

Academia Oamenilor de Știință din România

RAPORT DE ACTIVITATE

FINAL

Materiale carbonice în medicină: riscuri și oportunități

Tema de cercetare Nr. 6/2018

Director proiect

Prof. univ. dr. Ecaterina ANDRONESCU

Cercetător

Doctorand Alexa-Maria Croitoru

Universitatea Politehnica din București

Noiembrie 2018

MATERIALE CARBONICE IN MEDICINĂ: RISCURI SI OPORTUNITĂȚI

Introducere

Carbonul este un element cu adevărat remarcabil ce poate exista în diferite forme alotropice. Se găsește abundent în natură sub formă de carbune sau grafit natural și mai puțin sub formă de diamant. Diamantul este alcătuit dintr-o rețea cubică, iar grafitul are un tip special de rețea atomică numită rețea stratificată formată din straturi paralele de hexagoane, fiind un foarte bun conductor de căldură și curent electric. Posedă o anizotropie extremă în energiile de legătură ale laturii sale cristaline, ducând la proprietăți fizice anizotrope [1].

Materialele carbonice cuprind mai multe specii alotropice de carbon, nanotuburile de carbon și grafenoxidul fiind cele mai studiate și utilizate. De la descoperirea lor, au devenit foarte atractive pentru cercetători, datorită proprietăților fizico-chimice, mecanice și electrice precum stabilitatea termică și chimică, conductivitate electrică și dimensiunile lor nanometrice având astfel aplicații în domeniul biomedical și biologic [2-5].

Nanomaterialele anorganice au înregistrat progrese semnificative în domeniul medical, incluzând tratarea cancerului, eliberarea controlată, aplicații ortopedice, regenerarea țesuturilor. Ele au fost folosite pentru a îmbunătăți integrarea celulelor stem în terapia celulară, stabilitatea mecanică materială în repararea țesuturilor, conductivitatea electrică în regenerarea nervoasă și cardiacă și capacitatea antibacteriană în pansamentele pentru răni. Aceste nanomateriale au fost de asemenea, utilizate pentru a îmbunătăți sau a înlocui materialele chirurgicale comune și pentru a restabili funcționalitatea țesuturilor deteriorate [6].

În ultimii 25 de ani diferite materiale carbonice au fost studiate pentru diferite aplicații în domeniul biomedical. Gama largă de aplicații ale materialelor de carbon în medicină este, de asemenea, rezultatul multor cercetări privind metodele de preparare. De exemplu implanturile de carbon pot fi produse prin piroliza precursorilor solizi, lichizi și gazoși. Metoda de piroliză aplicată compușilor de carbon permite producerea de carbon cu structură și microstructură diferită sub formă de filme subțiri sau straturi groase, carbon pirolitic solid, pulberi sau sub formă de fibre. Diferitele forme de carbon care au atras atenția sunt grafitul artificial, fibrele de carbon și carbonul pirolitic. Fibrele de carbon sunt obținute în principal prin procesul de carbonizare a fibrelor organice la temperaturi medii. Cu toate acestea, aranjamentul atomului de carbon este similar celui din grafit. Proprietățile fizice și chimice ale fibrelor de carbon sunt de asemenea determinate de

microstructura lor. Acest lucru este important pentru aplicații ale fibrelor de carbon în medicină. Una dintre cele mai recente utilizări medicale ale fibrelor de carbon a fost înlocuirea sau repararea ligamentelor și a tendoanelor [7].

Nanotuburi de carbon (CNT)

Așa cum am specificat mai sus, nanotuburile de carbon (CNT) reprezintă unul dintre cele mai studiate tipuri alotropice de carbon. Sunt formate din grafit și construite sub forma de tuburi cilindrice având diametrul de ordinul nanometrilor și lungimea de cativa microni, până la ordinul milimetrilor [7, 8].

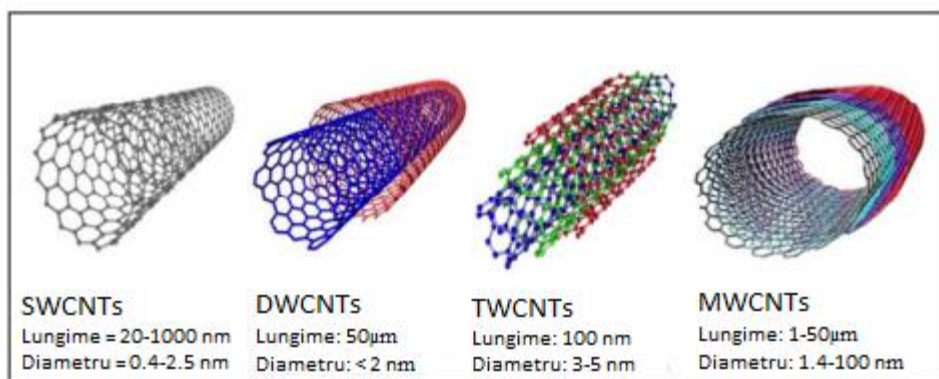


Figura 1. Tipuri de nanotuburi de carbon: cu un singur perete (SWCNTs), cu perete dublu (DWCNTs), cu perete triplu (TWCNTs), cu perete multiplu (MWCNTs) [9]

Ele au demonstrat un mare potențial în diverse aplicații biomedicale precum imagistică la nivel molecular, tratamentul cancerului, regenerarea țesuturilor, diagnosticarea, ingineria genetică, biosenzori și electrozi bazați pe nanotuburi de carbon, eliberarea controlată a diferitelor substanțe, terapia fototermică și radiație. În aplicațiile medicale nanotuburile de carbon au capacitatea de a penetra diferitele țesuturi ale corpului și de a transporta doze mari de agenți, furnizând efecte terapeutice. O altă direcție de a folosi nanotuburile de carbon în medicină și biologie este de a vizualiza obiecte la nivel molecular, celular și al țesutului. Asociate cu nanotuburile de carbon, substanțele de contrast îmbunătățesc vizualizarea celulelor și țesutului și astfel pot fi detectate noi modele de dezvoltare a procesului patologic. Înainte de introducerea nanotuburilor de carbon în practică medicală este necesar să se cunoască toate consecințele posibile în ceea ce privește utilizarea lor deoarece toxicitatea lor reprezintă o mare problemă în utilizarea în aplicații biomedicale. Dezvoltarea de noi nanostructuri bazate pe nanotuburi de carbon

în viitorul apropiat vor conduce la noi progrese legate de aplicarea și dezvoltarea unor noi parametri care vor determina proprietățile și efectele lor [10].

Datorită structurii lor nanometrice și a proprietăților remarcabile, nanotuburile de carbon sunt studiate pentru aplicații promițătoare. S-au înregistrat progrese semnificative pentru a depăși unele dintre obstacolele majore în ceea ce privește aplicațiile biomedicale ale nanomaterialelor, în special în problemele legate de solubilitatea în apă / dispersia și siguranța nanotuburilor de carbon. Un mare dezavantaj îl reprezintă insolubilitatea lor în mulți solvenți, în special în apă, ele fiind incompatibile cu sistemele biologice. Toxicitatea lor reprezintă de asemenea un mare dezavantaj tot datorită insolubilității în apă dar și a impurităților metalice. Astfel funcționalizarea nanotuburilor de carbon este necesară pentru a deveni solubile și pentru a avea toxicitate minimă pentru aplicații biomedicale [8, 9, 11].

În urma rezolvării acestor probleme, nanotuburile de carbon au fost aplicate cu succes în domeniul medicinei și farmaciei datorită suprafeței lor mare care este capabilă să adsoarbă sau să conjuge cu o mare varietate de agenți terapeutici și de diagnostic (medicamente, gene, vaccinuri, antibiotice, biosenzori, etc.). Au proprietatea de eliberare controlată direct în celule. Multe studii au demonstrat că atunci când moleculele sunt legate de CNT, ele sunt livrate mai eficient și în siguranță în celule decât prin metode tradiționale [7, 12]. Pentru eliberarea controlată, substanța este fixată la suprafață sau în interiorul tuburilor de carbon funcționalizate. Produsul obținut este apoi introdus în organism prin metode clasice (oral, injectare) sau ghidat cu un magnet extern către organul țintă [7, 13, 14].

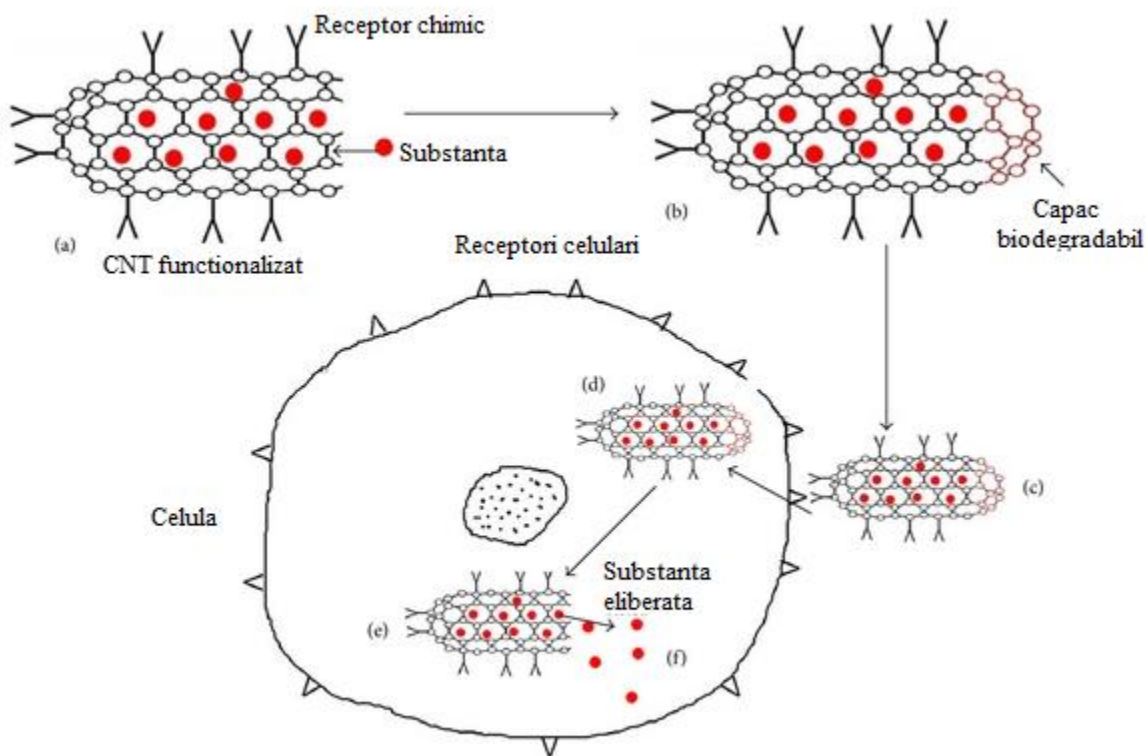


Figura 2. Ilustrare schematică a procesului de eliberare a substanței: a) suprafața CNT este legată de un receptor chimic și substanța este încărcată înăuntru, b) capătul deschis al CNT este închis, c) este apoi introdus în organism și ajunge la celula vizată/țintă datorită receptorului chimic de pe suprafață, d) celula internalizează CNT cu ajutorul receptorilor celulari prin endocitoză spre exemplu, e) capacul este îndepărtat sau se descompune în interiorul celulei, apoi substanța este eliberată [7].

În ciuda progresului în medicină, rezistența tumorilor maligne la tratamentul medical actual punctează nevoia de dezvoltare a unor noi abordări terapeutice. Tratamentul actual împotriva cancerului implica operație, chimioterapie și/sau radioterapie. Toate aceste medicamente chemoterapeutice au efecte secundare nedorite [15, 16]. În ultimul timp s-a pus accent pe folosirea medicamentelor naturale pentru tratarea cancerului. Astfel, dezvoltarea unui sistem de eliberare corespunzător, garantează eliberarea acestor biomolecule naturale în special în zonele tumorale. Pentru a îndeplini acest scop, nanotuburile de carbon au fost studiate pentru eliberarea moleculelor naturale anticanceroase prezentând siguranță și eficacitate terapeutică îmbunătățită [17]. Conform unor cercetări *in vitro*, celulele tratate cu nanoparticule de carbon sintetizate au demonstrat mai mult de 80% rata de supraviețuire, manifestând toxicitate minimă. De asemenea toxicitatea *in vivo* a nanoparticulelor de carbon a fost efectuată pe soareci. Diferite concentrații de nanoparticule de

carbon au fost administrate intravenos soarecilor. După 4 săptămâni nu s-au găsit semene de toxicitate și reacții adverse [18].

Proprietățile antioxidante ale nanotuburilor de carbon sintetizate prin grefarea cu acid galic, împotriva radicalilor 2,2'-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), hidroxil și peroxil au fost investigate. Materialele obținute au fost caracterizate prin spectroscopie în infraroșu cu transformata Fourier. Funcționalizarea covalentă a CNT cu acidul galic a fost confirmată și cantitatea de acid galic legat per g a fost 2.1 ± 0.2 mg. În final a fost evaluată și activitatea de inhibare a acetilcolinesterazei. Rezultatele au demonstrat activitatea antioxidantă a CNT funcționalizate care s-au dovedit a fi capabile de inhibarea acetilcolinesterazei având astfel aplicații în domeniul biomedical și farmaceutic [19].

După cercetări amanunțite s-a demonstrat citotoxicitatea și activitatea antioxidantă împotriva celulelor carcinoma *Ehrlich ascites* a unui nanocompozit obținut prin legarea nanotuburilor de carbon cu pereți multipli cu dodecenil succinic anhidru în prezența extractului de plantă *Beta vulgaris* și a nanoparticulelor de hidroxiapatită. Nanocompozitul obținut a fost analizat prin spectroscopie în infraroșu cu transformata Fourier (FTIR) și prin microscopie electronică prin transmisie (TEM). Astfel, materialul obținut are capacitatea de a fi folosit ca antioxidant și agent antitumoral în viitor, după studii mai amanunțite [20].

Un alt studiu demonstrează activitatea antimicrobiană utilizând nanotuburi de carbon cu un singur perete funcționalizate cu extractul de plantă *Hempedu bumi*, împotriva bacteriilor *Bacillus* sp., *Escherichia coli* și *Aspergillus niger*. S-au efectuat analize morfologice și structurale pentru a investiga nanocompozitul funcționalizat cu *H. bumi* utilizând microscopie electronică de scanare, microscopie de forță atomică, spectroscopie fotoelectronică cu raze X și spectroscopie în infraroșu cu transformata Fourier. A fost observată o zonă de inhibiție mai mare de 1 cm împotriva microbilor testați. Rezultatele indică potențial de utilizare a nanocompozitului obținut ca purtător de compuși din extractele plantelor [21].

Compușii polifenolici găsiți în plantele medicinale, legume, fructe și sucuri de fructe fac parte din categoria flavonoidelor. În particular, quercetina este considerată a avea un rol semnificativ în sănătatea umană, incluzând protecție cardiovasculară, activitate antitumorală, efecte antiulcer și proprietăți antialergice, antivirale și antiinflamatorii. Proprietățile ei antitumorale au fost verificate prin experimente *in vivo* și *in vitro*. Studiile arată că are efecte

benefice în inhibarea celulelor canceroase de sân, colon, prostată și plămâni. Deoarece nanotuburile de carbon pot fi folosite în aplicații medicale prin funcționalizare cu diferiți compuși naturali crescând astfel solubilitatea în soluțiile apoase, studii viitoare pot fi efectuate încorporând quercetina în nanotuburile de carbon [22].

Funcționalizarea nanotuburilor de carbon cu antioxidanți precum acid tanic și acid galic conduce la proprietăți antioxidante remarcabile confirmate prin analiza FTIR și măsurarea compușilor fenolici totali. Rezultatele obținute demonstrează că nanotuburile de carbon funcționalizate cu acid tanic au proprietăți antioxidante mai mari decât nanotuburile de carbon funcționalizate cu acid galic sau nefuncționalizate [23].

Aplicațiile nanomaterialelor în medicină sunt încă la început și întâmpină provocări. Deși s-a studiat intens toxicitatea *in vitro* și *in vivo* a materialelor carbonice, cunoștințele despre comportamentul lor *in vivo* și potențialele riscuri de sănătate sunt încă limitate datorită datelor insuficiente și discrepanței între rezultate. Majoritatea rezultatelor în ceea ce privește toxicitatea, sunt bazate pe experimente *in vitro*, de aceea este nevoie de atenție și precauție pentru a exploata aceste rezultate pe organismul uman. Recent s-au înregistrat progrese în biodistribuția, translocarea și eliminarea CNT după administrare sistemică, făcând primul pas spre aplicațiile medicale sigure ale nanotuburilor de carbon. Cercetările au demonstrat că toxicitatea și biocompatibilitatea CNT poate fi controlată prin modificări chimice și materiale [24].

Grafenoxidul (GO)

Materialele carbonice sunt considerate a fi mai prietenoase din punct de vedere biologic și al mediului înconjurător față de materialele anorganice, carbonul fiind unul dintre cele mai comune elemente din ecosistemul nostru. În particular, oxidul de grafenă, este considerat un material promițător pentru aplicații biomedicale datorită proprietăților sale fizice și chimice unice. Deși încă rămân probleme de rezolvat, aplicațiile biologice ale derivaților de grafen prezintă potențial semnificativ datorită multelor încercări cu rezultate promițătoare în ceea ce privește biofuncționalizarea și standardizarea derivaților de grafen, prin fracționare bazată pe mărime, număr de straturi și funcționalități chimice, dar și prin investigarea efectelor toxice pe termen lung [25, 26]. Grafenoxidul și derivații săi prezintă aplicații în diferite domenii rezumate în patru categorii principale, eliberare controlată și tratarea cancerului, biosenzori, bio-imagistică, și activitate antibacteriană [27-29]. Structura amfifilă și planară a grafenoxidului (conținând diferite grupări

funcționale: epoxi, hidroxil, carboxil, carbonil, etc.), îi conferă acestuia posibilitatea de a încorpora biomolecule hidrofile și/sau hidrofobe în structură cu scopul de a-i îmbunătăți stabilitatea într-un anumit mediu și pentru a avea toxicitate minimă pentru aplicații biomedicale [30-35].

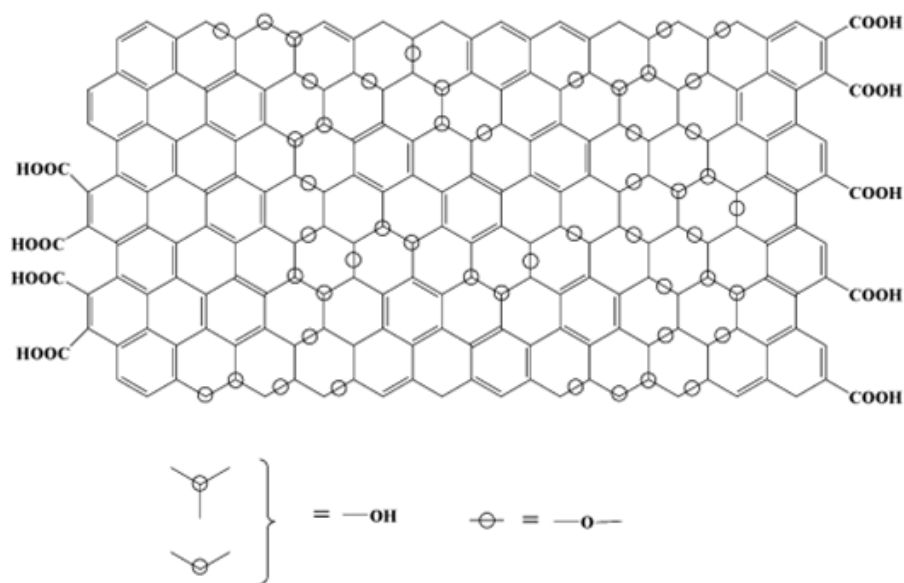


Figura 3. Structura oxidului de grafenă [36]

În ciuda avansărilor tehnologice în știința biomedicală, cancerul încă rămâne una dintre cele mai mari provocări pentru omenire. În această lucrare, ne dorim să obținem un sistem nanometric de eliberare controlată folosind grafenoxidul ca nanotransportor pentru mai mulți agenți activi cu proprietăți anticancerigene dar și antimicrobiene și antiinflamatorii. Compușii activi utilizați sunt acidul galic, acidul cafeic, limonenul și două uleiuri esențiale, de nucșoară și pin cembra.

Deoarece efectele secundare ale substanțelor sintetice asupra organismului sunt bine cunoscute, în ultimul timp s-a pus accent pe utilizarea substanțelor naturale și dezvoltarea de nanomateriale încărcate cu extracte naturale [37]. Este nevoie urgent pentru terapia în cancer de eliberare controlată țintă, iar sinteza în condiții ecologice este importantă pentru utilizarea biomedicală a sistemelor de eliberare controlată în organismal uman [38]. Efectele antimicrobiene, anticancerigene, antifungice ale compusilor naturali extrași din diferite plante împotriva diferitelor microorganisme, au fost demonstrate de-a lungul timpului de cercetători, lucru care ne încurajează să examinăm în continuare activitățile biologice ale substanțelor bioactive pentru utilizarea lor în medicină [39-43].

3,4,5-trihidroxibenzoic cunoscut și sub numele de acid galic [44], este un compus polihidroxifenolic, ce se găsește într-o diversitate mare de fructe, plante și legume având o mare varietate de aplicații biologice precum antibacteriene, antimutagenice, antivirale și antitumorale [45]. Este un bine-cunoscut antioxidant, raportat anterior ca având activitate anti-inflamatorie [39, 46].

3-(3,4-dihidroxifenil)-2-propenoic (acid cafeic), se găsește de asemenea în multe fructe, legume, băuturi (vin, cafea) și uleiuri vegetale. Acidul cafeic are o mare activitate antibacteriană și antivirală. Este unul dintre componenții majori ai acidului hidroxicinamic ce se găsește în vin, având proprietăți antioxidante, controlând nivelul de lipide din sânge și este antimutagenic [47]. Pe baza rapoartelor de cercetare aferente, acidul cafeic are o varietate de efecte farmacologice, incluzând anti-mutageneza, anticancer, antibacterian, protecție cardiovasculară, anti-leucemic și imunomodulator [48].

4-izopropenil-1-metilciclohexan (D-limonen), o terpenă naturală cu miros asemănător lămâiei, este un constituent major ce se găsește în citrice, cireșe, ulei de măsline și diferite plante aromatice. Este larg utilizat în cosmetică, industria alimentară dar și în industria farmaceutică și în medicină. Are proprietăți antioxidante, antimicrobiene, antitumorale, precum și antidiabetice [49-51]. Studiile au demonstrat că limonenul a avut efect de inhibare a dezvoltării diferitelor specii de *Leishmania*. Cercetătorii de asemenea au raportat că tratamentul cu limonen reduce rata de infecție a macrofagelor infectate cu *Leishmania amazonensis* cu 78% [52]. Uleiurile esențiale au fost utilizate tradițional pentru infecții respiratorii și sunt utilizate în prezent ca medicamente pentru diverse afecțiuni precum boli cardiovasculare, diabet, Alzheimer și cancer. Este bine cunoscut faptul că uleiurile esențiale prezintă activitate antimicrobiană [53]. Efectul antimicrobian și componenții chimici ai uleiurilor esențiale au fost recunoscute de câțiva cercetători în trecut. Mai mult, studiile au demonstrat efectul sinergetic al ingredientelor din uleiurile esențiale împotriva diferiților agenți patogeni umani [54, 55].

Grafenoxidul prezintă o suprafață ușor de modificat cu o diversitate de polimeri biocompatibili precum chitosan, polietilen glicol, poli-L-lizina și polivinilalcoolul. Grafen oxidul conține o cantitate mare de grupări hidrofilice marginale. Aceste proprietăți fac grafen oxidul mult mai atrăgător pentru cercetători având aplicații în eliberare controlată, parazitologie, inginerie tisulară, activitate antibacteriană, tratarea cancerului, imagistică, senzori și diagnosticare. Pentru ca grafen oxidul să fie folosit în studii clinice este esențial să se studieze toxicitatea și

biocompatibilitatea prin experimente *in vitro* și *in vivo* utilizând linii celulare specifice și modele animale [30, 56].

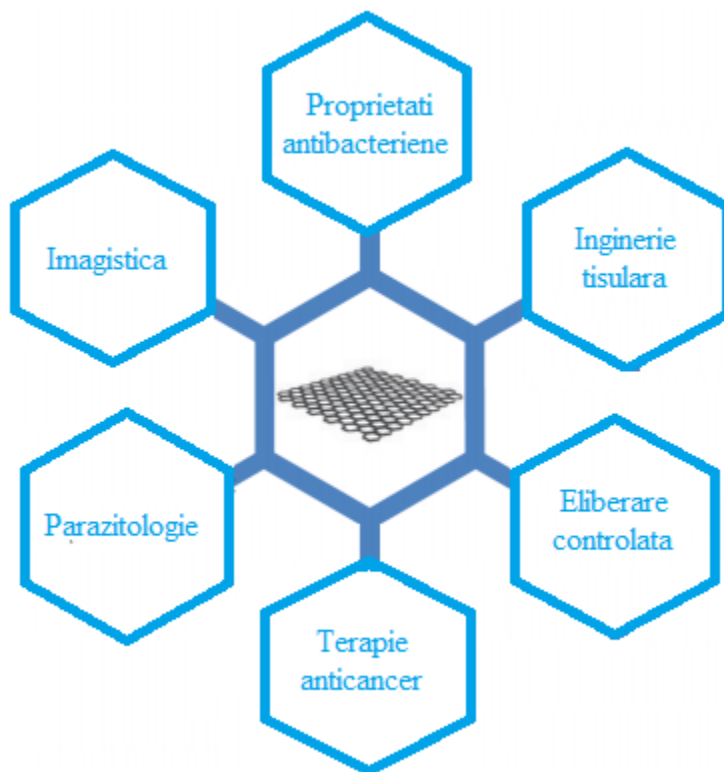


Figura 4. Aplicații ale grafen oxidului [25]

Un studio de literatură demonstrează efectele grafen oxidului asupra celulelor fibroblaste umane și asupra șoarecilor cu scopul de a investiga biocompatibilitatea grafen oxidului. Grafen oxidul sintetizat a fost caracterizat prin microscopie electronică prin transmisie de înaltă rezoluție și prin microscopie de forță atomică. Celulele fibroblaste umane au fost încărcate cu doze diferite de oxid de grafen din ziua 1 până în ziua 5. De altfel, treizeci de șoareci împărțiți în trei grupe de testare (doză mică, medie, mare) și un grup de control au fost injectați cu 0,1, 0,25 și respectiv 0,4 mg oxizi de grafen, și au fost urmăriți timp de 1 zi, 7 zile și, respectiv, 30 de zile. Rezultatele au arătat că grafen oxizii cu doze mai mici de 20 mug/ml nu au prezentat toxicitate asupra celulelor fibroblaste umane dar, o doza mai mare de 50 mug/ml prezintă toxicitate. De asemenea, oxizii de grafen în doze mici (0.1mg) și medii (0.25 mg) nu au prezentat toxicitate asupra șoarecilor , dar în doze mari (0.4 mg) au prezentat toxicitate cronică, 4/9 soareci au murit prin formare de granulom localizat în plămâni, splină, ficat si rinichi. Atunci când oxizii de grafen sunt explorați pentru aplicații *in vivo* în organismul animal sau uman, trebuie luată în considerare biocompatibilitatea acestora [31].

Așa cum am specificat, grafen oxidul este un nanomaterial cu proprietăți antibacteriene și suprafață mare având capacitate ridicată de încărcare a substanțelor. *Staphylococcus aureus* rezistent la metilicilină (MRSA) este responsabil pentru infecții grave în spitalele din întreaga lume, reprezentând o problemă gravă de sănătate. Curcumina, constituentul major al turmericului, este eficient împotriva bacteriei *Staphylococcus aureus* dar din păcate în concentrații toxice sau în combinație cu antibioticele. Principala problemă în terapiile cu curcumina este solubilitatea scăzută a acestui compus hidrofobic și citotoxicitatea în concentrații mari. Un studiu descrie eficacitatea unui nanomaterial compozit obținut prin funcționalizarea grafen oxidului (GO) cu curcumina (CU) în tratarea acestei infecții. Rezultatele au demonstrat eficiența GOCU împotriva MRSA la o concentrație mai mică de 2 $\mu\text{g/ml}$. Mai mult decât atât, GOCU prezintă toxicitate scăzută asupra celulelor fibroblaste și evită hemoliza celulelor roșii din sânge. Rezultatele arată că nanomaterialul obținut este promițător împotriva MRSA [57].

Câțiva cercetători au încorporat o serie de straturi de grafen oxid redus în matrice de polidimetilsiloxan pentru a fi folosit în tratarea rănilor. A fost studiată structura porilor, dispersia, proprietățile fizice, citotoxicitatea și activitatea antibacteriană. Materialul obținut a prezentat proprietăți mecanice îmbunătățite, compatibilitate bună și activitate antibacteriană. Aceste experimente demonstrează că membrana compozită obținută poate fi folosită în vindecarea rănilor [58].

Ampicilina este un antibiotic eficient împotriva bacteriilor gram-pozitive și gram-negative. În urma unor cercetări amănunțite, s-a demonstrat eficacitatea grafen oxidului încărcat cu ampicilină împotriva bacteriilor *Staphylococcus aureus* și *Escherichia coli*. Materialul obținut a fost analizat prin spectroscopie în infraroșu cu transformata Fourier și prin microscopie electronică cu scanare iar cantitatea de ampicilină încărcată pe grafen oxid a fost determinată prin spectroscopie de absorbție UV-VIS. Rezultatele au demonstrat că produsul obținut este un candidat promițător împotriva infecțiilor [59].

Combinația grafen oxidului cu diferite polizaharide precum alginat, amidon, celuloză, chitosan, formează nanocompozite cu proprietăți mecanice crescute. Acest lucru se datorează interacțiilor dintre grupele reactive ale grafen oxidului (carboxil și hidroxil) cu grupele polizaharidelor (carboxil, amino sau hidroxil). Aceste materiale pot fi folosite în diferite aplicații iar avantajul este că nu sunt dăunătoare mediului înconjurător. Chitosanul a fost utilizat la scară largă ca biomaterial pentru inginerie tisulară și eliberare controlată, deoarece prezintă proprietăți

atractive precum biocompatibilitate, biodegradabilitate, acțiune antibacteriană și imunogenitate scăzută. Combinarea acestuia cu grafen oxidul poate îmbunătăți proprietățile mecanice îmbunătățind în același timp adsorbția medicamentelor anticanceroase și controlând rata de eliberare. Astfel de nanocompozite pot fi folosite ca implanturi anticancer postoperator. Pinto și colab. au analizat biocompatibilitatea nanocompozitelor de grafen și a concluzionat că modificarea GO cu molecule hidrofile sau încapsularea substanțelor în matricele hidrofilice îmbunătățește aderența celulelor și compatibilitatea. Nanocompozitul obținut din grafen oxid sintetizat cu chitosan sub formă de fibre a fost folosit în aplicații de tratare a rănilor. Mai precis, fibrele obținute ce conțin alcool polivinilic (PVA), CS și grafen sunt benefice pot fi folosite la vindecarea rănilor atât la șoareci cât și la iepuri [60, 61].

Un grup de cercetatori au proiectat un sistem de eliberare utilizând grafen oxidul (GO) încarcat cu acidul galic (GA), un agent anticancer. Nanocompozitul format a fost caracterizat prin difractometrie de raze X (XRD), FTIR, microscopie electronica de transmisie de înaltă rezoluție (HRTEM) și spectroscopie UV/VIS. În studiile biologice *in vitro*, celulele fibroblaste, normale și cele canceroase de ficat au fost testate cu diferite concentrații de GO, GOGA și GA pentru 72 de ore. Nanocompozitul GOGA a arătat efect inhibitoriu asupra creșterii celulelor canceroase, fără să afecteze celulele normale. Rezultatele acestui studiu sunt promițătoare pentru investigații viitoare *in vivo* [45].

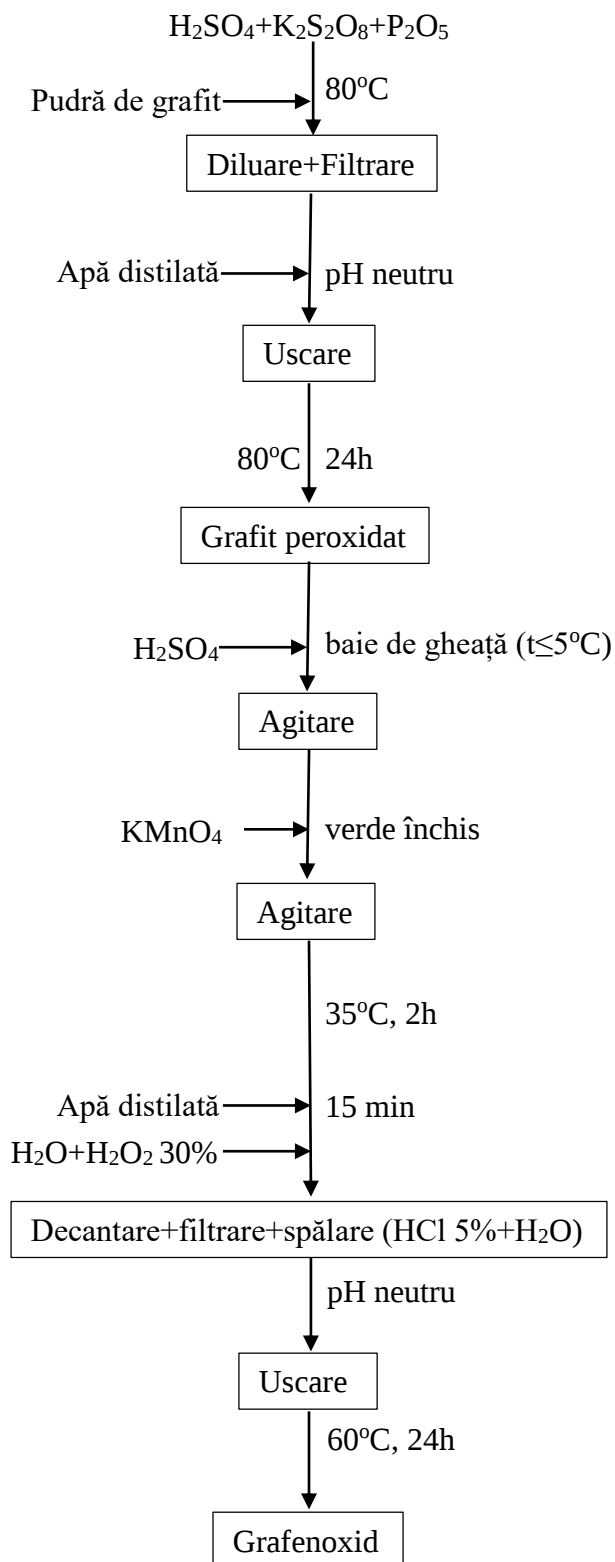
Studierea eliberării controlate a substanțelor este necesară în tratarea cancerului și sinteza ecologică este importantă pentru utilizări biomedicale ale sistemelor de eliberare controlată a substanțelor în organismul uman. În cadrul unei lucrări, cercetătorii au creat două sisteme nanocompozite de livrare a substanțelor pentru medicamentele anticanceroase, bazate pe grafen oxid funcționalizat cu polifenoli din ceai. Materialele obținute au demonstrat că au o capacitate de încărcare a doxorubicinei eficientă de $3.430 \times 10^6 \text{ mg g}^{-1}$, respectiv $3.932 \times 10^4 \text{ mg g}^{-1}$. Cel din urmă prezintă biocompatibilitate cu celulele normale chiar și la concentrații mari și promovează moartea celulelor tumorale prin eliberarea doxorubicinei în principal la nivelul nucleului. În urma rezultatelor, cercetătorii au demonstrat că aceste sisteme obținute sunt promițătoare pentru diferite aplicații biomedicale dar și în tratarea cancerului [38].

Acidul elagic, un polifenol natural, a fost izolat din extractul de coaja de rodie prin interacțiune hidrofoba utilizând grafen oxid grefat cu fibre de bumbac ca adsorbant staționar. Porțiunile de oxid de grafen au servit ca situsuri de legare a interacțiunii hidrofobe pentru adsorbția

acidului elagic. Fibra de bumbac funcționalizată cu oxid de grafen a fost realizată într-o membrană pentru a putea realiza purificarea acidului elagic. Au fost investigate efectele parametrilor operașionali asupra procesului de izolare. S-a descoperit ca 5mmol/l de soluție apoasă de carbonat de sodiu este o soluție tampon de legare adecvata și soluția apoasa de hidroxid de sodiu variind între 0.04 si 0.06 mol/l este o soluție de eluare adecvată pentru purificarea acidului elagic. În condiții optime, puritatea acidului elagic a crescut semnificativ de la 7.5% în extractul brut până la 75.0–80.0%. Valoarea pH-ului s-a dovedit a fi un parametru cheie care determină adsorbția și desorbția acidului galic. Niciun solvent organic nu este implicat în procesul de purificare. Astfel, o metodă simplă și prietenoasă cu mediul înconjurător este stabilită pentru purificarea acidului elagic utilizând ca adsorbant grafen oxidul funcționalizat [62].

Mod de lucru - Sinteza grafenoxidului

Grafenoxidul a fost sintetizat din pudră de grafit, urmărind metoda Hummer modificată. S-a realizat o soluție de H_2SO_4 concentrat (60 mL), $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ (10 g) și P_2O_5 (10 g) ce a fost încălzită și menținută la 80°C, peste care s-au adăugat 20 g de grafit sub agitare. Soluția astfel obținută a fost lasată să se racească la temperatura camerei după care a fost diluată cu o cantitate mare de apă, filtrată și spălată până când filtratul a ajuns la pH neutru. Produsul obținut a fost uscat timp de 24h la 80°C. Într-un pahar Berzelius aflat în baie de gheață ($t < 5^\circ\text{C}$) s-au adăugat 460 mL de H_2SO_4 concentrat și 20 g de grafit preoxidat sub agitare. 60 g de KMnO_4 au fost apoi adăugate încet în soluție și mixate până când soluția a devenit de culoare verde închis. Paharul apoi a fost mutat pe o plită cu agitare magnetică la temperatura de 35°C unde a fost ținut sub agitare timp de 2 ore. Peste amestec s-au adăugat 920 ml apă distilată și s-a lăsat sub agitare timp de 15 minute, după care s-au adăugat 2,8 L de apa distilată și 50 ml H_2O_2 de concentrație 30% pentru oprirea reacției. Amestecul obținut a fost decantat, filtrat la vid, și spălat cu HCl 5% și H_2O distilată până la obținerea unui pH-neutru. Pulberea obținută a fost uscată în aer la temperatura de 60°C timp de 24 h.



Schema 1. Sinteza grafenoxidului

Pentru obținerea suportului grafenoxid încărcat cu acid galic (GOGA) s-a preparat o soluție de acid galic de 1% și s-a lucrat la balon cotat de 50 ml. S-au cântărit 0,1 g grafenoxid într-un

balon cotate de 10 ml și s-a adus la semn cu soluția de acid galic 1%. S-au realizat astfel 3 probe. Soluțiile obținute au fost agitate timp de 16 ore după care au fost colectate prin filtrare la vid și uscate în etuvă la 40°C timp de 24 ore.

Același mod de lucru s-a utilizat și pentru obținerea celorlalte materiale: grafenoxid încărcat cu acid galic, limonen, ulei esențial de pin și nucșoară, preparându-se soluții de 1% de acid galic, limonen, ulei esențial de pin și respectiv nucșoară. S-au cântărit câte 0,1 g grafenoxid (x 3 probe din fiecare soluție) și s-au adus la semn cu soluțiile preparate la balon cotate de 10 ml.

Pentru a studia eliberarea controlată a substanțelor active încărcate în grafenoxid, o soluție tampon cu un pH de 7,4 a fost preparată. Diferite studii arată că anioni precum HPO_4^{2-} și H_2PO_4^- au efect în ceea ce privește eliberarea controlată [63, 64]. Viteza de eliberare controlată a fost monitorizată/măsurată prin adăugarea de 65 mg de compus în 25 ml soluție tampon fosfat (pH=7.4), din care s-au luat probe la 1, 4, 24, 48, 123h, respective la 10, 21 și 30 de zile. În tot acest timp, soluțiile au fost ținute la etuvă la 37°C. Înainte de a fi analizate prin HPLC, probele au fost centrifugate timp de 10 minute la 8000 rpm.

Rezultate și discuții

În acest raport sunt prezentate analizele celor cinci probe obținute prin încărcarea grafenoxidului cu substanțele de interes.

Spectroscopie în infraroșu cu transformata Fourier (FTIR)

Analizele (FTIR) au fost înregistrate cu ajutorul unui spectrometru Nicolet iS50FT-IR, echipat cu un detector DTGS care furnizează informații cu o sensibilitate ridicată în intervalul 4000 cm^{-1} și 100 cm^{-1} la o rezoluție de 4 cm^{-1} .

Grafenoxidul obținut este solubil în apă, de culoare neagră și dispersabil. Așa cum se poate vedea în Figura 5(a), semnalul de la 1721 cm^{-1} este atribuit vibrației de întindere a legăturilor C=O prezente în grupările carbonil și carboxil. Prezența semnalului de la 1600 cm^{-1} , se datorează vibrației de întindere C=C și semnalele din zona 1224 cm^{-1} și 1029 cm^{-1} se datorează legăturilor COC (epoxi) respective COH (alcoxi). Semnalul de la 3122 cm^{-1} , corespunde vibrației de întindere a grupării hidroxil asociată [31, 34].

Figura 5(b) indică benzile caracteristice ale acidului galic pur, semnalul de la 1664 cm^{-1} indică prezența grupării fenolice, iar semnalul de la 1608 cm^{-1} corespunde vibrației de întindere a dublelor legături C=C din inelul aromatic. Vibrația de întindere a grupărilor carboxilice apare la

1217 cm^{-1} , iar la 1021 cm^{-1} se găsește vibrația de întindere la legăturilor C-O din grupările carboxilice. Peak-ul de la 734 cm^{-1} corespunde vibrațiilor δ CC ale inelului benzenic. Semnalul de la 3269 cm^{-1} corespunde vibrației de întindere a legăturii hidroxil asociată.

După încărcarea nanotransportorului (grafenoxid) cu acid galic, se observă că benzile caracteristice grafenoxidului de la 1715 cm^{-1} , respectiv 1580 cm^{-1} , din Figura 5(c) cu intensitate scăzută, rămân. Semnalul ce se găsește în jurul valorii 3154 cm^{-1} , corespunde legăturii -OH din gruparea carboxil sau fenol. Prin scăderea dintre spectrul specific grafenoxidului încărcat cu acid galic și cel al grafenoxidului pur se poate observa o deplasare și o lărgire vizibilă a benzii din jurul valorii 1850 cm^{-1} dar și o creștere a intensității relative a peak-ului, ceea ce demonstrează interacția acidului galic cu suportul grafenoxidic. Același lucru se poate observa și în cazul peak-ului de la 1030 cm^{-1} . Spectrul infrarosu al suportului grafenoxid încărcat cu acid galic (GOGA) arată semnalele caracteristice atât ale grafenoxidului cât și ale acidului galic, ceea ce sugerează faptul că interacția suport-acid galic este o interacție puternică [45, 65].

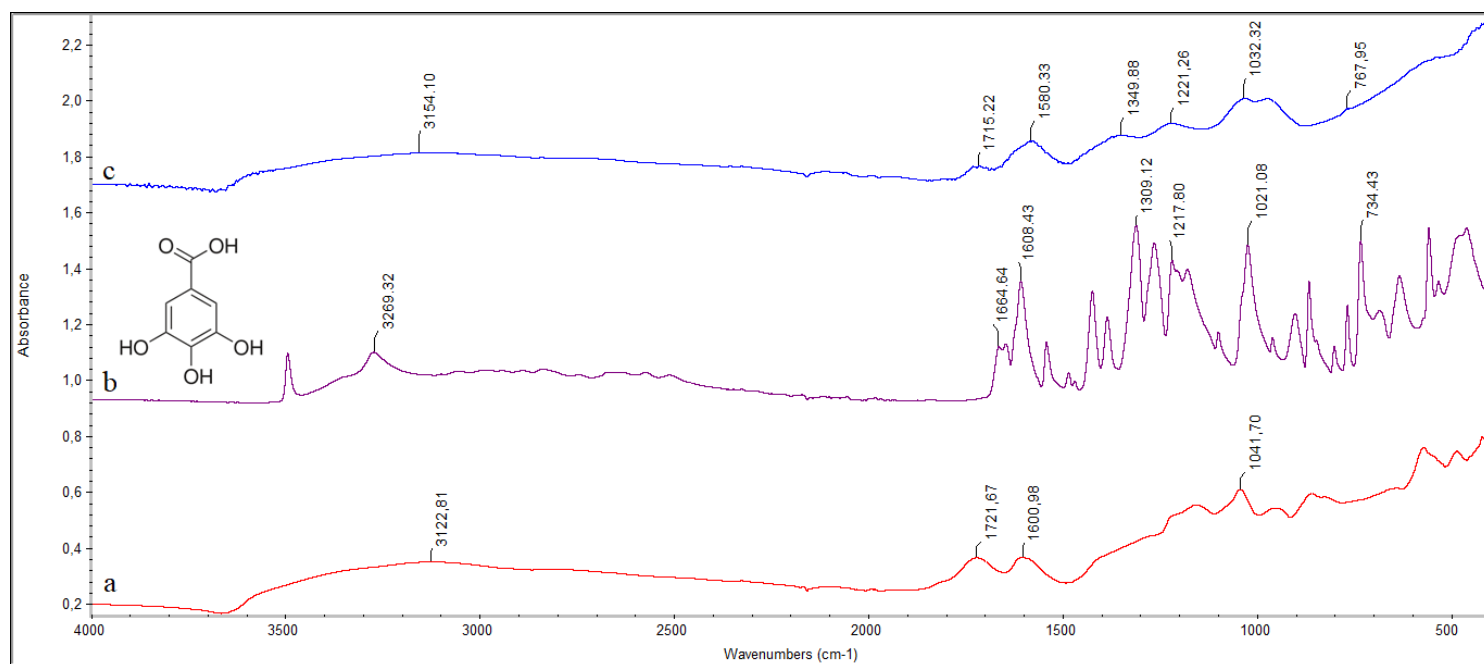


Figura 5. Spectrele FTIR caracteristice: a) grafenoxid (GO), b) acid galic (GA) și c) grafenoxid încărcat cu acid galic (GOGA)

În Figura 6(b), vibrația de întindere a grupărilor -CH apare la lungimea de undă de 2979 cm^{-1} . Banda cu intensitate foarte puternică de la 1600 cm^{-1} este atribuită vibrației de întindere a legăturilor -CO prezente în grupările carboxyl și banda de intensitate de la 1448 cm^{-1} corespunde vibrației de întindere CC din inelul aromatic. Semnalele de la 1214 cm^{-1} și 1071 cm^{-1} corespund

vibrației de întindere al legăturii C-OH din inelul aromatic. Semnalele cuprinse între 3200 cm^{-1} și 3500 cm^{-1} corespund vibrației grupărilor hidroxil asociate [66]. Cele două spectre ale GO-lui și GOCA sunt asemănătoare, în cel din urmă regăsindu-se semnale caracteristice cu cele ale acidului cafeic. Ca și în Figura 5, diferențele se văd în aceleași zone ale spectrului, 1580 cm^{-1} și 1041 cm^{-1} .

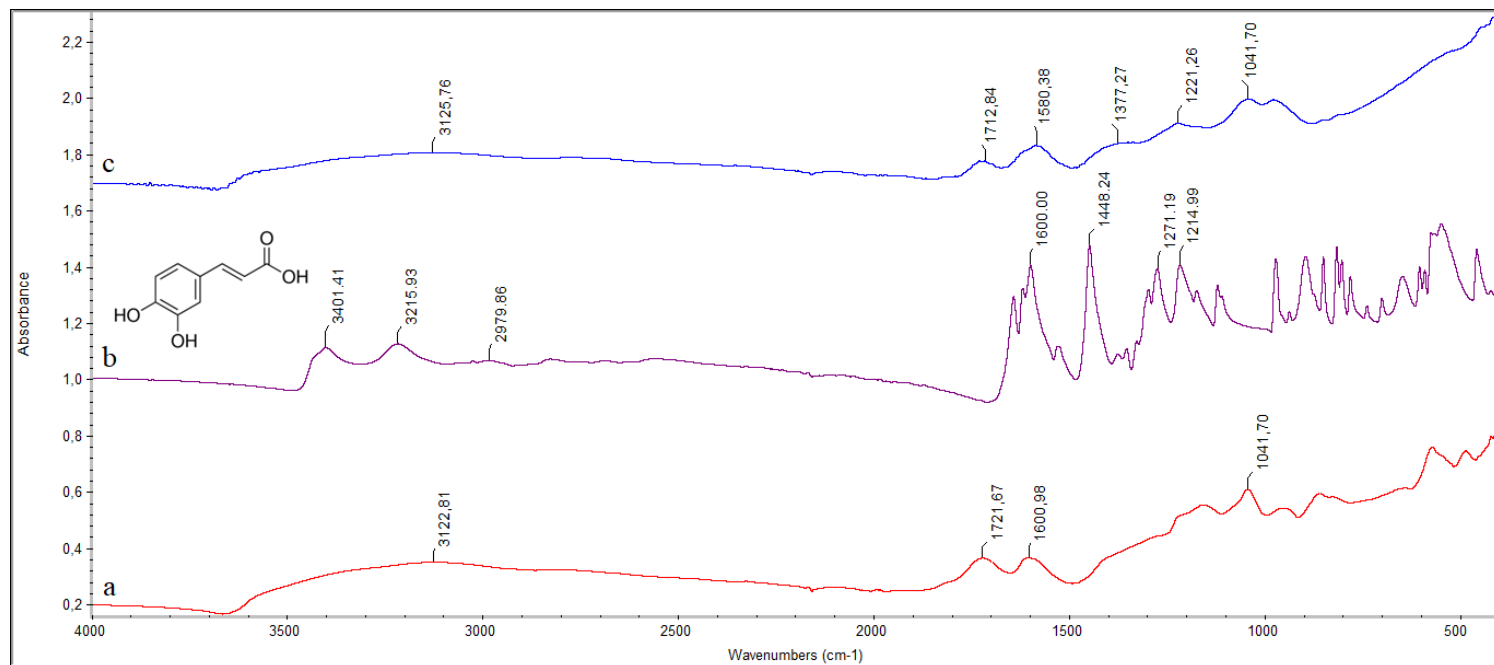


Figura 6. Spectrele FTIR caracteristice: a) grafenoxid (GO), b) acid cafeic (CA) și c) grafenoxid încărcat cu acid cafeic (GOCA)

Spectrul din Figura 7(b) prezintă benzile caracteristice la $1647\text{--}1677\text{ cm}^{-1}$ ce corespund vibrației de întindere a dublelor legături C=C din inelul aromatic respectiv din gruparea vinilică. Semnalele cuprinse între 3010 cm^{-1} și 3081 cm^{-1} corespund vibrației de întindere a legăturilor C-H. Semnalele de absorbție sub 3000 cm^{-1} sunt în general asociate cu grupările nesaturate. Cele două semnale de la 1377 cm^{-1} și 1437 cm^{-1} sunt atribuite legăturilor CH₃/CH₂, în timp ce semnalul intens de la 885 cm^{-1} poate corespunde vibrației de întindere a grupării -CH=CH₂. În Figura 7(c) se pot observa semnale caracteristice limonenului prin deplasarea și lărgirea benzii de la 1583 cm^{-1} . De asemenea se poate observa o diferență de intensitate relativă între cele două peak-uri de la 1583 cm^{-1} și 1721 cm^{-1} din figura 7(c) și peak-urile din spectrul grafenoxidului din aceeași zonă [67].

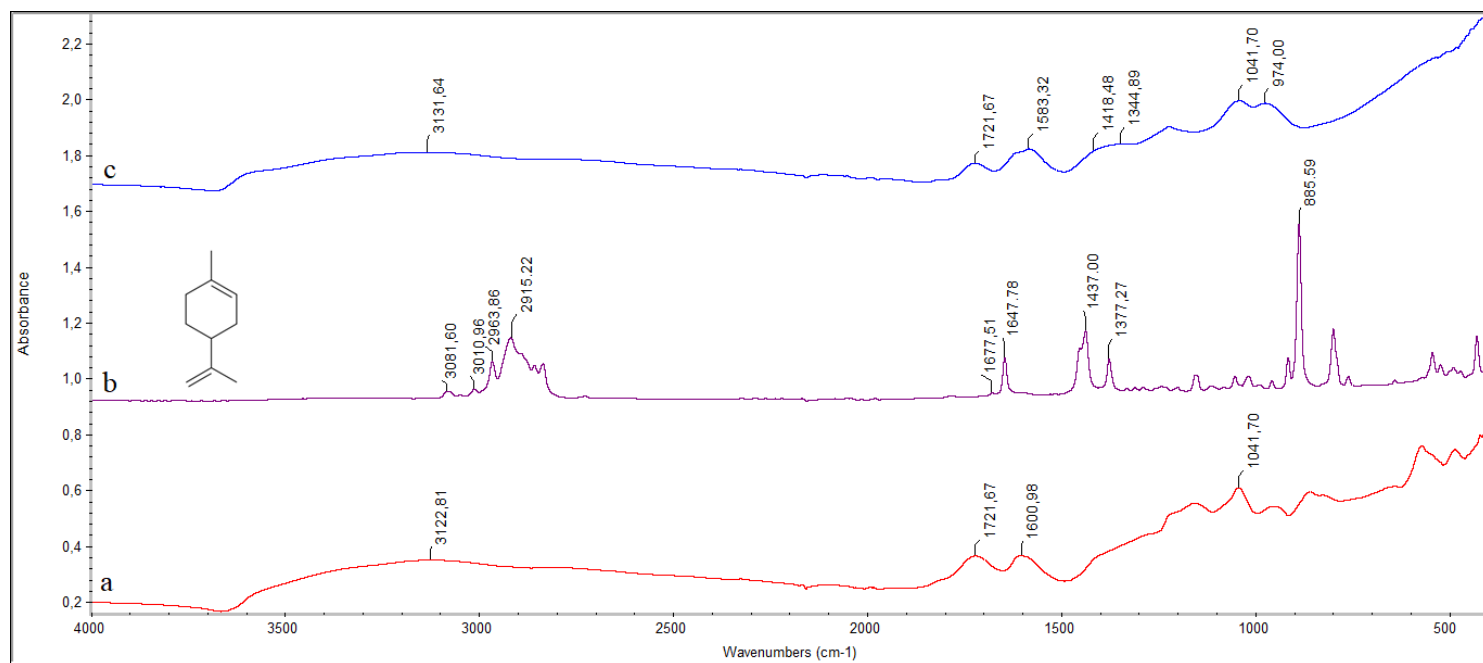


Figura 7. Spectrele FTIR caracteristice: a) grafenoxid (GO), b) limonen și c) grafenoxid încărcat cu limonene

În uleiul esențial de nucșoară principalii compuși chimici sunt sabinen, α -pinen și miristicin [68]. Figura 8(b) arată semnale asemănătoare cu cele identificate de alți cercetători, cum ar fi cele de la 941 cm^{-1} (corespunzător vibrației de întindere -CH) și cel de la 1197 cm^{-1} (corespunzător vibrației -CO). Vibrația de întindere a grupărilor CH_3/CH_2 apare la 1433 cm^{-1} . De asemenea, semnalul de la 3511 cm^{-1} corespunde grupării hidroxil asociată, iar cel de la 2919 cm^{-1} este atribuit vibrației de întindere a legăturilor -CH. După cum se poate observa în figura 8(c), în material se regăsesc semnale caracteristice uleiului esențial de nucșoară ceea ce demonstrează încărcarea anumitor compuși pe grafenoxid [69, 70].

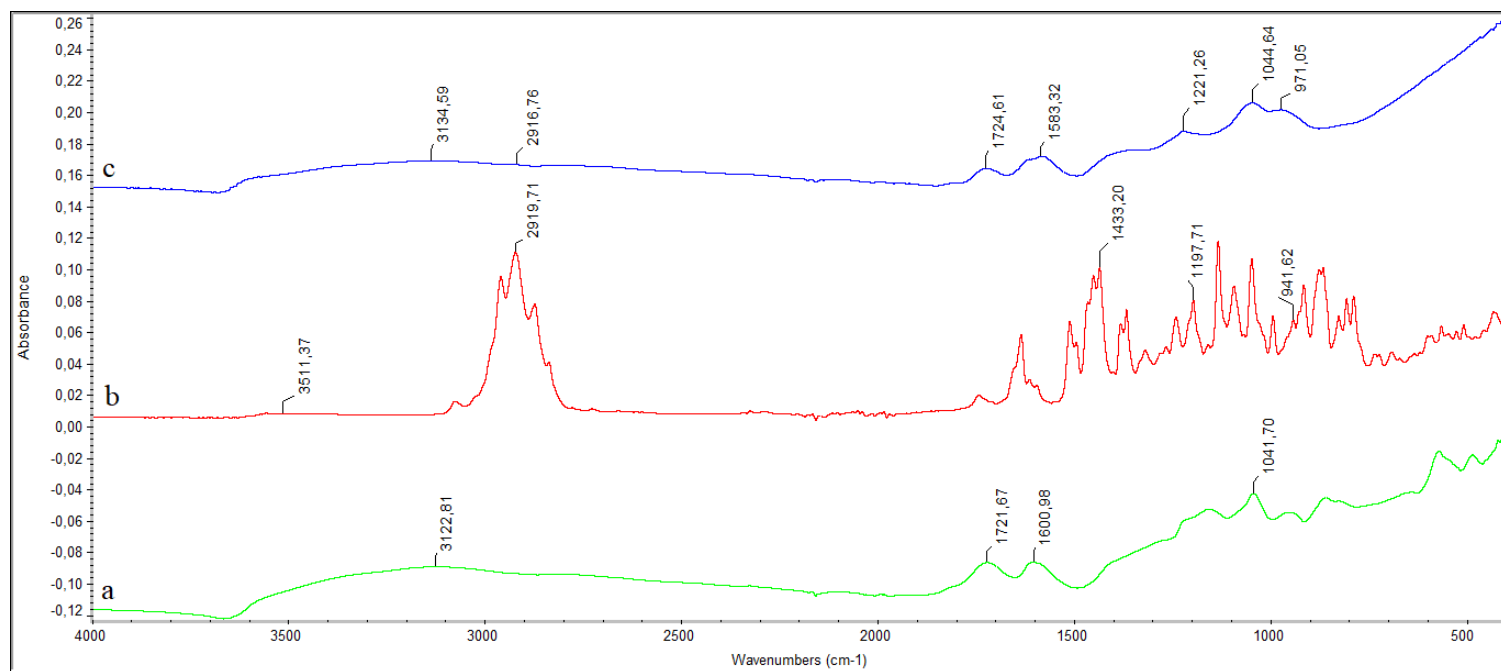


Figura 8. Spectrele FTIR caracteristice: a) grafenoxid (GO), b) ulei esențial de nucșoară și c) grafenoxid încărcat cu ulei esențial de nucșoară

După cum se poate observa, ultimele două spectre FTIR sunt asemănătoare din punct de vedere al încărcării substanței active pe nanotransportorul grafenoxid, rezultând formarea cu succes a complexului [71].

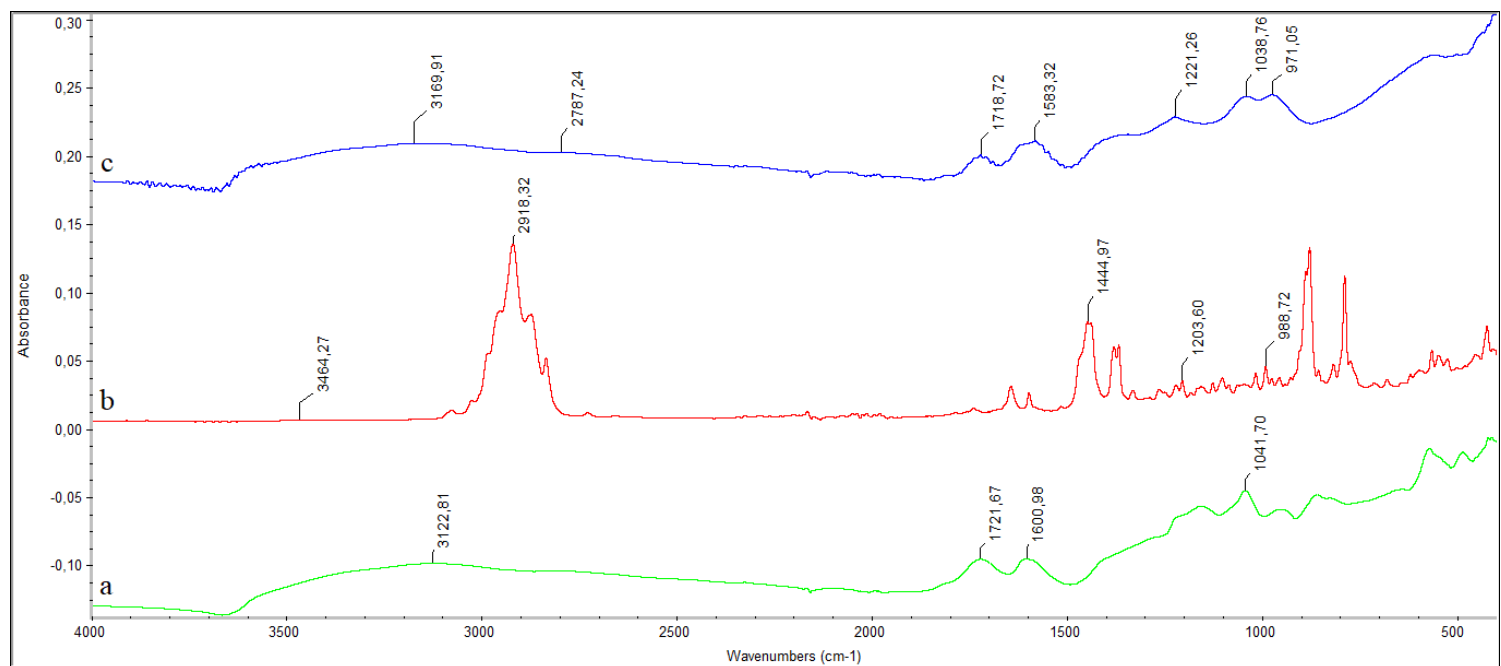
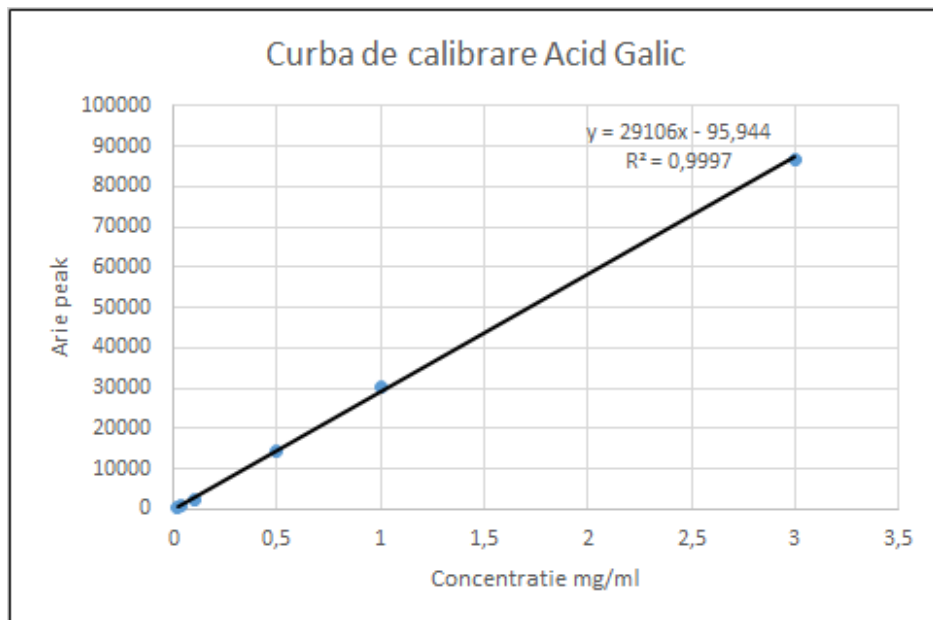


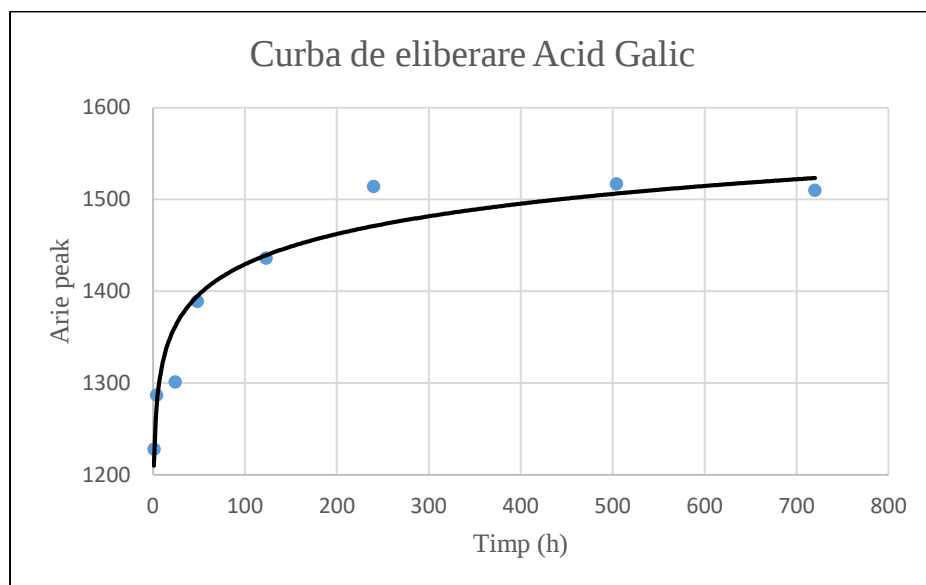
Figura 9. Spectrele FTIR corespunzatoare: a) grafenoxid (GO), b) ulei esențial de pin cembra și c) grafenoxid încărcat cu ulei esențial de pin cembra

Încărcarea și gradul de eliberare al compușilor activi (HPLC)

Curba de calibrare pentru substanța de interes (acid galic) a fost obținută la o lungime de undă de 280 nm utilizând o serie de soluții standard de concentrații cunoscute cuprinse între 0,02 și 3 mg/ml. Așa cum se poate observa în Figura 6, curba de calibrare este liniară având coeficientul de corelație mai mare de 0,995 [46, 72]. Profilul de eliberare al acidului galic din complexul GOGA în soluție tampon fosfat la pH 7.4 este arătat de asemenea în Figura 6. Din figură se poate observa că viteza de eliberare în soluția tampon este lentă ceea ce se datorează procesului de schimb anionic ce are loc între anionii acidului galic și anionii din soluția tampon. Eliberarea bruscă apărută în prima ora se poate datora suprafeței caracteristice a grafenoxidului, interacției cu acidul galic sau morfologia și/sau structura poroasă a materialului. Procentajul maxim de eliberare al acidului galic din nanocompozit ajunge la 80% în aproximativ 10 zile. În ceea ce privește gradul de încărcare a grafenoxidului cu ceilalți compuși activi, datorită solubilității foarte scăzute eliberarea este nesemnificativă, iar conținutul de substanță activă eliberată în soluție este sub limita de detecție a metodei utilizate [45, 73].



Concentratie (mg/ml)	Arie peak
0,02	458
0,04	954
0,1	2353
0,5	14268
1	30126
3	86897



Timp (h)	Arie peak
1	1228
4	1287
24	1301
48	1389
123	1436
240	1514
504	1517
720	1510

Figura 10. Curbele de calibrare și eliberare ale acidului galic

Aceste rezultate prezintă potențial pentru suportul grafenoxidic încărcat cu acid galic (GOGA) pentru a fi utilizat ca sistem cu eliberare a substanței de interes, având proprietatea de eliberare controlată și susținută [45].

Analiză termică grafenoxid încărcat cu compuși activi (TGA)

Analiza termică s-a realizat cu ajutorul unui aparat STA TG/DSC Netzsch Jupiter 449°C, în intervalul de temperatură 25-900°C, în atmosferă dinamică de 50 mL/min aer, cu o viteză de încălzire de 10K/min în creuzet din alumina (Al_2O_3).

Toate probele prezintă o pierdere de masă la început, în jur de 12-13%, cu excepția probelor cu acid galic și limonen care au o pierdere de masă în jur de 16%. Acest lucru se poate datora faptului că grafen oxidul probabil mai conține compuși volatili care sunt eliminați în această etapă (RT-145°C).

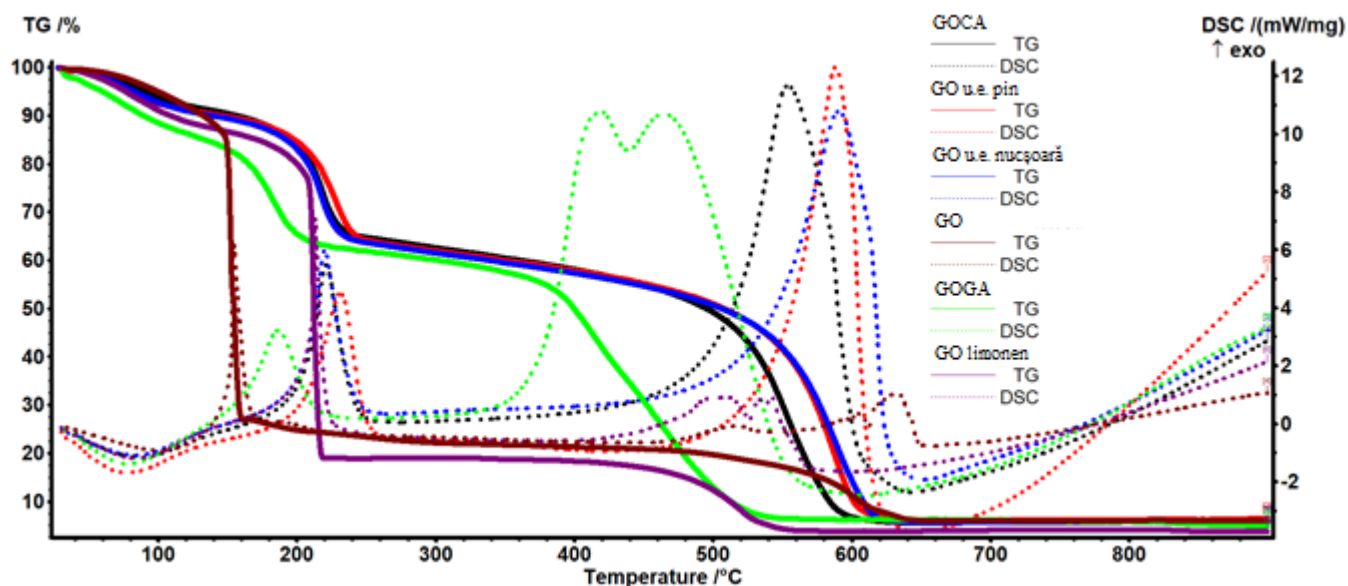


Figura 11. Analiza termică a grafenoxidului și a grafenoxidului încărcat cu compuși activi

Pentru grafenoxid-ul simplu pierderea de masă este de 13.06%. Oxidarea probei are loc brusc (aproape exploziv), energic, la $\sim 155^{\circ}\text{C}$, când proba pierde 60.05% din masă (în intervalul $145\text{--}165^{\circ}\text{C}$), după cum indică și efectul exoterm foarte ascuțit cu maximum la 155.3°C . Piroliza aceasta este specifică grafenoxid-ului chiar dacă atmosfera ar fi inertă, pentru că se realizează cu oxigenul conținut în el. Urmează apoi două etape de oxidare mai lentă, $165\text{--}460^{\circ}\text{C}$, cu o pierdere de masă de 6.27% și $460\text{--}660^{\circ}\text{C}$ cu o pierdere de masă de 14.75%. Aceste oxidări sunt însoțite de efecte slab exoterme cu maxime la 189, 517.7, 604.4 și respectiv 631.6°C . Pentru toate probele analiza indică existența unei mase reziduale, în acest caz de 5.91% [74-76].

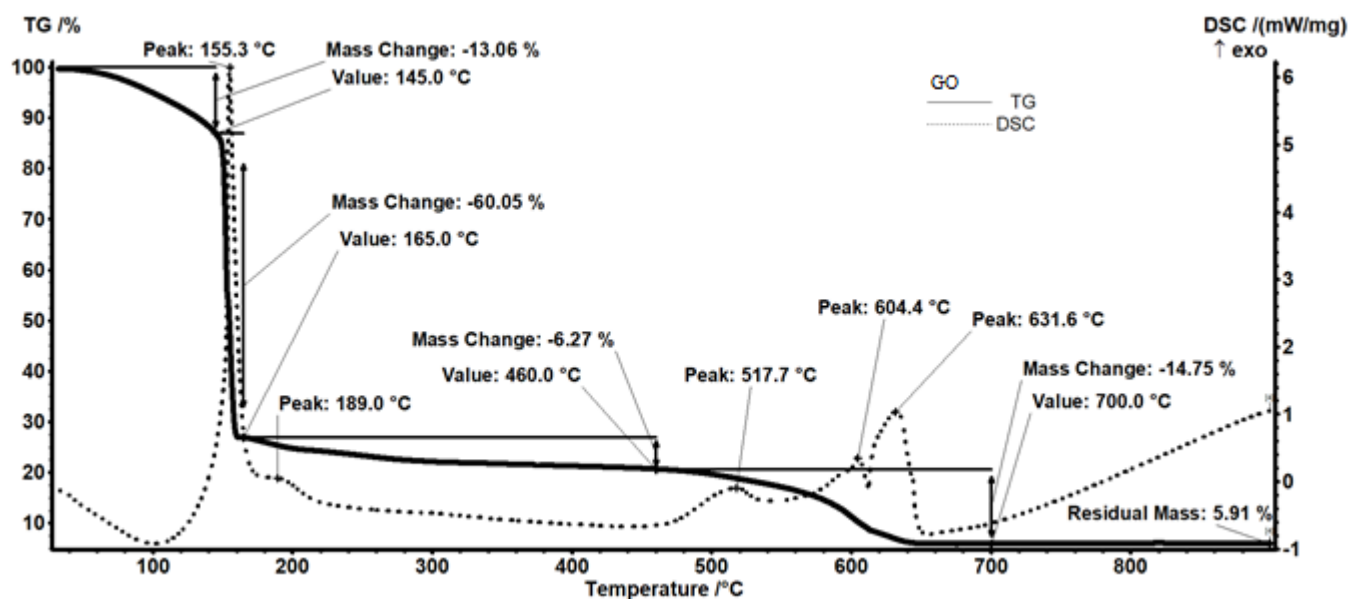


Figura 12. Analiza termică a grafenoxidului

Analiza termică pentru proba cu acid galic indică o pierdere de masă mai importantă în intervalul 30-145°C (16.23%), asemănătoare cu cea observată până acum, dar mai intensă, pierderea de masă fiind importantă chiar de la 30°C, procesul fiind însoțit de un efect slab endoterm. Între 145-215°C are loc un proces exoterm cu maximumul la 186.6°C, pierderea de masă asociată fiind de 20.33%. Proba pierde lent apoi masă până la 365°C (6.92%). În intervalul 365-560°C are loc oxidarea completă, pierderea de masă fiind de 50.18%, procesul fiind însoțit de un efect exoterm puternic, splitat în două, cu maxime la 419.5 și respectiv 464.5°C. Scindarea efectului exoterm indică faptul că în această etapă avem cel puțin două procese de oxidare înlănțuite, parțial suprapuse [77].

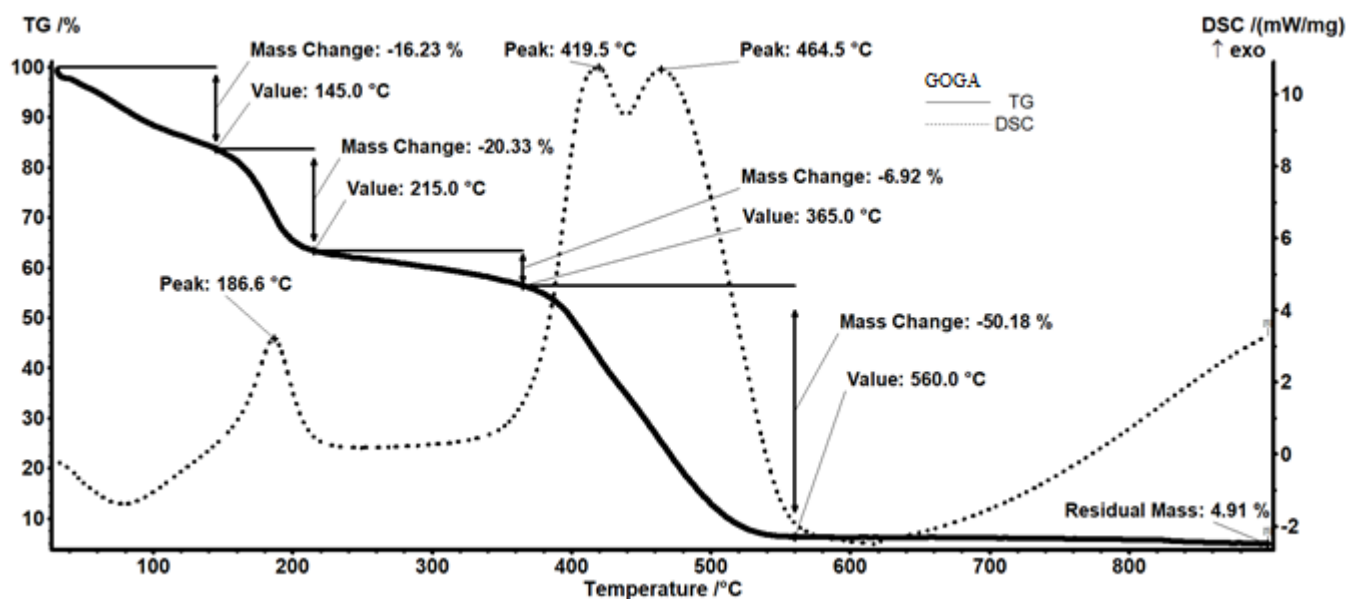


Figura 13. Analiza termică a grafenoxidului încărcat cu acid galic

Proba încărcată cu acid cafeic prezintă o pierdere de masă lentă (12.29%) între RT-180°C, asemănătoare cu cea observată și la grafenoxid-ul simplu, procesul fiind însoțit de un efect slab endoterm. Între 180-240°C are loc un proces exoterm (o oxidare) cu maximum la 221.3°C, pierderea de masă asociată fiind de 22.4%. Proba pierde lent apoi masă până la 460°C (11.27%), fără a se putea observa vreun efect notabil pe curba DSC. În intervalul 460-640°C are loc oxidarea completă, pierderea de masă fiind de 48.52%, procesul fiind însoțit de un efect exoterm puternic, cu maximum la 554.1°C.

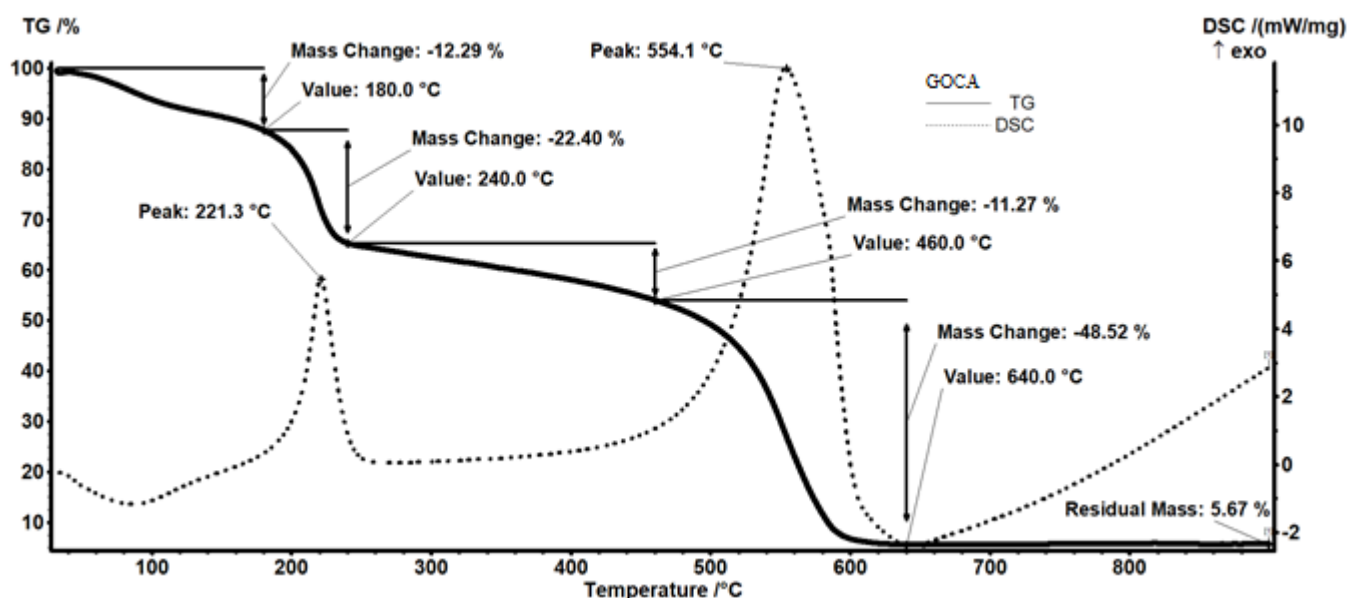


Figura 14. Analiza termică a grafenoxidului încărcat cu acid cafeic

Analiza termică pentru proba cu limonen indică o pierdere de masă de 16.01% în intervalul 30-180°C, asemănătoare cu cea observată la restul probelor, procesul fiind însoțit de un efect slab endoterm. Intre 180-225°C are loc un proces exoterm violent, cu maximum la 213.5°C, pierderea de masă asociată fiind de 65.03%. Proba este apoi relativ stabilă până la ~400°C când începe un nou proces de oxidare. Pana la 580°C se pierde 15.19% din masă, procesul fiind însoțit din nou de un efect exoterm splitat cu maxime la 509.5 și respectiv 42.8°C, indicând existența a cel puțin două procese de oxidare înlanțuite, parțial suprapuse.

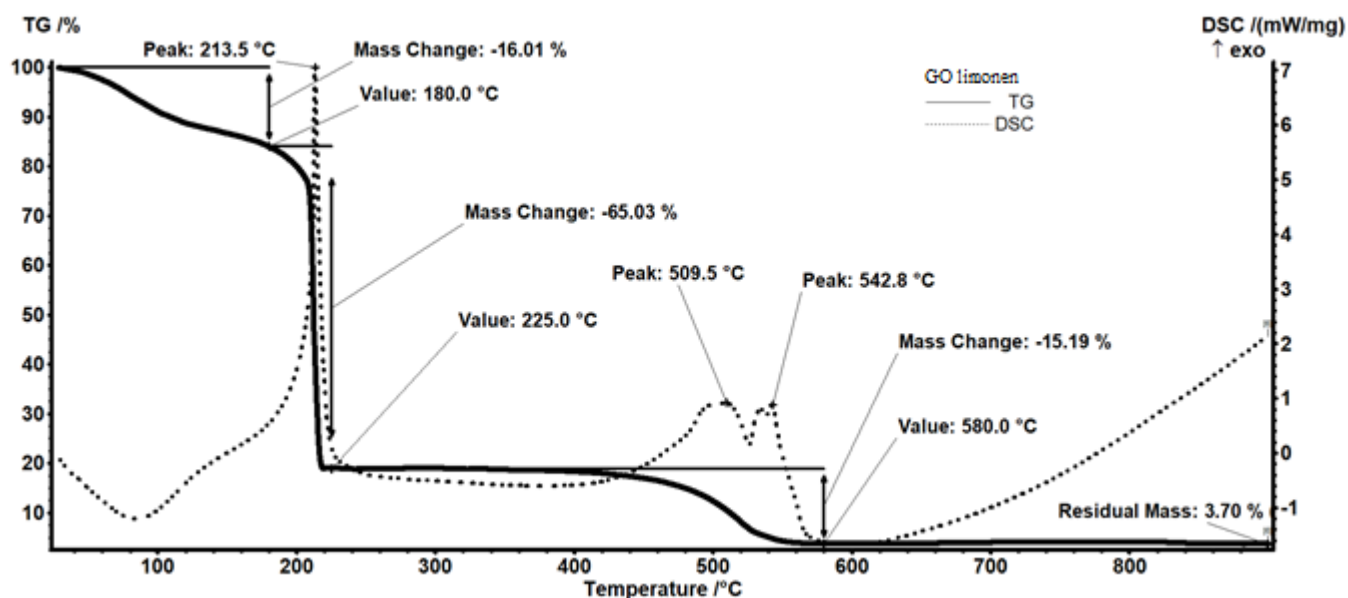


Figura 15. Analiza termică a grafenoxidului încărcat cu limonen

Analiza termică pentru proba cu ulei esențial de nucșoară indică o pierdere de masă lentă (12.53%) între RT-175°C, asemănătoare cu cea observată și la grafenoxid-ul simplu și la restul probelor, procesul fiind însoțit de un efect slab endoterm. Între 175-240°C are loc un proces exoterm, energic (o oxidare) cu maximum la 220.1°C, pierderea de masă asociată fiind de 23.25%. Proba pierde lent apoi masa până la 490°C (12.61%). În intervalul 490-640°C are loc oxidarea completă, pierderea de masă fiind de 45.97%, procesul fiind însoțit de un efect exoterm puternic, cu maximum la 590.7°C.

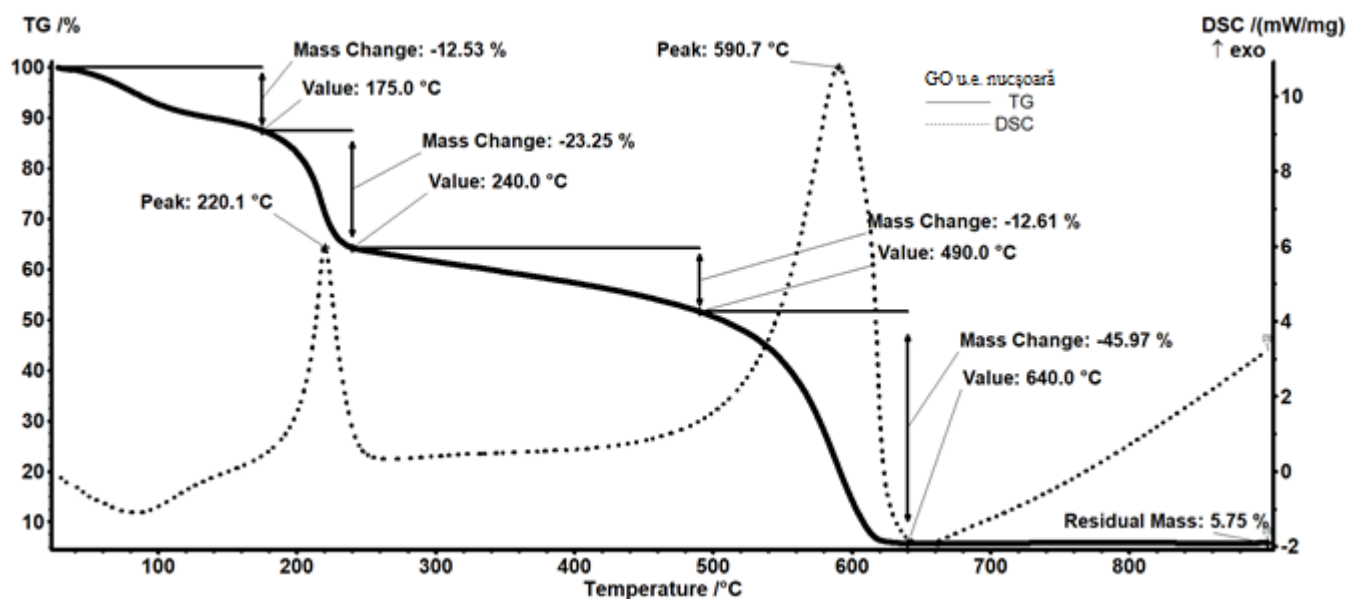


Figura 16. Analiza termică a grafenoxidului încărcat cu ulei esențial de nucșoară

Proba încărcată cu ulei essential de pin cembra prezintă o pierdere de masă lentă (12.35%) între RT-180°C, asemănătoare cu cea observată și la grafenoxid-ul simplu, procesul fiind însoțit de un efect slab endoterm. Între 180-250°C are loc un proces exoterm (o oxidare) cu maximum la 231.5°C, pierderea de masă asociată fiind de 23.54%. Proba pierde lent apoi masa până la 490°C (12.06%), fără a se putea observa vreun efect notabil pe curba DSC. În intervalul 490-640°C are loc oxidarea completă, pierderea de masă fiind de 45.84%, procesul fiind însoțit de un efect exoterm puternic, cu maximum la 588.6°C.

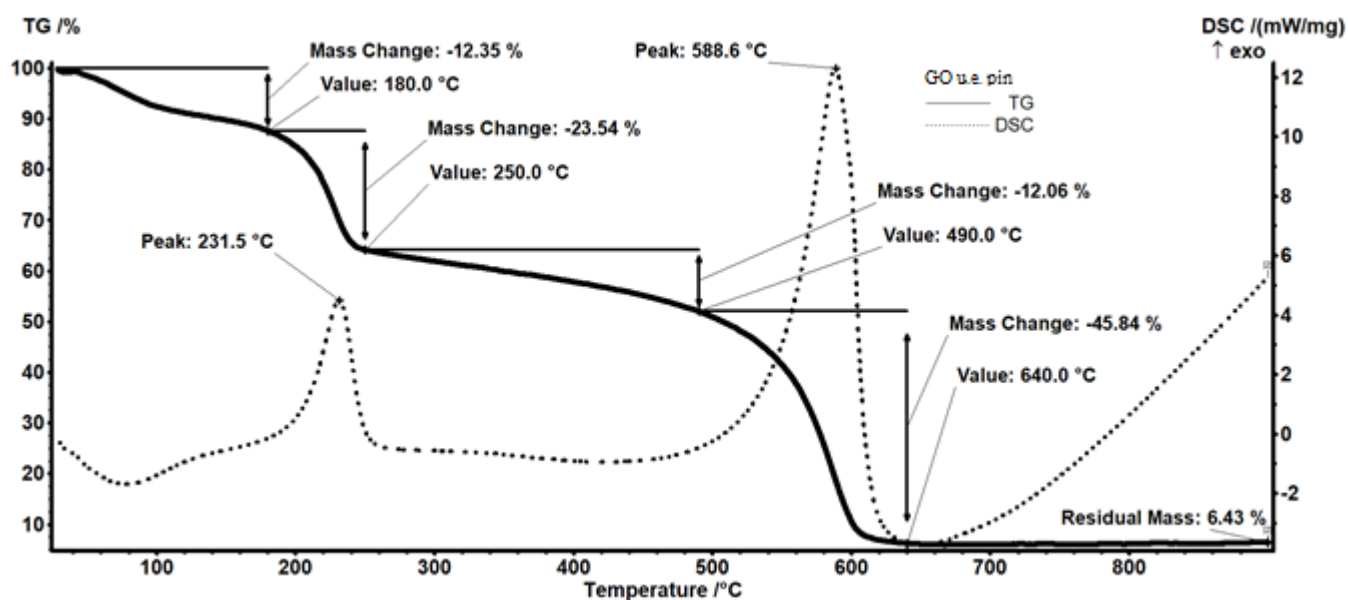


Figura 17. Analiza termică a grafenoxidului încărcat cu ulei esențial de pin cembra

Ca o concluzie a ceea ce s-a obținut în urma analizelor, avem oxidări lente (spre exemplu 215-365°C în proba cu acid galic), arderi (spre exemplu 490-640°C nutmeg) și ardere violentă (aproape de explozie, 180-225°C) la limonen.

Analiza fragmentelor funcționale ale grafenoxidului

Pentru analiza conținutului de grupe funcționale s-a folosit metoda Boehm. S-au dispersat 0,1 g grafenoxid în câte 100 ml de soluții de NaOH, NaHCO₃ și Na₂CO₃ de concentrații 0,1M. Soluțiile astfel obținute s-au agitat magnetic timp de 24 h, după care s-au filtrat la vid. Din extractele obținute s-au luat câte 5 ml și s-au titrat cu soluție de HCl 0,05M folosind ca indicator fenolftaleina. Pentru o interpretare corectă a rezultatelor, s-au obținut probe martor cu aceleași concentrații, fără grafenoxid [78, 79].

Concentrația grupelor funcționale s-a calculat presupunând că NaHCO₃ neutralizează doar grupările carboxilice, Na₂CO₃ neutralizează grupările carboxilice și lactonele și NaOH neutralizează toate grupele carboxilice, fenolice și lactonice. Conținutul de grupări carboxil este de 0,45 meq/g, de grupări fenolice 0,57 meq/g și grupări lactonice 0,15 meq/g, totalul grupărilor funcționale fiind de 1,17 meq/g. Conținutul de grupări fenolice este mai mare, acestea jucând un rol important în structura grafenoxidului.

Microscopie electronică de baleaj (SEM)

Imaginile de microscopie electronică de baleaj au fost obținute folosind un microscop electronic de baleaj de înaltă rezoluție, echipat cu o sursă de electroni cu emisie în câmp tip Schottky (FEI Inspect F50), cu rezoluția de 1,2 nm la 30 kV și 3 nm la 1 kV (BSE).

Morfologia probelor a fost observată prin microscopie electronică de baleaj (SEM) la diferite mărimi aplicate suprafeței materialelor de la 500X la 100 kX cu o tensiune de accelerare de 30 kV și o distanță de lucru de aproximativ 10 nm.

În Figura 18 se poate observa distribuția fulgilor de grafenoxid de dimensiuni micronice la mărimi de 500X, 10kX, 50kX și respectiv 100kX. Structura grafenoxidului este formată din foițe foarte subțiri aglomerate, așa cum se poate vedea la magnificații mici de 500X. La magnificații mari, se poate observa mai bine forma ondulată și pliata a grafenoxidului, rezultatele fiind asemănătoare cu cele obținute și prezentate și în alte studii din literatură [80-82].

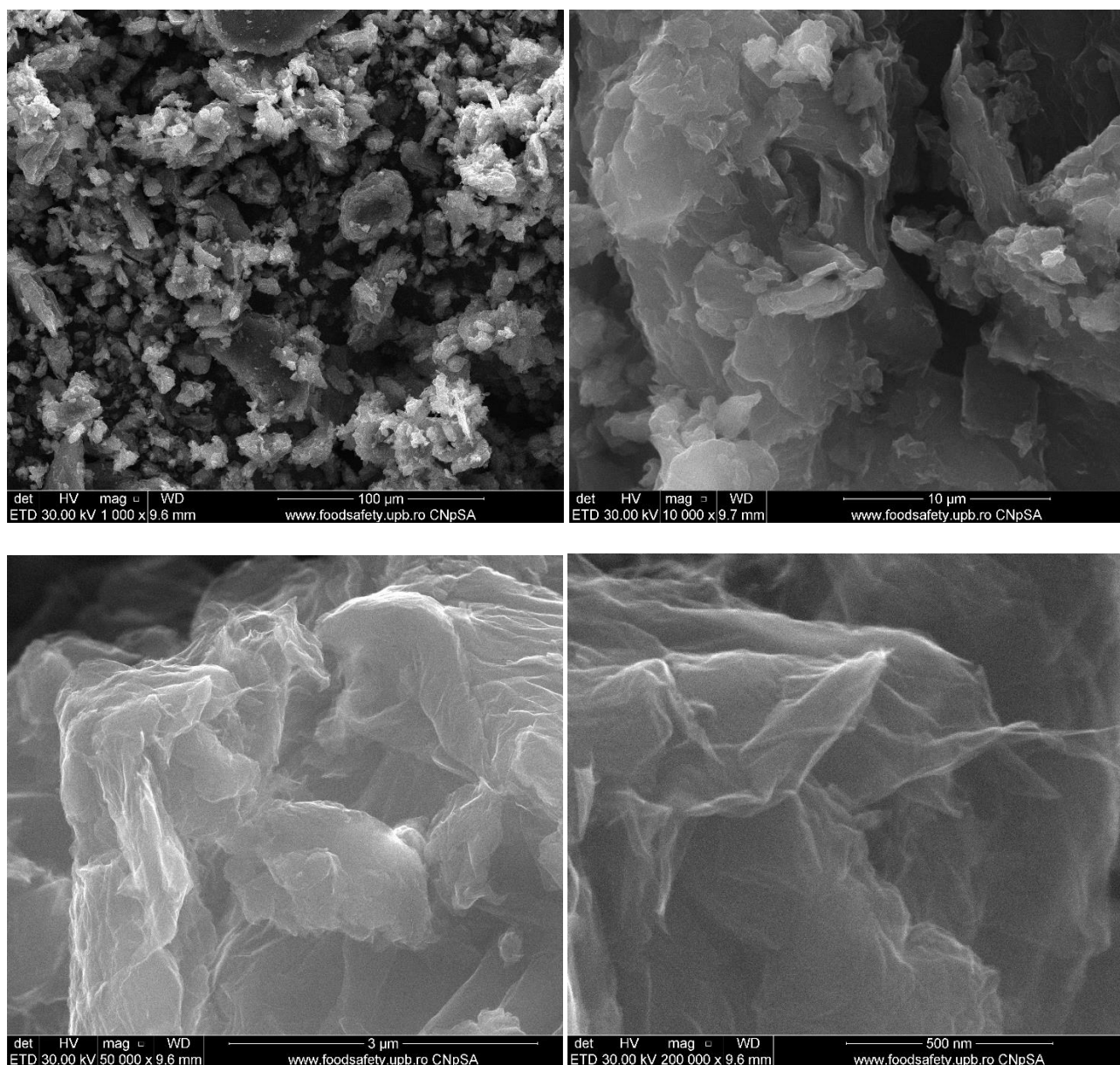
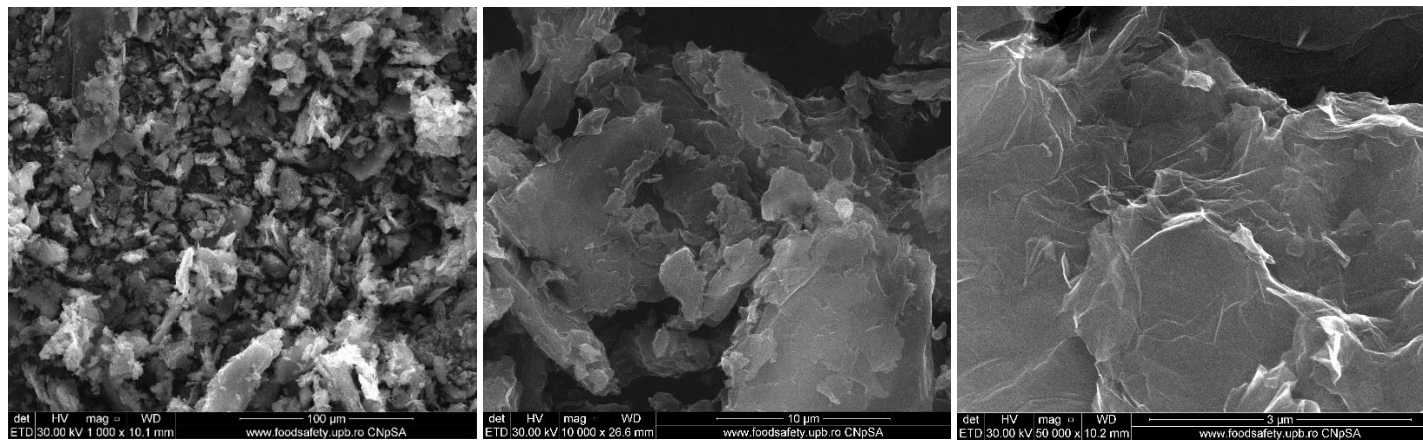
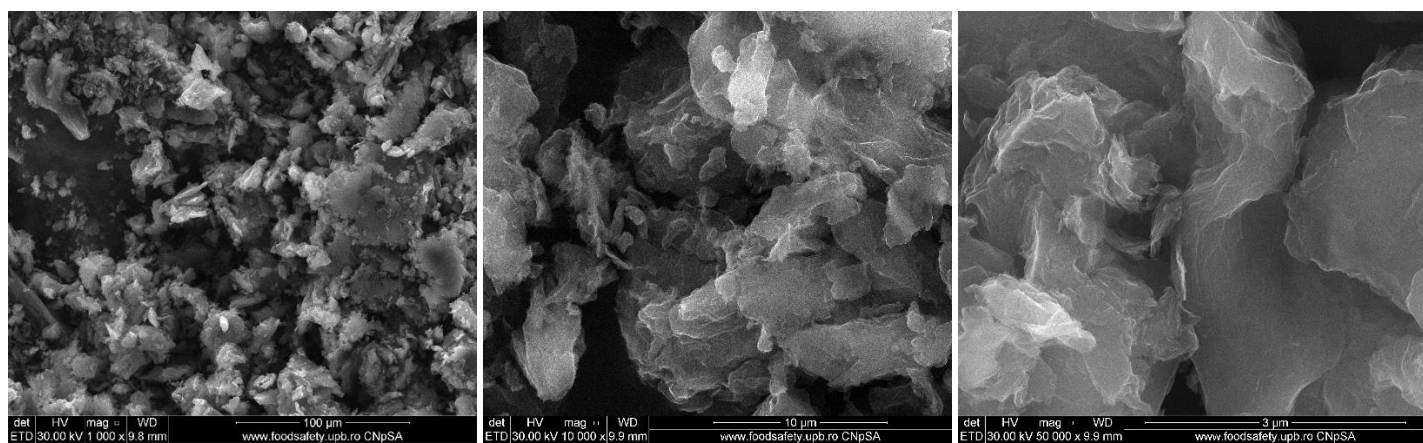


Figura 18. Microscopie electronică de baleaj grafenoxid

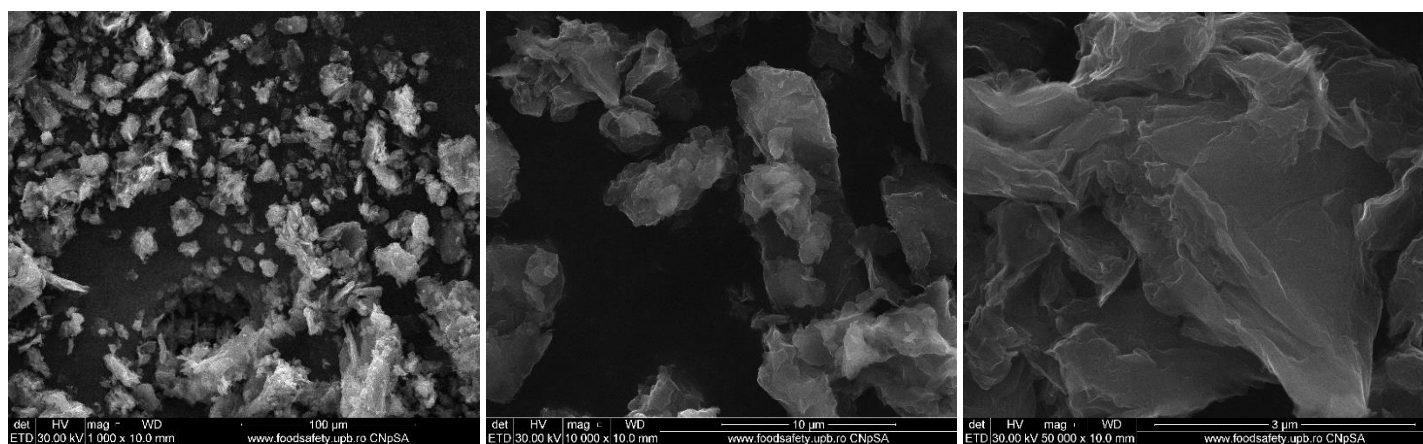
În cazul probelor de grafenoxid încărcate cu compuși activi (Figura 19) nu se observă modificări foarte mari ale structurii particulelor, având același aspect general ca și proba de grafenoxid. Se poate observa însă o ușoară creștere a gradului de aglomerare a particulelor datorată prezenței compușilor activi în proba de grafenoxid, acest lucru conferindu-le o formă ușor neregulată și mărită.



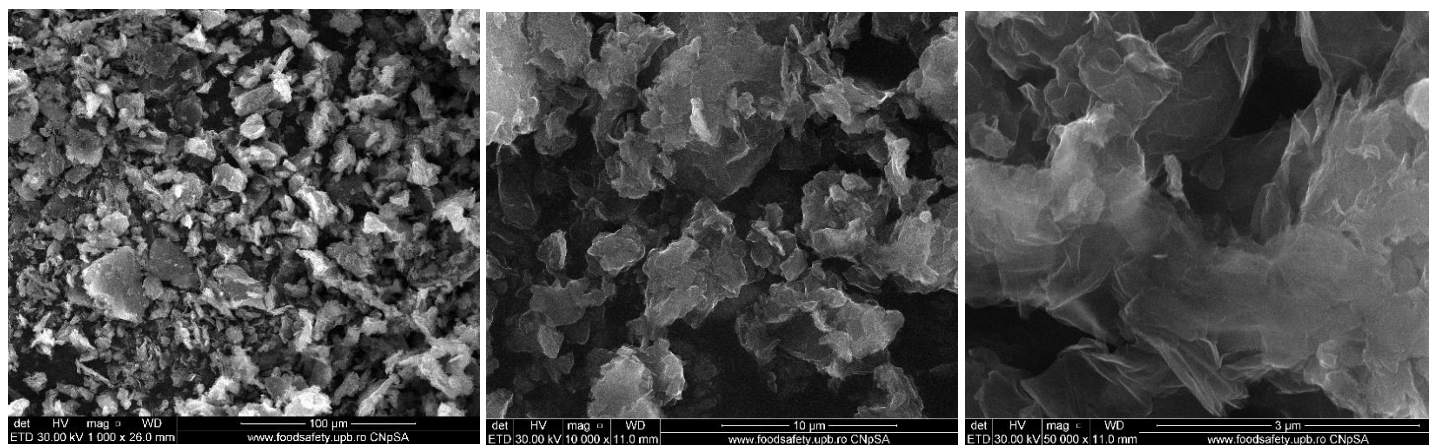
a)



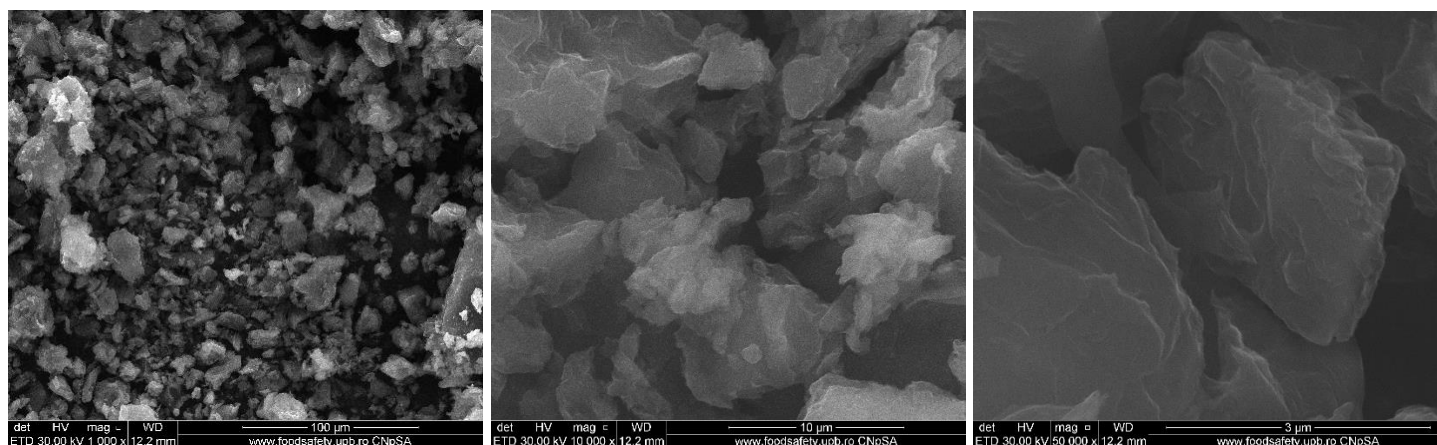
b)



c)



d)



e)

Figura 19. Microscopie electronica de baleaj a) GOGA, b) GOCA, c) GO limonen, d) GO ulei esențial de nucșoară, e) GO ulei esențial de pin cembra

Determinarea suprafeței specific prin metoda BET (Brunauer – Emmett – Teller)

Proba de grafenoxid a fost analizată cu un aparat Horiba de tip SA-9603MP, degazată la 150°C timp de 30 min până la obținerea unei mase constante.

Cu ajutorul analizei BET, s-a determinat suprafața specifică a grafenoxidului (149 m²/g), rezultatele indicând faptul că grafenoxidul are o textură poroasă acest lucru conferindu-i o capacitate de adsorbție bună pentru molecule [83-85].

Spectroscopie Raman

Analizele de spectroscopie Raman au fost realizate cu un aparat Horiba, utilizând un laser de 514 nm și obiectiv de 50X, cu un timp de achiziție de 10 secunde.

Spectroscopia Raman a fost utilizată pentru a analiza “dezordinea” și defectele din structura grafenoxidului și a grafenoxidului funcționalizat așa cum se poate vedea în Figura 10.

Spectrul Raman pentru grafenoxid coincide cu spectrele din literatură, prezentând peak-uri specifice acestui material. Modificarea intensitatii peak-urilor corespunzătoare benzilor D și G, poate fi folosită ca o măsură a “dezordinii” din grafenoxid, această bandă fiind accentuată de grupările funcționale ale oxigenului din material. O creștere a intensității benzilor indica creșterea gradului de “dezordine” a materialului. Banda D la grafenoxid apare la 1356 cm^{-1} și banda G apare la 1592 cm^{-1} [86, 87].

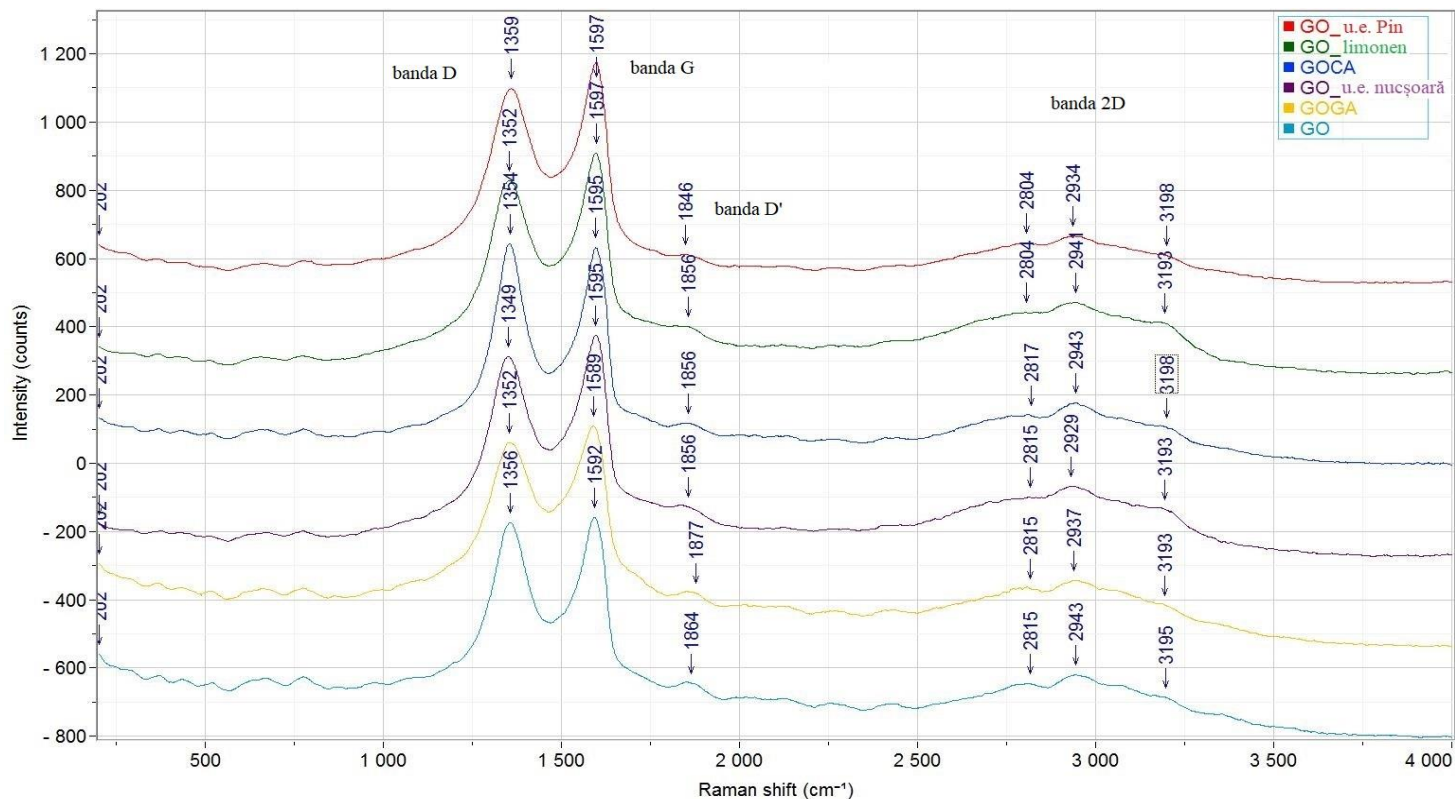


Figura 20. Spectrul Raman obținut pentru grafenoxid și grafenoxid funcționalizat cu acid galic, acid cafeic, limonen, ulei esențial de nucșoară și pincembra

Comparând spectrul grafenoxidului cu celelalte, observăm modificările de structură ce au apărut în timpul funcționalizării grafenoxidului cu compușii activi. Banda G, specifică formelor de carbon sp^2 , în cazul de față fiind observată la $\sim 1595\text{ cm}^{-1}$ și 1589 cm^{-1} în cazul grafenoxidului funcționalizat cu acid galic. Banda D ce corespunde prezenței dezordinii din rețeaua de carbon sp^3 , se poate observa la $\sim 1350\text{ cm}^{-1}$. Banda 2D apare în intervalul 2800 cm^{-1} și 3200 cm^{-1} . Spectrul Raman nu arată o diferență semnificativă între cele două benzi D și G. Schimbarea intensității peak-urilor dintre banda D și G în cazul grafenoxidului funcționalizat demonstrează grefarea grupărilor funcționale ale oxigenului de structura grafenoxidului [88, 89].

Concluzii și perspective

Ultimii 10 ani de literatură asupra studierii materialelor carbonice pentru aplicații biomedicale au dezvăluit și confirmat potențialul lor ca biomateriale. Atât grafen oxidul cât și nanotuburile de carbon generează efecte toxice atât *in vitro*, cât și *in vivo*, în timp ce modificările de suprafață pot reduce semnificativ interacțiunile lor toxice asupra sistemelor vii. Studii viitoare sunt însă necesare pentru a scădea efectele secundare ale nanomaterialelor obținute din materialele carbonice, în special grafen oxidul, pentru a fi utilizate în aplicații biomedicale.

Datorită efectelor secundare ale substanțelor sintetice precum antibioticele, asupra organismului uman, în ultimul timp a existat un mare interes pe utilizarea substanțelor naturale și în ultimii ani s-a pus mare accent pe dezvoltarea de nanomateriale încărcate cu substanțe bioactive.

Aplicațiile grafenoxidului în domeniul biomedicinii au fost demonstrate pe baza lucrărilor raportate în ultimii ani. În acest raport am prezentat sinteza unor sisteme de eliberare controlată bazate pe grafenoxid ca suport de încărcare cu diferite substanțe active cu proprietăți anticancerigene, antimicrobiene și antiinflamatorii, cu aplicații în domeniul medical.

Prin analizele efectuate dorim să demonstrăm biocompatibilitatea și proprietățile anticancerigene și antimicrobiene ale complexelor obținute. Din rezultatele obținute până în momentul de față, s-a demonstrat încărcarea cu succes a acidului galic pe suportul grafenoxidic. De asemenea s-a observat eliberarea lentă și continuă a acidului galic, ceea ce duce la creșterea viabilității substanței ducând la o eficiență terapeutică mai bună, scăzând astfel frecvența de dozare a medicamentului.

În ceea ce privește gradul de încărcare a grafenoxidului cu ceilalți compuși activi, datorită solubilității foarte scăzute eliberarea este nesemnificativă, iar conținutul de substanță activă eliberată în soluție este sub limita de detecție a metodei utilizate. Este nevoie de investigații viitoare pentru a putea determina capacitatea de adsorbție și eliberare și a celorlalte substanțe biologice active, prin analize specifice, astfel încât să prezinte proprietăți benefice organismului.

Caracterizarea SEM a arătat morfologia particulelor de grafenoxid, care în comparație cu probele încărcate, nu prezintă diferențe mari, ele fiind doar legate de o ușoară creștere a gradului de aglomerare a particulelor datorată prezenței compușilor activi în proba de grafenoxid. Toate aceste rezultate încurajează continuarea etapelor de cercetare prin efectuarea de studii viitoare *in vitro* și *in vivo* pentru demonstrarea acestor proprietăți.

Bibliografie

1. Marascu-Klein, V., *The applications of carbon materials in advanced technologies* International Conference on Economic Engineering and Manufacturing Systems, 2007. **8**: p. 313-316.
2. Biagiotti, G., et al., *Nanostructured carbon materials decorated with organophosphorus moieties: synthesis and application*. Beilstein J Nanotechnol, 2017. **8**: p. 485-493.
3. Yang, L., L. Zhang, and T.J. Webster, *Carbon nanostructures for orthopedic medical applications*. Nanomedicine (Lond), 2011. **6**(7): p. 1231-44.
4. Liu, H.Y., et al., *Carbon nanostructures in biology and medicine*. Journal of Materials Chemistry B, 2017. **5**(32): p. 6437-6450.
5. Ugnivenko, A., et al., *Carbon nanotubes in delivery of bioactive substances*. Journal of Bionanoscience, 2017: p. 1-43.
6. Urie, R., et al., *Inorganic Nanomaterials for Soft Tissue Repair and Regeneration*. Annu Rev Biomed Eng, 2018. **20**: p. 353-374.
7. He, H., et al., *Carbon nanotubes: applications in pharmacy and medicine*. Biomed Res Int, 2013. **2013**: p. 578290.
8. Liu, Z., et al., *Carbon Nanotubes in Biology and Medicine: In vitro and in vivo Detection, Imaging and Drug Delivery*. Nano Res, 2009. **2**(2): p. 85-120.
9. Sharma, P., et al., *Biomedical Applications of Carbon Nanotubes: A Critical Review*. Curr Drug Deliv, 2016. **13**(6): p. 796-817.
10. Alshehri, R., et al., *Carbon Nanotubes in Biomedical Applications: Factors, Mechanisms, and Remedies of Toxicity*. J Med Chem, 2016. **59**(18): p. 8149-67.
11. Mali, N., et al., *Carbon nanotubes as carrier for delivery of bioactive and therapeutic agents: An overview*. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 2011. **3**(3): p. 45-52.
12. Madani, S.Y., et al., *A new era of cancer treatment: carbon nanotubes as drug delivery tools*. Int J Nanomedicine, 2011. **6**: p. 2963-79.
13. Beg, S., et al., *Advancement in carbon nanotubes: basics, biomedical applications and toxicity*. J Pharm Pharmacol, 2011. **63**(2): p. 141-63.
14. Zhang, W., Z. Zhang, and Y. Zhang, *The application of carbon nanotubes in target drug delivery systems for cancer therapies*. Nanoscale Res Lett, 2011. **6**: p. 555.
15. Sanginario, A., B. Miccoli, and D. Demarchi, *Carbon Nanotubes as an Effective Opportunity for Cancer Diagnosis and Treatment*. Biosensors-Basel, 2017. **7**(1).
16. Kushwaha, S.K.S., et al., *Carbon nanotubes as a novel drug delivery system for anticancer therapy: a review*. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2013. **49**(4): p. 629-643.
17. Jogi, H., et al., *Carbon nanotubes in the delivery of anticancer herbal drugs*. Nanomedicine (Lond), 2018: p. 1187-1220.
18. Kumar, V., G. Toffoli, and F. Rizzolio, *Fluorescent carbon nanoparticles in medicine for cancer therapy*. ACS Med Chem Lett, 2013. **4**(11): p. 1012-3.
19. Cirillo, G., et al., *Antioxidant multi-walled carbon nanotubes by free radical grafting of gallic acid: new materials for biomedical applications*. J Pharm Pharmacol, 2011. **63**(2): p. 179-88.
20. Haroun, A.A. and H.A.A. Taie, *Cytotoxicity and Antioxidant Activity of Beta vulgaris Extract Released from Grafted Carbon Nanotubes Based Nanocomposites*. Macromolecular Symposia, 2014. **337**(1): p. 25-33.
21. Foo, M.E., et al., *Antimicrobial activity of functionalized single-walled carbon nanotube with herbal extract of Hempedu bumi*. Surface and Interface Analysis, 2018. **50**(3): p. 354-361.
22. Daneshmehr, S., *Carbon Nanotubes for Delivery of Quercetin as Anticancer Drug: Theoretical Study*. 5th International Biennial Conference on Ultrafine Grained and Nanostructured Materials, Ufgnsm15, 2015. **11**: p. 131-136.

23. Rajavel, K., et al., *Characterization of tannic acid- and gallic acid-functionalized single- and multiwalled carbon nanotubes and an in vitro evaluation of their antioxidant properties*. Journal of Taibah University Medical Sciences, 2016. **11**(5): p. 469-477.
24. Zhang, Y., Y. Bai, and B. Yan, *Functionalized carbon nanotubes for potential medicinal applications*. Drug Discov Today, 2010. **15**(11-12): p. 428-35.
25. Chung, C., et al., *Biomedical applications of graphene and graphene oxide*. Acc Chem Res, 2013. **46**(10): p. 2211-24.
26. Zhou, X. and F. Liang, *Application of graphene/graphene oxide in biomedicine and biotechnology*. Curr Med Chem, 2014. **21**(7): p. 855-69.
27. Kumar, K.S., M. Das Modac, and P. Paik, *Graphene Oxide for Biomedical Applications*. Journal of Nanomedicine Research, 2017. **5**(6): p. 1-6.
28. Singh, D.P., et al., *Graphene oxide: An efficient material and recent approach for biotechnological and biomedical applications*. Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications, 2018. **86**: p. 173-197.
29. Singh, S.K., et al., *Amine-modified graphene: thrombo-protective safer alternative to graphene oxide for biomedical applications*. ACS Nano, 2012. **6**(3): p. 2731-40.
30. Wu, S.Y., S.S. An, and J. Hulme, *Current applications of graphene oxide in nanomedicine*. Int J Nanomedicine, 2015. **10 Spec Iss**: p. 9-24.
31. Wang, K., et al., *Biocompatibility of Graphene Oxide*. Nanoscale Res Lett, 2011. **6**(1): p. 8.
32. Dreyer, D.R., et al., *The chemistry of graphene oxide*. Chemical Society Reviews, 2010. **39**(1): p. 228-240.
33. Wu, S., et al., *Cytotoxicity of graphene oxide and graphene oxide loaded with doxorubicin on human multiple myeloma cells*. Int J Nanomedicine, 2014. **9**: p. 1413-21.
34. Han, W., et al., *Biofabrication of polyphenols stabilized reduced graphene oxide and its anti-tuberculosis activity*. J Photochem Photobiol B, 2016. **165**: p. 305-309.
35. Pan, Y., N.G. Sahoo, and L. Li, *The application of graphene oxide in drug delivery*. Expert Opin Drug Deliv, 2012. **9**(11): p. 1365-76.
36. Jianchang, L., et al., *The Preparation of Graphene Oxide and Its Derivatives and Their Application in Bio-Tribological Systems*. Lubricants, 2014. **2**: p. 137-161.
37. Sebe, I., et al., *Polymers and Formulation Strategies of Nanofibrous Systems for Drug Delivery Application and Tissue Engineering*. Current Medicinal Chemistry, 2015. **22**(5): p. 604-617.
38. Wang, X.Q., et al., *High efficient anti-cancer drug delivery systems using tea polyphenols reduced and functionalized graphene oxide*. Journal of Biomaterials Applications, 2017. **31**(8): p. 1108-1122.
39. Chanwitheesuk, A., et al., *Antimicrobial gallic acid from Caesalpinia mimosoides Lamk*. Food Chemistry, 2007. **100**(3): p. 1044-1048.
40. Santos, A., et al., *Leaves and decoction of Juglans regia L.: Different performances regarding bioactive compounds and in vitro antioxidant and antitumor effects*. Industrial Crops and Products, 2013. **51**: p. 430-436.
41. Cosmulescu, S., I. Trandafir, and V. Nour, *Seasonal variation of the main individual phenolics and juglone in walnut (Juglans regia) leaves*. Pharmaceutical Biology, 2014. **52**(5): p. 575-580.
42. Fernandez-Agullo, A., et al., *Influence of solvent on the antioxidant and antimicrobial properties of walnut (Juglans regia L.) green husk extracts*. Industrial Crops and Products, 2013. **42**: p. 126-132.
43. Zhang, X.B., et al., *Activity guided isolation and modification of juglone from Juglans regia as potent cytotoxic agent against lung cancer cell lines*. BMC Complementary and Alternative Medicine, 2015. **15**.
44. Weng, Y.P., et al., *The inhibitory activity of gallic acid against DNA methylation: application of gallic acid on epigenetic therapy of human cancers*. Oncotarget, 2018. **9**(1): p. 361-374.

45. Dorniani, D., et al., *Graphene Oxide-Gallic Acid Nanodelivery System for Cancer Therapy*. *Nanoscale Res Lett*, 2016. **11**(1): p. 491.
46. Zuo, Y.G., H. Chen, and Y.W. Deng, *Simultaneous determination of catechins, caffeine and gallic acids in green, Oolong, black and pu-erh teas using HPLC with a photodiode array detector*. *Talanta*, 2002. **57**(2): p. 307-316.
47. Mota, F.L., et al., *Aqueous solubility of some natural phenolic compounds*. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 2008. **47**(15): p. 5182-5189.
48. Ji, W.Q., et al., *Measurement and correlation of the solubility of caffeic acid in eight mono and water plus ethanol mixed solvents at temperatures from (293.15 to 333.15) K*. *Journal of Molecular Liquids*, 2016. **224**: p. 1275-1281.
49. Zahi, M.R., H. Liang, and Q.P. Yuan, *Improving the antimicrobial activity of D-limonene using a novel organogel-based nanoemulsion*. *Food Control*, 2015. **50**: p. 554-559.
50. Yang, C., et al., *Antioxidant and Anticancer Activities of Essential Oil from Gannan Navel Orange Peel*. *Molecules*, 2017. **22**(8).
51. de Doz, M.B.G., A.M. Cases, and H.N. Solimo, *(Liquid plus liquid) equilibria of (water plus linalool plus limonene) ternary system at T = (298.15, 308.15, and 318.15) K*. *Journal of Chemical Thermodynamics*, 2008. **40**(11): p. 1575-1579.
52. Mendanha, S.A., et al., *Effects of nerolidol and limonene on stratum corneum membranes: A probe EPR and fluorescence spectroscopy study*. *International Journal of Pharmaceutics*, 2017. **532**(1): p. 547-554.
53. Inouye, S., T. Takizawa, and H. Yamaguchi, *Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2001. **47**(5): p. 565-573.
54. Swamy, M.K., M.S. Akhtar, and U.R. Sinniah, *Antimicrobial Properties of Plant Essential Oils against Human Pathogens and Their Mode of Action: An Updated Review*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2016.
55. Al-Rawi, S.S., et al., *The effect of supercritical fluid extraction parameters on the nutmeg oil extraction and its cytotoxic and antiangiogenic properties*. *11th International Congress on Engineering and Food (Icef11)*, 2011. **1**: p. 1946-1952.
56. Martinez Paino, I.M., F. Santos, and V. Zucolotto, *Biocompatibility and toxicology effects of graphene oxide in cancer, normal, and primary immune cells*. *J Biomed Mater Res A*, 2017. **105**(3): p. 728-736.
57. Bugli, F., et al., *Curcumin-loaded graphene oxide flakes as an effective antibacterial system against methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. *Interface Focus*, 2018. **8**(3): p. 20170059.
58. Qian, W., et al., *Polydimethylsiloxane incorporated with reduced graphene oxide (rGO) sheets for wound dressing application: Preparation and characterization*. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2018. **166**: p. 61-71.
59. Yurt, F., et al., *Preparation and evaluation of effect on Escherichia coli and Staphylococcus aureus of radiolabeled ampicillin-loaded graphene oxide nanoflakes*. *Chem Biol Drug Des*, 2018. **91**(6): p. 1094-1100.
60. Lu, B., et al., *Graphene-based composite materials beneficial to wound healing*. *Nanoscale*, 2012. **4**(9): p. 2978-82.
61. Terzopoulou, Z., G.Z. Kyzas, and D.N. Bikiaris, *Recent Advances in Nanocomposite Materials of Graphene Derivatives with Polysaccharides*. *Materials (Basel)*, 2015. **8**(2): p. 652-683.
62. Peng, R., et al., *Isolation of ellagic acid from pomegranate peel extract by hydrophobic interaction chromatography using graphene oxide grafted cotton fiber adsorbent*. *J Sep Sci*, 2018. **41**(3): p. 747-755.
63. Saifullah, B., et al., *Sustained release formulation of an anti-tuberculosis drug based on para-amino salicylic acid-zinc layered hydroxide nanocomposite*. *Chemistry Central Journal*, 2013. **7**.

64. Dorniani, D., et al., *Controlled-release formulation of perindopril erbumine loaded PEG-coated magnetite nanoparticles for biomedical applications*. Journal of Materials Science, 2014. **49**(24): p. 8487-8497.
65. Mohammed-Ziegler, I. and F. Billes, *Vibrational spectroscopic calculations on pyrogallol and gallic acid*. Journal of Molecular Structure-Theochem, 2002. **618**(3): p. 259-265.
66. Dimitric-Markovic, J.M., et al., *A study of the IR spectra of the copigments of malvin chloride with organic acids*. Journal of the Serbian Chemical Society, 2001. **66**(7): p. 451-462.
67. Urena, F.P., J.R.A. Moreno, and J.J.L. Gonzalez, *Conformational study of (R)-(+)-limonene in the liquid phase using vibrational spectroscopy (IR, Raman, and VCD) and DFT calculations*. Tetrahedron-Asymmetry, 2009. **20**(1): p. 89-97.
68. Jukic, M., O. Politeo, and M. Milos, *Chemical composition and antioxidant effect of free volatile aglycones from nutmeg (Myristica fragrans Houtt.) compared to its essential oil*. Croatica Chemica Acta, 2006. **79**(2): p. 209-214.
69. Muchtaridi, et al., *Identification of Compounds in the Essential Oil of Nutmeg Seeds (Myristica fragrans Houtt.) That Inhibit Locomotor Activity in Mice*. International Journal of Molecular Sciences, 2010. **11**(11): p. 4771-4781.
70. Shafiq, M.I., et al., *Chemical Composition of the Essential Oils of Nutmeg and Mace by GC-FID/MS Indigenous to Pakistan and Evaluation of their Biological Activities*. Latin American Journal of Pharmacy, 2016. **35**(10): p. 2176-2184.
71. Salem, M.Z.M., H.M. Ali, and M.O. Basalah, *Essential Oils from Wood, Bark, and Needles of Pinus roxburghii Sarg. from Alexandria, Egypt: Antibacterial and Antioxidant Activities*. Bioresources, 2014. **9**(4): p. 7454-7466.
72. Peng, L., et al., *An improved HPLC method for simultaneous determination of phenolic compounds, purine alkaloids and theanine in Camellia species*. Journal of Food Composition and Analysis, 2008. **21**(7): p. 559-563.
73. Huang, X. and C.S. Brazel, *On the importance and mechanisms of burst release in matrix-controlled drug delivery systems*. Journal of Controlled Release, 2001. **73**(2-3): p. 121-136.
74. Kampars, V. and M. Legzdina, *Thermal deoxygenation of graphite oxide at low temperature*. 12th Russia/Cis/Baltic/Japan Symposium on Ferroelectricity and 9th International Conference on Functional Materials and Nanotechnologies (Rcbjfs-2014-Fm&Nt), 2015. **77**.
75. Niu, Y.A., et al., *Reduction and structural evolution of graphene oxide sheets under hydrothermal treatment*. Physics Letters A, 2016. **380**(38): p. 3128-3132.
76. Zhang, H., et al., *A Study of Graphene Oxidation Using Thermal Analysis-Mass Spectrometry Combined with Pulse Thermal Analysis*. Acta Physico-Chimica Sinica, 2016. **32**(7): p. 1634-1638.
77. Stathi, P., et al., *Stabilization of Phenolic Radicals on Graphene Oxide: An XPS and EPR Study*. Langmuir, 2015. **31**(38): p. 10508-10516.
78. Nekahi, A., S.P.H. Marashi, and D.H. Fatmesari, *Modified structure of graphene oxide by investigation of structure evolution*. Bulletin of Materials Science, 2015. **38**(7): p. 1717-1722.
79. Kumar, N. and V.C. Srivastava, *Simple Synthesis of Large Graphene Oxide Sheets via Electrochemical Method Coupled with Oxidation Process*. Acs Omega, 2018. **3**(8): p. 10233-10242.
80. Gurunathan, S., et al., *Green synthesis of graphene and its cytotoxic effects in human breast cancer cells*. International Journal of Nanomedicine, 2013. **8**: p. 1015-1027.
81. Zaaba, N.I., et al., *Synthesis of Graphene Oxide using Modified Hummers Method: Solvent Influence*. Advances in Material & Processing Technologies Conference, 2017. **184**: p. 469-477.
82. Li, J.D., et al., *Preparation and characterization of graphene oxide/Ag₂CO₃ photocatalyst and its visible light photocatalytic activity*. Applied Surface Science, 2015. **358**: p. 168-174.
83. Hashemi, H. and H. Namazi, *Sonochemically synthesized blue fluorescent functionalized graphene oxide as a drug delivery system*. Ultrasonics Sonochemistry, 2018. **42**: p. 124-133.

84. Cano, M., et al., *Reduced graphene oxide: firm support for catalytically active palladium nanoparticles and game changer in selective hydrogenation reactions*. *Nanoscale*, 2013. **5**(21): p. 10189-10193.
85. Cheng, H.M., et al., *Preparation, characterization, and properties of graphene-based composite aerogels via in situ polymerization and three-dimensional self-assembly from graphene oxide solution*. *Rsc Advances*, 2016. **6**(82): p. 78538-78547.
86. Dresselhaus, M.S., et al., *Perspectives on Carbon Nanotubes and Graphene Raman Spectroscopy*. *Nano Letters*, 2010. **10**(3): p. 751-758.
87. Gurunathan, S., et al., *Oxidative stress-mediated antibacterial activity of graphene oxide and reduced graphene oxide in Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Nanomedicine*, 2012. **7**: p. 5901-5914.
88. Dorniani, D., et al., *Graphene Oxide-Gallic Acid Nanodelivery System for Cancer Therapy*. *Nanoscale Research Letters*, 2016. **11**.
89. Krishnamoorthy, K., et al., *Investigation of Raman and photoluminescence studies of reduced graphene oxide sheets*. *Applied Physics a-Materials Science & Processing*, 2012. **106**(3): p. 501-506.