

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

### **Proiect nr. 147**

#### **ETAPA IV: Produse dermatologice pe baza de noi biomateriale obtinute din nanoparticule metalice functionalizate cu compusi de semisinteza derivati din antociani.**

##### **REZUMAT**

In cadrul Etapei IV s-a realizat designul si sinteza unor produsi de semisinteza cu antociani obtinuti din fructele unor plante indigene din familia *Cornaceae*. Fructele de corn (*Cornus Sanguinea L*) au fost supuse extracției cu apă distilată, la temperatura camerei, sub agitare continuă, timp de o oră, procesul având drept scop separarea colorantilor antocianici din fructe. După finalizarea extracției, suspensia obținută se filtrează la vid, obținându-se extractul brut de antociani. Amestecul de antociani rezultat se supune cromatografiei pe Sephadex LH-20. Soluțiile apoase obtinute au fost supuse cromatografiei pe strat subtire pentru identificarea antocianilor separati (prin comparare cu standard). Doar una dintre fractiile izolate a continut doar un singur compus, identificat ca fiind cianidin-3-O-glucozida. Stabilitatea structurilor antocianici poate fi imbunatatita prin reactii de copigmentare, in urma carora pigmentii antocianici si diversi compusi organici fara culoare, sau ioni metalici, formeaza asocieri moleculare sau complexe generand o modificare sau o intensificare a culorii. S-a constatat ca fenomenul de copigmentare este dependent de structura chimica a copigmentilor, de concentratia acestora, de pH si de temperatura mediului. In general, reactiile sunt spontane si au loc la valori mici ale pH-ului. Copigmentul ales in acest caz a fost triptofanul iar interactiunea acestuia cu cianidin-3-O-glucozida separata din fructele de corn a fost investigata la diferite valori ale pH-ului respectiv ale raportului molar antocian:copigment. (**partener P1**)

Copigmentii obtinuti au fost folositi in continuare la prepararea de nanoparticule de aur. Din cauza ca in prezenta copigmentului pH-ul solutiei nu se poate modifica, nu s-a reusit obtinerea de nanoparticule de argint. In cazul obtinerii nanoparticulelor de aur s-au urmarit indeaproape conditiile de reactie si s-au ales cele optime (pH, temperatura, timp de reactie, raport reactanti). Soluțiile coloidale obtinute au fost caracterizate prin spectroscopie UV-Vis, microscopie electronica de transmisie (TEM), spectroscopie in IR cu transformata Fourier (FTIR), difractie de raze X (RX). Analizele au demonstrat formarea nanoparticulelor de aur avand culorile albastru inchis. Din spectrele FTIR se observa gruparile legate la suprafata nanoparticulelor metalice. (**Coordonator proiect CO**).

In continuare s-a urmarit aprecierea efectului biomaterialelor pe baza de nanoparticule de aur functionalizate cu compusi de semisinteza din familia *Cornaceae* 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). De asemenea, s-a evaluat efectul biomaterialelor obtinute din nanoparticule de aur functionalizate cu produsi de

semisinteza cu antociani obtinuti din fructele unor plante indigene din familia *Adoxaceae* asupra viabilitatii unor culturi de keratinocite.

Efectul asupra viabilitatii keratinocitelor umane normale HaCaT si a celulelor de carcinom epidermoid A431 (citotoxicitatea) s-a evaluat prin testul de viabilitate cell titer blue (Promega) iar evaluarea efectului asupra secretiei citokinelor inflamatorii de catre keratinocitele tratate cu aceste biomateriale cu sau fara expunere la UVB s-a realizat prin determinarea citokinelor IL-1 $\alpha$ , IL-8 si IL-6 prin teste ELISA (Quantikine, R&D).

Din rezultatele obtinute s-au tras concluziile:

- Nanoparticulele metalice functionalizate cu compusi de semisinteza din familia *Cornaceae* sunt bine tolerate de keratinocite *in vitro*, viabilitatea acestora scazand in functie de doza administrata fiind semnificativa doar la doze mari. Morfologic, celulele nu prezinta semne de suferinta celulara;
- celulele tumorale au prezentat o sensibilitate crescuta fata de toxicitatea NP, dar diferenta nu a fost semnificativa;
- Secretia de citokine inflamatorii- in urma expunerii la nanoparticulele metalice in cazul celulelor HaCaT IL-1 $\alpha$  nu se modifica, IL6 creste la ambele doze iar cea de IL8 doar la doza cea mai mare.
- In cazul liniei A431, doar IL6 creste dupa expunerea la UVB. Adaugarea nanoparticulelor duce la cresterea eliberarii de IL6, dar nu si a IL8 si IL1 $\alpha$ .
- Nanoparticulele metalice functionalizate cu compusi de semisinteza din familia *Adoxaceae*, duc la scaderea viabilitatii keratinocitelor in functie de doza administrata fiind semnificativa doar la doze mari.
- Celulele tumorale au prezentat o sensibilitate crescuta fata de toxicitatea NP, dar diferenta nu a fost semnificativa;
- Comparand toxicitatea celor doua tipuri de NP, se constata ca nanoparticulele metalice cu histidina au o toxicitate mai mare decat cele cu triptofan, deoarece IC50 pentru primele este mult mai mare in cazul ambelor linii celulare. (**partener P2**)

**Partenerul P3** a urmarit testarea toxicitatii NPs de aur functionalizate cu compusi de semisinteza obtinuti prin reactia de copigmentare intre cianidin-3-O-galactozida, antocian extras din fructele de *Cornus mas*, cu triptofan, pe model animal, in administrare intravenoasa. Evaluarea efectelor s-a facut prin determinarea in dinamica, la intervale de 30 minute, 24h si 7 zile a parametrilor hematologici, biochimici si de stres oxidativ, ultimii atat din ser cit si din organe: ficat, rinichi si splina. Investigarea parametrilor hematologici în cadrul experimentului de toxicitate acută a aratat modificari tranzitorii semnificative ale nivelelor hemoglobinei, hematocritului, numarului de hematii, in special la doza mare de nanoparticule. Studiul de fata isi propune evaluarea inflamatiei experimentale induse cu caragenan, la sobolani Wistar, prin aprecierea parametrilor de stres oxidativ din omogenat de tesut plantar. De asemenea, s-a urmarit cuantificarea efectului antioxidant al unor bioconjugate formate prin reducerea nanoparticulelor metalice de aur cu compusi de semisinteza rezultati in urma reactiei intre cianidin-3-O-galactozida (antocian separat din extractul de *Cornus mas*) si un aminoacid (triptofan). Pentru aceasta etapă a proiectului s-a urmărit prepararea unor creme cu nanoparticule de aur functionalizate cu compusul de semisinteza obtinut din reactia de copigmentare intre cianidin-3-O-galactozid si triptofan. Aprecierea efectului antiinflamator a

preparatelor aplicate topic la nivelul pielii a fost efectuat pe un lot de 6 pacienti cu placi si placarde de psoriazis vulgar situate la nivel cutanat. Studiul urmareste testarea toxicitatii NPs de aur functionalizate cu compusi de semisinteza obtinuti prin reactia de copigmentare intre cianidin-3-O-galactozida, antocian extras din extractul de *Cornus mas*, cu histidina, pe model animal, in administrare intravenoasa. Pentru aceasta etapă a proiectului s-a urmărit si prepararea unor creme cu nanoparticule de aur functionalizate cu compusul de semisinteza obtinut din reactia de copigmentare intre cianidin-3-O-galactozid si histidina.

Rezultatele au fost **diseminate** astfel: 3 lucrari in reviste nationale si internationale de specialitate, 3 capitole de carti in edituri internationale, 9 conferinte internationale.

**Toate activitatile au fost indeplinite.**