



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2019 00525

(22) Data de depozit: 29/08/2019

(41) Data publicării cererii:
28/02/2020 BOPI nr. 2/2020

(71) Solicitant:
• UNIVERSITATEA POLITEHNICA DIN
BUCUREȘTI, SPLAIUL INDEPENDENȚEI
NR.313, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:
• RĂPĂ MARIA, ALEEA GORNEȘTI NR.3,
BL.52, SC.1, AP.2, SECTOR 4,
BUCUREȘTI, B, RO;
• GAIDĂU CARMEN CORNELIA,
STR. ALEXANDRU PAPIU ILARIAN NR. 6,
BL. 42, SC. 2, AP. 53, ET. 6, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO;

• MATEI ECATERINA,
BD.CONSTRUCTORILOR NR.3, BL.G3,
SC.B, ET.2, AP.30, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;
• BERECHET MARIANA DANIELA,
ȘOS.BERGENI, NR.16, BL.3, SC.1, AP.30,
ET.7, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;
• PANTILIMON MIRCEA CRISTIAN,
BD.CAMIL RESSU NR.57, BL.H13, SC.D,
AP.69, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;
• PREDESCU ANDRA MIHAELA,
STR.GLĂDIȚEI NR.42, BL.T7, ET.4, AP.405,
SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;
• PREDESCU CRISTIAN,
STR. DR. PETRE GĂDESCU NR. 24A,
SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO

(54) COMPOZIȚII DE NANOFIRE PE BAZĂ DE COLAGEN
DIN CLEI DE IEPURE ȘI AGENȚI ANTIMICROBIENI,
ȘI PROCEDEU DE OBȚINERE A ACESTORA

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o compoziție de nanofire antimicrobiene și la un procedeu pentru obținerea acesteia utilizată pentru realizarea de pansamente non-active pentru tratarea rănilor. Compoziția, conform invenției, este constituită în procente masice din 8,6...24,5% clei din piele de iepure sub formă de granule, 18,8...39,5% apă, 41,7...70,6% soluție de acid acetic în concentrație de 40% și 2...8,3% agenți cu activitate antimicrobiană față de *Escherichia coli*,

Staphylococcus aureus și *Candida albicans*. Procedeu, conform invenției, constă în electrofilarea amestecului de componente, cu un debit al soluției de 0,4...0,9 ml/h, tensiune 22,71...24,35 kV și distanța dintre vârful de ac-colector de 9...14 cm.

Revendicări: 5
Figuri: 1



DESCRIEREA INVENȚIEI

COMPOZIȚII DE NANOFIRE PE BAZĂ DE COLAGEN DIN CLEI DE IEPURE ȘI AGENȚI ANTIMICROBIENI ȘI PROCEDEU DE OBTINERE A ACESTORA

Invenția se referă la compoziții de nanofire cu proprietăți antimicrobiene și la un procedeu de obținere a acestora **destinate pentru** obținerea pansamentelor non active.

În prezent, diferite tipuri de polimeri sintetici (policlorură de vinil, elastomeri, poliuretani, etc.) se utilizează pentru diferite aplicații biomedicale care includ: pansamente, grefe vasculare pe bază de fibre țesute, etc. Principalul dezavantaj al utilizării polimerilor artificiali în astfel de aplicații constă în dificultatea imitării țesutului natural și probabilitatea respingerii prin mecanismele naturale de apărare ale organismului. În vederea îmbunătățirii biocompatibilității biomaterialelor tip scaffold, acestora li se atașează polimeri naturali, cum ar fi: colagenul tip I, II, III sau gelatina [US 9.655.995 B2 [1], WO 2017/007842 A1 [2]].

Există o cerere din ce în ce mai mare de materiale biocompatibile și antimicrobiene pentru terapii de vindecare a rănilor și dezvoltarea de țesuturi proiectate pentru înlocuirea organelor. Polimerii naturali reprezintă opțiuni atractive, în principal datorită asemănării cu matricea extracelulară (EMC) precum și a versatilității chimice și performanței biologice a acestora.

Colagenul $[(C_2H_5NOC_5H_9NOC_5H_{10}NO_2)_n]$ este o proteină fibroasă constituită în principal din glicină, prolină și hidroxiprolină, utilizată intens într-o varietate de aplicații medicale pentru ingineria tisulară (înlocuirea pielii, valve vasculare, scaffold-uri, repararea tendoanelor/mușchilor, cartilagii, etc.), pentru medicamente sau dispozitive medicale cu eliberare controlată a substanțelor active US 9.228.009 B2 [3] datorită biocompatibilității și biodegradabilității controlate, abilității de a promova atașarea și proliferarea celulară precum și a lipsei toxicității [4-6].

Chitosanul $[(C_6H_{11}O_4N)_n]$ este un polimer natural din clasa polizaharidelor, abundent și regenerabil care prezintă activitate antioxidantă, antimicrobiană, proprietăți de gelifiere și încapsulare, biodegradabilitate, biocompatibilitate, non-toxicitate, preț de cost scăzut [7]. Chitosanul este recomandat a se utiliza ca biomaterial în industria farmaceutică, ingineria tisulară, cosmetică, pentru eliberarea controlată a medicamentelor, obținerea suturilor chirurgicale, a pansamentelor pentru vindecarea rănilor, etc.

Agenții antimicrobieni clasici, cum ar fi: sărurile cuaternare de amoniu, nanoparticulele de oxizi metalici (NPs), soluțiile de săruri metalice și antibioticele sunt aplicate pe scară largă pentru controlul infecțiilor bacteriene. Cu toate acestea, utilizarea lor

este limitată din cauza naturii toxice și a activității reduse a agenților antimicrobieni. Pentru a depăși acest lucru, se încorporează nanoparticule anorganice cu caracter antimicrobian în nanofibre polimerice funcționale [8].

Procedeul de electrospinning (electrofilare) este un procedeu foarte cunoscut în industria textilă pentru obținerea de fire neșesute din fibre de poliesteri. Principiul de funcționare constă în crearea unui câmp electric de înaltă tensiune între soluția de polimer și colectorul metalic pe care aceasta se depune sub formă de fire. De asemenea, electrospinning-ul este o tehnologie promițătoare pentru obținerea nanofirelor pentru aplicații biomedicale. Principalul avantaj al nanofirelor constă în raportul mare între suprafață și volum, de 1-3 ordine de mărime mai mare în comparație cu peliculele subțiri realizate din același material [9], ceea ce permite o flexibilitate mărită pentru modificarea suprafeței. Nanofirele obținute permit atașarea celulelor datorită diametrului mai mic al nanofirelor comparativ cu cel al celulelor [10]. Procesul de electrofilare nu este invaziv și nu necesită utilizarea agenților chimici de coagulare sau a temperaturilor ridicate pentru obținerea de fire. Prin tehnologia de electrospinning se pot utiliza soluții de polimeri sintetici sau naturali, amestecuri de polimeri, nanoparticule sau polimeri impregnați cu medicamente, care prezintă o masă moleculară adecvată pentru obținerea nanofirelor. Avantajul nanofirelor obținute prin electrospinning este că acestea nu conțin solvent.

Din brevetul **US 9.775.917 B2** [11] se cunoaște faptul că prin utilizarea solvenților adecvați (de exemplu: acetonă, N,N-dimetilformamidă, cloroform, metil etil cetonă, acid acetic, acid formic, etanol, 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol, tetrafluoroetanol, diclorometan, tetrahidrofuran, acid trifluoroacetic, dimetil acetamida, alcool izopropilic sau amestecuri ale acestora) pentru electrofilarea colagenului are loc procesul de denaturare, care constă în pierderea structurii helicoidale și separarea lanțurilor alpha. Această denaturare facilitează electrofilarea soluției de colagen.

În literatură sunt raportate nanofire antimicrobiene obținute prin electrospinning pe bază de alcool polivinilic și nanoparticule de oxid de zinc dopate cu fier (ZnO NPs-Fe) [8], soluții de etilceluloză/gelatină și nanoparticule de oxid de zinc (ZnO NPs) [12], nanofire de colagen/chitosan conținând ZnO NPs [13], nanocompozite pe bază de gelatină și nanoparticule de argint [14], etc.

Din brevetul **US 5.116.620 A** [15] se cunoaște realizarea unor pansamente antimicrobiene pe bază de colagen impregnat cu 0,1-5 % (procente în greutate) soluție clorit de sodiu (NaClO_2). Dezavantajul utilizării soluției de clorit de sodiu constă în necesitatea măsurilor de precauție împotriva contaminării inadvertente cu materiale organice, care ar

putea forma un amestec exploziv, precum și a posibilelor simptome clinice (methemoglobinemie, hemoliză, insuficiență renală).

Din brevetul **RO 133.132 A1** [16] se cunoaște utilizarea hidroxiapatitei dopate cu argint pentru obținerea unui biopansament pe bază de colagen, pentru tratamentul plăgilor suprainfectate.

Din brevetul **US 9.155.799 B2** [17] se cunosc compoziții de colagen reticulate care conțin 0,1-30 % compuși ai argintului, ca agent antimicrobian (de exemplu: clorură de argint, fosfat de argint, sulfat de argint, acetat de argint, azotat de argint, fluorură de argint, iodat de argint, lactat de argint, benzoat de argint, bromură de argint, carbonat de argint, citrat de argint, iodat de argint, laurat de argint, oxid de argint, palmitat de argint, proteină de argint, argint imidazolat, argint coloidal, argint).

Deficiența acestor compoziții constă în faptul că, sub acțiunea luminii, argintul suferă o reducere fotochimică la argint metalic, ceea ce are ca efect înnegrirea soluțiilor în timp.

Prezenta invenție înlătură dezavantajele datorate utilizării agenților antimicrobieni menționați mai sus, soluția tehnică constând în obținerea de nanofire prin electrofilarea, la un debit al soluției de 0,4...0,9 mL/h, tensiune +22,71...+24,35 kV și distanța dintre vârful de ac-colector 9...14 cm, a unui amestec pe bază de 8,6...24,5% (procente gravimetrice) colagen din clei de iepure sub formă de granule, dizolvat în apă la un raport gravimetric 0,464:1, la temperatura de 40°C, timp de 30 minute, 42...70,6 % soluție acid acetic de concentrație 40% procente volumetrice (Alfa Aesar) și 2...8,3% (procente gravimetrice) agenți antimicrobieni de tip:

- a) Dispersie de nanoparticule de oxid de zinc (ZnO NPs) 50% (% în greutate), în apă, cu dimensiunea medie particule < 35 nm (determinată prin DLS) (Aldrich);
- b) AG425K, soluție apoasă de nanoparticule de dioxid de titan (TiO₂ NPs) dopate cu azot și nanoparticule de argint (TiPE Nanotechnology in life, Shanghai, China), sub formă anatase, cu mărimea particulei de 6-8 nm, pH=7-10, concentrație de 0,72% Ti și 0,86% Ag, cu proprietăți antibacteriene, antifungice și antivirotoice, fără toxicitate (Oral LD₅₀ = > 10,000 mg/kg);
- c) Soluție de chitosan 1,5% (procente în greutate) obținută prin dizolvarea chitosanului din cochilii de crab, vâscozitate mare (Sigma) sub formă de cristale, caracterizat prin vâscozitate 1267 MPaxs și un conținut de cenușă sulfată 0,2% în soluție acid acetic 85% (procente volumetrice) sub agitare magnetică la 1000 rpm și 60°C, timp de 4 ore.

Proprietățile biocompatibile și de refacere a rănilor pe care le are colagenul extras din mamifere este deja cunoscut; în cazul prezentei invenții utilizarea colagenului extras din piele de iepure, sub formă de clei reprezintă o noutate absolută pentru utilizarea în acest scop. Se cunoaște că colagenul extras din pielea de iepure în mediu apos are cele mai bune proprietăți de lipire [18], probabil datorită structurii diferite a zonei terminale C a lanțului $\alpha 1$, care este mai lung cu doi aminoacizi, alanina și arginina [19]. Proprietățile speciale de lipire ale colagenului extras din clei de iepure au fost atribuite și conservării componentelor β (dimerul lanțului α) și γ (trimerul lanțului α), în stare de gelatină [20].

Asocierea colagenului de iepure cu materiale antimicrobiene recunoscute în condițiile realizării unor nanostructuri de tip nanofire asigură proprietăți superioare materialelor cunoscute (bureți, filme) datorită suprafeței de contact de 1-3 ori mai mari, cu proprietăți hemostatice, de absorbție și antimicrobiene. Realizarea acestor materiale este superioară produselor cunoscute deoarece nu se utilizează colagen nativ (care este foarte scump) și nici compoziții sofisticate sofisticate (nu conțin polimeri sintetici cu potențial inflamator sau solvenți organici toxici) sau antibiotice (raportate ca ineficiente sau cu efecte adverse). Nanofirele obținute prin procedeul de electrospinning, în cadrul invenției, prezintă un diametru de 42,66...114,6 nm, pori cu diametrul de circa 100 nm, activitate antimicrobiană față de *Escherichia coli* și *Staphylococcus aureus* și activitate fungică față de *Candida albicans*, ceea ce le recomandă pentru obținerea pansamentelor non active, pentru vindecarea rănilor și ingineria tisulară.

Procedeul de obținere a nanofirelor antimicrobiene, conform invenției, constă în aceea că, pe un colector al unui aparat de electrospinning se depun compozițiile pe bază de colagen din clei de iepure dizolvat în apă la un raport gravimetric 0,464:1, 5...36 mL soluție acid acetic 40% procente volumetrice și 0...1 % în greutate agenți antimicrobieni, la un debit al soluției de 0,4...0,9 mL/h, tensiune 22,71...24,35 kV și distanța dintre vârful de ac-colector 9...14 cm.

Invenția, conform descrierii de mai sus, prezintă următoarele **avantaje**:

- a. Se obțin nanofire continue pe bază de colagen din clei de iepure cu conținut ridicat de colagen și diferiți agenți antimicrobieni, prin procedeul electrospinning, având diametrul porilor controlat, ceea ce le recomandă pentru realizarea de pansamente non active (fără antibiotice) pentru tratamentul rănilor și obținerea de scaffold-uri pentru ingineria tisulară;

- b. Procedul de obținere a nanofirelor antimicrobiene este simplu versatil, reproductibil, are loc prin electrofilarea soluțiilor la temperatura camerei, fără un consum energetic mare și fără solvenți cu potențial toxic;
- c. Nanofirele obținute prezintă caracter antimicrobian adecvat utilizării propuse; Potențial de marketing, prin valorificarea materiilor prime naturale existente (colagenul sub formă de clei se extrage din piele piclată de iepure și prezintă proprietăți de electrofilare), în detrimentul resurselor sintetice, din surse petroliere, nebiodegradabile, cu performanțe reduse privind biocompatibilitatea.

Nanofirele de colagen din clei de iepure obținute au fost caracterizate prin determinarea dimensiunii (microscopie electronică de baleiaj) și a caracterului antimicrobian față de bacterii gram-pozitive și gram-negative și fungi. Rezultatele sunt discutate comparativ cu amestecul de referință și anume colagen din clei de iepure dizolvat în apă la un raport gravimetric 0,464:1 și 5 mL soluție acid acetic de concentrație 40% procente volumetrice.

Se prezintă în continuare 4 exemple de realizare a invenției.

Exemplul 1)

Colagenul sub formă de clei se extrage din piele piclată de iepure, mărunțită și supusă fierberii în baie de apă la 90°C, timp de patru ore. Acesta se caracterizează prin concentrație în substanță uscată de 10%, tăria cleiului de 421 și conductivitate electrică 820 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Cleiul astfel obținut se toarnă în cutii Petri și se usucă prin sublimare la 2-5°C, apoi se mărunțește prin mojarare sub formă de granule. 6,92 g clei de iepure astfel obținut se dizolvă în apă, la un raport gravimetric 0,464:1 și se amestecă cu 5 mL soluție acid acetic 40%. Această soluție se caracterizează prin: conductivitate electrică 272 $\mu\text{S}/\text{cm}$, pH 3,05 (la 27°C) și vâscozitate absolută 147,3 cP (200 rpm). 10 mL din soluția rezultată se introduc într-o seringă de teflon de 20 mL prevăzută cu un tub și un ac metalic calibru G21 atașat la celălalt capăt, în cadrul echipamentului de electrospinning. Soluția obținută are următoarea compoziție: 18,5% (procente gravimetrice) colagen din clei de iepure (granule), 39,5% apă, 42% soluție acid acetic 40%. Procesul de electrofilare este considerat ca fiind stabil în următoarele condiții: debit soluție 0,7 mL/h, tensiune +24,35 kV, distanța dintre vârful de ac la colector 9 cm. Nanofirele se colectează pe un tambur acoperit cu folie de aluminiu.

Nanofirele obținute prezintă un aspect omogen, o dimensiune a diametrului cuprinsă între 77,36 nm – 92,70 nm (Figura 1a) și activitate antimicrobiană pentru *Escherichia coli* și *Staphylococcus aureus*, timp de 14 zile expunere și respectiv activitate fungică pentru

Candida albicans timp de 7 zile expunere (Tabel 1) (European Pharmacopoeia 7.0 Efficacy of antimicrobial preservation).

Exemplul 2)

Se procedează conform procedurii descris în exemplul 1) și se amestecă 14 g soluție clei de iepure dizolvat în apă la un raport gravimetric 0,464:1 cu 36 mL soluție de acid acetic 40 % (procente volumetrice) și 1 g dispersie de nanoparticule de oxid de zinc (ZnO NPs), la temperatura camerei sub agitare magnetică la 200 rpm, timp de 2 ore, până se obține o soluție omogenă. Soluția astfel obținută se agită prin ultrasonicare, timp de 30 minute, în vederea eliminării bulelor de aer, înainte de electrofilare. Soluția obținută se caracterizează prin: conductivitate electrică 353 $\mu\text{S}/\text{cm}$, pH 3,83 (la 27°C) și vâscozitate absolută 302 cP (50 rpm). 10 mL din soluția rezultată se introduc într-o seringă de teflon de 20 mL, prevăzută cu un tub și un ac metalic calibru G21 atașat la celălalt capăt, în cadrul echipamentului de electrospinning. Soluția obținută are următoarea compoziție: 8,6% (procente gravimetrice) colagen din clei de iepure (granule), 18,8% apă, 70,6% soluție acid acetic 40% și 2% dispersie de nanoparticule de oxid de zinc (ZnO NPs). Parametrii optimi pentru procesul de electrofilare sunt: debit soluție 0,4 mL/h, tensiune +22,71 kV, distanța dintre vârful de ac-colector 14 cm. Nanofirele se colectează pe un tambur acoperit cu folie de aluminiu.

Nanofirele obținute prezintă un aspect omogen, o dimensiune a diametrului cuprinsă între 76,44 nm – 114,6 nm (Figura 1b) și activitate antimicrobiană pentru *Escherichia coli* și *Staphylococcus aureus* timp de 14 zile de expunere și respectiv activitate fungică pentru *Candida albicans* timp de 7 zile expunere (Tabel 2) (European Pharmacopoeia 7.0 Efficacy of antimicrobial preservation).

Exemplul 3)

Conform procedurii descris în exemplul 1) se amestecă 6 g soluție clei de iepure dizolvat în apă la un raport gravimetric 0,464:1 cu 5 mL soluție de acid acetic 40 % (procente volumetrice) și 1 g soluție AG425K de nanoparticule de dioxid de titan (TiO_2 NPs) dopate cu azot și nanoparticule de argint (AgNP), la temperatura camerei, sub agitare magnetică la 200 rpm, timp de 2 ore pentru a se obține o soluție omogenă. Soluția rezultată se agită prin ultrasonicare, timp de 30 minute, în vederea eliminării bulelor de aer. Soluția obținută se caracterizează prin: conductivitate electrică 271 $\mu\text{S}/\text{cm}$, pH 2,91 (la 27°C) și vâscozitate absolută 257 cP (100 rpm). 10 mL din soluția rezultată se introduc într-o seringă de teflon de 20 mL, prevăzută cu un tub și un ac metalic calibru G21 atașat la celălalt capăt, în cadrul echipamentului de electrospinning. Soluția obținută are următoarea compoziție: 24,5%

(procente gravimetrice) colagen din clei de iepure (granule), 25,5% apă, 41,7% soluție acid acetic 40% și 8,3% soluție AG425K de nanoparticule de dioxid de titan (TiO₂ NPs) dopate cu azot și nanoparticule de argint (AgNP). Parametrii optimi pentru procesul de electrofilare sunt: debit soluție 0,5 mL/h tensiune +24,27 kV, distanța dintre vârful de ac-colector 14 cm. Nanofirele se colectează pe un tambur acoperit cu folie de aluminiu.

Nanofirele obținute prezintă puține aglomerări de particule, o dimensiune a diametrului cuprinsă între 48,43 nm – 93,89 nm (Figura 1c) și activitate antimicrobiană față de *Escherichia coli* și *Staphylococcus aureus* timp de 14 zile de expunere și respectiv activitate fungică pentru *Candida albicans* timp de 7 zile expunere (Tabel 3) (European Pharmacopoeia 7.0 Efficacy of antimicrobial preservation).

Exemplul 4)

Conform procedurii descris în exemplul 1) se amestecă 7,2 g soluție clei de iepure dizolvat în apă la un raport gravimetric 0,464:1 cu 6 mL soluție de acid acetic 40 % (procente volumetrice) și 1 g soluție chitosan 1,5% (procente în greutate/procente volumetrice) la temperatura camerei, sub agitare magnetică la 200 rpm, timp de 2 ore pentru a se obține o soluție omogenă. Soluția de chitosan 1,5% (procente în greutate/procente volumetrice) se obține prin dizolvarea chitosanului (pulbere) în soluția de acid acetic 85% (procente volumetrice), sub agitare magnetică la 1000 rpm și 60°C, timp de 4 ore. Soluția rezultată se agită prin ultrasonicare, timp de 30 minute, în vederea eliminării bulelor de aer. Apoi, 10 mL soluție rezultată se introduc într-o seringă de teflon de 20 mL prevăzută cu un tub și un ac metallic calibru G21 atașat la celălalt capăt, în cadrul echipamentului de electrospinning. Soluția obținută se caracterizează prin: conductivitate electrică 245 μS/cm, pH 2,81 (la 27°C) și și vâscozitate absolută 512cP (50 rpm). Parametrii optimi pentru procesul de electrofilare sunt: debit soluție 0,6 mL/h tensiune +24,35 kV, distanța dintre vârful de ac-colector 9 cm. Soluția obținută are următoarea compoziție: 16% (procente gravimetrice) colagen din clei de iepure (granule), 34,6% apă, 42,3% soluție acid acetic 40% și 7,1% soluție de chitosan 1,5% în soluție acid acetic 85%. Nanofirele se colectează pe un tambur acoperit cu folie de aluminiu.

Nanofirele obținute prezintă un aspect heterogen, o dimensiune a diametrului cuprinsă între 42,66 nm – 75,38 nm (Figura 1d) și activitate antimicrobiană pentru *Escherichia coli* și *Staphylococcus aureus* timp de 14 zile de expunere și respectiv activitate fungică pentru *Candida albicans* timp de 7 zile expunere (Tabel 4) (European Pharmacopoeia 7.0 Efficacy of antimicrobial preservation).

În toate cazurile, condițiile de mediu de lucru în timpul procesului de electrofilare sunt: temperatura medie 29,6°C și umiditate relativă 35%.

Metode de caracterizare

Microscopie electronică cu baleiaj (SEM)

Morfologia și dimensiunea particulelor nanofirelor de colagen obținute au fost realizate cu ajutorul microscopului electronic cu baleiaj (SEM), QUANTA 450 FEG, mod de lucru high vacuum, după depunere pe banda de C.

Activitate antimicrobiană

Metoda: European Pharmacopoeia 7.0 Efficacy of antimicrobial preservation. Test for efficacy of antimicrobial preservation

Descrierea metodei: Încercarea constă în expunerea probei de testat la cu un inocul preparat cu un microorganism adecvat, depozitarea preparatului inoculat la o temperatură prescrisă, observarea eșantioanelor de probă testate la intervale de timp specificate și numărarea microorganismelor crescute pe probe. Mediile de cultură utilizate au fost: TSA (Casein soya bean digest agar) pentru bacterii și Sabouraud agar pentru fungi.

Pentru determinare se folosesc: bacterii gram-pozitive (*Staphylococcus aureus*) cu concentrația inițială de $2,45 \times 10^3$ UFC/mL, bacterii gram-negative (*Escherichia coli*) cu concentrația inițială de $1,5 \times 10^3$ UFC/mL și *Candida albicans* (ATCC 90028), care este un fung patogen care a avut concentrația inițială de $2,8 \times 10^4$ UFC/mL.

Criteriile de acceptare a activității antimicrobiene sunt specificate de metodă prin reducerea numărului de colonii viabile pentru un microorganism testat față de valoarea inițială a inoculului, exprimate în \log_{10} .


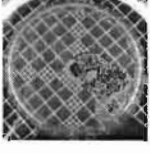
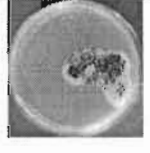

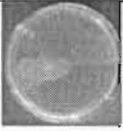
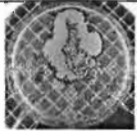
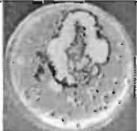


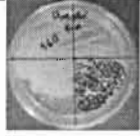
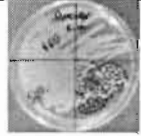
Rezultate obținute

Microscopie electronică cu baleiaj (SEM)


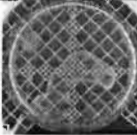
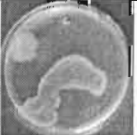


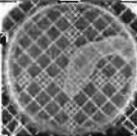
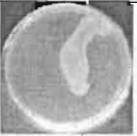
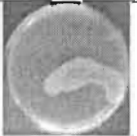


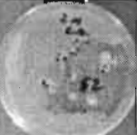
Imaginile SEM prezentate în Figura 1 relevă structuri omogene de nanofire în cazul utilizării colagenului din clei de iepure/ acid acetic (martor) (Figura 1a), clei de iepure/acid acetic/ZnO NPs și respectiv soluție AG425K (TiO₂ NPs dopate cu azot și nanoparticule de argint) (Figura 1b, 1c), în timp ce în cazul utilizării compoziției de clei de iepure/acid acetic/chitosan se obțin și aglomerări de particule (Figura 1d).

Rezultate privind proprietățile antimicrobiene ale nanofirelor de colagen din clei de iepure cu diferiți agenți antimicrobieni sunt prezentate în Tabel 1 – Tabel 4.


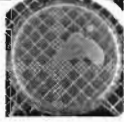
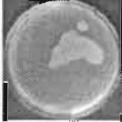


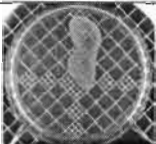
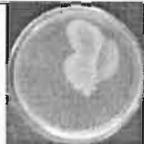



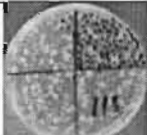
Tabel 1. Reducerea încărcării microbiologice sub influența nanofirelor de colagen

Microorganism		Reducere Log ₁₀			
Timp de observare testare microbiologică		6h	24h	7 zile	14 zile
<i>Escherichia coli</i>	Imagine probă				
	Valoare	3	2	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	Imagine probă				
	Valoare	2	4	-	-
<i>Candida albicans</i>	Imagine probă				
	Valoare	-	0,5	0,45	


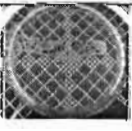
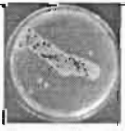
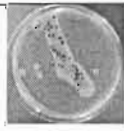
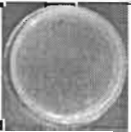
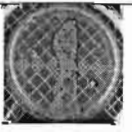
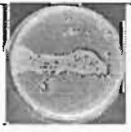


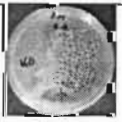
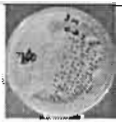
Tabel 2. Reducerea incarcarii microbiologice sub influenta nanofirelor de colagen cu nanoparticule de ZnO

Microorganism		Reducere Log ₁₀			
Timp de observare testare microbiologica		6h	24h	7 zile	14 zile
<i>Escherichia coli</i>	Imagine probă				
	Valoare	-	0,1	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	Imagine probă				
	Valoare	-	0,3	-	-
<i>Candida albicans</i>	Imagine probă				
	Valoare	-	2	1,65	

Tabel 3. Reducerea încărcării microbiologice sub influența nanofirelor de collagen cu AG425K

Microorganism		Reducere Log ₁₀			
Timp de observare testare microbiologică		6h	24h	7 zile	14 zile
<i>Escherichia coli</i>	Imagine probă				
	Valoare	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	Imagine probă				
	Valoare	-	-	-	-
<i>Candida albicans</i>	Imagine probă				
	Valoare	-	-	1,08	

Tabel 4. Reducerea încărcării microbiologice sub influența nanofirelor de collagen cu chitosan

Microorganism		Reducere Log ₁₀			
Timp de observare testare microbiologică		6h	24h	7 zile	14 zile
<i>Escherichia coli</i>	Imagine probă				
	Valoare	-	0,5	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	Imagine probă				
	Valoare	-	1	-	-
<i>Candida albicans</i>	Imagine probă				
	Valoare	-	1	1,15	

Din Tabelul 1 se poate observa că nanofirele de colagen fără agenți antimicrobieni prezintă activitate antimicrobiană mai slabă, în special după 6 ore de incubare, când se înregistrează valoarea 3, în cazul testării la *Escherichia coli* (față de valoarea 2 care este admisă) și valoarea 4 pentru *Staphylococcus aureus*, după 24 ore de expunere (față de valoarea admisă 3).

Din Tabelele 2 – 4 se observă că nanofirele de colagen din clei de iepure cu conținut de ZnO NPs, AG425K și chitosan prezintă valori ale reducerii încărcăturii microbiologice în cazul testării la *Escherichia coli* și *Staphylococcus aureus* în limitele admise de metodă. Agenții antimicrobieni încorporați în nanofirele de colagen din clei de iepure prezintă activitatea antimicrobiană în următoarea ordine: AG425K > ZnO NPs > chitosan.

Rezultatele privind rezistența la *Candida albicans* arată că numai nanofirele cu AG425K prezintă rezistență la 6h și 24h expunere, conform specificațiilor metodei.

Mecanismul exact al activității antimicrobiene pentru ZnO NPs, TiO₂ NPs, Ag NP, chitosan este încă în discuție. În literatura de specialitate au fost găsite diferite mecanisme pentru a explica modul în care nanoparticulele pot inactiva bacteriile. Generarea speciilor reactive de oxigen (ROS) prin descompunerea moleculelor de apă sub influența activității fotocatalitice a nanoparticule de oxid de metal, cum ar fi: anionul superoxid (O₂⁻), radicalii hidroxilici (HO[·]) și peroxidul de hidrogen (H₂O₂) poate provoca distrugerea componentelor celulare precum ADN-ul, proteinele și lipidele [21].

Un alt mecanism este eliberarea ionilor Zn²⁺ până la dizolvarea ZnO NPs. Zn²⁺ poate reduce metabolismul aminoacizilor și perturba sistemul enzimatic. Toxicitatea ZnO NPs a fost, de asemenea, asociată cu distrugerea integrității celulare prin contactul NPs cu peretele celular [22].

Mecanismul activității antimicrobiene în cazul chitosanului se poate explica prin natura policationică (sarcină pozitivă) a chitosanului care interferează cu metabolismul bacterian prin atragerea electrostatică la suprafața celulei [23].

BIBLIOGRAFIE

- [1] US 9.655.995 B2/2017 – Jingwei Xie. Nanofiber scaffolds and methods for repairing damaged cardiac tissue, 2017.
- [2] WO 2017/007842 A1- Lakshminarayanan, R. Dhand, C., Seeram, M., Liu., S., Beuerman R. W. A polymer product and preparation thereof, 2017.
- [3] US 9.228.009 B2/2016 – Hartgerink, J.D., O'Leary, L.R. Multi-hierarchical self-assembly of a collagen mimetic peptide, 2016.
- [4] Buttafoco, L., Kolkman, N.G., Engbers-Buijtenhuijs, P., Poot, A.A., Dijkstra, P.J., Vermes, I., Feijen, J. (2006). Electrospinning of collagen and elastin for tissue engineering applications. *Biomaterials*, **27**:724–734.
- [5] Mlyniec, A., Tomaszewski, K.A., Spiesz, E.M., Uhl, T. (2015). Molecular-based nonlinear viscoelastic chemomechanical model incorporating thermal denaturation kinetics of collagen fibrous biomaterials. *Polym Degrad Stab*, **119**:87–95.
- [6] Sun, L., Han, J., Liu, Z., Wei, S., Su, X., & Zhang, G. (2019). The facile fabrication of wound compatible anti-microbial nanoparticles encapsulated Collagenous Chitosan matrices for effective inhibition of poly-microbial infections and wound repairing in burn injury care: Exhaustive *in vivo* evaluations. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 111539. Doi:10.1016/j.jphotobiol.2019.111539.
- [7] Shukla, S.K., Mishra, A.K., Arotiba, O. A., Mamba, B.B. (2013). Chitosan-based nanomaterials: A state-of-the-art review. *Int. J. Biol. Macromol.* **59**:46–58.
- [8] Devi Sekar, A., Kumar, V., Muthukumar, H., Gopinath, P., Matheswaran, M. (2019). Electrospinning of Fe-doped ZnO nanoparticles incorporated polyvinyl alcohol nanofibers for its Antibacterial treatment and cytotoxic studies. *European Polymer Journal*. Doi:10.1016/j.eurpolymj.2019.05.038.
- [9] Petropoulou A., Christodoulou K., Polydorou C., et al. (2017). Cost-effective polymethacrylate-based electrospun fluorescent fibers toward ammonia sensing. *Macromol Mater Eng*; **302**. Doi: 10.1002/mame.201600453.
- [10] Pilehvar-Soltanahmadi, Y., Akbarzadeh, Moazzez-Lalaklo, N., Zarghami, N. (2016) An update on clinical applications of electrospun nanofibers for skin bioengineering, *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, **44**:6, 1350-1364. Doi:10.3109/21691401.2015.103699.
- [11] US 9.775.917 B2/2017 – Vile, G.F., Hosie, I.C., Feasey, S.V. Nanofibre and bioactive compositions and related methods, 2017.



- [12] Liu, Y., Li, Y., Deng, L., Zou, L., Feng, F., & Zhang, H. (2018). *Hydrophobic Ethylcellulose/Gelatin Nanofibers Containing Zinc Oxide Nanoparticles for Antimicrobial Packaging*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Doi:10.1021/acs.jafc.8b03267.
- [13] Sun, L., Han, J., Liu, Z., Wei, S., Su, X., Zhang, G. (2019). The facile fabrication of wound compatible anti-microbial nanoparticles encapsulated Collagenous Chitosan matrices for effective inhibition of poly-microbial infections and wound repairing in burn injury care: Exhaustive in vivo evaluations. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 111539. Doi:10.1016/j.jphotobiol.2019.111539.
- [14] Ruhal, A., Rana, J.S., Ruhal, P., Kumar, A., Ruhil, M. (2013). Antimicrobial nanocomposite of silver and gelatin nanofibers for medical applications, *International Journal for Technological Research in Engineering*, Volume 1, Issue 4.
- [15] US 5.116.620A/1992 – Chvapil, M., Barber. B.A. Antimicrobial wound dressing, 1992.
- [16] RO133132A1/2019 – Biopansament pe bază de hidroxiapatită dopată cu argint în matrice de collagen.
- [17] US 9.155.799 B2/2015 – Koob. T.J. Cross-linked collagen with at least one bound antimicrobial agent for in vivo release of the agent, 2015.
- [18] Ghezzi, L., Duce, C., Bernazzani, L., et al. (2015). Interactions between inorganic pigments and rabbit skin glue in reference paint reconstructions. *J Therm Anal Calorim*, **122**: 315-322.
- [19] Becker, U., Fietzek, P.P., Furthmays, H., et al. Non-helical sequences of rabbit collagen. *Eur J Biochem* 1975; **54**: 359-366.
- [20] Yu, W., Wang, X., Ma, L., et al. (2016). Preparation, characterisation and structure of rabbit (Hyla rabbit) skin gelatin. *Int J Food Sci Technol*; **51**: 574–580.
- [21] Danilczuk, M., Lund, A., Saldo, J., Yamada, H., Michalik, J. (2006). Conduction electron spin resonance of small silver particles. *Spectrochim. Acta A*. **63**: 189-191.
- [22] Da Silva, B. L., Caetano, B. L., Chiari-Andréo, B.G., Linhari Rodrigues Pietro, R.C., Chiavacci, L.A. (2019). Increased antibacterial activity of ZnO nanoparticles: influence of size and surface modification. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. Doi:10.1016/j.colsurfb.2019.02.013.
- [23] Young, D.H., Kohle, H, Kauss, H. (1982). Effect of chitosan on membrane permeability of suspension cultured Glycine max and Phaseolus vulgaris cells. *Plant Physiol* **70**(5), 1449–1454. Doi:10.1104/pp.70.5.1449.

REVENDICĂRI

1. Compoziții de nanofire din colagen de tip clei de iepure, pe bază de colagen din clei de iepure și agenți antimicrobieni, **caracterizate prin aceea că**, pentru obținerea lor s-au utilizat 8,6...24,5% clei din piele de iepure sub formă de granule, 18,8...39,5% apă, 41,7...70,6% soluție de acid acetic în concentrație de 40% și 2...8,3% agenți antimicrobieni, care prezintă dimensiuni nanometrice (77,36 nm – 92,70 nm) și activitate antimicrobiană față de *Escherichia coli* și *Staphylococcus aureus* timp de 14 zile și *Candida albicans* timp de 6 h de expunere, ceea ce le recomandă pentru obținerea pansamentelor non active.
2. Procedeu de obținere a nanofirelor din colagen din clei de iepure și agenți antimicrobieni, **caracterizate prin aceea că**, obținerea lor are loc prin electrofilare cu un debit al soluției 0,4...0,9 mL/h, tensiune +22,71...+24,35 kV și distanța dintre vârful de ac-colector 9...14 cm.
3. Compoziții de nanofire de colagen din clei de iepure și agenți antimicrobieni conform Revendicării 1, **caracterizate prin aceea că** sunt constituite din amestecuri formate din procente în greutate de: 8,6% clei din piele de iepure sub formă de granule, 18,8% apă, 70,6% soluție de acid acetic în concentrație de 40% și 2% dispersie de nanoparticule de oxid de zinc, cu activitate antimicrobiană față de *Escherichia coli* și *Staphylococcus aureus* timp de 14 zile și *Candida albicans* timp de 7 zile de expunere, ceea ce le recomandă pentru obținerea pansamentelor non active.
4. Compoziții de nanofire de colagen din clei de iepure și agenți antimicrobieni conform Revendicării 1, **caracterizate prin aceea că** sunt constituite din amestecuri formate din procente în greutate de: 24,5% clei din piele de iepure sub formă de granule, 25,5% apă, 41,7% soluție de acid acetic în concentrație de 40% și 8,3% soluție de nanoparticule de dioxid de titan dopate cu azot și azotat de argint, cu activitate antimicrobiană față de *Escherichia coli* și *Staphylococcus aureus* timp de 14 zile și *Candida albicans* timp de 7 zile de expunere, ceea ce le recomandă pentru obținerea pansamentelor non active.

5. Compoziții de nanofire de colagen din clei de iepure și agenți antimicrobieni conform Revendicării 1, **caracterizate prin aceea că** sunt constituite din amestecuri formate din procente în greutate de: 16% clei din piele de iepure sub formă de granule, 34,6% apă, 42,3% soluție de acid acetic în concentrație de 40% și 7,1% soluție de chitosan 1,5% în soluție acid acetic 85%, cu activitate antimicrobiană față de *Escherichia coli* și *Staphylococcus aureus* timp de 14 zile și *Candida albicans* timp de 7 zile de expunere, ceea ce le recomandă pentru obținerea pansamentelor non active.

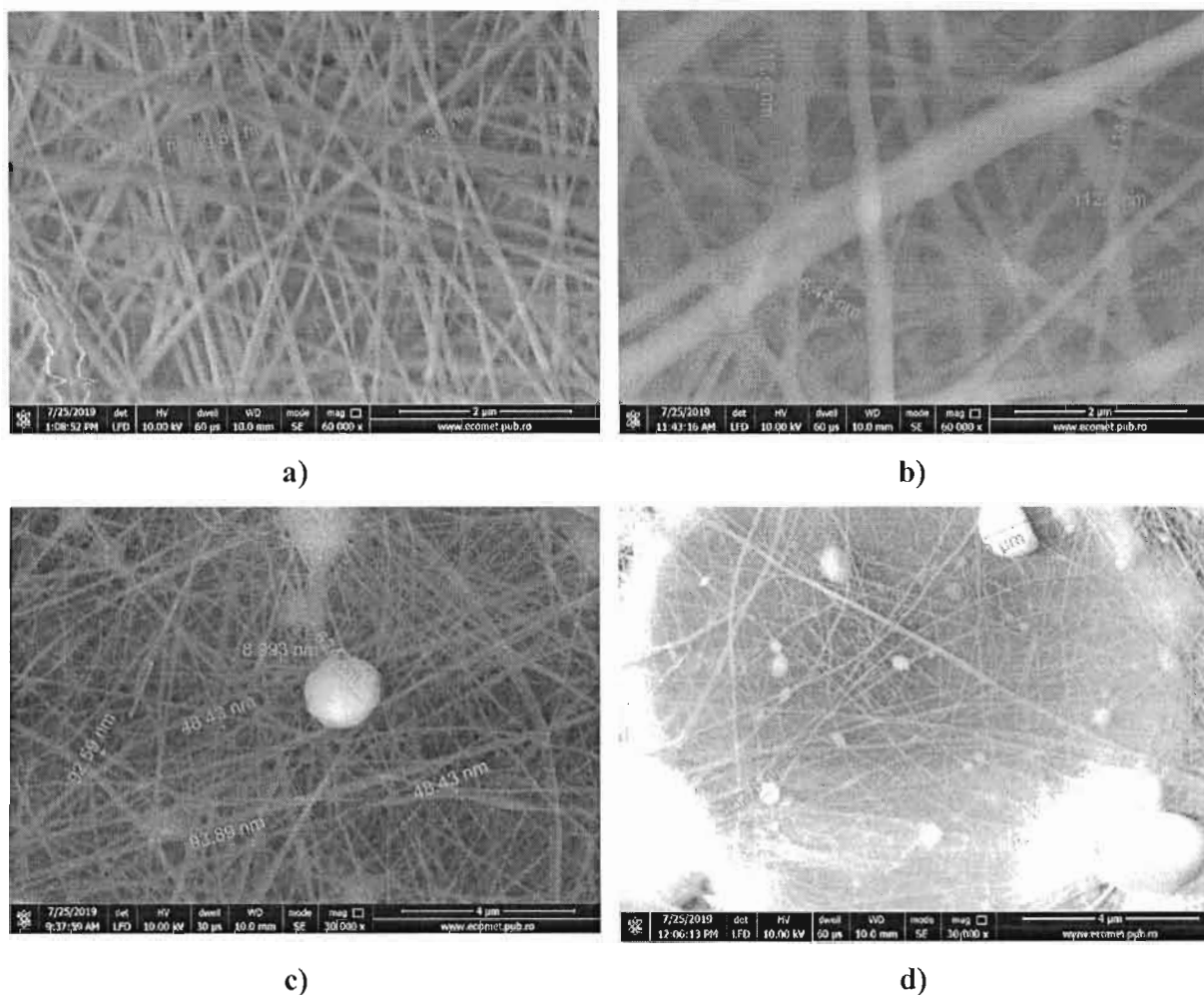


Figura 1. Imagini ale nanofirelor din collagen din clei de iepure obținute prin microscopia electronică de baleiaj
a) Nanofire pe bază de collagen din clei de iepure (martor); b) Nanofire pe bază de collagen din clei de iepure/ZnO NPs; c) Nanofire pe bază de collagen din clei de iepure/AG425K; d) Nanofire pe bază de collagen din clei de iepure/chitosan