

Stage II. Composite materials based on phenolic substances with antimicrobial potential for topical applications

In the third stage of the project PCE no. 117, all the foreseen activities were carried out and all result indicators were fulfilled with good results obtaining. The deliverables of this stage are: 2 composite materials containing mesoporous silica supports modified with Ag and Au nanoparticles (NPs) with determined features, 2 complex composite based on alginate containing wild bilberry leaves ethanolic extract encapsulated in mesoporous silica modified with Ag or Au, 2 collagen scaffolds modified with Zn(II) containing encapsulated wild bilberry leaves ethanolic extract incorporated in functionalized silica, chemical and thermal stability data of the encapsulated extract compared to the free one, antibacterial activities, biocompatibilities, antioxidant activities, anti-inflammatory activities.

Within the activity A3.1 - obtaining mesoporous silica modified with nanoparticles (NPs), dendritic silica particles functionalized with mercaptopropyl groups and then modified with Au NPs, support denoted dSiO₂-SH-Au and silica functionalized with aminopropyl groups and then modified with Ag NPs, MCM-NH₂-Ag. The presence of Au NPs or Ag NPs on the functionalized silica surface was evidenced by X-ray diffraction. Each silica supports modified with Au or Ag NPs showed high porosity (high values of the specific surface area and the total pore volume) determined from nitrogen adsorption-desorption isotherms.

Within the activity 3.2 - obtaining and characterizing the composite materials containing polyphenolic extract, the ethanolic extract from wild bilberry leaves prepared by extraction under inert gas pressure, denoted WB(E,HP), was encapsulated in the two supports modified with Au and Ag NPs prepared in this stage. The extract content of WB(E,HP)@MCM-NH₂-Ag and WB(E,HP)@dSiO₂-SH-Au samples, determined by thermogravimetric analysis, was 38.3% (wt) and 23.7% (wt), respectively.

The cytocompatibility, the anti-inflammatory activity and the level of the reactive oxygen species for the composite materials containing silica modified with Ag or Au NPs and wild bilberries extract were assessed on the human keratinocytes HaCaT cell line. The WB(E,HP) extract showed a good anti-inflammatory effect, as it significantly reduced the concentration of TNF- α cytokines, that was enhanced at higher treatment dose. The composite containing Au NPs led to a higher anti-inflammatory potential than the extract encapsulated in the support containing Ag NPs. The anti-inflammatory activity of the WB(E,HP)@dSiO₂-SH-Au sample correlates with its strong antioxidant activity, 47.98% of ROS being neutralized compared to 17.84% in the case of WB(E,HP)@MCM-Ag or 11.5% in the case of the free extract.

Within the activity 3.3 - *incorporation of extract-containing particles into a biopolymer for topical applications*, WB(E,HP)@MCM-NH₂-Ag and WB(E,HP)@dSiO₂-SH-Au composite materials were incorporated into alginate which was crosslinked using aqueous CaCl₂ solution. The alginate-based composites were lyophilized. Unfortunately, during crosslinking process, part of the extract was solubilized in CaCl₂ solution and in the washing water, the encapsulation efficiency being 70% in the case of the composite with Ag NPs and 68% in the case of the one containing Au NPs.

The prepared alginate-based composites showed a biocompatible showcase on the keratinocytes cell line, at treatment doses of 25 and 50 μ g/mL either after 24 h or 48 h of incubation period. Regarding the antioxidant activity on keratinocytes HaCat cell line, the presence of alginate in the composites had a positive effect considering that in the composite materials containing alginate, the extract content was lower than in the extract-silica composites.

At this stage, complex composites were designed using zinc-modified marine collagen porous scaffold as host for wild bilberry) leaves extract immobilized in mesoporous silica nanoparticles functionalized proline or propionic acid moieties for topical applications, wound dressings. The properties of the new composites demonstrated enhanced properties in terms of thermal stability of the zinc-collagen scaffold, without altering the protein conformation, and stimulation of NCTC fibroblasts mobility. The results of the scratch assay showed contributions of both zinc ions from collagen and the polyphenolic extract incorporated in functionalized silica in the wound healing process. The extract encapsulated in functionalized MSN proved enhanced biological activities compared to the extract alone: better inhibition of *P. aeruginosa* and *S. aureus* strains, higher biocompatibility on HaCaT keratinocytes, and anti-inflammatory potential demonstrated by reduced IL-1 β and TNF- α levels.

The obtained results were disseminated in 4 ISI published papers and 14 international conferences.

Etapa a 3-a/2024. Materiale compozite pe bază de compuși fenolici cu potențial antibacterian pentru aplicații topice

În această etapă a proiectului, s-au desfășurat toate activitățile prevăzute în planul de realizare și s-au îndeplinit toți indicatorii de rezultat, obținându-se rezultate bune.

În cadrul activității A3.1 - obținerea silicei mezoporoasă modificată cu heteroatomi, s-au sintetizat particule de silice dendritică funcționalizată cu grupări mercaptopropil și apoi modificată cu nanoparticule (NPs) Au, material denumit dSiO₂-SH-Au și silice funcționalizată cu grupări aminopropil și apoi modificată cu NPs de Ag, MCM-NH₂-Ag. Prezența NPs de Au, respectiv a NPs de Ag pe suprafața silicei funcționalizate a fost evidențiată prin difracția de raze X. Ambele suporturi de silice modificate cu NPs de Au, respectiv Ag au prezentat porozitate ridicată (valori mari ale suprafeței specifice și volumului total de pori) determinată din izotermele de adsorbție-desorbție a azotului.

În cadrul activității 3.2 - *obținerea și caracterizarea materialelor compozite ce conțin extract polifenolic*, s-a ales ca în cele două suporturi modificate cu NPs de Au și Ag să se încorporeze extractul etanolic din frunze de afin obținut prin metoda de extracție la presiune ridicată de gaz inert într-un reactor solvotermal, notat cu WB(E,HP). Conținutul de extract, determinat prin analiză termică, încorporat în cele două materiale compozite, WB(E,HP)@MCM-NH₂-Ag și WB(E,HP)@dSiO₂-SH-Au a fost de 38,3%(gr) respectiv de 23,7%(gr).

Materialele compozite ce conțin silice modificată cu NPs de Ag sau Au au fost evaluate din punct de vedere biologic prin testarea citocompatibilității, a efectului antiinflamator pe linia celulară de keratinocite umane. De asemenea, s-a determinat și nivelul de specii reactive de oxigen în cultura celulară de keratinocite, expuse la 50 μM t-butil hidroxid și apoi marcate cu soluție de 10 μM diacetat de 2,7'-diclorfluorescein *prin citometrie în flux*. Extractul WB(E,HP) a prezentat o activitate antiinflamatorie bună reducând semnificativ concentrația de citokine TNF-α odată cu creșterea cu dozei de tratament. Compozitul ce conține NPs de Au a condus la un potențial antiinflamator mai mare decât în cazul extractului încapsulat în suportul ce conține NPs Ag. Activitate antiinflamatorie a compozitului WB(E,HP)@dSiO₂-SH-Au se corelează și cu efectul antioxidant puternic, de neutralizare a SRO în proporție de 47,98% față de 17,84% în cazul WB(E,HP)@MCM-Ag sau 11,5% în cazul extractului liber.

În cadrul activității 3.3 - *încorporarea particulelor ce conțin extract într-un biopolimer pentru aplicații topice*, materialele compozite WB(E,HP)@MCM-NH₂-Ag și WB(E,HP)@dSiO₂-SH-Au au fost încorporate în alginat care a fost reticulat în soluție apoasă de CaCl₂. Compozitele pe bază de alginat au fost liofilizate. Din păcate, în timpul reticulării, o parte din extract s-a solubilizat în soluția de CaCl₂ și în apa de spălare a compozitelor cu alginat, eficiența încapsulării fiind de 70% în cazul compozitului cu Ag și 68% în cazul celui ce conține NPs Au.

Compozitele pe bază de alginat prezintă un comportament biocompatibil pe linia celulară de keratinocite, la dozele de tratament de 25 și 50 μg/mL atât după 24 h, cât și 48 h de incubare. În ceea ce privește efectul de neutralizare a SRO la nivel celular a keratinocitelor prezența alginatului în compozite a avut un efect pozitiv având în vedere că în materialele compozite cu alginat conținutul de extract a fost mai mic decât în compozitele de tip extract-silice modificată cu NPs.

În această etapă s-au dezvoltat noi compozite de tipul extract etanolic de frunze de afin încapsulat în silice mezoporoasă funcționalizată cu prolină sau acid propionic, încorporate într-o matrice de colagen modificat cu ioni de zinc, pentru aplicații topice, pentru vindecarea rănilor. Compozitele au prezentat proprietăți îmbunătățite în ceea ce privește stabilitatea termică a colagenului, cu conservarea conformației proteinei și stimularea mobilității fibroblastelor NCTC. Rezultatele testului de zgâriere au arătat contribuția atât a ionilor de zinc din colagen, cât și a extractului polifenolic încorporat în silice funcționalizată în procesul de vindecare a rănilor. Extractul încapsulat în nanoparticulele de silice funcționalizate a prezentat activități biologice îmbunătățite în comparație cu extractul liber: o mai bună activitate antimicrobiană față de bacteriile *P. aeruginosa* și *S. aureus*, biocompatibilitate superioară pe keratinocite HaCaT și un potențial antiinflamator prin reducerea nivelurilor de citokine IL-1β și TNF-α.

Rezultatele obținute au fost diseminate în 14 conferințe internaționale și în 4 articole ISI.