

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
“VICTOR BABEȘ” DIN TIMIȘOARA
FACULTATEA DE FARMACIE
DEPARTAMENTUL II**

TĂCULESCU ȘT. ELENA-ALINA



TEZĂ DE DOCTORAT

**CONTRIBUȚII PRIVIND EVALUAREA
EXPERIMENTALĂ A DIFERITELOR MATERIALE
MAGNETICE PE BAZĂ DE NANOPARTICULE DE
OXID DE FIER, DIN PUNCT DE VEDERE FIZICO-
CHIMIC ȘI BIOLOGIC**

Coordonator Științific
PROF. UNIV. DR. CRISTINA ADRIANA DEHELEAN

Timișoara
2022

CUPRINS

1. INTRODUCERE	1
2. STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII.....	2
3. SCOP ȘI OBIECTIVE.....	6
4. contribuții personale	8
4.1. SINTEZA ȘI CARACTERIZAREA NANOPARTICULELOR DE Fe_3O_4 FABRICATE PRIN METODA COMBUSTIEI, CA INSTRUMENTE ÎN HIPERTERMIE	8
4.2. SINTEZA ȘI CARACTERIZAREA NANOPARTICULELOR MAGNETICE BIOACTIVE, DIN PUNCT DE VEDERE AL APLICAȚIILOR ÎN HIPERTERMIE	9
4.3. BIOSINTEZA NANOPARTICULELOR DE OXID DE FIER: CARACTERIZAREA ȘI CITOTOXICITATEA LOR IN VITRO PE LINII CELULARE SĂNĂTOASE ȘI TUMORALE.....	10
4.4. IMPACTUL BIOLOGIC AL NANOPARTICULELOR MAGNETICE VERZI PE DOUĂ MONOSTRATURI TUMORIGENE PULMONARE DIFERITE ȘI PE UN MODEL 3D BRONȘIC NORMAL - MICROȚESUT EPIAIRWAY™	11
4.5. IMPACTUL BIOLOGIC AL NANOPARTICULELOR SOLID-LIPID PE CARCINOM UMAN DE PLĂMÂN (A549) ȘI PE UN MODEL 3D BRONȘIC NORMAL – MICROȚESUT EPIAIRWAY™	13

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

1. INTRODUCERE

Nanobiotehnologia este cea mai promițătoare tehnologie a secolului XXI și reprezintă un domeniu cu trăsături interdisciplinare puternice, întrucât reunește caracteristicile fizico-chimice ale unei substanțe (la nivel molecular), cu știința materialelor și ingineria materialelor privind proiectarea, dezvoltarea și aplicarea acestora și de asemenea cu aspectele sale biologice, pentru a manipula procese moleculare, genetice și celulare. În ceea ce privește medicina, nanobiotehnologia este utilizată la scară largă în direcționarea medicamentelor, imagistică, diagnosticare, prevenție și tratament. În sănătate, această tehnologie este utilă prin aplicarea unui agent *in vitro* și/sau *in vivo*, cu potențial biomedical, dar cel mai mare potențial al acestei științe îl reprezintă încă dezvoltarea de tratamente medicale noi și eficiente. Nanotehnologia se concentrează pe fabricarea, manipularea și utilizarea diferitelor materiale incluse în scara de mărime nanometrică (1-100 nm).

Nanoparticulele anorganice (NPs) sunt considerate a fi cele mai promițătoare nanomateriale pentru domeniul biomedical, industria auto, protecția mediului, precum și în dezvoltarea de noi dispozitive electronice. Cea mai importantă clasă de NPs anorganice este reprezentată de nanoparticulele de oxid de fier (IONPs). De când Administrația SUA pentru Alimente și Medicamente (FDA), a aprobat nanomedicamentele, IONPs-urile sunt cele mai studiate materiale, datorită proprietăților lor remarcabile și unice care fac posibilă aplicarea lor în cataliză, agricultură, mediu și biomedicină. În natură se găsesc multe forme de IONPs, dar cele mai utilizate tehnologic sunt: magnetita (Fe_3O_4), maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) și hematitul ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$).

În conformitate cu cele de mai sus, teza de doctorat se înscrie în tema de cercetare legată de sinteza, caracterizarea și utilizarea unor nanomateriale magnetice bazate pe nanoparticule de oxizi de fier. Subiectul abordat este de maximă actualitate, având în vedere aplicațiile nanoparticulelor magnetice de oxizi de fier în domeniul biomedical.

2. STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

În fiecare zi, nanoștiința înregistrează noi progrese în producția de nanoparticule verzi, cu o dimensiune mai mică de 100 nm, cu proprietăți biologice multiple. Proiectarea joacă un rol esențial în obținerea de nanoparticule magnetice cu proprietăți adaptate, prin urmare, în ultimul deceniu, numeroase metode de sinteză au fost dezvoltate pentru a obține nanoparticule magnetice de oxizi de fier potrivite pentru aplicarea în nanomedicină. Mulți factori ar trebui luați în considerare în procesul de proiectare care pot schimba dramatic rezultatele așteptate, adică controlul dimensiunii, formei, morfologiei, stabilității, biocompatibilității și proprietăților magnetice ale acestor nanoparticule. Acești factori continuă să fie o provocare permanentă, care poate fi încă optimizată în procesul de proiectare. În același timp, metoda de sinteză trebuie să fie ecologică, simplă, ieftină și reproductibilă. Metodele descrise în teză permit obținerea de nanoparticule magnetice cu dimensiuni înguste, forma dorită și morfologie, prin schimbarea condițiilor și/sau parametrilor sintezei.

În ultimele decenii, mulți cercetători s-au concentrat pe strategiile de proiectare a nanoparticulelor pe bază de oxizi de fier multifuncționale cu aplicare în domeniul biomedical, prin combinarea lor cu constituenți bioactivi cu scopul de a-și spori potențialul biomedical. Fabricarea nanomaterialelor prin intermediul entităților biologice reprezintă avangarda domeniului nanobiotehnologiei. În plus, nanoparticulele obținute pot fi aplicate într-o varietate de domenii biomedicale, cum ar fi terapia cancerului, administrarea de medicamente, hipertermia, bioimagistica, bioetichetarea etc. În comparație cu sinteza chimică convențională, biosinteza care implică o abordare a chimiei verzi, reprezintă o alternativă atractivă pentru dezvoltarea nanoparticulelor compatibile cu organismul uman și cu mediul înconjurător. Astfel, nanotehnologia verde se bazează pe utilizarea nanomaterialelor verzi, sigure pentru sănătatea umană sau a nanoproduselor concepute pentru a oferi soluții pentru sistemul medical, precum și pentru problemele de mediu.

Nanotehnologia verde este un domeniu relativ nou axat pe utilizarea nanomaterialelor verzi sau a nanoparticule fără a utiliza substanțe chimice toxice sau periculoase, ceea ce este sigur pentru sănătatea umană. În același timp, nanotehnologia verde se ocupă de nanoproduse, menite să ofere soluții

pentru biotehnologia avansată utilizată în sistemul medical, precum și pentru problemele de mediu. Sinteza verde este o abordare simplă ecologică folosită pentru a sintetiza diverse nanoparticule, care nu implică utilizarea de substanțe nocive, este rentabilă, biocompatibilă și benefică pentru mediu. Pentru sinteza nanoparticulelor magnetice prin abordare ecologică, bacteriile, ciupercile, drojdia, algele, virușii, extractele de plante, actinomicetele, biomasele de plante etc., sunt considerate alternative biologice care oferă o cale curată, netoxică și ecologică de sinteză a nanoparticulelor magnetice cu o gamă largă de compoziții, suprafață ajustabilă și caracteristici fizico-chimice (mărime, formă, morfologie). Fiecare entitate biologică enumerată mai sus are un grad mai mult sau mai puțin biochimic de capabilități care pot fi utilizate în sinteza fierului sau a nanoparticulelor pe bază de oxizi de fier. Dar, cu toate acestea, datorită procesului lor metabolic intrinsec și activității enzimaticе, nu toate entitățile biologice pot sintetiza nanoparticulele de oxizi de fier. Prin urmare, este necesară selecția celei mai potrivite entități biologice pentru a obține nanoparticule de oxizi de fier cu compoziție, suprafață, dimensiune și formă, bine definite.

Dintre toate entitățile biologice, plantele sau extractele pe bază de plante sunt cele mai utilizate în sinteza verde datorită ușurinței procesului de obținere, costurilor reduse, producției pe scară largă și inocuității pentru mediul înconjurător. Întreaga plantă sau diferite părți ale plantelor (frunze, fructe, coji de fructe, tulpini, rădăcini, semințe etc.) pot participa la sinteza nanoparticulelor magnetice, datorită cantității notabile de substanțe fitochimice care pot acționa ca agenți reducători și stabilizatori atât în procesul de sinteză cât și la potențialul de a acumula metale grele. În mediul de reacție, substanțele fitochimice reduc ionii metalici într-o singură etapă, de la stările lor de oxidare mono/divalentă la stări de oxidare zero valente, adică la nanoparticule. Nanoparticulele cu stări de oxidare zero valente duc la nuclearea particulelor urmată de creștere, fiind astfel mai stabile termodinamic, după care are loc reducerea ionilor metalici. Procesul de creștere este urmat de agregarea particulelor într-o varietate de morfologii (sfere, cuburi, tije, triunghiuri, pentagoane etc.). Reacția biochimică este ușor de condus, la temperatura camerei sau nu și se finalizează în câteva minute. În prezent, dezvoltarea nanoparticulelor magnetice de oxizi de fier prin metoda verde este mai orientată către potențialul biomedical, din cauza faptului că sănătatea umană

este amenințată de mai multe probleme care pot provoca o mulțime de boli grave, dintre care, cea mai gravă este cancerul. Potențiala aplicație biomedicală nanoparticulelor magnetice pe bază de oxizi de fier include: purtători terapeutici pentru administrarea de medicamente, agenți de vizualizare în imagistica prin rezonanță magnetică (RMN) sau intermediari de căldură în termoterapie pentru cancer (așa-numita hipertermie).

Cancerul rămâne în continuare o preocupare uriașă de sănătate la nivel mondial, cu o incidență, în prezent, de peste 4,9 milioane de cazuri în Europa, din care peste o sută de mii doar în România. Incidența cancerului în România este de așteptat să crească cu 5,4% până în 2030. Conform datelor observatorului global de cancer, până în prezent, decesele cauzate de cancer în Europa sunt de peste 2,2 milioane, din care, peste cincizeci de mii în România, fiind de așteptat să crească cu 7,6% până în 2030. În acest scop, în ultimul deceniu s-au dezvoltat măsuri considerabile pentru diagnosticul, monitorizarea și terapia cancerului. Etapa de diagnosticare este primordială deoarece descoperirea cancerului într-o fază precoce este determinată de alegerea celei mai potrivite și eficiente terapii împotriva cancerului. Deși prezintă multe dezavantaje și efecte secundare, terapiile convenționale viabile utilizate pentru tratarea cancerului sunt radioterapia, chimioterapia și chirurgia. Având în vedere eficacitatea limitată a terapiilor convenționale viabile, este foarte necesară dezvoltarea unei noi abordări suplimentare de tratament. Una dintre terapiile antitumorale cunoscute și folosite de mai bine de 30 de ani, este hipertermia magnetică.

Pentru administrarea intravenoasă sau orală, FDA a aprobat în ultimii ani mai multe formulări de nanoparticule magnetice pe bază de oxizi de fier – ca agenți de contrast în RMN, dar majoritatea au fost scoase de pe piață. De exemplu, Ferumoxides (Feridex IV[®], Endorem[™]) care constă dintr-un amestec de nanoparticule Fe_3O_4 și $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, având suprafața funcționalizată cu dextran, au fost utilizați ca țintă biologică de sistemul reticuloendotelial (RES) pentru etichetarea celulelor stem hepatice. GastroMARK și Oral-SPION au fost, de asemenea, utilizate și întrerupte, pentru etichetarea intestinului gastrointestinal, formularea constând într-un amestec de nanoparticule de Fe_3O_4 și $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, acoperite cu siliciu pe suprafața metalică a fierului. Cu toate acestea, în prezent există unele nanoparticule magnetice pe bază de oxizi de fier cu proprietăți superparamagnetice care au fost aprobate și sunt încă pe

pieță. De exemplu, Nano Therm, care are miezul magnetic acoperit cu aminosilan și este folosit în hipertermia tumorilor cerebrale, este încă folosit în Europa. De asemenea, Ferucarbotran (Resovist), care posedă Fe_3O_4 ca material de bază și are suprafața acoperită cu carboxidextran, este utilizat ca țintă biologică în vasele de sânge, pentru etichetarea celulelor stem. Pentru țintirea magnetică, nanoparticulele magnetice bazate pe oxizi de fier ar trebui să posede câțiva parametri cheie, inclusiv: i) suprafață mare pentru a maximiza cantitatea de încărcare a medicamentului; ii) funcționalizarea suprafeței nanoparticulelor, cu fragmente de țintire specifice pentru a facilita distribuția medicamentului la locul tumorii, evitând deteriorarea altor organe; iii) câmp de saturație ridicată pentru a furniza semnale maxime; iv) activitate sinergică cu agenți antitumorali, pentru a îmbunătăți eficacitatea tratamentului cancerului prin scăderea rezistenței celulelor canceroase. Pentru livrarea de medicamente, este imperativ ca miezul magnetic al nanomaterialului (de obicei magnetit, Fe_3O_4 sau maghemite, $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) să fie nanocristalin și să aibă un comportament superparamagnetic numai în prezența unui câmp magnetic extern, iar în afara acestuia, nanoparticulele nu ar trebui să mai prezinte interacțiuni magnetice. În prezent, procesul de optimizare a acestor nanoparticule magnetice de oxizi de fier se bazează atât pe reducerea efectelor secundare asociate (reducerea cantității de distribuție sistemică a medicamentului), cât și pe reducerea dozei necesare, prin îmbunătățirea preciziei țintei medicamentului.

Prin urmare, prezenta teză descrie concepte generale despre nanoparticule de oxizi de fier (diverse metode fizice, chimice și biologice de fabricare a lor, precum și caracteristicile acestora), aplicațiile biomedicale ale nanoparticulelor magnetice, în special în terapia cancerului, precum și câteva preocupări legate de posibila toxicitate a acestor nanomateriale magnetice (mecanismul de toxicitate *in vitro* și *in vivo*, inclusiv observații pentru reducerea toxicității). Cea de-a doua parte a tezei dezvoltă sinteza și caracterizarea fizico-chimică a celor trei oxizi de fier principali (magnetită, maghemită și hematită) prin utilizarea combustiei și abordării chimiei verzi, precum și impactul lor biologic asupra unor linii celulare normale și tumorale alături de impactul asupra țesuturilor respiratorii 3D bronșice.

3. SCOP ȘI OBIECTIVE

Scopul acestei teze de doctorat a fost sintetiza nanoparticulelor magnetice pe bază de oxizi de fier, cu caracteristici adecvate pentru aplicații biomedicale, în special pentru terapia cancerului – ce pot fi utilizate ca instrumente cu capacitate mare de încălzire utilizate în tratamentul hipertermic și ca sisteme de administrare a medicamentelor, pentru terapia țintită a cancerului. În ceea ce privește fabricarea nanoparticulelor, ideea se concentrează pe utilizarea a două metode originale de sinteză, ca alternativă la metodele convenționale utilizate în prezent – metoda arderii (combustie) și metoda verde, pentru sinteza magnetitei, maghemitei și a hematitei. Ambele metode prezintă multiple avantaje ce sunt prezentate în teză prin comparație.

Teza de doctorat aduce o contribuție importantă în această direcție, datorită faptului că, nanoparticulele magnetice rezultate din sinteza verde, precum și din combustie au fost testate în ceea ce privește capacitatea lor de încălzire, cuantificată prin puterea de pierdere intrinsecă (ILP) și rata specifică de absorbție (SAR), doi parametri obligatorii pentru aplicații practice în hipertermie. Prin metoda combustiei s-au obținut nanoparticule magnetice cu proprietăți magnetice excelente care au fost acoperite în continuare cu acid citric pentru a obține suspensii coloidale magnetice foarte stabile, biocompatibile, evaluate în continuare din punct de vedere al capacității de încălzire cuantificate prin ILP. Prin metoda verde, nanoparticule magnetice au fost obținute pentru prima dată, pornind de la două extracte apoase de *Artemisia absinthium* L., pe bază de frunze și tulpini. Pentru a obține nanoparticule magnetice cu caracteristici de inducere a hipertermiei, reacțiile de sinteză au fost efectuate, atât la 25°C, cât și la 80°C, utilizând două formulări ale agentului de precipitare. Datorită faptului că prin abordarea chimiei verzi s-au obținut nanoparticule magnetice cu capacitate de încălzire mai mare, restul obiectivelor stabilite pentru indeplinirea scopului tezei se referă doar la sinteza nanoparticulelor magnetice prin metoda verde.

În ceea ce privește noutatea și originalitatea acestei teze de doctorat, impactul biologic *in vitro* al nanoparticulelor magnetice verzi obținute, asupra liniilor celulare 2D sănătoase (keratinocite umane imortalizate HaCaT) și tumorigene (A375 - celule de melanom uman; A431 - carcinom uman epidermoid; A 549 - carcinom pulmonar uman și NCI-H460 - carcinom

pulmonar uman, cu celule mari), a fost evaluat cu rezultate foarte bune. De asemenea, profilul de biosecuritate al nanoparticulelor magnetice de oxizi de fier sintetizate a fost evaluat folosind modelul EpiAirway™ – microșesuturi funcționale 3D, din celule bronșice normale. Pentru aplicarea țintită a medicamentelor, s-au obținut nanoformulări de tip solid-lipid (SLN) prin încărcarea nanoparticulelor magnetice verzi cu un compus antitumoral - acid oleanolic. S-a analizat citotoxicitatea SLN-urilor pe linia celulară 2D tumorigenă (A549), precum și biocompatibilitatea acestora pe modelul 3D de microșesut funcțional EpiAirway™, o analiză care nu a mai fost făcută până acum. Această investigație complexă ne permite să imităm îndeaproape condițiile *in vivo* ale utilizării nanoparticulelor magnetice pe bază de oxizi de fier.

Prin această teză s-a dorit eliminarea oricărei disonanțe care arată trecerea de la studiile *in vitro* 2D la 3D, sau trecerea de la studiile *in vitro* la cele *in vivo*, cu scopul ca la finalul fiecărui studiu, să obținem date coerente. Celulele pot avea un răspuns ușor diferit la compușii antitumoralii atunci când sunt utilizate studii *in vitro* 2D și 3D, reprezentând principalul motiv pentru care prezenta teză de doctorat este esențială, deoarece constituie un studiu complet, integrator și complex. Pentru o mai bună înțelegere a informațiilor descrise mai sus, Figura 3.1. rezumă întregul contur al tezei. O scurtă prezentare generală a nanoparticulelor magnetice pe bază de oxizi de fier, împreună cu două metode diferite de sinteză a acestor nanoparticule, proprietățile lor fizico-chimice și impactul lor biologic, precum și caracteristicile inductoare de hipertermie, sunt descrise în capitolele 2 - 6.

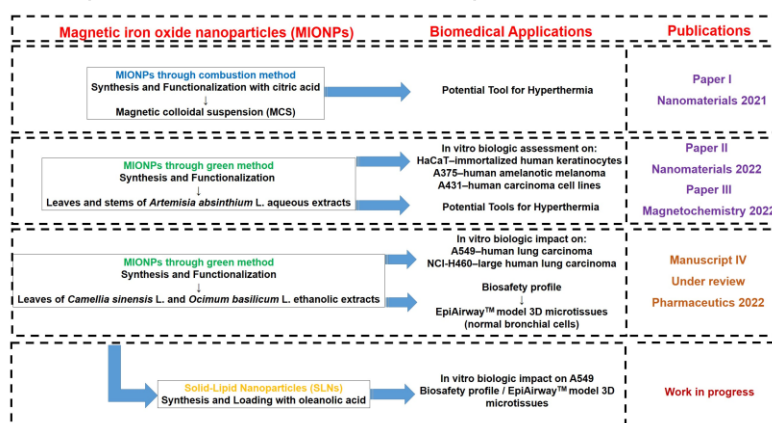


Figura 3.1. Schița întregii teze de doctorat, domeniul vizat de aplicații și lucrările publicate/în curs de revizuire sau în lucru.

4. CONTRIBUȚII PERSONALE

4.1. SINTEZA ȘI CARACTERIZAREA NANOPARTICULELOR DE Fe_3O_4 FABRICATE PRIN METODA COMBUSTIEI, CA INSTRUMENTE ÎN HIPERTERMIE

Rezultatele acestui studiu sunt prezentate în teza de doctorat în **Capitolul 2** și se referă la proiectarea nanoparticulelor magnetice pe bază de oxizi de fier, folosind metoda combustiei. În plus, este prezentat un proces ușor într-o singură etapă pentru prepararea unei suspensii coloidale magnetice foarte stabile și biocompatibile bazată pe nanoparticule magnetice de oxizi de fier acoperite cu acid citric, utilizate ca sursă de încălzire eficientă pentru tratamentul hipertermiei celulelor canceroase. Procesul de acoperire a materialelor magnetice, a fost efectuat pentru a obține o suspensie adecvată scopului medical, adică cu caracteristici de inducere a hipertermiei.

În ceea ce privește nanoparticule magnetice de oxizi de fier solide obținute, combustia a avut loc în atmosferă controlată (în absența aerului), tocmai pentru a asigura formarea magnetitului (Fe_3O_4) și a preveni oxidarea acestuia la maghemit ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$). Caracterizarea structurală a nanoparticulelor magnetice solide a arătat vârfuri largi de difracție în concordanță cu dimensiune nanometrică a cristalitelor în jur de 9 nm. Picurile observate au fost atribuite planurilor de difracție ale magnetitei și hematitei. S-a explicat că prezența hematitei nu este deranjantă, datorită faptului că aceste nanoparticule rămân în suspensie nefiind atrase de magnet din lipsa momentului magnetic, putând astfel fi îndepărtate. Microscopia electronică a arătat că nanoparticulele magnetice solide obținute aveau forme poligonale distribuite uniform. Magnetizarea de saturație a nanoparticulelor magnetice solide a fost de 46,26 emu/g, destul de mare având în vedere că volumul de magnetită este în jur de 90 emu/g.

În ceea ce privește analizele fizico-chimice ale suspensiei magnetice, acestea au relevat că suspensia coloidală obținută avea un diametru mediu de 72,7 nm la 25°C cu un indice de polidispersivitate de 0,179 și un potențial zeta de -45,0 mV, caracteristici superparamagnetice și o capacitate de încălzire care a fost cuantificată prin ILP. Spectroscopia Raman a arătat prezența magnetitei și a confirmat prezența acidului citric pe suprafețele

nanoparticulelor. Capacitatea de încălzire a suspensiei magnetice a relevat o valoare de $0,055 \text{ nH} \cdot \text{m}^2/\text{kg}$, la o amplitudine a câmpului magnetic de 120 Oe. S-a arătat că această valoare crește odată cu creșterea câmpului de amplitudine magnetică. Având în vedere acest lucru, se poate afirma că valoarea obținută indică faptul că suspensia magnetică ar putea fi utilizată în generarea de căldură magnetică.

4.2. SINTEZA ȘI CARACTERIZAREA NANOPARTICULELOR MAGNETICE BIOACTIVE DIN PUNCT DE VEDERE AL APLICAȚIILOR ÎN HIPERTERMIE

Ca o comparație, în **Capitolul 3** au fost dezvoltate nanoparticule magnetice de oxizi de fier prin sinteza verde, cu scopul de a investiga în ce măsură aceste nanoparticule magnetice posedă caracteristici de hipertermie magnetică, astfel încât să poată fi utilizate pentru dezvoltarea de noi strategii terapeutice care să contribuie la îmbunătățirea actualelor terapii pentru cancer.

În acest capitol, nanoparticulele magnetice dezvoltate prin abordarea chimiei verzi au fost obținute pentru prima dată, pornind de la două extracte apoase de pelin, pe bază de frunze și tulpini. Pentru a obține nanoparticule cu caracteristici inductoare de hipertermie, reacțiile de sinteză au fost efectuate, atât la temperatura camerei (25°C), cât și la 80°C , utilizând două formulări ale agentului de precipitare. În ceea ce privește compoziția fazelor, rezultatele au arătat că, indiferent de agentul de precipitare utilizat, toate probele cu o singură excepție (WL 25-2 – extract de pelin din frunze, folosind doar $\text{NH}_{3(\text{aq})}$ ca agent de precipitare la 25°C), au prezentat structura spinelului invers al magnetitei sau maghemitei cubice. Microscopia electronică prezintă particule de formă aproape sferică cu un interval de dimensiuni de la 1 la 10 nm. S-a observat o ușoară aglomerare de nanoparticule în cazul probelor precipitate numai cu $\text{NH}_{3(\text{aq})}$, mai ales când sinteza are loc la 25°C .

Investigația magnetică a nanoparticulelor obținute a arătat că sinteza la 80°C folosind un amestec de NaOH și $\text{NH}_{3(\text{aq})}$ le mărește diametrul și implicit le sporește rata de absorbție specifică (SAR), un parametru obligatoriu pentru aplicațiile practice în hipertermie. Valori SAR ridicate au fost obținute mai ales când s-a folosit extractul apos de tulpini (904 W/kg în cazul sintezei la 80°C și

880 W/kg în cazul sintezei la 25°C), precum și saturație de magnetizare ridicată (~62 emu/g pentru sinteza la 80°C și 42 emu/g pentru sinteza la 25°C).

În concluzie, având în vedere că, până în prezent, literatura de specialitate nu dezvăluie niciun studiu privind sinteza magnetitei și a maghemitei prin sinteză verde, pornind de la extracte apoase de pelin, destinate aplicațiilor de hipertermie magnetică, astfel putem afirma că acesta este primul studiu de cercetare în care este detaliată biosinteza nanoparticulelor magnetice pe bază de oxizi de fier, pornind de la un extract apos de pelin pe bază de frunze și tulpini, concepute pentru aplicații de hipertermie magnetică.

În concluzie, având în vedere ambele studii, sunt necesare cercetări ulterioare în vederea optimizării procedurii de sinteză, în scopul creșterii diametrului magnetic al nanoparticulelor (aplicând ambele metode s-au obținut nanoparticule sub 10 nm) și implicit a eficienței de încălzire magnetică AC, datorită faptului că aplicațiile practice ale nanoparticulelor în hipertermie sunt limitate de dimensiunile lor. Cu toate acestea, credem că această cercetare deschide noi metode în ceea ce privește condițiile de sinteză luate în considerare pentru prepararea nanoparticulelor magnetice biocompatibile și foarte stabile atât prin abordarea combustiei, cât și prin chimia verde mediată de plante.

4.3. BIOSINTEZA NANOPARTICULELOR DE OXIZI DE FIER: CARACTERIZAREA ȘI CITOTOXICITATEA LOR IN VITRO PE LINII CELULARE SĂNĂTATE ȘI TUMORIGENE

Capitolul 4 prezintă sinteza hematitei prin abordarea chimiei verzi, întrucât în capitolul anterior s-au obținut magnetită și maghemită. Încă o dată s-au folosit frunzele și tulpinile de *Artemisia absinthium* L., modificând însă condițiile de sinteză în scopul obținerii de $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$. Din câte știm, nu au fost raportate studii privind sinteza nanoparticulelor de $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ pornind de la extractul apos al oricărei specii de *Artemisia* pe bază de frunze și tulpini. Nanoparticulele au fost concepute cu scopul de a evalua efectele biologice *in vitro* ale ambelor extracte de *Artemisia absinthium* L. și ale nanoparticulelor magnetice de oxizi de fier rezultate din acestea, pe trei linii celulare diferite:

keratinocite umane imortalizate HaCaT, A375 – melanom amelanotic uman și A431– linie celulară de carcinom uman.

Rezultatele au arătat că lipsa proprietăților magnetice și culoarea maro-roșcată a tuturor probelor confirmă prezența hematitei ca fază majoritară. În plus, benzile FTIR situate la 435 cm^{-1} și 590 cm^{-1} , sunt atribuite vibrației de întindere Fe-O din hematită, confirmând formarea NP-urilor de $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$. Conform investigației prin microscopie electronică, nanoparticulele de oxizi de fier sintetizate sunt extrem de mici ($4,7 \pm 0,8\text{ nm}$ din SEM și $2,8 \pm 0,9\text{ nm}$ din TEM), aglomerate și cu formă cvasi-sferică. Diametrul hidrodinamic a evidențiat că nanoparticulele obținute din frunze sunt de ordinul micronilor (ce indică prezenta grupurilor gigantice), în timp ce nanoparticulele obținute din tulpini sunt de ordinul nanometrilor. Screeningul *in vitro* a probelor a relevat că linia celulară sănătoasă (HaCaT) prezintă o viabilitate bună (peste 80%) după expunerea la nanoparticule și lipsa caracteristicilor apoptotice, în timp ce liniile celulare tumorigene au manifestat o sensibilitate mai mare, în special celulele melanomului (A375) când este expus la o concentrație de $500\text{ }\mu\text{g/mL}$ nanoparticule timp de 72 de ore. Mai mult, celulele A375 au provocat markeri apoptotici semnificativi sub acești parametri (concentrație de $500\text{ }\mu\text{g/mL}$ nanoparticule, pentru un timp de contact de 72 de ore).

În concluzie, nanoparticulele de oxid de fier sintetizate au arătat un potențial promițător pentru aplicații biomedicale, deoarece screening-ul preliminar *in vitro* a dezvăluit că nanoparticulele de $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ fito-mediate nu au arătat activitate citotoxică asupra keratinocitelor umane imortalizate netumorigenice (HaCaT), în timp ce liniile celulare tumorigene, în special celulele A375 sunt afectate semnificativ, celulele eliberând o cantitate mare de LDH extracelular și semne specifice de apoptoză atunci când sunt expuse la o concentrație de $500\text{ }\mu\text{g/mL}$ pentru un interval de 72 de ore.

4.4. IMPACTUL BIOLOGIC AL NANOPARTICULELOR MAGNETICE VERZI ASUPRA A DOUĂ MONOSTRATURI TUMORIGENE PULMONARE DIFERITE ȘI ASUPRA UNUI MODEL 3D BRONȘIC NORMAL-MICROȚESUT EPIAIRWAY™

În **Capitolul 5** au fost testate și alte materiale vegetale implicate în sinteza nanoparticulelor de oxizi de fier prin metoda verde și anume *Camellia*

sinensis L. și *Ocimum basilicum* L. Studiul a fost întreprins cu scopul de a evalua impactul biologic al nanoparticulelor sintetizate prin metoda verde, pe două linii celulare 2D diferite morfologic, de cancer pulmonar: carcinom pulmonar uman - celule A549 și carcinom pulmonar uman cu celule mari - celule NCI-H460. În plus, profilul de biosecuritate al nanoparticulelor magnetice sintetizate a fost evaluat utilizând microșesuturile funcționale tridimensionale (3D) model EpiAirway™ obținute din celule bronșice normale, cultivate la interfața aer-lichid. Datorită faptului că literatura de specialitate prezintă puține rapoarte privind fabricarea nanoparticulelor magnetice de oxizi de fier prin sinteză verde cu potențial anticancerigen împotriva cancerului pulmonar, dar niciun studiu privind utilizarea ceaiului verde sau utilizarea busuiocului ca materiale vegetale pentru biosinteza nanoparticulelor magnetice de oxizi de fier și potențialele lor aplicații în cancerul pulmonar, considerăm că studiul nostru de cercetare va avea o importanță extrem de științifică. Efectul materiilor prime verzi ca agenți reducători și de acoperire a fost luat în considerare pentru dezvoltarea nanoparticulelor magnetice, precum și temperatura de sinteză a reacției (25°C și 80°C). Analizele fizico-chimice a arătat că, indiferent de tipul de extract de plantă, probele preparate la 25°C conțin un amestec de Fe_3O_4 și $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, în timp ce sinteza la 80°C a dus la formarea de Fe_3O_4 ca fază unică. Microscopia electronică a arătat că nanoparticulele formate au formă aproape sferică cu dimensiune îngustă sub 8 nm. Mai mult, statisticile diametrului nanoparticulelor magnetice, determinate din imagini TEM și SEM, a fost în conformitate cu dimensiunea cristalitelor, determinată prin analiza XRD și cu diametrul lor magnetic. Măsurătorile magnetice au demonstrat magnetizarea puternică de saturație, în jur de 60 emu/g în cazul probelor preparate din extract etanolic de ceai verde, ceea ce face ca aceste nanoparticule magnetice să fie potrivite atât pentru aplicații de hipertermie, cât și pentru livrarea de medicamente. Efectul biologic al nanoparticulelor magnetice obținute din extractul etanolic de *Camellia sinensis* L. a fost comparat cu cel al nanoparticulelor magnetice obținute din extractul etanolic de *Ocimum basilicum* L., prin utilizarea a două linii celulare de cancer pulmonar, diferite morfologic (A549 și NCI-H460); rezultatele au arătat că afectarea mai mare a viabilității celulare a fost manifestată de celulele A549 după expunerea la nanoparticulele magnetice obținute din extractul etanolic de *Ocimum basilicum* L. În ceea ce privește profilul de biosecuritate al

nanoparticulelor magnetice, s-a demonstrat că modelele EpiAirway™ nu au provocat scăderi importante a viabilității sau modificări histopatologice semnificative după tratamentul cu niciuna dintre probe, la concentrații de până la 500 µg/mL.

În concluzie, datele dezvăluie că nanoparticulele magnetice de oxizi de fier sunt mai active pe celulele A549 în comparație cu celulele NCI-H460. Cu toate acestea, nivelul de biosecuritate este bun, microșesuturile EpiAirway™ manifestând viabilități de peste 80% fără modificări histopatologice semnificative. Luând în considerare toate caracteristicile promițătoare prezentate mai sus, nanoparticulele magnetice sintetizate pot fi considerate candidați adecvați pentru dezvoltarea de formulări active prin nanotehnologie pentru tratamentul cancerului pulmonar.

4.5. IMPACTUL BIOLOGIC AL SLN ASUPRA CARCINOMUL PULMONAR UMAN (A549) ȘI ASUPRA UNUI MODEL 3D BRONȘIC NORMAL – MICROȘESUT EPIAIRWAY™

În Capitolul 6 sunt prezentate investigațiile privind impactul biologic al SLN-urilor încărcate cu o triterpenă pentaciclică (acid oleanolic – OA), derivate din nanoparticulele magnetice sintetizate prin metoda verde și foarte detaliate în capitolul anterior. În ceea ce privește impactul biologic, s-a urmărit determinarea potențialului anticancer pe linia celulară 2D de cancer pulmonar - carcinom pulmonar uman - celule A549, precum și profilul de biosecuritate al SLN-urilor, prin utilizarea modelului de microșesut EpiAirway™ 3D, obținut din celule bronșice normale.

Rezultatele au arătat că linia celulară de carcinom pulmonar uman (A549) a fost puternic afectată după tratamentul cu ambele probe de SLN provenite din ceai verde (Cs); ratele de viabilitate induse de SLN-uri au fost în jur de 50%. Mai mult, după o expunere de 24h la SLN_Ob 25 și SLN_Ob 80, celulele A549 au fost afectate semnificativ, manifestând o viabilitate de aproximativ 28%, respectiv 18%. În ceea ce privește profilul de biosecuritate al probelor SLN, rezultatele au prezentat un impact negativ asupra viabilității microșesuturilor bronșice normale 3D (sub 50%) după expunerea la toate probele de testat. Aceste aspecte au fost evidențiate și în urma investigației histologice privind modificările morfologice ale SLN-urilor pe modelul 3D de

țesut respirator. Toate probele induc modificări majore, cum ar fi pierderea integrității epitelului de suprafață, pierderea joncțiunilor epiteliale, pierderea cililor, hiperkeratoza și moartea celulelor are loc prin apoptoză. Este foarte probabil ca de vină pentru impactul negativ asupra viabilității și morfologiei microțesuturilor bronșice normale 3D, să fie doza prea mare (500 $\mu\text{g/mL}$) utilizată. Cu toate acestea, vor fi luate în considerare ajustări suplimentare în procesul de sinteză a SLN-urilor, precum și o altă evaluare complexă in vitro.

Teza de doctorat se bazează pe rezultatele originale obținute din trei articole de cercetare, în care subsemnatul este primul autor, publicate astfel :

- Datele prezentate în Capitolul 2, fac obiectul unui articol ISI, publicat în Jurnalul Nanomaterials (MDPI), Journal Rank Q1 (I.F.= 5.719).

Cele mai importante descoperiri din acest studiu, se bazează pe faptul că MNP-urile au fost dezvoltate prin metoda combustiei cu diametru îngust, care au stat la baza obținerii de suspensii coloidale magnetice stabile, biocompatibile și s-a demonstrat că suspensia obținută are diametru sub 100 nm, un indice de polidispersivitate bun și un potențial zeta foarte negativ, ceea ce denota stabilitatea și biocompatibilitatea suspensiei coloidale obținute. În ceea ce privește capacitatea de încălzire a suspensiei, valoarea obținută demonstrează că aceasta poate fi utilizată cu succes în generarea de căldură magnetică

- Datele prezentate în Capitolul 3, fac obiectul unui alt articol ISI, publicat în Jurnalul Magnetochemistry (MDPI) Journal Rank Q2, (I.F. = 3.336).

În ceea ce privește acest studiu, pentru prima dată, nanoparticule magnetice au fost obținute prin abordare de chimie verde, pornind de la două extracte apoase de pelin, pe bază de frunze și tulpini. S-a demonstrat că în funcție de condițiile de sinteză (temperatură, precursor de metal utilizat, agent reducător utilizat, agent de precipitare etc.), nanoparticulele cu proprietăți magnetice excelente precum și cu valoare ridicată a ratei specifice de absorbție (SAR), pot fi obținute prin abordarea de sinteză verde. În plus, s-a demonstrat că prin optimizarea procedurii de sinteză se mărește diametrul magnetic al nanoparticulelor și implicit eficiența de încălzire magnetică AC, datorită faptului că aplicațiile practice ale nanoparticulelor în hipertermie sunt limitate de dimensiunile acestora.

- Datele prezentate în Capitolul 4, fac obiectul celui de-al treilea articol ISI, publicat în Jurnalul Nanomaterials (MDPI), Journal Rank Q1, (I.F. = 5.719).

În ceea ce privește acest studiu, pentru prima dată, a fost raportată sinteza nanoparticulelor de $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ pornind de la extract apos din specia *Artemisia*, pe bază de frunze și tulpini. Având în vedere impactul biologic, s-a demonstrat că IONP-urile nou sintetizate au arătat un potențial promițător pentru aplicații biomedicale. În plus, s-a arătat că NP-urile $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ fito-mediate nu au prezentat activitate citotoxică asupra keratinocitelor umane imortalizate netumorigenice (HaCaT), dar liniile celulare tumorogene, în special celulele A375, au fost afectate semnificativ..

- Datele prezentate în Capitolul 5, sunt transmise spre publicare în Jurnalul Pharmaceutics (MDPI), Journal Rank Q1, (I.F. = 6.525)

În ceea ce privește acest studiu, pentru prima dată, a fost raportată fabricarea nanoparticulelor prin abordare de sinteză verde cu potențial anticancer împotriva cancerului pulmonar. S-a demonstrat magnetizarea puternică de saturație (60 emu/g) obținută pentru probele preparate cu extract etanolic de ceai verde, care subliniază caracteristicile lor unice pentru aplicații de hipertermie, precum și pentru livrarea medicamentelor. În plus, a fost dezvoltat profilul de biosecuritate al MIONP-urilor sintetizate prin metoda verde, folosind modelul EpiAirway™. Nu s-a arătat o scădere importantă a viabilității sau modificări histopatologice semnificative după tratamentul cu niciunul dintre MIONP verzi..

- Datele prezentate în Capitolul 6 sunt încă în lucru.

În faza inițială, a fost demonstrat efectul antitumoral ridicat al SLN-urilor pe bază de nanoparticule de oxizi de fier verzi încărcate cu OA. Ratele de viabilitate au fost sub 50%, ceea ce înseamnă că linia celulară de carcinom pulmonar uman (A549) a fost afectată semnificativ. În ceea ce privește profilul de biosecuritate al SLN-urilor folosind modelul EpiAirway™, toate probele induc modificări majore, cum ar fi pierderea integrității epiteliului de suprafață, pierderea joncțiunilor epiteliale, pierderea cililor, hiperkeratoza și moartea celulelor are loc prin apoptoză. Dar, cu toate acestea, vor fi luate în considerare ajustări suplimentare în procesul de sinteză a SLNs, precum și o altă evaluare complexă in vitro.