



Academia Oamenilor de Știință
din România

PROIECT 4. HIDROGELURI COMPOZITE CU NANOPARTICULE ANTIMICROBIENE

*Sisteme hibride pe bază de colagen/silice mezoporoasă/curcumină cu
proprietăți antibacteriene*

Cercetător Științific III,

Dr. Ing. Maria SÖNMEZ

2017

Cuprins

1. INTRODUCERE - OBIECTIVELE ȘTIINȚIFICE ALE ACTIVITĂȚII DE CERCETARE ...	3
2. STADIUL ACTUAL AL CERCETĂRILOR SIMILARE.....	5
3. REZULTATE ȘTIINȚIFICE OBTINUTE IN ACTIVITATEA DE CERCETARE	9
3.1. Sinteza silicei mezoporoase de tip MCM-41 si MCM-48	9
3.2. Incapsularea curcuminei in porii pulberilor de silice mezoporoasa de tip MCM-41 si MCM-48	9
3.3. Obținerea sistemelor complexe pe baza de colagen/curcumina si/sau silice	9
mezoporoasa	Error! Bookmark not defined.
3.4. Teste cinetice in vitro privind capacitatea de eliberare a curcuminei din pulberi mezoporoase si/sau materiale compozite	10
REZULTATE SI DISCUTII.....	10
3.5. Caracterizarea pulberilor de silice mezoporoasa dopate cu curcumina si ale sistemelor complexe	10
<i>Spectrele FTIR ale pulberilor de silice dopate cu procente variate de curcumina</i>	<i>10</i>
<i>Microscopia SEM inregistrata pe pulberile de tip MCM-41 si MCM-48 simple si dopate cu curcumina</i>	<i>12</i>
<i>Teste de eliberare controlata a curcuminei din silicea de tip MCM-41 si MCM-48</i>	<i>15</i>
<i>Difractia de raze X inregistrata pe pulberile de silice mezoporoasa simple si dopate cu curcumina</i>	<i>16</i>
<i>Teste privind activitatea antibacteriana a pulberilor dopate cu curcumina</i>	<i>17</i>
3.6. Caracterizarea sistemelor complexe pe baza de colagen/curcumina si colagen/silice mezoporoasa/curcumina.....	18
<i>Spectre FTIR inregistrate pe sistemele complexe</i>	<i>19</i>
<i>Imagini SEM inregistrate pe sistemele complexe</i>	<i>21</i>
<i>Teste de eliberare a curcuminei din sistemele complexe</i>	<i>22</i>
<i>Teste privind activitatea antibacteriana a sistemelor complexe</i>	<i>23</i>
Concluzii	24
Bibliografie	25

1. INTRODUCERE - OBIECTIVELE STIINTIFICE ALE ACTIVITĂȚII DE CERCETARE

Unul dintre obiectivele derivate ale proiectului „*Hidrogeluri compozite cu nanoparticule antimicrobiane*”, consta in obtinerea si testarea unor materiale compozite pe baza de colagen/pulberi mezoporoase de tip MCM41 sau MCM48 incarcate cu procente variate de curcumina in vederea realizarii de pansamente cu proprietati antibacteriene, destinate tratarii diverselor rani cronice, aparute la nivelul pielii (edeme, ulceratii, cancer de piele, etc.).

Necesitatea dezvoltarii unor hidrogeluri compozite cu proprietati antibacteriene, a aparut, datorita numarului ridicat de boli infectioase cauzate de microorganisme patogene cum ar fi, bacterii, fungi, virusuri etc., care reprezinta o amenintare majora la nivelul sanatatii publice. Potrivit unui raport al **ORGANIZATIEI MONDIALE A SANATATII (OMS)**, bolile infectioase sunt a doua cauza a mortalitatii, la nivel mondial. Supra-prescrierea si utilizarea abuziva a antibioticelor conventionale, au condus la dezvoltarea rezistentei agentilor patogeni, si implicit la pierderea activitatii acestora. In vederea inlaturarii acestor probleme, este necesara fie dezvoltarea unor noi tipuri de antibiotice fie obtinerea unor noi clase de materiale cu proprietati antibacteriene. Cateva clase de materiale unice au fost dezvoltate, in vederea utilizarii lor ca inlocuitori ai antibioticelor conventionale, precum, peptide antimicrobiene, polimeri cationici sintetici/naturali, nanoparticule antimicrobiene, etc. In timp ce, antibioticele conventionale au rolul de a actiona asupra tintelor moleculare specifice, cum ar fi inhibarea sintezei proteinelor, polimerii cationici naturali/sintetici sau peptidele antimicrobiene au avantajul ca, actioneaza asupra intregii membrane celulare prin intermediul interactiilor electrostatice urmata de insertia componentelor lor hidrofobe in domeniile lipidice ale membranei celulare, pentru a genera pori, conducand in acest mod la ruperea membranei celulare, pierderea continutului citoplasmatic si la moartea celulelor. Din acest punct de vedere, pentru evitarea utilizarii antibioticelor deoarece (bacteriile dezvolt rezistenta de cele mai multe ori), a polimerilor sintetici (au un anumit grad de toxicitate, in principal datorita rutelor de obtinere) si a nanoparticulelor generice cu proprietati antimicrobiene (Ag, Au etc. care au un grad de toxicitate ridicat peste anumite concentratii) in cadrul proiectului au fost dezvoltate hidrogeluri compozite cu proprietati antimicrobiene utilizand polimeri naturali (gel de colagen) si compusi naturali (curcumina sau diferuloilmetanul). Utilizarea unor astfel de hidrogeluri compozite cu activitate antimicrobiana prelungita, vor fi destinate prevenirii infectiilor cu diverse bacterii precum si la vindecarea diferitelor rani aparute la nivelul pielii si in special in cazul rezectiei unei portiuni de tesut – cancer de piele precum si in cazul unor rani aparute la persoanele ce sufera de diabet zaharat (edeme, ulceratii, etc.). O importanta deosebita trebuie acordata unor astfel de rani, deoarece procesul de vindecare este extrem de lent iar riscul de infectie este foarte ridicat, deoarece tesutul necrozat favorizeaza aderența bacteriana. Prin utilizarea curcuminei (diferuloilmetanul), care este un compus natural polifenolic, pe langa proprietatile lui antibacteriene excelente se va profita si de numeroase alte activitati biologice precum, activitățile antiseptice, antioxidante, anti-inflamatoare, analgezice. Acest tip de compus actioneaza de asemenea ca un antibiotic local, prevenind in acest mod infectia si septicemia in rani.

In vederea, atingeri obiectivului principal al cercetarii, in cadrul proiectului au fost realizate urmatoarele activitati specifice si anume:

OS 1. Realizare pulberi pe baza de materiale mezoporoase cu proprietati antibacteriene .

- 1) Sinteza si caracterizarea silicei mezoporoase de tip MCM 41 si MCM 48;
- 2) Adsorbția agentului antimicrobian reprezentat de curcumina in procente diferite, in porii silicei de tip MCM 41 sau MCM 48 utilizand metoda adsorbției sub vid, urmata de caracterizare morfo-structurala;
- 3) Evaluarea capacitati de eliberare a curcuminei din porii silicei mezoporoase;
- 4) Testarea activitatii antibacteriene a pulberilor ce contin procente variate de curcumina.

OS2. Obținerea sistemelor complexe cu proprietati antibacteriene

- 5) Realizarea sistemelor complexe pe baza de colagen/silice mezoporoasa dopata cu procente variate de curcumina;
- 6) Caracterizarea morfo-structurala a compozitelor obtinute;
- 7) Testarea capacitati de eliberare a curcuminei din compozitele dezvoltate prin imersare in solutie de buffer de fosfat;
- 8) Efectuarea testelor privind activitatea antibacteriana a acestor variante de compozite asupra diverselor tipuri de bacterii *S. aureus*, *P.aeruginosa* si *C.albicans*.

Un avantaj major al incapsularii acestui compus natural in gelul de colagen, consta in faptul ca in acest fel se va profita atat de proprietatile exceptionale regeneratoare a gelului de colagen precum si de proprietatile farmaceutice ale curcuminei.

2. STADIUL ACTUAL AL CERCETĂRILOR SIMILARE

Ranile cronice sunt considerate afecțiuni ale pielii, care sunt cele mai dificile de tratat și afectează mai mult de 7 milioane de persoane în SUA, iar costurile totale necesare pentru tratament depășesc 8 miliarde de euro/an [1]. Vindecarea ranilor este un proces de restabilire a funcțiilor normale ale structurii tesuturilor deteriorate și cuprinde numeroase procese celulare și biochimice, având ca rezultat final reconstrucția și regenerarea tesutului deteriorat [2]. Vindecarea ranilor este un proces complex și implică mai multe faze, inflamare (datorită eliberării leucotrienelor, prostaglandinelor și a radicalilor liberi), acumulare de lichide, proliferarea celulară – cu depunerea de colagen, epitelizarea și angiogeneza reglementată de factori de creștere, remodelarea tesuturilor cu proliferarea fibroblastelor și sinteza/acumularea fibrelor de colagen [3-5]. Ranile cronice cele mai comune, includ dar nu se limitează doar la ulcerul piciorului diabetic, ulcerul piciorului de stază venoasă și cel de presiune [4, 6]. Trăsăturile comune ale acestor tipuri de rani cronice includ, inflamația prelungită sau excesivă, formarea biofilmelor microbiene rezistente la medicamente respectiv incapacitatea celulelor dermice/epidermice, de a răspunde la stimulii reparativi [7]. Aceste tipuri de rani, reprezintă o provocare pentru profesioniști din domeniul îngrijirii ranilor și consumă cea mai mare parte a resurselor medicale, din întreaga lume. Prevalența de a dezvolta ulcer de picior, este cu 25% mai mare în cazul persoanelor ce suferă de diabet zaharat, fiind de altfel și principala cauză a amputărilor membrilor și a deceselor apărute [8]. Ulcerul de picior apare în principal ca o cauză a patologiilor multiple, neuropatie (deteriorarea nervilor datorită nivelului ridicat de glucoză din sânge) și angiopatie sau ischemie care conduc la infecții [9, 10]. Infecțarea ranilor și formarea biofilmului sunt provocate cel mai frecvent de bacterii gram-pozitive cum ar fi, *Streptococul β-hemolitic* și *Stafilococul auriu*, aceștia fiind cei mai obișnuiți agenți patogeni ai infecției acute a piciorului diabeticilor, în timp ce, bacteriile anaerobe sunt de obicei o parte a infecțiilor mixte la pacienții cu gangrena piciorului sau ischemia [11, 12]. Tratamentele actuale se bazează în principal pe terapia cu presiune negativă sau pe pansamente pentru rani, în scopul prevenirii infectării, limitării durerii, reducerea disconfortului și a cicatricilor. Pentru a putea trata cu succes anumite rani, este necesară reducerea cantității de țesut necrozat, în vederea prevenirii invaziei microbiene [13]. Pansamentele moderne, sunt astfel concepute încât să asigure unele caracteristici funcționale precum, menținerea unui mediu umed a plăgi, aderența redusă, protecția împotriva traumelor, schimbări minime ale pansamentului, izolare termică, adsorbția sangelui și a exudatului în exces, protecția împotriva infecțiilor și a invaziei bacteriilor, permeabilitate și costuri reduse [14]. Pansamentele pentru rani comercializate în prezent sunt sub formă de filme, bureți, hidrocolizi și hidrogeluri [15]. Numeroase cercetări efectuate în prezent se bazează pe obținerea de pansamente, ce au capacitatea de a livra diverse medicamente - antibiotice/compuși terapeuți antibacterieni, cu rol activ în vindecarea ranilor și în prevenirea infecțiilor.

Din acest punct de vedere, o gamă largă de biomateriale polimerice (sintetice și naturale), au fost propuse și testate în scopul accelerării vindecării ranilor și pentru a controla, reduce și elimina infecția. Marea majoritate a acestor biomateriale polimerice, sunt capabile să imite unele dintre caracteristicile fizice și biologice ale tesuturilor native datorită, conținutului ridicat de apă, biocompatibilității și biodegradabilității. Polimeri naturali care au fost investigați pentru tratarea ranilor includ polizaharide (chitosan, chitină, dextran, alginat, condroitină, heparină) [16], proteoglicani și proteine (colagen, gelatină, fibrină, keratină) [17]. Dintre polimeri sintetici investigați pentru tratarea ranilor se numără: acidul poliglicolic, alcoolul polivinilic, acidul

polilactic, acidul poliacrilic, poli ϵ -caprolactona, poli etilenglicolul [18, 19]. Cu toate acestea, marea majoritate a acestor polimeri, nu prezinta bioactivitate si capacitate de a accelera procesul de vindecare si mai ales de prevenire a infectiei, si necesita adaosul de nanomateriale in retea lor. Nanomateriale utilizate au in principal 2 roluri: (1) Nanomateriale utilizate ca suport pentru eliberarea sustinuta si controlata a agentilor terapeutici si (2) Nanomateriale care prezinta proprietati intrinseci benefice pentru tratarea ranilor in scopul accelerarii procesului de vindecare precum si de a furniza caracteristici bioactive [20].

Dintre nanomateriale cu proprietati intrinseci benefice pentru tratarea ranilor, se numara in principal nanoparticulele de argint [21] si de aur [22], deoarece poseda activitati bactericide asupra unui spectru larg de bacterii si fungi. Nanoparticule de argint in special, sunt utilizate pe scara larga in diverse produse cum ar fi imbracaminte si pansamente pentru rani, datorita efectului lui antibacterian excelent. Cu toate acestea, o serie de lucrari, prezinta informatii privind eventualele efecte toxice a acestor nanoparticule, peste anumite concentratii [23] iar in ultima perioada exista un interes sporit in vederea inlocuirii lor, prin utilizarea unor compusi naturali din plante. Cu toate acestea, pentru a putea fi utilizat cu succes ca agent de vindecare a ranilor, un compus natural trebuie sa poata stimula proliferarea fibroblastelor, formarea colagenului si sa prezinta proprietati antimicrobiene, antioxidante si antiinflamatoare. Numeroase plante sau compusii lor detin niveluri ridicate de antioxidanti, si proprietati antiinflamatori si antimicrobiene si ar putea fi utilizate cu succes pentru vindecarea diverselor tipuri de rani. Din acest punct de vedere, numerosi cercetatori s-au axat pe studii privind utilizarea extractelor din plante in vederea obtinerii pansamentelor bioactive pentru tratarea diverselor tipuri de rani [24].

O astfel de planta foarte des folosita de peste 4000 de ani in Asia pentru curatarea ranilor si pentru vindecare, este reprezentata de turmeric [25]. Turmericul, in functie de originea si de solul in care este cultivat contine un grup de compusi, precum curcumina, demetoxicurcumina, bis-demetoxicurcumina respectiv curcumina ciclica, in procent de aproximativ 2-9%. Componenta majoritara din turmeric este reprezentata de curcumina iar cea minoritara este reprezentata de curcumina ciclica. In functie de mediul de extractie, curcumina prezinta forma bis keto in mediu acid si neutru [26].

Curcumina, a fost identificata ca fiind principalul compus terapeutic din turmeric cu o gama larga de proprietati farmaceutice benefice antioxidante [27, 28], antiinflamatori, antifungice, anti HIV, anti-virale, antimicrobiene, anticoagulante si impotriva cancerului [29, 30]. Curcumina sau diferuloil metanul (formula chimica: $C_{21}H_{20}O_6$; (1E,6E)-1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione) este un pigment de culoare galbena din *Curcuma Longa* (Zingiberaceae family), cunoscut sub denumirea de turmeric, fiind un produs natural promitator din punct de vedere biologic si chimic, capabil de a modula procesele de vindecare a ranilor [25, 31].

Din acest punct de vedere, *Gokhan Emiroglu si alti* [32] au studiat efectele benefice ale curcuminei pentru tratarea traumei mucoasei nazale, utilizand un numar de 32 de sobolani, impartiti in 4 grupuri si cu greutate cuprinsa intre 250-350g, adulti, masculi. Trauma mucoaselor nazale a fost provocata sub anestezie prin injectarea intraperitoneala de clorhidrat de ketamina si xylazina HCl in proportie de 50mg/kg respectiv 10mg/kg. Testele histopatologice, evidentiaza faptul ca comparativ cu grupul de control 1 (tinut fara nici un fel de tratament) si grupul 4 (tratat topic cu dimetilsulfoxid), grupul 2 si 3 (tratat topic cu 5 si 10 mg/ml curcumina dizolvat in dimetil sulfoxid) au prezentat o regenerare celulara semnificativa si reduceri ale pierderii celulare din stratul epitelial respirator, reducand de asemenea si edemul, hiperplazia celulara si infiltrarea

leucocitara la un nivel normal. Un alt studiu, s-a axat pe stabilirea rolului curcuminei asupra modificarilor colagenului respectiv a proprietatilor antioxidante in timpul procesului de vindecare a ranilor cutanate la sobolani. Placile de excizie au fost realizate pe partea din spate a sobolanilor, iar curcumina a fost administrata topic. Tesuturile plagii eliminate (la 4, 8 si 12 zile dupa ranire) au fost folosite pentru a analiza modificarile biochimice si patologice. Rezultatele demonstreaza ca, curcumina a marit proliferarea celulara si sinteza colagenului la locul plagii, evidentiata prin cresterea ADN, a continutului total de proteine si a colagenului de tip III. Ranile tratate cu curcumina, s-au dovedit a se vindeca mai rapid, caracterizandu-se in viteze imbunatatite de epitelizare, contractia ranilor si rezistenta la tractiune, rezultate confirmate de asemenea si prin examinarea histopatologica. Tratamentul cu curcumina a scazut nivelul de peroxidaza lipidica, in timp ce nivelurile de superoxid dismutaza, catalaza si peroxidaza de glutation au crescut semnificativ, prezentand proprietatile antioxidante ale curcuminei in accelerarea vindecarii ranilor [33]. Un alt studiu condus de *Miah, H.A.M si alti* [34], investigheaza efectul terapeutic al extractului etanolic de turmeric pentru vindecarea ranilor. In cadrul studiului au fost utilizate un numar de 9 capre asupra carora au fost facute un numar de 80 de rani chirurgicale. Acestea au fost impartite in 3 grupuri si anume: grupul 1 (de testare) tratat cu extract etanolic, grupul 2 (standard) tratat cu povidone iodine si grupul 3 tinut fara tratament medicamentos, rana fiind doar spalata cu o solutie salina, iar informatiile au fost inregistrate din ziua 0 pana in ziua 21 post-operator. In vederea determinarii procesului de vindecare, au fost luate in considerare unele caractere morfologice precum, zona de inflamare a plagii, cresterea liniei de sutura de pe suprafata pielii, latimea zonei de sutura si lungimea contractiei in decursul unei saptamani. Evaluarea bacteriologica a fost realizata prin tehnici bacteriologice conventionale si biopsi de tesut, si colorate cu hematoxilina si eozina pentru efectuarea studiilor histopatologice. In cazul tratamentului cu extract etanolic, inflamarea zonei de sutura (11.51 ± 0.36 mm) si inaltimea liniei de sutura (2.65 ± 0.41 mm) au fost cele mai scazute, comparativ cu grupul de control (inflamarea zonei de sutura 12.46 ± 0.73 mm si inaltimea liniei de sutura 3.7 ± 0.35 mm). Studiile histopatologice au evidentiat faptul ca, resturile de tesuturi si hemoragiile au disparut, datorita aparitiei unui strat subtire de keratina pe suprafata epidermei in cazul tratamentului cu extract etanolic de turmeric.

Cu toate ca, administrarea locala a extractului de turmeric prezinta rezultate bune in tratarea anumitor rani provocate chirurgical, in cazul ranilor cronice, este necesara utilizarea unor materiale ce asigura o permeabilitate, oxigenare si nutritie adecvata, pentru atingerea unei rate optime de vindecare cu restabilirea continuitati si functionalitati anatomice. Aceste proprietati pot fi atinse prin utilizarea unui plastru transdermic, cu livrare controlata, ce contine substante medicamentoase ce se aplica pe piele, furnizand astfel medicamentele prin intermediul pielii la circulatia sistemica, la o rata predeterminata si cu mentinerea unei concentratii terapeutice optime, pe o perioada lunga de timp. Din pacate, numeroase medicamente nu pot patrunde prin piele datorita permeabilitatii scazute a acestuia, si necesita utilizarea unui sistem de imbunatatire a permeabilitati. Din acest punct de vedere, utilizarea curcuminei native, in aplicatii clinice este limitata datorita proprietatilor fizico-chimice nefavorabile si anume: hidrofobicitate, instabilitate, adsorbtiia redusa si eliminarea rapida din circulatia sistemica [35]. In scopul imbunatatirii solubilitati, numeroase eforturi s-au facut in vederea dezvoltarii unor sisteme de livrare optime utilizand diverse biomateriale precum, nanosfere si microsferice polimerice, nanoparticule lipidice, structuri sub forma de nanofibre, hidrogeluri, nanoparticule ceramice, scaffolds, etc [36].

Un astfel de plastru transdermic, obtinut in vederea imbunatatirii permeabilitati curcuminei prin tesutul epithelial si patrunderea in circulatia sistemica, a fost realizat utilizand o

combinatie intre poli vinilpirolidona si etil celuloza. Studiile histopatologice, efectuate pe sobolani au aratat ca plasturi care contin curcumina (20 mg) au aratat prezenta fibrelor de collagen bine organizate, cresterea celulelor fibroblaste si formarea de noi vase de sange, comparativ cu plasturi ce nu contin curcumina (grup de control) [37]. Un alt compozit spongios pe baza de 10 % curcumina /chitosan/gelatina a fost testat pentru tratarea ranilor. Rezultatele antibacteriene efectuate pe *P. aeruginosa* demonstreaza ca zona de inhibare este mai mare in cazul compozitului cu curcumina comparativ cu cel fara curcumina. Testele de eliberare a curcuminei in vitro in solutie buffer de fosfat, demonstreaza faptul ca, rata de eliberare a curcuminei este mai avansata in cazul buretilor ce contin cantitati mai ridicate de gelatina, datorita faptului ca hidrofilia curcuminei a fost relativ mai scazuta [38]. Momin, M si alti [39], au dezvoltat un pansament superporos pe baza de chitosan si alginat in care au incorporat curcumina si miere, pentru tratarea ranilor. Rezultatele obtinute demonstreaza capacitate mare de gonflare a acestui material ($111.05 \pm 0.5\%$), difuzia medicamentului in vitro ($75.03 \pm 3.95\%/20$ zile) si o rata rapida de granulare si reepitelizare a tesutului. Alte tipuri de pansamente pe baza de collagen de tip I au fost obtinute si testate pentru tratarea ranilor cornice, datorita faptului ca collagenul este biocompatibil, biodegradabil, hemostatic si faciliteaza vindecarea ranilor. Mai mult decat atat, materialele sub forma de hidrogel mentin o hidratare corespunzatoare a ranilor iar forma fibrilara a collagenului favorizeaza colonizarea si remodelarea celulelor cu formarea tesutului nou. Cu toate acestea, un dezavantaj major al hidrogelurilor pe baza de collagen, este legat de faptul ca acestea sunt sisteme slabe de livrare a medicamentelor, deoarece cinetica de eliberare este foarte rapida, de doar cateva ore. In acest sens, pentru controlul si evitarea eliberari rapide, este necesara utilizarea unui sistem de livrare impreuna cu collagenul. Un astfel de sistem este reprezentat de suporturile anorganice de tip silice mezoporoasa, unde medicamentele au fost grefate pe suprafata sau incarcate in porii nanoparticulelor. Mai mult datorita naturii semicristaline a acestor tipuri de nanoparticule, produsele lor de disociere ionica au aratat o influenta pozitiva asupra angiogenezei si vindecarii ranilor [40]. Un astfel de sistem de livrare a medicamentului pe baza de nanocompozite collagen-nanoparticule de silice, a fost dezvoltat in scopul prevenirii infectarii ranilor cornice. In acest sens, doua tipuri de antibiotice, rifamicinul si gentamicinul au fost incapsulate in nanoparticule de silice (cu dimensiunea de 100, 300 si 500 nm) si testate din punct de vedere al activitatii antimicrobiene asupra *Stafilococului aurii* respectiv *Pseudomonas aeruginosa*. Rezultatele obtinute arata faptul ca, gentamicina incarcata in particulele de silice cu dimensiunea de 500 nm, poate fi immobilizata in gelul de collagen fara modificarea structurii filamentare, iar eliberarea gentamicinei are loc pe o perioada de 7 zile prezentand totodata si o activitate antibacteriana paralela. Nanocompozitele pe baza collagen/particulele de silice cu dimensiunea de 100 nm - rifamicina, nu prezinta activitate antimicrobiana datorita adsorbției puternice a rifamicinei pe fibrele de collagen [41]. Numeroase alte tipuri de sisteme si tehnici au fost dezvoltate in vederea imbunatatirii biodisponibilitatii curcuminei hidrofobice. Un astfel de sistem este reprezentat de nanofibrele pe baza de gelatina/curcumina obtinute prin electrospinning. Materiale sub forma de fibre, promoveaza adeziunea si raspandirea fibroblastelor-keratinocitelor, datorita porozitatii si raportului volum/suprafata specifica mare [42].

3. REZULTATE ȘTIINȚIFICE OBTINUTE IN ACTIVITATEA DE CERCETARE

3.1. Sinteza silicei mezoporoase de tip MCM-41 si MCM-48

Silicea mezoporoasa cu structura porilor hexagonala a fost sintetizata, dupa metodologia publicata de *Melendez-Ortiz si colaboratorii*[43], si consta in adaosul unei cantitati adecvate (5 g) de surfactant cationic - cetiltrimetilamoniubromura (CTAB) in 960 ml de apa distilata, urmata de agitare intr-o baie cu ultrasunete timp de aproximativ 1h, pana la obtinerea unei solutii clare. In continuare, se adauga 340 ml de alcool etilic si 100 de ml de solutie amoniacala. Tetraetilortosilicatul precursorul de silice in cantitate de 25 ml, se adauga la aceasta solutie sub forma de picaturi fine si se continua amestecarea in baie cu ultrasunete, timp de 3 h. Precitatul alb obtinut se filtreaza, utilizand o pompa cu vid, se usuca la temperatura de 80°C intr-o etuva cu aer cald sau sub vid, urmata de calcinare in vederea indepartari surfactantului organic. Indepartarea surfactantului se realizeaza intr-un cuptor de calcinare, dupa urmatorul profil de temperatura: 0-550°C, timp de 1h 30 min, urmata de mentinerea temperaturi la 550°C timp de 9h. Pulberea calcinata, se mojaraza, si se utilizeaza in continuare pentru adsorbția curcuminei. Obținerea silicei mezoporoase cu structura porilor cubica de tip MCM-48, este similara cu metoda prezentata pentru MCM-41 cu mentiunea ca, surfactantul si anume CTAB se utilizeaza in cantitate mult mai ridicata, de aproximativ 20g.

3.2. Incapsularea curcuminei in porii silicei mezoporoase de tip MCM-41 si MCM-48

Pulberile de tip MCM-41 si MCM-48 calcinate au fost utilizate pentru incapsularea unor procente variate de curcumina, utilizand metoda adsorbției sub vid. In acest sens, o cantitate de 1 g din fiecare tip de pulbere de MCM-41 sau MCM-48, a fost transvazata intr-un recipient din sticla special construit pentru a putea fi adaptat la o pompa cu vid. Solutiile utilizate pentru adsorbției, au fost obtinute prin solubilizarea unei cantitati optime de curcumina respectiv 10, 20 si 50 mg in 7 ml alcool etilic, raportate la cantitatea de silice luata in lucru (1g), pentru a obtine pulberi de silice mezoporoase dopate cu 1, 2 si 5% curcumina. Aceste solutii, ce contin procente variate de curcumina, au fost mentinute intr-o baie cu ultrasunete timp de aproximativ 40-60 min, pana la solubilizarea completa a pulberi de curcumina. Dupa solubilizare, aceste solutii au fost injectate sub vid peste cele doua tipuri de pulberi de silice mezoporoasa. Dupa adsorbția completa a curcuminei in porii silicei, recipientul a fost indepartat de sub vid, si mentinut intr-o etuva cu aer cald la temperatura de 60°C timp de aproximativ 1 zi, pentru indepartarea solventului/uscare, urmata de mojarare si caracterizare. Cantitatea de alcool etilic (7 ml) a fost astfel calculat, incat sa acopere in totalitate pulberile de silice luate in lucru.

3.3. Obținerea sistemelor complexe pe baza de collagen/curcumina si/sau MCMx

Sistemele complexe, au fost obtinute utilizand o cantitate de 25 g de gel de collagen (ce contine aproximativ 0.5 g collagen uscat) in care a fost inglobat o cantitate egala de 0.5 g din pulberile obtinute anterior si anume: MCM-41-1%Curcumina, MCM-41-2%Curcumina, MCM-41-5%Curcumina, MCM-48-1%Curcumina, MCM-48-2%Curcumina, MCM-48-5%Curcumina. Compozitul collagen/5% curcumina a fost obtinut prin utilizarea unei cantitati de 25 g gel de collagen (0.5% collagen pur) la care s-a adaugat 25 mg curcumina. Toate variantele de compozite au fost obtinute, prin agitare magnetica puternica la aproximativ 420rpm, utilizand un agitor cu

posibilitate de amestecare in co-si contra-rotatie avand totodata si functia de vibratie. Toate variantele de materiale compozite obtinute, au fost amestecate aproximativ 20-30 de minute in vederea obtinerii unei omogenitati cat mai ridicate a pulberilor in masa de collagen. Compozitele obtinute au fost reticulate cu o solutie de glutaraldehida de 0.5% si transvazate in vase Petri din sticla. Dupa reticulare, compozitele au fost mentinute la frigider timp de aproximativ 2 zile la temperatura de 4°C si liofilizate.

3.4. Teste cinetice in vitro privind capacitatea de eliberare a curcuminei din pulberi mezoporoase si/sau materiale compozite

Testele de eliberare in vitro a curcuminei din pulberile dopate/compozitele obtinute, au fost realizate in solutie buffer de fosfat cu pH=7.2 pe parcursul a 0-134 ore. Solutia buffer de fosfat a fost obtinuta utilizand o cantitate de 168.7608 g/L de Na₂HPO₄ 12 H₂O si 15.145 g /L NaH₂PO₄ H₂O, iar pentru ajustarea pH-ului a fost utilizat NaOH. In vederea determinarii gradului de eliberare a curcuminei, o cantitate de aproximativ 400 de mg din pulberile mezoporoase ce contin curcumina in procente variate (1, 2 si 5%), compozitele collagen/5%curcumina si collagen/silice mezoporoasa (MCM41 sau MCM48) - x% curcumina, au fost transvazate in tuburi de centrifuga si puse in contact cu o cantitate de 45 ml solutie buffer de fosfat si mentinute intr-o baie cu termostatare, la temperatura de 37°C, pe intreaga durata a determinarilor. La diferite intervale de timp bine stabilite, tuburile ce contin proba si solutia buffer de fosfat au fost centrifugate la 10000rpm timp de 5 min si temperatura de 37°C. Determinarea concentratiei curente de curcumina existenta in solutie, a fost identificata prin spectrometrie UV-VIS, utilizand o cantitate de aproximativ 2 ml de supernatant, la lungimea de unde de 264 nm considerata ca fiind lungimea de unda maxima, la care adsoarbe curcumina. In timpul citirilor, ca referinta a fost utilizata solutia buffer de fosfat, in vederea reducerii la minim a erorilor de citire. Pentru a mentine un volum constant de solutie buffer pe tot parcursul testelor de eliberare, dupa citire, cele 2 ml de supernatant extrase au fost puse la loc, iar cuva a fost clatita cu solutie buffer de fosfat, in vederea evitarii impurificarii celorlalte probe. Dupa finalizarea determinarilor, s-a calculat cantitatea totala de curcumina eliberata.

REZULTATE SI DISCUTII

3.5. Caracterizarea pulberilor de silice mezoporoasa dopate cu curcumina si ale sistemelor complexe

Spectrele FTIR ale pulberilor de silice dopate cu procente variate de curcumina

Analiza FTIR este utilizata pentru a determina, interactiile ce au loc intre moleculele de curcumina si pulberile mezoporoase (Figura 2 A si B). Spectrele FTIR au fost inregistrate atat pe pulberea de curcumina simpla in domeniul 3600-400cm⁻¹ si 2000-400cm⁻¹ (Figura 1 A si B), in vederea unei mai bune evidentieri a benzilor caracteristice acesteia. Spectrul FTIR al curcuminei simple, prezinta numeroase benzi caracteristice si anume, banda de la 3504 cm⁻¹ poate fi asociata vibratiei grupari OH libere, banda de la 3014 cm⁻¹ poate fi atribuita grupari C-H de alungire provenit din nucleul aromatic, banda de la 2846 cm⁻¹ este atribuita grupari metil de alungire C-H, varful de la 1626 cm⁻¹ caracteristica grupari de alungire C=O, banda de la 1507 cm⁻¹ este atribuita vibratiei C=O si C=C, banda de la 1457 cm⁻¹ este asociata legaturi CH₂ de deformare.

Banda observata in regiunea $1000-1300\text{ cm}^{-1}$ poate fi atribuita legaturi C-O-C simetrice si asimetrice.

In Figura 2 A si B, sunt prezentate spectrele FTIR inregistrate pe pulberile de tip MCM-41 si MCM-48 simple calcinate, precum si cele inregistrate pe pulberile de tip MCM-41 si MCM-48 dopate cu 1, 2 respectiv 5% curcumina. In cazul pulberilor de tip MCM-41 si MCM-48 simple, spectrele FTIR sunt foarte asemanatoare si pun in evidenta prezenta benzilor caracteristice silicei mezoporoase, si anume picurile mari situate in intervalul 1052 cm^{-1} pot fi atribuite vibratiilor asimetrice ale legaturi Si-O-Si. Varfurile de la 807 cm^{-1} pot fi atribuite gruparilor Si-OH iar cele de la aproximativ 440 cm^{-1} pot fi atribuite grupari Si-O.

In cazul pulberilor de tip MCM-41 respectiv MCM 48 ce contin procente variate de curcumina (1, 2 si 5%), banda de la 807 cm^{-1} caracteristica legaturi (CH) din nucleul aromatic si C-CH prezenta in scheletul curcuminei pure, se suprapune peste banda Si-OH, caracteristica silicei mezoporoase si nu poate fi decelata. Cu toate acestea, in cazul ambelor tipuri de silice mezoporoasa (MCM-41 si MCM-48) dopate, se poate observa prezenta curcuminei, datorita identificarii benzi caracteristice de alungire a grupari C=O, care sufera mici deplasari fata de curcumina simpla, de la 1626 cm^{-1} la aproximativ 1628 cm^{-1} in cazul dopari silicei mezoporoase de tip MCM-41 si MCM 48. Mai mult decat atat, in cazul pulberilor de tip MCM-41 si MCM-48 dopate cu curcumina, o alta banda caracteristica poate fi decelata la aproximativ 1514 cm^{-1} si poate fi atribuita vibratiei gruparilor C=O respectiv C=C existente in spectrul curcuminei pure. Intensitatea acestor benzi, este cu atat mai mare cu cat procentul de curcumina este mai ridicat, si anume in cazul pulberilor de tip MCM-48-5% curcumina respectiv MCM-41-5% curcumina.

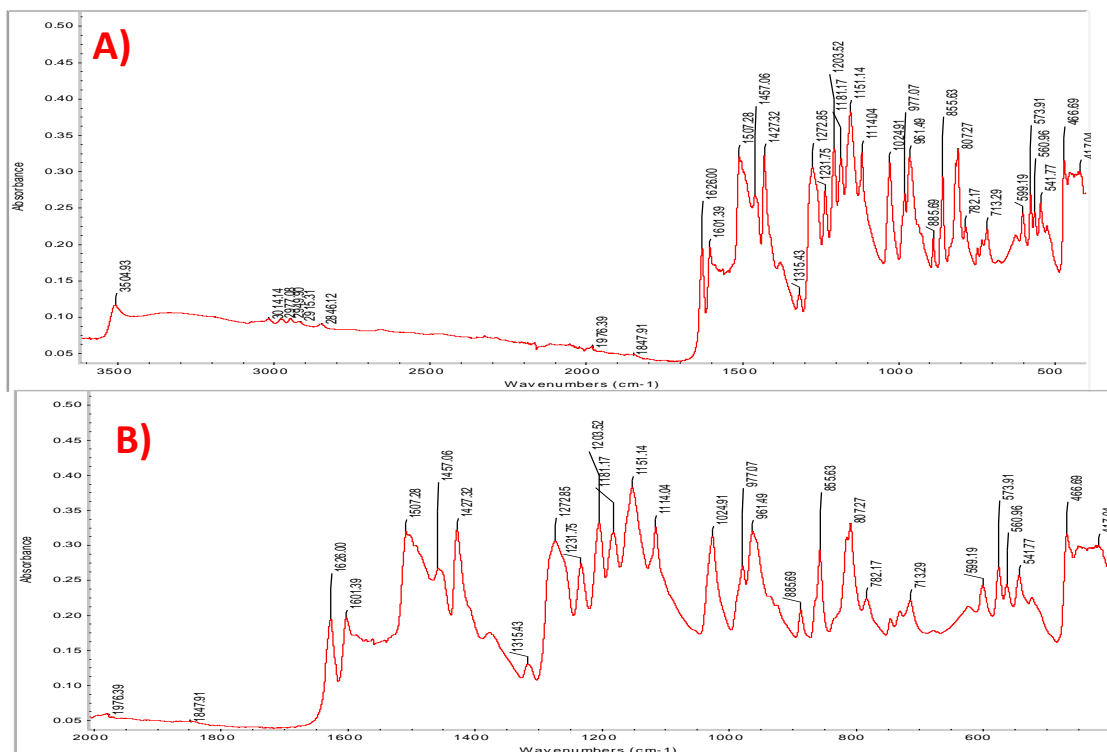


Figura 1. Spectrul FTIR ale curcuminei pure, A) in domeniul $3600-400\text{ cm}^{-1}$ si B) in domeniul $2000-400\text{ cm}^{-1}$

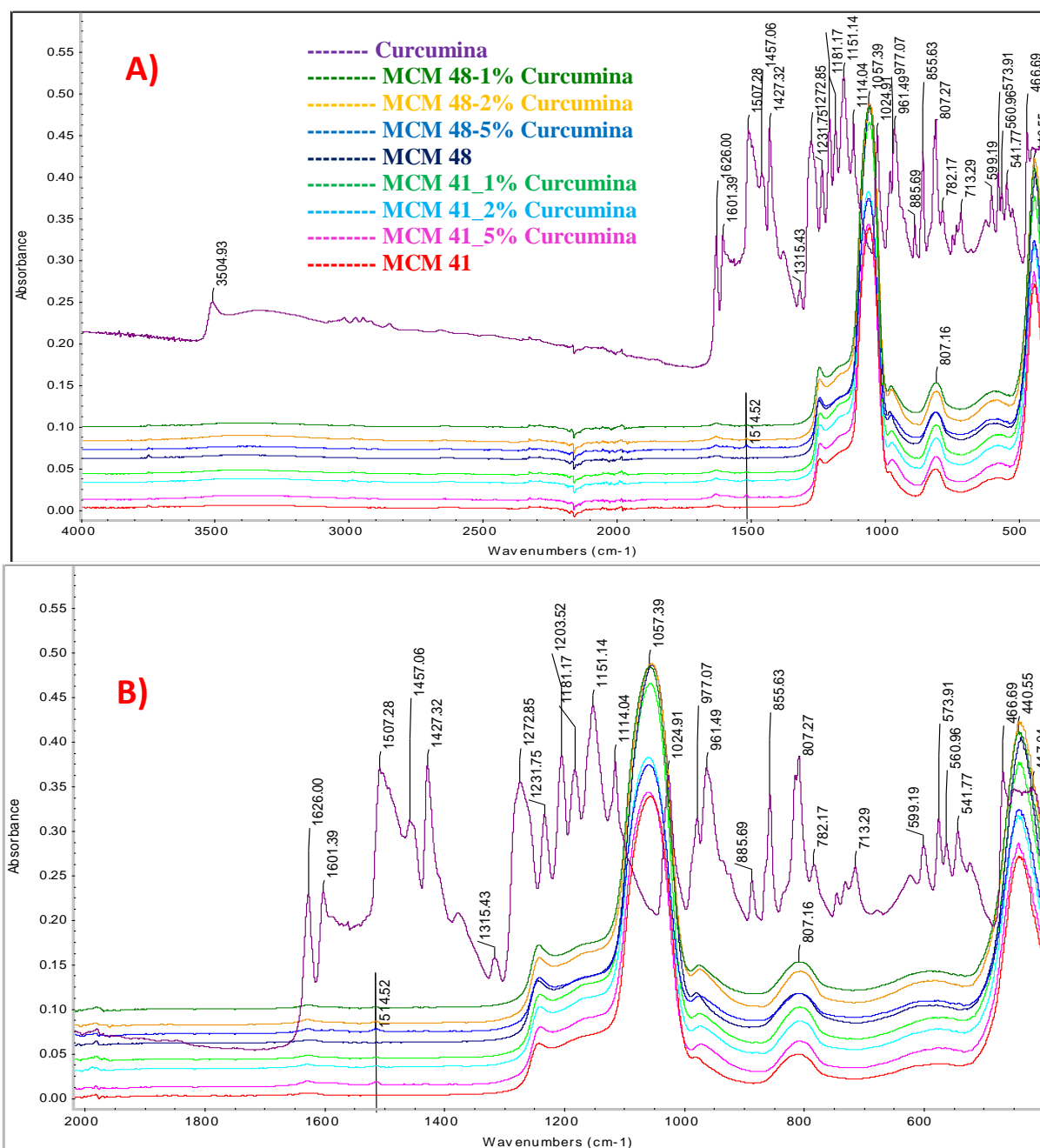


Figura 2. Spectrele FTIR inregistrate pe pulberile de MCM-41 si MCM-48 simple si dopate cu procente variate de curcumina, **A)** in domeniul 4000-400cm⁻¹, **B)** in domeniul 2000-400cm⁻¹

Microscopia SEM inregistrata pe pulberile MCM-41 si MCM-48 simple si dopate cu curcumina

Dupa cum se poate observa din imaginile SEM inregistrate pe pulberea de MCM-41 calcinata (Figura 3A), forma particulelor este predominant sferica uneori sferica distorsionata, iar dimensiunea particulelor este cuprins in intervalul 220-310nm. Mai mult decat atat, se poate observa ca particulele de MCM-41 sunt predominant monodisperse si nu exista tendinta de aglomerare.

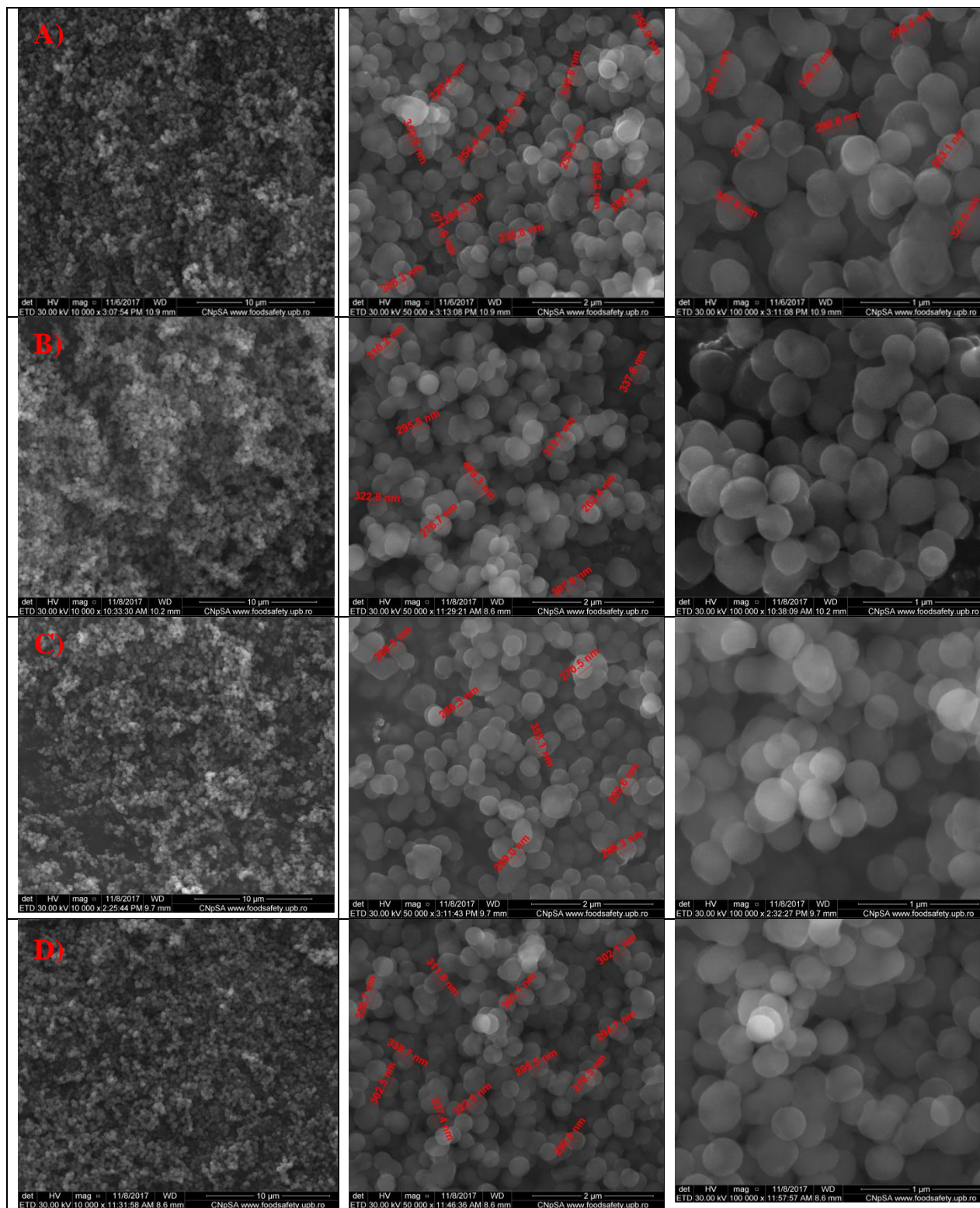


Figura 3. Imagini SEM inregistrate pe **A)** MCM-41, **B)** MCM-41-1%curcumina, **C)** MCM-41-2% curcumina si **D)** MCM-41-5% curcumina la diverse mariri – 10, 50 si 100kx

La mariri mari, de 50000 respectiv 100000x, se poate observa structura extrem de poroasa a acestui tip de material. In cazul incapsulari unor procente variate de curcumina in porii silicei de tip MCM-41 (Figura 3, imaginile B, C si D), se poate observa ca acesta nu afecteaza forma si porozitatea particulelor. Dimensiunea particulelor se mentin in limite acceptabile si variaza in intervalul, 237-469 nm. Prezenta curcuminei, nu a putut fi vizualizata prin SEM, probabil datorita localizari acestuia in porii silicei de tip MCM-41.

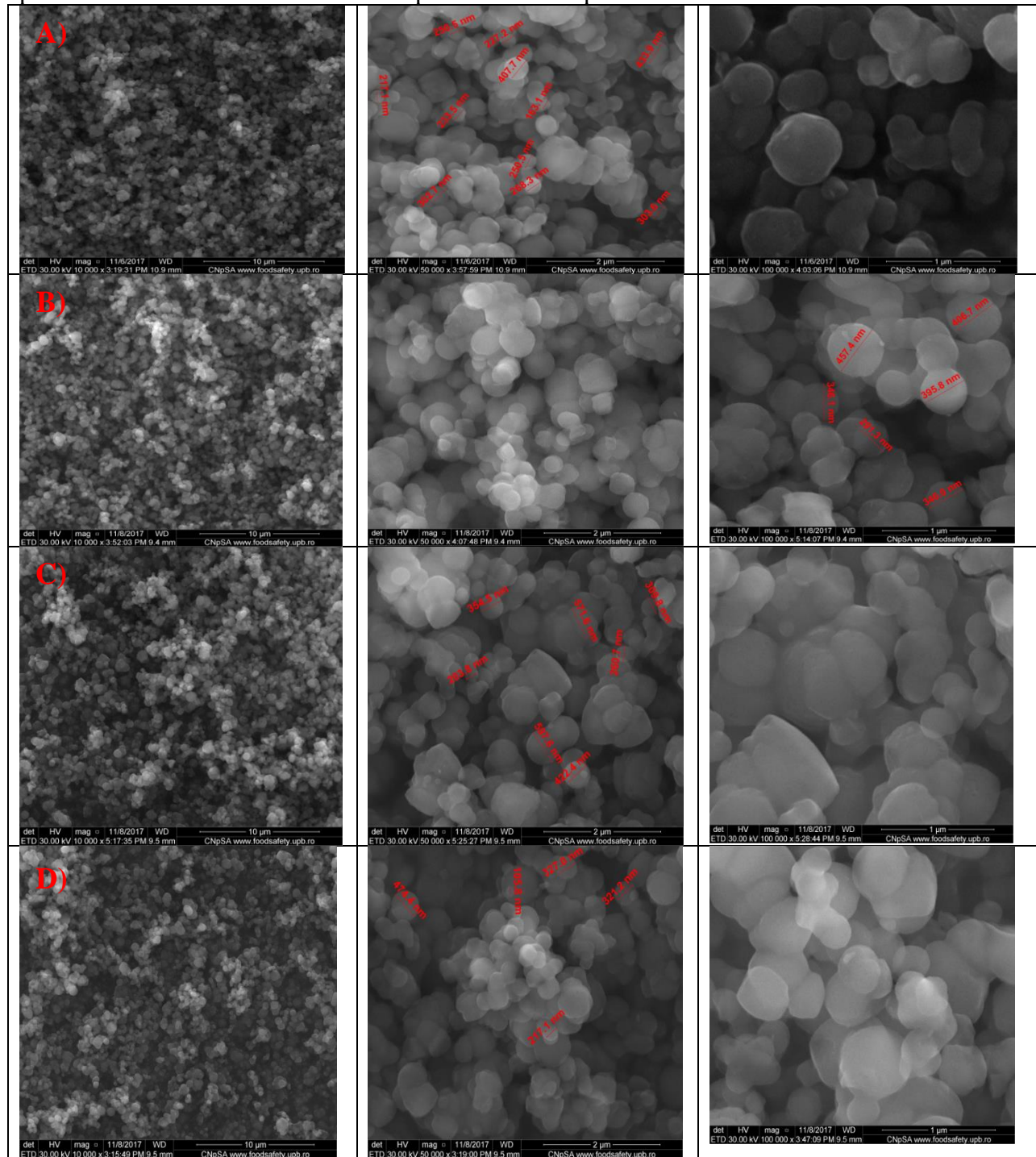


Figura 4. Imagini SEM inregistrate pe **A)** MCM-48, **B)** MCM-48-1% curcumina, **C)** MCM-48-2% curcumina si **D)** MCM-48-5% curcumina la diverse mariri – 10000, 50000 si 100000x

In Figura 4, sunt prezentate imaginile SEM inregistrate pe pulberea de silice mezoporoasa de tip MCM-48. Dupa cum se poate observa, morfologia particulelor variaza in limite largi de la sferica, sferica alungita si cubica. Mai mult decat atat, se poate observa o slaba tendinta de aglomerare a acestor particule. Dimensiunea particulelor variaza in domeniul 200-433 nm. La marire mare de 100kx poate fi observata, structura poroasa. In cazul incarcarii silicei de tip MCM-48 cu 1% curcumina (Figura 4B), forma respectiv dimensiunea particulei nu sufera modificari semnificate raportat la pulberea de MCM-48 simpla. Nu aceelasi lucru se poate spune in cazul incarcarii silicei de tip MCM-48 cu 2 respectiv 5% curcumina (Figura 4C si D), unde se poate observa, o puternica tendinta de aglomerare a particulelor intre ele, sub forma de ciorchine, probabil datorita faptului ca silicea de tip MCM-48 are dimensiunea porilor mai mare comparativ cu silicea de tip MCM-41, si permite adsorbtia mai rapidă/facilă a unei cantitati mai ridicate de curcumina in porii acestuia.

Teste de eliberare controlata a curcuminei din silicea de tip MCM-41 si MCM-48

Studiile de eliberare controlata a curcuminei au fost monitorizate atat pe pulberile pe baza de MCM-41 dopate cu 1, 2 si 5% precum si pe pulberile de tip MCM 48 dopate cu aceleasi procente de curcumina, si sunt prezentate in Figura 5. Testele de eliberare, au fost realizate in solutie tampon fosfat salin, la pH=7.2, pe o perioada de 134 h. Pe toata durata determinarilor, probele au fost mentinute intr-o baie termostata la 37°C. Dupa cum se poate observa, profilul de eliberare a curcuminei este dependenta atat de timpul de contact cu solutia de PBS, de tipul de silice utilizata precum si de procentul de curcumina existent in pori. Astfel cea mai buna rata de eliberare, este observata in cazul silicei de tip MCM-48-5% curcumina, atingand la un timp de contact de numai 76h un grad de recuperare 46%, la 105 h procentul fiind de 71% iar 134 h un procent de 79%. In cazul silicei de tip MCM-41-5% curcumina grad de recuperare este similara cu cel observant in cazul pulberilor de tip MCM-48-5% curcumina. Cu toate acestea, gradul de recuperare dupa un timp de contact de 134 h este mai scazuta, de aproximativ 76%. Cu toate acestea, in cazul ambelor tipuri de silice dopate, eliberarea curcuminei nu a atins maximul, si poate fi continuata, inca pe o perioada lunga de timp. Mai mult decat atat, viteza de eliberare a curcuminei scade drastic, dupa un timp de contact de 105 h, in cazul tuturor pulberilor testate. Acest lucru poate fi atribuit faptului, ca solutia de PBS a ajuns la saturatie sau este foarte aproape, si nu permite solubilizarea unor cantitati suplimentare de curcumina. In cazul testelor efectuate pe pulberea de tip MCM-48-2% curcumina gradul de recuperare a curcuminei este de 72 % la un timp de contact de 134 h comparativ cu silicea de tip MCM-41-2% curcumina unde procentul este de numai, 65%. Acest lucru poate fi atribuit faptului ca, dimensiunea porilor in cazul silicei de tip MCM41 este mult mai scazuta comparativ cu cele din MCM 48. Prin urmare, se poate concluziona faptul ca profilul de eliberare ale ambelor tipuri de pulberi, este puternic influentata de marimea porilor, si implicit rata de eliberare a curcuminei din MCM48 este mai intensa comparativ cu cel din MCM 41. Acest lucru este in concordanta, cu studiul efectuat de *AbouAitah KEA si colaboratori*[44], si arata faptul ca difuzia curcuminei sau a altor medicamente din silicea mezoporoasa, este legata de diametrul si geometria porilor, iar cinetica de eliberare este cu atat mai mica cu cat dimensiunea porilor este mai scazuta.

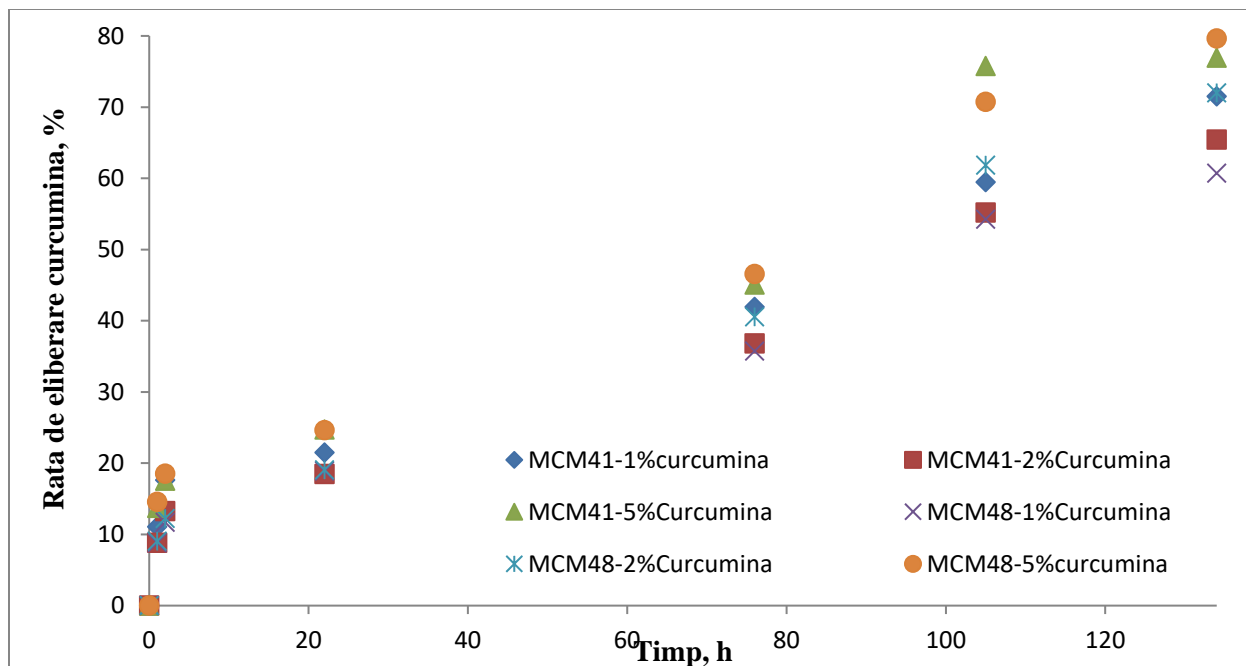
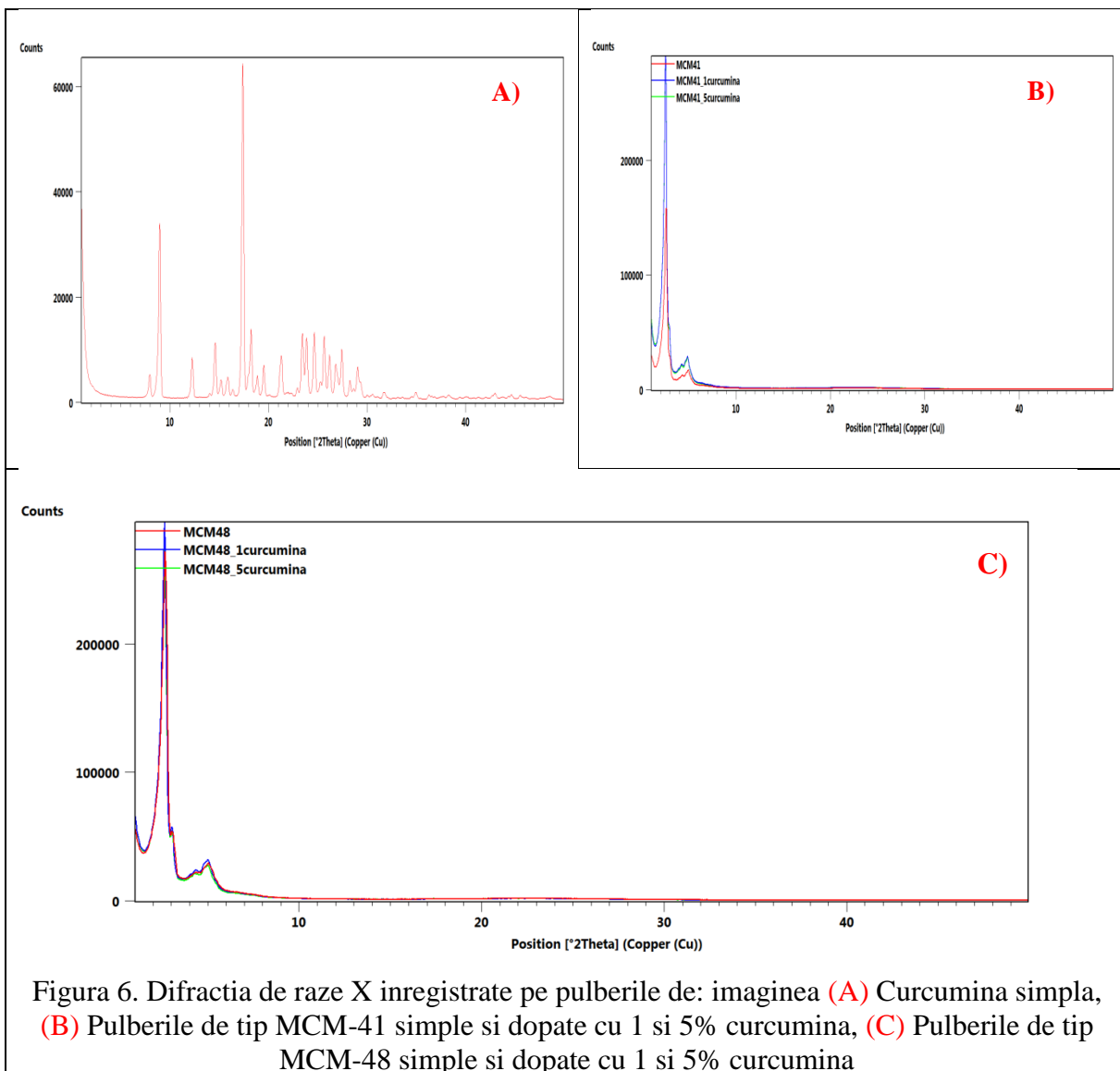


Figura 5. Rata de eliberare a curcuminei din silicea mezoporoasa de tip MCM 41 si MCM 48 dopata cu 1, 2 si 5% curcumina

Difractia de raze X inregistrata pe pulberile de silice simple si încărcate cu curcumina

Difractia de raze X a fost utilizata pentru evidentierea gradului de cristalinitate a curcuminei pure, silicei mezoporoase de tip MCM 41 si MCM 48 calcinate inainte si dupa incapsularea unor cantitati variate de curcumina, folosind un unghi fix intre $0-50^{\circ}$. In cazul curcuminei pure (Figura 6, imaginea (A)), poate fi vizualizat un varf de difractie intens a curcuminei cristaline la $\sim 17.28^{\circ}$ precum si aparitia a numeroaselor alte picuri la intensitati mai scazute ($7.96, 8.8, 12.28, 14.57^{\circ}$, etc). In cazul incapsularii curcuminei in pulberea de tip MCM41, se observa cresterea in intensitate a picului caracteristic zonei cristaline din silice si deplasarea acestuia la unghiuri mai mici, ceea ce reflecta, ca in porii silicei mezoporoase curcumina a fost adsorbita, chiar daca nu a putut fi decelata picurile caracteristice acesteia. In cazul incapsularii curcuminei in procent de 1 respectiv 5% in porii siliceii de tip MCM-48, prezenta picurilor caracteristice zonelor cristaline din curcumina, nu au putut fi identificate. Acest lucru poate fi atribuita faptului ca, curcumina a fost complet transformata intr-o stare ne-cristalina, fiind in concordanta cu studiile realizate anterior de alti cercetatori [25, 45]. S-a demonstrat de asemenea ca forma ne-cristalina a curcuminei s-au a medicamentelor in general incapsulat in pulberea de silice mezoporoasa poate sa prezinte o solubilitate mai buna, comparative cu forma cristalina.



Teste privind activitatea antibacteriana a pulberilor dopate cu curcumina

Curcumina simpla, pulberile de tip MCM 41 si MCM 48 simple si dopate cu procente variate de curcumina au fost utilizate pentru determinarea concentratiei minime inhibitorie, asupra tulpinilor de *S.aureus*, *P. aeruginosa* si *C. albicans* si sunt prezentate in Figura 7.

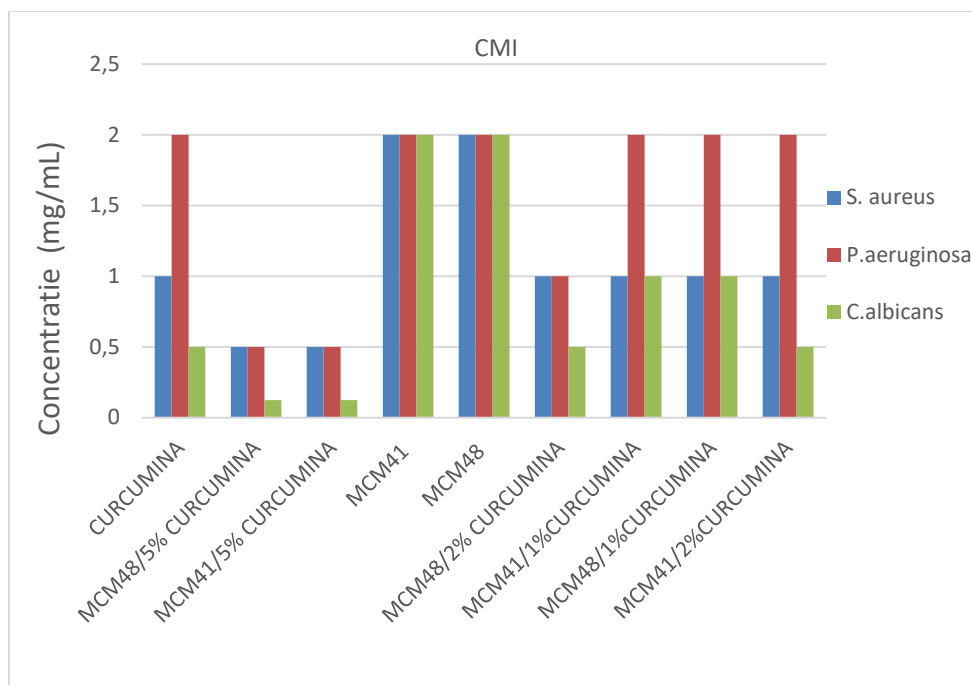


Figura 7. Concentratia minima inhibitorie a pulberilor obtinute asupra *S.aureus*, *P. aeruginosa* si *C. albicans*

Tulpinile utilizate pentru acest studiu: *S.aureus*, *P. aeruginosa* si *C. albicans* au fost obtinute din colectia de tulpini a laboratorului de Microbiologie, Facultatea de Biologie, Universitatea din Bucuresti.

Dupa cum se poate observa din graficul de mai sus, gradul de inhibare a activitati antibacteriene este puternic dependenta de tipul/concentratia de pulbere si de tulpina bacteriana utilizata. Astfel, pulberea de curcumina simpla are un efect inhibitor semnificativ asupra *S.aureus* la o concentratie de numai 1 mg/ml si la o concentratie si mai scazuta de 0.5 mg/ml asupra *C. albicans*, dar nu prezinta activitate de inhibare asupra *P.aeruginosa* nici la concentratie de 2 mg/ml. Pulberile mezoporoase de tip MCM 41 si MCM 48 simple, nu prezinta activitate de inhibare asupra nici unei tulpini, nici la concentratii mari de 2 mg/ml. Se poate observa ca pe masura ce concentratia de curcumina din probele de silice mezoporoasa de tip MCM 41 si MCM 48 creste la 5% activitatea celor 3 tipuri de tulpini se imbunatateste semnificativ chiar la adaosul unor concentratii scazute de pulberi de numai 0.5 mg/ml. In cazul pulberilor de silice dopate cu de 2%, curcumina concentratia minima inhibitorie necesara pentru tulpina *P. aeruginosa* este mai mare in cazul pulberilor de tip MCM-41/2% Curcumina comparativ cu pulberea de MCM-48-2% curcumina. Pulberile de silice (MCM-41 si MCM-48) dopate cu 1% curcumina prezinta activitate inhibitorie similara, asupra celor 3 tipuri de tulpini la aceleasi concentratii. Astfel se poate concluziona, ca adaosul unei cantitati mai ridicate de curcumina, imbunatateste activitatea antibacteriana.

3.6. Caracterizarea sistemelor complexe pe baza de colagen/curcumina si colagen/silice mezoporoasa/curcumina

Spectre FTIR inregistrate pe sistemele complexe

Spectrele FTIR prezentate in Figura 8 imaginile A si B, au fost inregistrate atat pe proba martor - colagen, amestecul colagen / 5% curcumina si curcumina simpla.

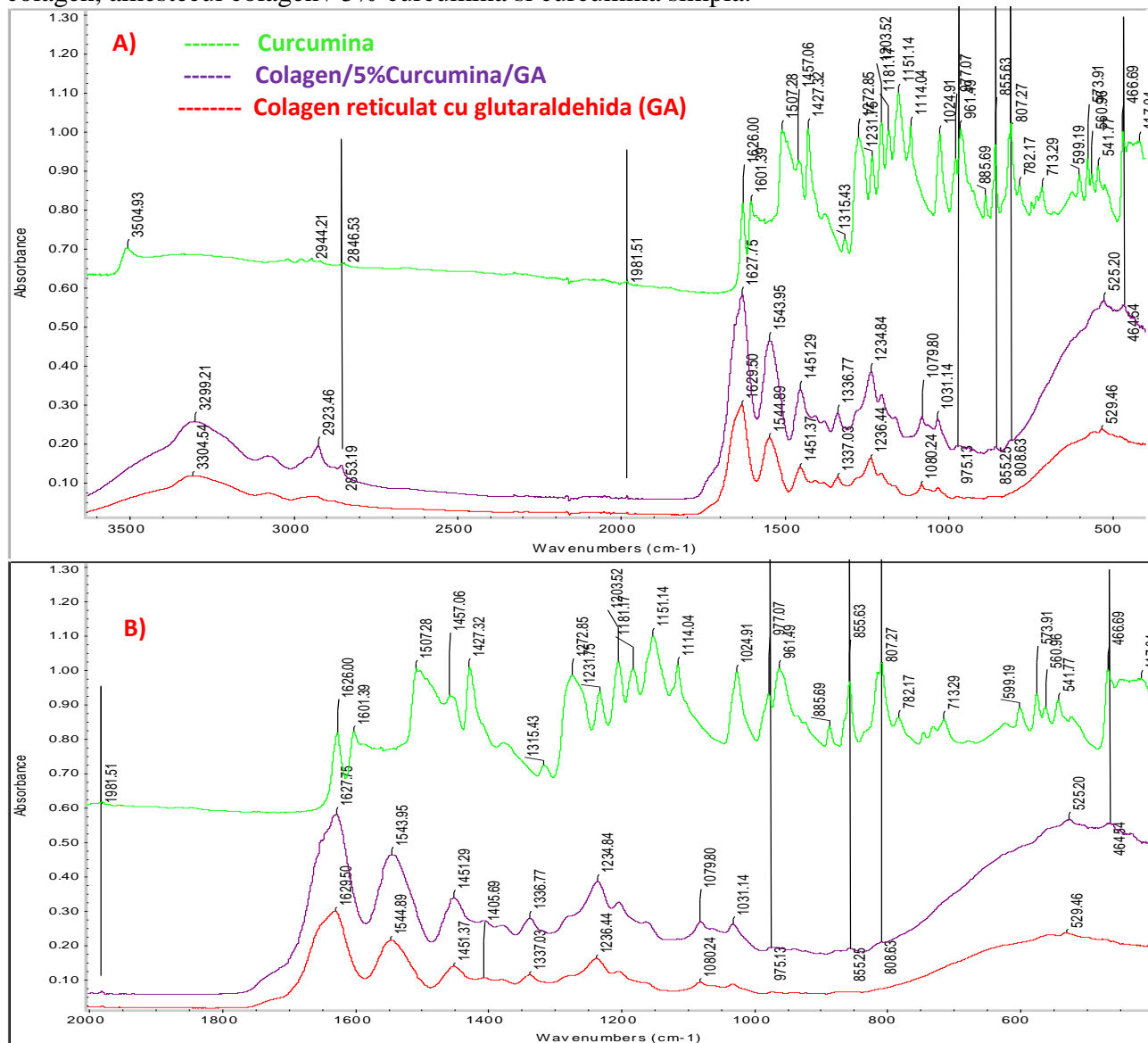


Figura 8. Spectrul FTIR inregistrat pe curcumina simpla, colagen/5% curcumina si colagen reticulat cu GA, imaginea **A)** in domeniul 3600-400cm⁻¹ si imaginea **B)** in domeniul 2000-400cm⁻¹

Dupa cum se poate observa, in cazul spectrului colagen reticulat cu glutaraldehida (GA) pot fi evidentiata la 3304cm⁻¹ benzile de alungire caracteristice gruparilor -NH, precum si prezenta amidei de tip, I, II si III, la urmatoarele lungimi de unda: 1629, 1544 si 1236 cm⁻¹. In cazul spectrului colagen/ 5% curcumina, pe langa benzile caracteristice colagenului pot fi puse in evidenta si benzile caracteristice curcuminei. Astfel banda de la 2923cm⁻¹ poate fi atribuita vibratiei de alungire asimetrica a grupari metilen (CH₂) iar banda de la 2853cm⁻¹ este atribuita vibratiei de alungire simetrice a grupari metilen (CH₂). Banda de la 1626cm⁻¹ caracteristica

legaturi C=O de alungire, prezenta in curcumina pura nu a putut fi evidentiata in cazul compozitului collagen/5%curcumina deoarece se suprapune peste banda amidei de tip I din collagen. Banda caracteristica legaturi (CH) din nucleul aromatic si legatura C-CH existenta in scheletul curcuminei, a putut fi identificata la aproximativ 808 cm^{-1} .

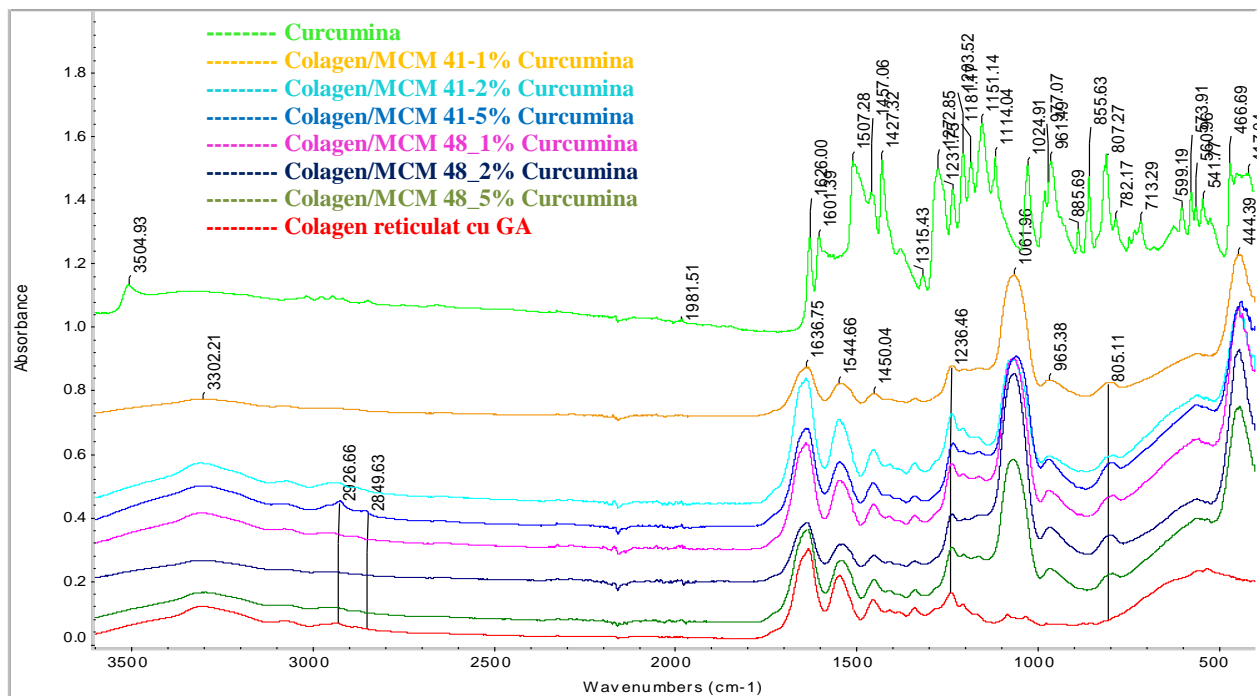
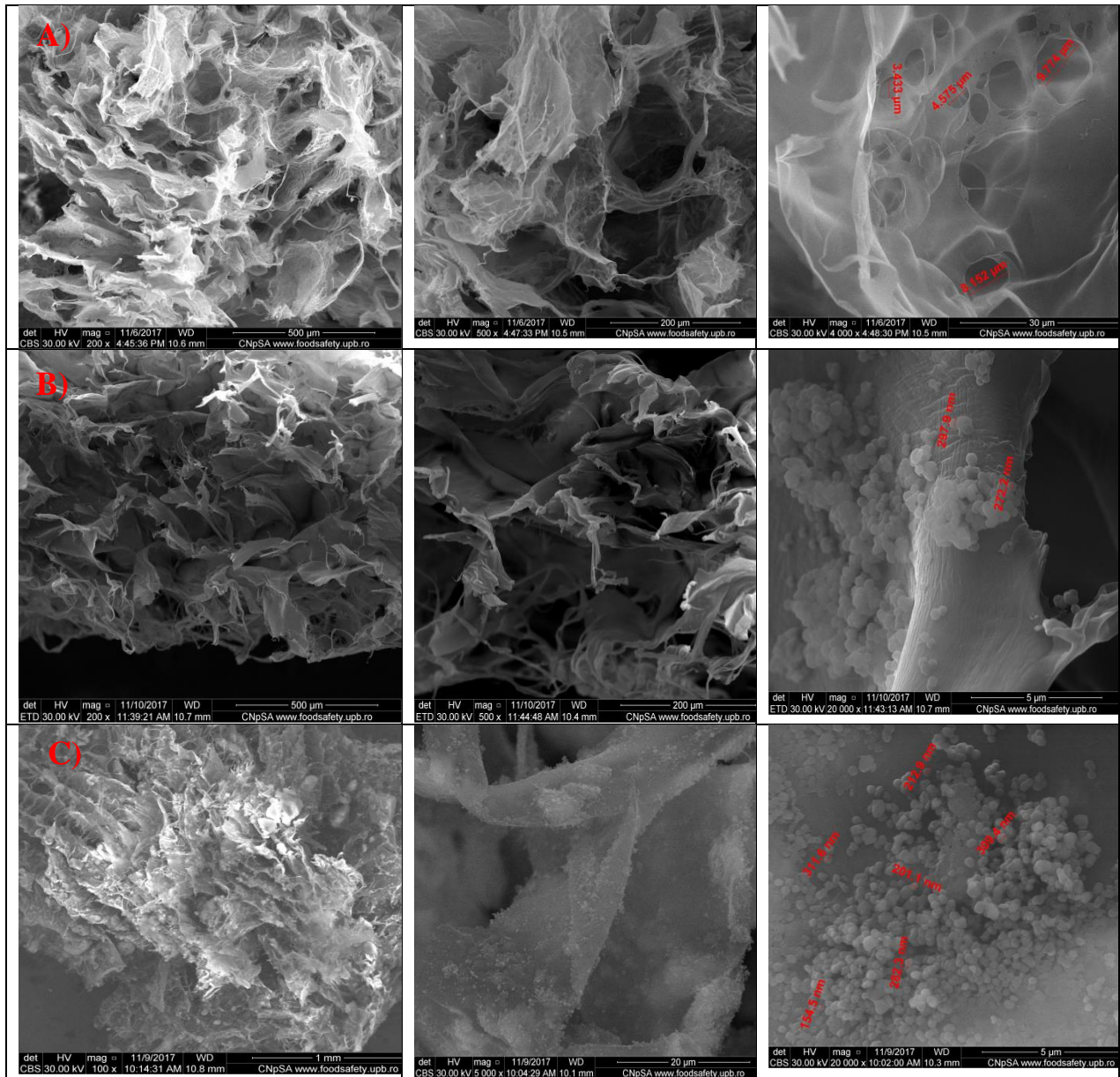


Figura 9. Spectrul FTIR inregistrat pe sistemele complexe collagen/silice mezoporoasa/curcumina

In cazul sistemelor complexe pe baza de collagen / silice mezoporoasa de tip MCM-41 si MCM-48 dopate cu 1, 2 respectiv 5% curcumina, spectrele FTIR prezentate in Figura 9 pun in evidenta atat benzile caracteristice din collagen (gruparea N-H la 3302 cm^{-1} si benzile caracteristice celor 3 tipuri de amide, la 1636 , 1544 si 1236 cm^{-1}) precum si benzile caracteristice silicei (legatura Si-O-Si la 1061 cm^{-1} , la 805 cm^{-1} legatura Si-OH iar la 444 cm^{-1} legatura Si-O). Prezenta curcuminei, poate fi identificata doar prin benzile caracteristice grupari metilenice (CH_2) asimetrice (2926 cm^{-1}) si simetrice (2849 cm^{-1}), acestea fiind cele mai intense si pot fi cu usurinta decelate, in cazul compozitului collagen/MCM-41-5% curcumina. Acest lucru poate fi atribuit faptului ca, dimensiunea porilor silicei mezoporoase de tip MCM-41 este mai redusa decat cel al MCM-48, si permite o adsorbție mai scazuta de curcumina.

Imagini SEM inregistrate pe sistemele complexe



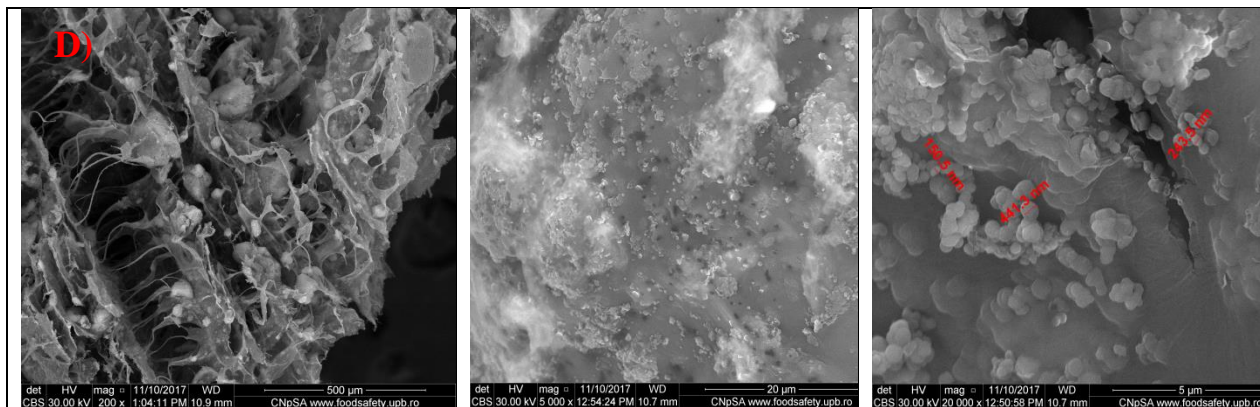


Figura 10. Imagini SEM reprezentative pt. **A)** Colagen reticulat cu GA, **B)** Colagen/5%curcumina, **C)** Colagen/MCM-41-5%Curcumina si **D)** Colagen/MCM-48-5%Curcumina

Morfologia sistemelor complexe a fost studiată prin SEM (Figura 10). Structura porilor cu pereți interconectați, a putut fi vizualizată la mărimi scăzute (100-500x) atât în cazul colagenului reticulat cu GA (imaginea A), a compozitelor colagen/5%curcumina (imaginea B) cât și în cazul sistemelor complexe (Colagen/MCM41-5%curcumina și Colagen/MCM48-5%curcumina) prezentate în imaginile C și D. În cazul colagenului reticulat cu GA, dimensiunea porilor variază între 3.4 - 9.7 μ m. Această structură a porilor cu pereți interconectați este specifică materialelor obținute prin liofilizare, și este conformă cu observațiile prezentate de *Joong-Hyun Kim și colaboratorii* [46]. În cazul compozitului colagen/5% Curcumina (Figura 10, imaginea B), prezenta curcuminei poate fi vizualizată la mărimi mari, de 20kx. Forma particulelor de curcumina vizualizată prin SEM este sferică iar dimensiunea lor variază între 272-297 de nanometri. În cazul sistemului complex Colagen/MCM41-5%curcumina (imaginea C), se poate vizualiza distribuția relativ uniformă a silicei de tip MCM-41 dopată cu 5% curcumina în masa de colagen. Mai mult la înaltă rezoluție (20kx) se poate observa forma sferică a silicei iar dimensiunea măsurată prin SEM se încadrează între 154-311nm. Aceleși observații sunt valabile și în cazul sistemului complex Colagen/MCM48-5%curcumina, cu mențiunea că dimensiunea particulelor variază în limite mai largi 150-441nm și există o ușoară tendință de aglomerare a acestor particule în masa de colagen.

Teste de eliberare a curcuminei din sistemele complexe

Sistemele complexe au fost studiate din punct de vedere al capacității de eliberare a curcuminei, în lipsa și în prezența unui sistem de livrare reprezentat de silicea mezoporoasă de tip MCM-41 și MCM-48.

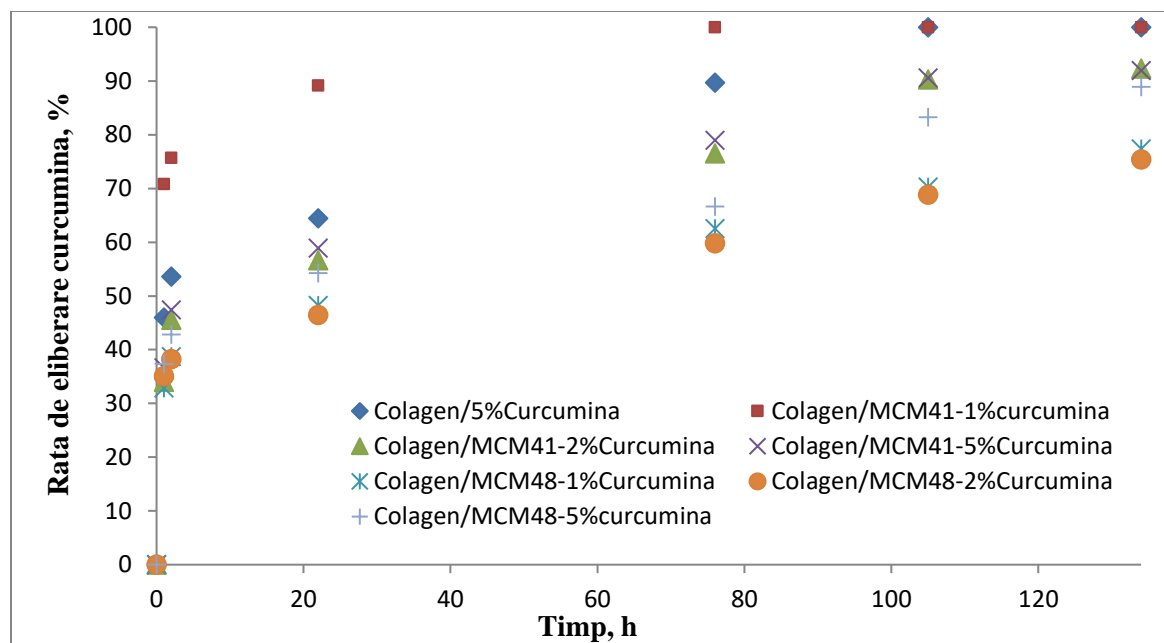


Figura 11. Rata de eliberare a curcuminei din sistemele complexe

Dupa cum se poate observa din Figura 11, cea mai rapida cinetica de eliberare a curcuminei o prezinta compozitul pe baza de Colagen/MCM 41-1% curcumina ajungand in decursul unei singure ore la un procent de 70% iar dupa un timp de contact de 76% la o rata de eliberare de 100%. Acest lucru poate fi atribuit faptului ca, timpul de contact al pulberi de MCM-41-1% curcumina cu gelul de colagen a fost mai indelungat, pana la liofilizare comparativ cu celelalte pulberi. Urmatorul sistem, ce prezinta o cinetica foarte rapida, este reprezentat de cel pe baza de Colagen/5% curcumina, care in prima 1h elibereaza un procent de 53% iar in decursul a 105 h toata cantitatea de curcumina. Acesta cinetica rapida de eliberare era de altfel de asteptat, deoarece colagenul este considerat un sistem de livrare a medicamentelor foarte slab, iar eliberarea este realizata prin difuzie. In cazul sistemelor pe baza de Colagen/MCM41-2% Curcumina si Colagen/MCM41-5% curcumina rata de eliberare este similara, crescand proportional cu timpul de contact astfel: la 1 h rata de eliberare a curcuminei este de 33 respectiv 36%, la 2 h este de 45 si 47%, la 22 h este 56 si 58%, la 76 h este de 76 si 78% iar dupa un timp de contact de 134 h rata este de 92 respectiv 91%. In cazul compozitelor ce contin Colagen/MCM-48 cu procente de 1, 2 si 5% rata de eliberare este mai scazuta comparativ cu compozitele Colagen/MCM-41-xCurcumina, si variaza dupa un timp de contact de 134 h la 77, 75 si 88%. Rezultatele obtinute confirma faptul ca, prin utilizarea unui sistem de livrare adecvat se poate obtine o cinetica de eliberare mai scazuta comparativ cu sistemul ce utilizeaza colagen.

Teste privind activitatea antibacteriana a sistemelor complexe

Testele privind viabilitatea tulpinilor actibacteriene *S. aureus*, *P. aeruginosa* si *C. albicans* la contactul cu diverse sisteme complexe obtinute in cadrul proiectului si anume, Colagen/0.5%GA, Colagen/5%Curcumina si Colagen/MCM41 sau MCM48/xCurcumina, sunt prezentate in Figura 12.

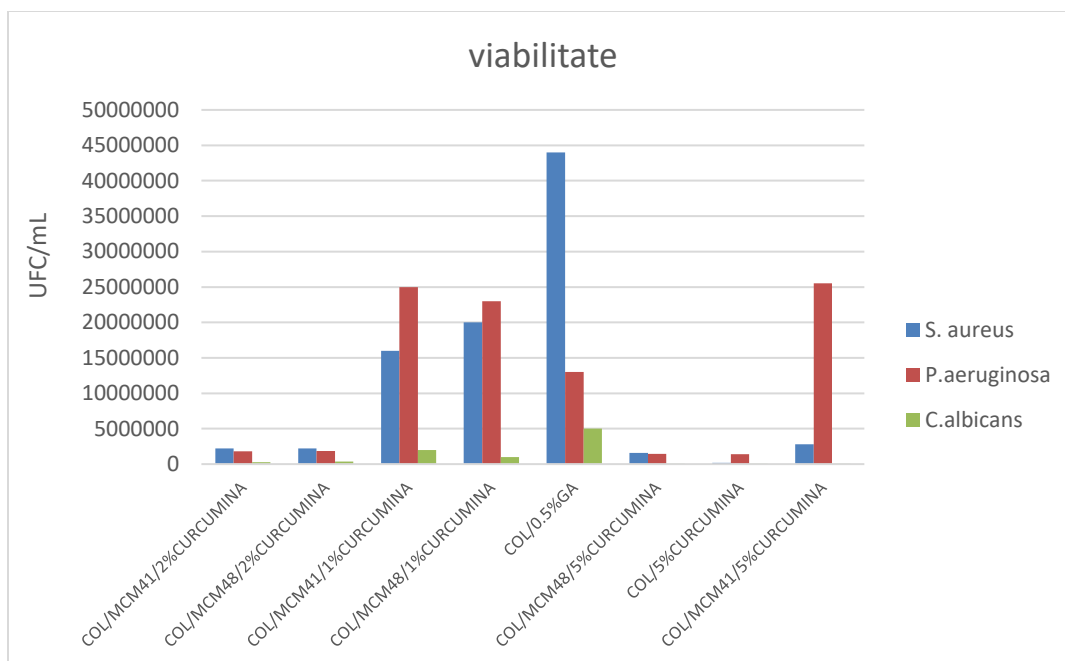


Figura 12. Influenta tipului de sistem complex asupra viabilitatii tulpinilor de *S. aureus*, *P. aeruginosa* si *C. albicans*

Dupa cum se poate observa, cea mai buna capacitate antibacteriana asupra viabilitatii *S. aureus*, *P. aeruginosa* si *C. albicans* o prezinta compozitul Col/5%Curcumina si compozitul Col/MCM 48-5%curcumina. Rezultate foarte bune privind capacitatea de distrugere a bacteriilor au fost obtinute si in cazul sistemului Col/MCM41/2% curcumina si Col/MCM48/2% curcumina. In cazul sistemelor complexe ce contin cantitati de numai 1% curcumina viabilitatea tulpinilor de *S. aureus*, *P. aeruginosa* este mult mai ridicata. Dupa cum se poate observa, colagenul nu prezinta activitate antibacteriana asupra *S. aureus* dar afecteaza viabilitatea *P. aeruginosa* si *C. albicans*. In cazul compozitului Col/MCM41-5% Curcumina rata de supravietuire a *P. aeruginosa* este mai ridicata ca in cazul compozitului ce utilizeaza 1 respectiv 2% Curcumina. Acest lucru poate fi atribuit faptului ca, colagenul, blocheaza partial porii impiedicand in acest fel eliberarea unei cantitati optime de curcumina.

Concluzii

In cadrul proiectului au fost obtinute o serie de pulberi de tip silice mezoporoasa si materiale compozite pe baza de gel de collagen/MCM-41 sau MCM-48 dopate cu procente variate de curcumina, in vederea obtinerii unor pansamente pentru tratarea ranilor cornice aparute la nivelul pielii. In acest sens, pentru obtinerea unui sistem sustinut de eliberare a curcuminei, la o rata predeterminata din gelul de collagen, curcumina cu o serie de caracteristici benefice pentru tratarea ranilor, antioxidante, antibacteriene, etc a fost incapsulata in doua tipuri de silice mezoporoasa (MCM-41 si MCM-48). Aceste tipuri de pulberi incarcate cu curcumina au fost caracterizate utilizand mai multe tehnici iar rezultatele au confirmat faptul ca, curcumina a fost incapsulata in porii materialelor mezoporoase (si in special prin FTIR). Difractia de raze X, nu a putut confirma prezenta curcuminei in porii silicei de tip MCM-41 sau MCM-48, datorita transformarii lui din faza cristalina in faza amorfa. Imaginile de microscopie electronica de baleaj, confirma faptul ca adsorbtiile unor procente variate de curcumina in porii silicei de tip MCM-41 nu afecteaza forma si dimensiunea acestuia. In cazul incapsularii curcuminei in porii

silicei de tip MCM-48, se observa o tendendinta accentuata de aglomerare a pulberilor. Testele de eliberare in vitro, realizate in solutie buffer de fosfat, arata ca pulberile de tip MCM 48 dopate cu 5% curcumina prezinta o rata de eliberare superioara comparative cu cele obtinute in cazul silicei cu pori hexagonali (MCM-41), datorita dimensiuni porilor mai ridicate. Testele antibacteriene efectuate pe pulberi, demonstreaza ca pe masura ce concentratia de curcumina creste, concentratia minima inhibitorie asupra tulpinilor de *S. aureus*, *P. aeruginosa* si *C. albicans*, este mai scazuta. In cazul compozitelor gel de colagen/MCM-41 sau MCM-48 ce contin procente de 1, 2 si 5% curcumina comparativ cu sistemul Colagen/5%Curcumina, rata de eliberare in vitro este mai scazuta, ceea ce demonstreaza ca silicea este un sistem optim de livrare a medicamentelor greu solubile si permite eliberarea curcuminei pe o perioada mai lunga de timp. Mai mult testele privind viabilitatea tulpinilor de *S. aureus*, *P. aeruginosa* si *C. albicans* arata ca compozitele pe baza de Colagen/5% curcumina si Colagen/MCM-48-5% Curcumina, prezinta cea mai buna activitate antibacteriana. Cu toate acestea, o activitate foarte buna antibacteriana este observata si in cazul compozitelor ce contin 2% curcumina. Pe baza rezultatelor obtinute, se poate afirma, ca aceste materiale compozite obtinute, sunt promitatoare pentru tratarea diverselor tipuri de rani, deoarece colagenul este un polimer biocompatibil, puternic regenerativ iar prezenta curcuminei ar putea limita dezvoltarea infectiilor.

Bibliografie

Uncategorized References

1. Banks, R.G.F.a.J., *Challenges in the Treatment of Chronic Wounds*. Adv Wound Care (New Rochelle). 2015. **4**(9): p. 560–582.
2. Bhaskar Rao A, P.E., Deepthi SS, Haritha V, Ramakrishna S, Madhusudan K, Surekha MV, Venkata Rao YSR, *Wound healing: a new perspective on glucosylated tetrahydrocurcumin*. Drug Design, Development and Therapy, 2015. **9**: p. 3579–3588.
3. Tejada S, M.A., Daglia M, Nabavi SF, Sureda A, Hajheydari Z, Gortzi O, Pazoki-Toroudi H, Nabavi SM, *Wound Healing Effects of Curcumin: A Short Review*. Curr Pharm Biotechnol., 2016. **17**(11): p. 1002-1007.
4. Mohammad Hosein Farzaei, Z.A., Mohammad Reza Shams-Ardekani, Mohammad Abdollahi, Roja Rahimi, *A Comprehensive Review of Plants and Their Active Constituents With Wound Healing Activity in Traditional Iranian Medicine*. Wounds, 2014. **26**(7): p. 197-206.
5. R Islam, U.R., MM Ha, MM Hossain, MM Rahman and MAHNA Khan, *Topical application of silver-curcumin on wound healing in rabbits*. The Bangladesh Veterinarian 2015. **32**(2): p. 55 – 64.
6. Agyare C, B.Y., Bekoe EO, Hensel A, Dapaah SO, Appiah T, *Review: African medicinal plants with wound healing properties*. J Ethnopharmacol., 2016. **177**: p. 85-100.
7. Robert Nunan, K.G.H., Paul Martin, *Clinical challenges of chronic wounds: searching for an optimal animal model to recapitulate their complexity*. Disease Models & Mechanisms, 2014. **7**: p.1205-1213.
8. Singh, N.A., D. G.; Lipsky, B. A, *Preventing Foot Ulcers In Patients With Diabetes*. JAMA, 2005. **293**(2): p. 217–228.
9. Kuppusamy Gowthamarajan, V.V.S.R.K., Satish Kumar MN and Rajkumar Malayandi, *Multiple Biological Actions of Curcumin in the Management of Diabetic Foot Ulcer Complications: A Systematic Review*. Trop. Med. Surg., 2015. **3**(1): p. 1-6.
10. Karen Smith, A.C., Eleanor M. Townsend, Lindsay E. O'Donnell, Abhijit M. Bal, John Butcher, William G. Mackay, Gordon Ramage and Craig Williams, *One step closer to understanding the role of*

- bacteria in diabetic foot ulcers: characterising the microbiome of ulcers.* BMC Microbiol., 2016. **16**(54): p. 1-12.
11. MS, B., *Diabetic foot infection.* Am Fam Physician., 2008. **78**(1): p. 71-79.
 12. Rajesh Singh Pawar, F.A.T., Avinash Singh Mandloi, and Shabnam Shaikh, *Exploring the role of curcumin containing ethanolic extract obtained from Curcuma longa (rhizomes) against retardation of wound healing process by aspirin.* Indian J Pharmacol. , 2015. **47**(2): p. 160–166.
 13. Jane Bramhill, S.R.a.G.R., *Bioactive Nanocomposites for Tissue Repair and Regeneration: A Review.* International Journal of Environmental Research and Public Health, 2017. **14**: p. 1-21.
 14. Tarig Abdelrahman, H.N., *Wound dressings: principles and practice.* Surgery (Oxford), 2011. **29**(10): p. 491-495.
 15. Aditya Sood, M.S.G., and Nancy L. Tomaselli, *Wound Dressings and Comparative Effectiveness Data.* Adv Wound Care (New Rochelle), 2014. **3**(8): p. 511–529.
 16. Ana Aglahe Escárcega-Galaz, J.L.D.L.-M., Jaime López-Cervantes, Dalia Isabel Sánchez-Machado, Olga Rosa Brito-Zurita, José Manuel Ornelas-Aguirre, *Chitosan treatment for skin ulcers associated with diabetes.* Saudi Journal of Biological Sciences, 2017: p. 1-6.
 17. Gerecht, L.E.D.a.S., *Engineered Biopolymeric Scaffolds for Chronic Wound Healing.* Front Physiol. , 2016. **7**: p. 1-12.
 18. Elbadawy A.Kamoun, E.-R.S.K., Xin Chen, *A review on polymeric hydrogel membranes for wound dressing applications: PVA-based hydrogel dressings.* Journal of Advanced Research, 2017. **8**(3): p. 217-233.
 19. Elbadawy A.Kamoun, X., Mohamed S.Mohy Eldin, El-Refaie S.Kenawy, *Crosslinked poly(vinyl alcohol) hydrogels for wound dressing applications: A review of remarkably blended polymers.* Arabian Journal of Chemistry, 2015. **8**(1): p. 1-14.
 20. S., K.I.D.S.S., *Nanomaterials for wound healing: scope and advancement.* Nanomedicine, 2015. **10**: p. 593–2612.
 21. B. Ajitha, Y.A.K.R., P. Sreedhara Reddy, *Enhanced antimicrobial activity of silver nanoparticles with controlled particle size by pH variation.* Powder Technology, 2016. **269**: p. 110-117.
 22. Mel, J.H.a.A.d., *A current affair: electrotherapy in wound healing.* J Multidiscip Healthc., 2017. **10**: p. 179–194.
 23. Helinor J. Johnston, G.H., Frans M. Christensen, Sheona Peters, Steve Hankin, *A review of the in vivo and in vitro toxicity of silver and gold particulates: Particle attributes and biological mechanisms responsible for the observed toxicity.* Critical Reviews in Toxicology, 2010. **40**(4): p. 328-346.
 24. Mihaela Georgescu, O.M., Marcela Popa, Teodora Stan, Veronica Lazar, Serban Vifor Bertesteanu and Mariana Carmen Chifiriuc, *Natural Compounds for Wound Healing*, in *Natural Compounds for Wound Healing*. 2016, Intech. p. 1-31.
 25. Xinyi Dai, J.L., Huaiyuan Zheng, Johannes Wichmann, Ursula Hopfner, Stefanie Sudhop, Carina Prein, Yi Shen, Hans-Günther Machens and Arndt F Schilling, *Nano-formulated curcumin accelerates acute wound healing through Dkk-1-mediated fibroblast mobilization and MCP-1-mediated anti-inflammation.* NPG Asia Materials, 2017. **9**: p. 1-14.
 26. Modasiya, M.K.a.P., M.V., *Studies on solubility of curcumin.* INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACY & LIFE SCIENCES, 2012. **3**(3): p. 1490-1497.
 27. E. M. Tanvir, M.S.H., Md. Fuad Hossain, Rizwana Afroz, Siew Hua Gan, Md. Ibrahim Khalil and Nurul Karim, *Antioxidant Properties of Popular Turmeric (Curcuma longa) Varieties from Bangladesh.* Journal of Food Quality, 2017. **2017**: p. 1-8.
 28. AJAY KUMAR, M.S., PREM PRATAP SINGH, SANDEEP KUMAR SINGH, PRATIMA RAJ, KAPIL D PANDEY, *ANTIOXIDANT EFFICACY AND CURCUMIN CONTENT OF TURMERIC (CURCUMA-LONGA L.) FLOWER.* International Journal of Current Pharmaceutical Research, 2016. **8**(8): p. 112-114.

29. Akbik D, G.M., Chrzanowski W, Rohanizadeh R, *Curcumin as a wound healing agent*. Life Sci., 2014. **116**(1): p. 1-7.
30. Teow, S.Y., et al., *Antibacterial Action of Curcumin against Staphylococcus aureus: A Brief Review*. J Trop Med, 2016. **2016**: p. 2853045.
31. Priyadarsini, K.I., *The chemistry of curcumin: from extraction to therapeutic agent*. Molecules, 2014. **19**(12): p. 20091-112.
32. Gokhan Emiroglu, Z.O.C., Yildiray Kalkan, Ozlem Celebi Erdivanli, Levent Tumkaya, Suat Terzi, Abdulkadir Özgür, Munir Demirci, and Engin Dursun, *The Effects of Curcumin on Wound Healing in a Rat Model of Nasal Mucosal Trauma*. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2017. **2017**: p. 1-6.
33. Manikandan Panchatcharam, S.M., Vinaya Subramani Gayathri, Lonchin Suguna, *Curcumin improves wound healing by modulating collagen and decreasing reactive oxygen species*. Molecular and Cellular Biochemistry, 2006. **290**(1-2): p. 87-96.
34. Miah, H.A.M., Hasan, M, Sarker, A.Y, Md Mahmudul Alam and Nasrin Sultana Juyena, *Clinical evaluation of ethanolic extract of curcumin (Curcuma longa) on wound healing in Black Bengal goats*. J. Adv. Vet. Anim. Res., , 2017. **4**(2): p. 181-186.
35. Negar Ghalandarlaki, A.A., and Soheil Ashkani-Esfahani, *Nanotechnology-Applied Curcumin for Different Diseases Therapy*. BioMed Research International, 2014. **2014**: p. 1-24.
36. Fu, L., *Delivery Systems in Wound Healing and Nanomedicine*, in *Wound Healing - New insights into Ancient Challenges*. 2016, INTECH. p. 75-97.
37. Radhika Gadekar, M.K.S., Gulab S.Thakur, Avinash Saurabh, *Study of formulation, characterisation and wound healing potential of transdermal patches of curcumin*. Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research, 2012. **5**(4): p. 225-230.
38. Van Cuong Nguyen, V.B.N., and Ming-Fa Hsieh, *Curcumin-Loaded Chitosan/Gelatin Composite Sponge for Wound Healing Application*. International Journal of Polymer Science, 2013. **2013**: p.1-8.
39. Momin M, K.S., Khanekar P, Mhatre S., *Novel biodegradable hydrogel sponge containing curcumin and honey for wound healing*. J Wound Care, 2016. **25**(6): p. 364-372.
40. Madasamy Parani, G.L., Ankur Singh, and Akhilesh K Gaharwar, *Engineered Nanomaterials for Infection Control and Healing Acute and Chronic Wounds*. ACS Appl. Mater. Interfaces 2016. **8**: p. 10049–10069.
41. Gisela Solange Alvarez, C.H.e., Andrea Mathilde Mebert, Xiaolin Wang, Thibaud Coradin and Martin Federico Desimone, *Antibiotic-loaded silica nanoparticle – collagen composite hydrogels with prolonged antimicrobial activity for wound infection prevention*. J. Mater. Chem. B, , 2014. **2**: p. 4660–4670.
42. Xinyi Dai, J.L., Huaiyuan Zheng, Johannes Wichmann, Ursula Hopfner, Stefanie Sudhop, Carina Prein, Yi Shen, Hans-Günther Machens & Arndt F Schilling, *Nano-formulated curcumin accelerates acute wound healing through Dkk-1-mediated fibroblast mobilization and MCP-1-mediated anti-inflammation*. NPG Asia Materials 2017. **9**: p. 1-14.
43. H.I.Meléndez-Ortiz, L.A.G.-C., Y.Olivares-Maldonado, G.Castruita, A.Mercado-Silva, Y.A.Perera-Mercado, *Preparation of spherical MCM-41 molecular sieve at room temperature: Influence of the synthesis conditions in the structural properties*. Ceramics International, 2012. **38**(8): p. 6353-6358.
44. AbouAitah KEA, F.A., Swiderska-Sroda A, Lojkowski W, Razin AMF,, *pH-controlled Release System for Curcumin based on Functionalized Dendritic Mesoporous Silica Nanoparticles*. J Nanomed Nanotechnol, 2016. **7**(1): p. 1-11.
45. Khaled EA AbouAitah, F.A., Anna Swiderska-Sroda, Witold Lojkowski, Abdel-Fattah M Razin and Khedr MH, *pH-controlled Release System for Curcumin based on Functionalized Dendritic Mesoporous Silica Nanoparticles*. Journal of Nanomedicine & Nanotechnology, 2016. **7**(1): p. 1-11.

46. Joong-Hyun Kim, T.-H.K., Min Sil Kang, and Hae-Won Kim, *Angiogenic Effects of Collagen/Mesoporous Nanoparticle Composite Scaffold Delivering VEGF165*. BioMed Research International, 2016. **2016**: p. 1-8.