

## ***Proiecte colaborative de cercetare aplicativa***

### **Proiect nr. 47**

#### **ETAPA III: Produse dermatologice pe baza de noi biomateriale obtinute din nanoparticule metalice functionalizate cu extracte din fructe din familia *Cornaceae* (sanger)**

#### **REZUMAT**

In cadrul Etapei III s-au preparat extracte din fructele de SANGER (*Cornus Sanguinea L*), un arbust ornamental care creste in Peninsula Balcanica. Extractul s-a obtinut in apa distilata, la temperatura camerei. Se obtin astfel principiile active hidrofile din fructe care au fost caracterizate fizico-chimic. S-a obtinut un continut de 42,36 mg echivalenti Cy-3-glu/L (continut total de antociani). S-au determinat valorile parametrilor cinetici ai reactiei de degradare a antocianilor din fructe de sanger la diferite temperaturi. Extractele apoase obtinute au fost purificate prin partiție cu acetat de etil apoi supuse extracției pe fază solidă, utilizându-se o rășină schimbătoare de ioni Dowex -50W-X8 (cationit), pe care au fost adsorbiți compușii cu structură antocianică. Compușii polari nearomatici și zaharurile libere s-au îndepărtat prin spălare cu apă distilată. Antocianii adsorbiți au fost eluați cu metanol acidulat (0.01% HCl) iar fracției antocianică a fost caracterizată prin cromatografie pe strat subțire și spectroscopie UV-VIS. **(partener P1)**

Extractele obtinute au fost folosite in continuare la prepararea de nanoparticule de aur si argint. S-au urmarit indeaproape conditiile de reactie si s-au ales cele optime (pH, temperatura, timp de reactie, raport reactanti). Solutiile coloidale obtinute au fost caracterizate prin spectroscopie UV-Vis, microscopie electronica de transmisie (TEM), spectroscopie in IR cu transformata Fourier (FTIR), difracție de raze X (RX) si calorimetrie de scanare diferentiala (DSC). Analizele au demonstrat formarea nanoparticulelor de aur si argint avand culorile rosu-inchis, respectiv galben-marou si diametrul mediu de 19 nm pentru AuNPs, respectiv 9 nm pentru AgNPs. Din spectrele FTIR se observa gruparile legate la suprafata nanoparticulelor metalice. **(Coordonator proiect CO)**.

S-a urmarit aprecierea efectului extractului de sanger precum si a bionanomaterialelor obtinute din acest extract si metalele nobile aur (Au) si argint (Ag) asupra viabilitatii keratinocitelor si asupra secretiei de catre acestea a unor citokine inflamatorii in conditii bazale si in urma stimulării (prin expunere la radiatii ultraviolete B- UVB). In cadrul etapei a IIIa a proiectului, echipa noastra a studiat toxicitatea nanoparticulelor de Au si Ag functionalizate cu extract de sanger (E4) pe linia celulara de keratinocite normale HaCaT si linia de carcinom epidermoid A431.

In concluzie:

Nanoparticulele de Au- AuNPE4- nu prezinta toxicitate asupra celor doua linii testate decat la cele mai mari concentratii, cand celulele tumorale A431 sunt mai afectate comparativ cu celulele normale.

Nanoparticulele de Au au efecte asupra eliberării citokinelor inflamatorii in felul urmatoar: •nu modifica in mod semnificativ eliberarea de IL-1 $\alpha$ ; expunerea la UVB nu duce la o crestere suplimentara a concentratiei de IL-1 $\alpha$ . •nu modifica secretia de TNF  $\alpha$  dar cand sunt expuse suplimentar la UVB, augmenteaza cresterea secretiei data de radiatii; •administrare singure nu duc la cresterea secretiei de IL6, dar la 24h si 48h dupa expunere la NP si iradiere au acelasi efect ca si in cazul TNF  $\alpha$ . Prin aceste

efecte, AuNPE4 dovedesc ca nu sunt toxice asupra keratinocitelor si ca au proprietati imunomodulatoare;

AgNPE4 au toxicitate superioara NP de Au, asupra ambelor linii, dar mai ales asupra celulelor tumorale.

Nanoparticulele de Ag •duc la eliberarea din celule a IL-1 $\alpha$ , exacerbata de expunerea la UVB; •secretia de TNF  $\alpha$  creste la 24h in urma administrarii de AgNPE4, dar nu se modifica prin expunerea la UVB; secretia de IL6 scade in urma epunerii la NP de Ag iar iradierea nu duce la o crestere a secretiei de IL6 la nici un interval in care se face determinarea. Aceste efecte sugereaza toxicitatea NP de Ag la concentratiile testate.

Extractul de sanger nu este toxic asupra keratinocitelor in cultura si duce la scaderea secretiei de IL6 si TNF  $\alpha$  cand este administrat cu 30 min. inaintea epunerii la UVB, dovedind proprietati antiinflamatorii.

### **partener P2)**

Nanomaterialele pe baza de nanoparticule metalice au fost evaluate din punct de vedere al toxicitatii precum si al efectului antiinflamator *in vivo*. Evaluarea efectelor s-a facut prin determinarea in dinamica, la intervale de 30 minute, 24h, 7 zile si 14 zile, a parametrilor hematologici si celor biochimici precum si prin aprecierea modificarilor histopatologice in coloratii uzuale din ficat, splina si rinichi. Studiul de toxicitate acuta a aratat ca, la dozele utilizate si la intervalele testate, nu apar modificari semnificative ale parametrilor hematologici, biochimici si histopatologici. Functia hepatica evaluata in dinamica, la 30 minute, 24h, 7 si 14 zile a relevat prezenta citolizei hepatice tardiv, la 14 zile dupa administrarea de nanoparticule de argint in doza medie si mare. Nu s-au evidentiat leziuni sugestive pentru toxicitate in tesutul hepatic, renal si splenic, nici la dozele mari si medii nici la doza mica de nanoparticule de aur si argint administrate. In concluzie putem afirma ca studiul de toxicitate sistemica cu doze variate de nanoparticule metalice nu releva la animale in dozele utilizate si la intervalele testate semne de toxicitate clinica, modificari ale parametrilor hematologici, biochimici si histopatologici. S-a evaluat si inflamatia experimentală indusa cu caragenan, la sobolani Wistar, prin aprecierea edemului inflamator plantar, a parametrilor de stres oxidativ, a markerilor de inflamatie prin western blot si pe sectiuni histologice, colorate in hematoxilina eozina. Au fost preparate creme cu dispersie de nanoparticule metalice de aur, respectiv de argint, cremă cu extract vegetal de sânger și cremă fără principii active (utilizată ca martor). Efectul antiinflamator al cremelor s-a testat prin aplicatii topice la nivelul pielii pe 16 subiecti umani. Concluzia studiului este că nanoparticulele metalice încorporate în creme nu au prezentat efectul antiinflamator scontat asupra leziunilor psoriazice. **(partener P3)**

Rezultatele au fost **diseminate** astfel: 5 lucrari in reviste nationale si internationale de specialitate, 1 brevet (OSIM), 9 conferinte internationale, 1 mobilitate.

**Toate activitatile au fost indeplinite.**