

Raport de activitate pe toata perioada de desfasurare a proiectului

Scopul acestui proiect a fost de a sintetiza si de a caracteriza din punct de vedere fizico-chimic si biologic materiale nanostructurate de tip core-shell pe baza de magnetita functionalizata cu diferite substante naturale sau sintetice cu efect antimicrobian.

Proiectul s-a desfasurat pe o perioada de 2 ani (24 luni) si a cuprins 3 etape de raportare a rezultatelor.

Etapa I.

In prima etapa de realizare a acestui proiect s-a urmarit: *Sinteza si caracterizarea nanoparticulelor bioactive de tip core shell.*

Pentru aceasta activitatile propuse si atinse sunt urmatoarele: 1) Obtinerea nanoparticulelor tip core shell bioactive, 2) Caracterizarea prin metode fizico-chimice a nanostructurilor bioactive obtinute, 3) Caracterizarea preliminara a efectului antimicrobian - optimizarea metodelor de testare, si 4) Documentare, planificare, diseminare, management de proiect, activitate realizata pe tot parcursul proiectului.

Materiale si metode

1. Obtinerea nanoparticulelor de magnetita dispersate in polietilenglicol ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PEG}$)

Nanoparticulele au fost obtinute printr-o metoda de co-precipitare a ionilor de Fe^{2+} si Fe^{3+} intr-o solutie bazica de polietilenglicol. Astfel, pentru prepararea nanoparticulelor magnetice dispersate in polietilenglicol ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PEG}$), s-au preparat doua solutii. Prima solutie s-a obtinut prin adaugarea intr-un pahar Berzelius a 300 mL apă demineralizată, 1,6 g de sulfat feros (FeSO_4) și 1 g de clorură ferică (FeCl_3), amestecându-se cu o baghetă de sticlă după fiecare adăugare. Ulterior, solutia de ioni Fe^{2+} si Fe^{3+} a fost filtrata si pastrata la rece pana la utilizare. Pentru obtinerea celei de-a doua solutii, s-au adăugat intr-un pahar Berzelius 300 mL de apă demineralizată, 1g de PEG (grad de polimerizare 1000) și 8 mL de hidroxid de amoniu (NH_4OH); solutia obtinută a fost supusă agitării, pe o plită magnetică.

După prepararea celor două solutii, s-a picurat solutia de ioni Fe^{2+} si Fe^{3+} peste solutia bazica de PEG, care se afla, în continuare, pe plita magnetică, sub agitare. Picurarea s-a realizat cu

ajutorul unei pompe peristaltice. După încheierea picurării, agitarea a fost oprită și s-a observat decantarea unei dispersii de culoare neagră. Aceasta a fost separată de produsele secundare de reacție cu ajutorul unui magnet NdFeB, și ulterior spălată în repetate rânduri cu apă demineralizată. În final, produsul obținut a fost lăsată la uscat, la temperatura camerei.

2. Obținerea nanoparticulelor de tip core/shell - Fe₃O₄/PEG@SiO₂

În ceea ce privește obținerea nanostructurilor de tipul Fe₃O₄/PEG@SiO₂, o cantitate de 500mg de nanoparticule de magnetite Fe₃O₄/PEG a fost dispersată în 50mL de apă deionizată, apoi au fost adăugați 44mL de etanol și 16mL de hidroxid de amoniu de concentrație 25%. Amestecul se supune agitării magnetice 10 minute. Se adaugă o cantitate de 50 mg de TEOS și se menține sub agitare magnetică timp de 4h la temperatura camerei. Amestecul rezultat a fost filtrat, spălat cu apă deionizată și uscat.

3. Obținerea nanoparticulelor de tip Fe₃O₄/PEG@SiO₂ cu adaos de agenți terapeutici naturali și de sinteză

În ceea ce privește adsorbția agenților terapeutici în rețeaua de silice construită pe suprafața nanoparticulelor de tipul Fe₃O₄/PEG, s-au realizat următoarele: 95 mg de nanopulbere de tipul Fe₃O₄/PEG a fost omogenizată într-un mojar cu 5 mg de agent terapeutic solid (antibiotice), respectiv, 5 μL de agent terapeutic lichid (uleiuri esențiale) în prezența a 2 mL de cloroform. Omogenizarea s-a realizat până la evaporarea completă a cloroformului. Ulterior, probele au fost ținute în hotă cu flux laminar timp de 24 de ore pentru a elimina excesul de ulei esențial și posibilele urme de cloroform din probe. Probele astfel obținute au fost ulterior caracterizate fizico-chimic și biologic. Agenți terapeutici utilizați sunt prezentați în tabelul I.1.

Tabelul I.1. Lista agenților terapeutici (AT) utilizați.

Agenți terapeutici naturali			Agenți terapeutici de sinteză		
	Denumire	Cod		Denumire	Cod
Uleiuri esențiale	Busuioc (<i>Ocimum basilicum</i>)	BUS	Antibiotice	Cefotaxim	CEF
	Ghimbir (<i>Zingiber officinalis</i>)	GHI		Cefuroxim	CFR
	Cuisoare (<i>Eugenia caryophyllata</i>)	CUI		Cefort	CFT
	Salvie (<i>Salvia officinalis</i>)	SAL			
	Eucalipt (<i>Eucalyptus globulus</i>)	EUC			

	Dafin (<i>Laurus nobilis</i>)	DAF			
	Scortisoara (<i>Cinnamomum verum</i>)	SCO			

4. Tehnici de caracterizare

a. Microscopie electronica de baleiaj (SEM)

În scopul investigării morfologiei și dimensiunii nanostructurilor obținute, probele au fost introduse în incinta de analiză a unui microscop electronic de baleiaj achiziționat de la compania FEI (Oregon, SUA), imaginile obținute fiind realizate prin înregistrarea fasciculului de electroni secundari rezultat, cu energie de 30 keV.

b. Microscopie electronica prin transmisie (TEM)

În scopul obținerii imaginilor TEM, s-a folosit un microscop electronic de transmisie de înaltă rezoluție de tip TecnaiTM G2 F30 S-TWIN echipat cu modul SAED, achiziționat de la compania FEI (Oregon, SUA). Acest microscop funcționează în modul de transmisie la o tensiune de 300 kV, rezoluția punctuală și de linie garantate având valorile de 2Å, respectiv 1Å.

c. Difractie de raze X (XRD)

Analiza XRD a fost realizată utilizând un difractometru Empyrean echipat cu monocromator hibrid și detector PIXcel3D, de la PANalytical (Almelo, Olanda). În acest sens, o cantitate mică de material pulverulent sintetizat a fost investigată prin utilizarea radiației CuK α ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$) a instrumentului, care a permis să scaneze la fiecare 3 secunde între 5° și 80° 2 θ unghiuri de împrăștiere, la 0,5° unghiul de incidență.

d. Spectroscopie de InfraRosu cu transformata Fourier (FT-IR)

Pentru investigarea integrității grupelor funcționale caracteristice nanoparticulelor obținute, o cantitate redusă de nanoparticule a fost analizată prin intermediul unui cristal de ZnSe al spectrometrului de tip FT-IR Nicolet 6700, achiziționat de la compania Thermo Nicolet (Wisconsin, Statele Unite ale Americii). Măsurătorile au fost efectuate la temperatura camerei, fiind efectuate 32 de scanări ale probei între 4000 și 500 cm $^{-1}$, la o rezoluție de 4 cm $^{-1}$. Înregistrarea informațiilor astfel achiziționate a fost posibilă prin conectarea spectrometrului la o unitate de preluare și prelucrare a datelor, prin intermediul programului de lucru Omnic (versiunea 8.2 Thermo Nicolet).

e. Analiza termodiferentiala – termogravimetrica (DTA-TG)

Analiza termica s-a realizat cu ajutorul unui aparat STA TG/DSC Netzsch Jupiter 449C, in intervalul de temperatura 25-900°C, in atmosfera dinamica de 50 mL/min aer, cu o viteza de incalzire de 10K/min in creuzet din alumina (Al_2O_3).

Rezultate obtinute

Microscopie electronica de baleiaj

Pulberea obtinuta a fost caracterizata prin Microscopie Electronica de Baleiaj. Aceasta analiza a permis identificarea morfologiei si domeniului de dimensiune. Din punct de vedere morfologic, pulberea contine particule de morfologie aproape sferica si dimensiuni nanometrice. Estimările realizate pe baza imaginilor SEM evidentiaza o dimensiune ce nu depaseste 10 nm.

Microscopie Electronica prin Transmisie (TEM)

Ulterior confirmarii dimensiunilor nanometrice utilizand SEM, pulberea $Fe_3O_4/PEG@SiO_2$ a fost caracterizata prin Microscopie Electronica prin Transmisie. Analizand imaginile, se observa dimensiunea nanometrica a particulelor, dimensiune ce nu depaseste 10 nm. Exista o tendinta de aglomerare a nanoparticulelor de magnetita. Se distinge o morfologie aproape sferica, formata din doua faze: una de cristalinitate ridicata cu diametru de 7-9 nm, si o faza cu cristalinitate redusa ce poate fi atribuita rețelei de silice obtinuta din TEOS.

Se poate observa ca nu exista prezente alte faze cristaline, unica faza cristalina identificata fiind cea a magnetitei identificata cu ajutorul inelelor de difractie si a masuratorilor specifice.

Difractie de Raze X (XRD)

Proba control $Fe_3O_4/PEG@SiO_2$ si cele 10 variante experimentale $Fe_3O_4/PEG@SiO_2 - AT$ au fost caracterizate din punct de vedere al cristalinitatii utilizand difractia de raze X. Rezultatele obtinute sunt prezentate in figura 4. In cazul tuturor probelor caracterizate au fost indentificate interferente de difractie caracteristice magnetitei, singura faza cristalina prezenta. Interferentele de difractie au o intensitate scazuta, sunt late, aspect ce evidentiaza structura nanometrica a probelor caracterizate.

Rezultatul difracției de raze X efectuată pentru pulberile obtinute demonstrează corespondența cu interferențele de difracție caracteristice ale magnetitei. Pattern-ul are peak-uri caracteristice la 18.31° (111), 30.33° (220), 35.51° (311), 43.16° (440), 53.61° (422), 57.17° (511), 62.82° (440). Toate interferențele pot fi indexate folosind fișa JCPDS numărul 19-0629 corespunzătoare magnetitei.

Din analiza comparativă a pattern-urilor rezultate în urma analizei de difracție de raze X efectuată pentru probele de magnetită se poate observa faptul că prezența agenților terapeutici naturali sau de sinteză nu a afectat structura cristalină specifică magnetitei. Datorită cantității mici de agent terapeutic adsorbită la suprafața nanoparticulelor obținute, nu s-a observat o diminuare considerabilă a intensității interferențelor de difracție.

Spectroscopie FT-IR

Nanopulberile de tipul $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PEG}@/\text{SiO}_2$ și $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PEG}@/\text{SiO}_2 - \text{AT}$ au fost caracterizate prin spectroscopie de infraroșu cu transformata Fourier.

Se poate observa că toate variantele experimentale prezintă banda de absorbție caracteristică legăturii Fe-O caracteristică magnetitei. Aceasta este prezentă la 555 cm^{-1} . De asemenea, se observă o bandă de absorbție de intensitate moderată, caracteristică legăturilor Si-O-Si, la 1044 cm^{-1} , ce este atribuită rețelei de silice prezente în structura nanopulberilor.

De remarcat faptul că nanopulberea de tipul $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PEG}@/\text{SiO}_2$ prezintă o intensitate a benzilor de absorbție caracteristice legăturilor C-H din PEG sub limita de detectare a echipamentului utilizat, spre deosebire de celelalte probe, cu conținut de agent terapeutic, unde se pot observa benzi de absorbție la diverse lungimi de undă: 2981 cm^{-1} , 2964 cm^{-1} , 2923 cm^{-1} , 2944 cm^{-1} .

Analiza termodiferențială – termogravimetrică (DTA-TG)

Pentru toate probele s-a măsurat pierderea de masă de la $25-200^\circ\text{C}$ și de la $200-900^\circ\text{C}$. Pentru prima etapă se observă un efect endoterm, o pierdere de apă, grupări -OH legate la suprafață și în cazul probelor acoperite cu diverse substanțe se pierd și moleculele cele mai volatile. Magnetita suferă un proces de oxidare în jur de 300°C (297.9°C) când trece în maghemita. Maghemita trece mai departe în hematit, transformare fizică atribuită peakului de 407.7°C , în cazurile analizate (figurile I.7-I.9).

La fiecare probă acoperită avem pierderi de masă mai mari, ceea ce indică existența substanțelor organice în plus, care este degradată, oxidată. În principiu substanțele organice nu lasă reziduu. Modul de calcul este redat mai jos pentru a vedea câtă substanță organică este depusă pe suportul de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PEG}/\text{SiO}_2$.

Daca avem x grame cefort si y grame magnetita, si presupunem ca toata substanta depusa se arde, iar suportul magnetita_PEG_SiO₂ are același comportament in toate probele, atunci avem:

- reziduul lasat de x = 0 si reziduul lasat de y este 0.9354y;
- pentru ca reziduul masurat este 86.74% = 0.9354y, iar x+y = 100, avem $x = 100 - 86.74/0.9354$
- deci $x = 7.27\%$

Desigur ca avand o substanta in plus apar mici modificari, mai ales pe partea de efecte termice. Pe curba DSC se observa aparitia unor efecte termice exoterme in plus, datorate oxidarii partii organice, si de asemenea apar modificari ale peakurilor magnetitei. Oxidarea Fe(II) la Fe(III) are loc la o temperatura mai mare, pentru ca intai trebuie oxidata partea organica care protejeaza in plus magnetita. La oxidarea la temperatura joasa (3-400°C) substanta organica se oxideaza incomplet, lasand de obicei in urma o masa carbonica (carbon nereactionat). Acesta are proprietati reducatoare si superficial poate reduce la loc Fe(III) la Fe(II), alterand suprafata nanoparticulelor. Aceste alterari modifica si temperatura tranzitiei maghemita-hematit in sensul cresterii ei.

In cazul probei Fe₃O₄/PEG@SiO₂-SCO apare un singur efect exoterm, larg, cu maximul la 345.3°C dar care este obtinut prin suprapunerea mai multor efecte sub o singura gaussiană.

Pentru proba Fe₃O₄/PEG@SiO₂-CUI (c) al doilea efect exoterm, observabil la 396°C este un umar, iar pozitia exacta a acestui eveniment este dificil de precizat. Cele doua efecte (323 si 396) sunt partial suprapuse.

Referitor la evaluarea preliminara a efectului antimicrobian, in aceasta etapa au fost selectate si caracterizate tulpinile microbiene ce ureaza a fi utilizate in studiu. Astfel, s-au selectat un numar de 2 tulpini microbiene de *Staphylococcus aureus*, specie model Gram pozitiva (1 tulpina de laborator – *S. aureus* subsp. aureus Rosenbach ATCC ® 25923 si 1 izolata clinic, rezistenta la antibiotice (MRSA= Methicilin resistant *S. aureus*); 2 tulpini de *Escherichia coli*, specie model Gram negativa, (1 tulpina de laborator - *E. coli* ATCC® 25922 si 1 izolata clinic), 2 tulpini de *Pseudomonas aeruginosa* (1 tulpina de laborator *P. aeruginosa* (Schroeter) Migula ATCC ® 27853 si 1 izolata clinic multirezistenta), si 1 tulpina levurica, respectiv de *Candida albicans* si 4

tulpini izolate din microbiota intestinala de nou-nascut in anul 2018 (*Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Enterococcus faecium* si *Enterococcus faecalis*). Toate tulpinile microbiene utilizate in studiu fac parte din colectia de tulpini a laboratorului de Microbiologie, Facultatea de Biologie, Universitatea din Bucuresti, institutie ce sprijina efectuarea acestor studii in parteneriat.

Pe parcursul acestei etape s-a publicat un articol stiintific (ISI) si au fost elaborate 3 lucrari stiintifice care au fost prezentate la manifestari stiintifice internationale. Toate publicatiile raportate contin acknowledgementul proiectului si rezultatele continute in acestea sunt partial regasite in prezenta raportare sau vor fi incluse (dupa completare) in raportarile viitoare.

Etapa II.

In cea de-a doua etapa de realizare a acestui proiect s-a urmarit: ***Caracterizarea efectului antimicrobial si antibiofilm al nanoparticulelor (NPs) core@shell dezvoltate.***

Pentru aceasta activitatile propuse si atinse sunt urmatoarele: 1) Analiza calitativa a efectului antimicrobial al nanosistemelor dezvoltate, 2) Analiza cantitativa a efectului antimicrobial al nanosistemelor dezvoltate, 3) Evaluarea impactului nanosistemelor obtinute asupra virulentei microorganismelor testate, 4) Analiza impactului nanosistemelor dezvoltate asupra aderenței si capacității de a produce biofilme microbiene, si 5) Documentare, planificare, diseminare, management de proiect.

Materiale si metode

Obtinerea nanoparticulelor (NPs) de tip $Fe_3O_4/PEG@SiO_2$ cu adaos de agenti terapeutici naturali si de sinteza s-a realiza in etapa anterioara.

Tulpinile utilizate pentru acest studiu (*Candida albicans* ATCC 10231 = tulpina levurica model, cu impact clinic, *Escherichia coli* ATCC 25922 = tulpina bacteriana Gram negativa model cu impact clinic, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 = tulpina bacteriana Gram negativa model de patogen oportunist, *Staphylococcus aureus* ATCC 23235 = tulpina bacteriana Gram pozitiva model de patogen oportunist și *Bacillus subtilis* ATCC 23857 = tulpina bacteriana Gram pozitiva model cu impact clinic) au fost obținute din colecția de tulpini a laboratorului de Microbiologie, Facultatea de Biologie, Universitatea din București. Tulpinile de microorganisme au fost

menținute pentru conservare pe mediu nutritiv lichid (bulion simplu) suplimentat cu 20% glicerol (stock-uri pe bulion glicerol), la o temperatură de -80°C .

II.1. Analiza calitativa a efectului antimicrobian al nanosistemelor dezvoltate

Pentru obtinerea de culturi proaspete, microorganismele din stock-uri pe bulion glicerol au fost insamantate pe medii nutritive (Geloza simpla pentru bacterii sau Sabouraud pentru levuri) si incubate timp de aprox. 20h, la o temperatură de 37°C . Coloniile microbiene obținute au fost utilizate pentru obținerea de suspensii în AFS (apă fiziologică sterilă) de densitate optică 0,5 McFarland ($1-3 \times 10^8$ UFC (unitati formatoare de colonii)/mL).

Pentru evaluarea calitativă a efectului antimicrobian prin metoda picaturilor, suspensiile microbiene obtinute au fost însămânțate în pânză cu tamponul pe mediu de cultură solid și ulterior au fost dispuse picături (volum = $10\mu\text{L}$ din suspensii de nanomaterial de concentratie 2mg/mL) din fiecare nanomaterial dispersat, control de ulei/antibiotic și DMSO (dimethylsulfoxid utilizat ca si solvent pentru nanosistemele testate). Plăcile pregatite sunt incubate pentru 24h la 37°C .

Pentru evaluarea calitativă a efectului antimicrobian prin metoda disc-difuzimetrica, pe placile Petri insamantate in panza cu tamponul, s-au dispus discuri sterile de hartie de filtru cu diametrul de 6mm impregnate prin imersare cu nanomaterialele obtinute (solutie conc. 2mg/mL). Placile astfel pregatite se incubeaza pentru 24h la 37°C . Dupa expirarea timpului de incubare se citesc si se inregistreaza diametrele zonei de inhibitie a cresterii (exprimate in mm). In cazul metodei disc difuzimetrica se verifica si capacitatea microorganismelor de a forma colonii sub discul de hartie de filtru.

Rezultate

Analiza calitativa a efectului antimicrobian manifestat de NPs dezvoltate a fost realizata prin doua metode, respectiv metoda picaturilor si metoda disc-difuzimetrica adaptata. Rezultatele obtinute arata un grad crescut de inhibitie a cresterii tulpinilor microbiene testate, in prezenta nanoparticulelor magnetice functionalizate cu uleiuri esentiale sau antibiotice (adaugate in nanosistemele respective la o concentratie de 2%). Cel mai semnificativ efect antimicrobian a fost observat in cazul tulpinii de *E.coli* pentru NPs de $\text{Fe}_3\text{O}_4@Si$ CUI, $\text{Fe}_3\text{O}_4@Si$ EUC, $\text{Fe}_3\text{O}_4@Si$ BUS, dar si $\text{Fe}_3\text{O}_4@Si$ CFT, $\text{Fe}_3\text{O}_4@Si$ CFR si $\text{Fe}_3\text{O}_4@Si$ CEF (fig 1). NPs functionalizate cu uleiuri esentiale au dovedit un efect antimicrobian crescut asupra tuturor speciilor microbiene analizate, in functie de tipul de ulei utilizat pentru functioalizarea acestora. Cele mai eficiente s-au

dovedit a fi NPs de $\text{Fe}_3\text{O}_4@Si$ CUI, $\text{Fe}_3\text{O}_4@Si$ EUC, $\text{Fe}_3\text{O}_4@Si$ BUS, iar tulpinile microbiene care au prezentat cea mai semnificativa inhibitie a cresterii au fost, pe langa *E.coli*, si *S.aureus* si *C. albicans*. La polul opus, *P. aeruginosa* si *B. subtilis* au prezentat cel mai redus grad de inhibitie a cresterii, la NPs testate.

Rezultatele analizei calitative obtinute prin metoda disc difuzimetrica adaptata confirma in cea mai mare parte rezultatele obtinute prin metoda picaturilor, cu o singura diferenta - $\text{Fe}_3\text{O}_4@Si$ BUS care in aceasta metoda nu mai prezinta eficienta antimicrobiana asupra *S.aureus*. Acest rezultat poate fi explicat prin capacitatea de difuzie incetinuta a uleiului esential sau a intregului nanosistem din discul de hartie de filtru, care poate conduce la obtinerea unor concentratii mai reduse de nanosistem in mediul de cultura, insuficiente pentru inhibarea dezvoltarii stafilococilor.

2. Stabilirea valorii CMI (concentrația minimă inhibitorie)

Pentru stabilirea CMI s-a utilizat o metodă cantitativă, caracterizată prin realizarea unor microdiluții seriale binare în mediu lichid (bulion simplu pentru bacterii si Yeast Peptone Glucose pentru drojdii), repartizat steril în plăci cu 96 de godeuri. În primul godeu al fiecărui șir s-a adăugat o cantitate de compus/nanosistem bioactiv corespunzătoare unei concentrații de 2mg/mL. Ulterior, cu ajutorul unei micropipete s-au realizat diluții binare, pornind de la godeul 1 (concentrație 2mg/mL) până la godeul 12. După realizarea microdilutiilor, în fiecare godeu s-au adăugat 15 μL suspensie microbiană de densitate 0.5 McFarland. Plăcile însămânțate au fost incubate 24h la 37°C, iar după incubare valoarea CMI pentru fiecare compus/nanosistem în parte s-a stabilit macroscopic, ca fiind concentrația cea mai scazuta a acestuia la care nu se observat apariția creșterii microbiene, respectiv apariția turbidității mediului, dar și prin citire spectrofotometrică a absorbantei culturii microbiene dezvoltate în mediul lichid la 620 nm.

Rezultatele obtinute au fost prelucrate astfel incat pe graficul prezentat mai jos apare gradul de reducere al valorii CMI datorat fiecarui nanosistem in parte, exprimat procentual. Acesta a fost calculat prin diferenta dintre valoarea CMI obtinuta in cazul nanosistemelor si valoarea CMI a compusilor antimicrobieni purificati, utilizati drept control. Valorile negative sunt considerate pe grafic ca "zero" si indica incapacitatea nanosistemului respectiv de a reduce valoarea CMI a compusului respectiv.

Rezultate

Metoda cantitativa de analiza a efectului antimicrobian exprimat s-a concretizat cu stabilirea concentratiei minime inhibitorii (valoarea CMI), prin aplicarea unei metode de microtitrare. Rezultatele obtinute au aratat ca NPs analizate prezinta valori CMI diverse, in functie de tipul de agent terapeutic inglobat, dar si de specia microbiana testata. Dupa cum se poate observa, nanosistemele dezvoltate prezinta capacitatea de a reduce concentratia minima inhibitorie a agentilor terapeutici utilizati, cu diferite grade, cel mai eficient in cazul uleiurilor esentiale. Valorile CMI ale antibioticelor testate au fost reduse cu 20 pana la 50% in cazul $\text{Fe}_3\text{O}_4@Si$ CUI si $\text{Fe}_3\text{O}_4@Si$ BUS, reducerea cea mai semnificativa fiind evidentiata pentru tulpinile de *S.aureus* si *E.coli* testate. Cea mai redusa capacitate de scadere a valorii CMI a fost observata pentru NPs de $\text{Fe}_3\text{O}_4@Si$ SAL, aceasta modificare fiind de sub 10%. Valorile CMI ale antibioticelor au fost reduce slab in cazul *E.coli*, sau nu au fost afectate in cazul celorlalte specii microbiene.

3. Evaluarea impactului nanosistemelor obtinute asupra producerii de factori de virulenta solubili
Analiza impactului nanomaterialelor obtinute asupra producerii de factori de virulenta a fost realizata cu ajutorul unor medii specifice. Mediile destinate evidențierii indirecte a unor factori de virulență solubili au la bază o geloza simpla și sunt îmbogățite cu diverse ingrediente necesare evidențierii producerii unor factori enzimatici capabili să degradeze/utilizeze/modifice substratul respectiv. După autoclavare, temperatura mediului se stabilizează la 45°C înainte de suplimentare, pentru evitarea degradării termice a componentelor adaugate. După turnarea mediilor în plăci Petri sterile cu diametrul de 9mm (Nunc) și solidificarea acestora, placile se însămânțează cu tulpinile de interes, tratate timp de 24h cu concentratii subinhibitorii din nanosistemele si controalele utilizate (CMI/2) și se incubează la 37°C pentru perioadele de timp necesare evidențierii ficarui factor de virulență solubil (24-72h).

Mediul agarizat se suplimentează cu 5% sânge de berbec. După solidificare plăcile se însămânțează și se incubează la 37°C timp de 24h. După expirarea timpului de incubare se urmărește apariția zonelor de hemoliză în jurul coloniilor, sub forma unui halou transparent, clar, caracteristic pentru tulpinile beta-hemolitice (care realizează o hemoliză completă, în care hemoglobina eliberată din hematii sub acțiunea beta-hemolizinelor este degradată total până la produși finali de metabolism) sau verzuu caracteristic tulpinilor alfa-hemolitice care realizează o

hemoliză parțială, în care hemoglobina este degradată doar parțial de către bacterii la methemoglobină). Zona de hemoliză poate fi accentuată prin păstrarea plăcilor la + 4°C, 30 minute înainte de citirea rezultatelor.

◆ Mediu cu Tween – pentru evidențierea producerii de lipaze

Mediul agar LB se suplimentează cu Tween 80 în concentrație finală de 1%, iar plăcile solidificate și însămânțate se incubează la 37°C timp de până la 7 zile. Prezența unei zone opace (de precipitare) în jurul ariei de creștere indică producerea de lipază.

◆ Mediu cu gălbenuș de ou - pentru evidențierea producerii de lecitinaze

Mediul agar LB se suplimentează cu gălbenuș de ou. După solidificare și însămânțare plăcile se incubează la 37°C timp de până la 7 zile. Prezența unei zone opace (de precipitare) în jurul ariei de creștere a indicat producerea de lecitinază.

◆ Mediu cu amidon - pentru evidențierea producerii de amilază

Mediul agarizat se suplimentează cu amidon, iar plăcile solidificate și însămânțate se incubează la 37°C timp de 24h. După incubarea mediului cu amidon, peste culturile în spot se adaugă câteva picături de soluție Lugol, prezența unei zone incolore în jurul ariei de creștere indicând producerea de amilaze.

◆ Mediu cu cazeină - pentru evidențierea producerii de cazeinază (proteaze)

Mediul agarizat se suplimentează cu 10% lapte degresat, iar plăcile solidificate și însămânțate se incubează la 37°C timp de 24h. Proteoliza cazeinei (prezența cazeinazei) este indicată de prezența după incubare a unei zone de precipitare (paracazeinat de Ca) clare în jurul ariei de creștere.

◆ Mediu cu gelatină – pentru evidențierea producerii de gelatinaze

Mediul agarizat se suplimentează cu gelatină, iar plăcile solidificate și însămânțate se incubează la 37°C timp de 24h. Apariția unei zone de precipitare în jurul ariei de creștere indică prezența gelatinazei.

◆ Mediu cu ADN - pentru evidențierea producerii de DN-ază

Mediul agarizat se suplimentează cu ADN, iar plăcile solidificate și însămânțate se incubează la 37°C timp de 24h. După incubare, peste culturile în spot s-a adăugat câteva picături de soluție HCl 1N, clarificarea zonei în jurul ariei de creștere a fost înregistrată ca reacție pozitivă.

Rezultate

Analiza pattern-urilor de factori de virulență solubili a arătat că majoritatea tulpinilor microbiene analizate exprimă preferențial exoenzimele amilază și cazeinază. S-au observat de asemenea și anumite diferențe între profilurile de virulență ale tulpinilor testate în funcție de tipul lor, și de nanosistemul (utilizat la o concentrație subinhibitorie = CMI/2) în prezența căruia au fost cultivate timp de 24h.

Tulpina de *B.subtilis* analizată produce exoenzimele cazeinază, gelatinază și amilază, precum și esculinaze, implicate în preluarea fierului din mediu. Exoenzimele eliberate funcționează ca și factori de virulență prin facilitarea degradării unor substraturi utile pentru creșterea și multiplicarea acestui microorganism (tabel II.2). În plus, acest microorganism produce și toxine formatoare de pori, de tipul lecitinazelor, utilizate pentru distrugerea celulelor țintă și invadarea gazdei. Nanoparticulele utilizate prezintă un efect slab de stimulare a producerii de toxine formatoare de pori și protează, efect observat mai ales în cazul Fe₃O₄@Si CFR și Fe₃O₄@Si CEF.

Referitor la tulpina de *S.aureus* analizată, aceasta prezintă un număr semnificativ de factori de virulență solubili, de tipul hemolizinelor (enzime care determină liza hematiilor), lecitinazelor, lipazelor (toxine formatoare de pori), esculinazelor (enzime microbiene care exprimă indirect capacitatea de a produce siderofori = molecule utile în captarea fierului), DN-azelor (enzime care degradează acizii nucleici), și amilaze (enzime utile în degradarea amidonului). NPs utilizate manifestă capacitatea de a stimula producerea de toxine formatoare de pori (lipaze), în special NPs Fe₃O₄@Si EUC, Fe₃O₄@Si CFT, Fe₃O₄@Si CFR și Fe₃O₄@Si CEF.

Tulpina de *E.coli* analizată exprimă un număr mai mic de factori de virulență solubili, aceasta dezvoltând proteaze de tipul cazeinazelor și amilazelor, însă sinteza și eliberarea acestora nu este influențată de către nanosistemele analizate, indiferent de tipul de compus bioactiv conținut.

Tulpina de *P.aeruginosa* analizată este una moderat virulentă, care eliberează factori de virulență solubili de tipul: cazeinazelor, lecitinazelor, și amilazelor. În acest caz, s-a observat că anumite NPs au capacitatea de a reduce potențialul virulent al acestui microorganism, mai ales prin inhibarea capacității de a produce lecitinaze și modularea producerii de amilaze. NPs pentru care

s-au observat procesele de modulare a virulentei mentionate sunt: NPs Fe₃O₄@Si EUC, Fe₃O₄@Si CFR si Fe₃O₄@Si CEF.

4. Analiza impactului nanosistemelor dezvoltate asupra aderenței și capacității de a produce biofilme microbiene

4.1. Aderența la substrat celular

Metoda se bazează pe infectarea unei culturi de celule eucariote *in vitro*, îndepărtarea bacteriilor neaderente după incubare și determinarea capacității de aderență și invazie bacteriană prin însămânțarea suspensiilor rezultate după liza celulelor monostratului și determinarea UFC/ml. Pentru testarea capacității de aderență și invazie s-a utilizat un protocol adaptat după Lazăr, 2003. Ca și substrat celular sensibil s-au utilizat culturi de celule HeLa, care după dezghețare au fost menținute în mediu RPMI cu adaos de 10% ser fetal de vițel (Sigma), fara antibiotice, fiind cultivate în plăci cu 6 godeuri sterile, pentru culturi de celule (Nunc). Monostratul celular a fost utilizat în momentul când nivelul de confluență a atins 70-80%. Tulpinile microbiene au fost diluate în TFS (tampon fosfat salin) până la o densitate de 0,5McFarland (10^7-10^8) și 10μl din această suspensie au fost utilizați pentru a inocula un godeu ce conține celule HeLa. După repartizarea suspensiilor bacteriene peste monostratul celular, placutele se incubează la 37°C, 2 ore, timp în care bacteriile aderă la suprafața celulelor eucariote. După expirarea celor 2 ore de incubare se îndepărtează surplusul de suspensie de pe monostratul celular și se spală de 3 ori cu TFS steril. Placuțele pentru testul de aderență vor fi tratate cu metanol 100%, 5 minute pentru fixare. După expirarea celor 5 minute se îndepărtează metanolul și se colorează cu soluție Giemsa 10% (Sigma Aldrich, Germania), 20 minute. După îndepărtarea colorantului placuțele au fost uscate și analizate la microscop cu Obiectivul cu Imersie (100x), utilizând un microscop Axiolab (Zeiss).

Rezultate

Rezultatele au aratat ca NPs dezvoltate pot sa interfere atat cu producerea de factori de virulenta solubili cat si cu cei atasati celular, de tipul adezinelor. Astfel, analiza capacitatii microorganismele analizate de a adera la substratul celular sensibil a aratat ca toate microorganismele analizate pot sa adere la celulele HeLa utilizate drept substrat celular sensibil, iar o parte dintre NPs dezvoltate pot reduce semnificativ capacitatea de aderența a acestora. Citirea și interpretarea capacității de

aderența a microorganismelor la substrat celular a constat în 2 activități, și anume evaluarea pattern-ului (modului) de aderență și stabilirea indicelui de aderență.

Referitor la modul în care celulele bacteriene pot adera la suprafața celulelor eucariote gazdă, au fost definite următoarele pattern-uri:

- aderența localizată – celule bacteriene care formează microcolonii, localizate într-un anumit situs pe suprafața celulei gazdă;
- aderența agregativă - celule bacteriene aderate pe suprafața celulei gazdă, dar și între ele;
- aderența difuză- celule aderate izolat, din loc în loc pe suprafața celulei gazdă. Majoritatea cazurilor de aderență cuprind combinații ale acestor variante de bază (i.e. aderență localizată-agregativă, sau aderență difuz-agregativă).

Indicele de aderență reprezintă raportul dintre numărul de celule EK care au prezentat pe suprafața lor celule bacteriene aderate și numărul total de celule eucariote, înmulțit cu 100, în urma analizei a cel puțin 3 câmpuri microscopice pentru fiecare probă.

Astfel, cu excepția *E.coli*, care adera difuz, toate celelalte tulpini microbiene au manifestat capacitatea de a agrega, dezvoltând un pattern de aderență difuz-agregativ la substratul celular. NPs dezvoltate pot să reducă semnificativ capacitatea microorganismelor de aderență, interferând totodată cu patternul de aderență al acestora. În tabelul 5 se poate observa că NPs Fe₃O₄@Si CUI și Fe₃O₄@Si EUC reduc cel mai semnificativ indicele de aderență al tuturor tulpinilor testate la substratul celular, această inhibiție a aderenței fiind uneori de peste 60% (i.e. la *C.albicans*, *S.aureus*, *E.coli*, *P.aeruginosa*). În plus, aceste NPs au capacitatea să modifice patternul de aderență al tulpinilor microbiene, prin scăderea capacității acestora de a adera între ele și de a forma agregate multicelulare.

4.2. Aderența la substrat inert și formarea de biofilme

Pentru stabilirea efectului biomaterialelor obținute asupra producerii de biofilme s-a utilizat o metodă cantitativă, bazată pe realizarea unor microdiluții seriale binare în mediul lichid (bulion simplu), repartizat steril în plăci cu 96 de godeuri. Se urmează același protocol descris anterior, în cazul metodei cantitative, CMI. După realizarea microdiluțiilor, în fiecare godeu s-au adăugat 15 μL suspensie microbiană de densitate 0.5 McFarland. Plăcile însamânțate au fost incubate 24h la 37°C, iar după incubare biofilmele formate au fost spălate cu grijă de 3 ori cu apă fiziologică sterilă (AFS) și fixate cu metanol rece timp de 5 minute. După îndepărtarea metanolului, plăcile uscate

au fost colorate cu soluție cristal violet 1% timp de 20 minute. După timpul de așteptare, excesul de colorant a fost spălat cu apă de robinet, iar colorantul inclus în celulele biofilmului format pe pereții godeului a fost solubilizat cu o soluție de acid acetic 33%. Suspensiile astfel obținute au fost utilizate pentru interpretarea rezultatelor, bazată pe citirea spectrofotometrică a absorbanței suspensiei colorate la 492nm. Valorile absorbantelor obținute prin analiza spectrofotometrică au fost proiectate pe grafic și reprezintă gradul formării biofilmelor după 24h incubare. Concentrația minimă de eradicare a biofilmelor (CMEB) a fost stabilită pentru fiecare nanomaterial în parte drept concentrația cea mai mică la care absorbanta (Abs 492nm) probei este redusă cu cel puțin 50% comparativ cu cea a controlului.

Rezultate

Rezultatele au arătat că microorganismele analizate prezintă capacități distincte de a adera la substratul inert și de a dezvolta biofilme monospecifice, această capacitate fiind influențată de tipul de nanomaterial utilizat. Astfel, pentru *B.subtilis* NPs magnetice funcționalizate cu ulei esențial de BUS, SCO și SAL au manifestat cel mai mare potențial de a inhiba capacitatea de aderență și formarea de biofilme, potențialul antibiofilm cel mai scăzut fiind înregistrat pentru magnetita core-shell control, dar și pentru NPs funcționalizate cu antibiotice.

Un efect inhibitor asemănător a fost observat și în cazul tulpinii de *S.aureus* testate, unde NPs magnetice core-shell funcționalizate cu ulei esențial de BUS, SCO și SAL au redus drastic capacitatea de formare a biofilmelor monospecifice, fenotip observat și pentru NPs funcționalizate cu ulei esențial de CUI.

La tulpina de *E.coli* testată capacitatea de a forma biofilme este slab influențată, cele mai semnificative efecte inhibitorii fiind observate în cazul NPs magnetice core-shell funcționalizate cu ulei esențial de BUS, SCO și SAL.

În cazul *P.aeruginosa* rezultatele au demonstrat că nanoparticulele core-shell prezintă capacitatea de a inhiba semnificativ dezvoltarea de biofilme la această specie oportunistă, într-o manieră dependentă de tipul de compus bioactiv înglobat. Rezultatele cele mai semnificative au fost înregistrate în cazul NPs funcționalizate cu uleiuri esențiale, astfel $\text{Fe}_3\text{O}_4@Si$ CUI, $\text{Fe}_3\text{O}_4@Si$ EUC, $\text{Fe}_3\text{O}_4@Si$ SAL și $\text{Fe}_3\text{O}_4@Si$ GHI au manifestat cel mai ridicat efect anti-biofilm la această

specie microbiana. NPs functionalizate cu antibiotice au manifestat efecte reduse de modulare a aderenței și formării de biofilme monospecifice.

La tulpina de *C.albicans* analizată NPs core-shell functionalizate au manifestat un efect anti-biofilm moderat, cele mai eficiente în inhibarea acestui fenotip fiind $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Si}$ CUI și $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Si}$ EUC.

Referitor la concentrațiile minime de eradicare a biofilmelor (CMEB), acestea au fost calculate în urma efectuării testelor antibiofilm, prin diferența dintre valorile absorbantelor obținute pentru probele control și cele în care microorganismele au fost cultivate în prezența NPs functionalizate. Rezultatele care reflectă valorile CMEB sunt exprimate în mg/mL și se regăsesc în tabelul II.7. Pentru tulpinile de bacterii analizate valorile CMEB obținute variază între 0,039 mg/mL și 1,25 mg/mL, valorile cele mai scăzute înregistrându-se pentru tulpina de *E.coli* analizată. Cele mai mici valori ale CMEB au fost observate în cazul $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Si}$ BUS, $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Si}$ SCO și $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Si}$ SAL, acestea având valori cuprinse între 0,039 mg/mL și 0,3129 mg/mL pentru speciile bacteriene. În plus, în mod asemănător cu valorile CMI obținute, aceste nanosisteme au redus semnificativ și valorile CMEB ale uleiurilor esențiale înglobate. Pentru tulpina levurică analizată, *C. albicans*, valorile CMEB înregistrate au valori foarte mari, fiind cuprinse între 1.25 – 2.5 mg/mL, acest rezultat sugerând că NPs core-shell dezvoltate au o eficiență mai redusă pentru eradicarea biofilmelor levurice, însă sunt foarte eficiente contra biofilmelor bacteriene monospecifice.

Etapele de documentare, planificare și management de proiect au fost realizate pe toată perioada de desfășurare a acestei etape. În această perioadă s-au publicat 4 articole științifice (ISI), 2 capitole de carte internaționale și au fost elaborate 2 lucrări științifice tip poster care au fost prezentate la manifestări științifice internaționale. Toate publicațiile raportate conțin acknowledgmentul proiectului și rezultatele continute în acestea sunt parțial regăsite în prezenta raportare sau vor fi incluse (după completare) în raportările viitoare.

Etapa III.

În ultima etapă de realizare a acestui proiect s-a urmărit: **Stabilirea biocompatibilității și a citotoxicității *in vitro* a sistemelor antimicrobiene nanostructurate obținute.**

Pentru aceste activități propuse și atinse sunt următoarele: 1) *Analiza calitativă și cantitativă a citotoxicității NP dezvoltate* (prin microscopie de fluorescență și metoda MTT standardizată de evaluare a citotoxicității); 2) *Documentare, planificare, diseminare, și management de proiect.*

Materiale și metode

1. Analiza calitativă și cantitativă a citotoxicității NP dezvoltate

Studiile de evaluare *in vitro* a biocompatibilității NP s-au realizat prin metodele: (1) evaluarea cantitativă a proliferării celulare utilizând testul cu săruri de tetrazolium (MTT); (2) evaluarea calitativă a morfologiei celulare utilizând tehnica de colorarea a citoplasmei cu Acridin Orange și vizualizare cu ajutorul microscopului cu fluorescență.

Pentru studiu s-a utilizat linia celulară L929 de tip fibroblaste de șoarece, care crește în cultură în monostrat și este recomandată pentru testele de evaluare a biocompatibilității unor materiale sau nanoparticule (NP), datorită sensibilității crescute pe care o manifestă. Cultivarea celulelor s-a realizat în mediu Minimum Essential Media (MEM), suplimentat cu 10% ser bovin fetal (FBS) și 1% antibiotice (neomicină și penicilină-streptomicină), în condiții standard, la 37 ± 2 °C, $5\pm 1\%$ CO₂, umiditate de aprox. 90%.

Celulele sunt conservate în criotuburi prin înghețare în azot lichid. Pentru a fi utilizate, criotubul dorit trebuie scos cu atenție din criostatul cu azot lichid, iar celulele trebuie să fie dezghețate rapid într-o baie cu apă, la 37°C. Celulele se transferă apoi într-un recipient și se adaugă mediu de cultură suplimentat, rapid dar cu atenție pentru a preveni inducerea șocului osmotic. Recipientul cu celule se plasează într-un incubator ce menține cultura în condiții standard 37 ± 2 °C, $5\pm 1\%$ CO₂. Mediul de cultură se schimbă la 2-3 zile.

Pregătirea monostratului celular utilizat în experiment

După 3-5 zile în condiții standard, după ce au ajuns la confluență celulele se plasează în noi recipiente. Pentru experimentul de evaluare a proliferării celulare (MTT), s-au utilizat plăci cu 96

de godeuri, în care au fost însămânțate 5000 celule/ godeu, iar, pentru experimentul de evaluare calitativă a morfologiei celulare prin microscopie de fluorescență, s-au utilizat plăci cu 24 de godeuri, în care au fost plasate lamele de sticlă sub forma de disc, cu diametrul de 10 mm și pe care au fost însămânțate câte 5000 celule. În acest scop, au fost parcurse următoarele etape:

- E1: Îndepărtarea în totalitate a mediului de cultură din recipient;
- E2: Adăugare 1 ml soluție tripsină 0,25% pentru desprinderea celulelor aderate;
- E3: Se incubează pentru 2-3 minute pentru a permite enzimei să acționeze;
- E4: Pipetare energetică pentru desprinderea tuturor celulelor atașate;
- E5: Adăugare suspensie celulară peste un volum de mediu de cultură în proporție de 1:3;
- E6: Numărare celule;
- E7: Spălare prin centrifugare (10 min, 1050 rpm, 4°C);
- E8: Resuspendare celule în mediu astfel încât să se asigure densitatea dorită de celule; incubare în condiții standard pentru 24 h.

Evaluarea proliferării celulare prin testul MTT

MTT (bromură de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliu) este o sare de tetrazoliu ce este redusă la formazan (colorat) în celulele vii, în citosol, de către esteraze. Substanța rezultată în urma procesului de reducere se acumulează în mediu și oferă astfel un aspect colorat al culturii. Intensitatea culorii poate fi citită la o anumită lungime de undă, cu un spectrofotometru putându-se stabili cantitativ (%) proliferarea/ viabilitatea celulelor din suspensia cuantificată. Pentru evaluarea biocompatibilității NP obținute asupra culturilor celulare de tip L929 fibroblast, utilizând această metodă, s-a urmărit eventuala scădere a viabilității celulare, asociată cu efectul citotoxic pe care îl pot avea nanosistemele proiectate asupra celulelor în cultură.

În acest scop, s-au parcurs următoarele etape:

- E1: Pregătirea probelor de NP și efectuarea diluțiilor corespunzătoare
 - prin suspendarea pulberilor în mediu de cultură pentru a obține soluții/dispersii cu concentrație de 5mg/mL;
- E2: Înlocuirea mediului de cultură existent în godeuri cu un volum corespunzător (100 μ L/ godeu) din proba pregătită anterior;
- E3: Incubarea în condiții standard (37 \pm 2°C, 5 \pm 1% CO₂, umiditate) pentru 24, 48, respectiv 72 h;
- E4: Adăugarea a câte 10 μ L soluție 5 mg/mL MTT pregătit în tampon fosfat salin (PBS);

- E5: Incubare în condiții standard ($37\pm 2^\circ\text{C}$, $5\pm 1\%$ CO_2 , umiditate) pentru 2 h;
- E6: Adăugare 100 μL soluție de solubilizare (izopropanol acid) în fiecare godeu; pipetare energetică pentru solubilizarea cristalelor de formazan;
- E7: Citire la spectrofotometrul TECAN la o lungime de undă de 570 nm.

Evaluarea morfologiei celulare prin colorare cu Acridin Orange

- E1: Spălare lamele cu 0,5 mL PBS;
- E2: Fixare cu 0,5 mL soluție 3,7% paraformaldehidă în PBS, timp de 5 minute;
- E3: Spălare, de 3 ori, cu câte 0,5 mL PBS;
- E4: Colorare cu 1 μL soluție Acridin Orange 2 mg/mL, pentru 5 minute;
- E5: Spălare, de 3 ori, cu câte 0,5 mL PBS;
- E6: Colorare cu reactiv Hoechst 33342, dil 1:2000 în PBS, pentru 10 minute;
- E7: Spălare, de 3 ori, cu câte 0,5 mL PBS;
- E8: Montare pe lamă, sigilare;
- E9: Vizualizare la microscopul cu fluorescență.

Rezultate

Analiza MTT

Analiza capacității celulelor în cultura de a reduce sarea de tetrazolium la formazan insolubil (testul MTT) a arătat că NP testate au efect citotoxic minim.

Astfel, după 24 h incubare a celulelor în condiții standard în prezența NP, viabilitatea și ratele de proliferare a acestora sunt similare cu a controlului celular netratat, fiind cuprinse între 90-100%. Ratele de proliferare cele mai reduse (de 90%) au fost observate în cazul NP: $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Si}$ EUC și $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Si}$ CFR, pentru celelalte NP fiind de peste 92%.

Și după 48h de incubare în condiții standard, ratele de proliferare a celulelor în cultura rămân ridicate, Pentru probele $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Si}$ CUI, $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Si}$ BUS și $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Si}$ CFR ratele de proliferare sunt de peste 80%, în schimb ce pentru restul probelor acestea sunt de peste 90%.

Diferente ne semnificative în privința viabilității celulelor și a ratelor de proliferare a acestora se observă și după cultivarea timp de 72h în prezența NP analizate. În acest caz, ratele de proliferare obținute sunt de peste 82%.

Evaluarea morfologiei celulare prin microscopie de fluorescență

În etapa următoare am avut în vedere analiza morfologiei celulelor în urma cultivării cu NP dezvoltate. Analiza la microscop a monostraturilor celulare după tratament a arătat că în toate cazurile celulele rămân aderate la substrat și prezintă o morfologie tipică (figura 4). Aceste rezultate demonstrează că sistemele nanostructurate dezvoltate nu prezintă toxicitate asupra celulelor în cultură, atunci când sunt utilizate la concentrații mai mici de 5mg/mL. Nanomaterialele: 1=Fe₃O₄@Si BUS, 2=Fe₃O₄@Si GHI, 3=Fe₃O₄@Si CUI, 9=Fe₃O₄@Si CFR, și 10=Fe₃O₄@Si CFT au prezentat o ușoară capacitate de inducere a necrozei celulelor tratate, însă celulele moarte (desprinse, sferic-ovalare, cu aspect strălucitor) nu însumează mai mult de 7-10% din totalul celulelor analizate microscopic.

Documentare, planificare, diseminare, și management de proiect

Etapele de documentare, planificare și management de proiect au fost realizate pe toată perioada de desfășurare a proiectului. În întreaga perioadă de implementare a proiectului s-au publicat 5 articole științifice (ISI), 2 capitole de carte internaționale și au fost prezentate 5 lucrări la manifestări științifice internaționale de prestigiu. Toate publicațiile raportate raportate conțin *acknowledgementul* proiectului și se regăsesc pe pagina web a acestuia: https://alina.amgtranscend.org/?page_id=74.

Publicatii

Articole ISI:

1. D Ficăi, V Grumezescu, O M Fufă, R C Popescu, A M **Holban***, A Ficăi, A M Grumezescu, L Mogoanta, G D Mogosanu and E **Andronescu**. Antibiofilm Coatings Based on PLGA and Nanostructured Cefepime-Functionalized Magnetite. *Nanomaterials* 2018, 8, 633; doi:10.3390/nano8090633.

2. Alexandru Mihai Grumezescu, Alexandra Elena Stoica, Mihnea-Ștefan Dima-Bălcescu, Cristina Chircov, Sami Gharbia, Cornel Baltă, Marcel Roșu, Hildegard Herman, **Alina Maria Holban**, Anton Ficai, Bogdan Stefan Vasile, **Ecaterina Andronescu**, Mariana Carmen Chifiriuc, Anca Hermenean. Electrospun Polyethylene Terephthalate Nanofibers Loaded with Silver Nanoparticles: Novel Approach in Anti-Infective Therapy. *J. Clin. Med.* 2019, 8, 1039; doi:10.3390/jcm8071039.
3. Eva Torres Sangiao, **Alina Maria Holban*** and Mónica Cartelle Gestal. Applications of Nanodiamonds in the Detection and Therapy of Infectious Diseases. *Materials* 2019, 12, 1639; doi:10.3390/ma12101639.
4. Andrei Paduraru, Cristina Ghitulica, Roxana Trusca, Vasile Adrian Surdu, Ionela Andreea Neacsu, **Alina Maria Holban**, Alexandra Catalina Birca, Florin Iordache and Bogdan Stefan Vasile. Antimicrobial Wound Dressings as Potential Materials for Skin Tissue Regeneration. *Materials* 2019, 12, 1859; doi:10.3390/ma12111859.
5. Mara Madalina Mihai, Monica Beatrice Dima, Bogdan Dima and **Alina Maria Holban***. Nanomaterials for Wound Healing and Infection Control. *Materials* 2019, 12, 2176; doi:10.3390/ma12132176.

Capitole de carte:

1. Bianca Boarca, Iulia Ioana Lungu, **Alina Maria Holban**. Chapter 7 - Core-shell nanomaterials for infection and cancer therapy. *Materials for Biomedical Engineering Bioactive Materials for Antimicrobial, Anticancer, and Gene Therapy.* 2019, Pages 197-211, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818435-6.00007-4>.
2. Bianca Boarca, Iulia Lungu, **Alina Maria Holban**. Bioactive Packaging for Modern Beverage Industry. *Trends in Beverage Packaging, Volume 16: the Science of Beverages*, 2019, Pages 51-71, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816683-3.00003-7>.

Conferinte internationale:

1. A M **Holban**, A M Grumezescu, L M Ditu, C Curutiu, I Gheorghe, V Grumezescu, V Lazar, E **Andronescu**. Magnetic core-shell nanoparticles with antimicrobial and immunomodulatory effect. Annual International Conference of the RSBMB, 5-7 September 2018, Bucharest, Romania.
2. A M **Holban**, A M Grumezescu, G Bianca, M Denisa, H B Mohammed, S Mohsin, M C Chifiriuc, V Lazar, E **Andronescu**. Core-shell nanoparticles functionalized with essential oils with antimicrobial activity. Joint ESENIAS and DIAS Scientific Conference and 8th ESENIAS Workshop, 26 – 28 September 2018, Bucharest, Romania.
3. A **Holban**, L M Ditu, A Grumezescu, C Curutiu, V Lazar, B Vasile, E **Andronescu**. Impact of inorganic nanoparticles on the virulence of some microbiota isolates with probiotic effect. 6th World Congress on Targeting Microbiota, 28-30 October 2018, Porto, Portugal.
4. **Alina Maria Holban**, Lia-Mara Ditu, Alexandru Mihai Grumezescu, Carmen Curutiu, Coralia Bleotu, Valentina Grumezescu, Veronica Lazar, Bogdan Vasile, **Ecaterina Andronescu**. Antibacterial activity of functional Fe₃O₄-PEG SiO₂ nanoparticles on pathogenic and microbiota species. EMRS - Spring Meeting 2019, 27-31.05.2019, Nisa, Franta.

5. **Alina M Holban**, Alexandru M Grumezescu, Carmen Curutiu, Lia M Ditu, Irina Gheorghe, Bogdan S Vasile, Coralia Bleotu, Veronica Lazar, **Ecaterina Andronescu**. Anti-pathogenic effect of *Eugenia caryophyllata* essential oil functionalized core-shell magnetic nanoparticles. 8th Congress of European Microbiologists, FEMS 2019, 7-11.07.2019, Glasgow, Franta.