

RAPORT FINAL DE ACTIVITATE

Suporturi magnetice destinate eliberării inteligente de substanțe biologice active

Director de Proiect:

Prof. Dr. Ing. Ecaterina ANDRONESCU

Membru Titular al AOSR

Cercetători:

As. Univ. Drd. Ing. Ionela Andreea NEACȘU

As. Univ. Drd. Ing. Vladimir Lucian ENE

Universitatea POLITEHNICA din București

Noiembrie 2019

CUPRINS

1. Introducere	3
1.1 Nanoparticule magnetice - aplicații biomedicale.....	3
1.2 Suporturi magnetice destinate eliberării de substanțe bioactive	6
1.3 Modificarea suprafețelor nanoparticulelor de magnetită	10
1.4 Rezistența la antibiotice - o problemă actuală	12
1.5 Magnetita funcționalizată - aplicații în tratarea infecțiilor	14
1.6 Substanțe biologice active cu efect antitumoral și antimicrobian	17
1.6.1 Penicilina.....	17
1.6.2 Fludarabina	19
1.6.3 Canabidiol	21
2. Materiale și metode.....	22
2.1 Materiale	22
2.2 Metode de obținere	22
2.2.1 Sinteza Fe_3O_4	22
2.2.2 Sinteza $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Penicilină.....	22
2.2.3 Sinteza $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Fludarabină.....	23
2.2.4 Sinteza $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Penicilină+Fludarabină	23
2.2.5 Sinteza $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Chitosan	24
2.2.6 Sinteza $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Chitosan+Canabidiol.....	24
2.3 Metode de caracterizare morfo-structurală	25
2.4 Metode de caracterizare biologică in-vitro	26
2.4.1 Evaluarea calitativă a potențialului antimicrobian.....	26
2.4.2 Evaluarea cantitativă a potențialului antimicrobian.....	27
2.4.3 Evaluarea viabilității celulare – MTT	27

3. Rezultate și discuții	28
4. Concluzii	40
5. Referințe bibliografice	41

1. Introducere

1.1 Nanoparticule magnetice - aplicații biomedicale

Magnetita [Fe_3O_4] este un mineral care poate fi obținut în laborator, dar este regăsit și în natură, rezultat în urma proceselor la temperatură ridicată, cedată de lava vulcanică sau întâlnit în roci metamorfice sau sedimentare. Aceasta are aplicații în multiple domenii precum în construcții, unde este utilizată sub formă granulată în ziduri cu scopul de protecție împotriva radiațiilor, dar mai este utilizată și pentru filtrarea și curățarea apelor. Detaliile referitoare la structura magnetitei au fost stabilite pentru prima dată în anul 1915 când a fost realizată prima difracție de raze X pe o structură cristalină. Aceasta este un mineral din grupa oxizilor de fier fiind cel mai rezistent, față de acizi și baze, în cadrul căruia cei trei ioni de Fe se prezintă sub forma: doi Fe^{3+} și unul Fe^{2+} . Magnetita cristalizează în sistemul cubic cu fețe centrate, iar suprafața cristalului este octaedru sau rombdodecaedru.

Magnetita prezintă un caracter feromagnetic puternic, dar se consideră că acesta este influențat de mărimea particulelor. Mărimea necesară a particulelor pentru a obține superparamagnetism este estimată sub valoarea de 20 nm, în timp ce dimensiunea critică pentru formarea unei structuri este estimată la 76 nm pentru cubic, cu toate că valoarea critică determinată anterior pentru particulele cubice a fost de 160 nm.

Faptul că mărimea particulelor influențează magnetizația acestora este cunoscut, însă nu și în ce sens. Studiile recente au arătat că saturația magnetizării va crește indiferent de structura cristalină sau forma particulelor, ceea ce este contrar studiilor anterioare conform cărora saturația magnetizării este mai scăzută pentru particulele sferice comparativ cu cele cubice [1].

Domeniul biomedical a cunoscut, în ultimele decenii, o evoluție semnificativă, ca urmare a dezvoltării materialelor la scală nanometrică. Biocompatibilitatea și toxicitatea nanoparticulelor de oxid de fier sunt două criterii care trebuie luate în considerare în cadrul aplicațiilor biomedicale. În plus, particulele magnetice trebuie să prezinte o magnetizare suficient de mare pentru a permite controlul deplasării acestora în sistemul circulator către țesutul țintă, prin intermediul aplicării unui câmp magnetic extern. Nanoparticulele de magnetită ce prezintă o perioadă de retenție ridicată în sistemul circulator, biodegradabilitate și grad scăzut de toxicitate, s-au dovedit a fi unele dintre cele mai promițătoare nanomateriale pentru aplicațiile biomedicale *in vitro* și *in vivo* [2, 3]. În Figura 1 sunt prezentate câteva dintre posibilele aplicații biomedicale ale nanoparticulelor de magnetite, iar cele mai importante vor fi ulterior detaliate.

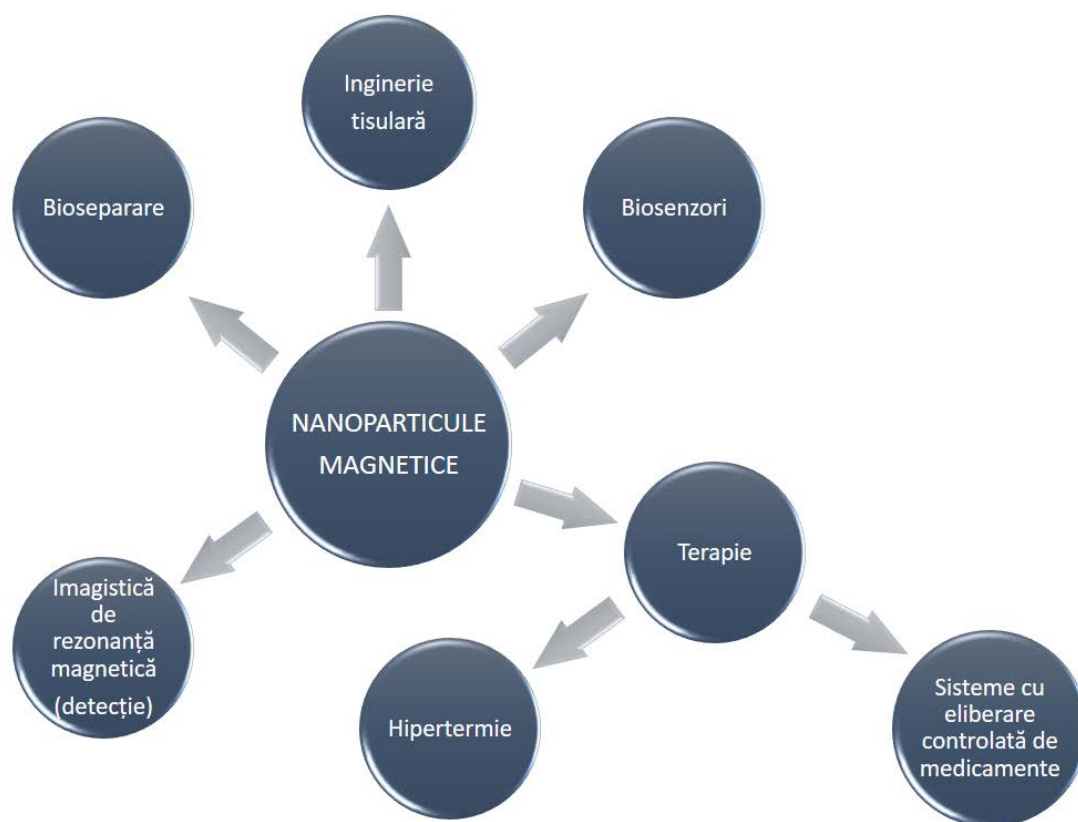


Figura 1. Aplicații biomedicale ale nanoparticulelor magnetice

Imagistică prin rezonanță magnetică nucleară (RMN) ca agent de contrast în identificarea și marcarea țesuturilor canceroase. În cadrul acestei tehnici, nanoparticulele magnetice sunt utilizate ca agenți de contrast, ghidați către zonele de interes prin intermediul unui câmp magnetic extern, în scopul detecției formațiunilor tumorale, putând face mult mai sigură operația. Prin această metodă se obțin imagini mult mai clare comparativ cu alte tehnici de imagistică și datorită proprietăților sale biologice se elimină rapid din organism, fără a produce efecte adverse [4].

În transportul și eliberarea controlată a medicamentelor unde magnetita este funcționalizată de obicei cu un sistem cu rețea polimerică care să îl livreze în sistem în mod constant pentru o perioadă variabilă de timp. Controlul asupra țintirii este favorizat de aspecte precum: volumul moleculei, concentrația de compus, tipul de suprafață (hidrofob/ hidrofil) sau elementele depuse pe aceasta (lipide, proteine).

În tratamentul cancerului prin hipertermie. În general, aceasta constă în utilizarea căldurii din diferite surse precum unde electromagnetice sau ultrasunete pentru a distruge celulele canceroase prin denaturarea proteinelor ce compun membrana celulară și citoplasma. Ideea hipertermiei folosită ca inductor artificial de temperatură peste pragul de 46°C în corpul

uman există de decenii. Hipertermia este de obicei folosită în combinație cu alte terapii precum chemoterapia sau radioterapia [5].

Mecanismul care stă la baza radiosensibilității termice constă în faptul că prin căldură se produce vasodilatație și reducerea vitezei de curgere a sângelui pentru menținerea fluxului constant în timpul ridicării presiunii în vas. În cazul în care țesutul tumoral este conectat la rezerve de sânge prin propriile vase, viteza scăzută a curgerii și diferențele de presiune favorizează schimbul de gaze dintre spațiul extracelular și cel intratumoral, ducând la concentrații mari de O_2 în țesutul canceros, eficientizând radioterapia. Similar, sensibilitatea chimică apare datorită livrării medicamentului. Aceste procese au loc în prima fază a hipertermiei ($<43^\circ C$). Când temperatura este ridicată la nivele letale ($>43^\circ C$), hipertermia poate afecta exteriorul tumorii prin hipoxia și acidoza tumorii datorate vitezei slabe de curgere a sângelui.

Tehnologia bazată pe simpla aplicare a temperaturii este limitată de localizarea și greutatea cu care se poate ajunge la tumoare, precum și de efectele secundare datorate căldurii care poate ajunge la țesuturi înconjurătoare sănătoase.

Folosirea nanomaterialelor poate combate aceste probleme. În expunerea nanoparticulelor de oxid de fier la câmpuri magnetice alternative, căldura este generată de relaxarea Neel și rotația Browniană. În mod ideal, nanoparticule bifunctionalizate pot fi trimise (prin țintire activă sau pasivă) către tumoră, unde se acumulează. Dacă un stimul extern este aplicat, temperatura celulelor adiacente particulelor este mărită considerabil mai repede decât celulele mai îndepărtate. În acest mod, celulele din vecinătatea particulelor pot fi distruse selectiv, în același timp reducând perioada de expunere a organismului la stimulii externi.

De asemenea, pe lângă aplicațiile din domeniul biomedical și de îngrijire a sănătății, nanoparticulele magnetice pot fi utilizate și în domeniul agricol ca nanofertilizatori, antifungici și pesticide, pentru protecția mediului (prevenția poluării și purificarea apei) [6], pentru obținerea celulelor fotovoltaice, în ingineria aerospațială (dezvoltarea de senzori, electronice, materiale inteligente), în ingineria construcțiilor (nanoacoperiri, senzori nanometrici, aditivi, agenți de pigmentare), în industria constructoare de mașini, industria textilă și în domeniul electronicii [7].

1.2 Suporturi magnetice destinate eliberării de substanțe bioactive

Majoritatea medicamentelor pentru terapia cancerului dezvoltate până acum nu sunt specifice pentru celulele maligne care trebuie vizate, acestea răspândindu-se în întregul corp după injectare. În consecință, pentru a atinge pragul minim de concentrație al oricărui medicament anticanceros în locația dorită, părțile sănătoase ale corpului sunt expuse unor niveluri similare de medicament. Această situație limitează doza maximă a unui medicament dat pe baza efectelor secundare de toxicitate.

De asemenea, deoarece majoritatea medicamentelor sunt prelucrate și excretate fie prin ficat, fie prin rinichi, administrarea acestor medicamente la pacienții cu leziuni la rinichi sau ficat poate determina niveluri de toxicitate insuportabile la pacient, cu imposibilitatea de a-l metaboliza și elimina. Injectarea locală este, desigur, cea mai simplă strategie de direcționare pentru rezolvarea problemelor de mai sus, dar este limitată la tumori cu dimensiuni considerabile și limitată de accesibilitatea în regiunea tumorală.

Scopul final al terapiei anticanceroase ar trebui să fie prelungirea timpului de supraviețuire și creșterea calității vieții pacientului. Prin urmare, cea mai mare necesitate în cazul unui tratament al unei tumori este un sistem de administrare a medicamentelor care poate furniza selectiv agenți anticancerigeni către un țesut specific al medicamentului cu concentrația necesară pentru zona respectivă, obținându-se astfel eficacitate terapeutică în același timp cu minimizarea efectelor secundare toxice.

Pentru a îmbunătăți indicele terapeutic al medicamentelor, eforturile specialiștilor s-au concentrat asupra dezvoltării unor noi suporturi de transport care să asigure o livrare țintită a substanței active (figura 2).

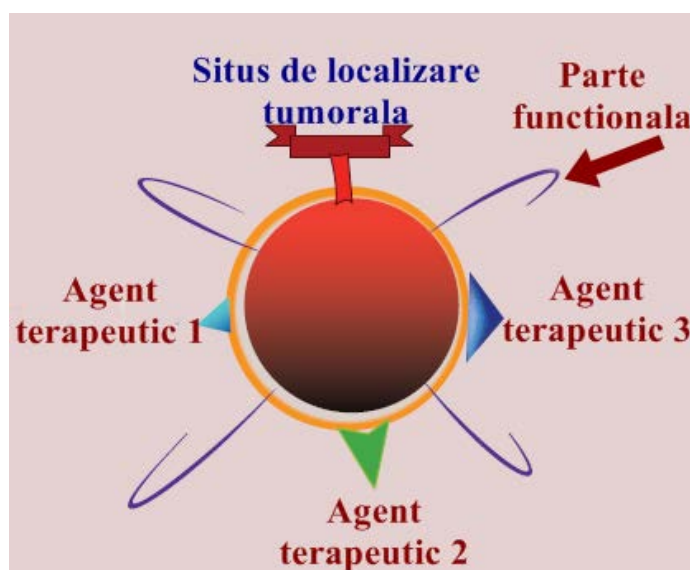


Figura 2. Model de sistem complex pentru localizare și tratare a tumorilor

Până la momentul actual, forme variate de sisteme de transport au fost create, incluzând utilizarea de materiale anorganice (nanoparticule de aur, materiale carbonice, silice mezoporoasă), materiale hibride de tip compus anorganic-polimer sau chiar lipozomi (tabel 1).

Deși aceste noi suporturi prezintă avantaje precum îmbunătățirea solubilității medicamentului și menținerea prelungită a acestuia sub formă circulantă, utilizarea lor în context clinic e împiedicată de obstacole precum lipsa unei acțiuni țintite la nivelul procesului tumoral, o internalizare celulară scăzută și bioacumularea în țesuturile sănătoase ce atrage după sine efecte secundare importante.

Tabel 1. Mecanisme de bază și tipuri de nanoparticule utilizate pentru diferite sisteme pentru diagnosticări și terapie

Diagnosticare/terapie	Mecanism de bază	Tipuri de nanoparticule	Acțiunea nanoparticulelor
MRI	Acțiunea magnetică asupra spinului electronic al H	Superparamagnetice Moment magnetic ridicat	Agent de contrast [8]
Chimioterapie	Afinitate biomecanică	Inerte Biocompatibile Suprafețe funcționalizate	Livrare de medicamente [9]
Chimioterapie	Activare termică Desorbție temporal ajustabilă	Suprafață specifică mare Legare chimică specifică	Eliberare controlată a medicamentelor
Terapie cu neutroni	Reacții nucleare (fisiune)	Facicul de neutroni cu secțiune transversală mare	Captarea neutronilor [10]
Hipertermie magnetică	Absorbție electromagnetică	Magnetice Moment magnetic ridicat	Încălzire [11]
Terapie fotodinamică	Emisie de fotoni. Conversie internă a fotonilor	Polimerice	Activarea fotosensibilizatorilor Producerea de specii citotoxice

O alternativă promițătoare pentru tratamentul cancerului relevă capacitatea agenților terapeutici de a atinge în mod selectiv ținta dorită după administrarea intravenoasă. Conceptul sistemelor bazate pe nanoparticule (NP) implică un grad ridicat de specificitate, ceea ce face

ca aceste nanoparticule să fie candidați de neegalat pentru următoarea generație de metode de administrare a medicamentelor. Perspectiva acestei noi generații de sisteme ar trebui să poată efectua, pe lângă specificitate și efecte terapeutice, procese active cum ar fi monitorizarea stării celulelor prin indicatori fizici sau activități specifice celulare prin emisia de semnale reactive. Aceste dispozitive, dacă sunt realizate, vor constitui adevărate platforme capabile să găzduiască mai multe componente care ar putea îndeplini în mod activ sarcini specifice de diagnosticare și funcții terapeutice la scară celulară.

Cu toate acestea, mai multe procese-cheie trebuie să fie adaptate înainte ca nivelurile de specificitate moleculară să poată fi atinse, cum ar fi modul în care medicamentul este stocat în nanoparticule; mecanismul care conduce NP spre obiectiv; barierele biologice care trebuie depășite. Fiecare dintre aceste evoluții are propriile sale provocări tehnice și implică domenii de cercetare diferite, astfel încât fiecare soluție trebuie luată în considerare din puncte de vedere al specificității sale înainte ca acestea să fie integrate într-un singur rezultat.

Stocarea concentrațiilor mari de medicament poate fi realizată în principiu pe baza raportului suprafață / volum (R_{sv}); în particule perfect sferice cu diametrul mediu de 5 nm, R_{sv} poate depăși valoarea de $= 3,3 \text{ nm}^{-1}$. În funcție de caracteristicile sale chimice, medicamentul care trebuie administrat poate fi atașat la NP-uri după o funcționalizare adecvată a suprafeței libere prin utilizarea unor grupuri terminale adecvate, acest lucru este efectuat de obicei prin intermediul adsorbției fizice a acestuia în timpul sintezei purtătorilor sau prin atașare covalentă la orice grupare a suprafeței reactive.

Avantajul utilizării nanoparticulelor în țintirea selectivă a tumorilor este potențialul de a furniza o doză concentrată de medicament în vecinătatea (sau chiar în interiorul) țesutului țintă, reducând expunerea la medicament a celulelor sănătoase. Acest lucru se poate face prin intermediul interacțiunilor fizice sau al atașării pasive / active. Direcționarea fizică poate fi realizată prin ghidarea nanoparticulelor superparamagnetice cu ajutorul unui câmp magnetic extern.

Există câteva exemple care arată o acumulare reușită a particulelor superparamagnetice aplicate intravenos, care vizează locații specifice prin intermediul unor magneți externi. Direcționarea pasivă are avantajul efectului îmbunătățit al permeabilității și retenției (EPR) al țesuturilor tumorale.

Efectul EPR este o consecință a unei arhitecturi vasculare incomplete, datorată vascularizării rapide, care este orchestrată de către tumoare pentru a furniza substanțele nutritive necesare extinderii sale rapide. Această vascularizare cu scurgeri permite extravazarea macromoleculelor circulante, precum și a particulelor mici din interiorul interstițiului tumoral,

care, împreună cu alți factori, cum ar fi drenajul limfatic slab, determină acumularea de medicamente.

Celălalt mod de a elibera medicamente la ținta dorită implică funcționalizarea suprafeței nanoparticulelor cu anticorpi monoclonali sau liganzi la receptori legați de tumoare, profitând de capacitatea de legare specifică între un anticorp și antigen sau între ligand și receptorul său. În cadrul acestei abordări, pot fi exploatate mai multe diferențe între celulele canceroase și cele normale, incluzând: proliferarea necontrolată, insensibilitatea la reglarea negativă a creșterii și semnalele anti-creștere, angiogeneza și metastazarea.

Este bine cunoscut faptul că, pentru majoritatea celulelor canceroase, rata de creștere este mai rapidă decât în cazul celulelor normale. Un mecanism care stă la baza acestei creșteri este acțiunea receptorilor care permit absorbția factorilor de creștere prin endocitoză mediată de receptor, mai eficient decât în cazul celulelor normale.

Aceste NP ar putea fi folosite ca un "cal troian" pentru a elibera agenți anticanceroși, prin acoperirea suprafeței nanoparticulelor cu anticorpi sau liganzi care se leagă în mod specific la acești receptori. Un exemplu de "marker" tumoral foarte selectiv este receptorul de folat, care este absent din țesuturile normale sau este inaccesibil pentru medicamentele circulante datorită localizării apicale polarizate în celulele endoteliale normale.

Cu toate acestea, acest receptor este pe deplin accesibil și hiperactiv în multe tipuri de celule canceroase, inclusiv în cancere ovariene, de creier, rinichi, sân și de plămân. Astfel, celulele canceroase pot capta în mod eficient folatul, o formă de vitamina B solubilă în apă, care este necesară pentru a crește și a se divide.

Una dintre strategiile ce vizează celulele tumorale pentru receptorul folat se bazează pe susceptibilitatea receptorului de folat la proteinele de endocitoză care sunt legate covalent de acesta. Această strategie a fost folosită de mai multe grupuri de cercetare pentru a arăta că nanoparticulele funcționalizate cu acid folic (un ligand cu afinitate mare pentru receptori de folat) pot fi internalizate cu succes în interiorul celulelor tumorale (figura 3).

O altă diferență a celulelor canceroase față de cele normale care ar putea fi exploatată este capacitatea lor dobândită de a evita apoptoza, definită ca un set de procese celulare programate care duc la moartea celulelor.

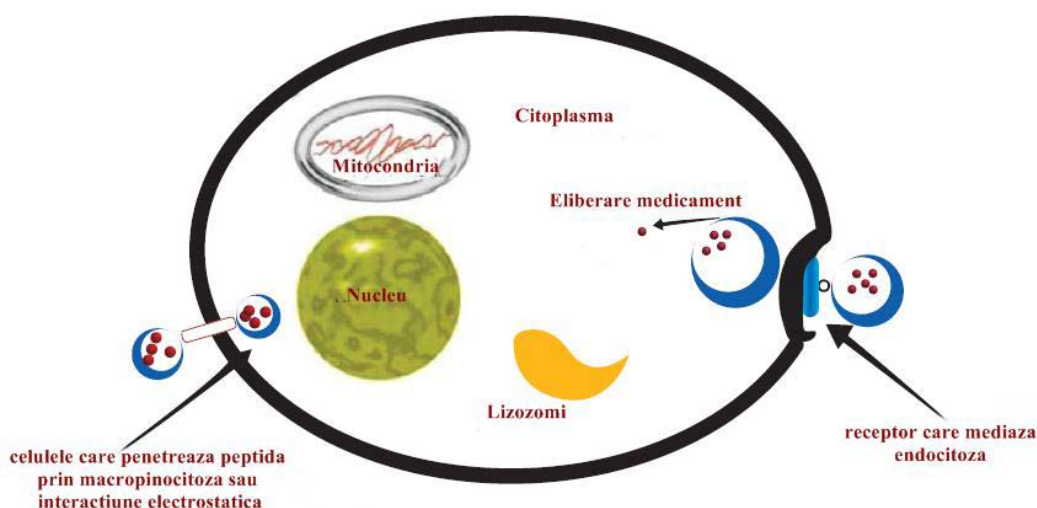


Figura 3. Transport intracelular de medicamente

O modalitate de a evita apoptoza într-o anumită varietate de tumori umane, care include cancerul pulmonar, colon, pancreas, prostata și de sân, implică supraexpunerea de către celulele maligne a unei proteine care inhiba acest proces, cunoscută sub numele de survivin. Această proteină este prezentă din timpul dezvoltării embrionare, dar este absentă în majoritatea țesuturilor normale, terminologic diferențiate. Prin urmare, survivinul ar putea fi utilizat ca un antigen tumoral. Deoarece s-au dezvoltat mai mulți anticorpi împotriva survivinului, imunoterapia ar putea fi o abordare conceptuală pentru tratarea tumorilor survivin-pozitive [12].

1.3 Modificarea suprafețelor nanoparticulelor de magnetită

După obținerea nanoparticulelor de magnetită, este necesară menținerea lor în formă coloidală. Ferrofluidele sunt suspensii ale nanoparticulelor magnetice (Fe_3O_4 sau Fe_2O_3), care formează fluide magnetizabile, ce rămân suspendate în faza lichidă indiferent de intensitatea câmpurilor magnetice care acționează asupra lor. Astfel, datorită compoziției lor, ferrofluidele posedă o combinație unică de fluiditate și susceptibilitate magnetică. Fără acoperirea suprafețelor, nanoparticulele au proprietăți hidrofobe, datorită raportului dintre suprafața specifică și volum. Datorită interacțiunilor hidrofobe dintre nanoparticule, acestea se vor aglomera cu formarea unor clustere. Acestea din urmă au forțe de atracție magnetică dipol-dipol puternice. Astfel, când două clustere se apropie unul de celălalt, câmpurile lor magnetice se întrepătrund și cele două continuă să se magnetizeze. Remanența magnetizării permanente a nanoparticulelor determină formarea agregatelor [13].

Pentru a evita formarea de agregate datorate magnetizării dar și a forțelor van der Waals, este indispensabilă modificarea suprafețelor nanoparticulelor. Unii stabilizatori, cum ar fi

surfactanții sau polimerii (naturali sau artificiali), sunt adăugați la momentul preparării pentru a împiedica agregarea nanoparticulelor.

În domeniul medical modificarea suprafețelor implică îndeosebi și atașarea unor liganzi de direcționare, cum ar fi molecule capabile să recunoască ADN-ul, în vederea tratării tumorilor. De asemenea, pe lângă aceste molecule, nanoparticulele pot fi funcționalizate cu substanțe biologice active, care se vor lega de nanoparticule prin intermediul unor compuși polimerici, formând legături de hidrogen cu acestea [14]. Aceste tipuri de legături sunt slabe, iar odată cu creșterea temperaturii, se vor rupe, eliberând medicamentul într-o anumită cantitate.

Chitosan - agent de stabilizare

Nanoparticulele superparamagnetice de oxid de fier acoperite cu chitosan au fost studiate pentru aplicații biomedicale, cum ar fi livrarea de medicamente, terapia genică, imagistica și biosensibilizarea [3].

Varianța naturală a chitosanului este chitina, aceasta fiind a doua cea mai întâlnită polizaharidă naturală. Proveniența chitinei este de natură animală, aceasta fiind sintetizată de crustacee, fungi și insecte în formă microscopică de microfibrile, fiind componenta majoritară din exoscheletul artropodelor și al pereților celulari ai fungilor. Sursa comercială majoritară a chitinei este reprezentată de deșeurile din industria fructelor de mare, cum ar fi carcasele crabilor și ale creveților .

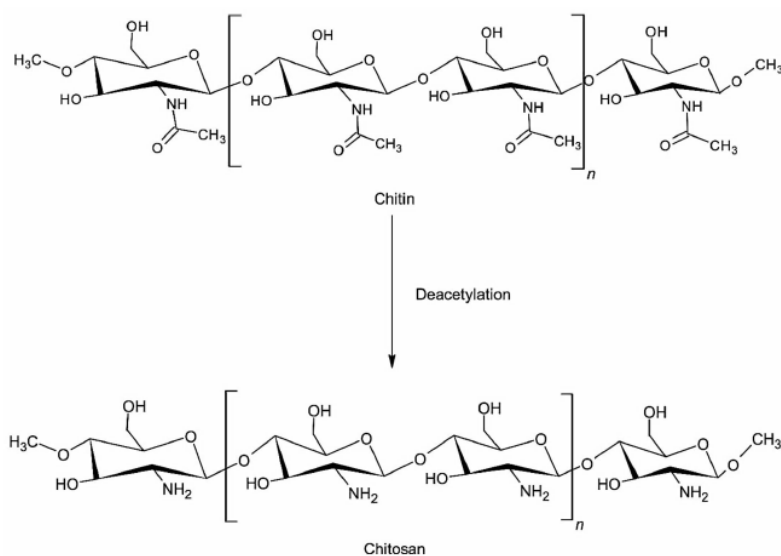


Figura 4. Structura chimică a chitinei și a chitosanului [15]

Spre deosebire de chitină, care este formată numai din unități de N-acetilglucozamină, chitosanul reprezintă varianta parțial deacetilată a acesteia, fiind un polimer liniar format din glucozamină și N-acetilglucozamină (figura 4). Scopul deacetilării este de a induce solubilitatea chitinei în apă. Chitosanul este solubil în soluții diluate de acizi cum ar fi acidul

acetic, lactic, malic, formic sau succinic. La pH 6 acesta devine policationic și poate interacționa ușor cu moleculele încărcate negativ (proteine, acizi grași, polizaharide anionice, fosfolipide). Cu toate acestea, chitosanul este considerat a fi un polimer hidrofil [16].

Formele utilizate ale chitosanului în domeniul biomedical sunt gelurile, microparticulele, filmele și sub formă de agenți de acoperire. De asemenea, produsele medicale pe bază de chitosan cele mai uzuale sunt suplimentele alimentare, agenți de vindecare a rănilor, dispozitivele hemostatice și transportorii de medicamente.

Principalele proprietăți care au determinat utilizarea chitosanului în domeniul biomedical sunt: biocompatibilitatea, biodegradabilitatea, lipsa toxicității. Acesta este un material cu proprietăți hemostatice, analgezice, antifungice și antibacteriene [17].

Biocompatibilitatea pare a fi determinată de prezența glucozaminei (în urma studiilor realizate de Baldrick), aceasta fiind componenta majoritară a chitosanului fiind totodată produsă și de organismul uman din glucoză. În schimb, activitatea hemostatică și antimicrobiană este atribuită caracterului policationic al polizaharidei, fiind implicat în aglutinarea eritrocitelor și formarea cheagurilor de sânge. Activitatea antimicrobiană este dată de interacțiunile electrostatice dintre structurile policationice și componentele anionice de pe suprafața microorganismelor [18].

1.4 Rezistența la antibiotice - o problemă actuală

Descoperirea antibioticelor cu numai opt decenii în urmă a provocat o revoluție în metodele de terapie practicate în medicina umană [19]. În prezent, antibioticele sunt cei mai obișnuiți agenți antibacterieni, utilizați cu eficacitate ridicată pentru tot felul de infecții chirurgicale și asociate dispozitivului. Chiar dacă utilizarea acestora a determinat o creștere a speranței de viață în țările în curs de dezvoltare, o serie de efecte secundare au survenit din cauza consumului excesiv, a suprasolicitării și a utilizării abuzive a antibioticelor [20]. Printre acestea se numără și rezistența la antibiotic (RA), un fenomen alarmant la nivel global, ale cărui efecte pe termen lung sunt controlate de către World Health Organization (WHO) și Centers for Disease Control and Prevention (CDC) [21]. Această problemă este și mai gravă în contextul unei rate reduse a investițiilor din industria farmaceutică în dezvoltarea de noi antibiotice mai puternice. Pentru a depăși rezistența la antibiotice, o soluție imediată pare a fi eliberarea unei doze mai mici de bactericide deja existente direct în zona infectată, cu ajutorul unui suport de eliberare inteligentă a substanței active [19].

De asemenea, numeroase nanoparticule sunt studiate din punct de vedere al activității antimicrobiene, pentru a îmbunătăți capacitatea acestora de penetrare a biofilmului bacterian,

de generare de specii reactive de oxigen și uciderea bacteriilor, oferind o metodă nouă de combatere a infecțiilor [22].

Factorii și mecanismele de apariție a RA au fost identificate, însă sunt necesare mai multe cercetări în acest domeniu, mai ales pentru a crea noi antibiotice care să fie mai eficiente împotriva microorganismelor patogene ușor adaptabile. Este bine cunoscut faptul că RA a condus la rate ridicate de morbiditate și mortalitate în rândul populației, scăderea productivității, pierderi economice, agravarea condițiilor de viață legate de sănătate, a avut implicații psihologice și a dus la creșterea costurilor de diagnostic și tratament. Utilizarea medicamentelor antibacteriene în ultimele decenii a provocat modificări genetice și biochimice ale bacteriilor pentru a le asigura supraviețuirea și multiplicarea. Rezistența la antibiotice poate fi explicată ca o serie de evenimente genetice care duc la modificări biochimice ale genomului, precum mutații.

În cazul bacteriilor rezistente la antibiotic, moleculele sunt modificate structurale astfel încât să prevină legarea antibioticului, prin următorul mecanism, evidențiat și în figura 5: blocarea antibioticelor de la intrarea în celule, inactivarea antibioticelor (cum ar fi degradarea enzimatică) și ieșirea antibioticelor din celulă înainte de legarea la aceasta, prin intermediul unor pompe puternice de eflux [23].

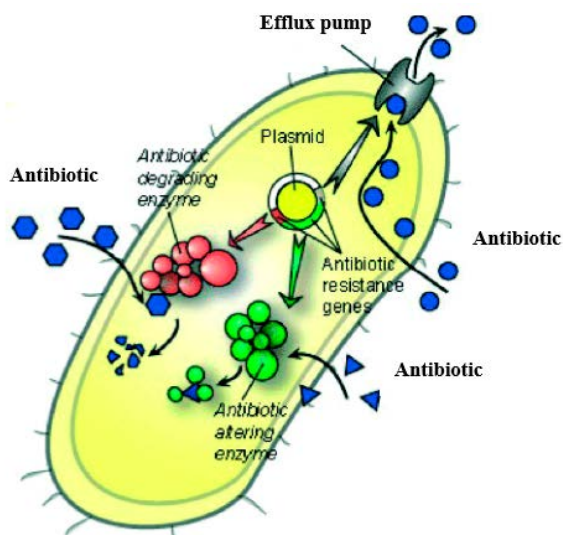


Figura 5. Mecanismul de acțiune al bacteriilor rezistente la antibiotic [23].

Efectul bolilor infecțioase asupra morbidității și mortalității este semnificativ în rândul populației. De exemplu, în 2007 și numai în statele membre ale UE, inclusiv Islanda și Norvegia, aproximativ 25 000 de persoane au decedat din cauza unor bacterii, cele mai frecvente fiind *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*, *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* și *Pseudomonas aeruginosa* [23].

Studii recente vizează implicarea strategiilor ecologice pentru tratarea infecțiilor prin utilizarea compușilor naturali, de exemplu extracte de plante și uleiuri volatile. Deoarece utilizarea antibioticelor și a altor antimicrobiene a devenit mai puțin eficientă, de multe ori este necesară utilizarea unor cantități mari de medicamente active pentru a rezolva infecțiile care pun în pericol viața.

Agenții antimicrobieni utilizați în cantități mari se pot dovedi a fi toxici pentru pacienți, provocând reacții adverse severe, prin urmare una dintre cele mai dorite strategii antimicrobiene se bazează pe folosirea de suporturi nanometrice pentru transportul și controlul eliberării substanței active.

Recent, din cauza rezistenței bacteriilor la antibioticele sintetice, a existat o tendință de utilizare de agenți derivați din plante care prezintă proprietăți antimicrobiene, cum ar fi utilizarea uleiurilor esențiale [24]. În ciuda efectelor lor antimicrobiene dovedite, utilizarea uleiurilor esențiale este încă limitată în terapia antiinfecțioasă datorită stabilității scăzute și volatilității ridicate a compușilor activi. Din acest motiv, suporturile nanometrice pentru transportul și controlul eliberării substanței active sunt, de asemenea, necesare pentru a obține cele mai bune rezultate și în cazul acestui tip de terapie.

1.5 Magnetita funcționalizată - aplicații în tratarea infecțiilor

În ultimii ani, cercetătorii au valorificat potențialul nanoparticulelor de magnetită (MNP) pentru a fi utilizate în inhibarea creșterii microbiene și formării biofilmelor în cazul multor specii patogene, cum ar fi fungi, drojdii și bacterii și, de asemenea, pentru a trata bolile infecțioase specifice acestora.

Candida albicans: Chifiriuc *et al.* [25] au raportat producția de nanoparticule de magnetită funcționalizată, cu diametru maxim de 20 nm, folosind o metodă de precipitare, cu acid oleic ca surfactant și ulei esențial de *Rosmarinus officinalis* ca agent antimicrobian. Suspensia de nanoparticulele de tip core-shell a fost utilizată pentru a acoperi un cateter prin aplicarea unui câmp magnetic, în timp ce uleiul esențial a fost adsorbit într-un tratament secundar de acoperire. Autorii au raportat că principalele componente observate ale *Rosmarinus officinalis* au fost 40,596% eucaliptol, 11,389% camfor, 10,19% caripilină și 18,42% α -pinen. Cateterul acoperit cu nanoparticule magnetice și ulei esențial a arătat un efect inhibitor distinct al biofilmului *C. albicans* într-o manieră dependentă de timp până la 72 de ore. Biofilmele *C. albicans* crescute pe suprafețele nanomodificate au scăzut cu până la aproximativ 85% în comparație cu cateterul neacoperit, așa cum au observat autorii folosind CLSM.

Nanocompozite cu diametre medii de 7-17 nm constând în magnetită, nanoparticule de argint și chitosan au manifestat un efect antimicrobian considerabil împotriva *C. albicans*. Valorile concentrației minim inhibitorii (CMI) ale nanocompozitelor, în funcție de conținutul de argint, au fost cuprinse între 0,9 și 12,6 mg/L. Nistatinul, un medicament antifungic utilizat pe scară largă, a fost atașat cu succes în nanoparticulele de magnetită acoperite cu chitosan. Sistemul astfel obținut, cu un diametru mediu de 8 nm, a prezentat o activitate antifungică îmbunătățită împotriva *C. albicans* [26].

Escherichia coli: Studii recente au raportat obținerea de nanoparticule magnetice (MNP) acoperite cu chitosan și grefate cu cefalosporine, care prezintă proprietăți antibacteriene mari împotriva *E. coli*. Microsferele magnetice de chitosan s-au preparat prin precipitarea chimică umedă a ionilor Fe^{2+} și Fe^{3+} în soluție apoasă cu chitosan și hidroxid de sodiu. Antibioticele testate au fost cefepimă, ceftriaxonă, cefuroximă și cefoperazonă. Cefalosporinele au fost bine încapsulate în microsfelele de chitosan cu magnetită, păstrându-și proprietățile și fiind avantajoase pentru administrarea convențională a medicamentului, deoarece prin utilizarea acestei abordări magnetită / chitosan, concentrația minim inhibitorie a fost scăzută de la 2 la 7,8 ori pentru tulpinile testate cu *E. coli*. De asemenea, s-a observat că temperatura de uscare a microsferelor de magnetită / chitosan rezultate a fost foarte importantă, deoarece s-a constatat că un tratament la 100 °C a avut ca rezultat aproximativ jumătate din valoarea concentrației minime inhibitorii, comparativ cu situația când temperatura a fost de 50 °C [27].

MNP grefate cu poliacrilamidă (10-20 nm) au fost raportate ca având proprietăți bactericide excelente, în special în eliminarea microbilor din apă. Concentrația minimă inhibitorie a acestor MNP pe *E. coli* a fost de 60 $\mu\text{g} / \text{mL}$, iar autorii au subliniat faptul că radicalii de superoxid și hidroxid produși de oxidul de fier par a fi cauza unor leziuni bacteriene, deoarece pot provoca stres oxidativ membranelor și ADN-ului.

S-a constatat că MNP modificate cu acid poli gama-glutamat de sodiu (PGA) scad CMI-urile antibioticelor comerciale Linezolid și Cefaclor împotriva *E. coli*, comparativ cu soluțiile antibioticelor simple. Pentru tulpina *E. coli* ATCC 8739, MNP acoperite cu PGA au prezentat o valoare CMI mai mică ($<0,5 \mu\text{g} / \text{mL}$) decât linezolid (16 $\mu\text{g} / \text{mL}$) și cefaclor (8 $\mu\text{g} / \text{mL}$), dar valorile mai mari pentru CaPGA -MNP acoperite (128 $\mu\text{g} / \text{mL}$). S-a constatat că PGA-MNP-urile acoperite nu reduc valorile CMI pentru tulpina *E. coli* O157: H7 comparativ cu antibioticele comerciale, dar cu toate acestea au arătat o anumită inhibare împotriva tuturor tulpinilor testate [28].

Alt studiu a arătat, de asemenea, că dextranul este mai eficient ca mediu de acoperire în ceea ce privește activitatea bactericidă comparativ cu zaharoza. Autorii au demonstrat în același studiu că parametrii cum ar fi compușii hidroxicili, speciile generate de oxigen activ, dimensiunea redusă a nanoparticulelor și utilizarea zaharurilor specifice pentru conversia enzimatică microbiană joacă un rol semnificativ în eficacitatea și mecanismul bactericid [29].

Staphylococcus aureus: S-au raportat, de asemenea, MNP acoperite cu chitosan obținut prin metoda coprecipitării și grefate cu două antibiotice aminoglicozidice selectate (kanamicină și neomicină). Sistemele de chitosan-magnetită acoperite cu aminoglicozide s-au dovedit a avea o activitate antibiotică excepțională împotriva tulpinilor de *S. aureus*.

Ca o aproximație, cantitățile de kanamicină sau neomicină utilizate cu nanoparticule de chitosan-magnetită necesare pentru a opri creșterea *S. aureus* a fost jumătate din cantitatea acestor antibiotice necesare fără MNPs. Motivul acestei activități antimicrobiene excepționale a fost raportul dintre suprafața superioară a suprafeței MNP-urilor și, prin urmare, suprafața disponibilă mai mare a antibioticului care intră în contact cu microorganismele.

În lucrarea lui Chifiriuc și colab. anterior descrisă s-a menționat că chitosanul a avut un efect pozitiv asupra activității antimicrobiene prin buna încapsulare a cefalosporinelor, făcându-le disponibile pentru interacțiunea cu microorganismele bacteriene.

Grumezescu și colab. [30] au constatat că nanoparticulele de magnetită sferice care conțin eugenol și preparate prin metoda precipitării au avut o foarte bună activitate antiaderentă împotriva formării biofilmului *S. aureus*.

Pentru a prepara astfel de nanoparticule, acidul 3-hidroxibutiric-co-3-hidroxoaleric, alcoolul polivinilic și eugenolul au fost utilizate ca fază organică pentru prepararea emulsiei, care după sonicare, adăugare de apă, evaporarea solventului și centrifugare, au condus la nanoparticulele respective. MNP cu eugenol s-au fabricat și prin evaporare LASER pulsant asistată de o matrice (MAPLE). Mărimea MNP a fost mai mică de 10 nm și studiile microbiologice au demonstrat că astfel de MNP cu eugenol au avut o activitate foarte bună anti-biofilm împotriva *S. aureus*.

MNP acoperite cu chitosan-carboximetilceluloză s-au dovedit a avea o activitate antibiotică îmbunătățită când s-au încorporat cu antibiotice cunoscute. Astfel de MNP Fe_3O_4 / chitosan-carboximetilceluloză s-au dovedit a spori considerabil (2% -10%) eficacitatea în administrarea de medicamente precum peniciline, macrolide, aminoglicozide, rifampicine și chinolone împotriva *S. aureus*.

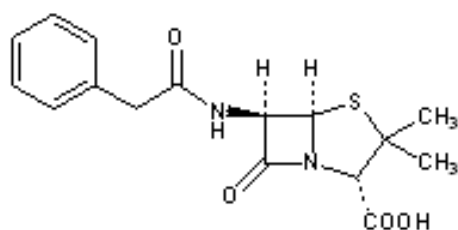
Astfel de MNP pot fi utilizate ca transportori ai antibioticelor prin creșterea eficienței lor fără a fi citotoxici și fără să influențeze ciclul celulei eucariote HCT8 [31].

1.6 Substanțe biologice active cu efect antitumoral și antimicrobian

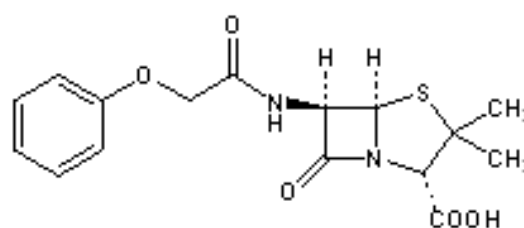
1.6.1 Penicilina

Penicilinele sunt un grup de medicamente antibacteriene care atacă o gamă largă de bacterii. Acestea au fost primele medicamente de acest tip pe care medicii le-au folosit. Descoperirea și fabricarea penicinelor au schimbat fața medicinei, aceste medicamente salvând milioane de vieți.

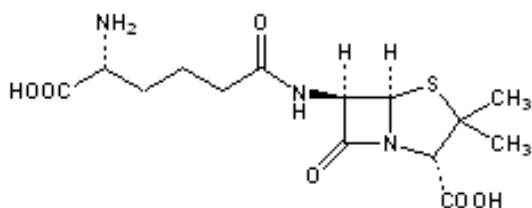
Penicilinele sunt un grup de antibiotice beta-lactamice derivate din specia genului *Penicillium*. Cele mai cunoscute exemple sunt benzilpenicilina (penicilina G) (injecție) și fenoximetilpenicilina (penicilina V) (formă orală acidă) (figura 6).



Penicilina G



Penicilina V



Penicilina N

Figura 6. Formule structurale pentru cele mai cunoscute exemple de penicilină

Aproximativ 10% dintre pacienții aflați în tratament raportează reacții alergice la peniciline; totuși, până la 90% din ele nu sunt de fapt alergice. Reacțiile alergice grave pot apărea numai la aproximativ 0,03% dintre pacienți.

Penicilinele acționează în special asupra bacteriilor Gram-pozitive. În prezent, multe tulpini de bacterii au devenit rezistente la terapia cu penicilină datorită utilizării iraționale a antibioticelor rezistente la penicilină. Penicilina este un antibiotic cu un spectru bactericid relativ redus împotriva germenilor gram-negativi, care a dus la derivatele sale ca ampicilina, având un spectru bactericid împotriva Gram negativ și Gram-pozitiv.

Oamenii atribuie în general descoperirea penicilinei lui Alexander Fleming. Istoria relevă că acesta s-a întors în laboratorul său într-o zi, în septembrie 1928, pentru a găsi un vas Petri care conține bacteriile *Staphylococcus*, cu capacul deschis. Vasul a devenit contaminat cu un mucegai albastru-verde numit *Penicillium notatum*. Fleming remarcă faptul că există un

inel clar care înconjoară mucegaiul în care bacteriile nu au putut să crească. Descoperind această matriță și recunoscând utilizarea ei, Fleming a pus comunitatea științifică în mișcare pentru a crea unul dintre cele mai utile medicamente din istoria medicală. Deși Fleming a descoperit din punct de vedere tehnic primul antibiotic, oamenii de știință au trebuit să facă o mulțime de studii înainte ca penicilinele să devină disponibile pentru uz general.

În discursul de acceptare al Premiului Nobel al lui Fleming, el a avertizat că o utilizare excesivă a penicilinelor ar putea duce într-o zi la rezistența bacteriană. Acest lucru a devenit o problemă. Contrar opiniei populare, nu este persoana care dezvoltă rezistența la peniciline, ci însăși bacteria.

Există trei moduri în care bacteriile pot dezvolta o imunitate la penicilină:

Penicilinaza: Bacteriile sunt uneori capabile să producă penicilinază, o enzimă care degradează penicilinele. Această capacitate se poate răspândi în întreaga populație bacteriană printr-un mic ciclu de ADN într-un proces numit conjugare. Acesta este echivalentul bacterian al reproducerii sexuale, în care organisme individuale împărtășesc noi informații genetice între ele.

Structura bacteriană modificată: Unele bacterii pot schimba subtil formatul proteinelor care leagă penicilina în peretele peptidoglican, astfel încât penicilinele să nu se mai poată lega de acesta.

Eliminarea penicilinei: Alte bacterii dezvoltă sisteme pentru a elimina penicilinele. Bacteriile au pompe de eflux pe care le folosesc pentru a elibera substanțe din celulă. Activarea unor astfel de pompe poate permite celulei să elimine penicilinele [32].

Această clasă de medicamente a avut un impact puternic asupra tratamentelor medicamentoase. Până la descoperirea antibioticelor, leziunile la răni și bolile, cum ar fi sifilisul, au fost aproape întotdeauna mortale. În mai puțin de un secol de la descoperirea penicilinei, antibioticele au salvat peste 200 de milioane de vieți.

Medicamentele din clasa penicilină lucrează prin spargerea indirectă a pereților celulelor bacteriene. Ele fac acest lucru prin acționarea directă pe peptidoglicani, care joacă un rol esențial în structura celulelor bacteriene.

Peptidoglicanii creează o structură asemănătoare unei plase în jurul membranei plasmactice a celulelor bacteriene, care mărește rezistența pereților celulari și împiedică intrarea fluidelor și a particulelor externe în celulă. Când o bacterie se înmulțește, în pereții celulei se deschid orificii mici, pe măsură ce celulele se divid. Peptidoglicanii noi produși apoi umplu aceste orificii pentru a reconstrui pereții. Penicilinele blochează structurile proteice care leagă peptidoglicanii împreună. Acest lucru împiedică bacteria să închidă găurile din pereții celulei.

Deoarece concentrația de apă a fluidului înconjurător este mai mare decât cea din interiorul bacteriei, apa trece prin orificii în celulă și bacteria se activează [33].

Unele efecte secundare ale penicilinei pot fi: diaree, greață, dureri de cap, erupții cutanate și urticarie, dificultăți de respirație sau respirație neregulată, dureri articulare, inflamație și apariție a inflamației sau roșeții feței, gură și limbă dureroase, uneori cu erupții albe, crampe abdominale, spasme, sensibilitate sau durere. Reacțiile adverse rare includ: anxietate, frică sau confuzie, senzație de pericol iminent, halucinații, îngălbenirea ochilor și a pielii, dureri în gât, sângerări neobișnuite, diaree și urinare redusă, convulsii.

1.6.2 Fludarabina

Fludarabina (figura 7) este un agent antineoplazic utilizat pentru tratamentul cancerului. Este cel mai frecvent utilizat pentru pacienții cu leucemie limfocitară cronică (Chronic lymphocytic leukemia – CLL), deși poate fi utilizat și pentru alte tipuri de cancer. Medicamentul este disponibil sub formă de soluție injectabilă sau pentru administrare orală.

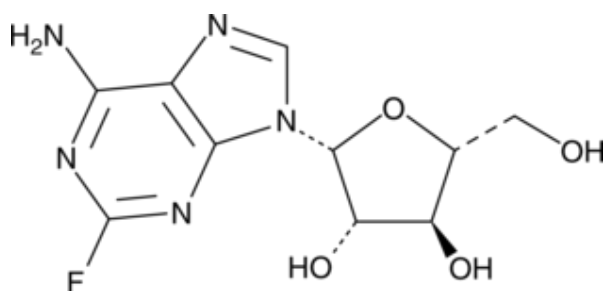


Figura 7. Formula structurală a Fludarabinei

A fost raportat un răspuns citoreductiv favorabil la pacienții cu limfom limfoplasmocitoid și la un număr mai mic de pacienți cu limfom cu celule T cutanat, CLL de origine celulară T sau leucemie prolimfocitară. Datele recente susțin, de asemenea, utilizarea fludarabinei, fie ca o componentă a unui regim non-mieloablative de condiționare sau pentru atingerea unui stadiu al bolii reziduale minime, la pacienții supuși unor transplanturi de celule stem din sângele periferic sau transplant de măduvă osoasă. Fludarabina a prezentat, de asemenea, activitate în tratamentul limfoamelor cu celule T cutanate, micoză fungoidă și sindromul Sézary, limfom limfoplasmocitoid, incluzând macroglobulinemia Waldenström și leucemie prolimfocitară. Cu toate acestea, este necesară o evaluare suplimentară la populații mai mari de pacienți.

Dovezile clinice din studiile comparative privind leucemia limfocitară cronică (CLL) sugerează că fludarabina este cel puțin la fel de eficace ca și CAP (ciclofosamidă, doxorubicină și prednison) sau CHOP (ciclofosamidă, vincristină, doxorubicină și prednison)

la pacienții netratați anterior, mai eficace decât clorambucilul în ceea ce privește rata de răspuns și durata de supraviețuire la pacienții netratați anterior cu ajutorul chimioterapiei. În plus, terapia secvențială cu fludarabină și citarabină a demonstrat o bună eficacitate în tratamentul leucemiei acute, precum și monoterapia cu fludarabină și terapia asociată în limfomul non-Hodgkin de grad scăzut.

Fludarabina este furnizată ca parte a unui regim terapeutic, combinată cu alți agenți chimioterapeutici. Lucrează prin atacarea proceselor metabolice din celulele canceroase, inhibând creșterea lor și, eventual, forțându-le să moară. Acest medicament este foarte eficient pentru pacienții care nu au răspuns la terapia primară. Ca medicament anti-cancer, fludarabina poate avea efecte secundare grave, care se manifestă prin atacarea atât a celulelor canceroase cât și a celulelor sanguine sănătoase. Poate provoca anemie, sistem imunitar slăbit, pneumonie.

În tratamentul leucemiei limfocitare cronice, s-a demonstrat că răspunsul la monoterapia cu fludarabină este puternic corelat cu stadiul bolii, amplexarea tratamentului chimioterapeutic anterior și răspunsul la chimioterapia anterioară.

Pentru tratamentul CLL, doza recomandată de fludarabină este de 25 mg / m², administrată sub formă de perfuzie intravenoasă de 30 de minute, sau sub formă de injecție intravenoasă zilnic timp de 5 zile și repetată la intervale de 28 de zile. Dozele de 20 până la 30 mg / m² / zi timp de până la 5 zile consecutive, repetate la fiecare 3 până la 5 săptămâni, în asociere cu citarabina, în tratamentul leucemiei acute și ca terapie cu un singur agent sau combinat în NHL au fost, de asemenea, utilizate cu succes. Reducerea dozei de fludarabină pe baza valorilor degajării creatininei este recomandată la pacienții cu insuficiență renală cunoscută sau suspectată; medicamentul este contraindicat la cei cu degajare de creatinină < 30 mL / min (1,8 L / h).

Mecanismele postulate pentru activitatea antitumorală a fludarabinei includ întreruperea sintezei ADN și ARN prin încorporarea metabolitului activ F-ara-A (9-beta-D-arabino-furanozil-2-fluoroadenin) trifosfat (F-ara-ATP), alungirea lanțurilor de acid nucleic, inhibarea polimerazelor ADN și ARN, primaza ADN, ligaza AND, ribonucleotid reductaza și potențarea activității deoxicitidin kinazei.

Atât studiile *in-vitro* cât și cele *in-vivo* au evidențiat apoptoza ca un mod suplimentar important de moarte celulară indusă de fludarabină. Totuși, importanța relativă a inhibării sintezei ADN și ARN în inducerea procesului apoptotic de către fludarabină nu a fost complet elucidată. *In-vitro*, fludarabina a demonstrat o citotoxicitate dependentă de concentrație și de timp împotriva liniilor de celule leucemice umane. S-a demonstrat că fludarabina potențează

activitatea unui număr de agenți antitumorali *in-vitro*, incluzând citarabina, cisplatina, mitoxantrona și azotatul de galiu.

Fludarabina are activitate antitumorală *in-vivo* împotriva unei game largi de modele de tumori murine și s-a demonstrat că induce radiosensibilizarea în modelele carcinomului mamar murin MCA-a, sarcoma SA-NH, MCA-K și MCA-4. Mecanismul de radiosensibilizare indus de fludarabină pare să implice eliminarea celulelor în fază S prin apoptoză și sincronizarea celulelor rămase într-o fază de ciclu celular mai radiosensibilă. Fludarabina a redus, de asemenea, numărul de limfocite capabile să prolifereze și să declanșeze respingerea, la șoareci, după iradierea totală a corpului, sugerând un posibil potențial imunosupresor al fludarabinei în condiționarea transplantului măduvei osoase.

Recent, utilizarea chimioterapiei combinate pe bază de fludarabină a demonstrat utilitatea promițătoare ca regim non-mieloablative de condiționare în transplantul de măduvă osoasă alogenă sau transplant de celule stem din sânge periferic la pacienții cu malignități hematologice [34].

Medicamentele profilactice pot fi oferite pentru a preveni infecția, numai la recomandarea oncologului. Un efect secundar potențial al fludarabinei este sindromul de liză tumorală, care, netratat, duce la insuficiență renală. Această complicație poate fi observată și în cazul medicamentelor chimioterapeutice. Reacțiile adverse frecvente includ greață, vărsături, căderea părului, sângerări, vânatăi, amețeli, confuzie. În cazuri rare, fludarabina pot fi neurotoxici atunci când sunt eliberați în doze foarte mari [34].

1.6.3 Canabidiol

Produsele naturale care provoacă apoptoza celulelor canceroase sunt surse importante în suprimarea cancerului. Datorită disponibilității extinse a materiei prime, funcționalizarea cu uleiuri esențiale (canabidiol – CBD) este una din cele mai la îndemână soluții. Pe lângă faptul că sunt ingrediente naturale care nu au efecte adverse, sintetizarea uleiurilor din plante medicinale este un proces foarte ieftin [25, 35-37].

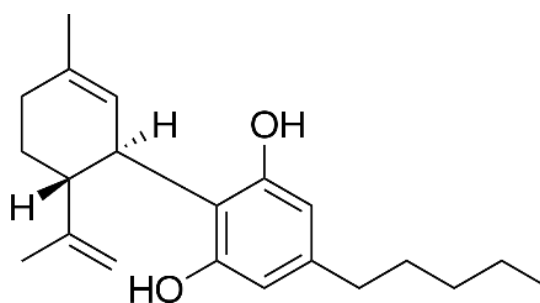


Figura 8. Formula structurală a Canabidiolului

Canabidiolul (figura 8) este un tetrahidrocanabinol derivat din *Canabis Sativa* cu numeroase aplicații medicale, care stă la baza Epidiolex, primul medicament pe bază de CBD aprobat în 2018 de către US Food and Drug Administration pentru tratarea epilepsiei.

2. Materiale și metode

2.1 Materiale

Sulfatul feros heptahidrat ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), clorura ferică (FeCl_3), hidroxidul de sodiu (NaOH), acidul acetic, chitosanul (CS), Canabidiolul (CBD), Penicilina (Pen) și Fludarabina (Flu) au fost achiziționate de la Sigma-Aldrich. Toți compușii prezintă puritate analitică și au fost utilizați fără purificări prealabile.

2.2 Metode de obținere

2.2.1 Sinteza Fe_3O_4

Sinteza nanoparticulelor de magnetită a fost efectuată Folosind metoda co-precipitării descrisă mai jos, după cum urmează [38]:

Pentru obținerea a 1g de magnetită, 1,2g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ și 1,4g de FeCl_3 sunt solubilizate în 200mL apă deionizată sub agitare magnetică. O altă soluție este obținută prin solubilizarea a 1,5g de NaOH în 100mL apă deionizată, conferind astfel un pH alcalin mediului de reacție, necesar procesului de co-precipitare. Prima soluție (care conține ioni de fier) este adăugată peste soluția de NaOH , în picătură, păstrând viteza de picurare constantă cu ajutorul unei pompe peristaltice. Reacția are loc la temperatura camerei (25°C) la o valoare a pH-ului fixă, de 10. După finalizarea procesului de picurare, decantarea accelerată a nanoparticulelor de magnetită este realizată prin plasarea unui magnet puternic dedesubtul vasului ce conține dispersia. După decantare, faza lichidă este eliminată, precipitatul fiind spălat cu apă ultrapură pentru a îndepărta coprodușii de reacție și posibilul exces de NaOH . Spălarea se repetă până la stabilirea pH-ului de 7 și până când excesul de ioni clorură nu mai poate fi pus în evidență prin reacția acestuia cu AgNO_3 . După spălare, nanoparticulele sunt uscate în etuvă la 60°C pentru 24 ore. Pulberea obținută va fi referențiată în continuare ca Fe_3O_4 .

2.2.2 Sinteza Fe_3O_4 @Penicilină

În vederea obținerii nanoparticulelor de magnetită cu un conținut de 20% (procente masice) de substanță bioactivă cu efect antimicrobian (Penicilină), în soluția bazică de NaOH s-a adăugat masa echivalentă de medicament aferentă 1g de magnetită și amestecul rezultat a

fost supus omogenizării până la solubilizare. Soluția precursoră de ioni de Fe (II și III) a fost pregătită în aceleași condiții ca cea din cazul Fe_3O_4 pur.

Prima soluție (care conține ioni de fier) este adăugată peste soluția de NaOH care conține și penicilină, în picătură, păstrând viteza de picurare constantă cu ajutorul unei pompe peristaltice. Reacția are loc la temperatura camerei (25°C) la o valoare a pH-ului fixă, de 10. După finalizarea procesului de picurare, se realizează separarea, spălarea, și uscarea precipitatului similar proceselor descrise anterior. Pulberea obținută va fi referențiată în continuare ca $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Pen}$.

2.2.3 Sinteza $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Fludarabină}$

În vederea obținerii nanoparticulelor de magnetită cu un conținut de 20% (procente masice) de substanță bioactivă cu efect antitumoral (Fludarabină), în soluția bazică de NaOH s-a adăugat masa echivalentă de medicament aferentă 1g de magnetită și amestecul rezultat a fost supus omogenizării până la solubilizare. Soluția precursoră de ioni de Fe (II și III) a fost pregătită în aceleași condiții ca cea din cazul Fe_3O_4 pur.

Ca și în sintezele precedente, soluția care conține ioni de fier este adăugată peste soluția de NaOH care conține și penicilină, în picătură, păstrând viteza de picurare constantă cu ajutorul unei pompe peristaltice. Reacția are loc la temperatura camerei (25°C) la o valoare a pH-ului fixă, de 10. După finalizarea procesului de picurare, se realizează separarea, spălarea, și uscarea precipitatului similar proceselor descrise anterior. Pulberea obținută va fi referențiată în continuare ca $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Flu}$.

2.2.4 Sinteza $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Penicilină}+\text{Fludarabină}$

În vederea obținerii nanoparticulelor de magnetită cu un conținut de 20% (procente masice) de substanță bioactivă cu efect antitumoral (Fludarabină) și antimicrobian (Penicilină) cumulat, în soluția bazică de NaOH s-au adăugat împreună masele echivalente de medicamente aferente 1g de magnetită, iar amestecul rezultat a fost supus omogenizării până la solubilizare. Soluția precursoră de ioni de Fe (II și III) a fost pregătită în aceleași condiții ca cea din cazul Fe_3O_4 pur.

Ca și în sintezele precedente, soluția care conține ioni de fier este adăugată peste soluția de NaOH care conține și fludarabină și penicilină, în picătură, păstrând viteza de picurare constantă cu ajutorul unei pompe peristaltice. Reacția are loc la temperatura camerei (25°C) la o valoare a pH-ului fixă, de 10. După finalizarea procesului de picurare, se realizează separarea,

spălarea, și uscarea precipitatului similar proceselor descrise anterior. Pulberea obținută va fi referențiată în continuare ca $Fe_3O_4@Pen+Flu$.

2.2.5 Sinteza $Fe_3O_4@Chitosan$

În vederea obținerii nanoparticulelor de magnetită acoperite cu chitosan, primul pas în sinteză a fost reprezentat de obținerea unei soluții de acid acetic 5% în care va fi ulterior solubilizat chitosanul. Astfel, 2g CS au fost adăugate în 300 mL soluție CH_3COOH 5% și lăsate la agitare magnetică timp de 3 ore la temperatura camerei, până la solubilizare completă. Clorura ferică și sulfatul feros heptahidratat, în proporțiile stoichiometrice descrise în sintezele precedente au fost dizolvate în soluția ce conține chitosan.

Această soluție a fost adăugată peste soluția de NH_4OH , în picătură, păstrând viteza de picurare constantă cu ajutorul unei pompe peristaltice. Reacția are loc la temperatura camerei ($25^\circ C$) la o valoare a pH-ului fixă, de 10, prin adăugare treptată de hidroxid de amoniu. S-a constatat faptul că pentru o menținere a pH-ului la valoarea stabilită, cantitatea de hidroxid de amoniu adăugată a fost mai mare, pentru compensarea acidității date de acidul acetic din soluția precursoră de ioni de fier.

După finalizarea procesului de picurare, decantarea accelerată a nanoparticulelor de magnetită este realizată prin plasarea unui magnet puternic dedesubtul vasului ce conține dispersia. După decantare, faza lichidă este eliminată, precipitatul fiind spălat cu apă ultrapură pentru a elimina coprodușii de reacție și posibilul exces de NH_4OH până la stabilirea pH-ului de 7 și până când excesul de ioni clorură nu mai poate fi pus în evidență prin reacția acestuia cu $AgNO_3$. După spălare, nanoparticulele sunt uscate în etuvă la $60^\circ C$ pentru 24 ore. Pulberea obținută va fi referențiată în continuare ca $Fe_3O_4@CS$.

2.2.6 Sinteza $Fe_3O_4@Chitosan+Canabidiol$

Pentru a obține nanoparticule de magnetită acoperită cu chitosan, cu un conținut de 20% (procente masice) de substanță bioactivă cu efect antitumoral (CBD), în soluția bazică de NH_4OH s-a adăugat masa echivalentă de medicament aferentă 1g de magnetită și amestecul rezultat a fost supus omogenizării până la solubilizare. În soluția precursoră de ioni de Fe (II și III) pregătită în aceleași condiții ca cea din cazul Fe_3O_4 a fost adăugată soluția de chitosan în acid acetic, apoi s-au urmat pașii descriși anterior. Pulberea obținută va fi referențiată în continuare ca $Fe_3O_4@CS+CBD$.

2.3 Metode de caracterizare morfo-structurală

Pentru studiul cristalinității sistemelor obținute și identificarea fazelor componente, acestea au fost supuse unei analize de difracție de raze X (XRD), fiind în același timp o metodă de analiză rapidă și reproductibilă. În acest scop s-a folosit un difractometru Panalytical Empyrean cu geometria Bragg-Brentano, ce utilizează radiație de tip Cu K_α cu lungimea de undă $\lambda=1.054 \text{ \AA}$, la 40 mA și 45 kV. Pulberile au fost mojarate în prealabil iar determinările au fost realizate la temperatura camerei, domeniul studiat fiind cuprins între valori ale unghiului de difracție 2θ de 10° și 80° , cu pas de 0.02° și timp de achiziție per pas de 100s.

Microscopia electronică de baleiaj (SEM) a fost utilizată în scopul investigării caracteristicilor morfologice și dimensionale ale nanoparticulelor obținute. Metoda prezintă avantajul unor mărimi care le depășesc cu mult pe cele permise de microscopice optice și se caracterizează printr-o adâncime de câmp mult mai mare. Probele pulverulente au fost fixate pe un suport port-obiect cu bandă dublu adezivă de C și introduse în incinta de analiză a unui microscop electronic de baleiaj Inspect F50, produs de compania FEI (Oregon, Statele Unite ale Americii), imaginile obținute fiind realizate prin înregistrarea fasciculului de electroni secundari rezultat, cu energie de 30 keV.

Spectroscopia în infraroșu cu transformată Fourier (FT-IR) permite, pe baza vibrațiilor de întindere sau de deformare specifice legăturilor chimice și grupărilor funcționale existente în compusul analizat, obținerea de informații cu privire la legăturile stabilite între suporturile magnetice utilizate pentru realizarea sistemelor de eliberare controlată prezentate în această lucrare. Spectrele IR au fost obținute folosind un echipament de tip Nicolet iN10 MX FT-IR Microscope. Acesta este dotat cu un detector de tip MCT, răcit cu azot lichid, și permite realizarea de măsurători în domeniul 4000 cm^{-1} - 400 cm^{-1} . Înregistrarea spectrelor s-a realizat în modul reflexie, la o rezoluție de 4 cm^{-1} , pentru fiecare spectru fiind realizate 32 scanări care au fost ulterior suprapuse și convertite în absorbantă cu ajutorul softului OmnicPicta (Thermo Scientific).

În scopul obținerii imaginilor de microscopie electronică prin transmisie (TEM), o cantitate redusă de probă pulverulentă a fost dispersată în etanol pur și supusă unui tratament cu ultrasunete, timp de 15 minute. Ulterior, proba a fost amplasată pe o grilă de cupru acoperită cu carbon și lăsată să se usuce, la temperatura camerei. Obținerea imaginilor TEM a fost posibilă prin analizarea probei cu ajutorul unui microscop electronic prin transmisie de înaltă rezoluție de tip Tecnai G2 F30 S-TWIN echipat cu SAED, produs de compania FEI (Oregon,

Statele Unite ale Americii). Acest microscop 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 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.

2.4 Metode de caracterizare biologică in-vitro

Tulpinile utilizate pentru acest studiu, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Candida albicans* ATCC 10231 și *Escherichia coli* ATCC 25922, au fost obținute din colecția de tulpini a laboratorului de Microbiologie, Facultatea de Biologie, Universitatea din București. Acestea au fost menținute în mediu nutritiv cu 20% glicerol la -80 °C și însămânțate în agar, astfel încât s-a obținut o suspensie microbiană de densitate $1-3 \times 10^8$ UFC/mL (UFC – unități formatoare de colonii), corespunzătoare standardului 0.5 MacFarland.

Evaluarea proprietăților antibacteriene ale sistemelor pe bază de penicilină s-a făcut prin două metode, una cantitativă și una calitativă.

Nanopulberile au fost sterilizate prin expunere la radiații UV timp de 30 min, apoi au fost realizate suspensii de concentrație de 20 mg/ mL în apă dublu distilată, sub agitare viguroasă.

Antibiograma este tehnica de evidențiere a sensibilității la antibiotice a unei tulpini. Determinarea spectrului de sensibilitate la antibiotice se poate realiza prin tehnici calitative și cantitative. În primul caz, tulpina microbiană este pusă în contact direct cu diferite antibiotice aflate într-o anumită concentrație pe când în cazul celei de-a doua tehnici tulpina microbiană este pusă în contact cu concentrații variabile ale aceluiași antibiotic. Prin intermediul acestor tehnici se va determina valoarea concentrației minime inhibitorii (C.M.I.), concentrația la care un antibiotic inhibă multiplicarea microorganismelor printr-un efect bacteriostatic.

2.4.1 Evaluarea calitativă a potențialului antimicrobian

Evaluarea calitativă a potențialului antimicrobian s-a realizat pe o placă Petri ce conține mediu Mueller Hinton, însămânțată în pânză cu tamponul, utilizând ca inocul o suspensie microbiană de densitate $1-3 \times 10^8$ UFC/mL (UFC – unități formatoare de colonii), corespunzătoare standardului 0.5 MacFarland. S-a urmat procedura descrisă de standardul CLSI 2018 pentru tehnica antibiogramelor. Astfel, se inserează un tampon în soluția din eprubetă pentru a prelua din inocul, se elimină excesul de lichid și apoi se trasează linii în zig-zag cu vârful tamponului pe mediul de cultură, având grijă să nu se pătrundă în mediu. Placa se întoarce

la 90° și se reia procesul de însămânțare. Această procedură se mai repetă încă o dată. La final, se trasează un cerc maginal. După încheierea procesului de însămânțare se pipetează 5 μ L de suspensie anterior pregătită.

Ca și medii folosite, pentru bacterii s-a utilizat geloză nutritivă (obținută prin dizolvarea agarului) iar pentru levuri s-a utilizat Sabourand (are un pH acid și astfel împiedică creșterea bacteriilor dar permite dezvoltarea fungilor). Plăcile însămânțate au fost incubate timp de 24 de ore, la 37°C. După această perioadă, microorganismele cresc și se multiplică iar după ce trece perioada de incubare se măsoară diametrul zonei de inhibiție cu ajutorul unei rigle gradate. Se observă de asemenea și dacă agentul antimicrobian înglobat în material difuzează sau nu în mediul de cultivare

2.4.2 Evaluarea cantitativă a potențialului antimicrobian

Pentru stabilirea concentrației minime inhibitorii (CMI) a pulberilor obținute, s-a utilizat o metodă cantitativă, bazată pe realizarea unor microdiluții seriale binare în mediu lichid (bulion simplu), repartizat steril în plăci cu godeuri. În primul godeu al fiecărui șir s-a adăugat o cantitate de sistem bioactiv corespunzătoare unei concentrații de 5mg/mL. Ulterior, cu ajutorul unei micropipete s-au realizat diluții binare, pornind de la godeul 1 (concentrație 5mg/mL) până la godeul 8 (unde concentrația finală va fi de 0.002441406 mg/mL). După realizarea microdiluțiilor, în fiecare godeu s-au adăugat 15 μ L suspensie microbiană de densitate 0.5 McFarland ($1-3 \times 10^8$ UFC/mL (UFC – unități formatoare de colonii)). Plăcuțele însămânțate au fost incubate 24h la 37 °C, iar după incubare s-a stabilit macroscopic valoarea CMI, pentru fiecare sistem în parte, ca fiind ultima concentrație la care nu s-a mai observat creșterea microbiană, respectiv apariția turbidității mediului.

2.4.3 Evaluarea viabilității celulare – MTT

Testul MTT se bazează pe studiul activității dehidrogenazei. Dacă celulele sunt tratate cu anumiți compuși, ei trebuie dizolvați într-un solvent adecvat. Testarea acestora a fost realizată în trei exemplare, ulterior mediindu-se rezultatele. Perioada de contact dintre celule și compus a variat în funcție de tipul celulei și de compusul de interes. Liniile de control celular cu un număr bine determinat de celule (peste care nu a fost adăugat compusul de testat) sunt păstrate. După perioada de incubare, mediul de cultură este îndepărtat.

Pentru celulele aderente, mediul este aspirat, iar pentru celulele cultivate în suspensie, placa în care au fost crescute este centrifugată la 200 rpm la 4 °C timp de 5 minute, după care mediul este îndepărtat. În fiecare godeu se adaugă 10 pL soluție MTT și 90 pL mediu de cultură

specific fiecărei linii celulare (MTT se adaugă la mediu la o concentrație finală de 0,5 mg / mL).

Compoziția mediului poate influența valorile densităților optice. Dacă mediul conține fenol roșu, pe placă se adaugă godeuri de control (“blank”-uri conținând numai soluție MTT și mediu de cultură celulară). Placa a fost incubată la 37 °C în termostaț timp de 4 ore sau până când cristalele intracelulare de formazan violet au fost vizibile pe microscop.

După perioada de incubare, soluția de lizare a celulelor este adăugată în fiecare godeu. Placa a fost acoperită și incubată în întuneric până când celulele au fost lizate și cristalele violet s-au dizolvat. Absorbanța a fost citită la o lungime de undă cuprinsă între 550-600 nm.

3. Rezultate și discuții

Difractograma de raze X înregistrată pentru proba de Fe_3O_4 este reprezentată în figura 9. Se identifică prezența magnetitei ca unică fază cristalină, cristalizată în sistem cubic (Fd-3m), conform datelor tabelare disponibile în fișa PDF4+ [04-009-8425] [39]. Maximele de difracție specific Fe_3O_4 sunt caracterizate de indicii Miller (111), (220), (311), (400), (422) și (511).

Gradul de cristalinitate al materialului obținut este unul scăzut, demonstrat prin prezența haloului de difracție la unghiuri mici. Dimensiunea de cristalit se poate estima ca fiind redusă, maximele de difracție având o lățime mare la jumătatea înălțimii (FWHM). Prezența substanțelor biologic active utilizate pentru funcționalizare sau a chitosanului nu poate fi determinată prin intermediul acestei metode, nefiind materiale cristaline.

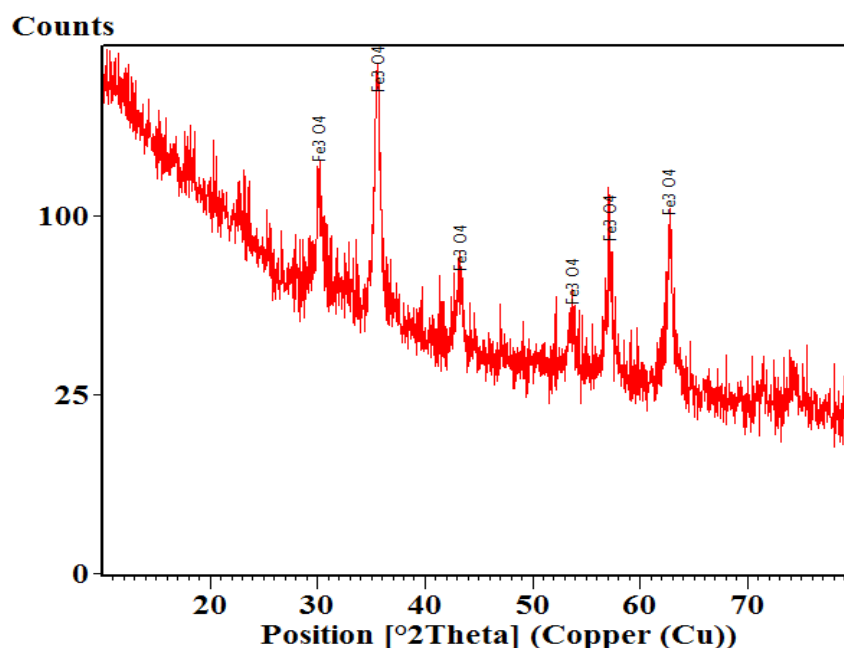


Figura 9. Difractograma de raze X pentru pulberea de Fe_3O_4

Din analiza termică complexă prezentată în figura 10, aferentă pulberii de Fe_3O_4 , se observă că proba suferă o pierdere de masă lentă, continuă, în intervalul temperatura camerei – 900 °C, mai rapidă până în 400 °C și mai lentă apoi (raportul pierderilor de masă temperatura camerei - 400°C / 400°C – 900 °C este de 2.33). Pe curba DSC se observă o serie de efecte endoterme și exoterme suprapuse. În principiu procesele endoterme sunt cauzate de pierderea unor molecule de apă, grupări -OH slab legate la suprafață sau alte molecule volatile. La temperaturi mai mare se elimină și grupările -OH legate covalent pe suprafața nanoparticulelor.

Procesele exoterme sunt oxidări, de exemplu magnetita suferă un proces de oxidare în jur de 300 °C - 400 °C când trece în maghemită. Acest proces de oxidare apare ca un efect exoterm pe curba DSC. Maghemita trece mai departe în hematit, transformare fizică vizibilă prin efectul exoterm de la 528.2 °C, procesul fiind specific tuturor probelor de magnetită (în funcție de dimensiuni, proces de sinteza etc. variază această temperatură, dar în general se situează în intervalul 500 °C – 600 °C). Masa reziduală este de 91.78%, formată din hematit de culoare roșu închis.

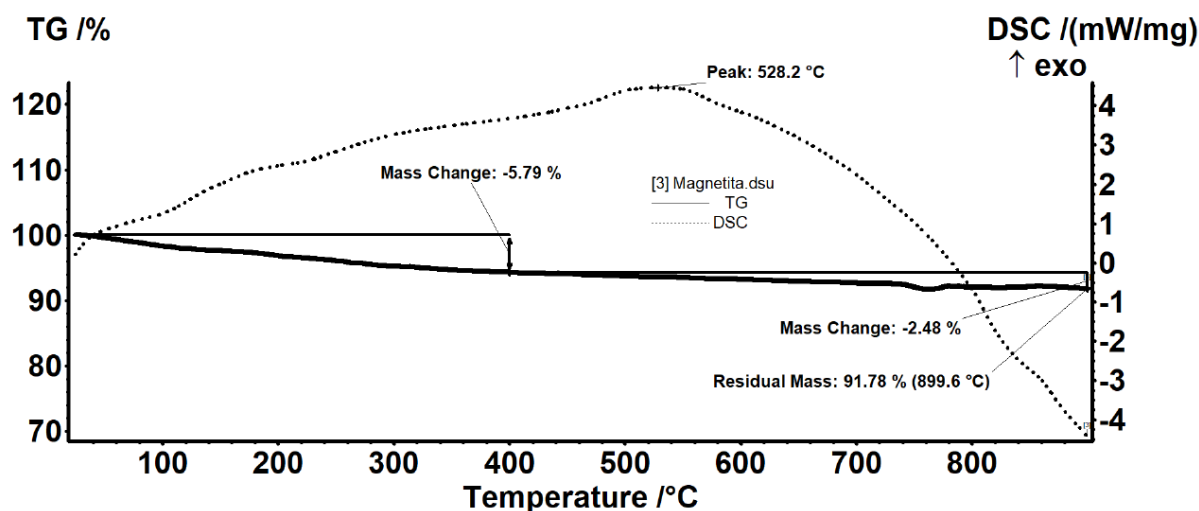


Figura 10. Analiza termică complexă pe pulberea de Fe_3O_4

Comparând rezultatul analizei termice complexe realizată pe pulberea de magnetită neîncărcată cu substanțe biologice active, cu rezultatele pentru celelalte materiale obținute, se observă diferențe în ceea ce privește raportul între pierderea de masă înregistrată până în 400 °C și cea de după 400 °C. Substanța organică existentă pe probă se va descompune/oxida la temperaturi până în 400 °C.

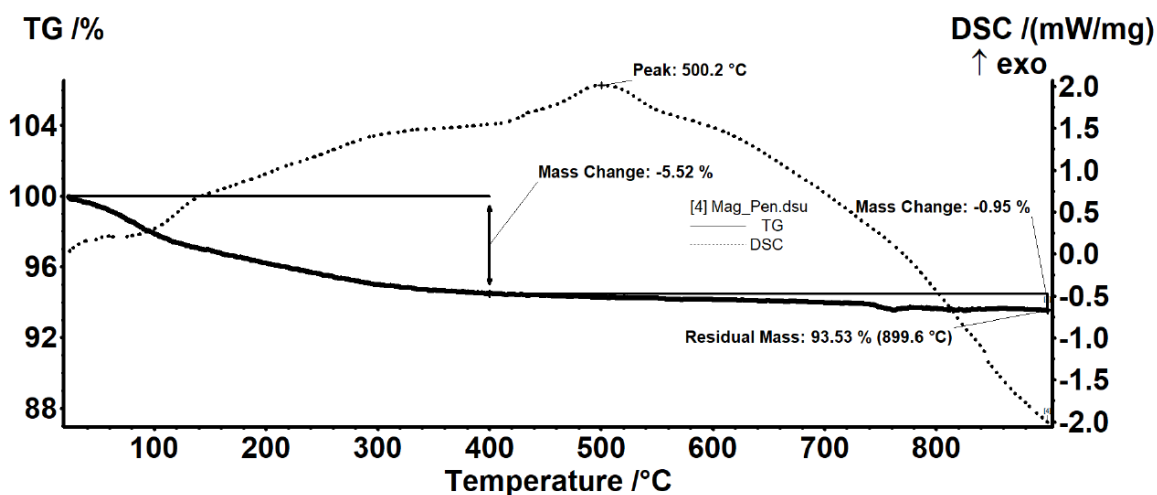


Figura 11. Analiza termică complexă pe pulberea de $Fe_3O_4@Pen$

În cazul pulberii de $Fe_3O_4@Pen$ acest raport este de 5.81 și indică o încărcare mare cu substanță organică (în acest caz penicilină) prin comparație cu magnetita simplă. La proba aceasta încărcarea pare a fi cea mai mare (figura 11). Transformarea maghemită / hematit, are loc la 500.2 °C, temperatură mai scăzută decât pentru magnetita simplă, ca urmare a modificărilor induse de arderea substanței organice de pe suprafața nanoparticulelor în etapele anterioare. Masa reziduală este de 93.53%.

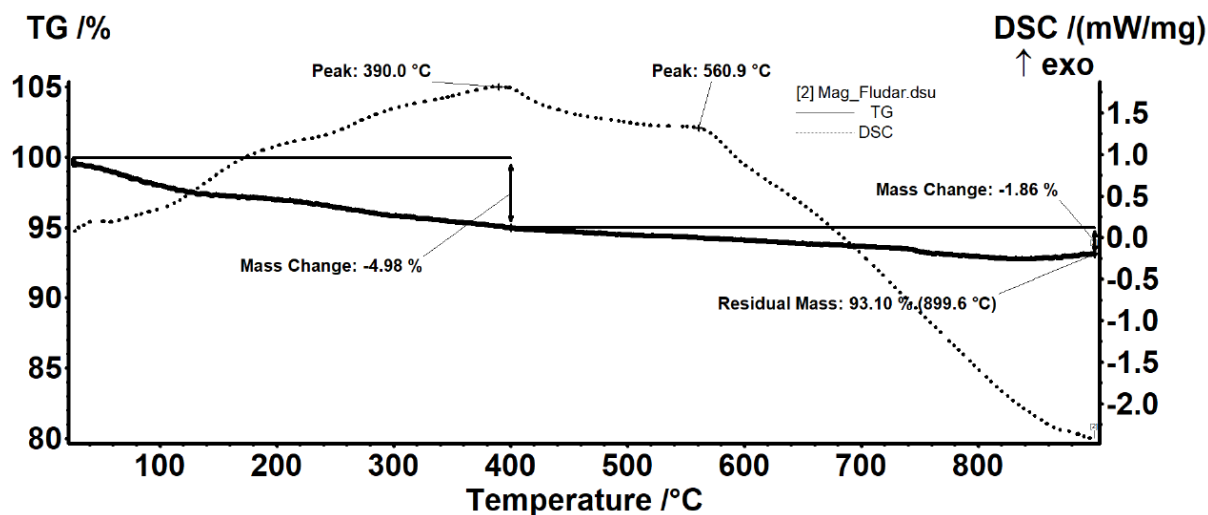


Figura 12. Analiza termică complexă pe pulberea de $Fe_3O_4@Flu$

Proba aferentă $Fe_3O_4@Pen$ suferă o pierdere de masă lentă, continuă, în intervalul temperatura camerei – 900 °C, mai rapid până în 400 °C și mai lentă apoi (raportul pierderilor de masa temperatura camerei – 400 °C /400 °C - 900 °C este de 2.67) (figura 12). Acest raport este mai mare decât la magnetita simplă, dar nu semnificativ mai mare, ceea ce indică o reținere a fludarabinei pe magnetită, dar în cantitate mai mică decât precum penicilina anterior

analizată. Pe curba DSC se observă o serie de efecte endoterme și exoterme suprapuse. În principiu procesele endoterme sunt cauzate de pierderea unor molecule de apă, grupări -OH slab legate la suprafață sau alte moleculele volatile.

La temperatură mai mare (peste 150 °C – 200 °C) se elimină și grupările -OH legate covalent pe suprafața nanoparticulelor și se oxidează substanța organică existentă. De asemenea magnetita suferă un proces de oxidare în jur de 3 °C - 400°C (se observă maximul exoterm de la 390 °C, dar poate să fie și o suprapunere cu arderea compusului organic) când trece în maghemită. Maghemita trece mai departe în hematit, transformare fizică vizibilă prin efectul exoterm de la 560.9 °C. În cazul în care în urma oxidării substanței organice mai rămâne carbon, atunci acesta este oxidat la CO₂ după 500 °C, efectul exoterm suprapunându-se peste cel al transformării maghemită-hematit. Masa reziduală este de 93.10%, formată din hematit.

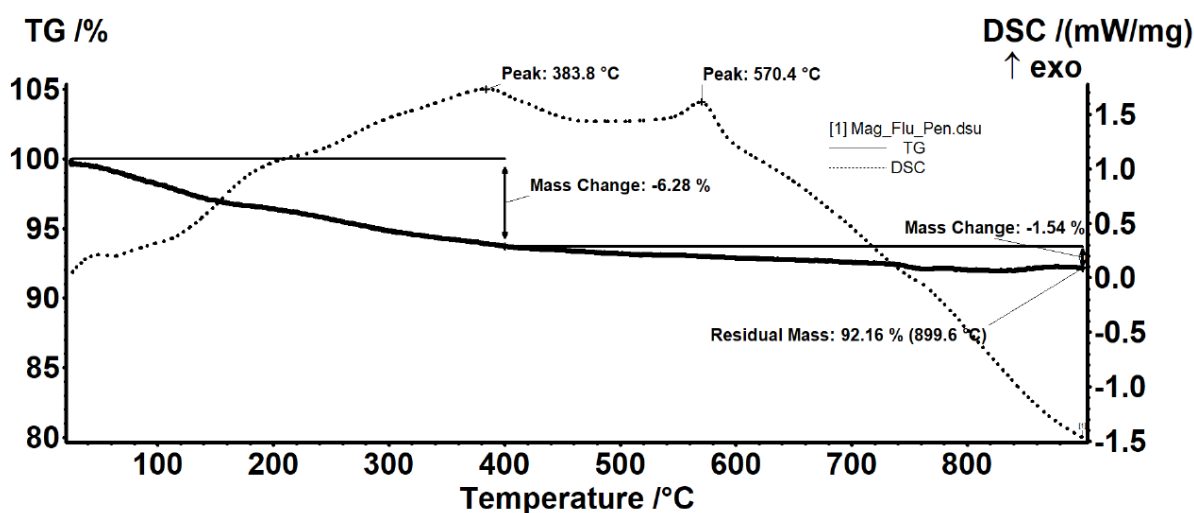
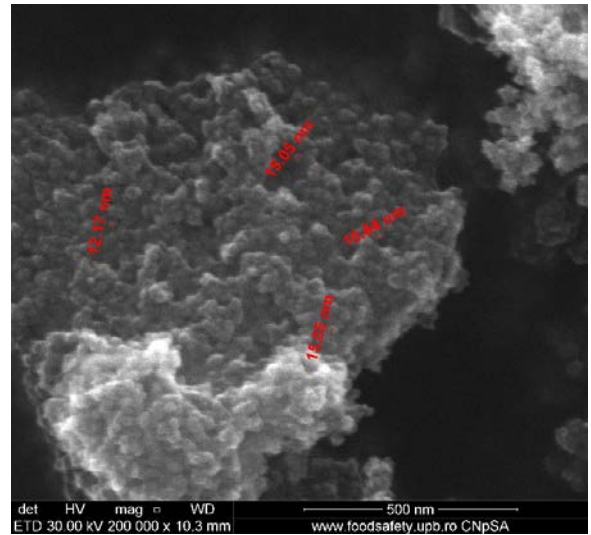
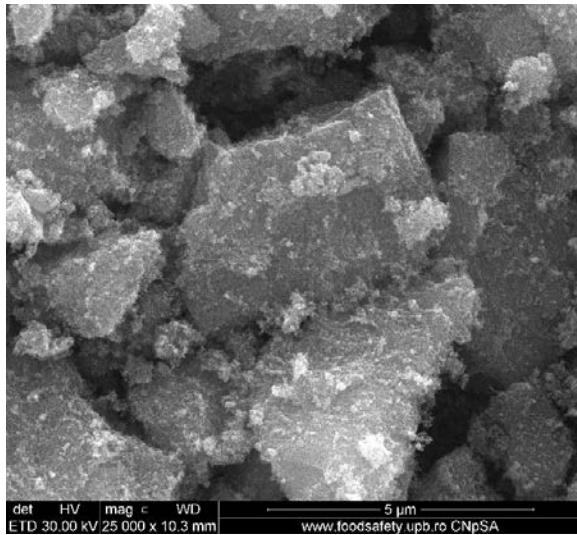


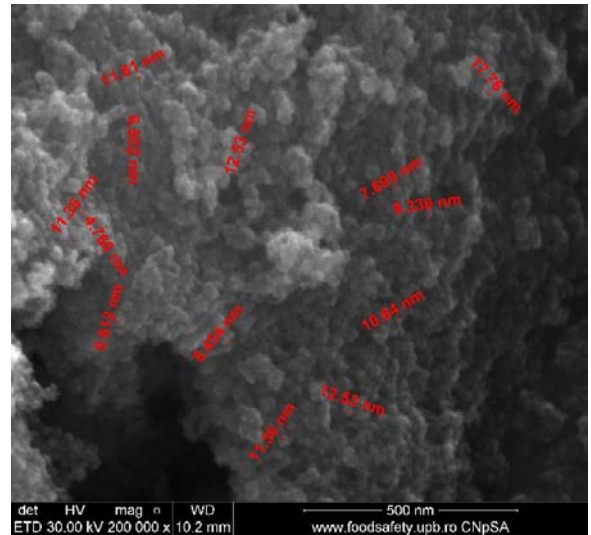
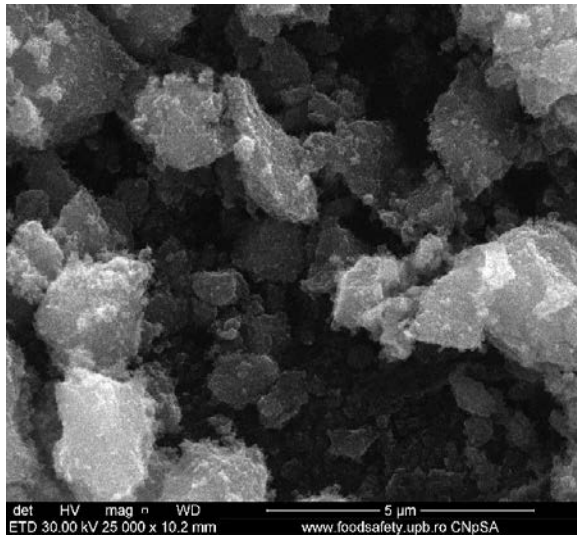
Figura 13. Analiza termică complexă pe pulberea de Fe₃O₄@Pen Flu

În cazul probei complexe, ce are în componență fludarabină și penicilină, se poate observa din analiza termică complexă o încărcare bună cu substanțe organice, prin comparație cu magnetita simplă, ca urmare a raportului de 4.07 între pierderea de masă până în 400 °C și după 400 °C. În acest caz încărcarea este situată între valoarea obținută la penicilină și cea obținută la fludarabină. Masa reziduală în acest caz este de 92.16%.

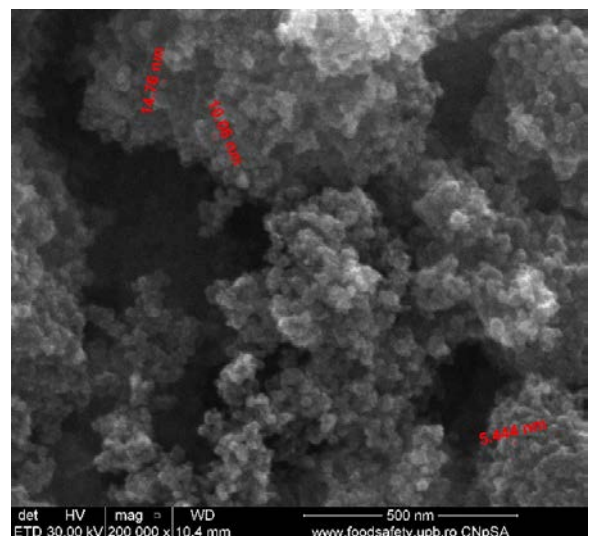
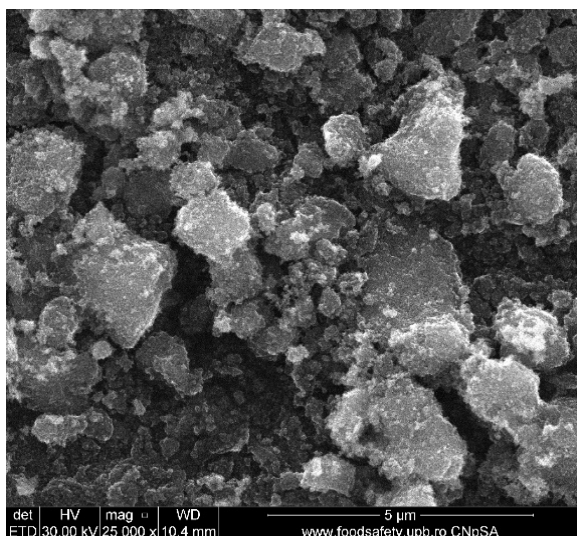
Din imaginile de microscopie electronică de baleiaj prezentate în figura 14, corespunzătoare materialelor sintetizate în cadrul acestui proiect, se observă caracterul nanostructurat al pulberilor obținute. Nanoparticulele de Fe₃O₄ sunt prezente în toate eșantioanele, mai ales dispuse în aglomerate, cu o morfologie sferică și diametrul între 5 nm și 20 nm pentru eșantionul standard.



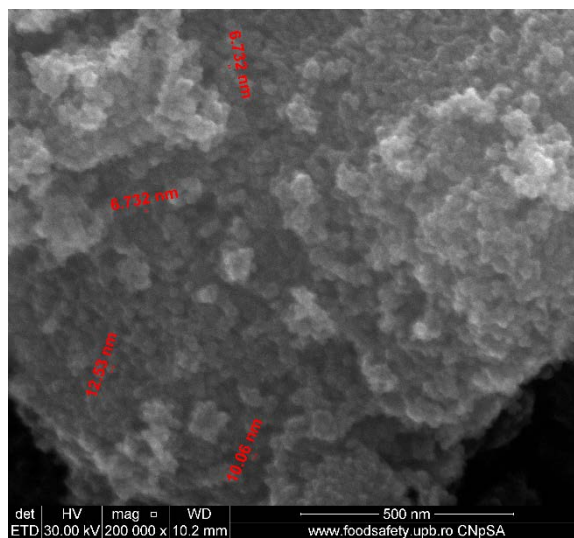
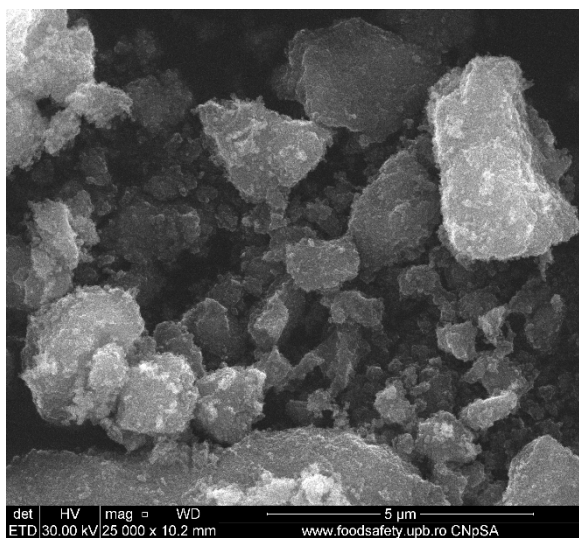
Fe_3O_4



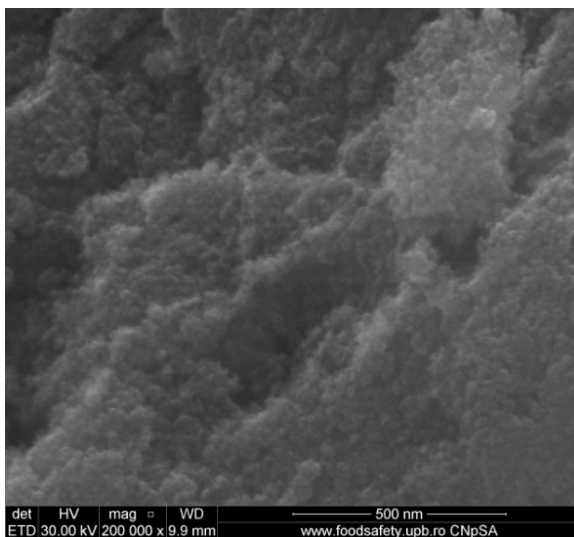
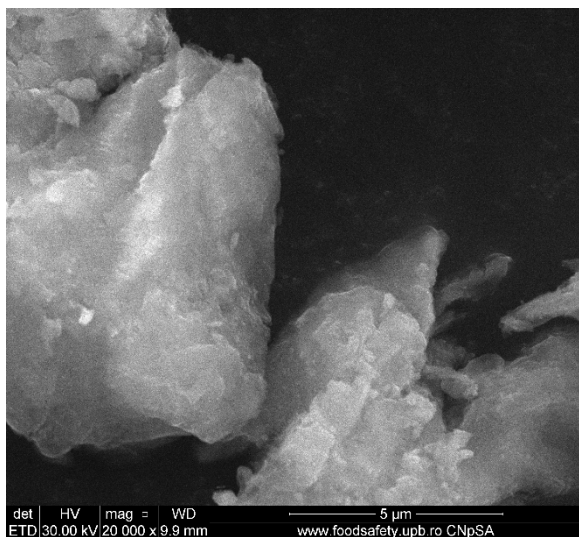
$\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Flu}$



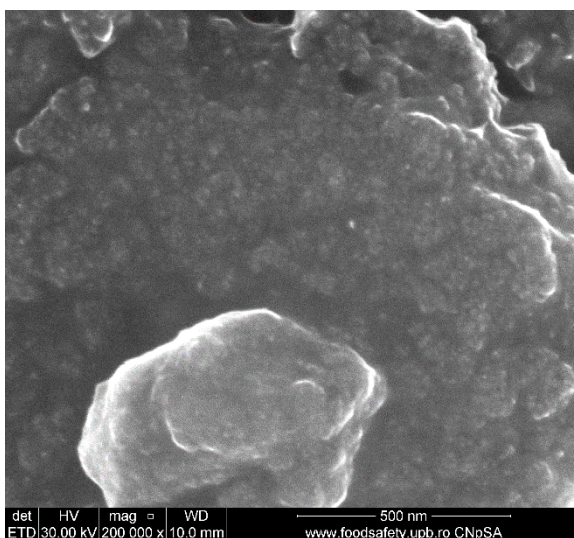
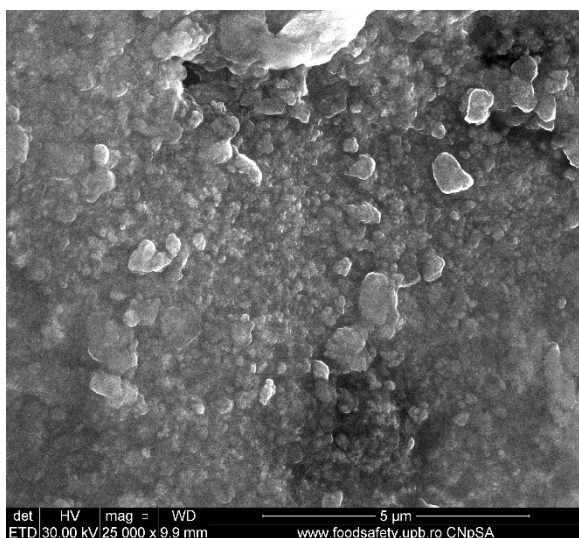
$\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Pen}$



$\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Pen+Flu}$



$\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CS}$

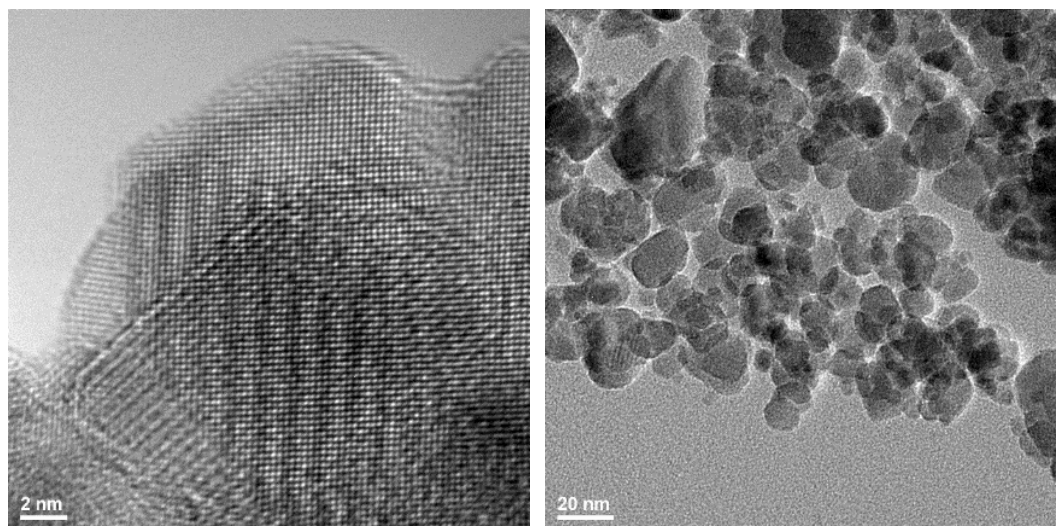


$\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CS+CBD}$

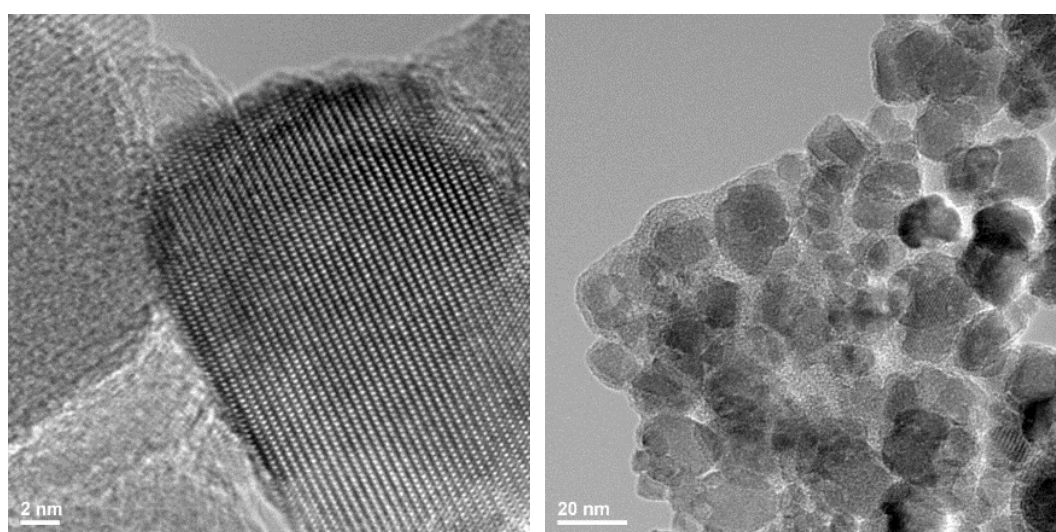
Figura 14. Micrografii SEM pentru pulberile obținute

Analizând pulberea $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CS}$, se observă formarea nanoparticulelor de magnetită cu un diametru între 3 nm și 7 nm. Acoperirea nanoparticulelor cu un strat polimeric de protecție a determinat o dimensiune mai mică a particulelor în comparație cu proba standard, cu o tendință mai mică de agregare, ca urmare a scăderii tensiunilor de suprafață și a magnetizării.

Din imaginile de microscopie electronică prin transmisie în câmp luminos (TEM) prezentate în figurile 15a și 15b se confirmă informațiile prezentate la SEM, particulele obținute au dimensiuni cuprinse între 10-20 nm și morfologie poliedrală. Se observă că în cazul probei de magnetită simplă particulele au tendință mare de aglomerare, care scade însă după adăugarea polimerului. Acest fapt evidențiază din nou modificările care au avut loc la suprafața Fe_3O_4 și care sunt menite să îi confere un plus de stabilitate în contact cu fluidele fiziologice și oxigenul din sânge.



Fe_3O_4



$\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Flu}$

Figura 15a. Imagini TEM în câmp luminos și de înaltă rezoluție (HR-TEM) pentru pulberile obținute

În cazul pulberilor cu un conținut teoretic de substanță biologic activă de 20% se observă depunerea unui strat subțire, de câțiva nm grosime, de substanță necristalină (asociată cu penicilina, fludarabina, chitosanul sau uleiul esențial de canabidiol) pe suprafața particulelor de magnetită cristalină.

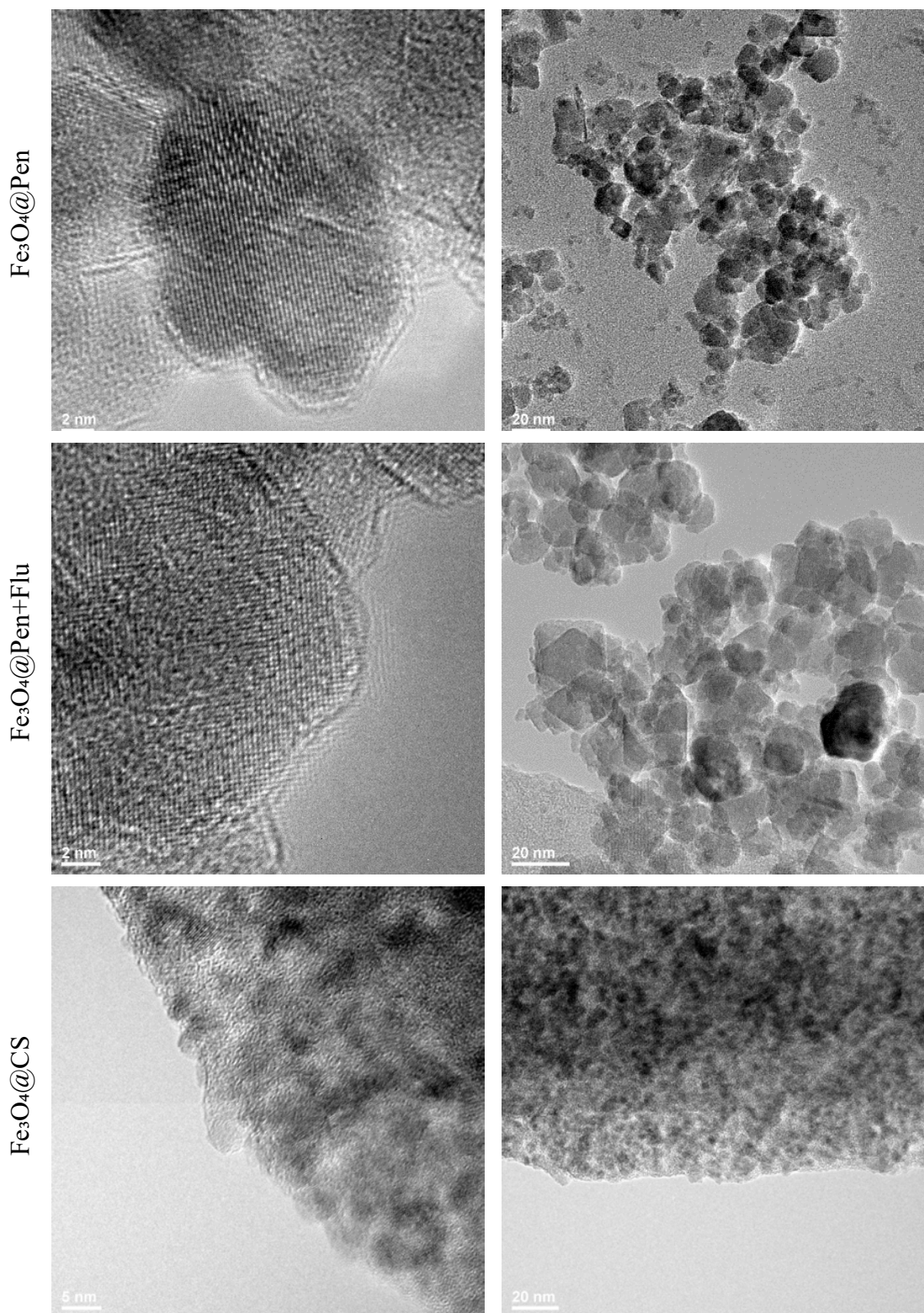


Figura 15b. Imagini TEM în câmp luminos și de înaltă rezoluție (HR-TEM) pentru pulberile obținute

În figurile 16 și 17 sunt prezentate cu intenția studiului comparativ spectrele FT-IR ale materialelor obținute. Se observă în spectrul caracteristic Fe_3O_4 prezența benzii de la 551 cm^{-1} , specifică legăturii Fe-O din structura magnetitei, care scade ușor în absorbantă odată cu introducerea substanțelor biologic active sau a polimerului. De asemenea, după adăugarea chitosanului, o serie de benzi caracteristice acestuia se pot identifica, cu precădere la 1622 cm^{-1} și 1520 cm^{-1} , atribuite grupărilor amidă I și amidă II, la 1062 cm^{-1} specifică legăturii C-O din structura zaharidelor, iar la 1374 cm^{-1} s-a regăsit deformarea grupării $-\text{CH}_3$. Banda largă din regiunea 3000 cm^{-1} - 3500 cm^{-1} este corespunzătoare vibrației de întindere a legăturilor N-H și O-H, iar cea de la 2900 cm^{-1} corespunde vibrației de întindere a legăturii C-H.

După introducerea uleiului natural, se observă o creștere în absorbantă a benzilor din regiunea corespunzătoare vibrației de întindere a legăturilor O-H, precum și apariția câtorva benzi noi, specifice acestuia. Se remarcă astfel cele 2 benzi de la 1622 , respectiv 1520 cm^{-1} ce caracterizează vibrația de întindere a legăturii C=C din nucleul benzenic, precum și cele 2 de la 2853 cm^{-1} , respectiv 2923 cm^{-1} , specifice grupării metilen din structura CBD.

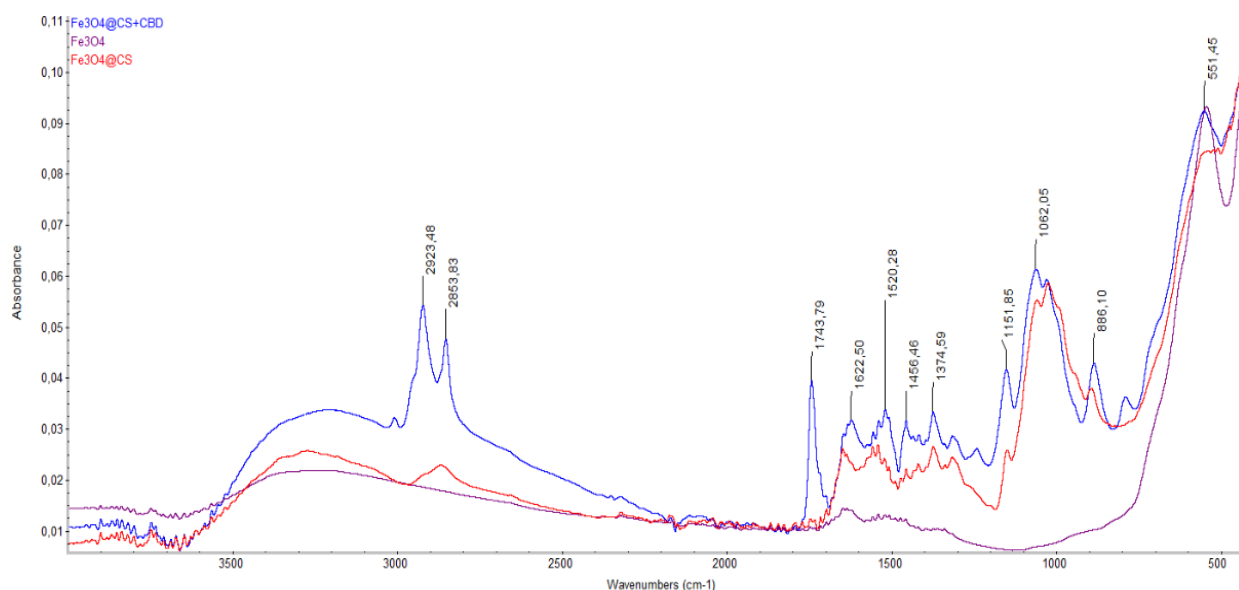


Figura 16. Spectrele FT-IR pentru pulberile de Fe_3O_4 , $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CS}$ și $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CS}+\text{CBD}$

Analizând spectrul FT-IR al magnetitei încărcată cu penicilină și fludarabină simultan, se observă apariția benzii specifică grupării carbonil C=O din structura agentului antimicrobian (penicilina) la numărul de undă de 1620 cm^{-1} , respectiv a vibrațiilor antisimetrice de întindere caracteristice legăturii P-O (ν_3) din structura agentului antitumoral (fludarabina) la numărul de undă de 1101 cm^{-1} , ceea ce confirmă adsorbția cu succes a ambilor agenți terapeutici pe suprafața magnetitei.

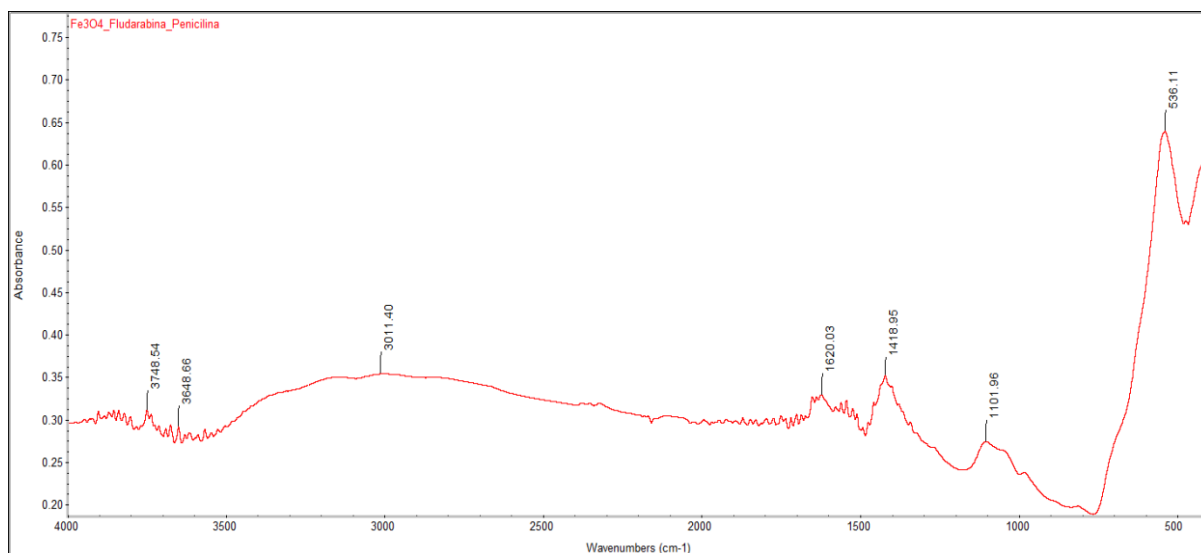


Figura 17. Spectrele FT-IR pentru pulberile de $Fe_3O_4@Pen+Flu$

Evaluarea efectului antimicrobian s-a realizat pe materiale pulverulente, prin determinarea diametrului zonei de inhibiție a creșterii (metodă calitativă) și a concentrației minim inhibitorii (metodă cantitativă). Rezultatele au arătat că materialele supuse analizei prezintă efecte antimicrobiene diverse în funcție de conținutul în agenți terapeutici, dar și în funcție de tipul de microorganism testat (*C. albicans*, *S. aureus*, *E. coli*).

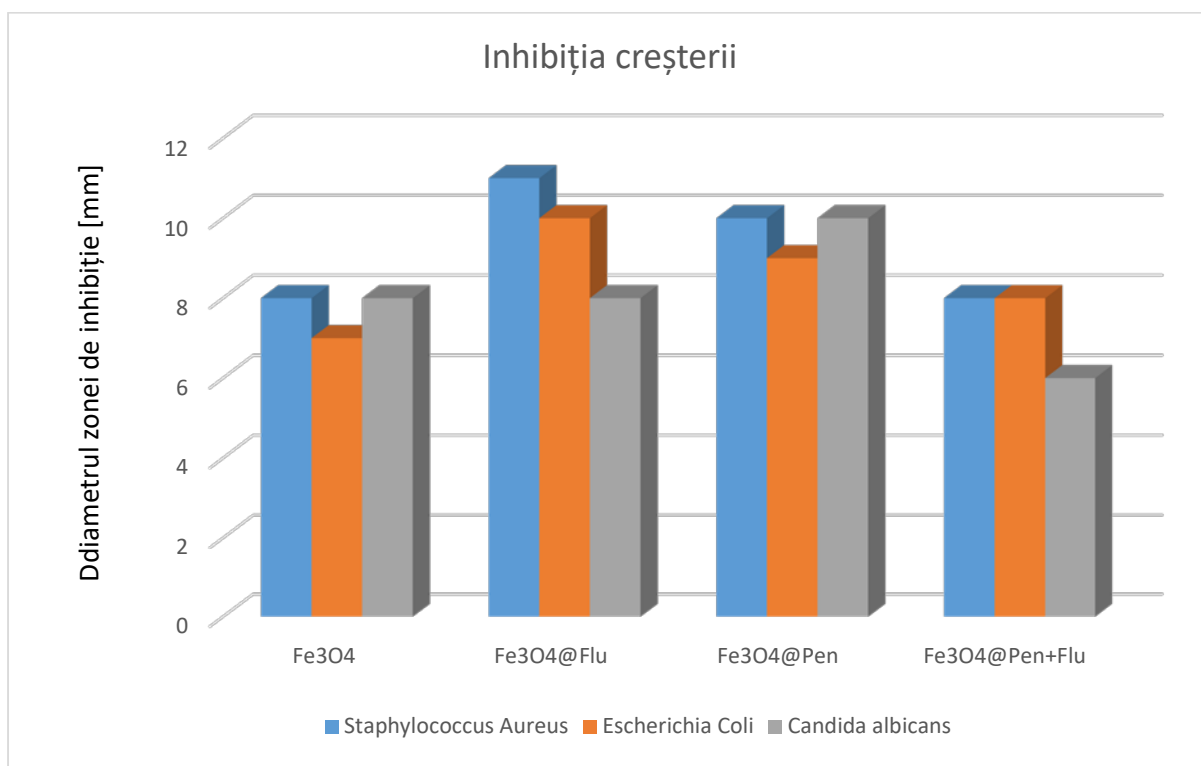


Figura 18. Evaluarea diametrului zonei de inhibiție a creșterii microorganismelor

Din punct de vedere calitativ (figura 18) s-a observat că materialele sintetizate și luate în analiză prezintă efect antimicrobian raportat la toate microorganismele studiate, cu o specificitate împotriva *S. aureus*. Este de menționat faptul că, deși fludarabina este utilizată drept agent antitumoral, aceasta prezintă și un efect antimicrobian remarcabil, rezultatele obținute în cazul pulberii Fe₃O₄@Flu fiind comparabile cu cele obținute în cazul pulberii Fe₃O₄@Pen.

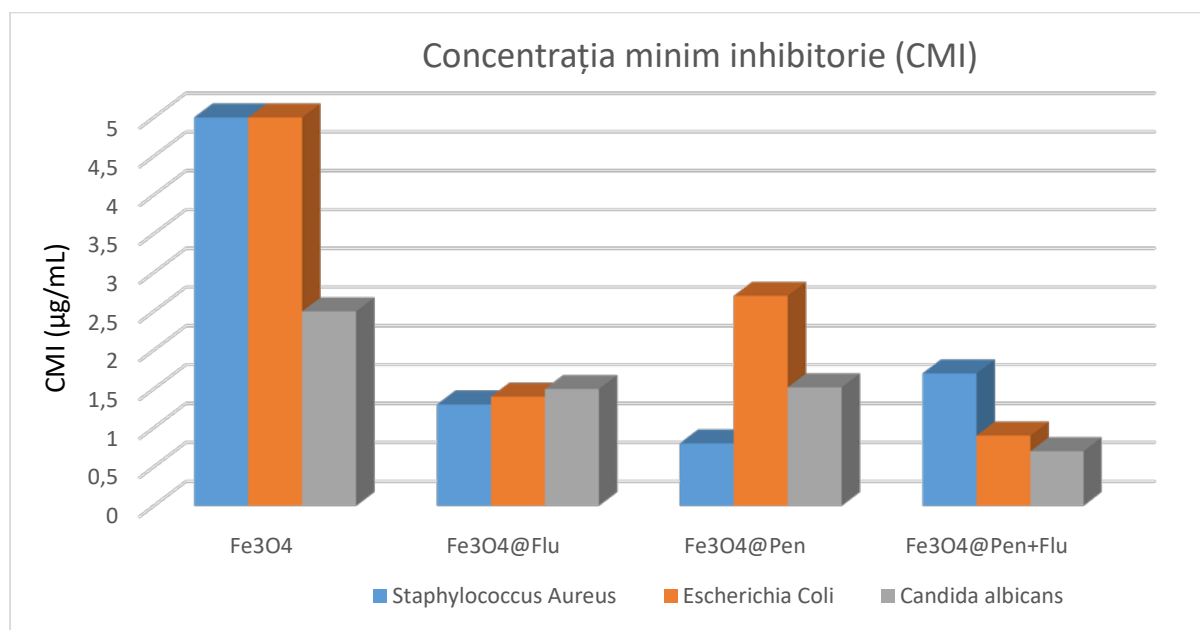


Figura 19. Reprezentare grafică a concentrației minim inhibitorie materialelor obținute

În figura 19 sunt prezentate rezultatele evaluării cantitative a activității antimicrobiene pentru pulberile pe bază de magnetită și substanțe biologice active. În această metodă de analiză, o valoare scăzută a concentrației minim inhibitorie (CMI) este asociată cu un caracter antimicrobian pronunțat. Se observă astfel o bună corelare a informațiilor rezultate cu cele anterior prezentate, în cazul metodei calitative, remarcându-se și de această dată cel mai bun efect împotriva *S. aureus* în cazul Fe₃O₄@Pen.

Fludarabina și penicilina asociate în sistemul complex cu 2 agenți terapeutici par să confere materialului final un efect sinergetic, proba Fe₃O₄@Pen + Flu prezentând cele mai bune rezultate împotriva levurii *C. albicans* și bacteriei Gram-negativă *E. coli*.

Pentru a determina caracterul antitumoral al nanosistemelor obținute, a fost efectuat testul MTT, implicând evaluarea calitativă *in-vitro* a viabilității celulare (figura 20). În acest sens, s-a utilizat linia SW-403 de celule canceroase, care au fost incubate în prezența materialelor de analizat. În fiecare godeu se adaugă 10 μ L de soluție MTT și 90 μ L de mediu de cultură specific pentru fiecare linie de celule (MTT se adaugă la mediu la o concentrație finală de 0.5 mg / mL). Placa a fost incubată la 37 °C în termostat timp de 4 ore sau până când cristalele intracelulare de formazan violet au fost vizibile pe microscop. După perioada de incubare, soluția de lizare a celulei este adăugată la fiecare godeu. Placa a fost acoperită și incubată în întuneric până când celulele au fost lizate și cristalele violete s-au dizolvat. Absorbanta a fost citită la o lungime de undă cuprinsă între 550 nm - 600 nm.

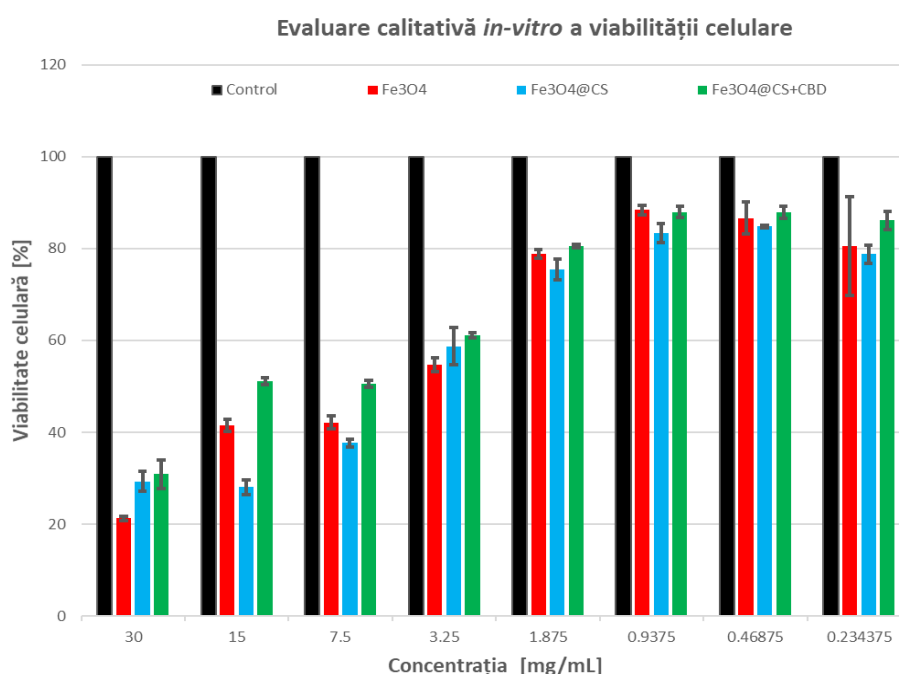


Figura 20. Evaluarea calitativă *in-vitro* a viabilității celulare

Materialele pulverulente analizate au fost adăugate în diferite concentrații în mediul MTT / SW-403 pentru a evalua cea mai bună concentrație la care celulele tumorale prezintă cea mai scăzută viabilitate celulară. Se observă că, odată cu creșterea concentrației probelor, în general, viabilitatea celulară a celulelor SW-403 scade. La cea mai mare concentrație (30 mg/mL), după 36 de ore de la dispersia pulberii în mediu, doar aproximativ 25% din celulele inițiale sunt încă în viață, dovedind efectul antitumoral al nanosistemelor obținute.

4. Concluzii

Prin intermediul activității experimentale din cadrul acestui proiect au fost obținute particule de magnetită (Fe_3O_4) în prezența unui polimer (chitosan) și a mai multor substanțe biologice active (ulei natural cu proprietăți antitumorale – canabidiol, agent antitumoral utilizat în medicină – fludarabină și agent antimicrobian - penicilină), cu scopul de a dezvolta sisteme cu eliberare controlată și țintită de medicamente.

Sinteza chimică utilizată pentru obținerea nanoparticulelor de magnetită a fost co-precipitare, o metodă eficientă și relativ ușoară pentru obținerea particulelor cu dimensiuni reduse (<20 nm), cu posibilitate de internalizare celulară.

Pentru caracterizarea pulberilor rezultate s-au folosit o serie de tehnici de caracterizare morfo-structurală și de determinare a activității antibacteriene și antitumorale *in-vitro*, care au avut ca rezultat recomandarea materialelor sintetizate drept sisteme cu aplicații biomedicale.

Pulberile obținute s-au dovedit a avea morfologie poliedrală și cvas-sferică, cu dimensiuni reduse (10-20 nm), și un potențial anticancerigen demonstrat asupra liniei tumorale SW-403, ceea ce creează premisele unor potențiale aplicații în realizarea țintită a chemoterapiei.

În viitor, ne propunem continuarea studiului prin evaluarea *in-vitro* a capacității și vitezei de eliberare a substanței active, precum și de a modifica parametrii de sinteză în vederea realizării unei eliberări controlate, lente, după ce are loc internalizarea celulară.

5. Referințe bibliografice

1. Li, Q., et al., *Correlation between particle size/domain structure and magnetic properties of highly crystalline Fe₃O₄ nanoparticles*. Nature, 2017.
2. Wu, W., et al., *Recent progress on magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, surface functional strategies and biomedical applications*. Science and technology of advanced materials, 2015. **16**(2): p. 023501-023501.
3. Ghazanfari, M.R., et al., *Perspective of Fe₃O₄ Nanoparticles Role in Biomedical Applications*. Biochemistry Research International, 2016. **2016**: p. 32.
4. Li, L., et al., *Superparamagnetic iron oxide nanoparticles as MRI contrast agents for non-invasive stem cell labeling and tracking*. Theranostics, 2013. **3**(8): p. 595-615.
5. Angrove, D.M., *Magnetite: Structure, Properties, and Applications*. 2011: Nova Science Publishers.
6. Kim, Y. and Y. Roh, *Environmental Application of Biogenic Magnetite Nanoparticles to Remediate Chromium(III/VI)-Contaminated Water*. Minerals, 2019. **9**(5).
7. Gozde, U., et al., *Magnetite: From Synthesis to Applications*. Current Topics in Medicinal Chemistry, 2015. **15**(16): p. 1622-1640.
8. Javed, Y., et al., *MRI based on iron oxide nanoparticles contrast agents: effect of oxidation state and architecture*. Journal of Nanoparticle Research, 2017. **19**(11): p. 366.
9. Revia, R.A. and M. Zhang, *Magnetite nanoparticles for cancer diagnosis, treatment, and treatment monitoring: recent advances*. Materials today (Kidlington, England), 2016. **19**(3): p. 157-168.
10. Kim, E.H., et al., *Gold nanoparticles as a potent radiosensitizer in neutron therapy*. Oncotarget, 2017. **8**(68): p. 112390-112400.
11. Chang, D., et al., *Biologically Targeted Magnetic Hyperthermia: Potential and Limitations*. Frontiers in pharmacology, 2018. **9**: p. 831-831.
12. Garg, H., et al., *Survivin: a unique target for tumor therapy*. Cancer Cell International, 2016. **16**(1): p. 49.
13. Gupta, A.K. and M. Gupta, *Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications*. Biomaterials, 2005. **26**(18): p. 3995-4021.
14. Li, T.-J., et al., *In vivo anti-cancer efficacy of magnetite nanocrystal - based system using locoregional hyperthermia combined with 5-fluorouracil chemotherapy*. Biomaterials, 2013. **34**(32): p. 7873-7883.

15. Sundaramurthi, D., et al., *Electrospun nanostructured chitosan–poly(vinyl alcohol) scaffolds: a biomimetic extracellular matrix as dermal substitute*. Biomedical Materials, 2012. **7**(4): p. 045005.
16. Younes, I., et al., *Influence of acetylation degree and molecular weight of homogeneous chitosans on antibacterial and antifungal activities*. Int J Food Microbiol, 2014. **185**: p. 57-63.
17. Moratti, S.C. and J.D. Cabral, *Antibacterial properties of chitosan*. 2017: p. 31-44.
18. Baldrick, P., *The safety of chitosan as a pharmaceutical excipient*. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2010. **56**(3): p. 290-299.
19. MacGowan, A. and E. Macnaughton, *Antibiotic resistance*. Medicine, 2017. **45**(10): p. 622-628.
20. Kumar, M., et al., *Antibiotics bioremediation: Perspectives on its ecotoxicity and resistance*. Environment International, 2019. **124**: p. 448-461.
21. Morehead, M.S. and C. Scarbrough, *Emergence of Global Antibiotic Resistance*. Primary Care: Clinics in Office Practice, 2018. **45**(3): p. 467-484.
22. Gutova, M., et al., *Optimization of a Neural Stem-Cell-Mediated Carboxylesterase/Irinotecan Gene Therapy for Metastatic Neuroblastoma*. Molecular therapy oncolytics, 2016. **4**: p. 67-76.
23. Liakos, I., A.M. Grumezescu, and A.M. Holban, *Magnetite nanostructures as novel strategies for anti-infectious therapy*. Molecules (Basel, Switzerland), 2014. **19**(8): p. 12710-12726.
24. Syed, I., S. Garg, and P. Sarkar, *Entrapment of essential oils in hydrogels for biomedical applications*, in *Polymeric Gels*. 2018. p. 125-141.
25. Chifiriuc, C., et al., *Hybrid magnetite nanoparticles/Rosmarinus officinalis essential oil nanobiosystem with antibiofilm activity*. Nanoscale Research Letters, 2012. **7**(1): p. 209.
26. Marková, Z., et al., *Chitosan-based synthesis of magnetically-driven nanocomposites with biogenic magnetite core, controlled silver size, and high antimicrobial activity*. Green Chemistry, 2012. **14**(9): p. 2550-2558.
27. Chifiriuc, C.M., et al., *Improved antibacterial activity of cephalosporins loaded in magnetic chitosan microspheres*. International Journal of Pharmaceutics, 2012. **436**(1): p. 201-205.

28. Stephen Inbaraj, B., et al., *The synthesis and characterization of poly(γ -glutamic acid)-coated magnetite nanoparticles and their effects on antibacterial activity and cytotoxicity*. Nanotechnology, 2011. **22**(7): p. 075101.
29. Iconaru, S.L., et al., *Synthesis and characterization of polysaccharide-magnetite composite nanoparticles and their antibacterial properties*. Nanoscale research letters, 2012. **7**(1): p. 576-576.
30. Grumezescu, V., et al., *MAPLE fabricated magnetite@eugenol and (3-hydroxybutyric acid-co-3-hydroxyvaleric acid)-polyvinyl alcohol microspheres coated surfaces with anti-microbial properties*. Applied Surface Science, 2014. **306**: p. 16-22.
31. Grumezescu, A.M., et al., *Synthesis, characterization and in vitro assessment of the magnetic chitosan-carboxymethylcellulose biocomposite interactions with the prokaryotic and eukaryotic cells*. International Journal of Pharmaceutics, 2012. **436**(1): p. 771-777.
32. Walsh, C., *Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance*. Nature, 2000. **406**(6797): p. 775-781.
33. Sauvage, E., et al., *The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis*. FEMS Microbiology Reviews, 2008. **32**(2): p. 234-258.
34. Adkins, J.C., D.H. Peters, and A. Markham, *Fludarabine*. Drugs, 1997. **53**(6): p. 1005-1037.
35. Ramer, R., et al., *Cannabidiol inhibits lung cancer cell invasion and metastasis via intercellular adhesion molecule-1*. The FASEB Journal, 2012. **26**(4): p. 1535-1548.
36. Ramer, R., et al., *Cannabidiol inhibits cancer cell invasion via upregulation of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1*. Biochemical Pharmacology, 2010. **79**(7): p. 955-966.
37. Zuardi, A.W., *Cannabidiol: from an inactive cannabinoid to a drug with wide spectrum of action*. Brazilian Journal of Psychiatry, 2008. **30**(3): p. 271-280.
38. Ene, V.L., et al., *Single step synthesis of glutamictartaric acid stabilised Fe₃O₄ nanoparticles for targeted delivery systems*. Rev. Chim. (Bucharest, Rom.), 2020. **5** (Accepted for publication).
39. Okudera, H., K. Kihara, and T. Matsumoto, *Temperature dependence of structure parameters in natural magnetite: single crystal X-ray studies from 126 to 773 K*. Acta Crystallographica Section B: Structural Science, 1996. **52**(3): p. 450-457.