

Academia Oamenilor de Știință din România

RAPORT FINAL DE ACTIVITATE

Suporturi magnetice destinate eliberării controlate

Director de Proiect:

Prof. Dr. Ing. Ecaterina ANDRONESCU

Membru Titular al AOSR

Cercetător:

As. Univ. Drd. Ing. Ionela Andreea NEACȘU

Universitatea POLITEHNICA din București

Noiembrie 2018

CUPRINS

1. Sisteme cu eliberare controlată	3
1.1 Clasificare	3
1.2 Avantaje și limitări.....	4
2. Nanotransportori pentru sistemele cu eliberare controlată	5
3. Metode de obținere a nanoparticulelor magnetice	7
4. Compuși antitumorali naturali cu caracter hidrofob	10
5. Materiale și metode.....	12
5.1 Sinteza Fe ₃ O ₄	12
5.2 Sinteza Fe ₃ O ₄ @acid glutamic	13
5.3 Obținerea sistemului complex Fe ₃ O ₄ @acid glutamic+Curcumină.....	14
6. Tehnici specifice de caracterizare	15
6.1 Difrakția de raze X (XRD).....	15
6.2 Microscopia electronică de baleiaj (SEM).....	15
6.3 Spectroscopia în infraroșu cu transformată Fourier (FT-IR)	15
6.4 Magnetometrie cu probă vibrantă (VSM).....	16
6.5 Microscopia electronică prin transmisie (TEM)	16
6.6 Analiza termică complexă (TG/DSC).....	16
6.7 Evaluarea potențialului citotoxic.....	17
6.7.1 Proliferarea celulară - MTT assay (Vybrant MTT cell Proliferation Assay kit, Molecular Probe)	18
6.7.2 Evaluarea stresului oxidativ (GSH-Glo™ Glutathione Assay, Promega).....	18
6.7.3 Evidențierea morfologiei citoscheletului (filamentelor de tubulină)	19
7. Rezultate și discuții	20
7.1 Caracterizarea pulberii de Fe ₃ O ₄	20
7.2 Caracterizarea pulberii de Fe ₃ O ₄ @acid glutamic	25

7.3 Caracterizarea biologică a materialelor obținute	30
8. Concluzii	32
9. Referințe bibliografice	34

1. Sisteme cu eliberare controlată

1.1 Clasificare

Sistemele cu eliberare controlată urmăresc ca un medicament și o matrice (biomaterial), într-un mod economic, să conducă la obținerea unui produs care, în contact cu mediul biologic, să determine, în timp, eliberarea principiului activ după un profil cinetic care să corespundă cerințelor impuse. Cel mai frecvent se dorește o viteză constantă de eliberare a substanței active, care în analogie cu cinetica chimică, corespunde unei cinetici de ordin zero [1].

- După modul de obținere a acestora, sistemele cu eliberare controlată pot fi clasificate:

a) *Sisteme fizice*, în cadrul cărora are loc încorporarea fizică a unui medicament într-o matrice (polimerică sau nepolimerică);

b) *Sisteme chimice*, caracterizate de legături chimice stabilite între medicament și materialul gazdă.

Sistemele fizice se clasifică la rândul lor în [2]:

- *Sisteme erodabile*, în cadrul cărora medicamentul este amestecat fizic cu o matrice și este eliberat în timp ce suportul este consumat (erodat) de mediul cu care vine în contact prin procese fizice de dizolvare.

- *Sisteme rezervor*, ce constau dintr-o membrană, non-degradabilă sau biodegradabilă, polimerică, care limitează viteza de eliberare și separă principiul activ (miezul sistemului) de mediul biologic. Sistemele rezervor pot fi obținute sub diverse morfologii, și anume: capsule, microcapsule, fibre sau tuburi cu capetele închise

- În funcție de mecanismul de control al eliberării medicamentului, sistemele de eliberare controlată a medicamentelor se clasifică în 5 categorii [3]:

1. Sisteme controlate de difuzie:

a. Dispozitive de tip rezervor (sisteme membrană);

b. Dispozitive de tip matrice (sisteme monolitice).

2. Sisteme controlate chimic:

a. Sisteme bioerodabile și biodegradabile;

b. Sisteme cu catene ramificate.

3. Sisteme activate de solvent:

a. Sisteme controlate osmotice;

b. Sisteme controlate prin îmbibare.

4. Sisteme cu eliberare modulată;

5. Sisteme ce prezintă capacitate de schimb ionic (silicați stratificați).

1.2 Avantaje și limitări

Avantaje clinice [4]:

- Diminuarea frecvenței administrării medicamentelor;
- Îmbunătățirea confortului pacientului;
- Reducerea nivelului de fluctuații în sânge a compușilor activi terapeutic;
- Spre deosebire de terapia convențională, permit diminuarea cantității de medicament utilizate;
- Diminuarea semnificativă a acumulării medicamentului în cadrul terapiei cronice;
- Scăderea toxicității medicamentului, atât la nivel local, cât și la nivel sistemic;
- Stabilizarea condiției medicale a pacientului ca urmare a unei concentrații mult mai uniforme a medicamentului;
- Îmbunătățirea biodisponibilității compușilor activi caracterizați de un timp de înjumătățire foarte scurt, datorită controlului spațial;
- Viteze de eliberare previzibile și reproductibile de-a lungul unei perioade lungi de timp.

Avantaje comerciale/industriale [4]:

- Extinderea ciclului de viață a produsului;
- Diferențierea produsului;
- Expansiunea pe piață;
- Extinderea brevetului.

Potențialele limitări ale sistemelor cu eliberare controlată [4]:

- Întârzierea procesului de acțiune a medicamentului;
- Probabilitatea retenției la nivelul sistemului a unei concentrații de medicament care se dovedește a fi insuficientă pentru terapia afecțiunii în cauză;
 - Dependența majoră a formei farmaceutice de perioada de retenție la nivelul tractului gastro-intestinal;
 - Costurile înregistrate depășesc valoarea terapiilor convenționale;
 - Nu toate medicamentele permit dezvoltarea unor sisteme cu eliberare prelungită.

Selectarea substanței active pentru dezvoltarea sistemelor cu eliberare prelungită reprezintă un pas critic. De aceea, este esențial a se ține cont de o serie de caracteristici prin care se poate evalua dacă un medicament se pretează, sau nu, formulărilor cu eliberare prelungită. Perioada de înjumătățire foarte scurtă sau prea extinsă, indicele terapeutic restrâns

sau limitat, absorbția redusă (lentă) sau activă, sunt doar câteva dintre aspectele deținute de medicamente, care ar putea influența eficacitatea dezvoltării sistemelor cu eliberare controlată [4].

În funcție de scopul urmărit, există mai multe tipuri de profile de eliberare controlată a medicamentelor, cele mai importante fiind ilustrate în Figura 1 [3].

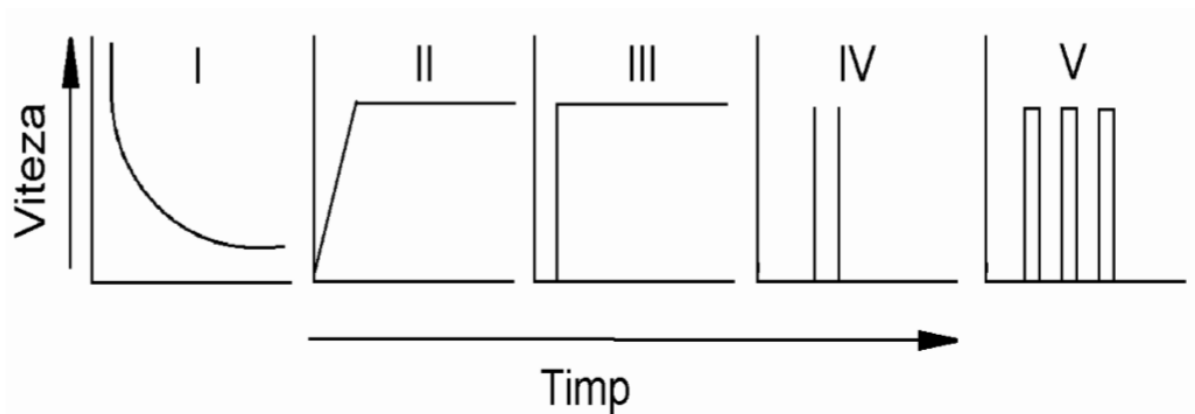


Figura 1. Diferite tipuri de profile de eliberare a medicamentelor (Tip I) viteza de eliberare scade exponențial cu timpul, (Tip II) cinetica de ordin 0 cu viteza de eliberare constantă, (Tip III) eliberare de ordin 0 cu întârziere semnificativă, (Tip IV) eliberare pulsatilă cu întârziere, (Tip V) eliberare multiplă cu întârziere constantă între eliberări [3].

2. Nanotransportori pentru sistemele cu eliberare controlată

Nanotransportorii sunt sisteme ce oferă posibilități unice de depășire a barierelor celulare, cu scopul de a îmbunătăți livrarea numeroaselor substanțelor active precum medicamentele, și nu în ultimul rând biomacromoleculele terapeutice [5]. Nanotransportorii ce dețin proprietăți fizico-chimice și biologice optimizate sunt mult mai ușor internalizați la nivel celular, spre deosebire de sistemele cu dimensiuni mai mari, ceea ce permite utilizarea cu succes a acestora ca suporturi pentru transportul compușilor bioactivi [6]. Până în prezent, au fost dezvoltați o serie de nanotransportori terapeutici, însă, cea mai mare parte dintre aceștia necesită teste suplimentare care să ateste siguranța utilizării lor clinice [7].

În ultimul deceniu, nanoparticulele au fost propuse ca transportori pentru sistemele cu eliberare controlată. Nanoparticulele sunt particule coloidale solide cu diametre mai mici de 100 nm, și, prin urmare, sunt considerate nanomateriale „zero-dimensionale” [7]. Nanoparticulele sunt special concepute pentru a absorbi, adsorbi sau încapsula o substanță activă, asigurând astfel protecția acesteia împotriva eventualelor procese de degradare, chimice sau enzimatic. Acestea pot fi utilizate ca adjuvante în vaccinuri sau transportori de medicamente, la nivelul cărora compusul activ este dizolvat, încapsulat, adsorbit sau atașat

chimic [8]. Principalul scop în proiectarea nanoparticulelor ca sisteme cu eliberare controlată, este acela de a elibera specific agenții farmacologic activi la viteze și doze optime de administrare [9].

Au fost raportate o serie de beneficii ale utilizării nanoparticulelor ca sisteme cu eliberare controlată, după cum urmează [10]:

- Eliberare controlată și susținută a medicamentului pe întreaga perioadă a transportului, precum și la nivelul zonei de acțiune dorite; o astfel de terapie implică selectivitatea, iar în acest fel se obține o creștere a eficienței terapeutice și diminuarea efectelor secundare (terapia convențională este non-selectivă, prin urmare efectele secundare se manifestă, de regulă, la nivel sistemic);

- Substanța activă poate fi încorporată în sistem fără a implica o reacție chimică; acesta este un factor important ce permite conservarea medicamentului;

- Caracteristicile de eliberare controlată și de degradare a medicamentului pot fi modulate cu ușurință;

- Nu există pierderi de substanțe active, prin urmare se înregistrează o creștere a biodisponibilității medicamentului în zona dorită, și pentru o mai lungă perioadă de timp;

- Solubilitatea medicamentelor ce prezintă un grad scăzut de solubilitate în apă este semnificativ îmbunătățită, timpul de înjumătățire al medicamentului în circulația sangvină este de asemenea prelungit prin reducerea imunogenității, eliberarea medicamentului cu o rată susținută și reducerea frecvenței de administrare a compușilor terapeutici;

- Creșterea confortului pacientului și îmbunătățirea performanței terapeutice, comparativ cu sistemele convenționale.

Când medicamentele sunt încărcate la nivelul nanoparticulelor prin încapsulare, adsorbție sau conjugate chimic, farmaco-cinetica acestora, precum și indicele terapeutic, pot fi semnificativ îmbunătățite. Substanțele active pot fi încapsulate în interiorul nanoparticulei (nanosferei), sau legate, fizic sau chimic, de suprafața acesteia.

Odată ajunse în zona de interes, nanoparticulele pot elibera medicamentul prin următoarele procese: difuzie, gonflare, eroziune sau degradare. Unele sisteme permit eliberarea compușilor activi sub influența unei energii exterioare, cum ar fi ultrasunetele, lumina sau câmpul magnetic [11]. Avantajele precum creșterea solubilității medicamentelor, prelungirea duratei de viață a acestora la nivel sistemic, eliberarea controlată și susținută a substanțelor active, distribuția preferențială a acestora către țesuturile și celulele de interes și posibilitatea

de a livra și elibera simultan mai mulți agenți terapeutici în cadrul terapiei combinate, recomandă nanoparticulele ca transportori promițători în dezvoltarea sistemelor cu eliberare controlată [10].

Există numeroase tipuri de nanoparticule, de diferite dimensiuni, forme și materiale, cu varii proprietăți chimice și de suprafață. În *Figura 2* de mai jos, sunt listate clase de nanoparticule, și după cum se poate observa, acestea variază atât din punct de vedere morfologic, cât și dimensional [12].

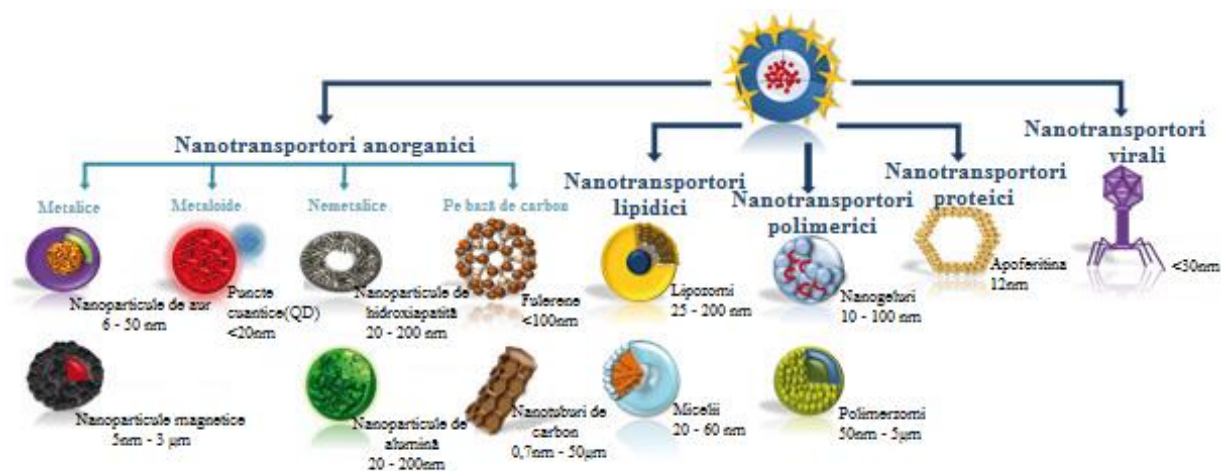


Figura 2. Tipuri de nanoparticule utilizate ca nanotrasportori pentru sistemele cu eliberare controlată (preluată și modificată [12])

3. Metode de obținere a nanoparticulelor magnetice

Nanoparticulele magnetice pot fi sintetizate prin numeroase metode fizice și chimice, dintre care putem aminti: metoda microemulsiilor, reacții de co-precipitare, sinteza sol-gel, reacțiile sono-chimice, sinteza prin metoda hidrotermală, descompunere termică, biosinteza, sinteza prin injecție în flux și metoda electrochimică. Aceste metode (prezentate pe scurt în tabelul 1) au fost utilizate de-a lungul timpului pentru obținerea unor particule cu compoziție omogenă și o distribuție îngustă a dimensiunii medii de particulă. Deși există numeroase alternative în ceea ce privește metodele de sinteză a nanoparticulelor magnetice, cea mai comună dintre acestea este metoda co-precipitării [13].

Tehnica co-precipitării este probabil cea mai simplă și cea mai eficientă rută de obținere a nanoparticulelor magnetice. Oxizii de fier, printre care și magnetita (Fe_3O_4), sunt sintetizați, de regulă, prin această metodă, ce constă în obținerea unui amestec stoichiometric de săruri feroase și ferice în mediu apos, raportul molar $\text{Fe}^{2+}:\text{Fe}^{3+}$ fiind 1:2.

Reacția de co-precipitare are loc la pH bazic, fie la temperatura camerei, fie la temperaturi ridicate [13].

Tabel 1. Metode uzuale de obținere a nanoparticulelor magnetice

Categoria	Metoda de obținere	Avantaje	Dezavantaje
Fizice	Litografie cu electroni	Posibilitatea de a modifica cu ușurință șablonul, utilizând programul CAD	Control redus asupra dimensiunii la scală nanometrică
	Depunere în fază de vapori	Se pot obține nanostructuri 1D de oxizi de Fe	
Chimice, în soluție	Co-precipitare	Metodă simplă, cu un cost redus, condiții blânde de reacție	Dificil de controlat dimensiunea și de a evita oxidarea
	Hidrotermală	Se pot obține particule cu dimensiuni cuprinse într-un interval îngust; forma și gradul de cristalinitate se pot regla ușor	Temperatură înaltă; sunt necesari compuși organici, toxici
	Depunere termică	Proprietăți magnetice, dimensiune și grad de cristalinitate ușor de controlat	Sunt necesare temperaturi și presiuni ridicate
Biologice	Procese microbiene	Reproductibilitate înaltă, necesită resurse reduse de energie (temperatură scăzută)	Procesul durează de la câteva zile până la 3 săptămâni

Dimensiunea și forma nanoparticulele de magnetită depinde de tipul sărurilor utilizate (cloruri, sulfați, nitrați, perclorați etc.), de raportul molar al ionilor ferici și feroși, de temperatura de reacție, de valoare pH-ului, concentrația ionică a mediului, precum și de alți parametri de reacție precum viteza de agitare și viteza de picurare a soluției de precursori în soluția cu un caracter bazic [[14][14][14][13].

Conform termodinamicii acestei reacții, o precipitare completă a magnetitei are loc la valori ale pH-ului cuprinse între 9 și 14, cu un raport stoichiometric precis de 2:1 ($\text{Fe}^{3+}:\text{Fe}^{2+}$).

Cu toate acestea, magnetita nu prezintă o foarte bună stabilitate și este foarte susceptibilă la oxidare, aceasta fiind transformată în maghemită ($\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$) în prezența oxigenului [13].

Principalul avantaj al acestei metode de sinteză este acela că, prin reacția de co-precipitare, se poate obține cu ușurință o cantitate mare de nanoparticule. Totuși, controlul distribuției dimensiunii nanoparticulelor este limitat, deoarece creșterea cristalelor este controlată doar de factorii cinetici.

În procesul de co-precipitare, sunt implicate două etape de bază: reacția de nucleație, care apare atunci când speciile precursorare ating suprasaturația critică, urmată de creșterea lentă a particulelor prin difuzia soluturilor către suprafața cristalelor. Pentru a obține nanoparticule de magnetită monodisperse, aceste două etape trebuie separate; prin urmare, nucleația trebuie evitată pe parcursul perioadei de creștere [13].

Particulele magnetice sintetice, obținute prin diverse rute de sinteză, pot prezenta diferențe mari în ceea ce privește proprietățile lor magnetice. Aceste diferențe sunt atribuite modificărilor structurale, creării limitelor antifazice, sau existenței unui strat magnetic rezidual la suprafața particulelor.

Dezavantajul metodelor de sinteză în soluții apoase este acela că valoarea pH-ului de reacție a amestecului trebuie să fie ajustată atât în timpul procesului de sinteză, cât și pe parcursul procesului de purificare. Prin urmare, producerea unor cantități semnificative de particule magnetice dispersate și cu dimensiuni mici, reprezintă o provocare, atunci când sunt abordate astfel de metode de sinteză. Tendința acestor nanoparticule de a forma agregate și de a crește în dimensiune, pentru a minimiza energia totală liberă a suprafeței, reprezintă o dificultate critică și dificil de combătut [15]-[16].

4. Compuși antitumorali naturali cu caracter hidrofob

α-Bisabolol, denumit I.U.P.A.C. 6-metil-2-(4-metil-3-ciclohexen-1-il)-5-hepten-2-ol, este un alcool sesquiterpenic natural cu formula chimică C₁₅H₂₆O (*figura 3*), a fost izolat pentru prima dată din *Matricaria chamomilla* (*Asteraceae*) în secolul al XX-lea și de atunci a fost identificat în alte plante aromatice cum ar fi *Eremanthus erythropappus*, *Smyrniopsis aucheri* și *Vanillosmopsis*. Recent, *α*-bisabololul a fost identificat ca un constituent major al uleiului esențial *Salvia Runcinata*, o plantă indigenă în Africa de Sud.

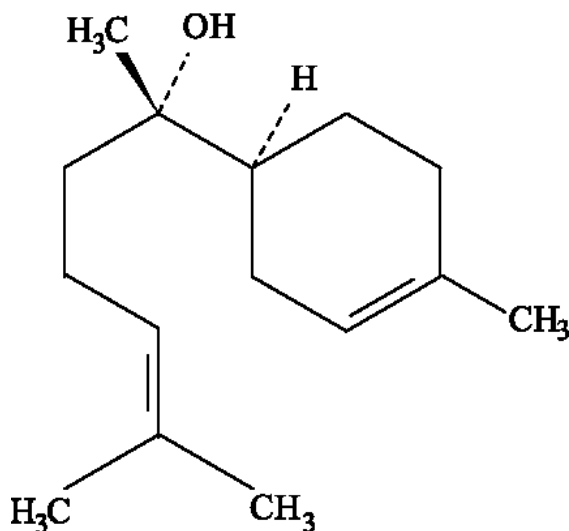


Figura 3. Structura chimică structurală a α-Bisabolol

Acest compus prezintă, de asemenea, câteva alte proprietăți farmacologice, cum ar fi activitățile analgezice, antibiotice și anticanceroase. Recent, s-a demonstrat că *α*-Bisabolol este un inhibitor al AKT și s-au dezvoltat astfel terapii promițătoare pentru cancerul pancreatic avansat pe baza acestuia [18] [19]. Mutagenitatea și genotoxicitatea bisabololului au fost, de asemenea, investigate. Datorită toxicității scăzute asociate bisabololului, Administrația pentru Alimentație și Medicamente (Food and Drug Administration - FDA) a acordat acestui constituent statutul de “substanță sigură” (Generally Regarded as Safe - GRAS), care a promovat utilizarea acestuia ca ingredient activ în mai multe produse comerciale [20].

Curcumina este un ingredient esențial extras din rădăcina de *Curcuma Longa*. Rădăcina acestei plante are colorație galbenă datorată curcuminei, motiv pentru care a fost utilizată ca agent colorant în produse alimentare și medicamente în țările asiatice [17].

Curcumina (1,7-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-heptadien-3,5 dionă, *figura 4*) este un fenol hidrofob care are o varietate largă de aplicații ca agent terapeutic (potențial antiinflamator, anti-cancerigen și neuroprotector), bucurându-se de un real interes datorită structurii conjugate unice care îi permite să acționeze ca un antioxidant [18].

Se prezintă sub formă de pulbere galbenă, cu o masă moleculară de 368 g/mol și un punct de fierbere de 183°C. În stare naturală se regăsește sub forma a 2 tautomeri. Nucleele aromatice sunt funcționalizate cu grupări metoxy și hidroxi în poziția orto una față de cealaltă. Cele 2 nucleee aromatice sunt conectate printr-o catenă alifatică nesaturată ce conține 7 atomi de C, cu 2 grupări carbonil [19].

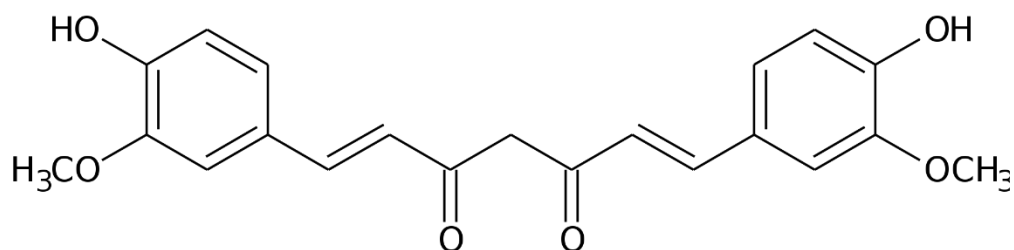


Figura 4. Formula chimică structurală a Curcuminei [20]

Acidul usnic (C₁₈H₁₆O₇ – figura 5), se găsește în mod unic în licheni și este larg răspândit în speciile *Cladonia* (*Cladoniaceae*), *Usnea* (*Usneaceae*), *Lecanora* (*Lecanoraceae*), *Ramalina* (*Ramalinaceae*), *Evernia*, *Parmelia* (*Parmeliaceae*) și alte genuri de licheni, speciile *Alectoria* (*Alectoriaceae*) fiind de multe ori printre cele mai bogate surse de acid usnic. Lichenii sunt formați prin simbioză între ciuperci și alge și / sau cianobacterii. Mulți licheni care conțin acid usnic au fost utilizați pentru aplicații medicinale, cosmetice și ecologice [21].

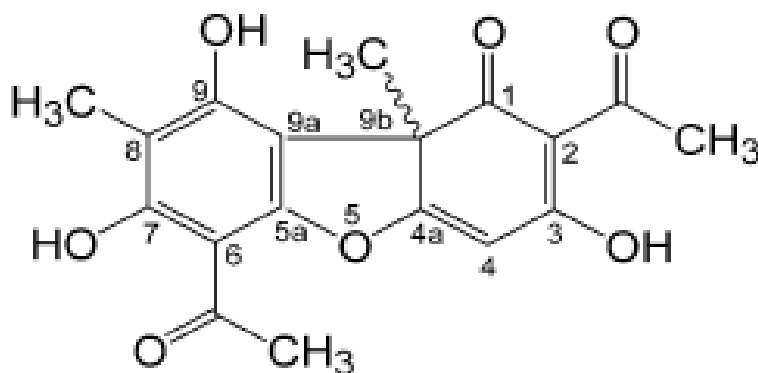


Figura 5. Formula chimică structurală a Acidului Usnic

Yang și colaboratorii au studiat activitatea de inhibare a dezvoltării celulelor canceroase pulmonare de către 7 specii de licheni din Munții Carpați, precum și mecanismul de acțiune anti-metastatic identificat, în vederea valorificării lor ca noi agenți anti-cancerigeni [22].

5. Materiale și metode

5.1 Sinteza Fe_3O_4

Utilizând metoda co-precipitării, descrisă în cele ce urmează (figura 6), a fost realizată sinteza nanoparticulelor de magnetită:

În vederea obținerii a 3 g magnetită se cântăresc 3,6 g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ și 4,2 g $FeCl_3$ care se solubilizează în 600 mL apă ultrapură, sub agitare magnetică continuă. O altă soluție bazică este obținută prin solubilizarea a 4.5 g NaOH în 300 mL apă ultrapură, asigurând astfel un pH adecvat procesului de coprecipitare. Prima soluție, ce conține ioni de fier se adaugă peste soluția bazică, în picătură, cu debit constant, cu ajutorul unei pompe peristaltice.

La finalul picurării, cu ajutorul unui magnet, se efectuează decantarea accelerată a nanoparticulelor de magnetită prin plasarea paharului care conține suspensia deasupra magnetului. După decantare, menținând magnetul sub pahar, în aceeași poziție relativă față de acesta, faza lichidă este îndepărtată.

Precipitatul este spălat cu apă ultrapură în vederea îndepărtării produșilor de reacție secundari și materiilor prime nereacționate, până la obținerea unui pH neutru. După spălare, nanoparticulele sunt uscate în etuva cu vid, la temperatura de $60^\circ C$ pentru 24 h.

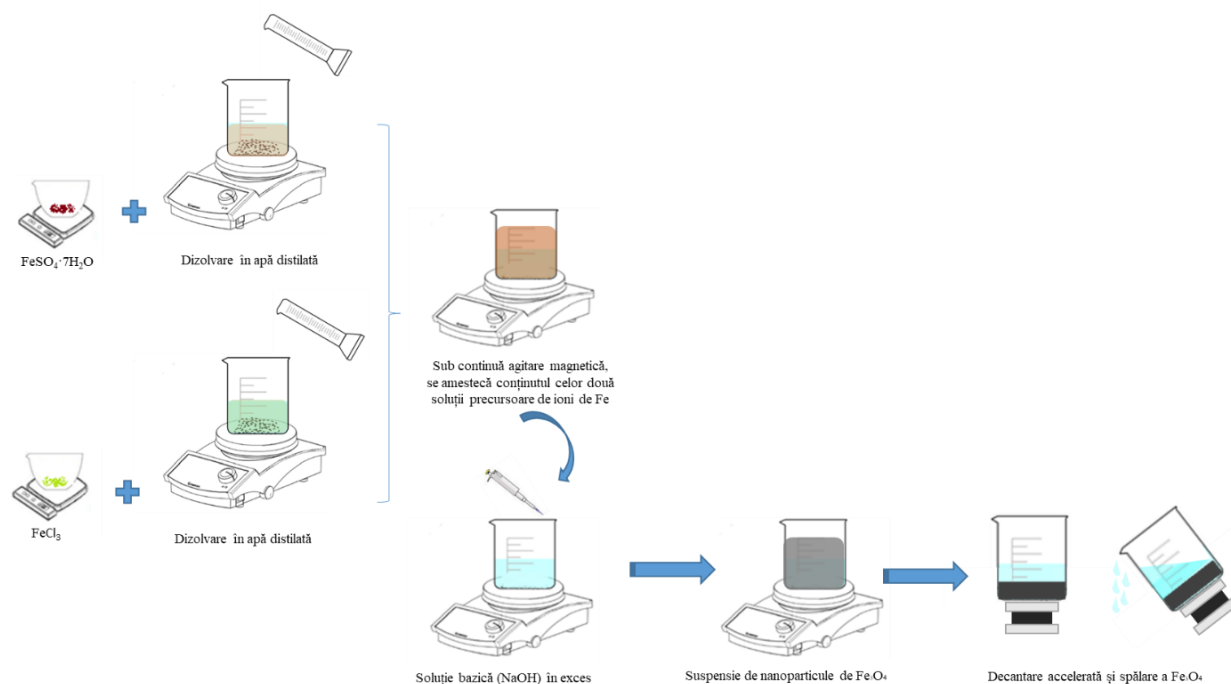


Figura 6. Schema de obținere a nanoparticulelor de magnetită (Fe_3O_4)

5.2 Sinteza $Fe_3O_4@acid\ glutamic$

Sinteza nanoparticulelor de magnetită acoperită cu acid glutamic (figura 7) a fost realizată prin metoda co-precipitării modificate (figura 8) astfel:

Pentru obținerea a 3 g magnetită acoperită cu acid glutamic se cântăresc 3,6 g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ și 4,2 g $FeCl_3$ care se solubilizează în 600 mL apă ultrapură, sub agitare magnetică continuă. O altă soluție bazică este obținută prin solubilizarea a 4.5 g NaOH în 300 mL apă ultrapură, asigurând astfel un pH adecvat procesului de coprecipitare.

În soluția bazică astfel obținută se dozează acidul glutamic în raport molar 1:2 față de magnetită. Prima soluție, ce conține ioni de fier se adaugă peste soluția bazică, în picătură, cu debit constant, cu ajutorul unei pompe peristaltice.

La finalul picurării, cu ajutorul unui magnet, se efectuează decantarea accelerată a nanoparticulelor de magnetită prin plasarea paharului care conține suspensia deasupra magnetului.

După decantare, menținând magnetul sub pahar, în aceeași poziție relativă față de acesta, faza lichidă este îndepărtată.

Precipitatul este spălat cu apă ultrapură în vederea îndepărtării produșilor de reacție secundari și materiilor prime nereacționate, până la obținerea unui pH neutru. După spălare, nanoparticulele sunt uscate în etuva cu vid, la temperatura de 60°C pentru 24 h.

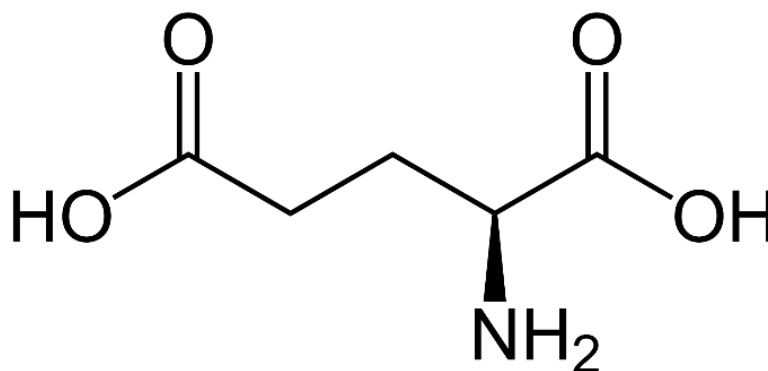


Figura 7. Formula structurală a acidului glutamic

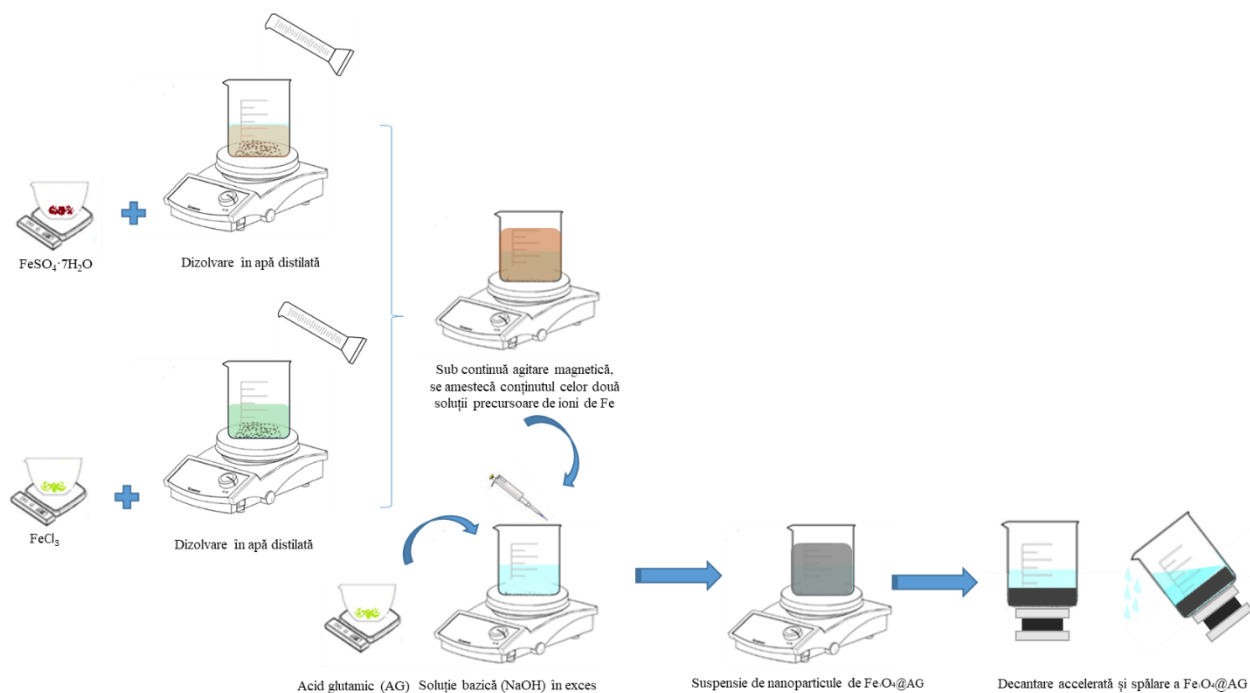


Figura 8. Schema de obținere a nanoparticulelor de magnetită ($Fe_3O_4@AG$)

5.3 Obținerea sistemului complex $Fe_3O_4@acid\ glutamic+Curcumină$

Pentru încapsularea Curcuminei în sistemul anterior obținut, de tipul $Fe_3O_4@acid\ glutamic$, au fost mai întâi dispersate 100 mg $Fe_3O_4@AG$ în 20 ml apă deionizată, folosind o baie de ultrasonare, timp de 20 min. Peste aceasta s-a adăugat un amestec format din 1mg Curcumină și 10 ml etanol (solubilitatea curcuminei în etanol este de 10mg/ml).

Dispersia obținută a fost supusă agitării magnetice la temperatura camerei, până la volatilizarea completă a etanolului. Particulele magnetice impregnate cu curcumină au fost separate de curcumina liberă prin același procedeu de decantare magnetică accelerată și spălate de 3 ori cu apă deionizată.

După spălare, nanoparticulele sunt uscate în etuva cu vid, la temperatura de 30°C pentru 24 h.

6. Tehnici specifice de caracterizare

6.1 Difracția de raze X (XRD)

Analiza XRD a fost realizată în scopul caracterizării materialelor sintetizate din punctul de vedere al cristalinității acestora, precum și al fazelor componente, pentru anticiparea ulterioară a proprietăților aferente în cazul utilizării lor ca sisteme cu eliberare controlată în terapia cancerului.

Analiza de difracție de raze X a fost efectuată utilizând un echipament PANalytical Empyrean în geometrie Bragg-Brentano echipat cu un tub de raze X cu anod de Cu ($\lambda_{CuK\alpha}=1.541874 \text{ \AA}$) cu focalizare în linie, fantă divergentă programabilă pe partea incidentă și fantă anti-împrăștiere programabilă montat pe detector PIXcel3D pe partea difractată. Spectrul a fost achiziționat pe domeniul de unghiuri $20-80^\circ 2\theta$, cu pas de achiziție de 0.02° și timp de achiziție pe pas de 100s.

6.2 Microscopia electronică de baleiaj (SEM)

Microscopia electronică de baleiaj s-a realizat cu în vederea evidențierii aspectelor referitoare la morfologia probelor sintetizate, respectiv a dimensiunii particulelor, a gradului de cristalinitate existent. Achiziția de imagini a fost realizată cu ajutorul microscopului electronic de baleiaj de înaltă rezoluție, Inspect F50, la 30KeV și diverse magnificații.

6.3 Spectroscopia în infraroșu cu transformată Fourier (FT-IR)

Investigarea prin metoda FT-IR a pulberilor sintetizate a presupus analizarea unor cantități reduse de probă prin intermediul spectrometrului model Nicolet iS50R. Măsurătorile au fost efectuate la temperatura camerei, utilizându-se modulul de atenuare totală a reflexiei (ATR), fiind efectuate 32 de scanări ale probelor între 4000 și 440 cm^{-1} , la o rezoluție de 4 cm^{-1} . Înregistrarea spectrală a datelor a fost posibilă prin conectarea spectrometrului la o unitate de preluare și prelucrare a datelor, prin intermediul programului de lucru Omnic.

Valorile energetice reduse ce sunt caracteristice radiațiilor infraroșii determină, în urma interacției cu un compus, absorbția radiației electromagnetice de către moleculele substanței iradiate și apariția unor vibrații specifice grupărilor funcționale din moleculele compusului chimic. Legăturile chimice dintr-o moleculă, rezultate în urma absorbției radiației infraroșii, pot prezenta diverse tipuri de vibrații precum vibrații de alungire (în care se înregistrează o variație a distanței interatomice) sau vibrații de deformare (în care unghiul de valență dintre legăturile covalente ce au în comun un atom suferă modificări în plan sau în afara acestuia).

Grupările funcționale ale moleculelor prezintă capacitatea de a absorbi radiația electromagnetică în infraroșu doar la anumite valori ale lungimii de undă, ceea ce permite înregistrarea de către interferometru a unor maxime de absorbție în infraroșu caracteristice. Maximele de absorbție rezultate sunt ulterior analizate.

Potențialul citotoxic al nanosistemelor complexe sintetizate a fost investigat la nivelul celulelor stem mezenchimale izolate din fluidul amniotic (AFSC). În cadrul testelor biologice au fost urmărite influențele celor 3 probe (Fe_3O_4 , $\text{Fe}_3\text{O}_4@AG$, $\text{Fe}_3\text{O}_4@AG+\text{Curcumină}$) asupra proliferării celulare, stresului oxidativ, morfologiei celulare și a citoscheletului (modificări ale filamentelor de tubulină) și a expresiei unor markeri specifici celulelor stem, implicați și în diferențierea acestora.

6.4 Magnetometrie cu probă vibrantă (VSM)

Proprietățile magnetice ale nanosistemelor complexe au fost investigate la temperatura camerei, înregistrând funcția de susceptibilitate magnetică a câmpului magnetic prin intermediul magnetometrului cu probă vibrantă, model LakeShore 7404.

6.5 Microscopia electronică prin transmisie (TEM)

Imaginile obținute prin TEM corespunzătoare probelor de magnetită și magnetită acoperită cu acid glutamic au fost obținute cu ajutorul unui microscop electronic prin transmisie de înaltă rezoluție model TecnaiTM G2 F30 S-TWIN echipat cu SAED, achiziționat de la compania FEI. Microscopul funcționează în modul de transmisie la o tensiune de 300 kV, rezoluția punctuală și cea de linie garantate având valorile de 2 Å, respectiv 1 Å.

Analiza particularităților rețelelor cristaline poate fi efectuată prin intermediul difracției de electroni pe arie selectată (SAED), în interiorul unui microscop electronic prin transmisie. Această tehnică de investigare este similară – din punct de vedere al principiului metodei – cu difracția de raze X, cu următoarele deosebiri: radiația incidentă este reprezentată de un fascicul de electroni, iar analizarea probei este realizată pe zone cu dimensiuni de ordinul nanometrilor. Difracția specifică a fasciculului de electroni permite investigarea complexă a probei de interes: constatarea naturii cristaline sau amorfe, identificarea sistemului cristalografic, identificarea eventualelor defecte structurale, precum și determinarea compozițională.

6.6 Analiza termică complexă (TG/DSC)

Analiza termică complexă (TG/DSC) a fost realizată cu ajutorul unui Sistem de analiză termică complexă STA (TG/DSC) - FTIR – GCMS, NETZSCH STA 449 F3 Jupiter, efectuând o încălzire a probei cu viteză constantă până la 1000°C.

Analiza termogravimetrică (TG) este o tehnică analitică ce permite obținerea de date privind stabilitatea termică și conținutul compușilor volatili, prin monitorizarea variației de masă a probei ce este supusă unui tratament termic. Evaluarea comportamentului termic al probei ce se dorește a fi analizată se realizează prin transferarea unei cantități variabile de energie termică spre probă și monitorizarea proprietăților de material ce sunt modificate – în cazul de față, masa probei.

Analiza termică diferențială (calorimetria diferențială, DSC) are la bază compararea variației temperaturii unei probe cu a unui etalon, care nu prezintă transformări de fază în intervalul de temperaturi analizat. Metoda evidențiază transformările de fază în stare solidă, care au un mic efect termic însoțitor. Suplimentar, corelând pierderile de masă ale probei cu intervalele de temperatură în care au fost înregistrate, dar și cu natura exo-/endo-termă a modificărilor probei, analiza termică complexă (TG/DSC) permite obținerea de date relevante privind natura și metoda de obținere a materialului analizat, precum și identificarea probei din punct de vedere chimic.

6.7 Evaluarea potențialului citotoxic

Având în vedere că diversele aplicațiilor medicale ale nanoparticulelor magnetice necesită internalizarea acestora într-o proporție cât mai mare pentru un diagnostic și un tratament eficiente, înțelegerea potențialelor riscuri asociate cu expunerea la aceste nanoparticule și efectul acoperirilor de suprafață utilizate pentru funcționalizare sunt cruciale. În numeroase cazuri, aceste tratamente pot fi îndepărtate adecvat din organism, însă există posibilitatea ca prin supraîncărcarea celulelor cu nanoparticule magnetice să se declanșeze o serie de efecte adverse, iar impactul pe termen lung al acestor expuneri acute nu este pe deplin înțeles. De aceea este necesară o investigație și elucidare complete a consecințelor biologice în urma expunerii la nanoparticulele magnetice.

Odată puse în contact cu sisteme biologice (celule, țesuturi, organe) nanoparticulele magnetice sunt internalizate la nivelul celulelor printr-o serie de mecanisme: difuzie pasivă, endocitoză mediată de receptori, endocitoză mediată de clatrină, internalizare prin caveolae, ș.a. După ce au fost internalizate, nanoparticulele magnetice pot afecta ADN-ul în mod direct, sau pot fi degradate în ioni de fier la nivelul lizozomilor. Acești ioni de fier pot străbate membrana nucleară sau mitocondrială și, în final, ionii feroși (Fe^{2+}) pot reacționa cu peroxidul de hidrogen și oxigenul produs de mitocondrii, pentru a produce radicali hidroxil puternic reactivi și ioni ferici (Fe^{3+}) prin reacția Fenton. Radicalii hidroxil (HO^{\cdot}) generați ar putea afecta indirect ADN-ul, proteinele și lipidele (8-OH-dG=8 hidroxideoxiguanozină,

MDA=malondialdehidă, HNE=4-hidroxi-2-nonenal), pot avea un impact asupra citoscheletului actinic prin modularea căii de semnalizare a actinei, și totodată, pot altera expresia diferitelor gene cum ar fi cele implicate în reglarea ciclului celular, homeostazia fierului și funcționarea pancreatică [23].

Prin urmare, expunerea la nanoparticule magnetice poate conduce la apariția efectelor toxice precum eliberarea din membrană a lactat dehidrogenazei (tehnica LDH), afectarea funcțiilor mitocondriale (MTT), inflamație, formarea corpurilor apoptotice/apoptosomice, condensare cromozomială, generarea speciilor reactive de oxigen (ROS) și afectarea ADN-ului

6.7.1 Proliferarea celulară - MTT assay (Vybrant MTT cell Proliferation Assay kit, Molecular Probe)

Pe baza acestei metode colorimetrice cantitative se permite aprecierea proliferării, viabilității și citotoxicității celulare. Metoda se bazează pe reducerea sării de tetrazoliu galbene MTT (bromura de 3-(4,5dimetiltiazoliu)-2,5-difeniltetrazoliu) la formazan de culoare albastru-închis. Reducerea realizată de enzimele mitocondriale (în special succinat dehidrogenaza) este un indiciu al integrității celulare/mitocondriale. Formazanul, insolubil în apă, poate fi solubilizat cu izopropanol, dimetilsulfoxid sau alt solvent organic. Densitatea optică (DO) a formazanului solubilizat este evaluată spectrofotometric, obținându-se o funcție absorbantă-concentrație colorant-număr de celule active metabolic din cultură.

Celulele se cultivă în plăcuțe cu 96 de godeuri, având o densitate de însămânțare de 3000 celule /godeu în diferite condiții experimentale. Ulterior s-au adăugat 10 μ l (12 mM) MTT, iar celulele MSC au fost incubate la temperatura de 37°C timp de 4 ore. Se adaugă ulterior 100 μ l soluție SDS-HCl, și se pipetează energic pentru solubilizarea cristalelor de formazan. Se incubează o oră, apoi se pipetează pentru omogenizare și se elimină bulele pentru a nu interfera cu citirea. Se citește la spectrofotometru, model TECAN (Männedorf, Switzerland) la 570 nm.

6.7.2 Evaluarea stresului oxidativ (GSH-Glo™ Glutathione Assay, Promega)

Celulele AFSC (celule stem mezenchimale izolate din lichid amniotic) se însămânțează la o densitate de 3000 celule în 300 μ l mediu de cultura DMEM, suplimentat cu 10% ser fetal bovin și 1 % antibiotice (penicilina, streptomycin/neomicin) în plăcuțe cu 96 godeuri. La 24 de ore de la însămânțare, celulele se tratează cu biomateriale. Stresul oxidativ a fost evaluat utilizând kitul GSH-Glo™ Glutathione Assay kit. Acest kit dozează cantitatea de glutatation, un agent antioxidant. Glutathionul produs de celule este transformat de glutatation S-transferaza în

glutacion oxidat, cantitatea de glutacion transformat fiind direct proporțională cu cantitatea de enzimă glutacion S-transferază care transformă glutacionul legat cu un precursor de luciferină, în glutacion oxidat legat cu luciferină care emite lumină. Cu cât lumina este mai intensă, cu atât s-a transformat mai mult glutacion, deci s-a sintetizat mai mult glutacion, celula fiind mai puțin stresată de prezența nanosistemelor complexe (activitate biochimică neafectată). Dacă lumina este mai puțin intensă, producerea glutacionului a fost inhibată, prin urmare, stresul oxidativ a fost accentuat.

Protocolul de lucru a constat în adăugarea a 100 μ L 1X GSH-Glo™ Reagent și incubarea la temperatura de 37°C, timp de 30 de minute. Apoi s-au adăugat 100 μ l Luciferin Detection Reagent și s-a incubat la 37°C pentru încă 15 minute. La finalul celor 15 minute se omogenizează bine mediul din godeurile cu celule, și apoi plăcuța se citește la luminometru.

6.7.3 Evidențierea morfologiei citoscheletului (filamentelor de tubulină)

Organizarea celulară în prezența nanosistemelor complexe sintetizate a fost evaluată prin examinarea filamentelor de tubulină prin imunocitochimie. Metoda presupune următoarele etape:

- Celulele AFSC au fost spălate de două ori cu PBS (tampon fosfat salin);
- Fixarea celulelor timp de 20 de minute cu 4% paraformaldehidă în PBS;
- Spălarea de două ori cu PBS;
- Permeabilizarea celulelor cu Triton X-100 0,3% în PBS timp de 2 x15 min;
- Blocarea situsurilor nespecifice cu 4% ser în PBS timp de o oră;
- Incubarea AFSC cu anticorpi primari: tubulină (Ac monoclonal de șoarece 1: 4000) peste noapte;
- S-au realizat trei spălări de 2-3 minute;
- Adăugarea anticorpului secundar (AlexaFluor 488 anti-șoarece Invitrogen, 1: 1000) timp de o oră la temperatura camerei;
- Urmează etapele de spălare (trei spălări a câte 2-3 minute fiecare) cu PBS și de două ori a câte un minut cu apă purificată;
- Preparatele au fost evaluate cu ajutorul unui microscop cu fluorescență inversat.

7. Rezultate și discuții

7.1 Caracterizarea pulberii de Fe_3O_4

Spectrul de difracție de raze X înregistrat pentru proba de magnetită este reprezentat în Figura 9. Rezultatele obținute au fost interpretate pe baza fișei ASTM (en. American Society for Testing and Materials) PDF4+ [04-013-9808].

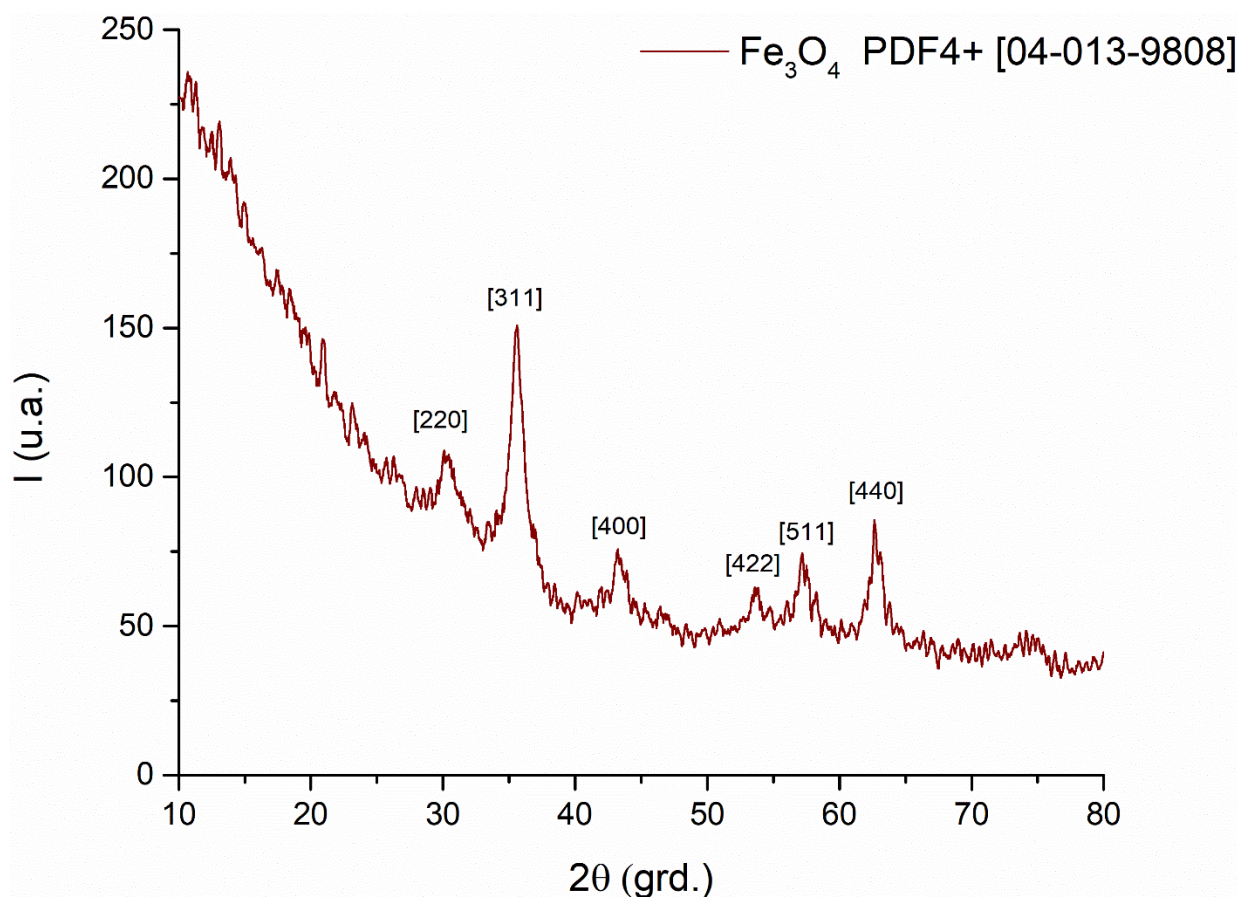


Figura 9. Difractograma de raze X pentru pulberea de Fe_3O_4 , cu evidențierea planelor de cristalizare

Prin urmare spectrul indică un material cu un grad scăzut de cristalinitate, iar în intervalul 2θ ($10-80^\circ$) investigat se remarcă prezența a 6 interferențe de difracție specifice, la valori estimate ale unghiului 2θ de 30, 35, 43, 54, 57 și 62° . Conform datelor tabelare disponibile în fișele ASTM, maximele de difracție identificate în cazul nanoparticulelor sintetizate experimental corespund planelor de difracție (2 2 0), (3 1 1), (4 0 0), (4 2 2), (5 1 1), respectiv (4 4 0) ale magnetitei, cristalizată în sistem cubic.

Din imaginile de microscopie electronică de baleiaj prezentate în figura 10 reiese o morfologie cvasi-sferică, cu particule foarte fine, cu diametrul cuprins între 4-7 nm, dispuse preponderent în aglomerate. Nanomaterialele sintetizate prezintă caracteristici greu

observabile in SEM. Din acest motiv, au fost necesare investigații amănunțite de microscopie electronică prin transmisie.

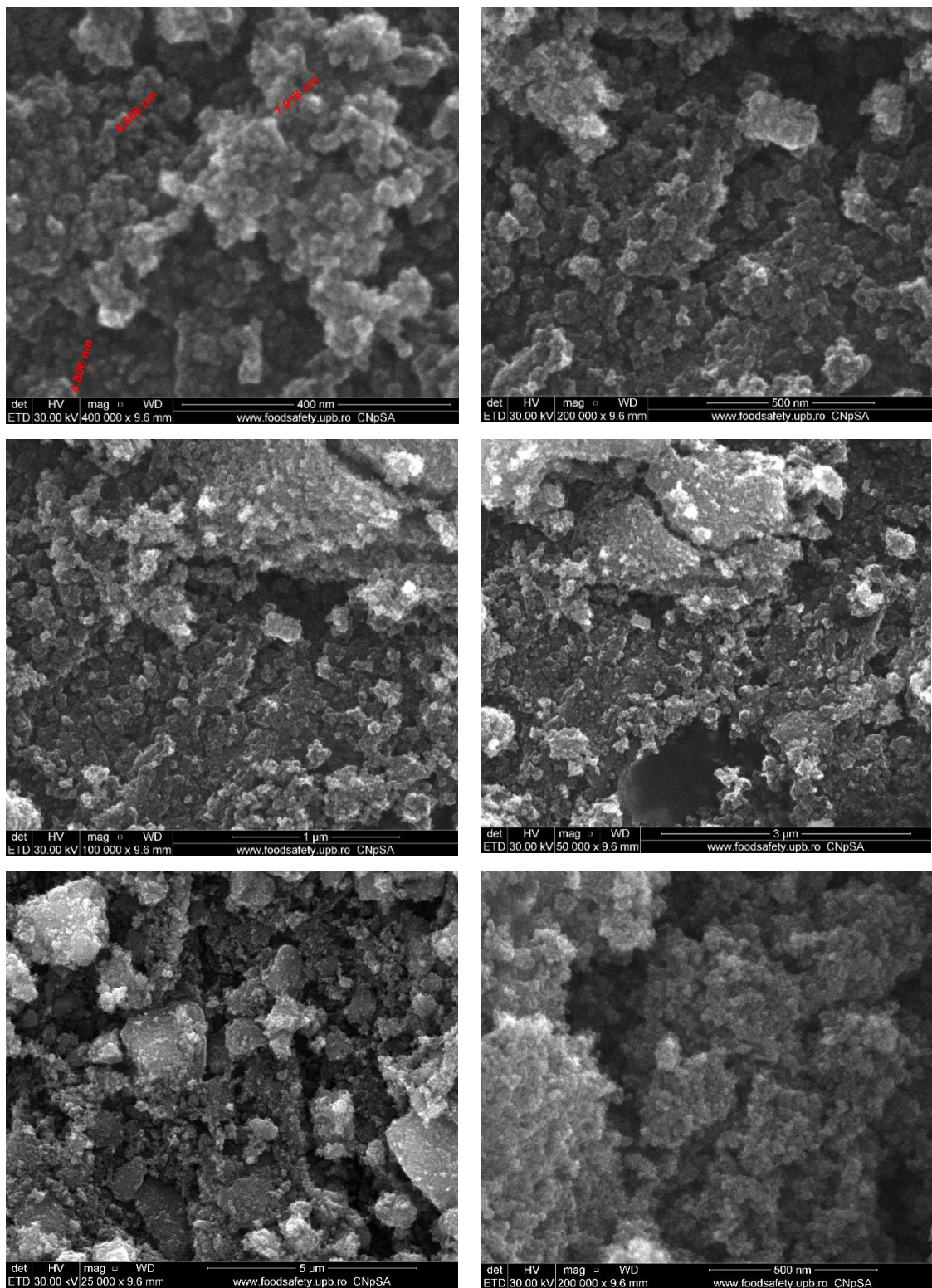


Figura 10. Micrografii SEM pentru pulberea de Fe_3O_4

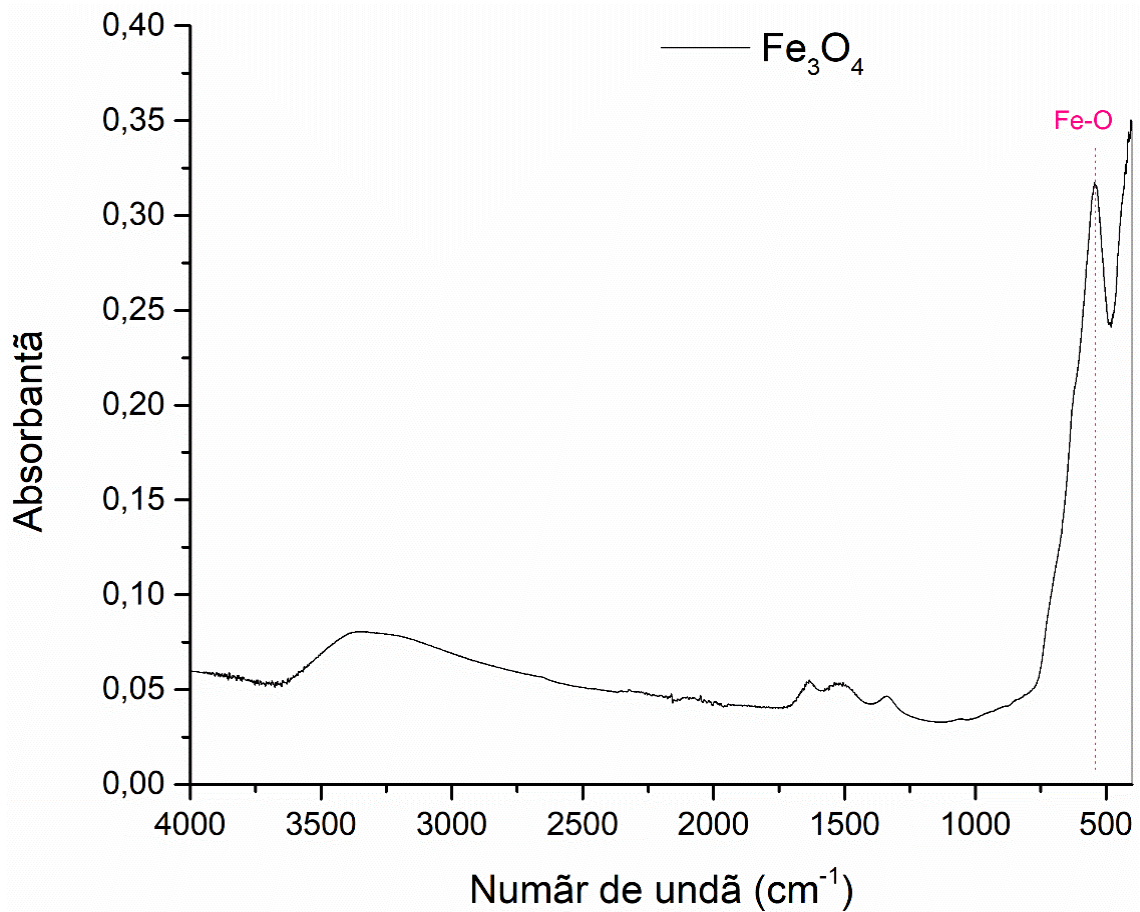


Figura 11. Spectrul FT-IR pentru pulberea de Fe₃O₄

Spectrul FT-IR pentru proba de Fe₃O₄ este prezentat în figura 11. Banda de absorbție puternică situată la aproximativ 547 cm⁻¹ corespunde legăturii Fe-O din magnetită.

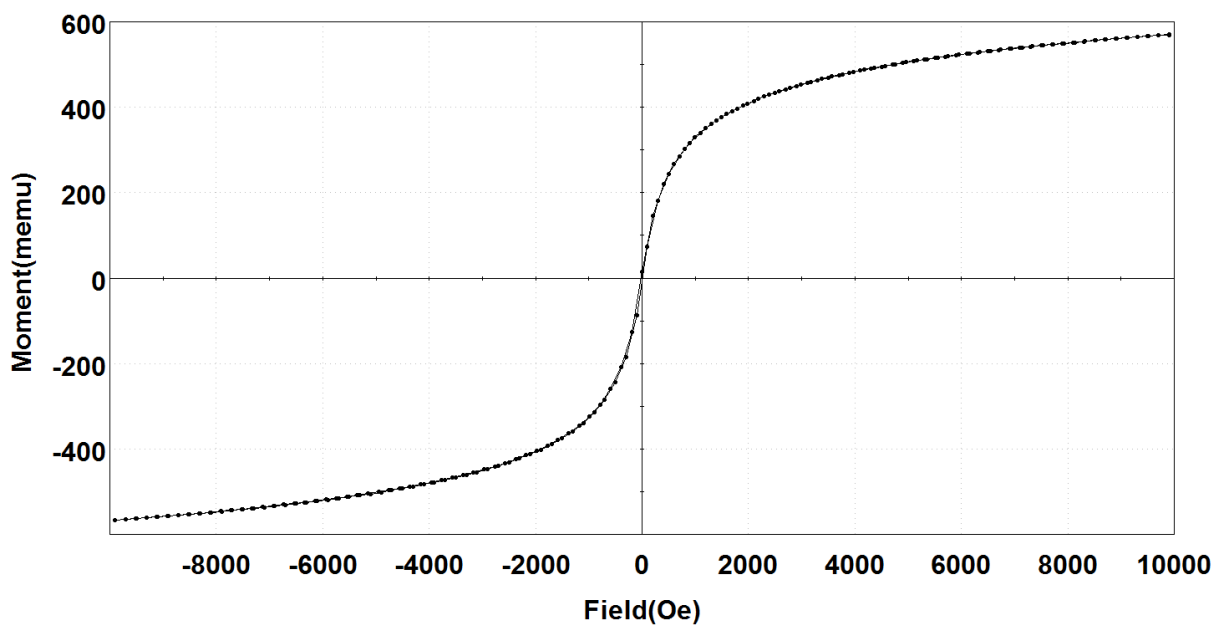


Figura 12. Variația magnetizării în funcție de câmpul magnetic aplicat pentru nanoparticulele de Fe₃O₄ la temperatura de 25°C

În figura 12 este prezentată variația magnetizării în funcție de câmpul magnetic aplicat pentru nanoparticulele de Fe_3O_4 la temperatura de 25°C . Se observă că în intervalul -2000 și 2000 Oe a valorii câmpului magnetic aplicat, magnetizația prezintă o creștere semnificativă, atingând valoarea de saturație la aproximativ 5000 Oe, acest comportament fiind caracteristic magnetitei. Dacă în cazul magnetitei bulk magnetizația de saturație este de aproximativ 95 emu/g, în domeniul biomedical, o magnetizație de saturație de 10 emu/g este suficientă pentru ca nanoparticulele magnetice să poată fi utilizate ca sisteme cu eliberare controlată. Nanoparticulele de magnetită sintetizate în cadrul acestui studiu prezintă o magnetizație de saturație de 58 emu/g, datorită direct proporționalității cu valoarea diametrului de nanoparticulă. Prin urmare, nanoparticulele magnetice sintetizate dispun de proprietățile magnetice necesare pentru a fi utilizate ca sisteme complexe în eliberare controlată.

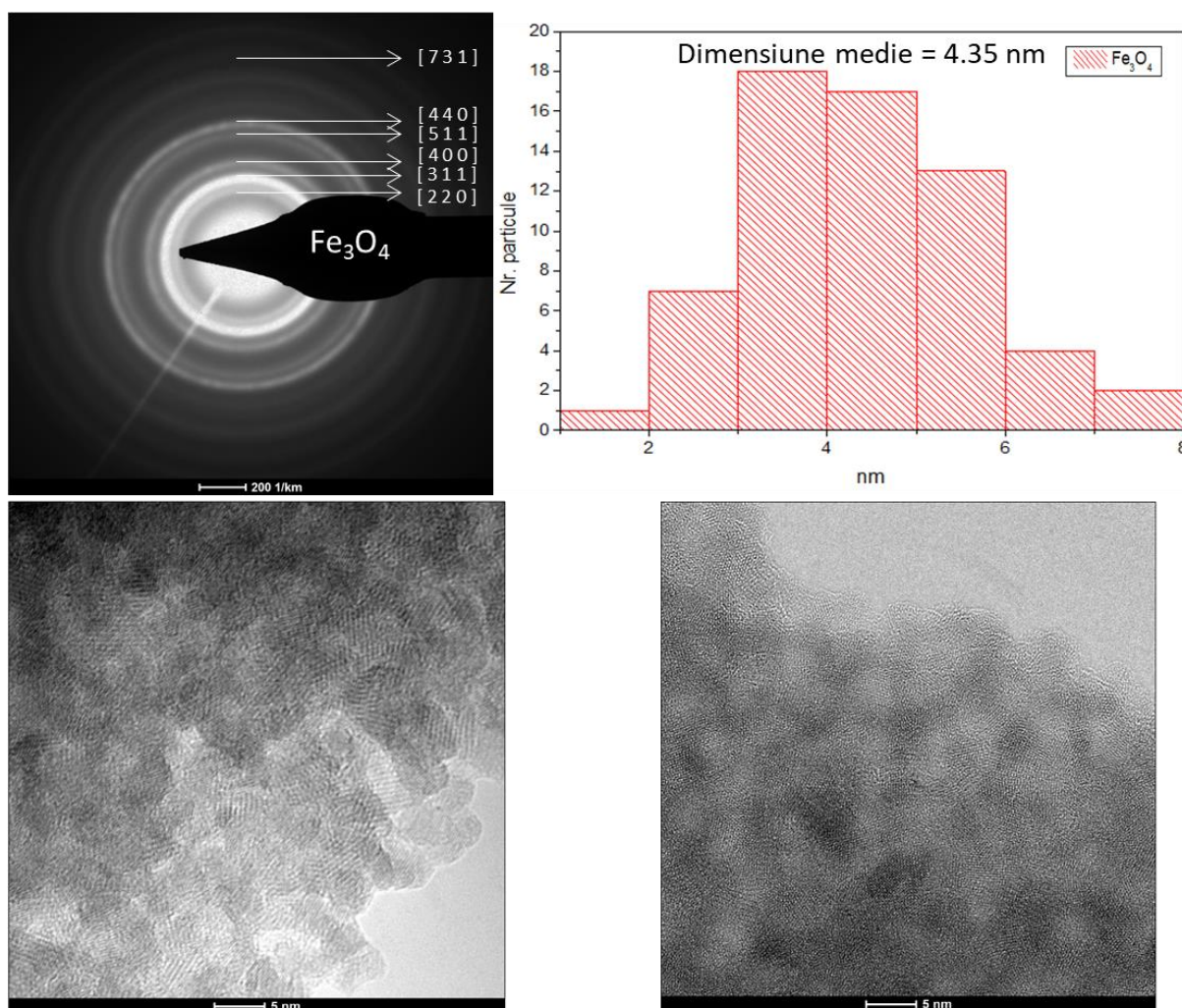


Figura 13. Imagine TEM în câmp luminos, difracție de electroni pe arie selectată și distribuție după dimensiune obținute pe proba de Fe_3O_4

În Figura 13 sunt prezentate multiplele informații furnizate de către microscopia electronică prin transmisie. Astfel, din imaginea de microscopie electronică prin transmisie în câmp luminos obținută pentru proba de magnetită se poate observa faptul că proba este formată din aglomerate de nanoparticule, cu o morfologie preponderent sferică și poliedrală. Dimensiune medie de particulă este de 4,35 +/-0,02 nm, având o distribuție monomodală, conform histogramei prezentate de asemenea în figura 8. Din difracția de electroni pe arie selectată (SAED) realizată se pot observa planele de cristalizare caracterizate prin indicii Miller evidențiați și în XRD, respectiv (2 2 0), (3 1 1), (4 0 0), (4 2 2), (5 1 1), (4 4 0) ale magnetitei.

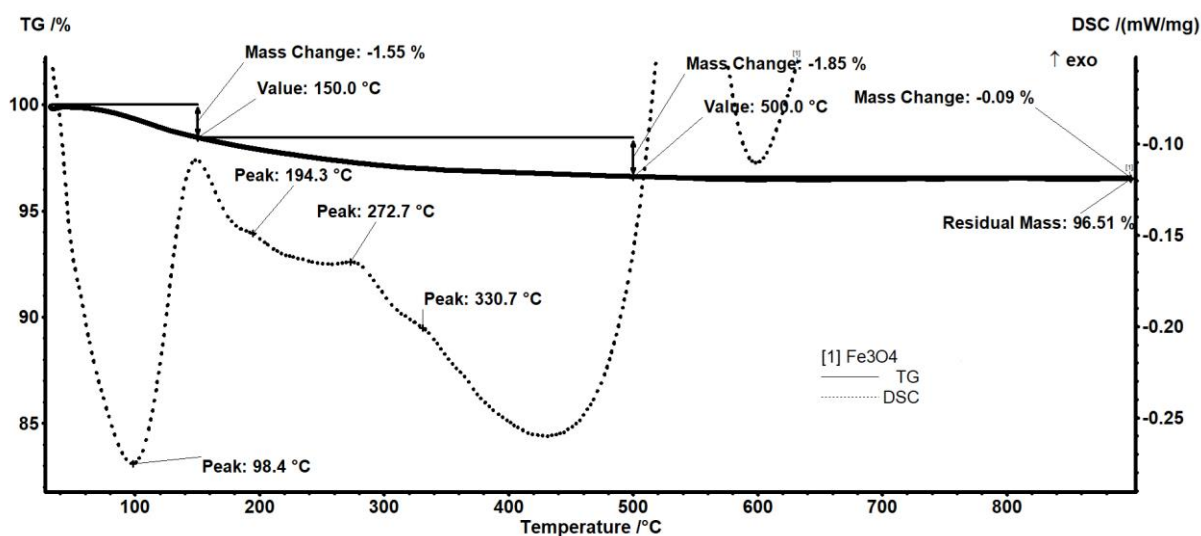


Figura 14. Analiza termică complexă pe pulberea de Fe_3O_4 (TG/DSC)

Din analiza termică complexă prezentată în figura 14 se observă că în intervalul 30-150°C are loc prima pierdere de masă (1.55%), însoțită de un efect endoterm cu minimul la 98.4°C. Pierderea de masă este cauzată de eliminarea apei din probă și eventual, a unor grupări -OH de pe suprafața nanoparticulelor.

În intervalul 150-500°C pierderea de masă înregistrată este 1.85%, și este însoțită de mai multe efecte, slabe, suprapuse. În principiu se pot degrada resturi de precursori rămase din sinteza magnetitei. Peak-ul de la 330°C poate fi atribuit transformării magnetitei în maghemită (proces de oxidare). Pe curba DSC se observă un efect slab exoterm la 544.4°C. Acesta reprezintă o transformare de fază, a maghemitei în hematit. Este o transformare de fază specifică, întâlnită la majoritatea probelor cu magnetită, dar poziția acestui maxim este dependentă de mulți factori: dimensiunea nanoparticulelor, forma, metoda de sinteză etc. Pe intervalul 500-900°C se înregistrează o pierdere de masă de 0.09% (practic masa rămâne constantă). Masa reziduală este 96.51% iar în final proba are culoare negru-gri.

7.2 Caracterizarea pulberii de Fe_3O_4 @acid glutamic

În Figura 15 sunt prezentate spectrele de difracție de raze X ale probelor de magnetită și magnetită@acid glutamic. După cum se poate observa, în ambele spectre se identifică prezența maximelor de difracție caracteristice magnetitei, anterior detaliate.

De remarcat este faptul că intensitatea interferențelor de difracție, în cazul probei ce conține și compus organic, are valori mai ridicate la unghiuri mici în comparație cu proba de magnetită pură. Acest lucru poate fi pus pe seama prezenței fazei organice cristaline pe suprafața nanoparticulelor magnetice, cu maxime de difracție la 2θ de 30 și 35 (atribuite acidului glutamic conform PDF4+ [00-019-1757]), rezultatul fiind un efect sinergetic al celor 2 faze evidențiate.

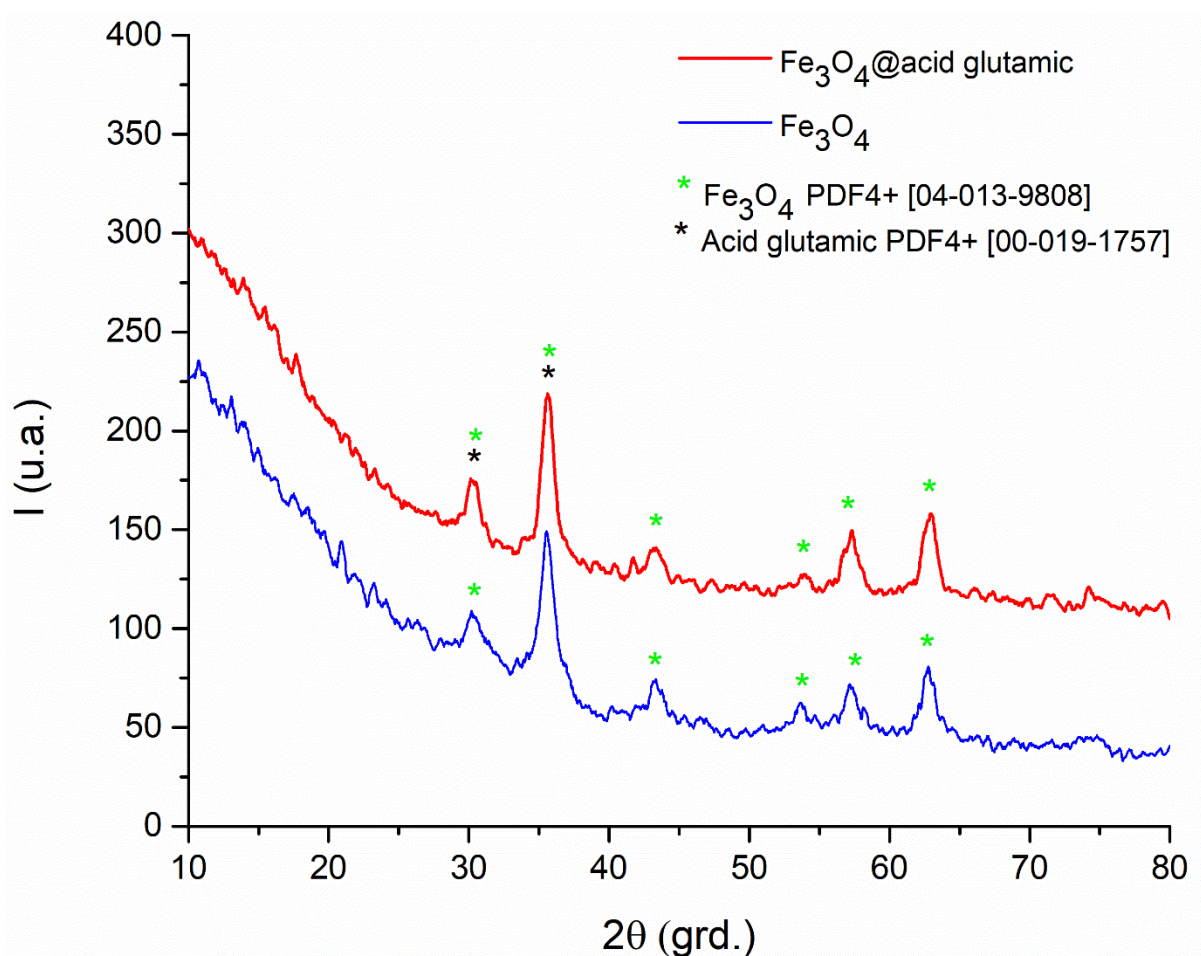


Figura 15. Diffractograma de raze X pentru pulberia de Fe_3O_4 @acid glutamic și evidențierea diferențelor față de Fe_3O_4

Din punct de vedere morfologic, imaginile de microscopie electronică de baleiaj efectuate pe probele de Fe_3O_4 @acid glutamic (Figura 16) indică prezența unor particule cu formă preponderent sferică, organizate sub forma unor aglomerate. Micrografiile obținute oferă

primele indicii asupra caracterului nanodimensionat al materialelor (dimensiuni de particulă mai mici de 10 nm dar preponderent mai mari decât cele de magnetită simplă).

Compusul organic utilizat în procesul de sinteză pare să fi acoperit individual particulele oxidice. Determinările sunt, însă, dificil de realizat, datorită prezenței acidului glutamic care alterează calitatea imaginilor (compus instabil la 30kV). Prin urmare, se recomandă utilizarea microscopiei electronice prin transmisie ca tehnică de caracterizare a nanosistemelor complexe, pentru obținerea unor informații cu un nivel ridicat de acuratețe.

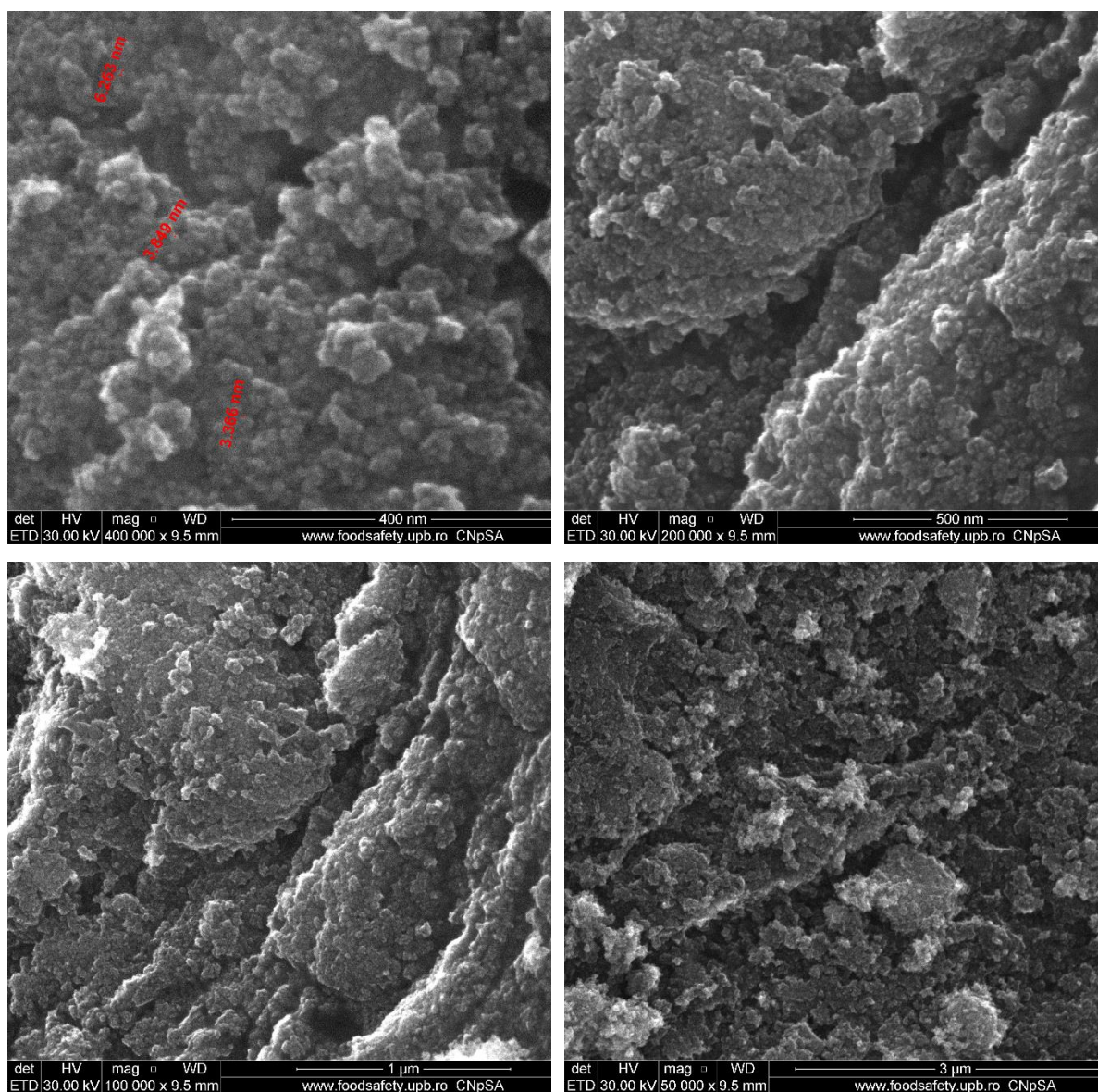


Figura 16. Micrografii SEM pentru pulberea de Fe_3O_4 @acid glutamic

În figura 17 sunt prezentate cu intenția studiului comparativ spectrele FT-IR ale Fe_3O_4 (anterior detaliat), Acid glutamic și Fe_3O_4 @Acid glutamic. În spectrul corespunzător acidului

glutamic se observă benzile caracteristice, în corelație cu formula structurală a acidului glutamic, prezentată în figura 2, astfel: la 3005 cm^{-1} banda specifică vibrației de întindere a legăturii O-H, la 2855 cm^{-1} banda specifică vibrației de întindere a legăturii C-H, la 1690 cm^{-1} banda specifică legăturii C=O și la 1523 cm^{-1} banda specifică vibrației de întindere a legăturii N-H din gruparea amino. Spectrul probei de Fe_3O_4 @Acid glutamic prezintă elemente comune celor 2 faze componente, regăsind astfel în jurul valorii de 550 cm^{-1} banda ce corespunde legăturii Fe-O din magnetită, iar în intervalul de $1500\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ benzile specifice acidului glutamic. Absorbanta celor din urmă nu înregistrează însă valori ridicate, posibil din cauza unei cantități prea mici de fază organică de pe suprafața particulelor oxidice.

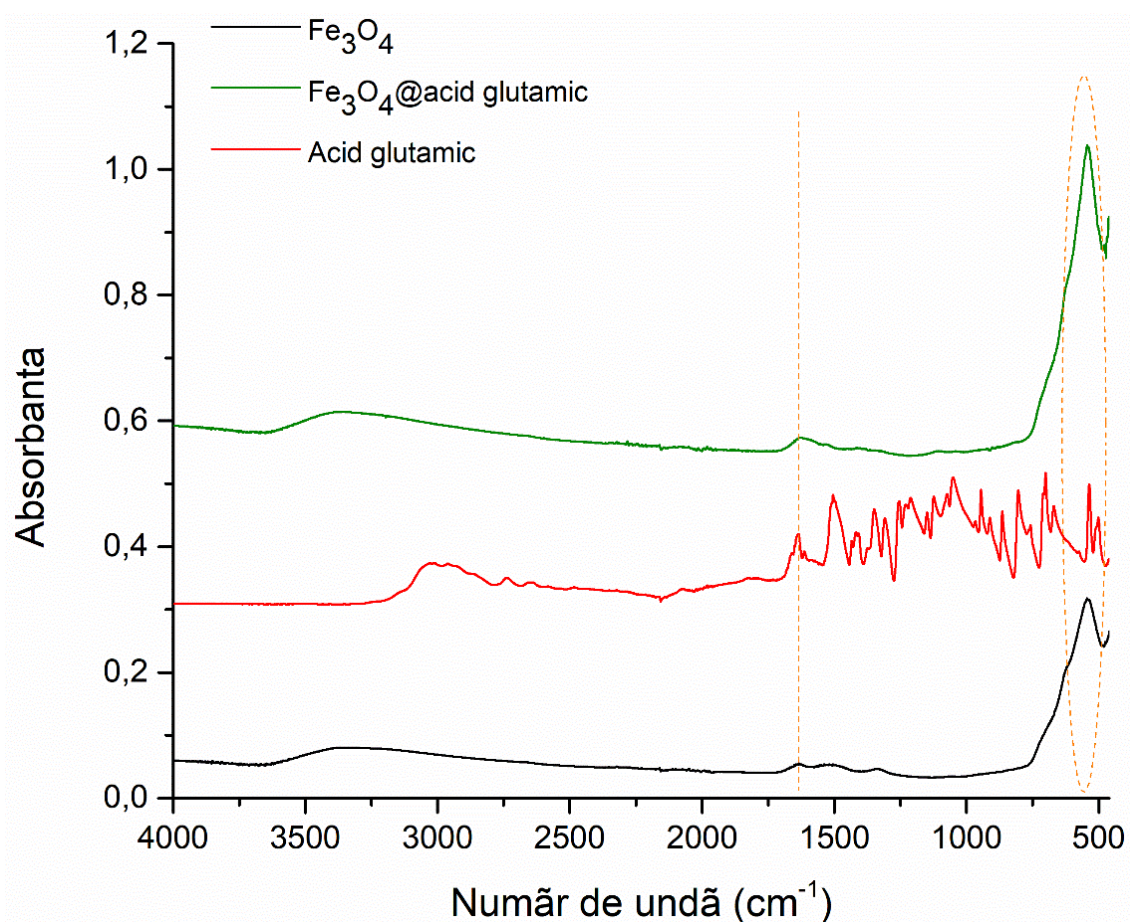


Figura 17. Spectrul FT-IR pentru proba de Fe_3O_4 @Acid glutamic

În figura 18 este prezentată variația magnetizării în funcție de câmpul magnetic aplicat pentru nanoparticulele de Fe_3O_4 @acid glutamic la temperatura de 25°C . Se observă că în intervalul -2000 și 2000 Oe a valorii câmpului magnetic aplicat, magnetizația prezintă o creștere semnificativă, atingând valoarea de saturație la aproximativ 5000 Oe, similar magnetitei pure anterior prezentată. Nanoparticulele de Fe_3O_4 @acid glutamic sintetizate în

cadru acestui studiu prezintă o magnetizație de saturație de 42 emu/g și dispun de proprietățile magnetice necesare pentru a fi utilizate ca sisteme complexe în eliberare controlată.

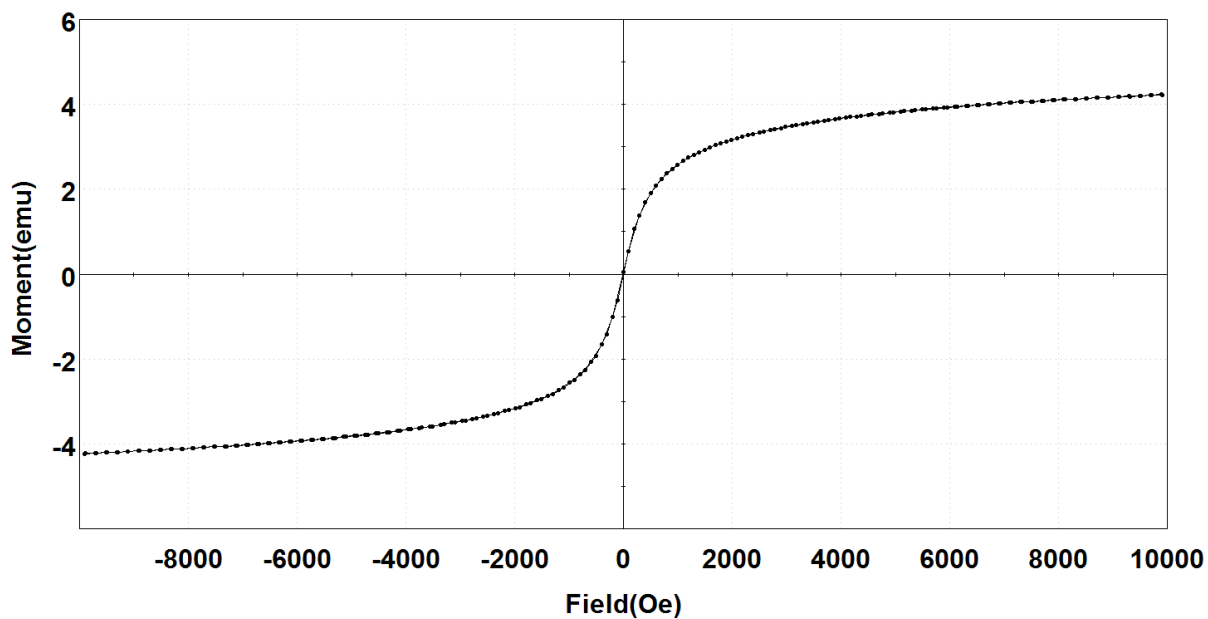


Figura 18. Variația magnetizării în funcție de câmpul magnetic aplicat pentru nanoparticulele de Fe_3O_4 @Acid glutamic la temperatura de 25°C

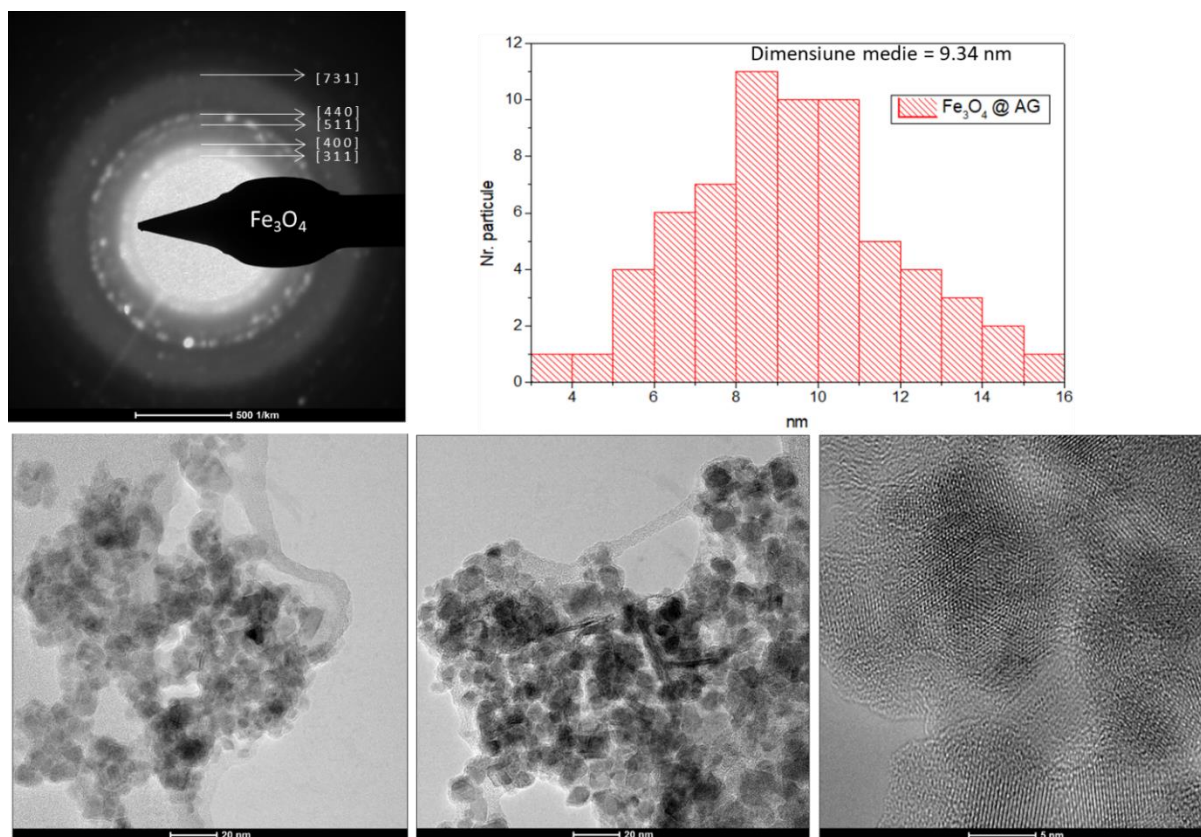


Figura 19. Imagine TEM în câmp luminos, difracție de electroni pe arie selectată și distribuție după dimensiune obținute pe proba de Fe_3O_4 @Acid glutamic

Din analizele de microscopie electronică prin transmisie efectuate pe materialul hibrid magnetită-acid glutamic reiese faptul că pulberea prezintă un grad crescut de cristalinitate, iar la suprafața particulelor se observă un strat necristalin, format dintr-un compus organic, de 1-2 nm, dispus uniform și echidistant în jurul particulelor oxidice, marcându-se mai degrabă formarea de nanostructuri de tip miez-înveliș (figura 19). Dimensiunea medie de particulă în acest caz este de 9.34 nm, mai mare decât în cazul magnetitei simple.

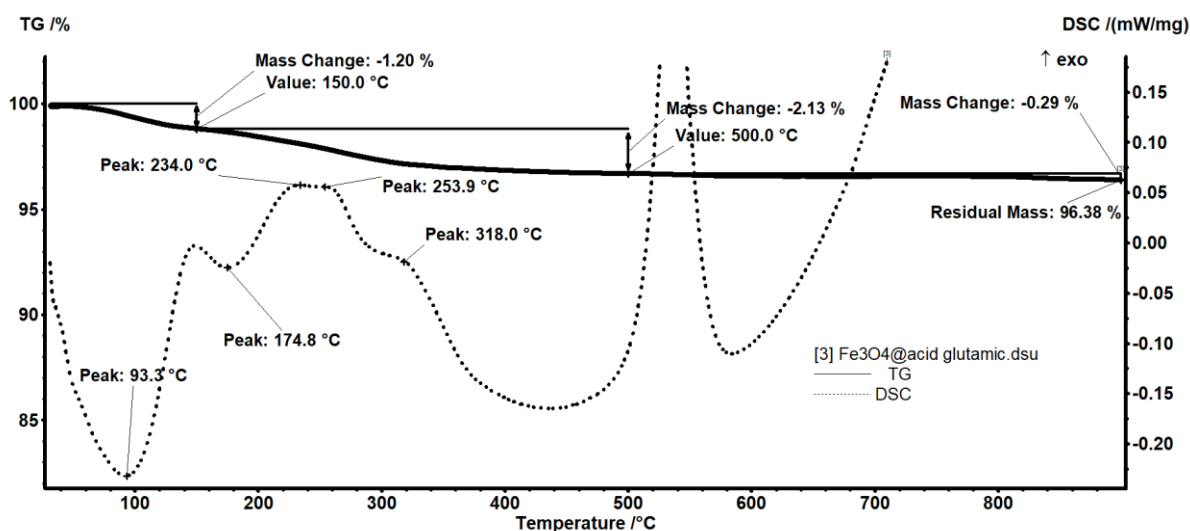


Figura 20. Analiza termică complexă (TG/DSC) obținută pe proba de $Fe_3O_4@Acid$ glutamic

Din punctul de vedere al comportamentului termic, proba de $Fe_3O_4@Acid$ glutamic este asemănătoare cu cea de magnetită simplă (figura 20), dar există câteva deosebiri totuși: pierderea de masă pare mai lentă în zona 200°C, iar reziduul este roșcat. Dacă s-a reținut acid glutamic pe magnetită, fie este foarte puțin, fie este înlocuit o parte din apa/-OH adsorbite pe suprafața magnetitei. Altfel, în intervalul 30-150°C are loc prima pierdere de masă (1.20%), însoțită de un efect endoterm cu minimul la 93.3°C. Pierderea de masă este cauzată de eliminarea apei din probă și eventual, a unor grupări -OH de pe suprafața nanoparticulelor.

În intervalul 150-500°C pierderea de masă înregistrată este 2.13%, și este însoțită de mai multe efecte, slabe, suprapuse. În principiu se pot degrada resturi rămase din sinteza magnetitei, acid glutamic etc. Tot aici are loc și transformarea magnetitei în maghemită (proces de oxidare). Pe curba DSC se observă un efect slab exoterm la 536.7°C. Acesta reprezintă o transformare de fază, a maghemitei în hematit. Pe intervalul 500-900°C se înregistrează o pierdere de masă de 0.29%. Masa reziduală este 96.38%, de culoare maro-roșcat.

7.3 Caracterizarea biologică a materialelor obținute

Potențialul citotoxic al nanosistemelor complexe sintetizate a fost investigat la nivelul celulelor stem mezenchimale izolate din fluidul amniotic (AFSC). În cadrul testelor biologice au fost urmărite influențele celor 3 probe (Fe_3O_4 , $\text{Fe}_3\text{O}_4@AG$, $\text{Fe}_3\text{O}_4@AG+\text{Curcumină}$) asupra proliferării celulare, stresului oxidativ, morfologiei celulare și a citoscheletului (modificări ale filamentelor de tubulină) iar rezultate sunt prezentate în continuare.

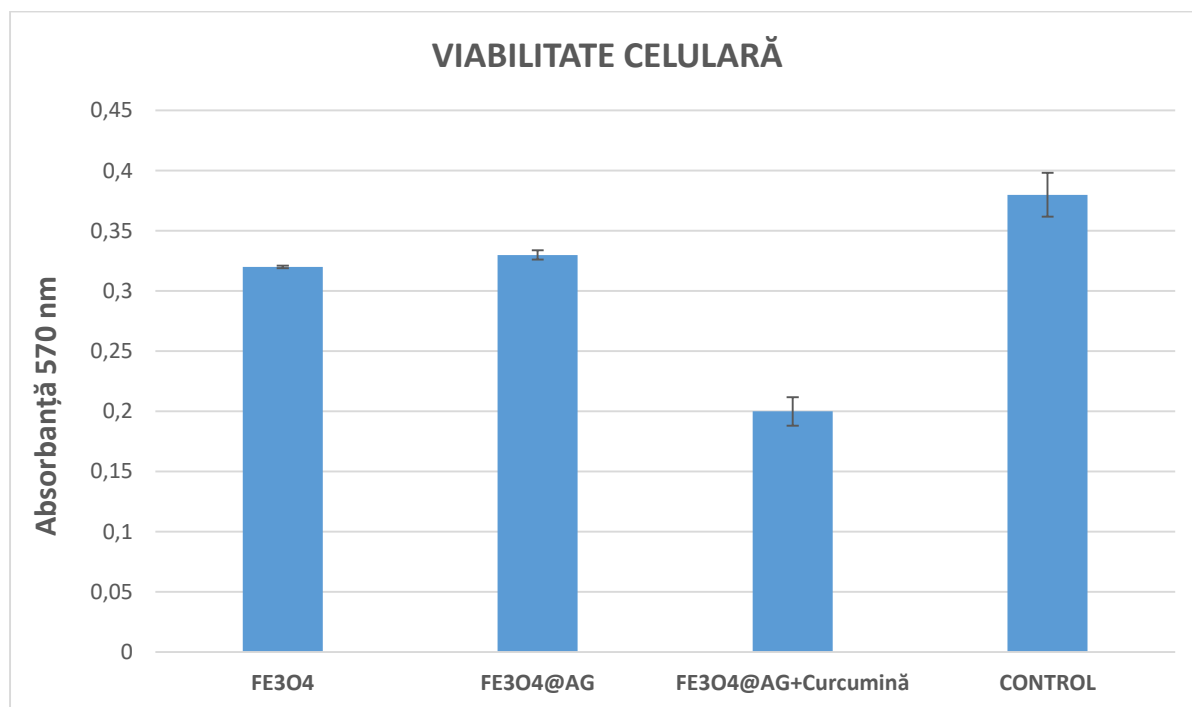


Figura 21. Evidențierea proliferării celulelor stem mezenchimale cultivate timp de 24 de ore în prezența nanoparticulelor prin metoda MTT

În figura 21 sunt evidențiate grafic valorile absorbanțelor, la lungimea de undă de 570 nm, obținute în urma cuantificării proliferării celulare, ca rezultat al clivării reactivului MTT (sării de tetrazoliu) de către oxidoreductazele mitocondriale. Se observă că sistemul încărcat cu Curcumină este singurul care afectează semnificativ (reduce) activitatea oxidoreductazelor mitocondriale ale celulelor stem mezenchimale izolate din lichidul amniotic, sugerând, prin urmare, un efect citotoxic. Explicația acestui efect poate fi pusă pe seama faptului că la origine, Curcumina este o substanță antitumorală. În consecință, rolul acesteia este acela de a distruge celulele.

Comparând celelalte sisteme sintetizate cu proba de control (celule stem mezenchimale netratate), nu se observă efecte semnificative ale acestora asupra metabolismului și viabilității celulare.

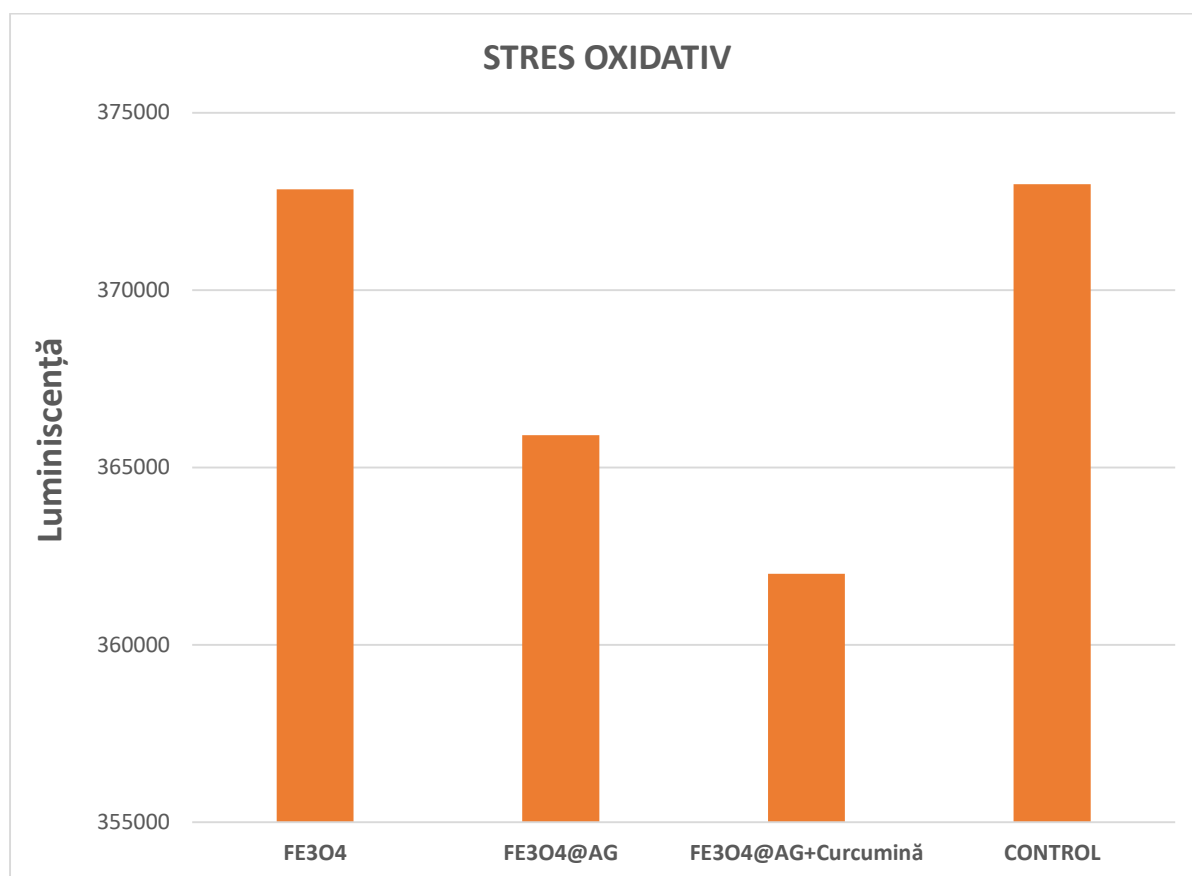


Figura 22. Evidențierea capacității nanosistemelor obținute de a induce un stres oxidativ la nivelul celulelor stem mezenchimale izolate din fluidul amniotic prin dozarea cantității de glutatation (compus antioxidant)

În figura 22 este evidențiat grafic potențialul nanosistemelor complexe de a induce stresul oxidativ la nivelul celulelor stem mezenchimale izolate din fluidul amniotic. Astfel se constată că proba reprezentată de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{AG}+\text{Curcumină}$ este singura care induce un stres oxidativ semnificativ, ca urmare a prezenței agentului antitumoral în nanosistem. Inducerea unui stres oxidativ, însă în proporție mai mică, se poate observa și în cazul probei $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{AG}$, aceasta influențând slab apariția speciilor reactive de oxigen.

Analizând impactul nanosistemelor asupra morfologiei celulelor diploide umane (figura 23), putem observa că nanoparticulele testate nu alterează în mod semnificativ arhitectura acestora și nici forma tipică, aspect evidențiat prin absența unor modificări majore în structura citoscheletului și a filamentelor de tubulină. Citoscheletul prezintă o morfologie tipică AFSC, celulele ce provin din probele tratate fiind asemănătoare cu cele control, netratate. AFSC prezintă extensii sugerând că au un fenotip activ. Acestea sunt posibile datorită activității

citoscheletului, și reprezintă în principal filamente de actină și microtubuli. Metabolismul celular este activ, după cum reiese din imaginile de microscopie, celulele absorbind colorantul în citoplasmă, ceea ce sugerează că sunt viabile.

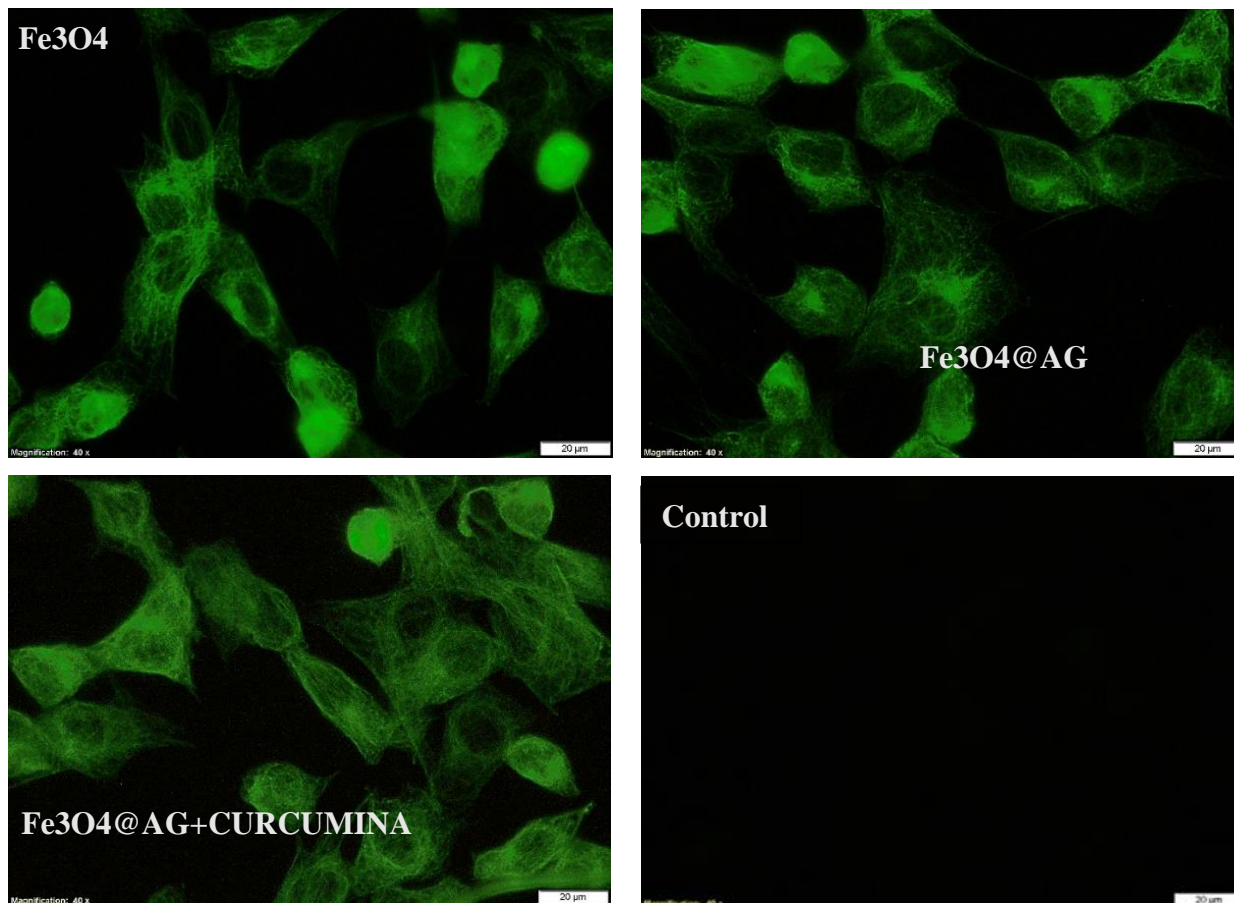


Figura 23. Imagini reprezentative ale filamentelor de tubulină în prezența materialelor sintetizate

8. Concluzii

Deoarece sistemele pe bază de *nanoparticule magnetice*, în special cele bazate pe magnetită, s-au dovedit în studiile anterioare o alternativă viabilă la metodele de tratament actuale, *scopul proiectului* a fost de a valorifica această categorie de materiale, în vederea *obținerii de sisteme cu eliberare controlată de substanțe antitumorale*, ca răspuns la limitările pe care chimioterapia sau radioterapia le prezintă.

În vederea îndeplinirii scopului proiectului, o serie de obiective specifice au fost îndeplinite:

OS1 - Obținerea de nanostructuri tip Fe_3O_4 , utilizând metoda co-precipitării, pornind de la $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ca precursor de Fe^{2+} și FeCl_3 ca aportor de Fe^{3+} . Pulberea obținută s-a dovedit a fi nanostructurată, cu o morfologie cvasi-sferică, particule foarte mici, cu diametrul cuprins între 4-7 nm, dispuse preponderent în aglomerate (aspecte demonstrate cu ajutorul microscopiei electronice de baleiaj).

OS2 – Obținerea de nanostructuri tip Fe_3O_4 funcționalizate cu compuși multifuncționali – acid glutamic ($\text{Fe}_3\text{O}_4@AG$); datorită faptului că nanoparticulele de Fe_3O_4 sunt foarte susceptibile la degradare/degenerare în medii acide sau oxidative, precum și în condiții *in-vivo*, grefarea unui înveliș protector exterior este un mijloc de menținere a stabilității componentului magnetic până la momentul internalizării celulare. Produsul natural de catabolism folosit pentru acoperire a fost acidul glutamic, care s-a dovedit a fi depus pe suprafața nanoparticulelor de magnetită, determinând o scădere a gradului de cristalinitate identificat atât în urma analizei de difracție de raze X cât și în urma microscopiei electronice prin transmisie.

OS3 – Obținerea de $\text{Fe}_3\text{O}_4@AG$ – Curcumină, utilizat ca sistem cu eliberare țintită în terapia cancerului; în vederea realizării unor sisteme eficiente pentru tratamentul canceros, a fost necesară învelirea suplimentară a structurilor tip core-shell cu citostatic.

OS4 – Caracterizarea morfologică și structurală a Fe_3O_4 și $\text{Fe}_3\text{O}_4@AG$; în acest sens, au fost utilizate o parte din tehnicile de caracterizare enumerate anterior, cărora li se adaugă FT-IR, pentru a studia eventualele legături formate între suportul de magnetită și compușii multifuncționali de pe suprafață, DSC- pentru cuantificarea conținutului de substanțe organice din sistemele complexe, și VSM – pentru evaluarea proprietăților magnetice ale ansamblurilor.

OS5 – Evaluarea biologică a sistemelor obținute. Date fiind aplicațiile biomedicale, s-au realizat studii privind proliferarea celulară, stresul oxidativ, morfologia celulară și citoscheletul în contact cu materialele pulverulente obținute.

9. Referințe bibliografice

- [1] A. M. Grumezescu, *Nano- and microscale drug delivery systems: design and fabrication*. Elsevier Ltd, 2017.
- [2] J. M. Walker, *Drug Delivery System Series Editor*. 2014.
- [3] V. Pașcalău and V. Popescu, “SISTEME DE ELIBERARE CONTROLATA A MEDICAMENTELOR. HIDROGELURI.”
- [4] D. Bhowmik, H. Gopinath, B. Pragati Kumar, S. Duraivel, and K. P. Sampath Kumar, “THE PHARMA INNOVATION Controlled Release Drug Delivery Systems,” vol. 1, no. 10, 2012.
- [5] H. Hillaireau and P. Couvreur, “Nanocarriers? entry into the cell: relevance to drug delivery,” *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 66, no. 17, pp. 2873–2896, Sep. 2009.
- [6] S. Suri, H. Fenniri, and B. Singh, “Nanotechnology-based drug delivery systems,” *J. Occup. Med. Toxicol.*, vol. 2, no. 1, p. 16, Dec. 2007.
- [7] D. Peer, J. M. Karp, S. Hong, O. C. Farokhzad, R. Margalit, and R. Langer, “Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy,” *Nat. Nanotechnol.*, vol. 2, no. 12, pp. 751–760, Dec. 2007.
- [8] S. Singh, V. K. Pandey, R. P. Tewari, and V. Agarwal, “Nanoparticle Based Drug Delivery System: Advantages and Applications,” *Indian J. Sci. Technol.*, vol. 4, no. 3, pp. 177–180, Mar. 2011.
- [9] N. Jain *et al.*, “NANOTECHNOLOGY: A SAFE AND EFFECTIVE DRUG DELIVERY SYSTEM.”
- [10] L. Zhang, F. Gu, J. Chan, A. Wang, R. Langer, and O. Farokhzad, “Nanoparticles in Medicine: Therapeutic Applications and Developments,” *Clin. Pharmacol. Ther.*, vol. 83, no. 5, pp. 761–769, May 2008.
- [11] M. E. Davis, Z. (Georgia) Chen, and D. M. Shin, “Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer,” *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 7, no. 9, pp. 771–782, Sep. 2008.
- [12] S. Dost, “Viry jako nanotransportéry léčiv,” pp. 30–35, 2014.
- [13] S. Laurent *et al.*, “Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Vectorization, Physicochemical Characterizations, and Biological Applications,” *Chem. Rev.*, vol. 108, no. 6, pp. 2064–2110, Jun. 2008.
- [14] W. Wu, Z. Wu, T. Yu, C. Jiang, and W.-S. Kim, “Recent progress on magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, surface functional strategies and biomedical

- applications,” *Sci. Technol. Adv. Mater.*, vol. 16, no. 2, p. 023501, Apr. 2015.
- [15] D. K. Kim *et al.*, “Superparamagnetic iron oxide nanoparticles for bio-medical applications,” *Scr. Mater.*, vol. 44, no. 8–9, pp. 1713–1717, 2001.
- [16] G. A. Held, G. Grinstein, H. Doyle, S. Sun, and C. B. Murray, “Competing interactions in dispersions of superparamagnetic nanoparticles,” *Phys. Rev. B*, vol. 64, no. 1, p. 012408, Jun. 2001.
- [17] A. Rauf, M. Imran, I. E. Orhan, and S. Bawazeer, “Health perspectives of a bioactive compound curcumin: A review,” *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 74, pp. 33–45, Apr. 2018.
- [18] M. Sanei and A. S. Demneh, “Effect of curcumin on memory impairment: A systematic review,” *Phytomedicine*, Jun. 2018.
- [19] J. Gallo, N. J. Long, and E. O. Aboagye, “Magnetic nanoparticles as contrast agents in the diagnosis and treatment of cancer,” *Chem. Soc. Rev.*, vol. 42, no. 19, pp. 7816–7833, 2013.
- [20] M. C. Fadus, C. Lau, J. Bikhchandani, and H. T. Lynch, “Curcumin: An age-old anti-inflammatory and anti-neoplastic agent,” *J. Tradit. Complement. Med.*, vol. 7, no. 3, pp. 339–346, Jul. 2017.
- [21] K. Ingólfssdóttir, “Usnic acid,” *Phytochemistry*, vol. 61, no. 7, pp. 729–736, Dec. 2002.
- [22] Y. Yang *et al.*, “Inhibitory Activity of (+)-Usnic Acid against Non-Small Cell Lung Cancer Cell Motility.”
- [23] N. Singh, G. J. S. Jenkins, R. Asadi, and S. H. Doak, “Potential toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION).,” *Nano Rev.*, vol. 1, 2010.