

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. Vladimir-Lucian ENE

Universitatea POLITEHNICA din București

Noiembrie 2018

# Cuprins

<b>1. PROBLEMATICA ABORDATĂ</b> .....	<b>2</b>
<b>2. METODE ACTUALE DE REZOLVARE</b> .....	<b>3</b>
<b>3. SUPORTURI MAGNETICE DESTINATE ELIBERĂRII CONTROLATE</b> .....	<b>4</b>
3.1 NANOPARTICULE DE MAGNETITĂ - GENERALITĂȚI.....	4
3.2 STABILIZAREA PARTICULELOR MAGNETICE.....	6
3.3 APLICAȚII ALE NANOPARTICULELOR MAGNETICE.....	8
<b>4. COMPUȘI ANTITUMORALI NATURALI CU CARACTER HIDROFIL</b> .....	<b>10</b>
<b>5. MATERIALE ȘI METODE</b> .....	<b>12</b>
5.1 SINTEZA $Fe_3O_4$ .....	12
5.2 SINTEZA $Fe_3O_4@ACID\ TARTRIC\ (Fe_3O_4@AT)$ .....	13
5.3 OBȚINEREA SISTEMULUI COMPLEX $Fe_3O_4@ACID\ TARTRIC+IRINOTECAN$ .....	14
<b>6. TEHNICI SPECIFICE DE CARACTERIZARE</b> .....	<b>15</b>
6.1 DIFRAȚIA 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) .....	17
6.7 EVALUAREA PROLIFERĂRII ȘI VIABILITĂȚII CELULARE (TEST MTT) .....	17
6.8 EVALUAREA STRESULUI OXIDATIV.....	18
6.9 EVIDENȚIEREA MORFOLOGIEI CITOSCHELETULUI.....	19
<b>7. REZULTATE ȘI DISCUȚII</b> .....	<b>20</b>
7.1 CARACTERIZAREA PULBERII DE $Fe_3O_4$ .....	20
7.2 CARACTERIZAREA PULBERII DE $Fe_3O_4@ACID\ TARTRIC$ .....	24
7.3 CARACTERIZAREA BIOLOGICĂ A MATERIALELOR OBȚINUTE.....	30
<b>8. CONCLUZII</b> .....	<b>32</b>
<b>9. REFERINȚE BIBLIOGRAFICE</b> .....	<b>34</b>

## 1. Problematika abordată

Cancerul este unul din cele mai răspândite grupuri de boli, cauzând aproximativ 14.6% din totalitatea deceselor, reprezentând o problemă majoră de sănătate la nivel global, potrivit Societății Americane a Cancerului. Accelerarea progresului împotriva cancerului necesită atât investiții globale crescute în cercetarea cancerului, cât și aplicarea cunoștințelor existente de control al cancerului în toate segmentele populației [1]. Agenția Internațională pentru Cercetare a Cancerului (IARC) a estimat că, în absența unor eforturi semnificative pentru îmbunătățirea controlului global al cancerului, mortalitatea produsă de cancer ar putea crește la 12.9 milioane și incidența cancerului la 20 milioane până în anul 2030 [2]. La o analiză mai atentă a datelor, devine clar că stigmatul legat de cancer este o problemă importantă care trebuie abordată din cauza devastării sociale, emoționale și financiare care adesea însoțesc diagnosticul de cancer. Convingerile culturale privind cancerul devin din ce în ce mai recunoscute ca factori determinanți, nu numai pentru prevenirea cancerului și măsuri de control, ci și pentru implicațiile psihologice și comportamentale de după diagnosticarea și tratamentul cancerului.

Tratamentele pentru cancer includ intervenții chirurgicale, radioterapie, imunoterapie și chimioterapie, ultima fiind utilizată în aproape 50% din cazurile de cancer, ca tratament standard pentru multe, dacă nu toate, cancerele metastazice [3]. Un dezavantaj general al chimioterapiei este eficacitatea redusă a livrării de medicamente către celulele tumorale, cauzând pătrunderea neintenționată a medicamentelor la celulele și țesuturile nețintite, ceea ce conduce la multiple efecte secundare, incluzând căderea părului, grețuri și vărsături, risc crescut la infecții, oboseală, datorită numărului scăzut de celule sanguine (prin afectarea celulelor măduvei osoase care formează sângele). Pentru a se realiza concentrația dorită a medicamentului în celulele tumorale, se utilizează doze mai mari de medicamente anticanceroase, provocând chiar și mai multe efecte secundare datorate toxicității off-target a agenților chimioterapeutici [4]. Un alt dezavantaj major al chimioterapiei este rezistența intrinsecă sau dobândită a unei tumori la medicament, care adesea conduce la reparația bolii și reduce rezultatele terapeutice. În ultimul deceniu, rezistența la tratament a atras o mare atenție urmată de unele descoperiri seminale, incluzând mutații secvențiale, celule stem canceroase și interconversie bidirecțională a populațiilor de celule canceroase din tulpinile stem și non-stem [5].

Cu toate acestea, tratamentul cu succes al cancerului va necesita depășirea acestor elemente de dificultate printr-o rafinare considerabilă a cunoștințelor privind tratamentul și, prin urmare, îmbunătățirea prognosticului pacienților cu cancer.

## 2. Metode actuale de rezolvare

În încercarea de a substitui tratamentele actuale de cancer, diferite nanobiomateriale, cum ar fi lipozomi și imunolipozomi [6], nanoparticule magnetice (MNPs) [7-9], polimeri [10], nanogeluri etc. sunt folosite ca nanotransportori pentru agenții chimioterapeutici. Astfel de nanotransportori sporesc timpul de circulație al agenților chimioterapeutici în fluxul sanguin, îmbunătățesc acumularea și reținerea agenților în tumoare și, în unele cazuri, sporesc eliberarea de agenți chimioterapeutici peste barierele fiziologice la locul bolii. Datorită dimensiunilor nanometrice (10 până la 100 nm) și permeabilității și retenției îmbunătățite (EPR), nanotransportorii tind să se acumuleze în țesutul tumoral mai mult decât în țesuturile normale. Explicația acestui fenomen rezidă în faptul că celulele tumorale trebuie să stimuleze producția de vase de sânge pentru a crește rapid. Per ansamblu, acest fapt duce la creșterea eficacității terapiei și la reducerea efectelor secundare [11].

Printre numeroasele nanoparticule magnetice (MNPs) utilizate ca nanotransportori pentru eliberarea agenților chimioterapeutici, nanoparticulele de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  au atras o atenție specială deoarece oferă oportunități pentru aplicații biologice datorate superparamagnetismului lor [12]. Cu toate acestea, există unele dezavantaje majore care limitează aplicațiile lor practice: (i) nanoparticulele simple de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  sunt sensibile la condițiile acide și oxidative și (ii) existența unor forțe van der Waals și a atracțiilor magnetice dintre particule determină ca dispersia MNP să fie foarte instabilă, particulele fiind predispuse la aglomerare. Prin urmare, acoperirea unui strat exterior de protecție este foarte importantă pentru a menține stabilitatea componentei magnetice [13]. O strategie eficientă pentru a realiza acest lucru o reprezintă încapsularea nanoparticulelor de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  într-un înveliș anorganic (C,  $\text{SiO}_2$ , ZnO etc.) pentru a forma nanocompozite magnetice, care pot extinde aplicarea lor tehnică ca rezultat al caracteristicilor unice ale cochiliei (stabilitate înaltă în condiții extreme și structură poroasă naturală) și abilității acesteia de a oferi o platformă pentru legarea de grupări funcționale. Cu toate acestea, utilizarea acestor sisteme pentru tratamentul cancerului este limitată datorită faptului că majoritatea nanostructurilor anorganice de magnetită acoperită este hidrofobă și inertă chimic, ceea ce în mod evident este dezavantajos față de bioaplicațiile lor în mediul apos.

Un material sintetic promițător raportat în literatura de specialitate pentru modificări de suprafață ale MNP-urilor este polietilenglicolul (PEG), un polimer hidrofil, solubil în apă, biocompatibil, non-antigenic și proteic [14]. Potrivit studiilor, MNP acoperite cu PEG au prezentat o stabilitate coloidală ridicată de până la 21 de zile în comparație cu MNP nemodificate [15]. În funcție de aplicație, această stabilitate pe termen lung nu este neapărat necesară, eliberarea citostaticelor decurgând în doar câteva zile. Ca atare, găsirea unor astfel de agenți de acoperire adecvați este încă o provocare a abordărilor curente.

### 3. Suporturi magnetice destinate eliberării controlate

Nanoparticulele anorganice utilizate ca nanotransportori pentru sistemele cu eliberare controlată pot fi definite ca particule de oxizi metalici sau cu compoziție metalică, cu un efect citotoxic redus. În cadrul acestei aplicații, nanoparticulele anorganice prezintă o serie de avantaje: posibilitatea modificării moleculelor de țintire sau a medicamentelor atașate la nivelul acestora, livrarea eficientă a compușilor terapeutici la situsurile țintă, conducând astfel la o terapie mult mai eficientă și un control mult mai bun al eliberării substanțelor active. Nanoparticulele anorganice prezintă proprietăți chimice, fizice și biologice net superioare, și totodată performanțe semnificative, ca urmare a dimensiunilor nanometrice ale acestora. În plus, suprafața specifică mare, și implicit reactivitatea mărită a acestora, oferă posibilitatea atașării unui număr mare de liganzi care să le îmbunătățească afinitatea față de celulele și țesuturile țintă, reducând efectele adverse și asigurând astfel o creștere semnificativă a eficienței terapeutice [16]. În cadrul acestei clase de nanotransportori pot fi încadrate următoarele tipuri de nanoparticule: nanoparticule metalice (ex.: nanoparticule de aur), nanoparticule magnetice (magnetita), punctele cuantice (Quantum Dots), nanoparticule nemetalice (nanoparticule de hidroxiapatită, silice mezoporoasă, nanoparticule de alumina) și nanoparticule pe bază de carbon (fulerene și nanotuburi de carbon).

#### 3.1 Nanoparticule de magnetită - generalități

Nanoparticulele magnetice prezintă o gamă variată de caracteristici ce le recomandă drept candidați promițători pentru sistemele cu eliberare controlată. Unele dintre aceste caracteristici sunt: manipularea ușoară a nanoparticulelor prin aplicarea unui câmp magnetic extern, posibilitatea utilizării unor strategii pasive și active de eliberare a substanței active, abilitatea de a fi vizualizate prin intermediul tehnicilor de imagistică precum rezonanța magnetică nucleară, și internalizarea eficientă de către țesuturile țintă, asigurând eficiența tratamentului pentru doze terapeutice optime [17].

Magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) este un mineral din grupa oxizilor de fier ce cristalizează în sistemul cubic cu fețe centrate, pe baza a 32 ioni de oxigen ( $\text{O}^{2-}$ ) strâns ordonați de-a lungul direcției  $[1\ 1\ 1]$ . Magnetita diferă față de majoritatea oxizilor de fier prin faptul că deține în structură atât ioni de fier bivalenți ( $\text{Fe}^{2+}$ ), cât și trivalenți ( $\text{Fe}^{3+}$ ) [18].

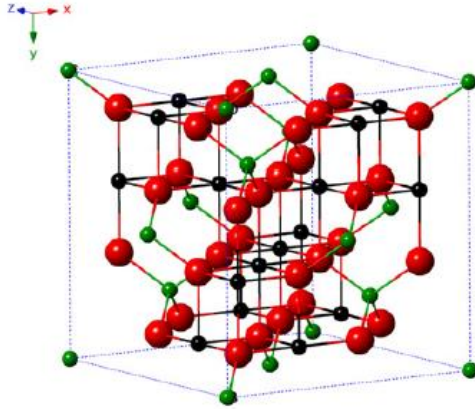


Figura 1. Structura cristalină a magnetitei ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) [18].

După cum se poate observa în *Figura 1*, magnetita prezintă o structură spinelică inversă, ce constă într-o rețea cubică de ioni oxidici, în care toți ioni de  $\text{Fe}^{2+}$  ocupă jumătate din spațiile octaedrice, iar ioni de  $\text{Fe}^{3+}$  sunt uniform distribuiți la nivelul situsurilor octaedrale remanente și a celor tetraedrale.

În magnetita stoechiometrică raportul ionilor de fier  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$  este  $\frac{1}{2}$ , iar ioni bivalenți de fier pot fi parțial sau total înlocuiți de alți ioni bivalenți (cobalt, mangan, zinc, etc). Astfel, magnetita poate fi un semiconductor atât de tip  $n$ , cât și de tip  $p$ . Cu toate acestea, magnetita este oxidul de fier cu cea mai scăzută rezistivitate, ca urmare a benzii interzise foarte înguste (0,1 eV) [18-20].

La temperatura camerei, magnetita are un comportament ferimagnetic: sub temperatura Curie (în cazul magnetitei, 850K), momentele magnetice ale situsurilor tetraedrice, ocupate de speciile ferice ( $\text{Fe}^{3+}$ ), sunt aliniată feromagnetic, în timp ce momentele magnetice pe situsurile octaedrice, ocupate de speciile ferice și feroase ( $\text{Fe}^{2+}$ ), sunt antiferomagnetice, anulându-se reciproc. Odată cu creșterea temperaturii, fluctuațiile termice distrug aliniamentul feromagnetic al momentelor magnetice la nivelul situsurilor tetraedrice; prin urmare, puterea ferimagnetică este diminuată. Când este atinsă temperatura Curie, magnetizarea netă devine zero, și se observă un comportament superparamagnetic al particulelor feromagnetice [21].

### 3.2 Stabilizarea particulelor magnetice

În cadrul obținerii și stocării nanoparticulelor în formă coloidală, stabilitatea coloidului este foarte importantă. Ca urmare a compoziției lor, fluidele magnetice dețin capacitatea de a interacționa cu câmpurile magnetice. În absența unui strat de acoperire, particulele magnetice de oxid de fier au suprafețe hidrofobe, cu o valoare mare a raportului suprafață/volum. Datorită interacțiilor hidrofobe dintre particule, acestea din urmă se aglomerează, formând clustere (agregate), conducând la creșterea dimensiunii particulelor. Aceste aglomerate de particule manifestă atracții magnetice foarte puternice de tip dipol-dipol și prezintă un comportament feromagnetic. Când două aglomerate de nanoparticule, de dimensiuni mari, se apropie unul de altul, fiecare dintre acestea pătrunde în câmpul magnetic al celuilalt aglomerat. Pe lângă exercitarea forțelor de atracție dintre particule, fiecare particulă se află în câmpul magnetic al particulelor vecine, devenind mult mai magnetizată. Aderarea particulelor magnetice remanente determină o magnetizare mutuală, ceea ce conduce la creșterea proprietăților de agregare [19].

După cum a fost menționat și anterior, nanoparticulele de magnetită sunt susceptibile la oxidare, iar prin acoperirea cu diverse materiale, rezistența acestora în medii oxidative (aer sau fluide biologice) este mult îmbunătățită.

De vreme ce particulele sunt atrase magnetic, pe lângă aglomerarea datorată forțelor Van de Waals, modificarea suprafeței este adesea indispensabilă. Pentru stabilizarea eficientă a nanoparticulelor de oxid de fier se recomandă acoperirea acestora cu stabilizatori precum surfactanți sau macromolecule (polimeri), care, în cele din urmă, vor împiedica agregarea nanoparticulelor magnetice. Majoritatea acestor polimeri aderă la suprafața particulelor într-o manieră specifică substratului.

Materialul de acoperire trebuie ales cu o foarte mare atenție, în funcție de aplicația vizată. Materialele polimerice de acoperire pot fi clasificate în sintetice și naturale. Polimerii de bază de poli(etilen-co-vinil acetat), poli(vinilpirolidona) (PVP), acid poli(lactic-co-glicolic) (PLGA), poli(etilenglicol) (PEG), alcool polivinilic (PVA), dendrimerii (poliamidoamine – PAMAM) etc. sunt exemple tipice de sisteme polimerice sintetice.

Sistemele polimerice naturale includ utilizarea gelatinei, dextranului, chitosanului etc. Diversi surfactanți, precum oleatul de sodiu, dodecilamina, carboximetilceluloza de sodiu, sunt, de asemenea, frecvent utilizate pentru a îmbunătăți capacitatea de dispersie a nanoparticulelor în medii apoase. Pe lângă compușii organici, pentru acoperirea nanoparticulelor magnetice în scopul stabilizării și al îmbunătățiri proprietăților magnetice, se

pot utiliza și alte tipuri de materiale precum metalele (aur) și compuși din clasa silicaților sau silanilor (Figura 2) [19][22].

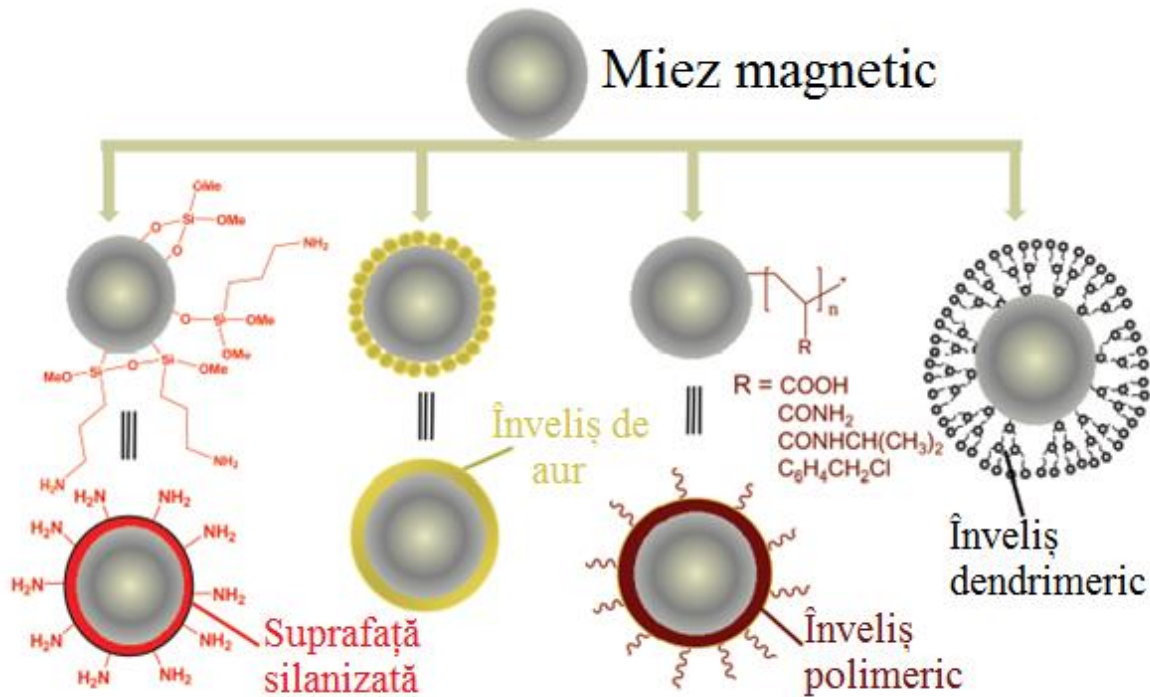


Figura 2. Nanoparticule magnetice cu tipuri variate de acoperiri [22].

Au fost dezvoltate mai multe abordări de funcționalizare a nanoparticulelor de oxid de fier cu polimeri, dintre care cele mai comune fiind acoperirea *in situ* și *post-sinteză*.

În cadrul funcționalizării *in situ*, rutele convenționale sunt polimerizarea în micro-emulsie și procesul sol-gel de funcționalizare a nanoparticulelor magnetice cu polimeri în timpul procesului de sinteză. Macromoleculele organice acoperă nanoparticulele de magnetită și formează un strat de acoperire în timpul procesului de polimerizare în emulsie; structura convențională este una de tip core-shell (miez-înveliș) sau o structură de tip dispersie în matrice. Din păcate, aceste strategii de modificare directă a suprafeței nu prezintă un real succes în ceea ce privește menținerea stabilității coloidale, iar grosimea stratului de acoperire este dificil de controlat.

În consecință, ruta cel mai frecvent abordată pentru modificarea nanoparticulelor magnetice cu polimeri este funcționalizarea *post-sinteză*. Mecanismele comune implicate în modificarea particulelor prin această strategie sunt adsorbția fizică și grupările funcționale ancorate pe suprafața nanoparticulelor de oxid de fier, determinând formarea unor particule cu o structură de tip core-shell [18].



### 3.3 Aplicații ale nanoparticulelor magnetice

Magnetita poate fi utilizată cu succes și în cadrul ingineriei tisulare, în special datorită susceptibilității acestui material de a fi ghidat magnetic în zona de interes, dar și datorită influenței pozitive asupra anumitor tipuri de celule, în special asupra osteoblastelor. Testele *in vitro* și *in vivo* au demonstrat că prezența magnetitei în materialele compozite utilizate în ingineria tisulară a determinat o creștere semnificativă a viabilității și a proliferării celulelor osteoblaste [23].

În cadrul administrării convenționale de medicamente, precum ingestia orală sau injectarea intravasculară, substanța activă este distribuită în întreg organismul prin intermediul circulației sistemice. Pentru majoritatea agenților terapeutici, doar o anumită cantitate a acestora ajunge la nivelul organului/țesutului afectat, iar difuzia medicamentului prin barierele biologice este relativ redusă, cauzând o creștere a incidenței efectelor adverse. Eliberarea țintită a substanțelor active tinde să concentreze medicamentul în țesutul de interes. Simultan, această tehnică determină o reducere a concentrației relative a medicamentului în țesuturile remanente și permite depășirea barierelor biologice prin acumulare activă sau printr-o strategie activă de țintire [24]. În acest sens, nanoparticulele magnetice s-au dovedit a fi candidați promițători în terapia cancerului și a poliartritei reumatoride [25], asigurând diminuarea, sau chiar anularea efectelor adverse datorate terapiei convenționale, prin reducerea distribuției sistemice a medicamentelor și scăderea dozelor compușilor citotoxici [26].

Nanoparticulele de magnetită utilizate ca transportori ai substanțelor active pot livra o gamă variată de medicamente în toate regiunile anatomice ale organismului. Prin urmare, o eliberare intracelulară eficientă a nanoparticulelor, reprezintă principalul factor în eficientizarea încapsulării agentului terapeutic. În general, nanoparticulele magnetice sunt utilizate ca miez (core), iar componentele biocompatibile joacă rolul unui înveliș, determinând obținerea unor structuri de tip core-shell (miez-înveliș) ce pot fi utilizate ca transportori ai substanțelor bioactive. Medicamentele se pot fie lega sau încapsula în matricea polimerică, fie atașa de suprafața nanoparticulelor magnetice, fiind ulterior acoperite de învelișul biocompatibil [27].

În cadrul unui sistem transportor de medicamente, dimensiunea, proprietățile de suprafață și stabilitatea reprezintă caracteristici cruciale. Nanoparticulele magnetice trebuie să fie suficient de mici pentru a penetra prin patul capilar. Cu toate acestea, dacă diametrul nanoparticulelor este mai mic de 10 nm, acestea vor fi îndepărtate rapid prin extravazări și clearance renal (eliminarea/excreția medicamentului din sistemul biologic). Prin urmare,

nanoparticulele cu diametre cuprinse între 10 și 100 nm sunt optime pentru injecția intravenoasă și prezintă cea mai îndelungată perioadă de retenție în sistemul circulator [27].

Livrarea țintită de substanțe active mediată de nanostructuri, o tehnologie cheie în dezvoltarea nanotransporturilor, are potențialul de a spori biodisponibilitatea medicamentului, de a îmbunătăți perioada de eliberare a substanței active, interacționând cu ușurință cu liganzii vizați și permițând eliberarea țintită a medicamentului (sensibilitate în prezența unui câmp magnetic extern). În particular, compozitele pe bază de nanoparticule magnetice și compuși biocompatibili (înveliș polimeric) sunt recunoscute, în prezent, drept cele mai promițătoare sisteme de eliberare controlată a agenților terapeutici [28-29]. Mai mult decât atât, particulele magnetice nanostructurate pot servi nu doar ca vehicule pentru transportul medicamentelor, ci și pentru transportul genelor în terapia genică (gene delivery) [30].

În cadrul acestei aplicații, nanotransportorii magnetici încărcăți cu molecule bioactive sunt injectați în organismul pacientului prin intermediul sistemului circulator. Un câmp magnetic extern este utilizat pentru a localiza nanosistemele la nivelul organului/țesutului țintă. Odată cu localizare sistemului în zona vizată, medicamentul este eliberat fie prin activitate enzimatică, fie prin modificarea condițiilor fiziologice (precum pH-ul, osmolalitatea sau temperatura) și poate fi astfel preluat de către celulele țintă [31-32].

În ciuda tuturor avantajelor, utilizarea nanoparticulelor magnetice ca sisteme de eliberare controlată prezintă și unele limitări. De vreme ce gradientul magnetic scade o dată cu distanța dintre câmpul magnetic și țintă, principala limitare a nanotransporturilor magnetice este asociată tăriei câmpului magnetic extern care poate fi aplicat pentru a obține gradientul magnetic necesar retenției nanoparticulelor în zona vizată, pentru o anumită perioadă de timp [33]. O altă limitare este asociată dimensiunilor mici a nanoparticulelor, o cerință esențială pentru asigurarea superparamagnetismului, care la rândul său este crucial în împiedicarea aglomerării nanoparticulelor după îndepărtarea câmpului magnetic extern. O dimensiune mică a particulelor implică un răspuns magnetic de putere redusă, fapt ce face dificilă direcționarea particulelor și păstrarea acestora în proximitatea țintei. Direcționarea s-a dovedit a fi mult mai eficientă în regiunile în care viteza de curgere a sângelui este mult mai scăzută, și cu atât mai mult, când sursa generatoare de câmp magnetic se află mai aproape de organul/țesutul țintă [34].

Deși au fost raportate numeroase beneficii ale utilizării nanoparticulelor magnetice ca sisteme de eliberare controlată și țintită a substanțelor bioactive, până în prezent, studiile clinice actuale pun încă o serie de probleme. Chiar dacă nanoparticulele magnetice pot fi considerate biocompatibile, răspunsul imun pe parcursul perioadei de retenție a sistemului,

toxicitatea nanoparticulelor magnetice și a posibililor compuși de descompunere ai acestora, sunt o serie de parametri care trebuie încă studiați pentru a determina siguranța utilizării acestor sisteme în eliberarea controlată și țintită a substanțelor active [35].

#### 4. Compuși antitumorali naturali cu caracter hidrofili

Sistemele coloidale, cum ar fi lipozomii, nanoparticulele și microemulsiile au fost în general raportate în literatură ca purtători ai medicamentelor hidrofobe. Cu toate acestea, furnizarea de molecule hidrofile este, de asemenea, un obiectiv provocator și care necesită o abordare multidisciplinară.

Multe medicamente sunt hidrofile, iar dintre acestea multe sunt molecule cu greutate moleculară mică (mai puțin de 500 Da). Farmacopeea Statelor Unite (USP) clasifică medicamentele hidrofilice, în intervalul de la foarte solubil la solubil într-un mediu apos, dacă solubilitatea lor este mai mare de 33 mg / mL. Medicamentele hidrofobe sunt adesea supuse absorbției intracelulare scăzute, degradării enzimatică, eliberării rapide, distribuției suboptimale, dezvoltării rezistenței, farmacocineticii slabe, indice terapeutic scăzut și, în cazul medicamentelor antitumorale, incapacitatea de a se acumula și a fi reținută în interiorul tumorii. Încărcarea medicamentelor în sistemele de administrare coloidală poate, în multe cazuri, să depășească aceste dificultăți, deoarece poate îmbunătăți farmacocinetica, poate proteja medicamentul împotriva degradării in vivo, susține eliberarea medicamentului, crește confortul pacientului prin evitarea injecțiilor repetate și reducerea efectelor secundare. În cazul medicamentelor antitumorale, sistemele de nanoparticule posedă de asemenea avantajul de a spori permeabilitatea și retenția (efectul EPR), rezultând acumularea lor mai mare în tumori. Posibilitatea modificării suprafeței sistemelor cu nanoparticule, de exemplu prin PEGilare, conduce la sisteme coloidale discrete prin care se poate evita absorbția rapidă de către sistemul fagocitar mononuclear; adăugarea de liganzi specifici pe suprafața lor poate, de asemenea, să ofere o eliberare mai eficientă la locul țintă [36].

Produsele vegetale naturale au reprezentat fundația numeroaselor tratamente medicale. Deși aspectele moderne ale medicinei occidentale au devenit astăzi prima linie a practicii clinice, produsele vegetale naturale continuă să fie utilizate ca remedii în medicina alternativă în întreaga lume. Se estimează că 80% dintre persoanele din țările în curs de dezvoltare depind în principal de produse naturale pentru a-și satisface nevoile de asistență medicală. În Statele Unite ale Americii s-a constatat că aproximativ unul din trei americani utilizează medicamente naturale în decursul unei zile. Se estimează că din cele 877 medicamente cu moleculă mică introduse în întreaga lume în perioada 1981-2002, aproximativ 61% pot fi identificate înapoi

la origine în produse naturale. Acestea sunt nu numai eficiente, dar prezintă și o toxicitate scăzută și au doze terapeutice mult sub nivelul lor toxic [37].

Din categoria compușilor antitumorali naturali, studiul de față se va canaliza pe obținerea unor sisteme complexe magnetice pentru eliberarea irinotecanului și doxorubicinei.

Irinotecanul (figura 3) este un analog al camptotecinei, un extract din arborele chinezesc *Camptotheca Acuminata*, cu o solubilitate apoasă mai mare decât camptotecina. Irinotecanul a fost un pro-medicament activat metabolic în organism la 7-etil-10-hidroxicamptotecină (SN-38).

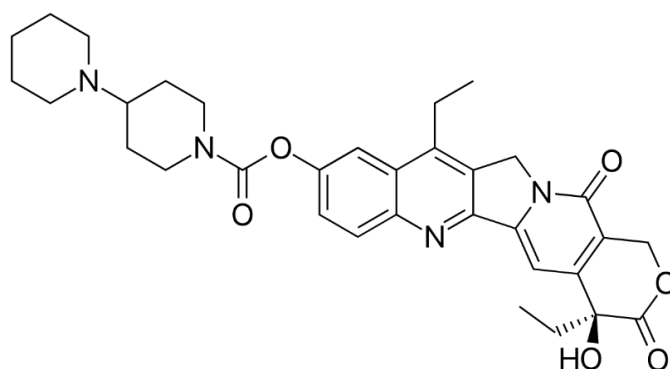


Figura 3. Formula chimică a Irinotecanului [38]

Irinotecanul are un spectru larg de activitate antitumorală atât *in vitro*, cât și *in vivo* și este asociat cu o toxicitate mai previzibilă și mai ușor de gestionat decât cea a compusului inițial izolat. După studiile clinice, irinotecanul a devenit disponibil în comerț în Japonia pentru tratamentul cancerelor pulmonare, cervicale și ovariene în 1994. Irinotecanul a fost aprobat pentru tratamentul cancerului colorectal metastatic (CRC), în asociere cu 5-fluorouracilul (5-FU) în Statele Unite în 1996, urmată de aprobarea în asociere cu 5-FU și leucovorin (LV) pentru tratamentul de primă linie a CRC metastazat [39][40].

Doxorubicina clorhidrat este sarea clorhidrică a doxorubicinei, un antibiotic antraciclinic cu activitate antineoplazică (figura 4). Doxorubicina, izolată din bacteria *Streptomyces Peucetius* var. *Caesius*, este congenerul hidroxilat al daunorubicinei. Doxorubicina se intercalează între perechile de bază din helixul ADN, împiedicând astfel replicarea ADN-ului și, în cele din urmă, inhibând sinteza proteinelor. În plus, doxorubicina inhibă topoizomeraza II care are ca rezultat un complex legat de enzimă-ADN scindabilă și stabilizată în timpul replicării ADN și, ulterior, previne legarea lanțului nucleotid după dubla ruptură. Doxorubicina forează de asemenea radicali liberi de oxigen care duc la citotoxicitate secundară peroxidării lipidelor membranei celulare. Formarea radicalilor liberi de oxigen

contribuie, de asemenea, la toxicitatea antibioticelor antraciclinei și anume efectele vasculare cardiace și cutanate [41].

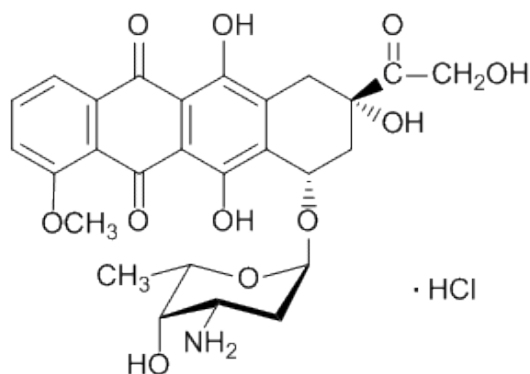


Figura 4. Formula chimică a Doxorubicinei [41]

## 5. Materiale și metode

### 5.1 Sinteza $\text{Fe}_3\text{O}_4$

Nanoparticulele de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  au stârnit interes științific atât pentru proprietățile magnetice cât și pentru faptul că prin funcționalizare permit vectorizarea medicamentelor. Nanoparticulele magnetice au fost sintetizate prin metoda co-precipitării astfel (figura 5):

- Pentru obținerea 1g de magnetită se cântăresc 1,2 g  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  și 1,4 g  $\text{FeCl}_3$  și sunt solubilizați individual în câte 150 mL apă ultrapură, sub agitare magnetică continuă;
- 1,5g NaOH se dizolvă în 200 mL apă ultrapură, asigurând un pH optim obținerii nanoparticulelor magnetice;
- Soluția precursoră de ioni de fier se adaugă peste soluția bazică anterior obținută, în picătură, cu ajutorul unei pompe peristaltice, cu un debit constant;
- Cu ajutorul unui magnet puternic, se efectuează o decantare accelerată a suspensiei de nanoparticule de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , prin plasarea paharului Berzelius în care se află suspensia de nanoparticule peste magnet;
- După dencantarea completă, menținând magnetul în contact cu paharul, faza limpede a suspensiei este îndepărtată;
- Precipitatul este spălat cu apă ultrapură de trei ori, în vederea îndepărtării materiilor prime nereacționate și obținerea unui pH neutru;
- După spălare, nanoparticulele sunt uscate în etuva cu vid, la temperatura de  $60^\circ\text{C}/24\text{h}$ .

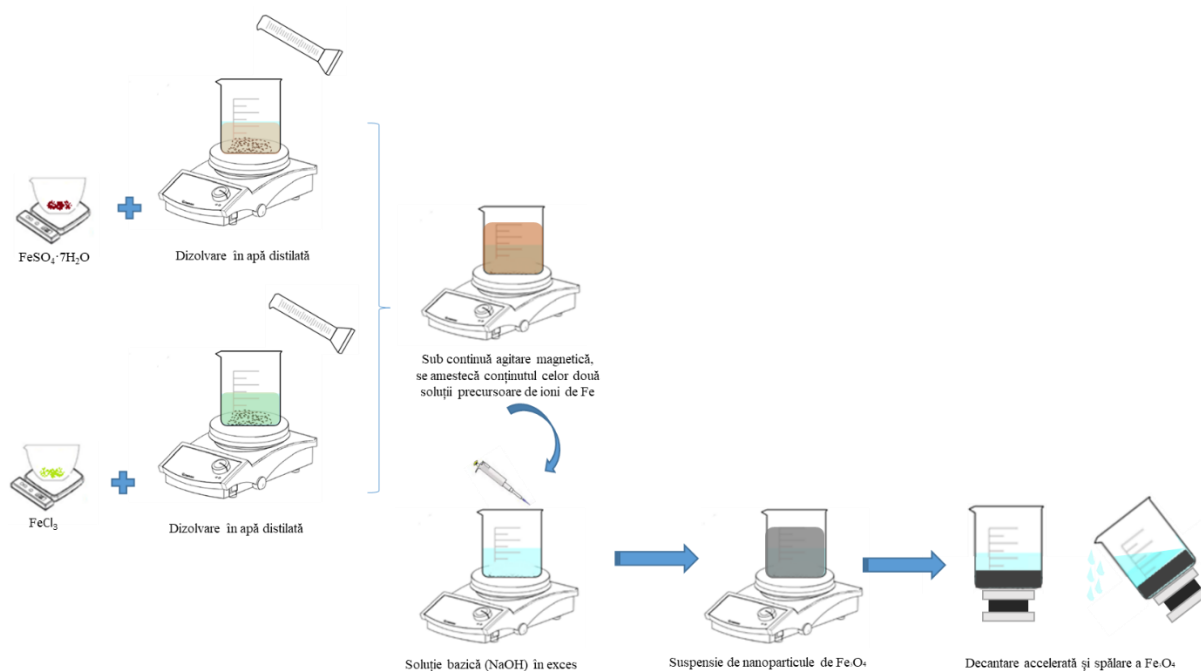


Figura 5. Schema de obținere a nanoparticulelor de magnetită ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ )

## 5.2 Sinteza $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @acid tartric ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @AT)

Nanoparticulele magnetice acoperite cu acid tartric (figura 6) au fost sintetizate prin metoda co-precipitării modificată astfel (figura 7):

- Pentru obținerea 1g de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @acid tartric se cântăresc 1,2 g  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  și 1,4 g  $\text{FeCl}_3$  și sunt solubilizați individual în câte 150 mL apă ultrapură, sub agitare magnetică continuă;
- 1,5g  $\text{NaOH}$  se dizolvă în 200 mL apă ultrapură, asigurând un pH optim obținerii nanoparticulelor magnetice;
- Se dozează acidul tartric ( $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_6$ ) în raport molar 1:2 față de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  și se solubilizează în soluția bazică anterior obținută.
- Soluția precursoră de ioni de fier se adaugă peste soluția bazică ce conține și acidul tartric, în picătură, cu ajutorul unei pompe peristaltice, cu un debit constant;
- Cu ajutorul unui magnet puternic, se efectuează o decantare accelerată a suspensiei de nanoparticule de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , prin plasarea paharului Berzelius în care se află suspensia de nanoparticule peste magnet;
- După dencantarea completă, menținând magnetul în contact cu paharul, faza limpede a suspensiei este îndepărtată;

- Precipitatul este spălat cu apă ultrapură de trei ori, în vederea îndepărtării materiilor prime nereacționate și obținerea unui pH neutru;
- După spălare, nanoparticulele sunt uscate în etuva cu vid, la temperatura de 60°C/24h.

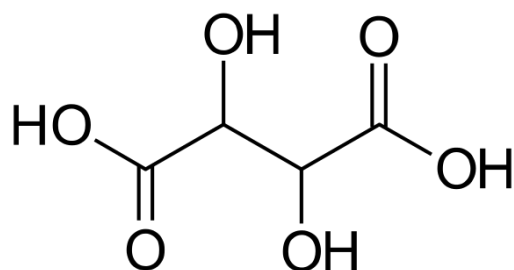


Figura 6. Formula structurală a acidului tartric (AT)

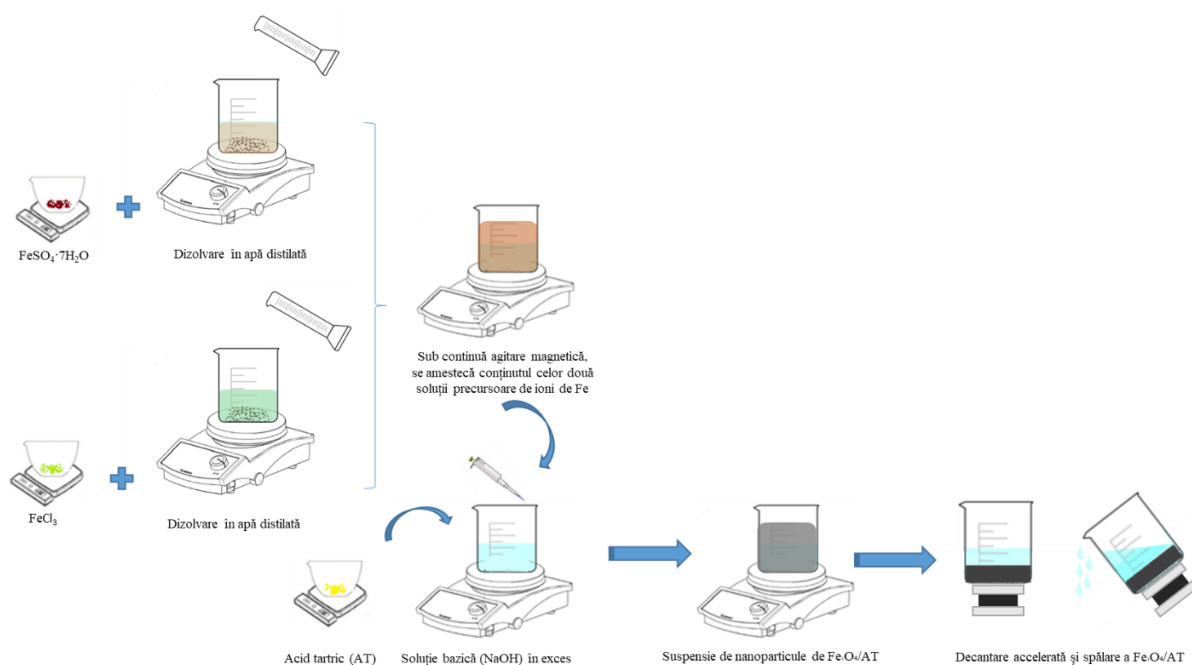


Figura 7. Schema de obținere a nanoparticulelor de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ acid tartric ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ AT)

### 5.3 Obținerea sistemului complex $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ acid tartric+Irinotecan

Pentru adăugarea de citostatic hidrofил (Irinotecan), pulberea anterior obținută ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ AT) a fost dispersată în apă distilată prin intermediul unei sonde de ultrasonare, formând o suspensie. Peste suspensia de nanoparticule aflată sub agitare magnetică continuă se adaugă, prin picurare o soluție apoasă de Irinotecan (1% procente masice) și se continuă omogenizarea 2h. Particulele magnetice cu irinotecan au fost separate prin decantare magnetică accelerată și spălate de 3 ori cu apă deionizată, ulterior uscate la 30°C/24 h.

## 6. Tehnici specifice de caracterizare

### 6.1 Difrakția de raze X (XRD)

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  $10-80^\circ 2\theta$  cu pas de achiziție de  $0.02^\circ$  și timp de achiziție pe pas de 100s.

Cu ajutorul analizei de Difrakție de raze X se poate determina compoziția mineralogică și structura cristalografică a diverselor materiale. Interacția dintre radiația X emisă de un tub catodic (radiație filtrată, colimată și direcționată) și rețeaua cristalină a probei de analizat (imobilizată pe un suport rotativ aflat în incinta difractometrului) determină difracția radiației incidente într-un mod discontinuu și propagarea radiațiilor difractate în funcție de distanța interatomică din celula elementară. Efectul de difracție caracteristic probei investigate este format prin interferarea pozitivă a difracțiilor individuale ale tuturor atomilor rețelei cristalografice, fenomen realizat în conformitate cu legea lui Bragg (aceasta din urmă stabilește o relație de proporționalitate între lungimea de undă asociată radiației electromagnetice, distanța dintre planele reticulare și valoarea unghiului incident al radiației X, conform relației  $n \cdot \lambda = 2 \cdot d \cdot \sin\theta$ ).

Analiza XRD a fost realizată în scopul caracterizării materialelor sintetizate din punctul de vedere al cristalinității acestora, precum și al fazelor componente, pentru anticiparea proprietăților corespunzătoare în cazul utilizării lor în cadrul sistemelor de eliberare controlată a medicamentelor.

### 6.2 Microscopia electronică de baleiaj (SEM)

În cazul sistemelor sintetizate, microscopia electronică de baleiaj s-a realizat cu scopul de a evidenția aspecte referitoare la morfologia, compoziția și topografia acestora. Achiziția de micrografii s-a realizat cu ajutorul unui microscop electronic de baleiaj de înaltă rezoluție, *Inspect F50*, la o valoare a energiei de 30KeV și diverse mărimi.

### 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.

Tehnica de analiză spectroscopică în infraroșu cu transformată Fourier (FT-IR) a fost utilizată pentru investigarea naturii interacțiunilor stabilite între nanoparticulele de magnetită și compușii organici. 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. Spectrele de absorbție sau transmitanță în infraroșu reprezintă instrumente analitice utile în obținerea de informații calitative (identificare chimică și determinare structurală) și cantitative (asocierea intensității maximelor spectrale cu cantitatea de compus) despre proba analizată.

#### 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 tartric au fost obținute cu ajutorul unui microscop electronic prin transmisie de înaltă rezoluție model Tecnai G<sup>2</sup> 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 fascicului 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 proliferării și viabilității celulare (test MTT)

Testul MTT este o metodă colorimetrică cantitativă ce constă în reducerea unei sări de tetrazoliu galbene, MTT [bromură de 3-(4,5-dimetitiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliu] la un formazan de culoare albastru-închis. Coeficientul de reducere (realizată de enzimele mitocondriale, în special succinat dehidrogenază) este direct proporțional cu numărul de celule viabile, fiind un indice al integrității celulare/mitocondriale (figura 8).

Pe baza acestei metode colorimetrice cantitative se permite aprecierea proliferării, viabilității și toxicității celulare.

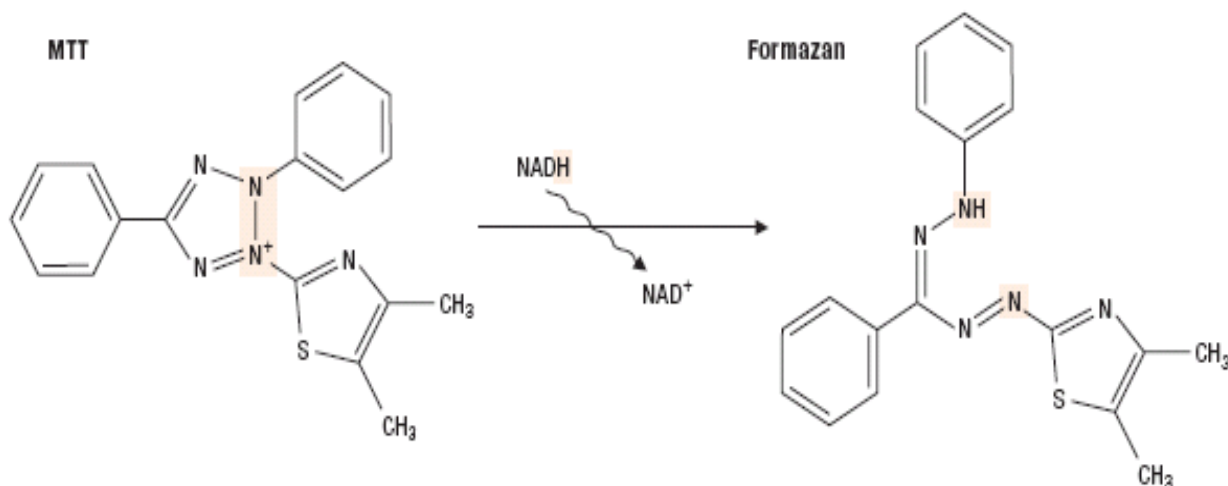


Figura 8. Reducerea sării de tetrazoliu galbene MTT [bromură de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliu] la un formazan de culoare albastru-închis

Potențialul citotoxic al sistemelor complexe sintetizate a fost investigat la nivelul celulelor stem mezenchimale izolate din fluidul amniotic (AFSC). Acestea au fost cultivate în mediu de cultură DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium) (Sigma-Aldrich, Missouri, USA), suplimentat cu 10% ser fetal bovin și 1 % antibiotice (penicilina și streptomicina)

Celulele se cultivă în plăcuțe cu 96 de godeuri, având o densitate de însămânțare de 3000 celule /godeu în prezența materialelor sintetizate, timp de 72h. Ulterior s-au adăugat 10 μl (12 mM) MTT, iar celulele MSC au fost incubate la temperatura de 37°C timp de 4 ore. Se adaugă ulterior 100 μl 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 Infinite M200 (Männedorf, Switzerland) la 570 nm.

## 6.8 Evaluarea stresului oxidativ

Și în acest caz au fost analizate celulele AFSC (celule stem mezenchimale izolate din lichid amniotic), care se însămânțează conform protocolului la o densitate de 3000 celule în 300 μl mediu de cultură DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium), suplimentat cu 10% ser fetal bovin și 1 % antibiotice (penicilină, streptomycină/neomicină) în plăcuțe cu 96 godeuri.

După 24 de ore de la însămânțare, celulele se pun în contact cu materialele pulverulente de analizat. Stresul oxidativ este evaluat cu ajutorul setului GSH-Glo™ Glutathione Assay kit (Promega, Wisconsin, USA), care determină cantitatea de glutation - un agent antioxidant

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

Protocolul standard de lucru a constat în adăugarea a 100  $\mu$ L 1X GSH-Glo™ Reagent și incubarea la temperatura de 37°C, timp de 30 de minute. Apoi s-au adăugat 100 $\mu$ 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 (Microplate Luminometer Centro LB 960, Berthold, Germany).

## 6.9 Evidențierea morfologiei citoscheletului

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

- 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 $\text{Fe}_3\text{O}_4$

În urma analizei XRD și prelucrării datelor cu ajutorul programului HighScore s-a identificat ca unică fază cristalină  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (magnetită) conform PDF4+ [01-085-3772], cu structură ortorombică și planele de cristalizare evidențiate în figura 9. Aspectul general al interferențelor de difracție relevă un caracter cristalin al probei și dimensiuni mici de cristalit, cu posibile aglomerări de particule.

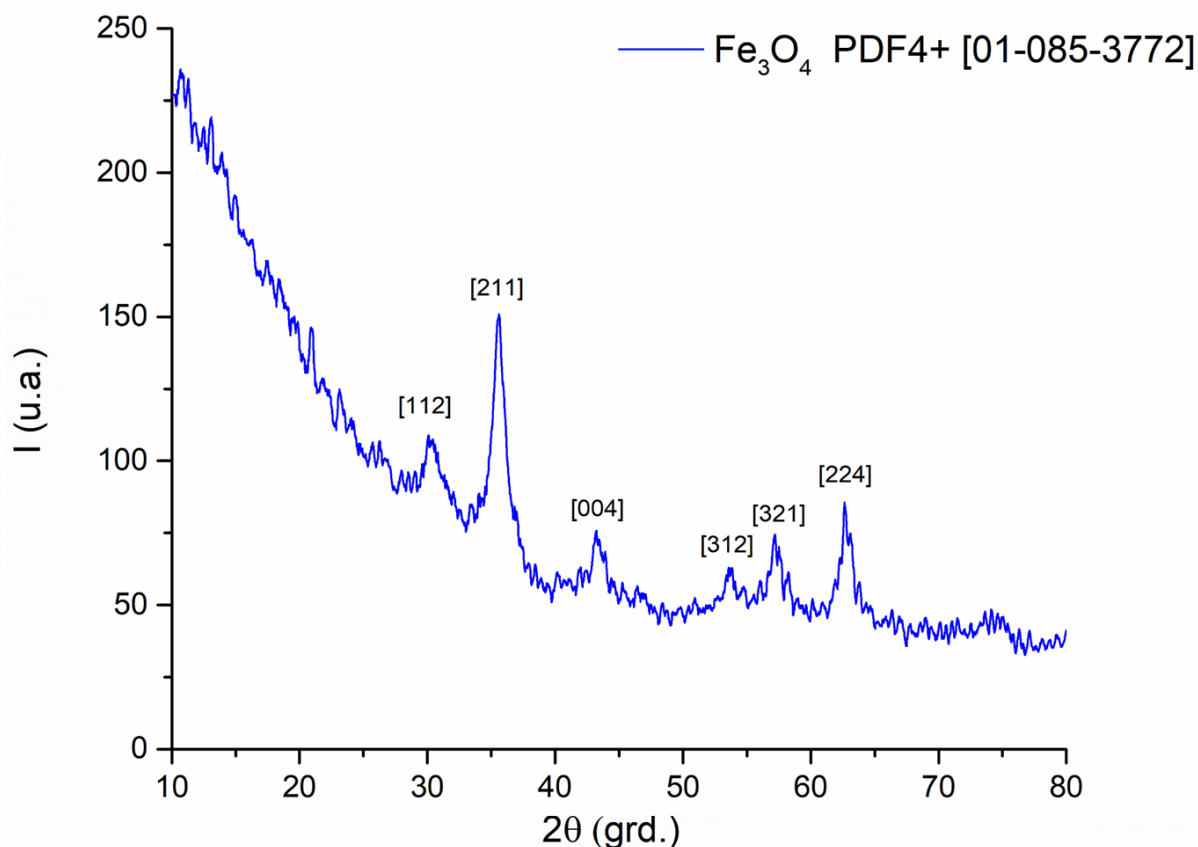


Figura 9. Diffractograma de raze X pentru pulbera de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , cu evidențierea planelor de cristalizare

Imaginile de microscopie electronică de baleiaj (SEM) prezentate în figura 10 sunt în concordanță cu informațiile rezultate din spectrul de raze X, evidențiind dimensiunea nanometrică a particulelor de magnetită obținute, cu dimensiuni cuprinse între 3-5 nm. Se poate observa cum, datorită suprafețelor specifice mari asociate dimensiunii reduse, particulele au un grad mare de aglomerare.

Dimensiunile reduse și rezoluția maximală a echipamentului fac greu de precizat forma particulelor, care pare cvasi-sferică. Pentru o caracterizare morfologică amănunțită în vederea

stabilirii dimensiunii medii de particulă și forma acestora, s-a recurs la o tehnică mai avansată de caracterizare microscopică, microscopia electronică prin transmisie (TEM).

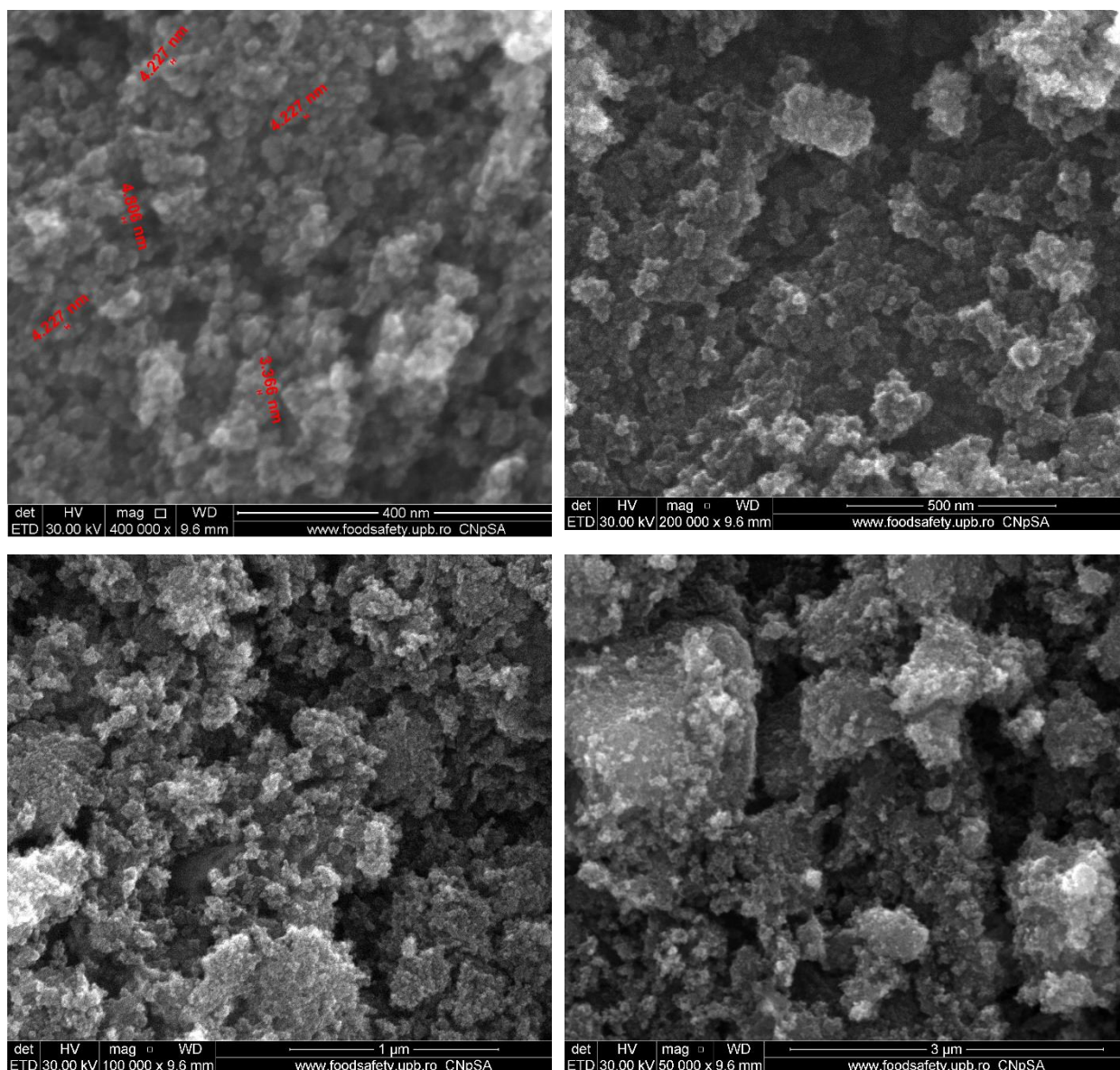


Figura 10. Micrografii SEM pentru pulberea de  $Fe_3O_4$

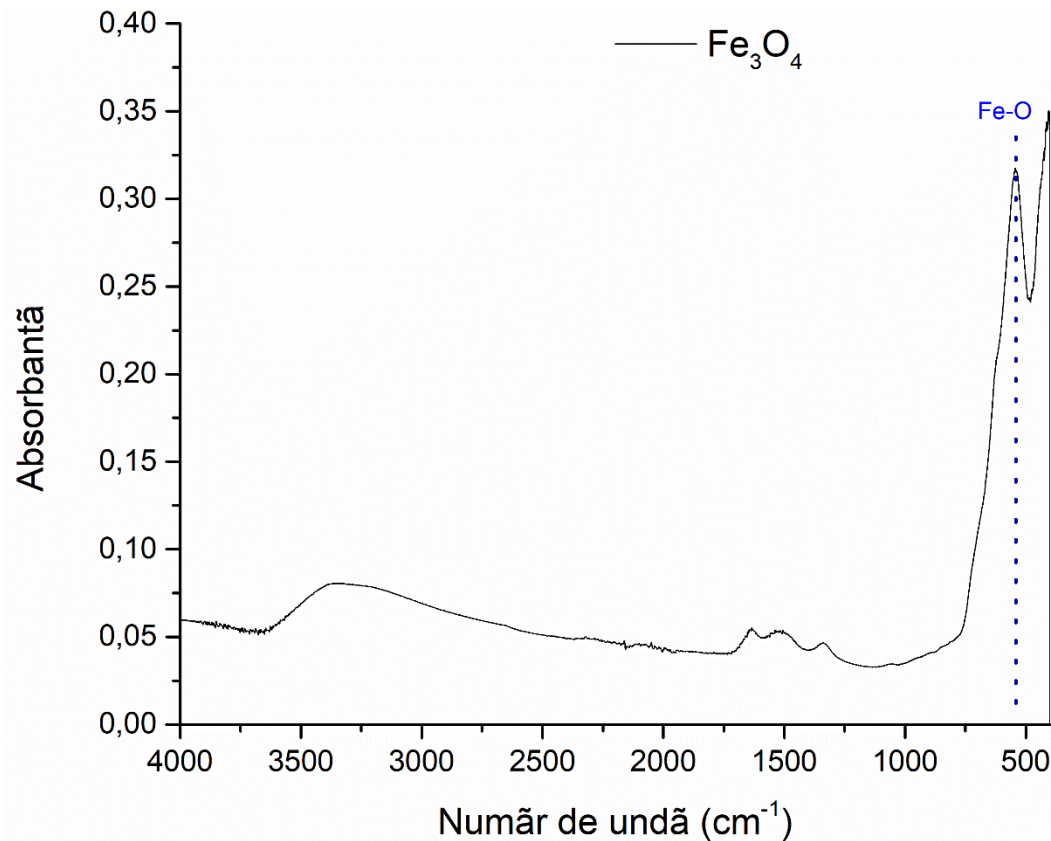


Figura 11. Spectrul FT-IR pentru pulberea de  $Fe_3O_4$

Din spectrul FT-IR prezentat în figura 11 se remarcă banda de vibrație de la  $582\text{ cm}^{-1}$  specifică legăturii  $Fe^{2+}-O^{2-}$  atribuită magnetitei. Banda largă de la  $3000-3500\text{ cm}^{-1}$  poate fi atribuită grupărilor  $-OH$  corespunzătoare apei posibil adsorbită pe suprafața particulelor de magnetită.

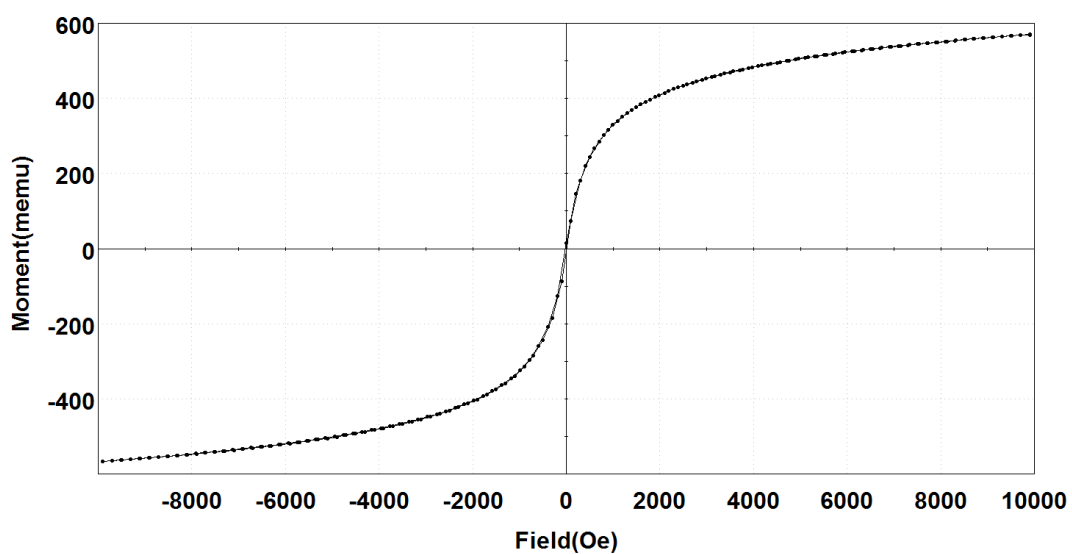


Figura 12. Variația magnetizării în funcție de câmpul magnetic aplicat pentru nanoparticulele de  $Fe_3O_4$  la temperatura de  $25^\circ C$

Curba de magnetizare înregistrată la temperatura camerei a particulelor de magnetită neacoperită este prezentată în figura 12. Proba nu prezintă histerezis, indicând astfel natura superparamagnetică a particulelor. Valoarea magnetizării de saturație a fost 59 emu/g pentru nanoparticulele de magnetită, fiind, prin urmare, ușor de separat, cu ajutorul unui magnet, din amestecul de reacție, simplificând astfel protocolul de curățare. Magnetizarea de saturație mare poate conferi, de asemenea, proprietăți de ecranare electromagnetică acoperirilor hibride utilizate în anumite aplicații.

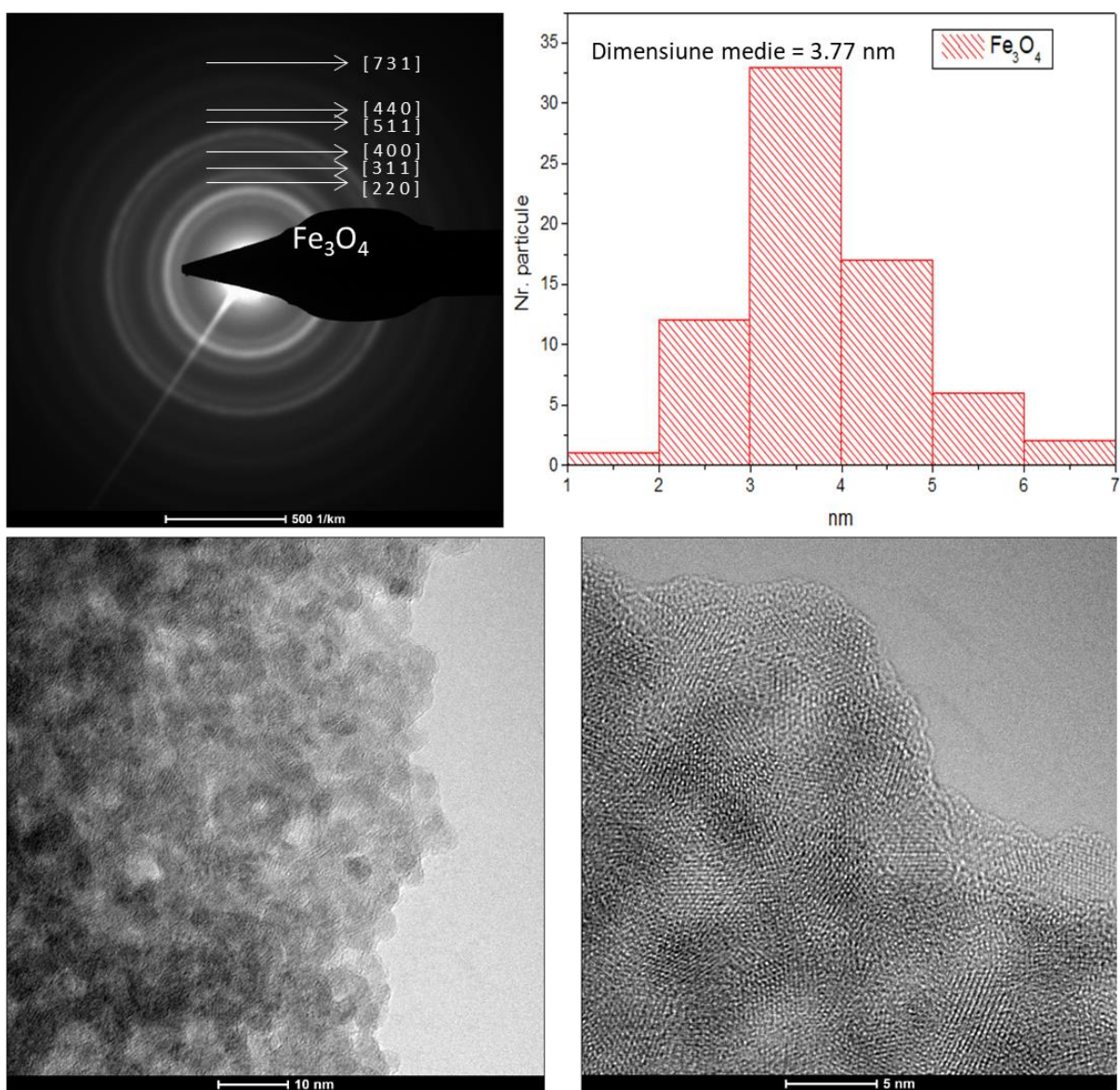


Figura 13. Imagine TEM în câmp luminos, de înaltă rezoluție, difracție de electroni pe arie selectată și distribuție după dimensiune obținute pe proba de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$



În Figura 13 sunt prezentate rezultatele obținute prin microscopia electronică prin transmisie. Din imaginea de microscopie electronică prin transmisie de ansamblu se poate observa tendința de aglomerare a nanoparticulelor. Morfologia este cvasi-sferică și poliedrală, cu dimensiunea medie de particulă de 3,77 nm și o distribuție monomodală, așa cum demonstrează histograma prezentată în figura 13. 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.

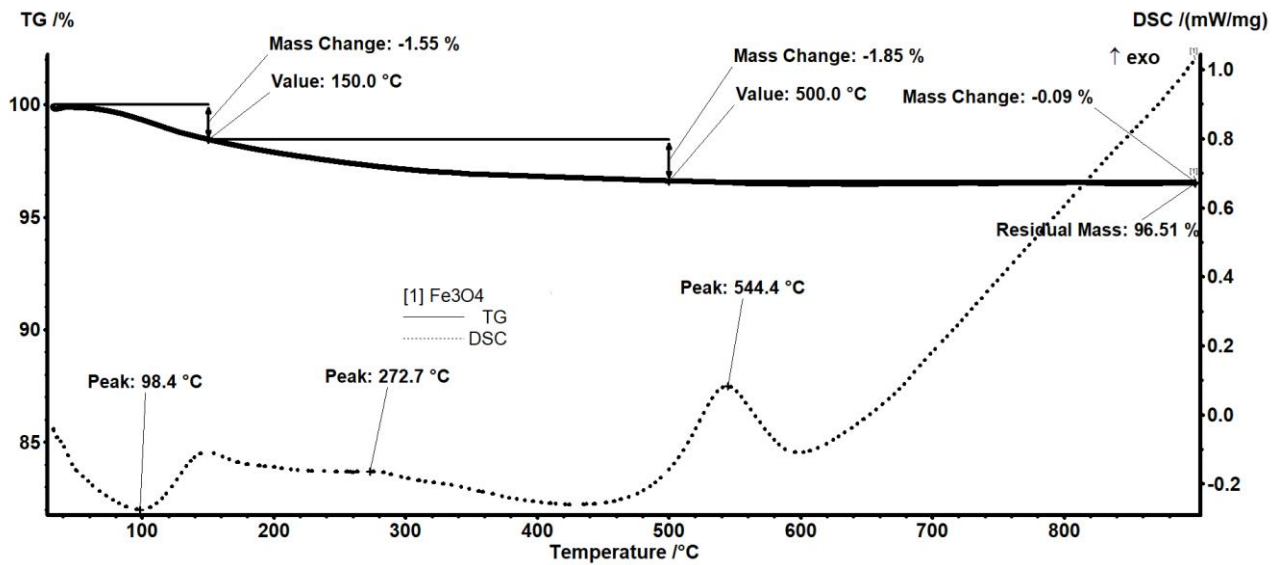


Figura 14. Analiza termică complexă efectuată pe pulberea de  $Fe_3O_4$  (TG/DSC)

Conform analizei termice efectuată pe pulberea de  $Fe_3O_4$  (TG/DSC) și prezentată în figura 14 se poate observa o pierdere de masă inițială de 1,55% datorată eliminării apei adsorbite pe suprafața particulelor, asociată unui efect endoterm în jurul temperaturii de 100 °C. La temperaturi < 400°C au loc eliminări de reziduuri și precursori nereacționați, cu o pierdere de masă totală de 1,85%. În intervalul de temperatură supus analizei se pot observa și cele 2 transformări de fază specifice  $Fe_3O_4$ , magnetită în maghemită (la 330 °C), respectiv maghemită în hematit (la 544 °C). După temperatura de aprox. 500 °C pierderea de masă este subunitară și se poate considera masa constantă.

## 7.2 Caracterizarea pulberii de $Fe_3O_4$ @acid tartric

În figura 15 sunt prezentate spectrele de difracție de raze X ale probelor de  $Fe_3O_4$  și  $Fe_3O_4$ @acid tartric. 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, este

semnificativ modificată (se remarcă o scădere), ca urmare a existenței compusului organic pe suprafața nanoparticulelor de magnetită. Prezența acidului tartric se identifică prin cele 2 interferențe de difracție caracteristice la  $2\theta$  de 31 și 46 (conform PDF4+[00-031-1911]).

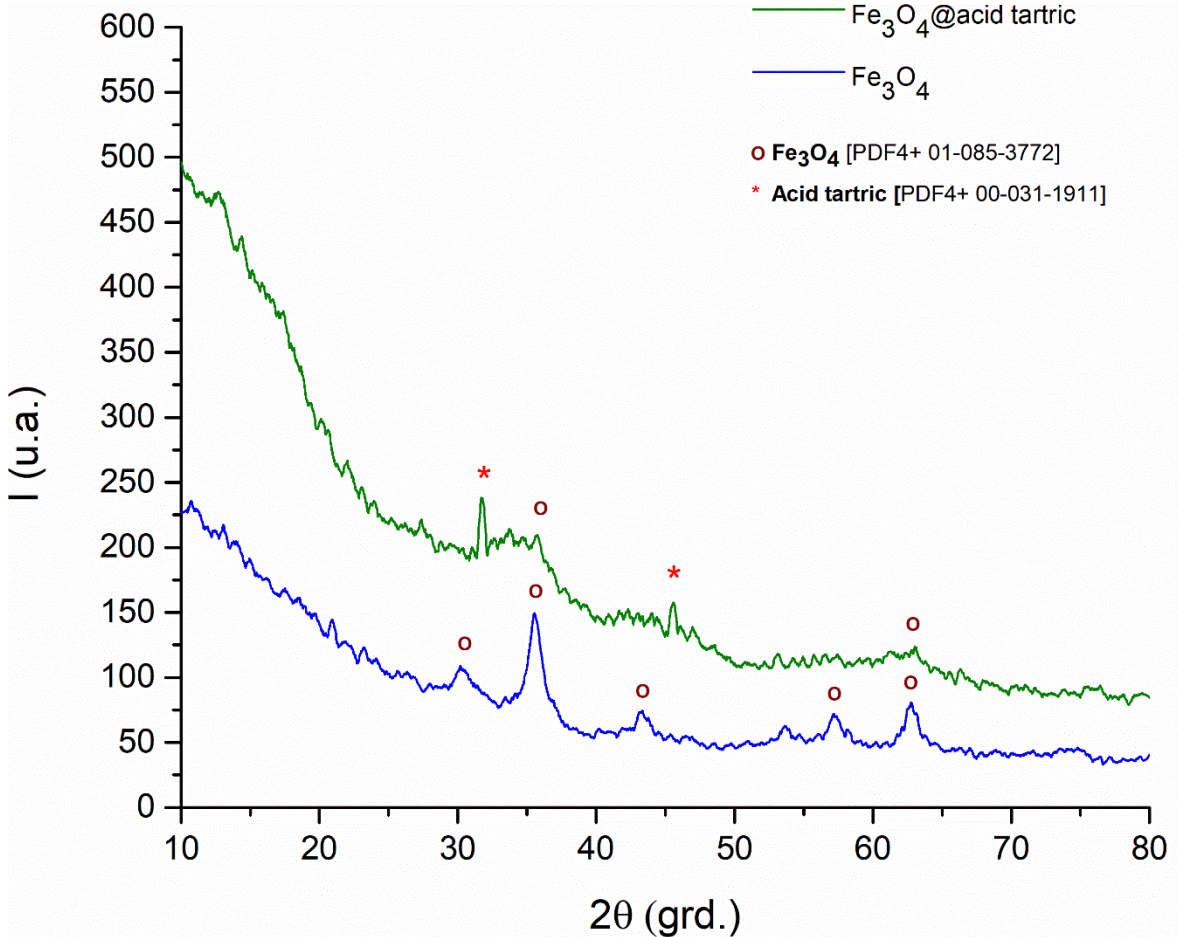


Figura 15. Diffractograma de raze X pentru pulberea de  $Fe_3O_4$ @acid tartric și evidențierea diferențelor față de  $Fe_3O_4$

Microscopia electronică de baleiaj, evidențiată în figura 16, pune în evidență dimensiunea nanometrică a magnetitei ce conține compusul organic, dispusă sub formă de aglomerări datorită necesității reducerii energiei libere a suprafeței particulelor, prin conglomerări ale acestora cu suprafață redusă. Ca și în cazul magnetitei pure, dat fiind spectrul dimensional aferent, sunt necesare investigații suplimentare cu ajutorul microscopiei electronice prin transmisie.

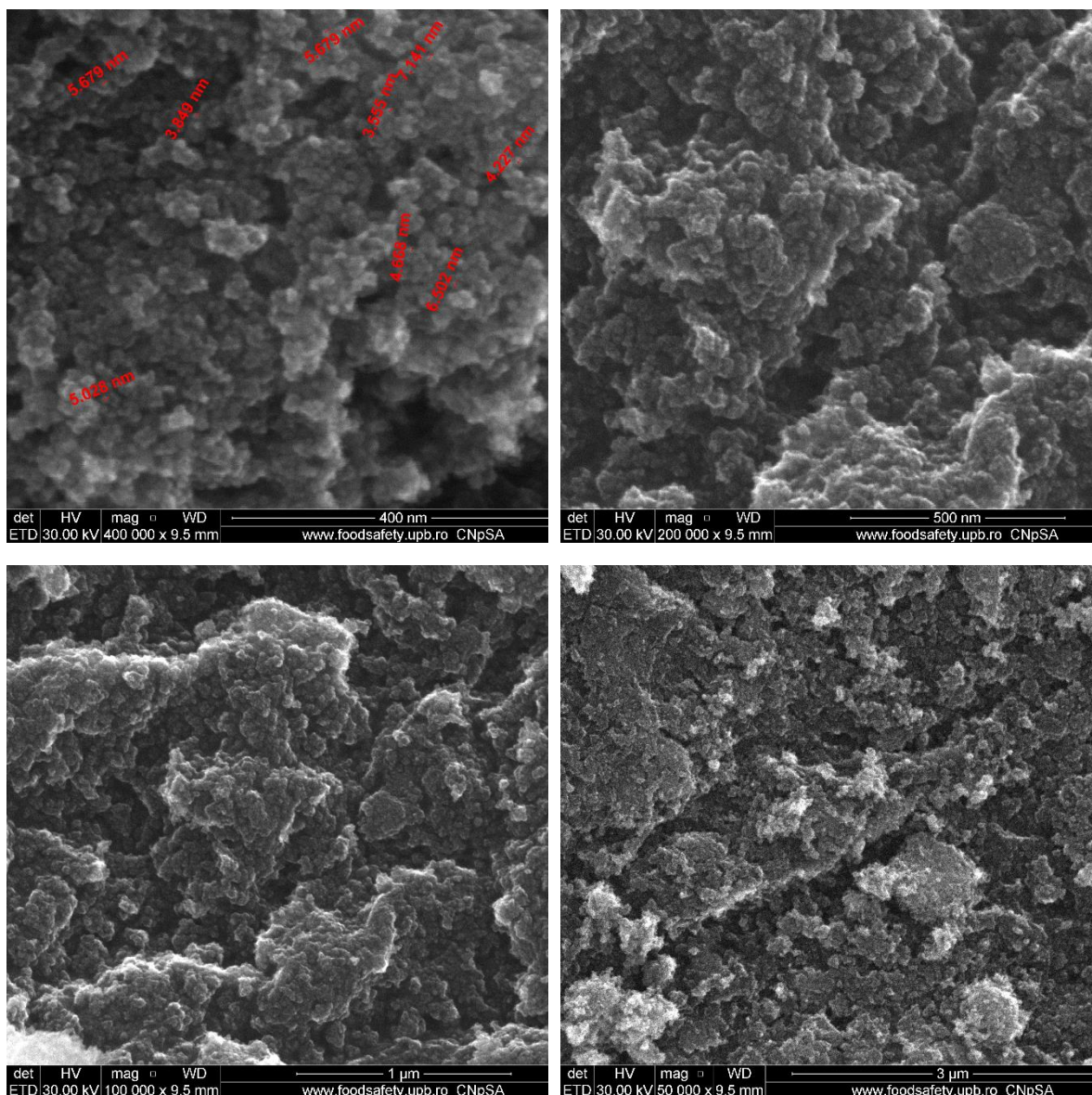


Figura 16. Micrograții SEM pentru pulberea de  $Fe_3O_4$ @acid tartric

În figura 17 sunt prezentate transformatele Fourier ale spectrelor de infraroșu pentru magnetită, compusul organic vizat și magnetita acoperită. Se poate observa că în spectrul celei din urmă sunt prezente atât benzile de absorbție de la  $582\text{ cm}^{-1}$  specifice legăturii  $Fe^{2+}-O^{2-}$  cât și absorbții în zona  $1000-1750\text{ cm}^{-1}$  corelate cu legăturile interatomice  $-OH$  din gruparea funcțională  $-COOH$ ,  $C=O$  respectiv  $C-O$ , specifice acidului tartric.

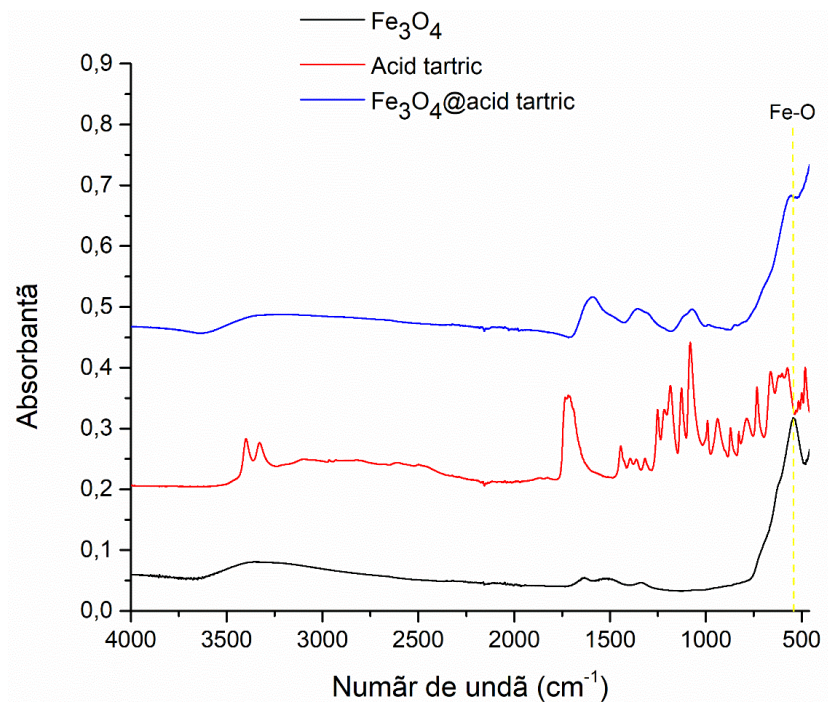


Figura 17. Spectrul FT-IR pentru proba de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@acid tartric

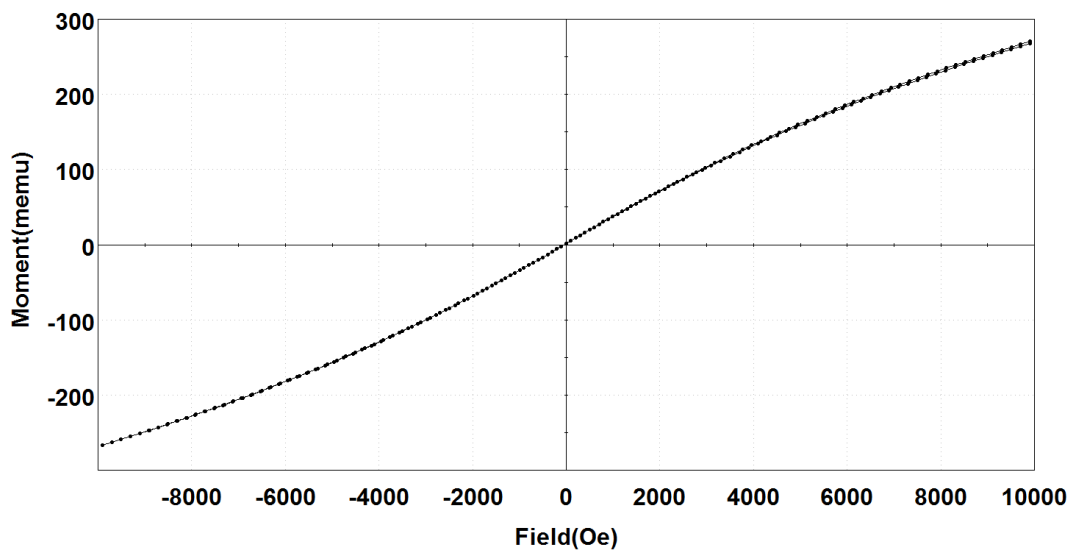


Figura 18. Variația magnetizării în funcție de câmpul magnetic aplicat pentru nanoparticulele de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@acid tartric la temperatura de 25°C

Variația magnetizării în funcție de câmpul magnetic aplicat pentru nanoparticulele de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@acid tartric la temperatura de 25°C este prezentată în Figura 18. Magnetita acoperită prezintă un caracter superparamagnetic, ce o recomandă pentru aplicații biomedicale. Proba analizată are o magnetizație de saturație de 26,3 emu/g, cu 55,4% mai mică decât în cazul

magnetitei simple. Această scădere este datorată prezenței materialului de acoperire, implicit a creșterii masei odată cu adăugarea unui al doilea component, lipsit de proprietăți magnetice. Această valoare depășește însă valoarea de 10 emu/g suficientă pentru ca nanoparticulele magnetice să poată fi utilizate ca sisteme cu eliberare controlată.

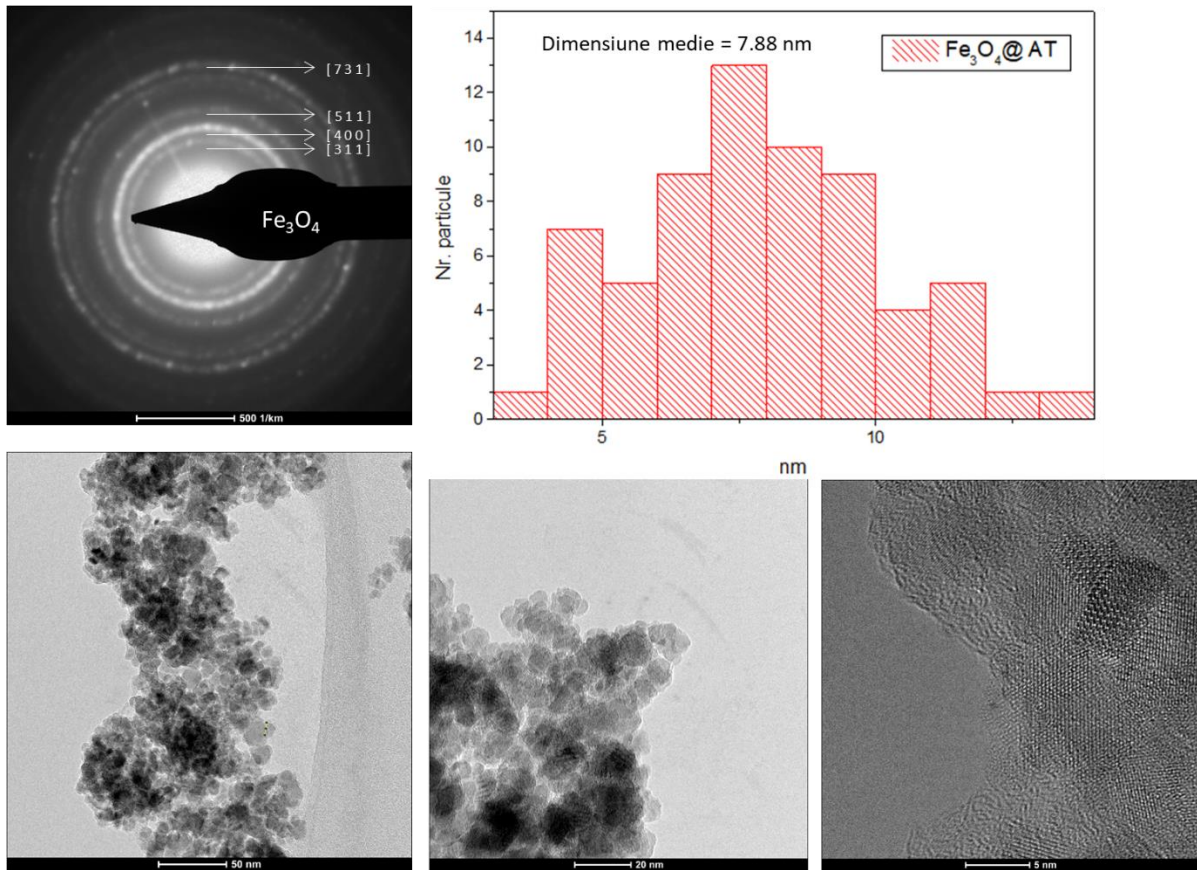


Figura 19 . *Imagine TEM în câmp luminos, difracție de electroni pe arie selectată și distribuție după dimensiune obținute pe proba de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Acid tartric*

Analizele de microscopie electronică prin transmisie prezente în figura 19, realizate pe magnetita acoperită cu acid tartric, pun în evidență reducerea aglomerărilor de magnetită împreună cu creșterea dimensiunii medii ale particulelor de magnetită. Aceste efecte se datorează acoperirii cu acid tartric a particulelor de magnetită care compensează energia liberă a suprafeței celor din urmă.

Din difracția de electroni pe arie selectată se observă inelele de difracție specifice magnetitei (compusul organic este ars în fasciculul de 300 kV, prezența acestuia neputând fi pusă în evidență prin această tehnică).

De altfel, se observă o lărgire a domeniului dimensional al particulelor de magnetită, dimensiunile particulelor variind între 3-15 nm, față de magnetita neacoperită care a relevat

prin observație o limită dimensională superioară de 7 nm. Acest fapt se poate explica prin prezenta în mediul sintezei a acidului tartric, care pe de o parte, modifică subtil pH-ul reacției de formare a  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  și pe de alta, modifică tensiunea superficială a soluției ce conduce la o morfologie și dimensionalitate particulară variată.

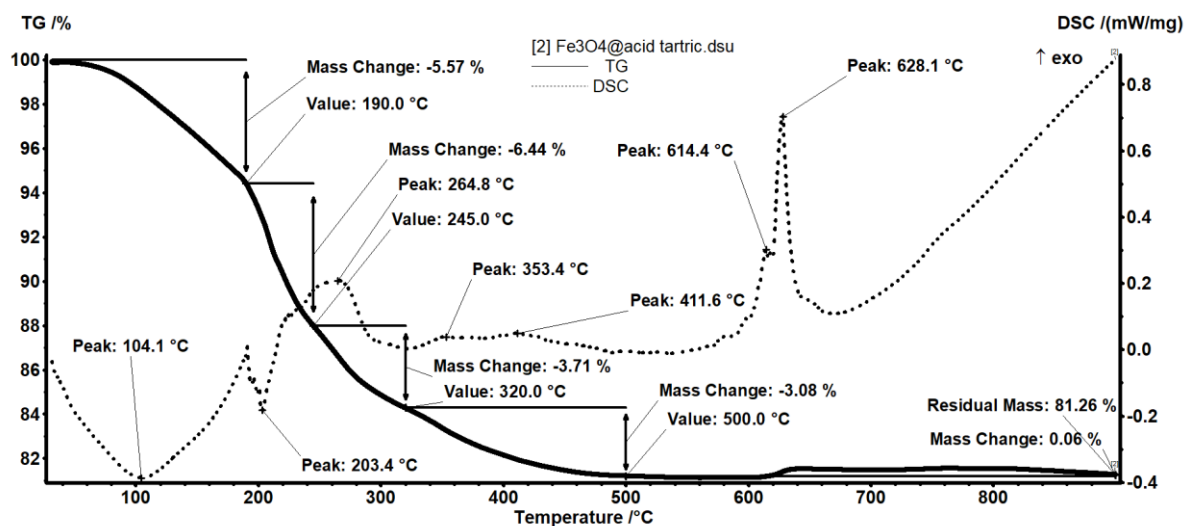


Figura 20. Analiza termică complexă (TG/DSC) obținută pe proba de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @Acid tartric

În intervalul 30-190°C are loc prima pierdere de masă (5,57%), însoțită de un efect endoterm cu minimul la 104,1°C (figura 20). Pierderea de masă este cauzată de eliminarea apei din probă și eventual, a unor grupări -OH de pe suprafața nanoparticulelor. Întrucât magnetita are pe suprafața sa un strat de acid tartric este posibil să rețină mai multă apă comparativ cu proba de magnetită simplă. Pierderea unei cantități mai mari de apă duce și la modificarea temperaturii la care apare peakul endoterm. În intervalul 190-245°C se înregistrează o pierdere de masă de 6,44%, însoțită de un efect endoterm cu minimul la 203,4°C. Astfel pierderea de masă înregistrată este o descompunere, cel mai probabil a acidului tartric (în funcție de forma acidului tartric punctul de topire este situat între 140-206°C). Pierderea de masă este continuă în intervalul 245-320°C (3,71%) procesul fiind însoțit de un efect slab exoterm cu maximul la 264,8°C.

Degradarea oxidativă a rezidului organic continuă în intervalul 320-500°C, cu o pierdere de masă de 3,08% și efecte slabe exoterme la 353 și 411°C. Se observă apoi o mică creștere de masă între 620-640°C. În urma degradării substanței organice se produce și un reziduu carbonic, care reduce parțial fierul de la suprafața nanoparticulelor. Apoi, după îndepărtarea carbonului, fierul este oxidat la loc la  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  și asta duce la creșterea de masă observată. Pe lângă acest proces exoterm se mai înregistrează și transformarea de fază a

maghemitei în hematit. Cele două efecte sunt parțial suprapuse cu maxime la 614 și 628°C. Masa reziduală este 81,26%, de culoare negru-marونی. Din calcule încărcarea magnetitei cu acid tartric este 15,81%.

### 7.3 Caracterizarea biologică a materialelor obținute

Pentru analiza viabilității și a capacității proliferative a celulelor, s-a utilizat metoda MTT (prin folosirea unei truse rapide: Vybrant MTT cell Proliferation Assay kit, Molecular Probe).

În figura 21 sunt prezentate grafic valorile absorbantei măsurată la lungimea de undă specifică culorii albastru (de 570 nm), pentru fiecare probă supusă analizei. Se determină astfel conținutul de formazan (ca rezultat al clivării reactivului MTT (sării de tetrazoliu) de către oxidoreductazele mitocondriale din amestec), iar pe baza lui se poate cuantifica proliferarea celulară. Comparând sistemele sintetizate cu proba de control (celule stem mezenchimale netratate), nu se observă efecte semnificative ale acestora asupra metabolismului și viabilității celulare, excepție făcând proba cu un conținut în agent antitumoral ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@AT+\text{Irinotecan}$ ). În acest caz se constată o reducere mai slabă a reactivului MTT, datorată unui număr mai mic de celule viabile după contactul cu materialul sintetizat. Asta denotă un ușor caracter citotoxic, datorat cel mai probabil irinotecanului, al cărui scop în fond este de a distruge celulele (canceroase dar implicit și pe cele viabile într-o oarecare măsură).

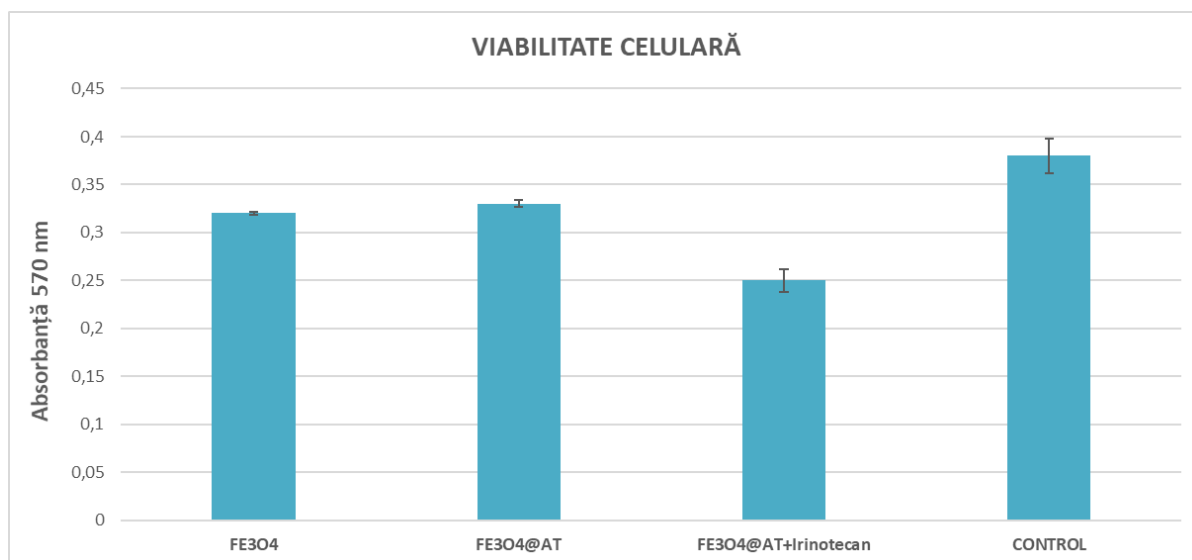


Figura 21. Evidențierea proliferării celulelor stem mezenchimale prin metoda MTT

Un alt test utilizat cu scopul de a evalua efectul nanosistemelor sintetizate asupra celulelor diploide umane în cultură a fost cel pentru stabilirea impactului acestora asupra stresului oxidativ.

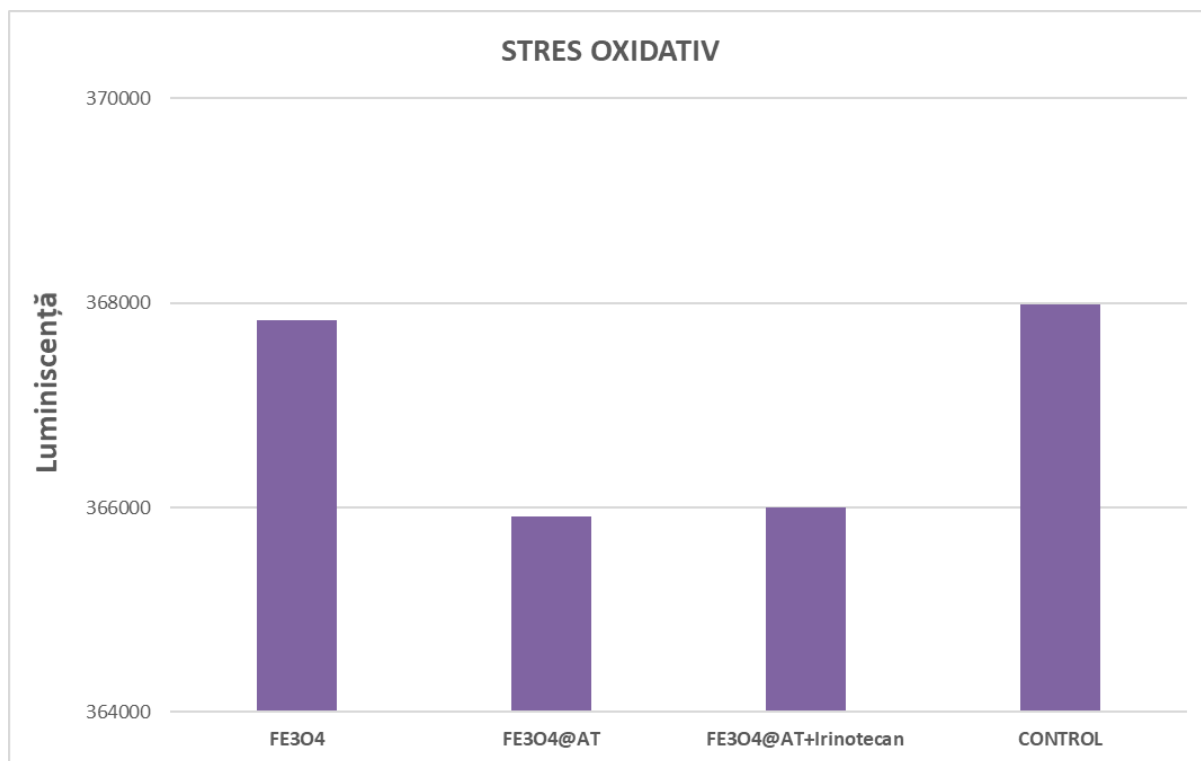
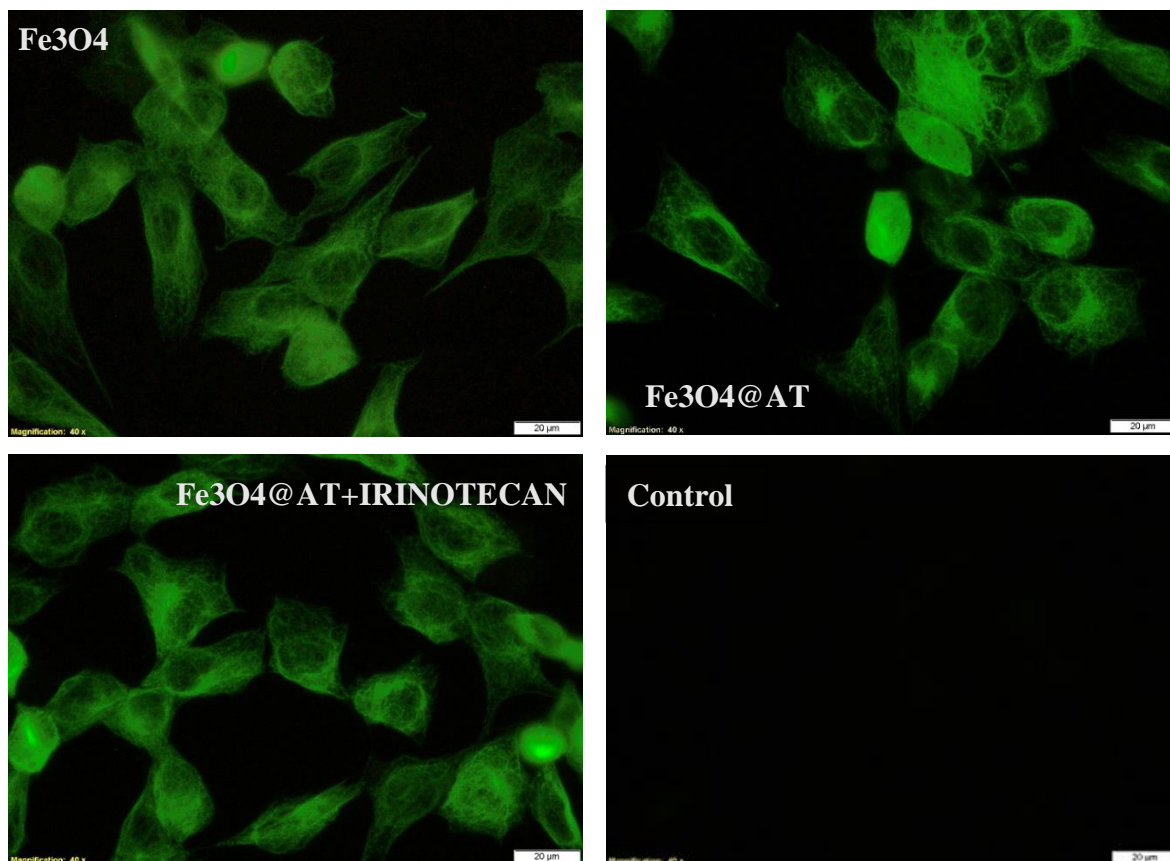


Figura 22. Evidențierea capacității materialelor obținute de a induce un stres oxidativ

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  $Fe_3O_4$  este singura care nu induce un stres oxidativ semnificativ, celelalte 2 având valori ale luminiscentei diferite de proba control, ca urmare a prezenței agentului antitumoral în nanosistem dar și a acidului tartric.

Microscopia de fluorescență (figura 23) arată că celulele AFSC sunt predominant viabile, probele obținute au un slab efect citotoxic, confirmând astfel rezultatele biochimice. Nu sunt observate celule moarte sau fragmente de celule, AFSC au o morfologie normală, cu aspect caracteristic. AFSC prezintă extensii specifice unui fenotip activ, posibile datorită activității citoscheletului, și sunt în general reprezentate de filamente de actină și microtubuli.





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

## 8. Concluzii

Proiectul a urmărit **îmbunătățirea strategiilor medicale care vizează terapia cancerului, prin internalizarea celulară indusă a unui nou sistem nanostructurat de eliberare țintită cu produs de cataboliză ca agent de acoperire și compus antitumoral hidrofил.** În vederea realizării acestui țel și a minimizării efectelor adverse negative ale tratamentelor actuale, s-a urmărit atingerea a 5 obiective specifice (OS), după cum urmează:

**OS1** - Obținerea de nanostructuri tip  $\text{Fe}_3\text{O}_4$

**OS2** – Obținerea de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  acoperită cu nanostructuri multifuncționale – acid tartaric ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@AT$ )

**OS3** – Sinteza de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@AT$  – Irinotecan (Citostatic hidrofил) utilizat ca sistem de eliberare în terapia cancerului

**OS4** – Caracterizarea morfologică și structurală a materialelor obținute, evaluarea proprietăților magnetice

**OS5** – Evaluarea biologică a materialelor obținute

Nanoparticulele de magnetită obținute prin metoda coprecipitării plecând de la precursori anorganici de  $\text{Fe}^{3+}$  și  $\text{Fe}^{2+}$ , au fost caracterizate printr-o serie de tehnici, reieșind astfel caracterul nanostructurat și proprietățile magnetice ale acestora. Pentru crearea de structuri core-shell cu miez magnetic s-a ales ca și compus multifuncțional acidul tartric, cu rol în protecția componentului magnetic până la eliberarea țintită a agentului antitumoral, iar gradul de încărcare a magnetitei cu acid tartric s-a dovedit a fi de 15,81%.

De altfel, odată cu adăugarea acidului tartric se observă o lărgire a domeniului dimensional al particulelor de magnetită, dimensiunile particulelor variind între 3-15 nm, față de magnetita neacoperită, care a relevat prin observație o limită dimensională superioară de 7 nm. Acest fapt se poate explica prin prezenta în mediul sintezei a acidului tartric, care pe de o parte, modifică subtil pH-ul reacției de formare a  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  și pe de altă parte, modifică tensiunea superficială a soluției ce conduce la o morfologie și dimensionalitate particulară variată.

În vederea obținerii unor sisteme eficiente pentru terapia cancerului, a fost necesară o acoperire suplimentară a structurilor miez-înveliș cu un citostatic, mai exact unul cu un caracter hidrofil (Irinotecan). Există numeroși agenți antitumorali hidrofilii care se pot utiliza în tratamentul cancerului. Eliberarea lor dintr-un sistem cu miez magnetic poate fi activată cu ușurință în prezența unui câmp electromagnetic ce funcționează în domeniul 100-300kHz. Selecția citostaticului hidrofil a fost corelată cu natura învelișului organic și cu specificitățile structurale ale nanostructurii multifuncționale astfel încât să fie asigurată o eliberare controlată optimă a citostaticului la locul tumorii.

Din punct de vedere al activității biologice, comparând sistemele sintetizate cu proba de control (celule stem mezenchimale netratate), nu se observă efecte semnificative ale acestora asupra metabolismului și viabilității celulare, dovedind un efect citotoxic redus și o disponibilitate pentru utilizarea ca strategii medicale care vizează terapia cancerului.

## 9. Referințe bibliografice

- [1] R. L. Siegel, K. D. Miller, and A. Jemal, “Cancer statistics, 2016,” *CA. Cancer J. Clin.*, vol. 66, no. 1, pp. 7–30, Jan. 2016.
- [2] M. Daher, “Cultural beliefs and values in cancer patients.,” *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.*, vol. 23 Suppl 3, no. suppl 3, pp. 66–9, Apr. 2012.
- [3] G. Wu, G. Wilson, J. George, C. Liddle, and L. Hebbard, “Overcoming treatment resistance in cancer: Current understanding and tactics,” *Cancer Lett.*, vol. 387, pp. 69–76, 2017.
- [4] K. Cheung-Ong, G. Giaever, and C. Nislow, “DNA-Damaging Agents in Cancer Chemotherapy: Serendipity and Chemical Biology,” *Chem. Biol.*, vol. 20, no. 5, pp. 648–659, 2013.
- [5] C. Carrère, “Optimization of an in vitro chemotherapy to avoid resistant tumours,” *J. Theor. Biol.*, vol. 413, pp. 24–33, 2017.
- [6] R. A. Schwendener, W. Fuchs, and G. von, “Liposomes and Immuno- liposomes as Carriers for Cytostatic Drugs, Magnetic Resonance Contrast Agents, and Fluorescent Chelates,” *Chimia (Aarau).*, vol. 46, no. 46, 1992.
- [7] D. Ficai, A. Ficai, E. Dinu, O. Oprea, M. Sonmez, M. K. Keler, Y. M. Sahin, N. Ekren, A. T. Inan, S. Daglilar, and O. Gunduz, “Magnetic core shell structures: From 0D to 1D assembling,” *Curr. Pharm. Des.*, vol. 21, no. 37, 2015.
- [8] D. Ficai, O. Oprea, A. Ficai, and A. M. Holban, “Metal oxide nanoparticles: Potential uses in biomedical applications,” *Curr. Proteomics*, vol. 11, no. 2, 2014.
- [9] D. Ficai, A. Ficai, B. S. Vasile, M. Ficai, O. Oprea, C. Guran, and E. Andronescu, “Synthesis of rod-like magnetite by using low magnetic field,” *Dig. J. Nanomater. Biostructures*, vol. 6, no. 3, 2011.
- [10] G. Dan Mogoșanu, A. Mihai Grumezescu, L. Everard Bejenaru, and C. Bejenaru, “Chapter 8 – Natural and synthetic polymers for drug delivery and targeting,” in *Nanobiomaterials in Drug Delivery*, 2016, pp. 229–284.
- [11] T. Tanaka, S. Shiramoto, M. Miyashita, Y. Fujishima, and Y. Kaneo, “Tumor targeting based on the effect of enhanced permeability and retention (EPR) and the mechanism of receptor-mediated endocytosis (RME),” *Int. J. Pharm.*, vol. 277, no. 1, pp. 39–61, 2004.
- [12] G. Unsoy, U. Gunduz, O. Oprea, D. Ficai, M. Sonmez, M. Radulescu, M. Alexie, and A. Ficai, “Magnetite: From synthesis to applications,” *Curr. Top. Med. Chem.*, vol. 15,

- no. 16, pp. 1622–1640, 2015.
- [13] M. Sonmez, M. Georgescu, L. Alexandrescu, D. Gurau, A. Ficai, D. Ficai, and E. Andronesu, “Synthesis and applications of  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$  core-shell materials,” *Curr. Pharm. Des.*, vol. 21, no. 37, 2015.
- [14] M. Anbarasu, M. Anandan, E. Chinnasamy, V. Gopinath, and K. Balamurugan, “Synthesis and characterization of polyethylene glycol (PEG) coated  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanoparticles by chemical co-precipitation method for biomedical applications,” *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 135, pp. 536–539, 2015.
- [15] M. F. Tai, C. W. Lai, and S. B. Abdul Hamid, “Facile Synthesis Polyethylene Glycol Coated Magnetite Nanoparticles for High Colloidal Stability,” *J. Nanomater.*, vol. 2016, pp. 1–7, 2016.
- [16] P. Kopel, D. Wawrzak, V. Milosavljevic, A. Moulick, M. Vaculovicova, R. Kizek, and V. Adam, *Nanotransporters for Anticancer Drug Delivery*, vol. 14, 2015.
- [17] M. Arruebo, R. Fernández-Pacheco, M. R. Ibarra, and J. Santamaría, “Magnetic nanoparticles for drug delivery,” *Nano Today*, vol. 2, no. 3, pp. 22–32, Jun. 2007.
- [18] 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.
- [19] A. K. Gupta and M. Gupta, “Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications,” *Biomaterials*, vol. 26, no. 18, pp. 3995–4021, Jun. 2005.
- [20] C. Boxall, G. Kelsall, Z. Zhang, M. D. Vásquez, P. Sánchez-Batanero, and A. Sclafani, “Photoelectrophoresis of colloidal iron oxides. Part 2. Magnetite ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ),” *J. Chem. Soc., Faraday Trans.*, vol. 92, no. 5, pp. 791–802, Jan. 1996.
- [21] D. K. Kim, Y. Zhang, W. Voit, K. V. Rao, J. Kehr, B. Bjelke, and M. Muhammed, “Superparamagnetic iron oxide nanoparticles for bio-medical applications,” *Scr. Mater.*, vol. 44, no. 8–9, pp. 1713–1717, 2001.
- [22] A. Wilczewska, K. Niemirowicz, K. Markiewicz, and H. Car, “Nanoparticles as drug delivery systems,” *Pharmacol. Reports*, vol. 64, no. 5, p. 1864–1882., 2012.
- [23] S. Panseri, C. Cunha, T. D’Alessandro, M. Sandri, G. Giavaresi, M. Marcacci, C. T. Hung, and A. Tampieri, “Intrinsically superparamagnetic Fe-hydroxyapatite nanoparticles positively influence osteoblast-like cell behaviour,” *J. Nanobiotechnology*, vol. 10, p. 32, Jul. 2012.

- [24] J. D. G. Durán, J. L. Arias, V. Gallardo, and A. V. Delgado, "Magnetic Colloids As Drug Vehicles," *J. Pharm. Sci.*, vol. 97, no. 8, pp. 2948–2983, Aug. 2008.
- [25] H. Markides, O. Kehoe, R. H. Morris, and A. J. El Haj, "Whole body tracking of superparamagnetic iron oxide nanoparticle-labelled cells--a rheumatoid arthritis mouse model.," *Stem Cell Res. Ther.*, vol. 4, no. 5, p. 126, Oct. 2013.
- [26] Shao-Wen Cao, \* Ying-Jie Zhu, Ming-Yan Ma, and Liang Li, and L. Zhang, "Hierarchically Nanostructured Magnetic Hollow Spheres of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> and  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>: Preparation and Potential Application in Drug Delivery," 2008.
- [27] S. Laurent, D. Forge, M. Port, A. Roch, C. Robic, L. Vander Elst, and R. N. Muller, "Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Vectorization, Physicochemical Characterizations, and Biological Applications," *Chem. Rev.*, vol. 108, no. 6, pp. 2064–2110, Jun. 2008.
- [28] Wahajuddin and S. Arora, "Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: magnetic nanoplatforms as drug carriers," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 7, p. 3445, Jul. 2012.
- [29] M. Talelli, C. J. F. Rijcken, T. Lammers, P. R. Seevinck, G. Storm, C. F. van Nostrum, and W. E. Hennink, "Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles Encapsulated in Biodegradable Thermosensitive Polymeric Micelles: Toward a Targeted Nanomedicine Suitable for Image-Guided Drug Delivery," *Langmuir*, vol. 25, no. 4, pp. 2060–2067, Feb. 2009.
- [30] G. Hasenpusch, J. Geiger, K. Wagner, O. Mykhaylyk, F. Wiekhorst, L. Trahms, A. Heidsieck, B. Gleich, C. Bergemann, M. K. Aneja, and C. Rudolph, "Magnetized Aerosols Comprising Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles Improve Targeted Drug and Gene Delivery to the Lung," *Pharm. Res.*, vol. 29, no. 5, pp. 1308–1318, May 2012.
- [31] X.-M. Zhu, J. Yuan, K. C.-F. Leung, S.-F. Lee, K. W. Y. Sham, C. H. K. Cheng, D. W. T. Au, G.-J. Teng, A. T. Ahuja, and Y.-X. J. Wang, "Hollow superparamagnetic iron oxide nanoshells as a hydrophobic anticancer drug carrier: intracellular pH-dependent drug release and enhanced cytotoxicity," *Nanoscale*, vol. 4, no. 18, p. 5744, 2012.
- [32] S. Kim, J.-H. Kim, O. Jeon, I. C. Kwon, and K. Park, "Engineered polymers for advanced drug delivery.," *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 71, no. 3, pp. 420–30, Mar. 2009.
- [33] T. Neuberger, B. Schöpf, H. Hofmann, M. Hofmann, and B. von Rechenberg, "Superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications: Possibilities and limitations of a new drug delivery system," *J. Magn. Magn. Mater.*, vol. 293, no. 1, pp.

- 483–496, May 2005.
- [34] Q. A. Pankhurst, J. Connolly, S. K. Jones, and J. Dobson, “Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine,” *J. Phys. D. Appl. Phys.*, vol. 36, no. 13, pp. R167–R181, Jul. 2003.
- [35] K. Kaaki, K. Hervé-Aubert, M. Chipera, A. Shkilnyy, M. Souc?, R. Benoit, A. Paillard, P. Dubois, M.-L. Saboungi, and I. Chourpa, “Magnetic Nanocarriers of Doxorubicin Coated with Poly(ethylene glycol) and Folic Acid: Relation between Coating Structure, Surface Properties, Colloidal Stability, and Cancer Cell Targeting,” *Langmuir*, vol. 28, no. 2, pp. 1496–1505, Jan. 2012.
- [36] S. Arpicco, L. Battaglia, P. Brusa, R. Cavalli, D. Chirio, F. Dosio, M. Gallarate, P. Milla, E. Peira, F. Rocco, S. Sapino, B. Stella, E. Ugazio, and M. Ceruti, “Recent studies on the delivery of hydrophilic drugs in nanoparticulate systems,” *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, vol. 32, pp. 298–312, Apr. 2016.
- [37] 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.
- [38] “irinotecan hydrochloride - Căutare Google.” [Online]. Available: [https://www.google.ro/search?safe=active&biw=1440&bih=769&tbm=isch&sa=1&ei=S1IzW\\_qCBIf2kwWvuIuQAQ&q=irinotecan+hydrochloride&oq=irinotecan+hydrochloride&gs\\_l=img..3..0i19k1j0i30i19k1.21418.21418.0.21666.1.1.0.0.0.133.133.0j1.1.0....0...1c.1.64.img..0.1.1](https://www.google.ro/search?safe=active&biw=1440&bih=769&tbm=isch&sa=1&ei=S1IzW_qCBIf2kwWvuIuQAQ&q=irinotecan+hydrochloride&oq=irinotecan+hydrochloride&gs_l=img..3..0i19k1j0i30i19k1.21418.21418.0.21666.1.1.0.0.0.133.133.0j1.1.0....0...1c.1.64.img..0.1.1). [Accessed: 27-Jun-2018].
- [39] K. Fujita, Y. Kubota, H. Ishida, and Y. Sasaki, “Irinotecan, a key chemotherapeutic drug for metastatic colorectal cancer,” *World J. Gastroenterol.*, vol. 21, no. 43, pp. 12234–48, Nov. 2015.
- [40] Y. Yao, P. Zhang, J. Wang, J. Chen, Y. Wang, Y. Huang, Z. Zhang, and F. Xu, “Dissecting Target Toxic Tissue and Tissue Specific Responses of Irinotecan in Rats Using Metabolomics Approach,” *Front. Pharmacol.*, vol. 8, p. 122, 2017.
- [41] “Doxorubicin hydrochloride | C<sub>27</sub>H<sub>30</sub>ClNO<sub>11</sub> - PubChem.” [Online]. Available: [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Doxorubicin\\_Hydrochloride#section=Top](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Doxorubicin_Hydrochloride#section=Top). [Accessed: 27-Jun-2018].