediu lichid (bullion simplu) si ulterior 50  $\mu$ L suspensie microbiana de densitate 0.5 McFarland. Placile cu 6 godeuri astfel pregatite, au fost incubate la 37°C timp de 24h. Dupa incubare materialele au fost spalate cu AFS si mediul a fost schimbat, pentru dezvoltarea biofilmelor dezvoltate pe acestea. Placutele au fost incubate pentru diferite perioade de timp (24, 48 si respective 72h). Dupa expirarea fiecărei perioade de incubare luate in calcul, esantionul pe care s-a dezvoltat biofilmul a fost spalat cu AFS si depus intr-un tub steril intr-un mL AFS. Tubul a fost vortexat energetic timp de 30 sec si sonicat 10 sec pentru desprinderea celulelor din biofilm. Suspensia celulara obtinuta a fost diluata si diferite dilutii au fost insamantate pe placi cu mediu de cultura solidificat in vederea obtinerii si cuantificarii numarului de unitati formatoare de colonii.

### 3. Rezultate si discuții

Materialele compozite obținute au fost caracterizate atât din punct de vedere structural cu ajutorul spectroscopiei în infraroșu (IR) cât și morfologic cu ajutorul microscopiei de baleiaj.

#### 3.1. IR

În spectrul IR al materialelor pe baza de chitosan 1% (figura 1) benzile sunt în general mari datorită caracterului macromolecular al compusului și datorită numeroaselor legături intermoleculare de hidrogen [70].

Astfel, în spectrul chitosanului au fost identificate benzile caracteristice grupării amidice, datorate vibrațiilor  $\nu(\text{C}=\text{O})$  (amida I) la  $1650\text{ cm}^{-1}$  și  $\delta(\text{C}-\text{N})$  (amida II) la lungimea de  $1568\text{ cm}^{-1}$ . Totodată, în regiunea  $3\ 320 - 3\ 400\text{ cm}^{-1}$  s-a identificat o bandă largă atribuită vibrației de valență a grupărilor OH alcoolice dar și a vibrațiilor de întindere a grupărilor  $\nu(\text{N}-\text{H})$ .

De asemenea, au fost identificate următoarele benzi caracteristice grupărilor din structura chitosanului:

- banda de la  $2867\text{ cm}^{-1}$  este caracteristica vibrațiilor de întindere a grupărilor  $\nu(\text{C}-\text{H})$
- banda de la  $1417\text{ cm}^{-1}$  este caracteristica vibrațiilor de deformare a grupărilor  $\delta(\text{OH})$ .
- banda de la  $1372\text{ cm}^{-1}$  (chitosan) este caracteristica vibrațiilor de deformare a grupărilor  $\delta(\text{C}-\text{H})$ .
- banda de la  $1318\text{ cm}^{-1}$  este caracteristica vibrațiilor de deformare a grupărilor  $(\text{C}-\text{H})$  (amina III),  $\omega(\text{C}-\text{H})_n$ .
- banda de la  $1152\text{ cm}^{-1}$  este caracteristica grupărilor  $(\text{C}=\text{O})$  din punțile de oxigen rezultate în urma deacetilării chitosanului.
- banda de la  $1060\text{ cm}^{-1}$  caracteristica vibrațiilor de întindere a grupărilor  $\nu(\text{C}=\text{O})$  din legăturile C-O-H, C-O-C and CH<sub>2</sub>CO.
- banda de la  $892\text{ cm}^{-1}$  este caracteristica grupărilor  $\omega(\text{C}-\text{H})$  din structura polizaharidei

Din spectrele IR (figura 1) înregistrate pe materialele compozite pe baza de CH1% și CH1%/NPZnO1%, se observă că bandă largă atribuită vibrației de valență a grupărilor OH alcoolice s-a deplasat la valori mai mici, ceea ce indică interacțiunea dintre aceste grupuri și ZnO [36, 71].



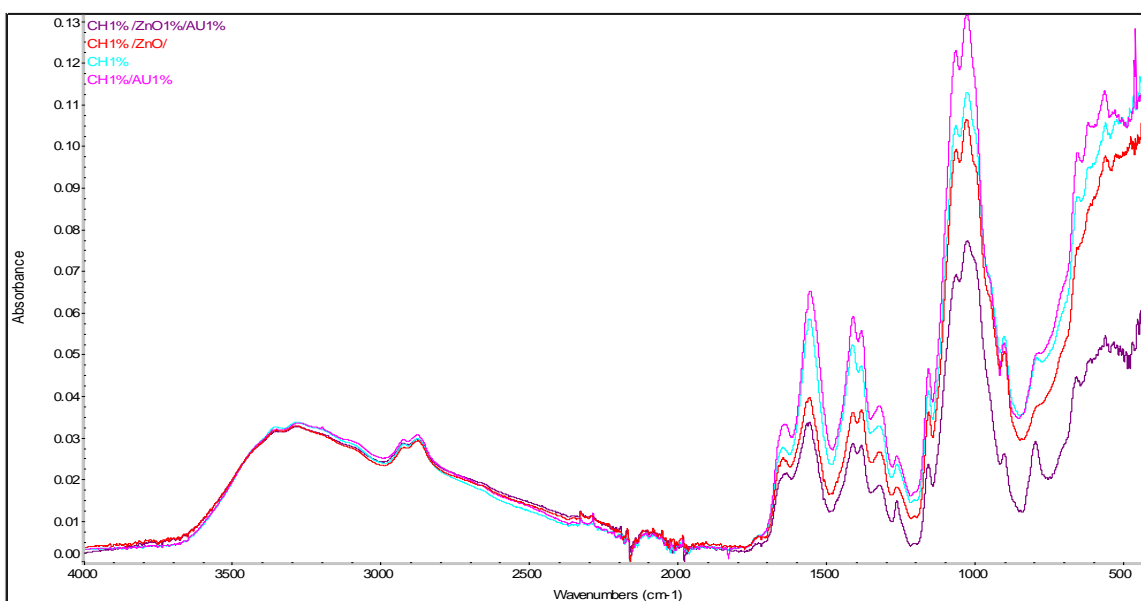
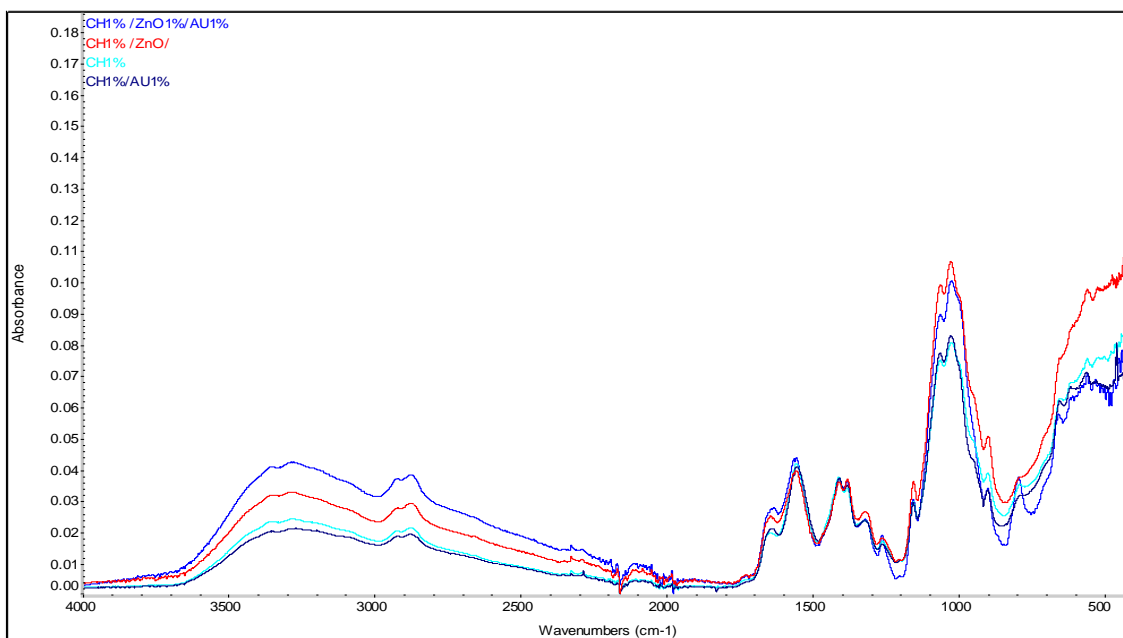
De asemenea, se observă o scădere a intensității benzilor din jurul valorilor 1151, și 1060  $\text{cm}^{-1}$ , corespunzătoare  $\nu(\text{O-H})$  vibrațional, sugerând existența unor interacțiuni între chitosan și oxidul de zinc.

În cazul materialelor compozite pe baza de CH1%, CH1%/NPZnO1%/AU1% și CH1%/AU1% (figura 1), se pot observa modificări a intensității și formei vârfurilor la 1643 și 1250  $\text{cm}^{-1}$ , indicând faptul că au avut loc interacțiuni între UA, chitosan și NPZnO. Această concluzie este susținută și prin deplasarea benzilor de la 1643  $\text{cm}^{-1}$  la valori mai mici. De asemenea, în cazul materialelor compozite pe baza de CH1%/NPZnO1% și CH1%/NPZnO1%/AU1% (figura 1), se observă o scădere a intensității benzilor în jurul valorii de 1151, și 1060  $\text{cm}^{-1}$ , corespunzătoare  $\nu(\text{O-H})$  vibrațional, sugerând că s-ar putea produce o interacțiune între Chitosan și oxidul de zinc.

În tabelul 3 sunt redate valorile benzilor caracteristice materialelor compozite obținute.

**Table 3** valorile benzilor caracteristice materialelor compozite CH1%, CH1%/NPZnO1%, CH1%/AU1%, CH1%/NPZnO1%/AU1%

Material compozit	$\nu(\text{OH})$ $\nu_{\text{s}}(\text{N-H})$	$\nu(-\text{C}=\text{O})$	$\nu(-\text{C}=\text{O}),$ $\delta(\text{NH}_3)$	$\delta(\text{OH})$	$\delta(-\text{CH}_3)$	$\nu_{\text{s}}(-\text{CH}_3)$ $\omega(-\text{CH}_2)$ + OH	$\nu_{\text{as}}(\text{C}=\text{O})$	$\nu(\text{C}=\text{O})$ C-O-H, C-O-C CH <sub>2</sub> CO	$\omega(\text{C-H})$
CH1%	3281	2874	1643 1552	1408	1378	1318	1258 1152	1060 1019	896
CH1% /NPZnO1%	3358	2875	1637 1582	1476	1370	1319	1261 1150	1058 1023	895
CH1% / AU1%	3266	2874	1633 1552	1406	1377	1317	1252 1152	1061 1023	897
CH1%/ NPZnO1%/AU1%	3273	2871	1630 1560	1406	1377	1317	1252 1152	1059 1022	897



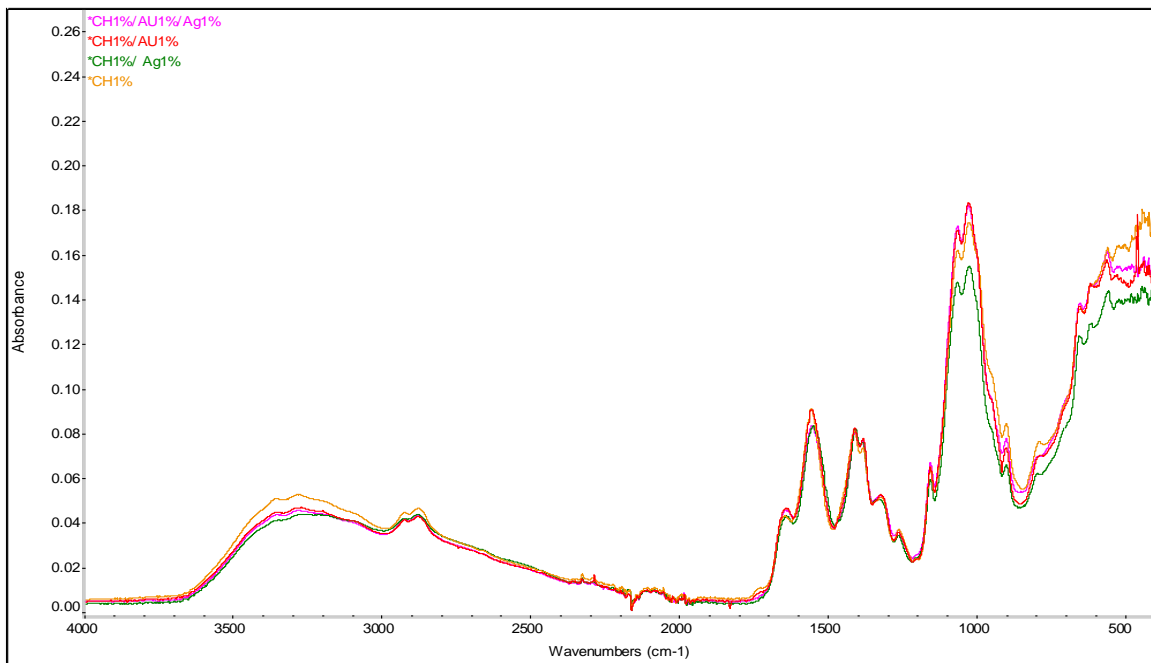
**Figura 1. Spectrele IR ale materialelor CH1%, CH1%/NPZnO1%, CH1%/AU1%, CH1%/NPZnO1%/AU1%**

Adăugarea nanoparticulelor de argint a condus la deplasarea benzii caracteristice amidei I de la 1643 la 1637  $\text{cm}^{-1}$  datorita încorporării nanoparticulelor de argint în nanocompozit și implicit a interacțiilor ce se dezvoltă [71-73]

In tabelul 3 sunt redate valorile benzilor caracteristice materialelor compozite CH1%, CH1%/NPAg1%, CH1%/AU1%, CH1%/NPAg1%/AU1%

**Table 3 valorile benzilor caracteristice materialelor compozite CH1%, CH1%/NPAg1%, CH1%/AU1%, CH1%/NPAg1%/AU1%**

Material compozit	$\nu(\text{OH})$ $\nu\text{s}(\text{N-H})$	$\nu(-\text{C}=\text{O})$	$\nu(-\text{C}=\text{O}),$ $\delta(\text{NH}_3)$	$\delta(\text{OH})$	$\delta(-\text{CH}_3)$	$\nu\text{s}(-\text{CH}_3)$ $\omega(-\text{CH}_2) +$ $\text{OH}$	$\nu\text{as}(\text{C}=\text{O})$	$\nu(\text{C}=\text{O})$ $\text{C-O-H},$ $\text{C-O-C}$ $\text{CH}_2\text{CO}$	$\omega(\text{C-H})$
Chitosan	3281	2874	1643 1552	1408	1378	1318	1152	1060	896
Chitosan /AG1%	3253	2872	1637 1545	1405	1380	1323	1152	1061	897
Chitosan / AU	3266	2874	1633 1552	1406	1377	1317	1152	1061	897
Chitosan /Ag/ AU	3275	2872	1637 1550	1405	1378	1320	1152	1061	897



**Figura 2. Spectrele IR ale materialelor CH1%, CH1%/NPAg1%, CH1%/AU1%, CH1%/NPAg1%/AU1%**

### 3.2. SEM

Morfologia de suprafață a materialelor pe baza de CH1% și CH1%/NPZnO1% a fost evaluată utilizând microscopia electronică de scanare. În imaginile SEM (Figurile 3 și 4), se poate observa că prezența NPZnO pe suprafața chitosanului conduce la modificări nete ale acestuia. Dacă suprafața materialelor pe baza de CH1% (figura 3) pur este netedă, compactă și omogenă. Prin încorporarea NPZnO (figura 4), suprafața devine rugoasă și eterogenă. De asemenea se observă o distribuție uniformă a NPZnO pe suprafața chitosanului de dimensiuni similare (Figura 4) [74]. Se observă o structură fibrilară a materialelor pe baza de CH1% pur.

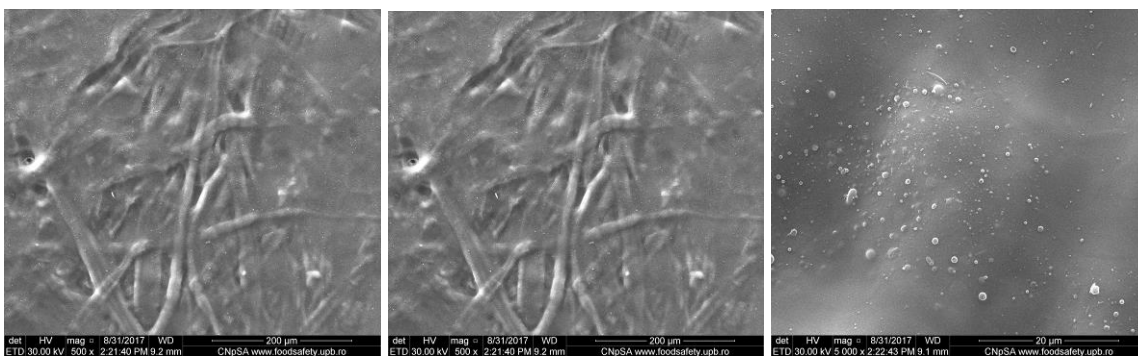


Figura 3. Imagini SEM ale materialului compozit pe baza de CH1%

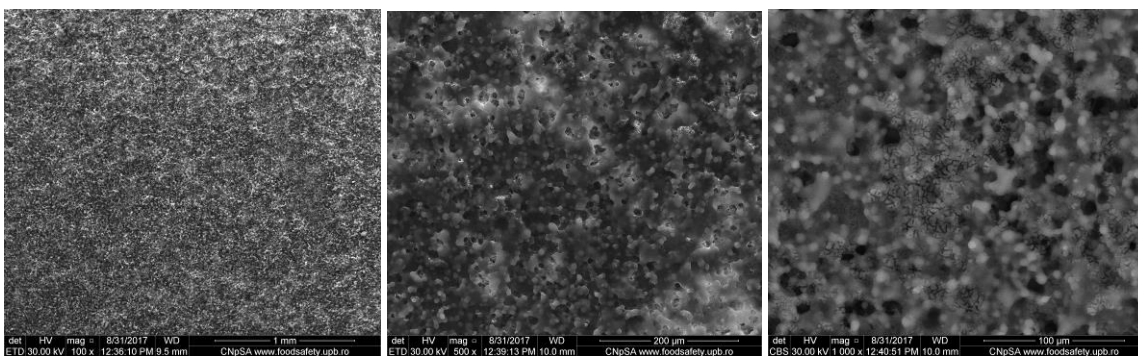
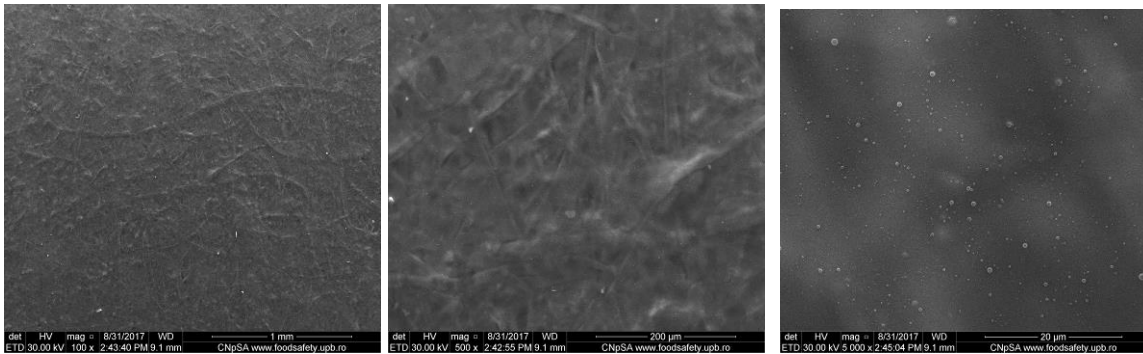


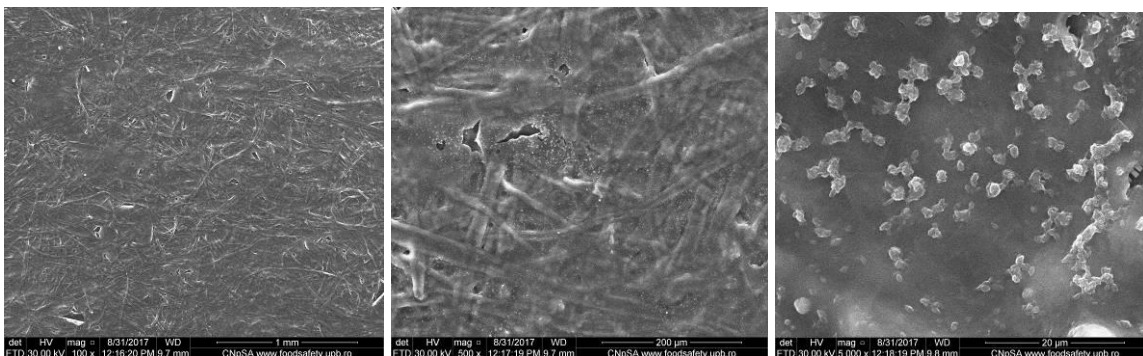
Figura 4. Imagini SEM ale materialului compozit pe baza de CH1%/NPZnO1%

În cazul materialelor CH1%/AU1% (figura 5) suprafața este netedă, compactă și omogenă ca și în cazul materialelor pe baza de CH1%



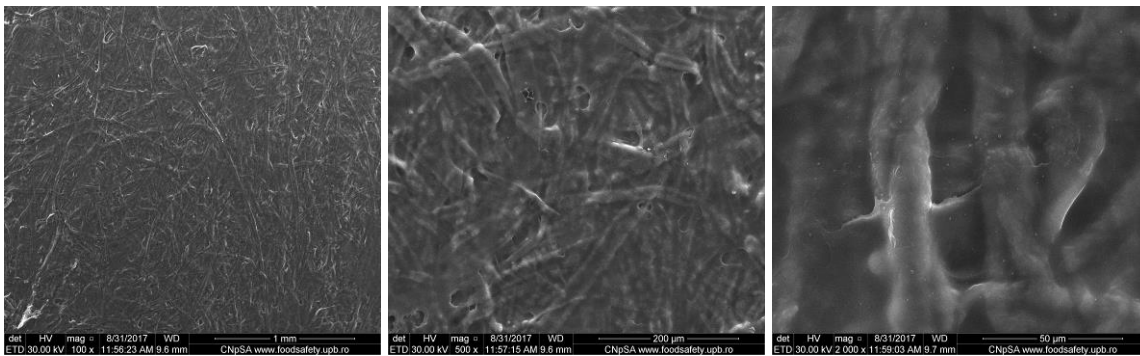
**Figura 5. Imagini SEM ale materialului compozit pe baza de CH1%/AU%**

Din imaginile SEM înregistrare pe materialul CH1%/NPZnO1%/AU1% (figura 6), se poate observa ca prin încorporarea NPZnO suprafața devine rugoasă și eterogenă. De asemenea, se observa o distribuție uniformă a NPZn pe suprafața chitosanului de dimensiuni similare (Figura 4).

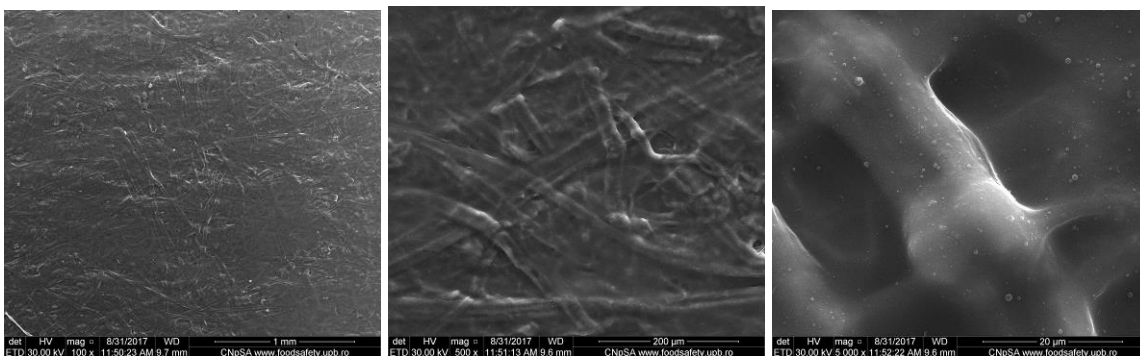


**Figura 1. Imagini SEM ale materialului compozit pe baza de CH1%/NPZnO1%/AU1%**

In cazul materialelor CH1%/NPAg1%/CH1%/NPAg1%/AU1% (figurile 7 si 8) suprafața este netedă, compactă și omogenă ca si in cazul materialelor pe baza de CH1%. Se observa o morfologie fibrilară a materialelor pe baza de CH1% pur. Acest lucru se poate explica prin incorporarea NPAg in masa materialului.



**Figure 2. Imagini SEM ale materialului compozit pe baza de CH1%/NPAg1%**

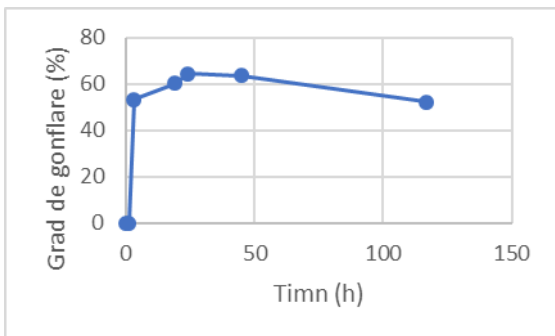


**Figure 3. Imagini SEM ale materialului compozit pe baza de CH1%/NPAg1%/AU1%**

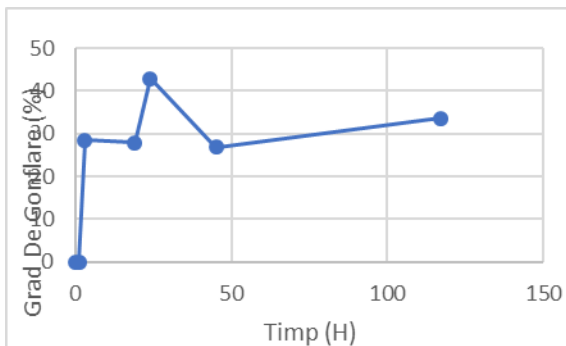
### **Gradul de gonflare**

Gradul de gonflare pentru materialele compozite obținute s-a realizat utilizând ca solvent apa distilata la temperaturi camerei.

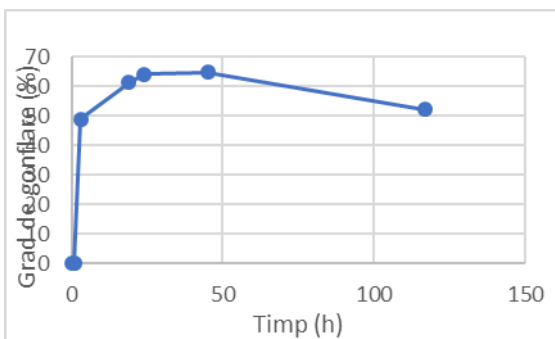
Se observa din graficele obținute (Figurile 9-14) ca gradul de gonflare cel mai mare îl prezinta materialele de tip CH1% si CH1%/AU1% datorita porozității ridicate a materialului. Materialele de tip CH1%/NPZnO1%/AU1%, CH1%/NPZnO1%, CH1%/NPAg1% si CH1%/NPAg1%/AU1% au grade de gonflare mai scăzute datorita scăderii porozității acestor materiale ca urmare a dispunerii nanoparticulelor in pori dar și datorită hidrofilicității scăzute a acidului usnic. Acest rezultat este in acord cu microscopia SEM.



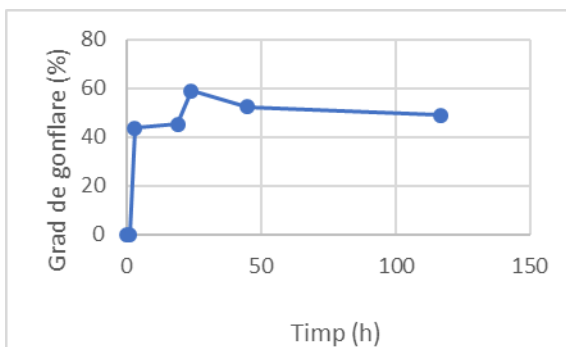
**Figura 9. Grad de gonflare pentru materialul de tip CH1%**



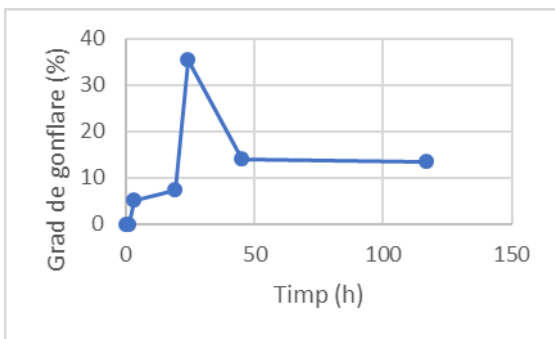
**Figura 10. Grad de gonflare pentru materialul de tip CH1%/NPZnO1%**



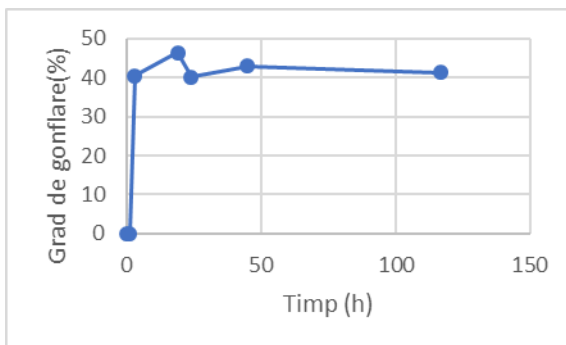
**Figura 11. Grad de gonflare pentru materialul de tip CH1%/AU%**



**Figura 12. Grad de gonflare pentru materialul de tip CH1%/NPZnO%/ AU1%**



**Figura 13. Grad de gonflare pentru materialul de tip CH1%/NPAg%**



**Figura 14. Grad de gonflare pentru materialul de tip CH1%/NPAg%/AU1%**

Evoluția absorbției de apă nu este continuă în cazul tuturor probelor datorită faptului că apare și o ușoară degradare a matricii de chitosan. În cazul probelor CH1% și CH1%/AU1% evoluția absorbției de apă prezintă o alură normală, proba absorbind apă

până la 24h după care începe o degradare ușoară a hidrogelului gonflat. În ambele cazuri, degradarea după 5 zile fiind de ~10-15%.

Tip material	Grad de gonflare, %
CH1%	64.42
CH1%/NPZnO1%	42.95
CH1%/AU1%	64.69
CH1%/NPZnO1%/AU1%	58.94
CH1%/NPAg1%	35.46
CH1%/NPAg1%/AU1%	46.5

### 3.3. Testarea activității antimicrobiene

Activitatea antimicrobiană a fost testată pe culturi de *C. albicans*, *P aeruginosa*, *S. Aureus* în regim planctonic sau biofilm.

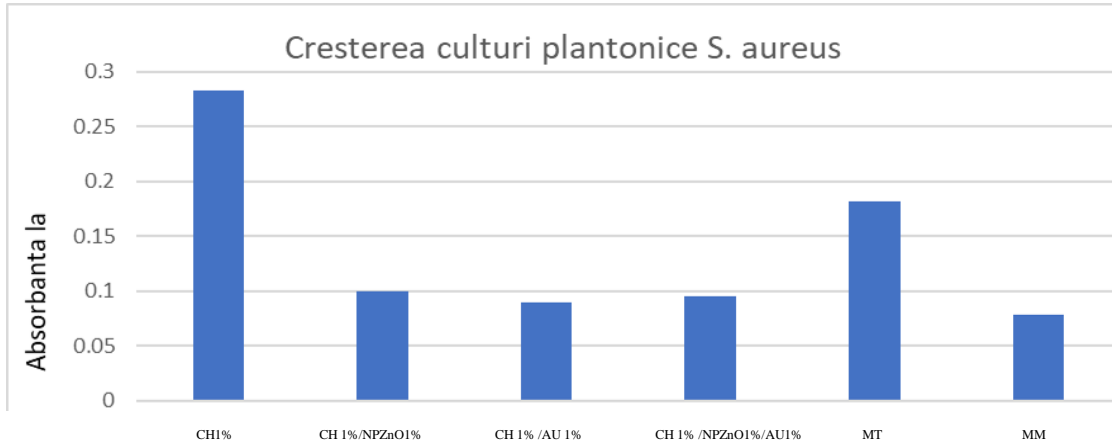
#### *Creșterea microorganismelor planctonice în prezența materialelor*

În cazul probelor pe bază de chitosan și oxid de zinc, activitatea antimicrobiană a filmelor depinde de la tulpină la tulpină. În cazul tulpinii *S aureus* activitatea este practic aceeași pentru toate probele ce conțin ZnO ceea ce denotă faptul că această activitate este practic indusă de prezența acestuia, probabil datorită interacției dintre ionii hidroxil cu suprafața încărcată pozitiv a celulelor. În cazul bacteriilor gram negative de *P aeruginosa* și a bacteriilor benefice *C albicans*, mecanismul complex face ca activitatea antimicrobiană a sisteme ternare chitosan-AU-ZnO să fie chiar mai modeste decât a sistemelor binare aferente fiind necesare studii suplimentare în a înțelege această evoluție.

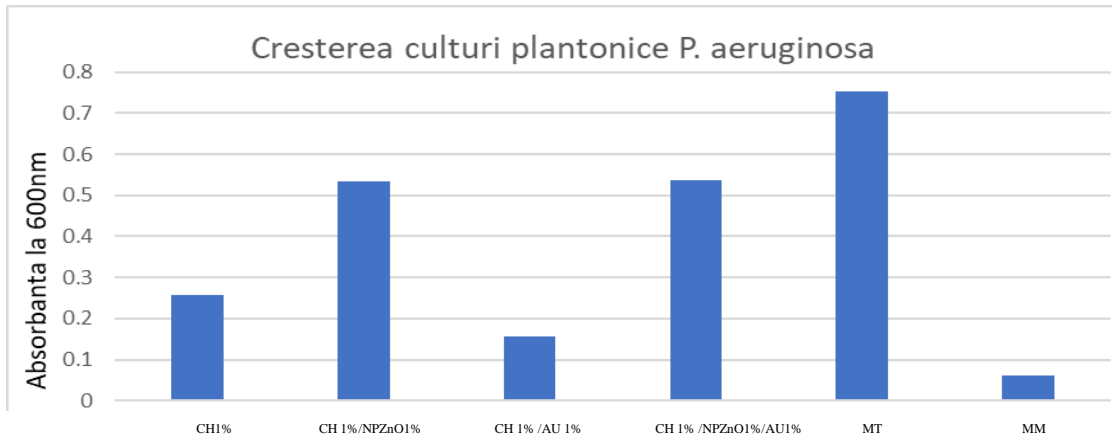
În cazul probelor pe bază de chitosan și nanoparticule de Ag comportamentul antimicrobian este complex. Cu excepția tulpinii *S Aureus* și parțial în cazul *P Aeruginosa*, când probele dezvoltate manifestă activitate antimicrobiană îmbunătățită, în cazul sistemului chitosan-AU activitatea fiind maximă, în cazul *C albicans* activitatea antimicrobiană este mult sub activitatea antimicrobiană a chitosanului. Dat fiind faptul ca



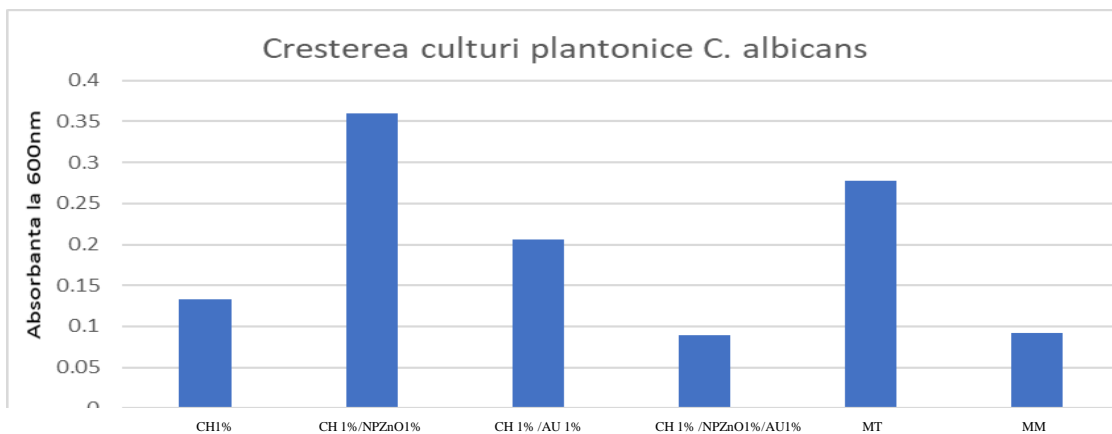
tulpinile de *C albicans* sunt benefice organismului, acest rezultat poate fi considerat un beneficiu ce va trebui valorificat în viitor.



**Figura 15. Metoda cantitativă de testare a culturi plantonice pentru S. Aureus**



**Figura 16. Metoda cantitativă de testare a culturi plantonice pentru P.aeruginosa**



**Figura 17. Metoda cantitativă de testare a culturi plantonice pentru C. Albicans**

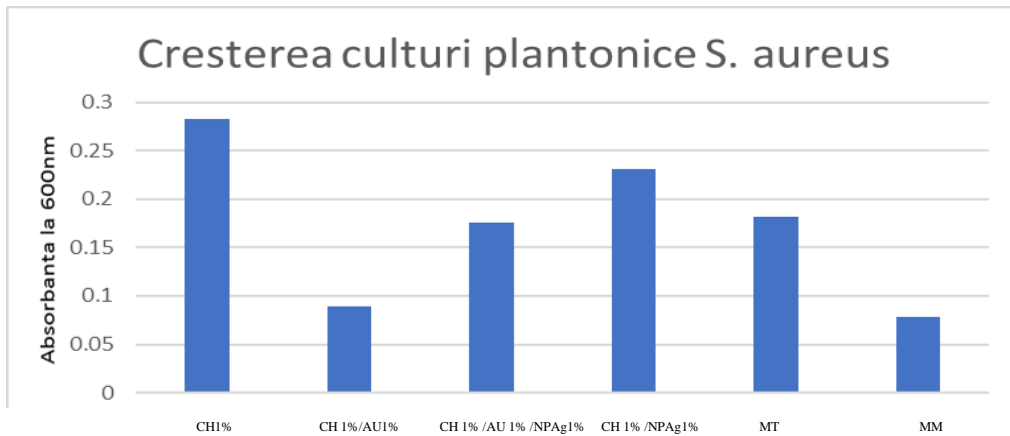


Figura 18. Metoda cantitativă de testare a culturi plantonice pentru S. Aureus

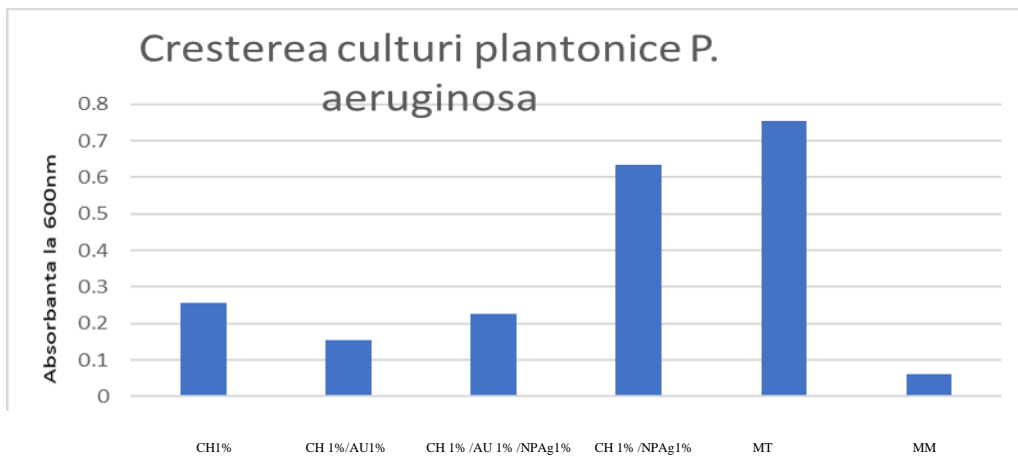


Figura 19. Metoda cantitativă de testare a culturi plantonice pentru P. Aeruginosa

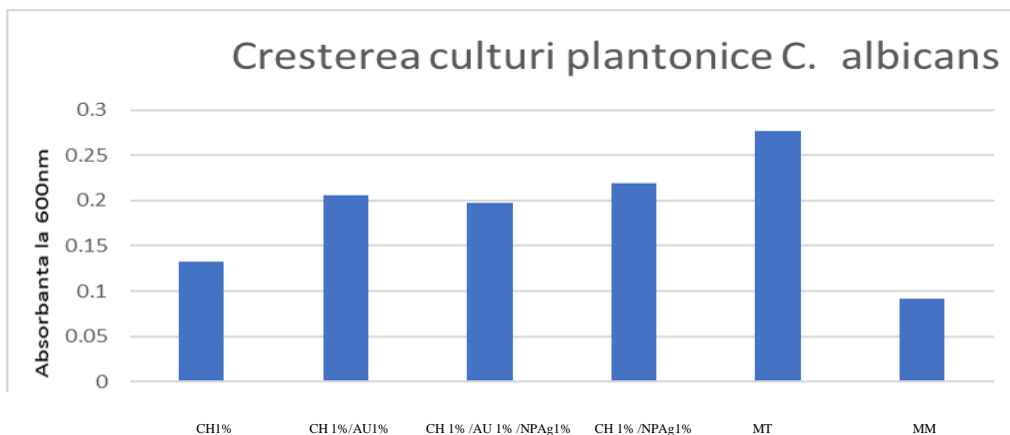
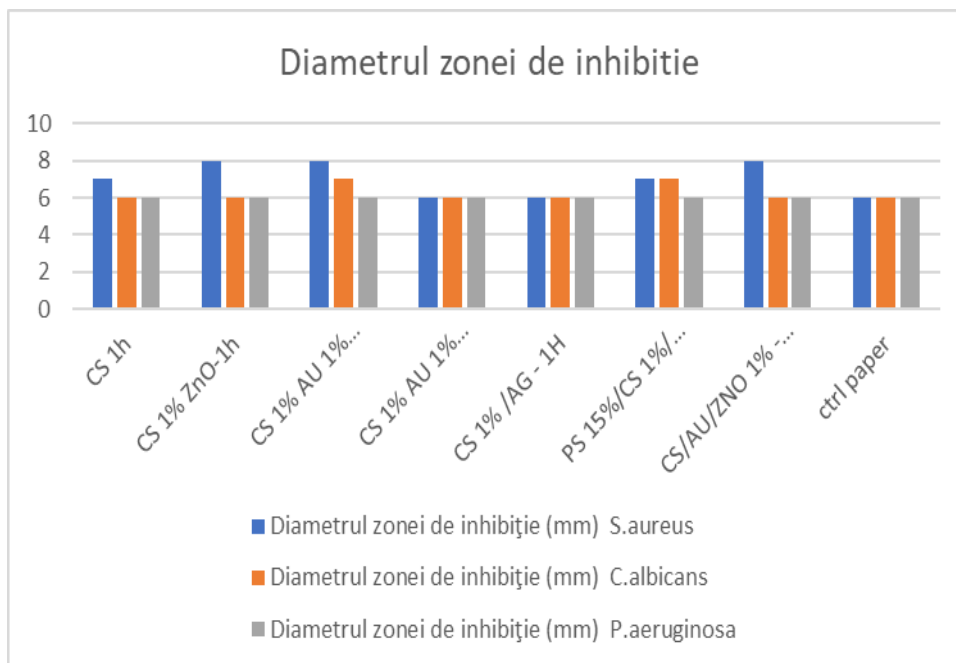


Figura 20. Metoda cantitativă de testare a culturi plantonice pentru C. albicans

### **Metoda disc-difuzimetrica adaptata**

Metoda a permis evaluarea diametrului de inhibiție în jurul discurilor realizate din filme pe bază de chitosan. În acest caz, se poate observa că activitatea antimicrobiană cea mai bună revine probelor CH1%/AU1% (activ atât pe bacterii gram pozitive cât și gram negative dar care nu afectează considerabil activitatea *C. albicans*).



**Figura 21. Evaluarea diametrului de inhibiție a filmelor obținute prin electrospinning, pe cele trei tulpini considerate**

### **Evaluarea formării de Biofilme**

Evaluarea microbiologică a biofilmelor formate este esențial datorită faptului că comportamentul celulelor asociate în biofilm sunt net diferite de cel al celulelor planctonice. În acest caz se observă că pe tulpina *S. Aureus* toate probele conținând acid usnic manifestă o activitate antimicrobiană net îmbunătățită comparativ cu chitosanul pur și, tendința este ca după 24h, viabilitatea tulpinilor să scadă. În cazul *P. aeruginosa* se observă o activitate antimicrobiană extrem de bună cazul chitosanului pur însă în cazul celorlalte sisteme activitatea antimicrobiană asupra biofilmului este scăzută. În cazul tulpinii de *C. albicans*, activitatea antimicrobiană este mică ceea ce denotă faptul că aceste sisteme nu sunt foarte toxice pentru tulpina bacteriană benefică organismului uman.

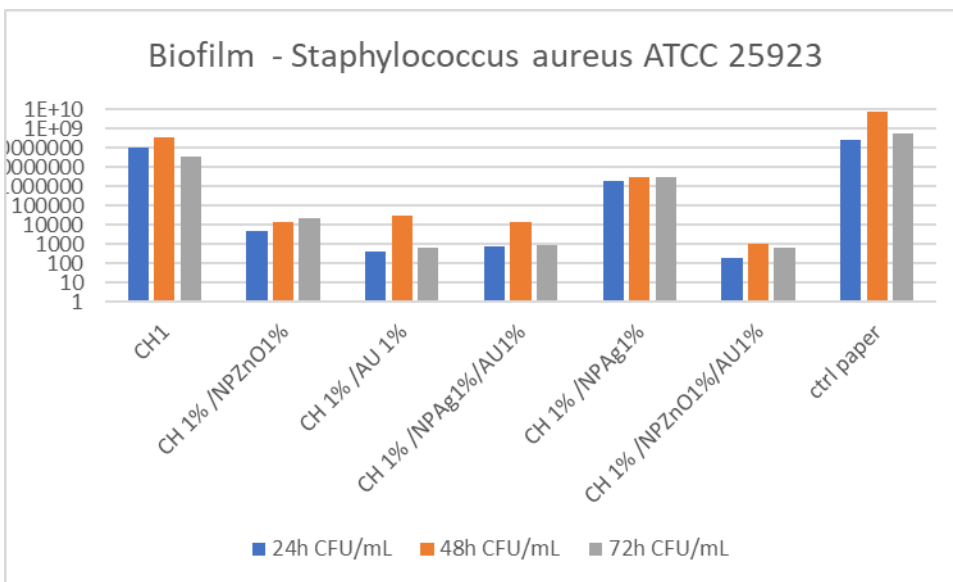


Figura 22. Metoda cantitativă de testare a activității antibiofilm asupra *S. Aureus*

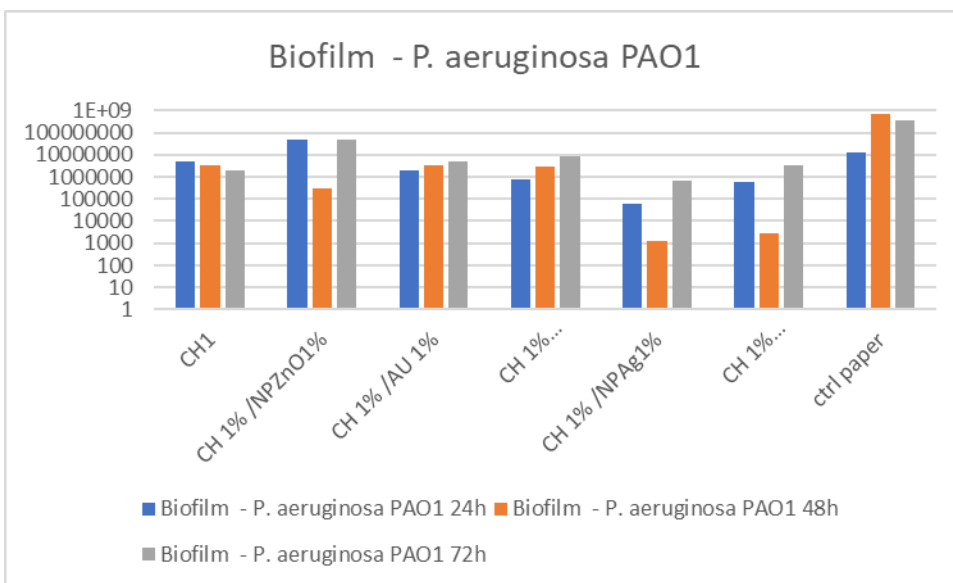


Figura 23. Metoda cantitativă de testare a activității antibiofilm asupra *P. aeruginosa*

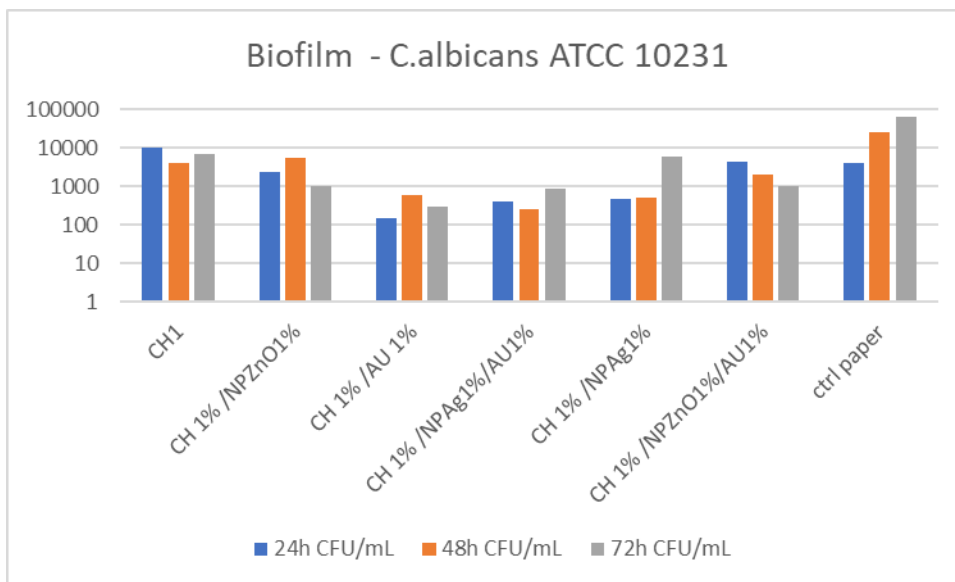


Figura 24. Metoda cantitativă de testare a activității antibiofilm asupra *C. albicans*

## CONCLUZII

Scopul acestui studiu l-a reprezentat sintetiza, caracterizarea și testarea din punct de vedere a activității antimicrobiene și antifungice a unor hidrogeluri pe baza de chitosan ce conțin nanoparticule anorganice metalice și oxidice Ag și ZnO dar și compuși naturali precum Acid Usnic prin metoda electrofilării în scopul utilizării acestor în procesele regenerative și chiar anti-infecțioase aferente arsurilor și altor afecțiuni ale pielii.

Cele mai importante avantaje ale tehnicii de electrofilare sunt reprezentate de posibilitatea obținerii unor fibre foarte subțiri cu suprafață specifică mare cât și de posibilitatea de funcționalizare a acestor fibre în funcție de aplicația dorită. Aceste avantaje fac posibilă utilizarea electrospinningului pentru un domeniu larg de aplicații în domeniul biomedical, aplicații precum: inginerie tisulară, eliberare controlată, în domeniul implantologiei, vindecarea rănilor, și nu numai.

În cadrul acestui studiu s-au obținut o serie de materiale compozite pe baza de CH/ agenți antimicrobieni prin metoda electrificării. Ca agenți antimicrobienu au fost aleși și testați NPZnO, NPAg și acid usnic care conform datelor de literatură prezintă proprietăți antimicrobiene foarte bune atât pe bacterii cât și pe fungi. Deși mecanismul de

actiune al activitatii antimicrobiene a acestor agenti nu este pe deplin cunoscut, totusi de-a lungul timpului numeroase studii au incercat sa elucideze aceasta problema.

Sisteme polimerice de chitosan cu un conținut scăzut de NPZnO, NPAg sau /și acid usnic pot fi folosite ca membrane biologice cu activitate antimicrobiană.

In cadrul studiului au fost obținute 6 tipuri de materiale compozite de tip CH1%, CH1%/NPZnO1%, CH1%/NPZnO1%/AU, CH1%/AU1%, CH1%/NPAg1%, CH1%/NPAg1%/AU1%. In urma caracterizării fizico-chimice s-a putut observa ca utilizarea diversilor agenți antimicrobieni influențează morfologia materialelor compozite. Activitatea antimicrobiană a acestor structuri este promițătoare, filmele obținute fiind protective în raport cu bacteriile benefice de tipul *C. Albicans* însă active asupra *S. Aureus* și *P. Aeruginosa*, atât în regim planctonic cât și în biofilm.

#### **Diseminare:**

##### **- 2 articole in curs de publicare**

- Denisa Ficai, Ioana Lavinia Ardelean, Alina Holban, Lia Mara Ditu, Gudovan Dragos, Maria Sonmez, Trusca Roxana, Anton Ficai, Ecaterina Andronescu Manufacturing nanostructured chitosan based 2D sheets with prolonged antimicrobial activity, Romanian Journal of Morphology and Embriology, Vol 58, Nr4/2017
- Y. Moukbil, O Gunduz, D Ficai, IL Ardelean, A Ficai, M Sonmez, E Andronescu; Hydrogel-based materials for medical applications; articol in definitivare pentru transmitere la Biofabrication

##### **- Participare la 1 conferință internațională**

- Ioana Ardelean, Denisa Ficai, Alina Holban, Carmen Mariana Chifiriuc, Bogdan Vasile Anton Ficai, Roxana Trusca, Ecaterina Andronescu; Preparation, characterization and antimicrobial activities of polysulfone/chitosan/usnic acid/ZnO composite by electrospinning method, Romanian International Conference on Chemistry and Chemical Engineering, Poiana Brașov, 6-9 Septembrie, 2017.

#### **Bibliografie**

- [1] Gonzalez-Henriquez CM, Sarabia-Vallejos MA, Rodriguez-Hernandez J. Advances in the Fabrication of Antimicrobial Hydrogels for Biomedical Applications. Materials. 2017;10.
- [2] Biondi M, Ungaro F, Quaglia F, Netti PA. Controlled drug delivery in tissue engineering. Advanced Drug Delivery Reviews. 2008;60:229-42.
- [3] Vashist A, Vashist A, Gupta YK, Ahmad S. Recent advances in hydrogel based drug delivery systems for the human body. J Mater Chem B. 2014;2:147-66.

- [4] Biondi M, Indolfi L, Ungaro F, Quaglia F, La Rotonda MI, Netti PA. Bioactivated collagen-based scaffolds embedding protein-releasing biodegradable microspheres: tuning of protein release kinetics. *J Mater Sci-Mater M*. 2009;20:2117-28.
- [5] Mollica F, Biondi M, Muzzi S, Ungaro F, Quaglia F, La Rotonda MI, et al. Mathematical modelling of the evolution of protein distribution within single PLGA microspheres: prediction of local concentration profiles and release kinetics. *J Mater Sci-Mater M*. 2008;19:1587-93.
- [6] Ungaro F, Biondi M, d'Angelo I, Indolfi L, Quaglia F, Netti PA, et al. Microsphere-integrated collagen scaffolds for tissue engineering: Effect of microsphere formulation and scaffold properties on protein release kinetics. *J Control Release*. 2006;113:128-36.
- [7] Mayol L, Biondi M, Russo L, Malle BM, Schwach-Abdellaoui K, Borzacchiello A. Amphiphilic hyaluronic acid derivatives toward the design of micelles for the sustained delivery of hydrophobic drugs. *Carbohydr Polym*. 2014;102:110-6.
- [8] Mayol L, Biondi M, Quaglia F, Fusco S, Borzacchiello A, Ambrosio L, et al. Injectable Thermally Responsive Mucoadhesive Gel for Sustained Protein Delivery. *Biomacromolecules*. 2011;12:28-33.
- [9] Mayo L, Quaglia F, Borzacchiello A, Ambrosio L, La Rotonda MI. A novel poloxamers/hyaluronic acid in situ forming hydrogel for drug delivery: Rheological, mucoadhesive and in vitro release properties. *Eur J Pharm Biopharm*. 2008;70:199-206.
- [10] Borzacchiello A, Mayol L, Ramires PA, Pastorello A, Di Bartolo C, Ambrosio L, et al. Structural and rheological characterization of hyaluronic acid-based scaffolds for adipose tissue engineering. *Biomaterials*. 2007;28:4399-408.
- [11] Guarnieri D, Battista S, Borzacchiello A, Mayol L, De Rosa E, Keene DR, et al. Effects of fibronectin and laminin on structural, mechanical and transport properties of 3D collageneous network. *J Mater Sci-Mater M*. 2007;18:245-53.
- [12] Maltese A, Borzacchiello A, Mayol L, Bucolo C, Maugeri F, Nicolais L, et al. Novel polysaccharides-based viscoelastic formulations for ophthalmic surgery: Rheological characterization. *Biomaterials*. 2006;27:5134-42.
- [13] Fisher OZ, Khademhosseini A, Langer R, Peppas NA. Bioinspired Materials for Controlling Stem Cell Fate. *Accounts Chem Res*. 2010;43:419-28.
- [14] Slaughter BV, Khurshid SS, Fisher OZ, Khademhosseini A, Peppas NA. Hydrogels in Regenerative Medicine. *Adv Mater*. 2009;21:3307-29.
- [15] Kloxin AM, Kloxin CJ, Bowman CN, Anseth KS. Mechanical Properties of Cellularly Responsive Hydrogels and Their Experimental Determination. *Adv Mater*. 2010;22:3484-94.
- [16] Borzacchiello A, Mayol L, Garskog O, Dahlqvist A, Ambrosio L. Evaluation of injection augmentation treatment of hyaluronic acid based materials on rabbit vocal folds viscoelasticity. *J Mater Sci-Mater M*. 2005;16:553-7.
- [17] Borzacchiello A, Mayol L, Schiavinato A, Ambrosio L. Effect of hyaluronic acid amide derivative on equine synovial fluid viscoelasticity. *J Biomed Mater Res A*. 2010;92A:1162-70.
- [18] Biondi M, Borzacchiello A, Mayol L, Ambrosio L. Nanoparticle-Integrated Hydrogels as Multifunctional Composite Materials for Biomedical Applications. *Gels*. 2015; 1 162-78.

- [19] Chang CH, Lin YH, Yeh CL, Chen YC, Chiou SF, Hsu YM, et al. Nanoparticles Incorporated in pH-Sensitive Hydrogels as Amoxicillin Delivery for Eradication of *Helicobacter pylori*. *Biomacromolecules*. 2010;11:133-42.
- [20] Gupta P, Vermani K, Garg S. Hydrogels: from controlled release to pH-responsive drug delivery. *Drug Discov Today*. 2002;7:569-79.
- [21] Chen BK, Lo SH, Lee SF. Temperature Responsive Methacrylamide Polymers with Antibacterial Activity. *Chinese J Polym Sci*. 2010;28:607-13.
- [22] Cao B, Tang Q, Li LL, Humble J, Wu HY, Liu LY, et al. Switchable Antimicrobial and Antifouling Hydrogels with Enhanced Mechanical Properties. *Adv Healthc Mater*. 2013;2:1096-102.
- [23] Dizman B, Elasri MO, Mathias LJ. Synthesis and characterization of antibacterial and temperature responsive methacrylamide polymers. *Macromolecules*. 2006;39:5738-46.
- [24] Ji QX, Chen XG, Zhao QS, Liu CS, Cheng XJ, Wang LC. Injectable thermosensitive hydrogel based on chitosan and quaternized chitosan and the biomedical properties. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine*. 2009;20:1603-10.
- [25] !!! INVALID CITATION !!!
- [26] Fallows SJ, Garland MJ, Cassidy CM, Tunney MM, Singh TRR, Donnelly RF. Electrically-responsive anti-adherent hydrogels for photodynamic antimicrobial chemotherapy. *J Photoch Photobio B*. 2012;114:61-72.
- [27] Malmsten M. Antimicrobial and antiviral hydrogels. *Soft Matter*. 2011;7:8725-36.
- [28] Censi R, Di Martino P, Vermonden T, Hennink WE. Hydrogels for protein delivery in tissue engineering. *J Control Release*. 2012;161:680-92.
- [29] Rinaudo M. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Prog Polym Sci*. 2006;31:603-32.
- [30] Acosta N, Jimenez C, Borau V, Heras A. Extraction and Characterization of Chitin from Crustaceans. *Biomass Bioenerg*. 1993;5:145-53.
- [31] Madhally SV, Matthew HWT. Porous chitosan scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials*. 1999;20:1133-42.
- [32] Jayakumar R, Menon D, Manzoor K, Nair SV, Tamura H. Biomedical applications of chitin and chitosan based nanomaterials-A short review. *Carbohydr Polym*. 2010;82:227-32.
- [33] Venkatesan J, Kim SK. Chitosan Composites for Bone Tissue Engineering-An Overview. *Marine Drugs*. 2010;8:2252-66.
- [34] Croisier F, Jerome C. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. *Eur Polym J*. 2013;49:780-92.
- [35] Shelton RM. Aloe Vera - Its Chemical and Therapeutic Properties. *Int J Dermatol*. 1991;30:679-83.
- [36] Abdelhady AA. Preparation and characterization of chitosan oxide nanoparticles for imparting antimicrobial and UV protection to cotton fabric; . *International journal of carbohydrate chemistry*, . 2012;243:1-7.
- [37] Dai TH, Tanaka M, Huang YY, Hamblin MR. Chitosan preparations for wounds and burns: antimicrobial and wound-healing effects (vol 9, pg 857, 2011). *Expert Rev Anti-Infe*. 2013;11:866-.



- [38] Rabea EI, Badawy MET, Stevens CV, Smaghe G, Steurbaut W. Chitosan as antimicrobial agent: Applications and mode of action. *Biomacromolecules*. 2003;4:1457-65.
- [39] Helander IM, Nurmiäho-Lassila EL, Ahvenainen R, Rhoades J, Roller S. Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram-negative bacteria. *Int J Food Microbiol*. 2001;71:235-44.
- [40] Kong M, Chen XG, Xing K, Park HJ. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. *Int J Food Microbiol*. 2010;144:51-63.
- [41] Li P, Poon YF, Li WF, Zhu HY, Yeap SH, Cao Y, et al. A polycationic antimicrobial and biocompatible hydrogel with microbe membrane suctioning ability. *Nat Mater*. 2011;10:149-56.
- [42] Raafat D, von Bargaen K, Haas A, Sahl HG. Insights into the Mode of Action of Chitosan as an Antibacterial Compound (vol 74, pg 3764, 2008). *Appl Environ Microb*. 2008;74:7455-.
- [43] Millner RWJ, Lockhart AS, Bird H, Alexiou C. A New Hemostatic Agent: Initial Life-Saving Experience With Celox (Chitosan) in Cardiothoracic Surgery. *Ann Thorac Surg*. 2009;87:E13-E4.
- [44] Liao SY, Read DC, Pugh WJ, Furr JR, Russell AD. Interaction of silver nitrate with readily identifiable groups: relationship to the antibacterial action of silver ions. *Lett Appl Microbiol*. 1997;25:279-83.
- [45] Kumar R, Munstedt H. Silver ion release from antimicrobial polyamide/silver composites. *Biomaterials*. 2005;26:2081-8.
- [46] Hernandez-Sierra JF, Ruiz F, Pena DCC, Martinez-Gutierrez F, Martinez AE, Guillen ADP, et al. The antimicrobial sensitivity of *Streptococcus mutans* to nanoparticles of silver, zinc oxide, and gold. *Nanomed-Nanotechnol*. 2008;4:237-40.
- [47] Cui Y, Zhao YY, Tian Y, Zhang W, Lu XY, Jiang XY. The molecular mechanism of action of bactericidal gold nanoparticles on *Escherichia coli*. *Biomaterials*. 2012;33:2327-33.
- [48] Veiga AS, Schneider JP. Antimicrobial Hydrogels for the Treatment of Infection. *Biopolymers*. 2013;100:637-44.
- [49] Yu HJ, Xu XY, Chen XS, Lu TC, Zhang PB, Jing XB. Preparation and antibacterial effects of PVA-PVP hydrogels containing silver nanoparticles. *J Appl Polym Sci*. 2007;103:125-33.
- [50] Zan XJ, Kozlov M, McCarthy TJ, Su ZH. Covalently Attached, Silver-Doped Poly(vinyl alcohol) Hydrogel Films on Poly(L-lactic acid). *Biomacromolecules*. 2010;11:1082-8.
- [51] Thomas V, Yallapu MM, Sreedhar B, Bajpai SK. A versatile strategy to fabricate hydrogel-silver nanocomposites and investigation of their antimicrobial activity. *J Colloid Interf Sci*. 2007;315:389-95.
- [52] Rattanaruengsrikul V, Pimpha N, Supaphol P. Development of Gelatin Hydrogel Pads as Antibacterial Wound Dressings. *Macromol Biosci*. 2009;9:1004-15.
- [53] Singh R, Singh D. Radiation synthesis of PVP/alginate hydrogel containing nanosilver as wound dressing. *J Mater Sci-Mater M*. 2012;23:2649-58.
- [54] Travan A, Pelillo C, Donati I, Marsich E, Benincasa M, Scarpa T, et al. Non-cytotoxic Silver Nanoparticle-Polysaccharide Nanocomposites with Antimicrobial Activity. *Biomacromolecules*. 2009;10:1429-35.

- [55] Fullenkamp DE, Rivera JG, Gong YK, Lau KHA, He LH, Varshney R, et al. Mussel-inspired silver-releasing antibacterial hydrogels. *Biomaterials*. 2012;33:3783-91.
- [56] Henríquez CMG, Guerra GDCP, Vallejos MAS, de la Fuente SDR, Flores MTU, Jimenez LMR. In situ silver nanoparticle formation embedded into a photopolymerized hydrogel with biocide properties. *J Nanostruct Chem* 2014; 4, :119–32.
- [57] González-Henríquez CM, Pizarro GDC, Sarabia-Vallejos MA, Terraza CA, Lopez-Cabana ZE. In situ-preparation and characterization of silver-hema/pegda hydrogel matrix nanocomposites: Silver inclusion studies into hydrogel matrix. *Arabian J Chem*. 2014;in press.
- [58] Agnihotri S, Mukherji S, Mukherji S. Antimicrobial chitosan–pva hydrogel as a nanoreactor and immobilizing matrix for silver nanoparticles. *Appl Nanosci* 2012;2, :179–88.
- [59] Dutta S, Shome A, Kar T, Das PK. Counterion-Induced Modulation in the Antimicrobial Activity and Biocompatibility of Amphiphilic Hydrogelators: Influence of in-Situ-Synthesized Ag-Nanoparticle on the Bactericidal Property. *Langmuir*. 2011;27:5000-8.
- [60] Akmaz S, Adiguzel ED, Yasar M, Erguven O. The Effect of Ag Content of the Chitosan-Silver Nanoparticle Composite Material on the Structure and Antibacterial Activity. *Adv Mater Sci Eng*. 2013.
- [61] Dror-Ehre A, Mamane H, Belenkova T, Markovich G, Adin A. Silver nanoparticle-E. coli colloidal interaction in water and effect on E-coli survival. *J Colloid Interf Sci*. 2009;339:521-6.
- [62] Chen P, Song LY, Liu YK, Fang YE. Synthesis of silver nanoparticles by gamma-ray irradiation in acetic water solution containing chitosan. *Radiat Phys Chem*. 2007;76:1165-8.
- [63] Kim JS, Kuk E, Yu KN, Kim JH, Park SJ, Lee HJ, et al. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomed-Nanotechnol*. 2007;3:95-101.
- [64] Cao XL, Cheng C, Ma YL, Zhao CS. Preparation of silver nanoparticles with antimicrobial activities and the researches of their biocompatibilities. *J Mater Sci-Mater M*. 2010;21:2861-8.
- [65] Jung WK, Koo HC, Kim KW, Shin S, Kim SH, Park YH. Antibacterial activity and mechanism of action of the silver ion in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Appl Environ Microb*. 2008;74:2171-8.
- [66] Lu PJ, Huang SC, Chen YP, Chiueh LC, Shih DYC. Analysis of titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles in cosmetics. *J Food Drug Anal*. 2015;23:587-94.
- [67] Mirzaei H, Darroudi M. Zinc oxide nanoparticles: Biological synthesis and biomedical applications. *Ceram Int*. 2017;43:907-14.
- [68] Reddy KM, Feris K, Bell J, Wingett DG, Hanley C, Punnoose A. Selective toxicity of zinc oxide nanoparticles to prokaryotic and eukaryotic systems. *Appl Phys Lett*. 2007;90.
- [69] Padmavathy N, Vijayaraghavan R. Enhanced bioactivity of ZnO nanoparticles-an antimicrobial study. *Sci Technol Adv Mat*. 2008;9.

- [70] Negrea P, Caunii A, Sarac I, Butnariu M. The Study of Infrared Spectrum of Chitin and Chitosan Extract as Potential Sources of Biomass. *Dig J Nanomater Bios.* 2015;10:1129-38.
- [71] Abbasipour M, Mirjalili M, Khajavi R, Majidi MM. Coated Cotton Gauze with Ag/ZnO/chitosan Nanocomposite as a Modern Wound Dressing. *J Eng Fiber Fabr.* 2014;9:124-30.
- [72] Olaniyan OJ, Dare EO, Adetunji OR, Adedeji OO, Ogungbesan SO. Synthesis and Characterization of Chitosan-Silver Nanocomposite Film. *Nano Hybrids Compos.* 2016;11:22-9.
- [73] Velmurugan N, Kumar GG, Han SS, Nahm KS, Lee YS. Synthesis and Characterization of Potential Fungicidal Silver Nano-sized Particles and Chitosan Membrane Containing Silver Particles. *Iran Polym J.* 2009;18:383-92.
- [74] Rahmana PM, MujeebaK. VMA, MuraleedharanaSteni, K.Thomasb. Chitosan/nano ZnO composite films: Enhanced mechanical, antimicrobial and dielectric properties. *Arabian Journal of Chemistry.* 2016.