

Raport Stiintific Sintetic

Acest proiect a avut ca scop obtinerea, caracterizarea si analiza efectului nanoparticulelor de magnetită bioactive functionalizate cu compusi naturali obtinuti din plante asupra virulenței și persistenței unor tulpini de laborator și izolate clinice de *Pseudomonas aeruginosa*. Proiectul s-a desfasurat in perioada octombrie 2015 – noiembrie 2017 si a cuprins 3 etape.

Principalele rezultate obtinute in etapa 1 (perioada Octombrie – Decembrie 2015):

În această etapă au fost sintetizate materialele nanostructurate bioactive pe bază de compuși naturali de origine vegetală cu efect antimicrobian și au fost selectate tulpinile de *P. aeruginosa* ce urmeaza a fi utilizate pentru testele *in vitro*. Protocoalele de lucru, precum și rezultatele obținute au fost discutate in sedințe organizate cu membrii proiectului.

Nanoparticulele magnetice au fost obtinute printr-o metoda de de co-precipitare adaptata. Metodele de caracterizare utilizate sunt: Microscopia electronică prin transmisie (TEM), difracția de electroni pe arie selectată (SAED), Analiza termogravimetrica (TGA) si Difractia cu raze X (XRD).

Au fost selectate un numar de 10 tulpini de *Pseudomonas aeruginosa*, 9 izolate clinice cu diferite patternuri de virulenta si rezistenta si o tulpina control, de laborator (PAOI).

Obiectivele și activitățile prevazute in planul de realizare a proiectului pentru perioada Octombrie-December 2015 au fost atinse, activitatea de management de proiect desfașurandu-se in mod constant, pe intreaga perioada de desfasurare a proiectului.

Informații detaliate cu privire la rezultatele obtinute pot fi regasite in Rapoartul stiintific aferent etapei 1, depuse la sfarsitului perioadei de implementare a etapei 1, precum si pe pagina web a proiectului.

Principalele rezultate obtinute in etapa 2 perioada (Ianuarie - Decembrie 2016):

Pe parcursul acestei perioade s-au finalizat testele de caracterizare fizicochimica, precum si analiza antimicrobiana a nanoparticulelor de magnetită bioactive functionalizate cu compusi

naturali obtinuti din plante asupra virulenței și persistenței unor tulpini de laborator și izolate clinice, rezistente de *P. aeruginosa*.

Rezultatele obtinute au demonstrat ca nanomaterialele magnetice testate prezinta diferite proprietati antimicrobiene si antibiofilm, in functie de tipul de compus natural continut. Activitatea antimicrobiana a fost, de asemenea, diferita in randul tulpinilor microbiene testate, rezistenta acestora la actiunea nanomaterialelor corelandu-se cu rezistenta la antibiotice a acestora.

Receptivitatea cea mai pronuntata la actiunea nanomaterialelor a fost observata in cazul tulpinilor de laborator (ex PAO1), si a izolatelor clinice cu rezistenta la antibiotice mai scazuta. Nanoparticulele de magnetita functionalizate cu eugenol sau cu limonen au dovedit cel mai pronuntat efect antimicrobian, fiind eficiente atat in cazul tulpinilor de *P. aeruginosa* sensibile, cat si in cazul celor rezistente, eficienta acestui nanosistem fiind observata in culture planctonice si in biofilme.

In plus, concentratii subinhibitorii ale acestor nanomateriale/compusi vegetali purificati au modulat fenotipuri microbiene cheie, precum virulenta, persistenta si implicit rezistenta microorganismelor analizate.

Rezultatele obtinute sugereaza ca nanoparticulele de magnetita functionalizate cu compusi de origine vegetala ar putea fi utilizate cu succes in dezvoltarea de noi strategii antimicrobiene, fiind capabile sa limiteze multiplicarea microorganismelor si sa inhibe dezvoltarea de biofilme, dar si sa interfere cu fenotipuri cheie de virulenta, atunci cand sunt utilizate in concentratii subinhibitorii.

Pe parcursul acestei etape s-au realizat 2 intalniri de lucru (mese rotunde) la care au participat membrii echipei proiectului, in cadrul carora s-au discutat protocoalele de lucru, dar si rezultatele preliminare obtinute.

In aceasta perioada au fost publicate/communicate 9 lucrari cu acknowledgementul proiectului: 3 articole cu cotatione ISI, 1 articol BDI, 3 capitole de carte la edituri internationale si 2 postere, care au fost prezentate in cadrul unor manifestari stiintifice internationale.

Informații detaliate cu privire la rezultatele obținute pot fi regasite în Rapoartul științific aferent etapei 2, depuse la sfârșitul perioadei de implementare a etapei 2, precum și pe pagina web a proiectului.

Principalele rezultate obținute în etapa 3 (perioada Ianuarie - Noiembrie 2017):

În a treia și ultima etapă a proiectului s-a analizat expresia unor gene care controlează comportamentul social, virulența și rezistența microorganismelor sub influența nanosistemelor magnetice funcționalizate dezvoltate.

Rezultatele au arătat că aceste nanoparticule funcționalizate au capacitatea de a modula specific expresia genelor de Quorum Sensing (QS), într-o manieră dependentă de compusul bioactiv conținut, dar și de tulpina de *P. aeruginosa* testată.

Astfel, expresia principalelor gene de QS, respectiv *lasI*, *lasR*, și *rhlR* a fost supraexprimată în mod semnificativ în urma tratamentului cu nanoparticulele funcționale obținute, în cazul utilizării unor tulpini de *P. aeruginosa* cu rezistență la antibiotice crescută și cu virulență moderată sau accentuată.

În schimb, pentru tulpinile de *P. aeruginosa* mai sensibile sau cu virulență mai scăzută, cum este cazul tulpinii P.a 1 și a tulpinii de laborator PAOI (notate P.a 10) rezultatele au arătat că nanoparticulele magnetice funcționalizate determină mai degrabă scăderea expresiei genelor de QS. Acest rezultat ar putea fi corelat cu scăderea fenotipurilor de virulență a acestor tulpini, fiind cunoscut faptul că semnalizarea moleculară QS reprezintă mecanismul central de control al virulenței microbiene.

Nanoparticulele de magnetita control (nefuncționalizate) au prezentat un efect nesemnificativ asupra expresiei genelor QS, rezultatele sugerând că aceste diferențe în expresia genică se datorează în primul rând activităților biologice ale compusilor naturali utilizați, iar nanoparticulele magnetice utilizate au rolul de a potența efectul acestora, însă nu determină efecte biologice semnificative în stare nefuncționalizată.

Al doilea obiectiv abordat în această etapă se referă la evaluarea biocompatibilității *in vitro* și *in vivo* și a biodistributiei *in vivo*, pe model murin.

Studiile *in vitro* au aratat ca nanomaterialele utilizate nu prezinta manifestari toxice, permitand dezvoltarea normala a celulelor diploide umane in cultura. Celulele utilizate au prezentat morfologie si proliferare normale in prezenta materialelor nanostructurate obtinute.

Rezultatele au aratat ca nanoparticulele utilizate nu determina manifestari toxice evidente asupra organelor vitale ale soarecilor albi balbC analizati, toti soarecii testati pastrandu-si viabilitatea si comportamentul obisnuit in timpul efectuarii experimentelor.

Cu toate acestea, s-a observat ca nanoparticulele utilizate s-au aglomerat preferential in anumite organe, formand agregate macromoleculare, vizibile la microscopul optic in sectiunile de tesut.

Analiza sectiunilor de organe s-a realizat din probe prelevate la 2 zile si la 10 zile dupa inocularea intraperitoneala a nanoparticulelor. La ambele variante de timp analizate, s-a constatat ca nanostructurile magnetice simple sau functionalizate sunt absente în creier, miocard și pancreas, insa agregate de nanoparticule au fost vizibile la microscop în sectiunile de ficat, plămân, rinichi și splină.

Prezenta agregatelor de nanoparticule in aceste tesuturi nu pare sa fie dependenta de tipul de compus bioactiv utilizat, nanoparticulele de magnetita simple prezentand acelasi pattern de biodistributie ca si nanoparticulele de magnetita functionalizate.

In sectiunile de organe in care erau vizibile nanoparticule s-au observat modificari asociate cu inflamatiya, probabil datorita prezentei fagocitelor care au endocitat activ agregatele de nanoparticule prezenta in tesut.

Studiul realizat sugereaza ca nanoparticulele magnetice functionalizate prezinta specificitate de tesut, fiind capabile sa formeze agregate in organe bine vascularizate, probabil datorita transportului acestora pe cale sangvina.

Datorita activitatilor antimicrobiene si modulatori ale unor mecanisme de virulenta si rezistenta la nivel molecular si fenotipic, dar si a biocompatibilitatii demonstrate *in vitro* si *in vivo*, nanoparticulele magnetice obtinute ar putea fi considerate noi strategii antimicrobiene eficiente si ecologice, care ar putea fi utilizate pentru tintirea specifica a unor infectii, greu de tratat.

Obiectivele și activitățile prevazute în planul de realizare a proiectului pentru perioada Ianuarie -Noiembrie 2017 au fost atinse, activitatea de management de proiect desfășurându-se în mod constant, pe întreaga perioadă de desfășurare a proiectului.

În această perioadă au fost realizate 2 mese rotunde (întâlniri) cu membrii proiectului pentru discutarea planurilor de lucru și respective a rezultatelor obținute. Detalii cu privire la activitățile desfășurate și la rezultatele obținute, se pot regăsi în raportul etapei 3 (perioada Ianuarie-Noiembrie 2017).

În această perioadă au fost publicate 2 articole ISI, 1 capitol de carte și au fost comunicate 4 lucrări științifice la conferințe internaționale. Una dintre lucrările prezentate a câștigat premiul întâi la secțiunea: *Cea mai bună lucrare tip poster* (EMRS spring 2017, Strasbourg, Franța).

Activitatea de management de proiect s-a desfășurat în mod constant, pe întreaga perioadă de implementare a proiectului. Obiectivele propuse au fost atinse și experimentele au fost lucrate conform planului de realizare al proiectului.

Publicatii pe întreaga perioadă de implementare a proiectului

Articole ISI:

Alina Maria Holban, Monica Cartelle Gestal, Alexandru Mihai Grumezescu. Control of biofilm-associated infections by signaling molecules and nanoparticles. International Journal of Pharmaceutics, 2016, doi:10.1016/j.ijpharm.2016.02.044. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517316301491>

Eva Torres-Sangiao, Alina Maria Holban and Monica Cartelle Gestal. Advanced Nanobiomaterials: Vaccines, Diagnosis and Treatment of Infectious Diseases. Molecules 2016, 21, 867; doi: 10.3390/molecules21070867. <http://www.mdpi.com/1420-3049/21/7/867>

Alexandra Elena Oprea, Loredana Mihaela Pandel, Ana Maria Dumitrescu, Ecaterina Andronescu, Valentina Grumezescu, Mariana Carmen Chifiriuc, Laurentiu Mogoanta, Tudor-Adrian Balaseanu, George Dan Mogosanu, Gabriel Socol, Alexandru Mihai Grumezescu, Florin Iordache, Horia Maniu, Mariana Chirea and Alina Maria Holban. Bioactive ZnO Coatings Deposited by

MAPLE—An Appropriate Strategy to Produce Efficient Anti-Biofilm Surfaces. *Molecules* 2016, 21(2), 220; doi: 10.3390/molecules21020220. <http://www.mdpi.com/1420-3049/21/2/220>

P.C. Balaure, B. Boarca, R.C Popescu, D. Savu, R. Trusca, B.Ş. Vasile, A.M. Grumezescu, A. M. Holban, A. Bolocan, E. Andronescu. Bioactive mesoporous silica nanostructures with anti-microbial and anti-biofilm properties. *International Journal of Pharmaceutics*, 531, 1, 5 2017, 35-46. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037851731730769X>

C. Curutiu, L.M. Ditu, F. Iordache, C. Bleotu, M.C. Chifiriuc, V. Lazar, D.N. Paduraru, A. M. Holban. Quorum Sensing molecules produced by *Pseudomonas aeruginosa* impair attachment and biofilm formation in *Candida albicans*. *Biointerface Research in Applied Chemistry*. 7, 2, 2017, 2016-2020. http://biointerfaceresearch.com/?page_id=2015

Articole BDI:

Ioannis L. Liakos, Alexandru Mihai Grumezescu, Alina Maria Holban, Iordache Florin, Francesca D'Autilia, Riccardo Carzino, Paolo Bianchini and Athanassia Athanassiou. Polylactic Acid—Lemongrass Essential Oil Nanocapsules with Antimicrobial Properties. *Pharmaceuticals* 2016, 9, 42; doi: 10.3390/ph9030042, <http://www.mdpi.com/1424-8247/9/3/42>.

Capitole de carte:

Alina Maria Holban, Ecaterina Andronescu, Carmen Curutiu, Lia-Mara Ditu, Mariana Carmen Chifiriuc and Veronica Lazar. Bioactive nanomaterials for cartilage and muscle regeneration. Pag 261 – 297, in the volume *Nanobiomaterials in Soft Tissue Engineering*, Elsevier, Editor Alexandru Grumezescu, 2016, DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-323-42865-1.00010-6>. [Print Book ISBN :9780323428651](#)

Ecaterina Andronescu, Alexandru Mihai Grumezescu, Mădălina-Ionela Gușă, Alina Maria Holban, Florina-Cristina Ilie, Alexandra Irimia, Irina-Florentina Nicoara and Mihaela Tone. Nano-hydroxyapatite: novel approaches in biomedical applications. Pag 189-213, in the volume *Nanobiomaterials in Hard Tissue Engineering: Applications of Nanobiomaterials*, Elsevier, edited by Alexandru Grumezescu, 2016, ISBN 9780323428620. <http://www.sciencedirect.com/science/book/9780323428620>.

Florin Iordache, Irina Gheorghe, Veronica Lazar, Carmen Curutiu, Lia Mara Ditu, Alexandru Mihai Grumezescu, Alina Maria Holban. Nanostructured materials for prolonged and safe food preservation. Food Preservation, Chapter 9, p. 305-331, edited by Alexandru Grumezescu, 2016, ISBN 978-0-12-804303-5. <http://www.sciencedirect.com/science/book/9780128043035>.

V. Grumezescu, A.M. Holban, I. Barbu, R.C. Popescu, A.E. Oprea, V. Lazar, A.M. Grumezescu and M.C. Chifiriuc. Nanoarchitectonics used in antiinfective therapy. ch 7 in: Antibiotic Resistance: Mechanisms and New Antimicrobial Approaches, eds. Kateryna Kon and Mahendra Rai. Elsevier, 2016.

Participari la conferinte:

A.M. Holban, E. Andronescu, A.M. Grumezescu, L.M. Ditu, C. Curutiu, V. Lazar, V. Grumezescu, Otilia Vasile, C.M. Chifiriuc. Magnetite nanoparticles functionalized with plant derived compounds reduce the resistance and persistence of opportunistic pathogens. ECCMID 9-12.04.2016, 2016, Amsterdam, Netherlands, P1287.

A.M. Holban, E. Andronescu, A.M. Grumezescu, L.M. Ditu, C. Curutiu, V. Lazar, V. Grumezescu, B. Vasile, C.M. Chifiriuc. Magnetite nanoparticles functionalized with β -pinene modulate virulence, attachment and biofilm formation of opportunistic pathogens. 10TH INTERNATIONAL CONFERENCE ON PHOTOEXCITED PROCESSES AND APPLICATIONS (ICPEPA), Aug 29 – Sept 2, 2016, Brasov, Romania.

A. Grumezescu, A. Holban, R. Popescu, O. Fufa, P. Balaure. Chitin-based bionanocomposites for wound-healing applications. 27th ECCMID, 22-25 Aprilie 2017, Viena, Austria.

A M Holban, A M Grumezescu, M C Chifiriuc, V Grumezescu, L M Ditu, C Curutiu, AI Cotar, E Sarbu, E Andronescu, V Lazar. Fe₃O₄ nanoarchitectures functionalized with eugenol modulate virulence, biofilm formation and Quorum Sensing molecular signaling in Pseudomonas aeruginosa. EMRS, May 22 - 26, 2017, Strasbourg, Franta – BEST POSTER AWARD.

A.M. Holban, A.M. Grumezescu, L.M. Ditu, C. Curutiu, C. Bleotu, V. Grumezescu, C. Chifiriuc, V. Lazar. Limonene functionalized magnetite nanoparticles for improved antimicrobial and immunomodulatory therapy. 42nd FEBS Congress, 7-14 September 2017, Ierusalim, Israel.

A M Holban, A M Grumezescu, M C Chifiriuc, L M Ditu, C Curutiu, V Grumezescu, C Bleotu and V Lazar. Magnetite nanoparticles as efficient nanoshuttles for the delivery of antimicrobial natural volatile compounds. ANM 2017, 19-21 iulie 2017, Aveiro, Portugalia.