



UNIVERSITATEA POLITEHNICA DIN BUCURESTI
SCOALA DOCTORALA: CHIMIE APPLICATA SI STINTA MATERIALELOR

TEZA DE DOCTORAT

**Sisteme de nanoparticule functionalizate pentru terapia
cancerului**

Autor: Ing. Rebecca Alexandra Puiu

Coordonator: Prof. Dr. Ing. Ecaterina Andronescu

2023

Abstract:

Cancerul reprezinta o boala ale carei origini nu au putut fi inca identificate, iar in ciuda acestui fapt, se afla pe locul al doilea in topul bolilor letale, locul intai fiind ocupat de atacurile de cord. La momentul actual, singura modalitate de a transporta medicamente cu proprietati anti-canceroase este prin intermediul chimioterapiei, insa aceasta are dezavantajul de a fi asociata cu toxicitatea sistemica nociva, neurotoxicitate, afectiuni gastrice, anemie, etc si de asemenea, rezultatele terapeutice asteptate nu sunt atinse din cauza solubilitatii scăzute si a tintirii ineficiente. Aceste deficiente ale chimioterapiei pot fi evitate sau reduse prin gasirea unor noi metode de incapsulare a medicamentelor ce pot oferi o livrare tintita mai sigura datorita conductivitatii ridicate si a stabilitatii, precum si a morfologiei suprafetei.

In ciuda utilizarii intense a medicamentelor de natura chimica, precum citostaticele, terapiile de origini naturale au prezentat mai mult interes in ultimul timp, inclusiv uleurile esentiale. Cercetatorii ce au realizat studii *in vitro* si *in vivo* pana acum au aratat efectul citotoxic al acestora impotriva diferitelor tipuri de cancer, mecanismul realizandu-se prin apoptoza.

Scopul principal al acestui studiu este de a obtine noi terapii anti-canceroase, utilizand atat compusi chimici cat si naturali si diferite tipuri de sisteme de transport pe baza de nanoparticule metalice, eficienta acestor noi sisteme fiind analizata *in vitro*.

Cuvinte Cheie: Nanoparticule, nanoparticule metalice, biotehnologii, tratamentul cancerului, terapia cancerului, studii *in vitro*

CUPRINS

CAPITOLUL I

I.1. Introducere.....	5
I.2. Nanoparticule – metode de sinteza, caracterizare si utilizarea in aplicatii biomedicale	8
I.3. Tipuri de citostatice pentru terapia cancerului	16
I.3.1. Nanoparticule de argint functionalizate cu citostatice.....	19
I.3.2. Utilizarea uleiurilor esentiale in tratamentul cancerului	20
I.3.3. Nanotransportatori inteligenti functionalizati cu uleiuri esentiale	26
I.4. Utilizarea nanoparticulelor de argint in terapia cancerului	29
I.5. Utilizarea SPIONs in terapia cancerului.....	31

CAPITOLUL II

Contributii originale si concluzii generale

II.1. Justificarea alegерii temei.....	33
II.2. Tehnica MAPLE.....	33
II.3. Studii biologice asupra nanoparticulelor de argint functionalizate cu citostatice	35
II.4 Concluzii generale.....	38

CAPITOLUL III

Bibliografie.....	41
Publicatii.....	54

1. Introducere

Cancerul reprezinta cea mai mare problema in medicina la nivel Mondial, oamenii de stiinta cautand permanent tratamente sustenabile si o vindecare complete in domeniul oncologic. Principalul obiectiv in a gasi diferite modalitati de preventie a avansarii cancerului este realizarea unei terapii personalizate de tintire moleculara. Acest domeniu este foarte dynamic, fiecare descoperire de noi medicamente si terapii aducand o noua perspectiva asupra progresarii cancerului. [1]. Chiar daca recent o atentie speciala a fost atribuita studiilor axate pe tratamentul cancerului, chimioterapia impreuna cu radioterapia si chirurgia inca reprezinta standardul de ingrijire a pacientilor oncologici [2].

Tesuturile invatate de tumori prezinta o densitate vasculara ridicata, aceasta fiind intretinuta de alimentarea cu sange. O arhitectura vasculara defectuoasa, combinata cu un drenaj limfatic scazut, duce la efectul EPR (permeatie si retentie sporite) [3]. Noile abordari terapeutice sunt foarte necesare pentru a furniza specific agenti terapeutici acolo unde tumora este localizata intr-un mod specific, iar un raspuns rapid la aceasta situatie este dezvoltarea nanotehnologiei, folosind nanomateriale in terapia cancerului [4] .

In functie de raspunsul fiziologic dorit, sistemele de nanotransportatori pot fi create in conditii controlate pentru a interactiona cu tesutul tinta, avand diferite forme: micelle, dendrimeri, nanoparticule, nanofiber, nanotuburi, quantum dots, etc. Sunt doua motive majore ce cauzeaza aparitia cancerului: o scadere a mortii celulare si o crestere a proliferarii celulare. Prin diferite actiuni externe, moartea celulara poate fi programata, fara a afecta celulele sanatoase [5]. Un astfel de exemplu este terapia tintita, care este diferita de chimioterapie in sensul ca este o terapie personalizata. In acest caz, nanoparticulele cu o dimensiune si sarcina potrivite pot fi utilizate ca si transportor, avand un impact asupra zonei de eliberare a medicamentului. Nanoparticulele prezinta multe avantaje, precum asimilarea nespecifica, solubilitate creștuta si efecte adverse scazute [6].

Nanotehnologiile reprezinta o noua optiune in diagnosticul si tratamentul cancerului, oferind proprietati unice pe care le poseda materialele la scala nanometrica care au adresabilitate in diferite domenii ce tin de stiinta si medicina. O gama variata de nanomateriale a fost studiata pentru a putea fi utilizate atat pentru diagnostic (bioimagistica, nanobiosenzori) cat si in scop terapeutic (nanotransportatori, imunoterapie, terapie fotodinamica) [7].

Nanomaterialele reprezinta un capitol interesant in tratamentul cancerului datorita proprietatilor lor incontestabile, una dintre acestea fiind suprafata ce poate fi modificata, ceea ce inseamna ca o mare varietate de medicamente si molecule pot fi atasate pe aceasta. Nanotransportatorii ce au suprafata modificata prezinta ca o consecinta imbunatatirea unor probleme importante pe termen lung, precum metabolismul medicamentelor si solubilitatea scazuta.

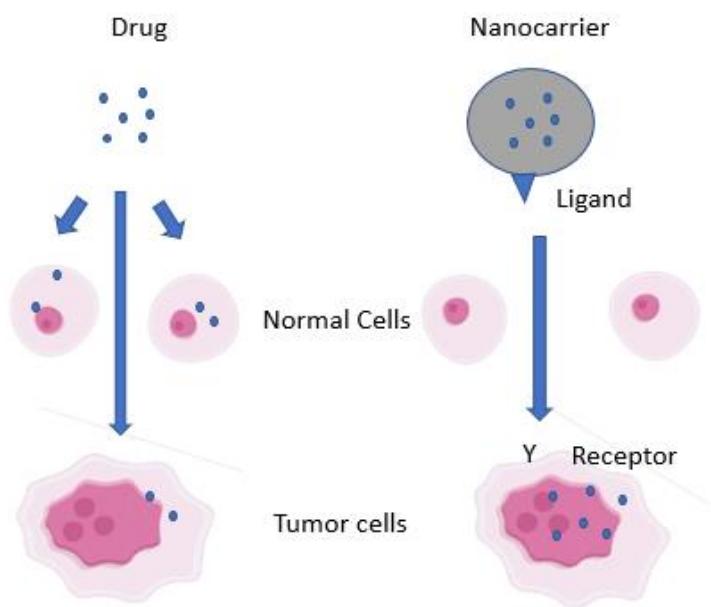


Figura. 1 Comparatie intre eliberarea tintita si netintita a medicamentului

Mai mult decat atat, nanotransportatorii pot de asemenea sa actioneze ca o tinta pasiva, acest lucru fiind denumit efectul EPR depunerea medicamentelor direct in tumora fiind crescuta [8]. Astfel, sunt facilitate patrunderea in tesutul tumoral si acumularea de nanoparticule in tumora, comparative cu tesuturile sanatoase [7].

I.2. Nanoparticule metalice– metode de sinteza, caracterizare si utilizarea in aplicatii biomedicale

Interesul legat de utilizarea nanoparticulelor metalice in terapia cancerului si biomedicine este din ce in ce mai crescut si are principala provocare de a limita contactul intre suprafata lor si celulele sanatoase, tintind doar celulele cancerioase si tesuturile specifice. Literature curenta de specialitate prezinta multe studii legate de productia si procesul de optimizare al nanoparticulelor, acestea fiind divizate in doua categorii: metalice (Au, Pt, Ag,

etc.) si nemetalice (acid polylactic, nanotuburi de carbon, etc.) si pot fi obtinute print rei metode diferite: fizice, chimice si pe baza de microorganism (sinteza “verde”) [9].

Terapia cancerului este aria de interes in care nanoparticulele sunt utilizate constant. Un aspect important ce poate modifica tratamentul cancerului este faptul ca celulele canceroase prezinta rezistenta la o mare varietate de medicamente lipofile, cauzand rezistenta la medicamente si ineficienta chimioterapiei. O varietate de studii au aratat ca nanoparticulele metalice cu o suprafata reactiva ridicata pot induce apoptoza, aceasta fiind considerate cea mai eficienta metoda de a elimina celulele canceroase din organism [10].

O multime de studii din literatura recentă confirmă efectele nanoparticulelor metalice in terapia cancerului: nanoparticulele de argint prezinta efecte positive asupra celulelor cancerului de san, nanoparticulele de aur prezinta o citotoxicitate de 70% asupra celulelor de adenocarcinoma colorectal, iar nanoparticulele de CeO₂ prezinta o activitate eficienta impotriva cancerului pulmonar [9].

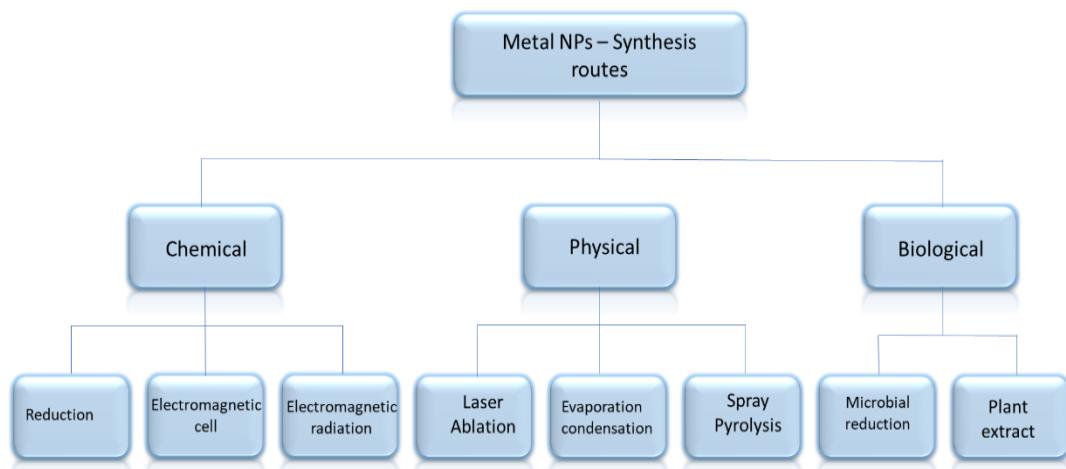


Figura 2. Metode de sinteza a nanoparticulelor metalice

Exista o multime de rute de sinteza pentru a obtine nanoparticule metalice, asa cum se poate observa in figura 2, ce necesita conditii speciale de vid, aparatura performanta si diferiti aditivi chimici, insa totodata sunt si anumiti factori mai putin placuti atunci cand sunt utilizate rute de sinteza chimice, precum riscul biologic crescut asupra mediului inconjurator.

Particulele cu dimensiuni nanometrice poseda atat proprietati moleculare cat si atomice in intervalul nanometric, cu dimensiuni si forme diferite si caracteristici imbunatatite a suprafetelor ce pot fi personalizate. Raportul suprafata-volum al nanoparticulelor metalice este

mare, productia acestora devenind interesanta la nivel global in domeniul biomedical [11]. Trei proprietati principale sunt modificate: fizice, chimice si biologice, incluzand asimilarea celulara, distribuirea in tumori, proprietatile mecanice, punctul de topire, aglomerarea, conductivitatea termica, in comparative cu materialul conventional [12].

Sunt multe proprietati unice ale nanoparticulelor metalice utilizate in terapia cancerului, precum morfologia, cristalinitatea, dimensiunea, proprietatile suprafetei si nu il ultimul rand, compozitia acestora. Aceste proprietati pot fi alterate in timpul conjugarii cu diferite tipuri de medicamente, insa sunt disponibile diferite tehnici ce ofera parametri relevanti despre nanomaterialele studiate, pentru a descrie in detaliu proprietatile fizico-chimice ale acestora (Tabelul 1).

Tabel 1: Tehnici utilizate pentru a caracteriza nanoparticulele metalice

Categorie	Tehnica	Observatii	Referinte
Spectroscopie	XRD (Difractie cu raze X)	Dimensiunea cristalitului, compozitia, structura cristalului	[13]
	FT-IR	Compozitia suprafetei chimice, structura cristalina, natura legaturilor	[14]
	UV-VIS	Dimensiune, aglomerare, concentratie	[15]
	Raman	Interactii moleculare, structura chimica	[16]
Microscopie electronica	TEM	Morfologie, compozitia elementala a nanoparticulelor	[17]
	SEM	Morfologie, dimensiunea nanoparticulelor	[14]
Determinarea sarcinii de suprafata	ELS (imprastierea electroforetica a lumинii)	Stabilitatea nanoparticulelor, potentialul zeta, determinarea sarcinii de suprafata	[18]
Metode de difuzie	DLS (imprastierea	Distributia dimensiunilor, aglomerarea	[19]

	dinamica a luminii)		
	SAXS	Dimensiune, coeficient de crestere	[20]
	NTA	Distributia dimensiunilor	[21]
Analize de suprafata	BET	Suprafata	[22]

I.3.1. Nanoparticule de argint functionalizate cu citostatice

O serie de teste realizate *in vitro* si *in vivo* de-a lungul timpului au aratat ca nanoparticulele de argint au tendinta de a forma agglomerate in interiorul diferitelor tipuri de cellule, avand o afinitate pentru macrophage si celule reticuloendooteliale. In mod similar, acestea se acumuleaza si in diferite tipuri de tesuturi precum ficat, splina, noduli limfatici, rinichi si maduva osoasa. Un rol important in curatarea renala il are dimensiunea nanoparticulelor, aceasta sporind de asemenea si timpul de eliminare [23].

Utilizarea nanoparticulelor pentru a incapsula agenti chimioterapeutici pentru a tinti celulele canceroase, este o noua metoda de a reduce toxicitatea si efectele adverse asociate cu administrarea citostaticelor [24]. Considerate a fi unul dintre cei mai des utilizati agenti antibacterieni, nanoparticulele de argint prezinta o rezistenta limitata asupra contactului cu bacteriile, si toxicitate scazuta asupra celulelor normale. Studiile si cercetarile in domeniul nanotehnologiei de asemenea arata ca nanoparticulele pot fi utilizate cu success in medicina datorita capabilitatii lor de a fi rezistente la mai multe medicamente, si au efecte antifungice, antivirale si antibacteriene [25]. Ruta de sinteza a nanoparticulelor de argint este de asemenea prietenoasa cu mediul inconjurator si cost eficienta, facandu-le a fi un agent promitor in tratamentul cancerului [26].

In literatura, nanoparticulele de argint au dimensiuni mai mari de 10nm. Deoarece parametrii reactiilor chimice depind de forma si dimensiunea particulelor, este foarte probabil ca nanoparticulele cu dimensiuni mai mici sa fie mai putin toxice pentru celulele necancerioase si sa tinteasca celulele canceroase in mod direct [27].

Unul dintre cele mai eficiente medicamente chimioterapeutice ce face parte din familia texanelor este Paclitaxel-ul, aratand activitate antitumorala impotriva unor tipuri avansate de cancer, inclusive cancerul ovarian, mamar, pulmonar, cancer prostatic avansat, avand un

potential ridicat de a induce apoptoza [28]. Efectul anticancer este promovat de cauzarea mortii celulare datorita stabilizarii microtubulilor si inhibarea fazelor ciclului celular [29]. Paclitaxel-ul are un indice therapeutic scazut si nu este foarte solubil in apa si din cauza permeabilitatii scazute poate cauza o varietate de efecte adverse [27].

Nanoparticulele de argint pot fi combinate cu success cu diferite tipuri de medicamente anticanceroase, unul din ele fiind Paclitaxel. Kalindemirtas et al. au descoperit un potential efect cytotoxic al nanoparticulelor de argint functionalizate cu Paclitaxel asupra liniei celulare de osteosarcom (Saos-2), un tip de cancer foarte rar si fatal, ce apare mai des in cazul tinerilor adulti si a adolescentilor. Nanoparticulele de argint se comporta ca un transportator, rezolvand problemele ce tin de solubilitate si toxicitate cauzate de Paclitaxel. Studiul mai demonstreaza si ca doza medicamentului ce poate cauza efecte adverse serioase poate fi redusa de 10 ori si ca de asemenea, citotoxicitatea asupra celulelor normale lipseste, indicand faptul ca medicamentul transportat de catre nanoparticulele de argint ajunge tintit in celulele canceroase [27].

Studiile *in vitro* au demonstrat faptul ca dimensiunea nanoparticulelor de argint este un factor foarte important corelat cu performanta lor – aceasta creste cu cat dimensiunea scade. Acest experiment a mai aratat si o eficienta terapeutica fara a duce la aparitia unei toxicitati sistemice [30].

I.3.2. Utilizarea uleiurilor esentiale in tratamentul cancerului

Desi medicamentele citostatici, precum cele testate in teza curenta: fludarabina, paclitaxel, doxorubicina, gemcitabine si carboplatin ofera un raspuns clinic substantial in timpul tratamentului cancerului, inca sunt anumite probleme pentru care solutiile sunt limitate: rezistenta medicamentului, reaparitia cancerului, tesuturi sanatoase ce sunt afectate de lipsa de selectivitate [31].

Fitochimicele, care sunt substanțe naturale cu o activitate biologică crescută, pot fi o altă soluție pentru tratamentul cancerului, inducând apoptoza. Uleiurile esentiale extrase din plante aromatice prezinta proprietati antiproliferative, antioxidantane si antimutagenice si pot fi un adjuvant ce ajuta la cresterea sensitivitatii celulelor tumorale, fiind o alternativa viabila pentru tratamentul conventional [31].

Exista mai mult de 300 de tipuri de uleiuri esentiale utilizate in diferite domenii, majoritatea fiind utilizate in forma lichida si la temperatura camerei. Uleiurile esentiale pot fi

solubile atat in eter cat si in alcool, dar insolubile in apa, volatile in natura si instabile cand sunt in contact cu lumina, oxigenul si caldura [12].

Toate uleiurile esentiale sunt volatile, au o densitate mai mica de 1 si au o masa moleculara scazuta, insa proprietatile lor biologice difera in functie de structura si compositia chimica a acestora [32].

I.5. Utilizarea SPIONs in terapia cancerului

Sunt disponibile o multime de sisteme de transport, precum polimeri organici si anorganici, oxizii metalici, lipide, etc., insa in ultimul timp o atentie sporita a fost tintita asupra nanoparticulelor superparamagnetice de oxid de fier, de asemenea cunoscute ca SPIONs, datorita proprietatilor remarcabile de ghidare magnetica [33]. Printre toate proprietatile SPIONs, cele mai importante sunt senzitivitatea magnetica [34], biocompatibilitatea si ca pot fi folosite simultan atat pentru tintirea tumorii cat si pentru transportul medicamentelor [35]. Avand o permeabilitate ridicata, SPIONs pot tinta zone tumorale si sunt aprobat de FDA pentru a fi utilizate in aplicatii clinic can target tumoral zones and are FDA [36]. Atat administrarea cat si temperature zonei tinta cresc, fiind indusa moartea celulelor tumorale.

Alt motiv pentru care SPIONs sunt utilizati in aplicatiile biomedical este toxicitatea scazuta, fara a ramane reziduri magnetice [37]. În ciuda tuturor acestor caracteristici, magnetite tinde sa scada energia suprafetei, asa ca SPIONs ar trebui modificate cu alte materiale biocompatibile pentru a evita aglomerarea [35]. Aceste obstacole apar *in vivo*, provocarile majore aparand din cauza stabilitatii coloidale scazute si a timpului de circulare in sange [38].

Un complex folosit pentru terapia cancerului sunt SPIONs încărcate cu ciclodextrine (un compus de glucoză), un candidat util pentru medicamentele hidrofobe datorita exteriorului lor care este hidrofil si interiorului hidrofob [39]. Exista un studiu in care un sistem de livrare a medicamentelor cu stabilitate ridicata a fost format prin interacțiunea SPIONs cu β -ciclodextrina si paclitaxel, pentru a îmbunătăți ghidarea magnetica. Sistemul dezvoltat prezinta activitate antitumorala atat *in vitro* cat si *in vivo* [40].

Există o multime de studii efectuate pe nanoparticulele de oxid de fier, care arată eficacitatea acestora în terapia cancerului. Krus et al. au studiat productia speciilor reactive-oxidative de catre nanoparticulele de fier, cee ace a dus la cresterea efectului citotoxic [41]. In alt studio, nanoparticulele de fier au sporit moartea celulara prin apoptoza. Această abordare

poate fi periculoasa, deoarece nanoparticulele nu pot fi eliminate complet din organism, de aceea trebuie avut grija ca dimensiunea nanoparticulelor sa fie cat mai mica posibil [30].

Nanoparticulele ce au interiorul din oxid de fier ajuta la evitarea efectelor nadorite prin directionarea lor in tumora, utilizand magneti externi. Acest tip de nanoparticule sunt denumite nanoparticule superparamagnetice, avand o contributie anisotropa pentru a imbunatati terapiile standard [42].

2. Obiective si justificarea alegerii temei

În ultimul timp, studiile au raportat ca incidenta cancerului este din ce in ce mai observata la pacientii tineri, cu varste cuprinse intre 20 si 29 de ani. Incidenta cancerului este mai scazuta cu 30% in cazul barbatului, iar in cazul femeilor cu varste cuprinse intre 30 si 39 de ani, prevalenta cancerului este aproape dubla [43]. Din pacate, femeile tinere ce supravietuiesc tratamentului impotriva cancerului, devin mai vulnerabile la reactiile lor adverse, avand boli cardiovasculare sau infertilitate. De asemenea, legat de acest subiect, studiile arata ca femeile ce supravietuiesc tratamentului devin cu 38% mai putin fertile dupa chimioterapie decat ceilalți, factorul principal fiind leziunile de la nivelul ovarelor [44].

Chimioterapia reprezinta cea mai convenabila metoda utilizata impotriva tuturor tipurilor de cancer, si se bazeaza pe intensitatea dozei, ceea ce inseamna ca in fiecare luna trebuie stabilita o doza maxima tolerate. Aceasta metoda poate duce la diviziunea celulelor canceroase, insa din pacate poate afecta diviziunea celulelor normale, cauzand o varietate de reactii adverse dupa tratamentul chimioterapeutic. Este important ca administrarea citostaticelor sa se faca intr-un interval de timp stabil, astfel permitand refacerea celulelor normale – process ce poate duce la rezistenta celulelor canceroase. Astfel, este o nevoie uriasa de a dezvolta noi strategii si terapii pentru a evita efectele adverse ale chimioterapiei si a combate dezvantajele acestui tip de tratament [45].

II.2. Tehnica MAPLE

Tehnica MAPLE mai este cunoscuta si sub numele de Evapore Laser Pulsata Asistata de o Matrice si este o tehnica mai delicata, fiind construita pentru a putea obtine filme biomoleculare foarte subtiri, pastrand structura originala si functiile acestora. In comparative cu alte metode de depunere laser, MAPLE ofera anumite avantaje excelente [46]:

- Acoperirile obtinute sunt omogene, chiar si cele composite

- Materialele depuse sunt versatile
- Grosimea si aderenta acoperirilor pot fi controlate pentru orice tip de substrat

In plus fata de toate avantajele prezentate, principalul avantaj oferit de combinarea dintre matrice si lungimea de unda si fluanta laser reprezinta abilitatea de a pastra proprietatile (fizicochimice si chimice) ale moleculei organice.

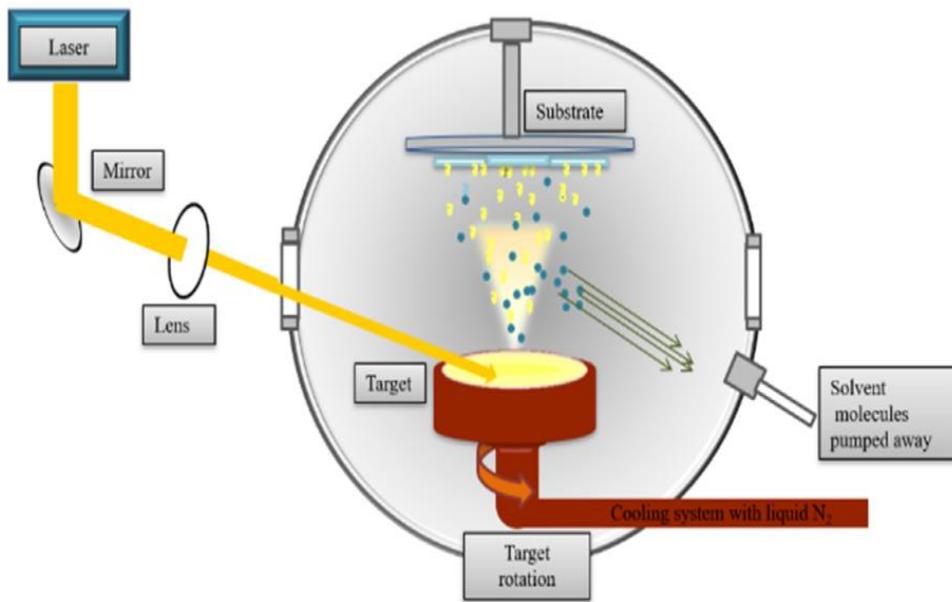


Figura. 3 Instalatia MAPLE [46]

In figura 3 putem observa o instalatie tipica MAPLE, ce consta intr-un laser pulsat ce poate fi infrarosu sau ultraviolet, un fascicul cuprins in gama $1\text{-}25 \text{ mm}^2$ ce trece printr-o camera de vid pe o tinta solidă. Fluanta laserului este aleasa astfel incat tinta sa nu fie degradata, fiind cuprinsa intre 0.100J/cm^2 si 5 J/cm^2 .

Tinta include o matrice inghetata cu azot lichid, ce contine molecule organize dizolvate intr-un solvent absorbant. Omogenitatea tintei este vitala. Concentratia fiind mentinuta astfel incat materialul studiat sa fie complet dizolvat pana cand formeaza o solutie omogena. Coeficientul de adeziune al moleculelor volatile este foarte scazut si acestea pot fi eliminate de sistemul de vid, asa ca moleculele de solvent formeaza o acoperire dup ace sunt colectate pe un substrat. Deoarece se utilizeaza o concentratie scazuta, putem spune ca moleculele din materialul tinta sunt protejate de moleculele puternic volatile ale solventului matricei, evitand deteriorarea termica in timpul interactiunii laser [47].

3. Contributii originale

Anti-Cancer Nanopowders and MAPLE-Fabricated Thin Coatings Based on SPIONs Surface Modified with Paclitaxel Loaded β -Cyclodextrin

In primul studiu, am dezvoltat sisteme nano-ingineresti inteligente de livrare tintita a medicamentelor, cu farmacocinetica și biodistribuție personalizate, care pot livra selectiv agenți anti-cancer direct la locul tumorii acestia fiind o soluție pentru majoritatea dificultăților întâmpinate cand sunt utilizate instrumentele terapeutice convenționale.

Astfel, sunt descrise sinteza, caracterizarea fizicochimica și evaluarea in vitro a biocompatibilitati si activitatea antitumorala sistemelor de nanoparticule superparamagnetice de oxid de fier pe baza de magnetite (Fe_3O_4), cu o suprafață modificată cu β -ciclodextrina (CD) și paclitaxel (PTX) - ($Fe_3O_4@βCD/PTX$).

Nanoparticulele de Fe_3O_4 - β -ciclodextrina ($Fe_3O_4@β-CD$) sunt obținute prin metoda co-precipitării, ce implica precipitarea simultană ionilor ferovi (Fe²⁺) și ferici (Fe³⁺) în soluție apoasă. Pe scurt, soluția 1 (Sn1) a fost preparată prin dizolvarea sulfatului feros și a clorurii ferice (raport molar 1:2) în 300 mL apă demineralizată. Soluția 2 (Sn2) constă în 1 g β -CD și 9 mL hidroxid de amoniu în 300 mL apă demineralizată. În pasul următor, soluția 1 este adăugată în picurare peste soluția 2, utilizând o palnie de egalizare a presiunii sub agitare magnetică. Nanoparticulele de magnetita care au format un precipitat sunt colectate magnetic. După decantarea fazelor lichide, pulberea rezultată este spălată de trei ori cu apă demineralizată și lăsată să uscă la temperatură camerei.

Nanopulberile sunt complet caracterizate prin difracție cu raze X, (XRD), microscopie electronică de scanare (SEM), microscopie electronică prin transmisie (TEM), spectroscopie în infraroșu cu transformata Fourier (FT-IR), și analiza termică (simultan analiza termogravimetrică (TGA) și calorimetrie cu scanare diferențială (DSC)).

Sistemele ce contin PTX- β -CD au fost preparate prin metoda evaporării solventului. Pentru aceasta, 100 mg nanoparticule $Fe_3O_4@β-CD$ au fost disperse în soluția de PTX (10 mg) în cloroform (1 mL) și amestecate într-un mojar până când a fost evaporat complet cloroformul. Ulterior, acestea au fost pastrate la temperatură de la 5°C pentru a fi utilizate ulterior.

Filmele subțiri de $Fe_3O_4@PTX$ - β -CD au fost obținute prin tehnica MAPLE. Acestea au fost depozitate pe sticlă și substrat de Siliciu ce au fost anterior curătate succesiv cu acetone, etanol și apă deionizată în baie de ultrasunete timp de 15 minute. Aceste substraturi au fost

uscate in flux de azot de puritate ridicata. Tintele MAPLE constau in 2% suspensie de Fe₃O₄@β-CD/PTX in DMSO ce au fost turnate intr-un support prerasat la temperatura de 173 K si ulterior imersat in azot lichid timp de 30 de minute. Depunerile MAPLE au fost obtinute utilizand un excimer a KrF* ($\lambda = 248$ nm si $\tau_{FWHM} = 25$ ns) COMPExPro 205, Lambda Physics-Coherent (Göttingen, Germania), ce a functionat la o rata de repetitie de 15 Hz. Au fost investigate trei fluente diferite ale fascicolului laser, 300, 400, and 500 mJ/cm². Un anumit numar de pulsuri laser cuprinse in gama 22,000 si 75,000 au fost aplicate pe fiecare tinta. In timpul procesului de depunere, parametrii experimentalii (de ex. Temperatura substratului, presiunea de fond, distanta de la tinta la substrat) au fost mentinute constante (temperatura camerei, 1 Pa, 4 cm, respectiv).

Cristalinitatea nanopulberilor de Fe₃O₄@β-CD a fost investigate cu ajutorul analizei XRD. Modelele de difracție cu raze X au fost înregistrate la temperatura camerei folosind radiația CuKa ($\lambda = 1,54056\text{\AA}$ la 15 mA și 30 kV) cu unghiul de difracție Bragg 2θ variind între 10 și 80°.

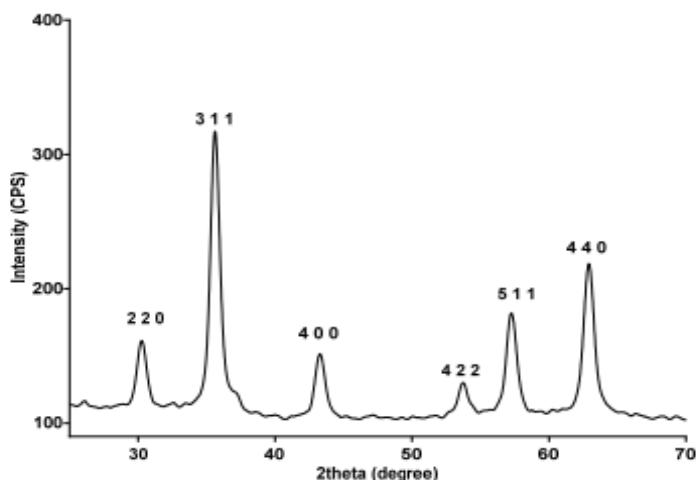


Figura 4. Spectrul XRD al nanopulberilor Fe₃O₄@ β-CD

Picurile de difracție care apar la $2\theta = 30,31, 35,71, 43,31, 53,90, 57,61$ și $62,81$ au fost atribuite planurilor retelei de magnetite, (2 2 0), (3 1 1), (4 0 0), (4 2 2), (5 1 1), și respectiv (440), fiind în bună concordanță cu literatura de specialitate. [48].

Structura interioară și morfologia nanocompozitelor au fost investigate prin TEM. Imaginele TEM ale nanopulberilor Fe₃O₄@ β-CD sunt reprezentate grafic în Figura 5. La măriri mai mari, se poate distinge o fază nanocrystalină de magnetita fără aglomerări și un înveliș necristalin ce poate fi atribuit β-CD (Figura 5b). Modelul inelului SAED înregistrat

reprezentat în figura 5d corespunde planurilor rețelei de magnetit (220), (311), (400), (422) respectiv (511), fiind în perfect acord cu policristalinitatea ridicată a fazei de magnetit și confirmând o data absența oricărei alte faze cristaline.

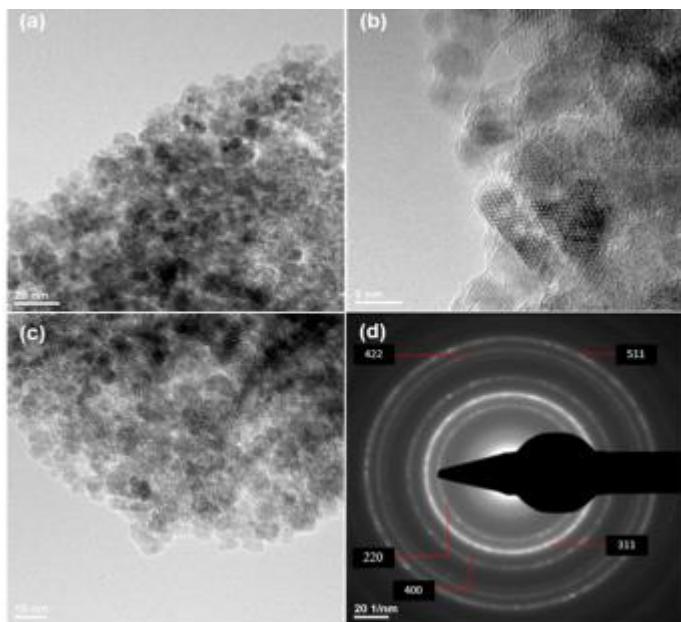


Figura 5. Micrografii TEM (a,b,c) si modelul SAED (d) pentru pulberile $\text{Fe}_3\text{O}_4@\beta\text{-CD}$

Forma și dimensiunea nanodelaiilor de la suprafața compozitelor $\text{Fe}_3\text{O}_4@\beta\text{-CD}$ au fost evaluate prin analize SEM efectuate la un microscop electronic FEI, folosind fascicule de electroni secundari cu energii de 30 keV.

Aglomerarile de nanoparticule pot fi observate la o magnificatie scazuta (5000X) in micrografiile SEM (Figura 6a). Imaginele la o magnificatie crescuta ($400,000\times$) prezinta nanoparticule de 3-5nm cu o morfologie sferica bine definita (Figura 6 b,c,d). SEM a fost de asemenea utilizata pentru a determina dimensiunea particulelor, forma, caracteristicile morfologice si texturale ale filmelor subtiri obtinute prin. Figura 7a este o micrografie SEM la o magnificatie de $200,000\times$ a filmelor subtiri de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\beta\text{-CD}$ in sectiune, depuse la o fluenta laser de 400 mJ/cm^2 . Astfel se poate observa morfologia uniforma, compacta si aglomerata a filmului. Suprafata filmului subtire expune un aspect neregulat cu o grosime ce variaza intre 18 si 71 nm (Figura 7b).

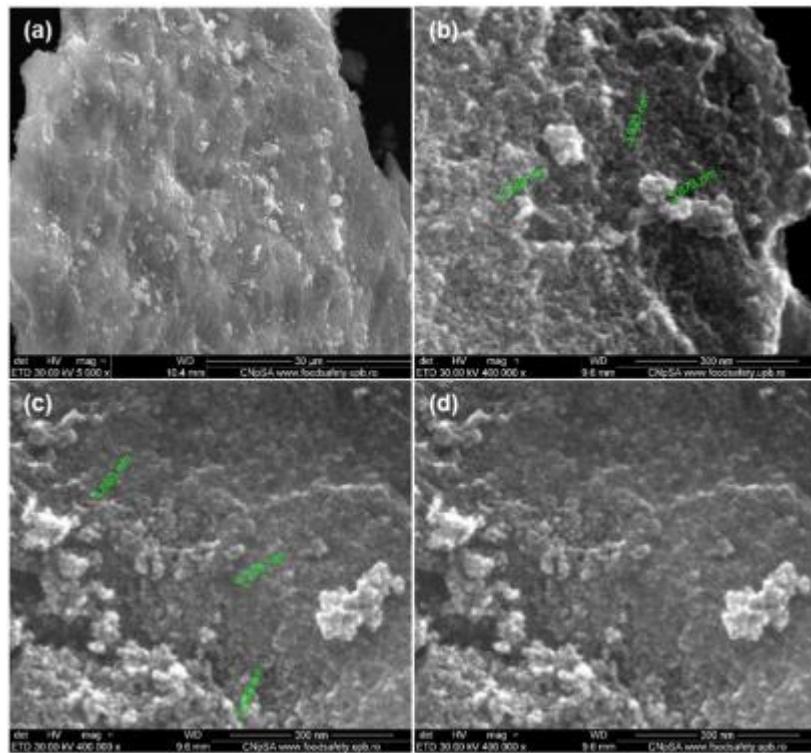


Figura 6: Micrografii SEM ale nanopulberilor $\text{Fe}_3\text{O}_4@\beta\text{-CD}$ la (a) magnificatie redusa ($5000\times$) si (b,c,d) magnificatie ridicata ($400,000\times$)

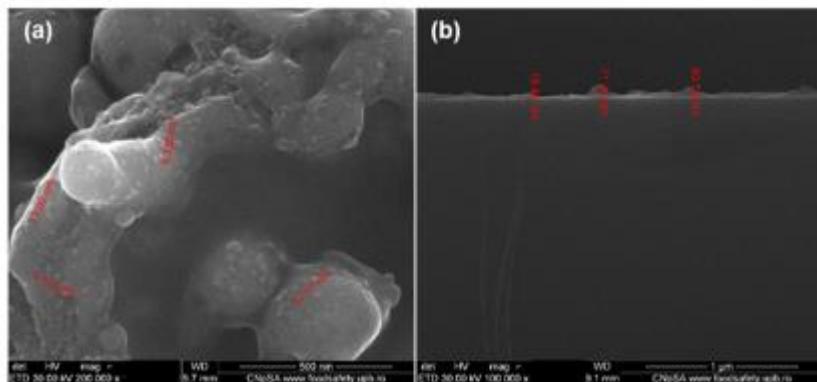


Figura 7: Micrografii SEM cu vedere in plan (a) si in sectiune (b) ale $\text{Fe}_3\text{O}_4@\beta\text{-CD/PTX}$ depuse la 400 mJ/cm^2

Pentru a evalua biocompatibilitatea filmelor magnetice obtinute prin MAPLE, formate din nanoparticule de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\beta\text{-CD}$, au fost realizate teste de citotoxicitate pe osteoblaste din linia celulara 3T3. Nu a fost observata nicio schimbare in viabilitatea celulara in prezenta magnetitei modificate cu $\beta\text{-CD}$ dupa realizarea testului MTT (Figura 8a), iar nivelul de NO in mediul de cultura a fost similar cu cel utilizat in proba martor (Figura 8b). Buna biocompatibilitate a nanoacoperirilor $\text{Fe}_3\text{O}_4@\beta\text{-CD}$ este de asemenea confirmata si de

microscopia in contrast de fază, astfel ca nu a fost raportat niciun efect advers evitent asupra morfologiei osteoblastelor, asa cum se poate observa in figura 9.

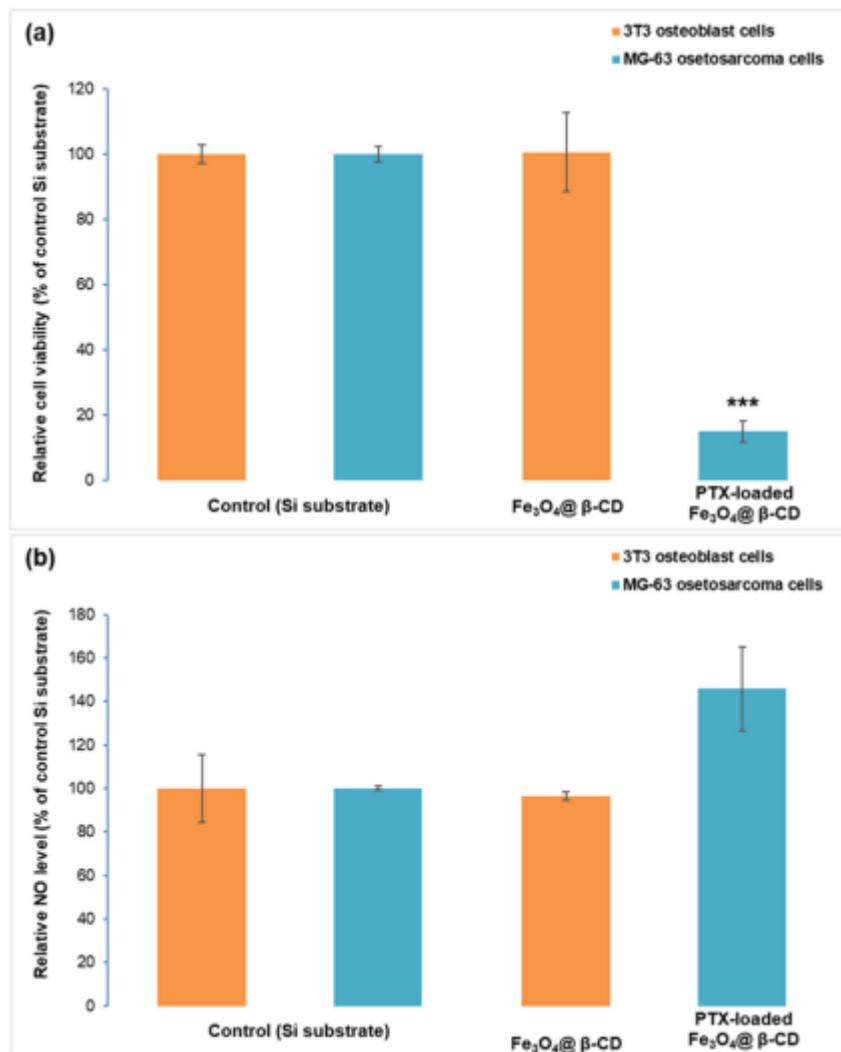


Figura 8. Teste de biocompatibilitate a nanoparticulelor de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\beta\text{-CD}$ pe osteoblastele normale 3T3 (a) și eficiența antitumorală a nanocompozitelor $\text{Fe}_3\text{O}_4@\beta\text{-CD}$ încărcate cu PTX pe celulele de osteosarcom MG-63 (b) evidențiată de rezultatele MTT (a) și Griess (b). Rezultatele au fost calculate ca valori medii ($n = 3$) și exprimate în raport cu probele martor ($^{***}p < 0,001$).

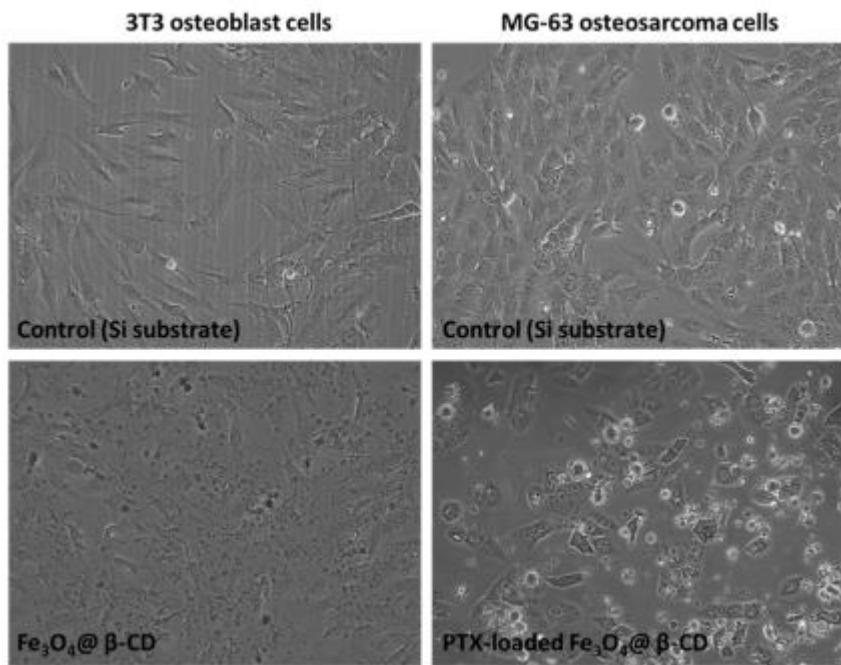


Figura 9. Imagini de microscopie in contrast de faza a osteblastelor din linia celulara 3T3 si culture cellulare de osteosarcom MG-63 pe suprafata acoperirilor $\text{Fe}_3\text{O}_4@\beta\text{-CD}$ si nanocompozitelor $\text{Fe}_3\text{O}_4@\beta\text{-CD}$ incarcate cu PTX. Marire: 10X

O scadere semnificativa de 85% a martorului (reprezentat de o lamela de sticla) a demonstrat eficienta crescuta a probelor de $\beta\text{-CD}$ incarcate cu PTX depuse ca film subtire prin tehnica MAPLE pe substrat de sticla (figura 8a). comparand activitatea antitumorala slaba a medicamentelor simple cu eficienta ridicata a SPIOns modificate la suprafata cu $\beta\text{-CD}$ si incarcate cu PTX depuse ca filme subtiri prin metoda MAPLE, am concluzionat ca aceste modificari arata o activitate imbunatatita si un potential ridicat pentru aplicatii anti-tumorale. Nivelul de NO al probei martor a crescut cu 145% (figura 8b), sugerand un efect inflamator indus de aceste nanocomposite incarcate cu PTX. Doar cateva osteoblaste tumorale au fost observate la 24h dupa incubarea cu nanocompozitele pe baza de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\beta\text{-CD}$ incarcate cu PTX, in imaginile de microscopie in contrast de faza (Fiura 9).

Nanopolimerile $\beta\text{-CD}$ modificate la suprafață și filmele subțiri au arătat o biocompatibilitate excelentă și un efect noncitotoxic. Pe de alta parte, filmele subțiri magnetice incarcate cu medicament au aratat o afinitate semnificativ crescuta fata de celulele tumorale.

Multifunctional Polymeric Biodegradable and Biocompatible Coatings Based on Silver Nanoparticles: A Comparative In Vitro Study on Their Cytotoxicity towards Cancer and Normal Cell Lines of Cytostatic Drugs versus Essential-Oil-Loaded Nanoparticles and on Their Antimicrobial and Antibiofilm Activities

Cel de-al doilea studiu realizat reprezinta o comparatie in vitro a citotoxicitatii selective impotriva celulelor tumorale MCF7 si a celulelor VERO normal, testata pe nanoacoperirile pe baza de argint, obtinute prin metoda MAPLE. Nanoparticulele de argint (AgNPs) au fost incarcate cu 5 medicamente citostatice representative (doxorubicina, fludarabina, paclitaxel, gemcitabina si carboplatin) si 5 tipuri de uleiuri esentiale (EOs) (oregano, rozmarin, ghimbir, busuioc si cimbru). Acoperirile obtinute in acest fel au fost caracterizate prin difractie de raze X, termogravimetrie cuplata cu calorimetrie cu scanare diferențială, spectroscopie în infraroșu cu transformata Fourier, maparea în infraroșu și microscopie electronica cu scanare.

Scopul acestui studio a fost de a evalua comparativ activitatea citotoxică impotriva celulelor tumorale MCF7 și a liniilor celulare sanatoase VERO a nanoparticulelor de argint incarcate cu citostatice respectiv uleiuri esentiale, incorporate intr-o matrice biopolimerica biocompatibila obtinuta prin metoda MAPLE, ce pot fi utilizate in aplicatii anti-tumorale. De asemenea, a fost testata si activitatea antibacteriala si antibiofilm a nanoacoperirilor obtinute impotriva unor tipuri representative de bacterii si fungi, precum *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Escherichia coli* (*E. coli*), si *Candida albicans* (*C. albicans*).

In timp ce toate nanoacoperirile incarcate cu medicamente antitumorale au prezentat o puternica activitate citotoxică impotriva ambelor tipuri de celule – tumorale si normale, cele incarcate cu ulei essential de rozmarin si cimbru au aratat o citotoxicitate remarcabila si semnificativ selective impotriva celulelor canceroase testate.

Nanoparticulele de argint au fost obtinute prin metoda reducerii de tip bottom-up. Pe scurt, solutia 1 (Sn1) a fost preparata prin dizolvarea a 0.5 g AgNO₃ in 100 mL apa distilata. Solutia 2 (Sn2) a constat in 1 g D-glucoza si 4 g NaOH dizolvat in 400 mL apa distilata la temperatura de 80 °C sub agitare magnetica. In pasul urmator, solutia 1 a fost picurata cu ajutorul unei palnii de egalizare a presiunii in solutia 2, sub agitare magnetica in cazul nanoparticulelor de argint functionalizate cu agenti citostatici, 100 mg de doxorubicina, fludarabina, carboplatin, gemcitabina si paclitaxel au fost adaugate in solutia 2 iar in cazul nanoparticulelor de argint functionalizate cu uleiuri esentiale, 200 μL de rozmarin, busuioc, cimbru, oregano respectiv ghimbir, au fost adaugate in solutia 2. In acest pas, precipitatul

obtinut a fost colectat, iar dupa decantarea fazei lichide, pulberea obtinuta a fost spalata de trei ori cu apa demineralizata si uscata la temperatura camerei. In tabelul 2 sunt prezentate codurile probelor utilizate in acest studio.

Tabel 2: codurile probelor utilizate in studiul actual si descrierea acestora

Cod proba	Descriere	Cod Proba	Descriere
AgNP@doc	Nanoparticule de argint functionalizate cu doxorubicina	AgNP@ros	Nanoparticule de argint functionalizate cu rozmarin
AgNP@car	Nanoparticule de argint functionalizate cu carboplatin	AgNP@bas	Nanoparticule de argint functionalizate cu busuioc
AgNP@flu	Nanoparticule de argint functionalizate cu fludarabina	AgNP@thy	Nanoparticule de argint functionalizate cu cimbru
AgNP@gem	Nanoparticule de argint functionalizate cu gemcitabina	AgNP@ore	Nanoparticule de argint functionalizate cu oreano
AgNP@pac	Nanoparticule de argint functionalizate cu paclitaxel	AgNP@gin	Nanoparticule de argint functionalizate cu ghimbir

Rezultatul analizei XRD al nanoparticulelor de argint poate fi observat in figura 10. Au fost masurate patru intensitati difractate in intervalul 20° - 80° . Modelele obtinute in urma difractiei de raze X confirmă structura cubica cristalina a nanoparticulelor de argint. Picuri de difractie specifice au fost identificate la valoarea 2θ ale unghiurilor 38.45° , 46.35° , 64.75° , și 78.05° , ce corespund planurilor de difractie $(1\ 1\ 1)$, $(2\ 0\ 0)$, $(2\ 2\ 0)$, și $(3\ 1\ 1)$ specific nanoparticulelor de argint.

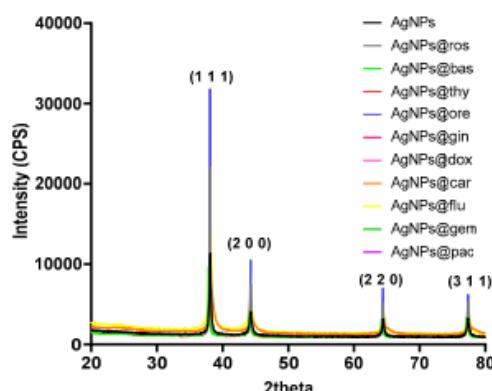


Figura 10: Modelul XRD al pulberii de nanoparticule de argint

Micrografilele SEM (Figura 11) arata dimensiunea nanometrica a nanoparticulelor de argint. Particulele au o forma cvasi-sferica, cu diametru ce variaza intre 20 si 60nm. De asemenea, poate fi observat faptul ca nanoparticulele de argint functionalizate cu uleiuri esentiale au diametre mai mari decat cele functionalizate cu medicamente citostatice. Cel mai probabil, acest fenomen se datoreaza complexitatii uleiurilor esentiale ce contin sute de compusi, in timp ce medicamentele citostatice sunt compuse din molecule simple.

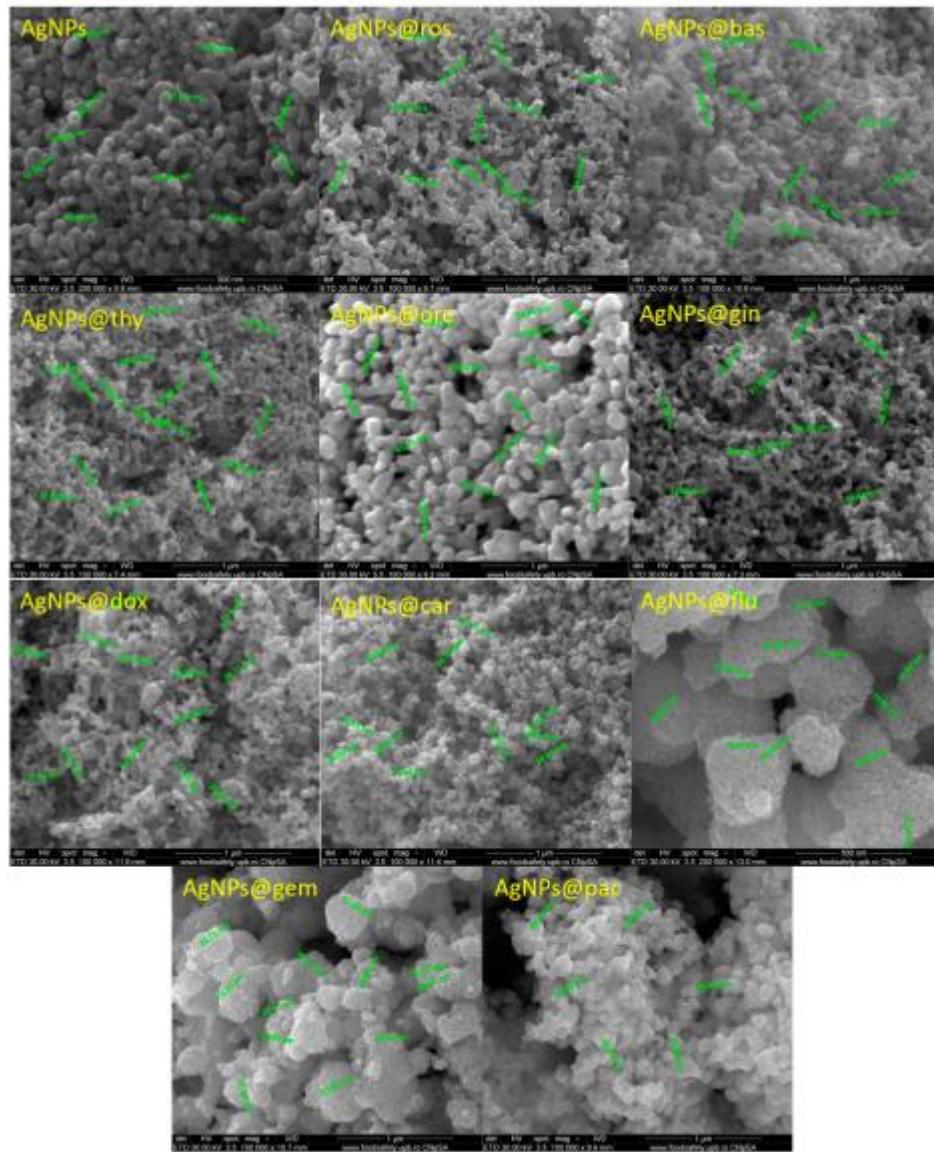


Figura 11: Nanoparticule de argint functionalizate cu diverse citostatice si uleiuri esentiale

Figura 12 prezinta micrografii de suprafata ale nanoacoperirilor obtinute la fluente laser ce variaza intre 200 si 600 mJ/cm² (Figura 12a–e). Conform figurii 12, suprafetele sunt bine acoperite cu PHBV/AgNPs. In toate probele, suprafetele prezinta agglomerate ce

constau in materiale incorporate bine dispersate pe matricea polimerica. O uniformitate crescuta a suprafetei poate fi observata in cazul nanoacoperirilor obtinute la o fluenta laser de 400 mJ/cm^2 (figura 12c).

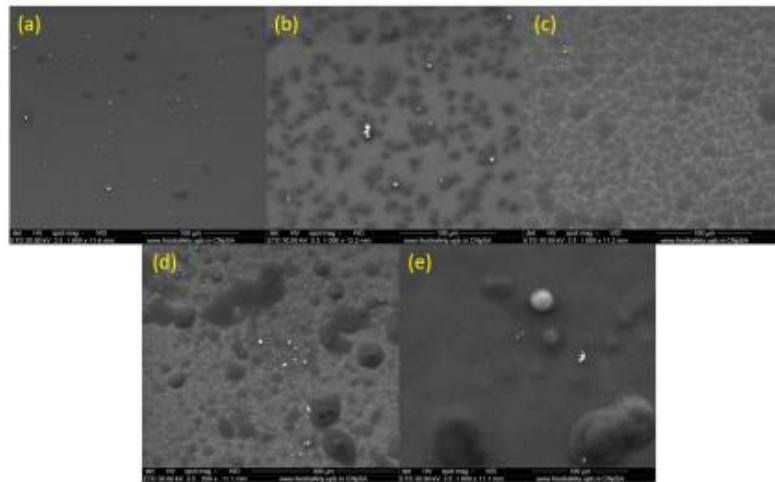


Figura 12: Imagini SEM ale acoperirilor PHVB/AgNPs la $1000\times$ (a–e), obtinute la fluenta laser de (a) 200 mJ/cm^2 ; (b) 300 mJ/cm^2 ; (c) 400 mJ/cm^2 ; (d) 500 mJ/cm^2 ; si (e) 600 mJ/cm^2 .

Caracteristicile morfologice ale tuturor acoperirilor composite pot fi observate in figura 13. Acoperirile prezinta o depunere unoforma, fiind prezente pe suprafata lor si cateva agglomerate.

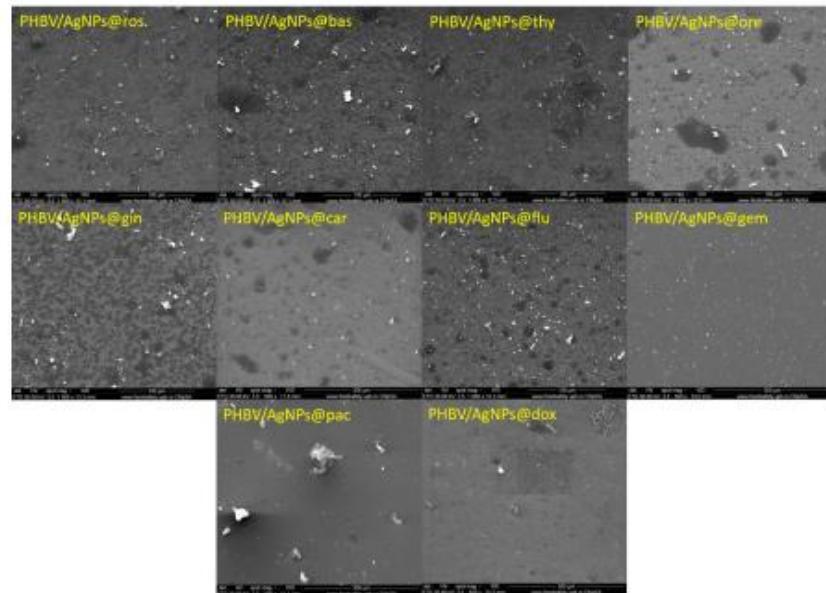


Figura 13: Imagini SEM ale acoperirilor ($500\text{--}1000\times$) obtinute la fluenta laser de 400 mJ/cm^2 .

Pentru a investiga efectul acoperirilor de PHBV/AgNP incarcate cu compusi naturali si medicamente anticanceroase, asupra viabilitatii celulare a celulelor sanatoase si a celor tumorale, coatings loaded with natural compounds and anticancer drugs on the cell viability of both normal and tumor cells, au fost realizate teste MTT dupa 48h si 5 zile de la contactul cu acoperirile obtinute. Rezultatele din figura 14 arata ca la 48h de la contact, toate probele au impactat supravietuirea celulara atat a celulelor sanatoase cat si a celor tumorale, viabilitatea celulara fiind statistic semnificativ scazuta de toate acoperirile, independent de incarcatura cu medicament. Dintre acoperirile ce contin medicamente anticancer, PHBV/AgNPs@gem, PHBV/AgNPs@carb, si PHBV/AgNPs@dox au prezentat cel mai puternic potential de a suprima viabilitatea celulaa a celulelor MCF7, in timp ce PHBV/AgNPs@pac si PHBV/AgNPs@flu au prezentat un efect cytotoxic mai scazut insa inca puternic – reducand viabilitatea celulara cu ~25% respective ~35%, comparativ cu proba martor. În ceea ce privește celulele sanatoase, acoperirile PHBV/AgNP încărcate cu medicamente anticancer au prezentat un potențial citotoxic similar, toate probele declanșând o scădere statistic semnificativa de până la ~60% a viabilității celulare în comparație cu proba martor. In contrast, desi au fost probe incarcate cu compusi naturali – ce au avut efecte similar cu acelea incarcate cu compusi chimioterapeutici- PHBV/AgNPs@ros si PHBV/AgNPs@thy au aratat un impact moderat asupra supravieturirii celulelor sanatoase, scazand viabilitatea celulara cu doar ~30% spre deosebire de proba martor nefrata.

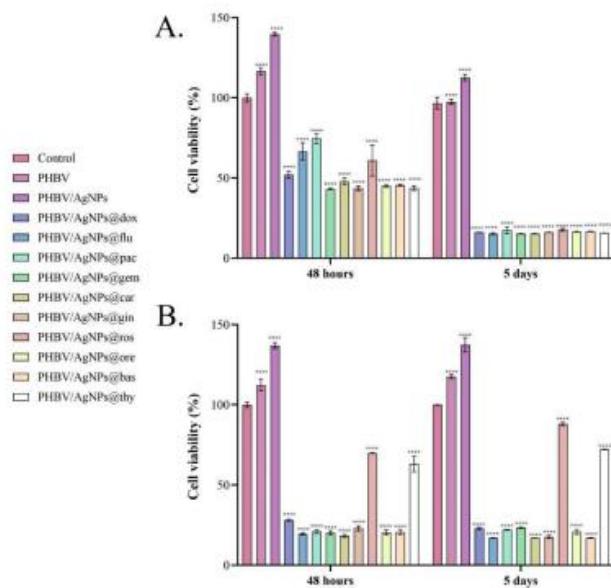


Figura 14: Reprezentare grafica a viabilitatii celulare a (A) celulelor tumorale MCF7 si (B) celulelor VERO dupa 48 h si 5 zile de contact cu probele neacoperite (control) si PHBV, PHBV ce contin citostatice si PHBV ce contin uleiuri esentiale

Profilele citotoxice arătate de teste LDG (figura 15) au confirmat rezultatele obținute cu ajutorul testului MTT. Comparând nivelurile LDG în toate probele ce contin medicament, cele mai joase niveluri LDH, au fost observate în mediile de cultură corespunzătoare probelor ce contin fludarabine.

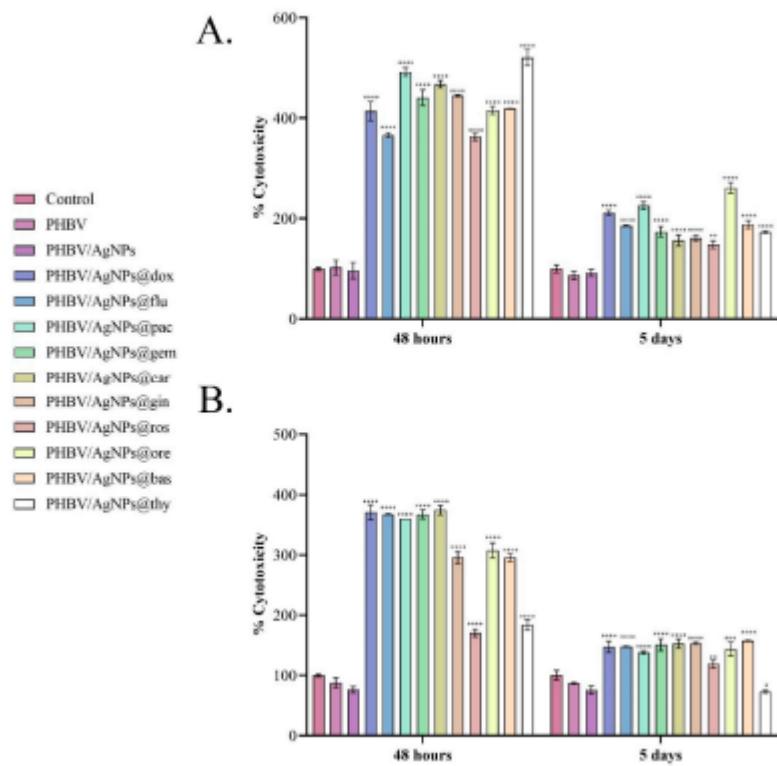


Figura 15. Reprezentarea grafica a proelor neacoperite (control) si PHBV, PHBV/AgNP, incarcate cu citostatice si uleiuri esentiale prezентate in urma testelor LDH, cuantificate in mediile de cultura din (A) celule tumorale MCF7 si (B) celule VERO dupa 48h si 5 zile

Rezultatele obtinute au aratat ca acoperirile ce contin compusi naturali au indus efecte citotoxice atat in celulele sanatoase cat si cele tumorale, similar cu cele induse de PHBV/AgNPs incarcate cu medicamente anticanceroase. Atat teste MTT cat si cele LDH au aratat ca efectele citotoxice au fost mediate de incarcatura de medicament din acoperirile pe baza de PHBV/AgNPs, asa cum probele simple (PHBV, PHBV/AgNPs) nu au afectat negativ viabilitatea celulara si citotoxicitatea. Mai mult decat atat, PHBV/AgNPs au aratat o compatibilitate excelenta atat pentru celulele sanatoase cat si pentru cele tumorale, cu o crestere semnificativa a viabilitatii celulare observata comparative cu referinta experimentalala. In timp ce toate acoperirile PHBV/AgNPs incarcate cu compusi naturali au scazut viabilitatea celulelor tumorale, majoritatea probelor au prezentat un puternic efect citotoxic asupra celulelor

normale. Cu toate acestea, rozmarinul si cimbrul, desi au aratat o scadere a viabilitatii celulelor normale, s-a demonstrat a fi semnificativ mai putin citotoxice comparativ cu alte probe in timp ce au prezentat acelasi efect cytotoxic asupra viabilitatii celulelor tumorale ca si medicamentele anticanceroase.

Pentru a evalua impactul PHBV-PHBV/AgNPs incarcate cu medicament asupra morfologiei celulelor sanatoase si a celor tumorale, precum si distributia celuelor pe suprafetele materialului, probele au fost analizate prin microscopie cu fluorescenta dupa colorarea filamentelor de actina si a nucleelor (Figura 16). Rezultatele obtinute au aratat ca, in absenta medicamentului, toate probele au permis dezvoltarea normala atat a celulelor tumorale cat si a celor sanatoase. Adaugarea atat a medicamentelor anticanceroase cat si a componentelor naturale in structura PHBV-AgNPs au dus la aparitia unor alterari severe a arhitecturii celulare atat a celulelor sanatoase cat si a celor tumorale, exceptand probele ce contin rozmarin si cimbru, ce au permis alterarea cu o afinitate crescuta morfologia celulelor tumorale.

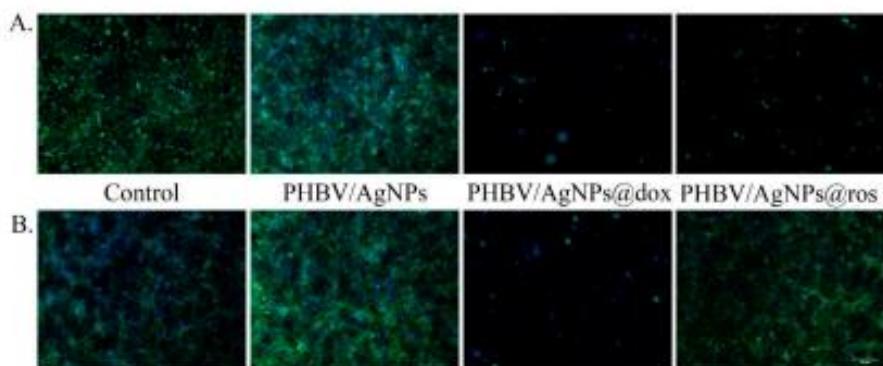


Figura. 16 Micrografii in fluorescent ace prezinta cutoskeletul (A) celulelor MCF7 si (B) l celulelor VERO cells dupa 5 zile de contact cu proba de referinta, PHBV/AgNPs, PHBV/AgNPs@dox, si PHBV/AgNPs@ros. Scale: 100 μ m (verde – filamentele de actina etichetate cu FITC-faloidina; albastru—nucleul celulelor colorate cu DAPI).

Pentru a testa efectul antimicrobian al acoperirilor testate, au fost realizate diferite tete de crestere si viabilitate celulara in PBS. Viabilitatea in PBS a fost evaluate la 2 intervale: 2h si 4h pentru a stabili potentialul intrinsec de a ucide bacteriile al probelor de nanoacoperiri. O scadere semnificativa a viabilitatii a fost observata in prezena acoperirilor ce contin uleiuri essentiale in special PHBV/AgNPs@gin, PHBV/AgNPs@ros, PHBV/AgNPs@bas, si PHBV/AgNPs@thy. Viabilitatea acestor acoperiri a fost semnificativ afectata la ambele intervale de testare (Figura 17). Referitor la dezvoltarea biofilmului, nu a fost observata nicio

inhibitie semnificativa in cazul acoperirilor ce contin cytostatic in conditiile testate. In orice caz, o inhibare semnificativa a biofilmului a fost observata in cazul tuturor acoperirilor ce contin uleiuri esentiale si nanoparticule de argint. Uleiurile esentiale de ghimbir si cimbru au avut cele mai importante efecte anti-biofilm in urma analizarii tuturor tulpinilor microbiene analizate, asa cum poate fi observat in Figura 18.

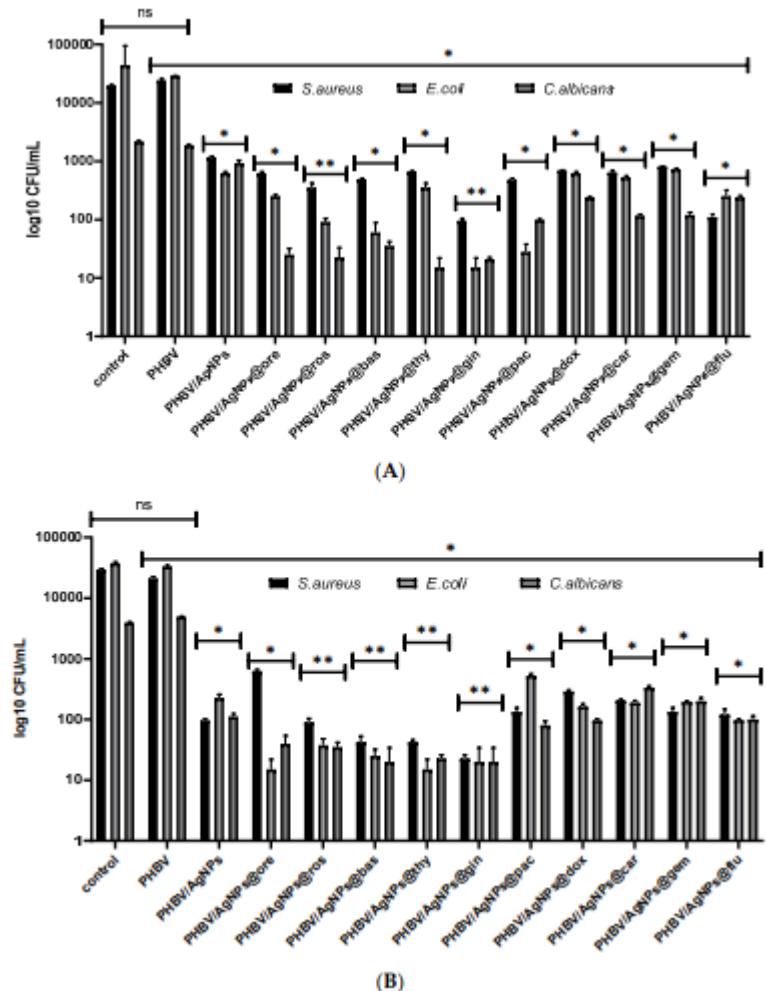


Figura 17. Reprezentare grafica a valorilor log₁₀ CFU/mL obtinute in cadrul testarii tulpinilor microbiene, exprimand viabilitatea bacteriei incubate ca suspensii de 0.5 in PBS pe acoperirile obtinute pentru 2 h (A) si 24 h (B). * p < 0.05; ** p < 0.001 comparand formarea biofilmului pe proba martor PHVB control si fiecare acoperire cu AgNPs s, ns— nesemnificativ.

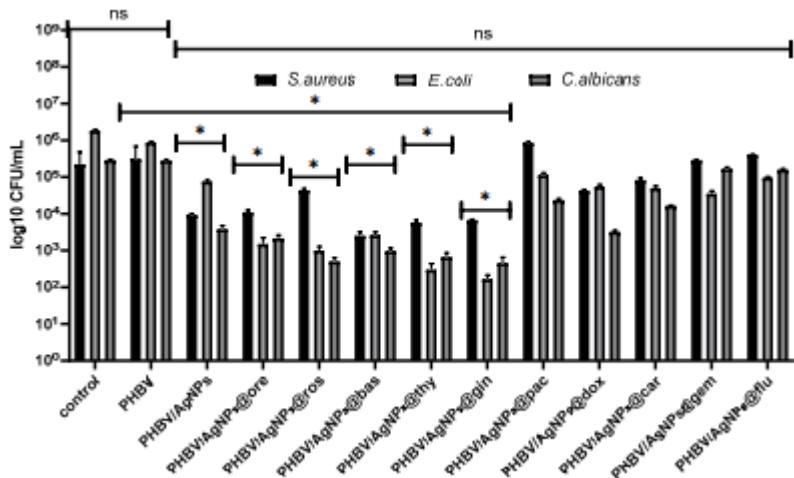


Figura 18. Reprezentare grafica a valorilor \log_{10} CFU/mL obtinute pentru tulpinile microbiene testate, exprimand biofilmul dezvoltat pe proba martor si nanoacoperirile de AgNPs la 24h de la incubare. * $p < 0.05$; comparand formarea biofilmului in cazul probei martor PHBV si a fiecarei acoperiri pe baza de nanoparticule de argint

Concluzii generale

Administrarea pacientilor oncologici a castigat foarte mult interes in ultima perioada, studii importante fiind facute asupra unor noi strategii de dezvoltare. În ciuda tuturor progreselor, răspunsul clinic al pacienților oncologici la tratamentul cancerului este limitat, ceea ce duce la îmbunătățirea eficacității prin căutarea unor alternative. Ca și posibila solutie a acestor alternative, au fost studiați compusi naturali ca și agenți în tratamentul cancerului și au demonstrat a fi eficiente împotriva rezistenței la medicamente, având și efecte farmacologice.

Studii recente au arătat că uleiurile esențiale pot fi o soluție naturală terapeutică promisitoare, care conține o mare varietate de compusi chimici, toate având potential medical. Structurile chimice complexe ce se gasesc în uleiurile esențiale nu pot fi găsite în alți agenți naturali, oferind avantajul de a fi ușor de găsit în natură, costul de producție este scăzut, și de asemenea are potentialul de a putea fi produse la o scară largă [49]. Desigur, toate aceste avantaje vin și cu anumite puncte slabe, uleiurile esențiale fiind foarte volatile, slab solubile și stabilitate scăzuta și uneori insuficientă pentru o întreținere specifică.

Aceste limite pot fi depășite cu ajutorul nanomedicinei, prin abordare nanotehnologică, oferind metode de încarcare pentru uleiuri esențiale pentru a îmbunătății întreținerea specifică a celulelor de interes.

Nanopurtătorii inteligenți încărcați cu o farmacocinetică personalizată care pot fi livrați direct în zona țintă sunt o soluție pentru problemele cu care se confruntă abordările terapeutice convenționale. Având un număr remarcabil de caracteristici importante, SPIONs prezintă biocompatibilitate, capacitatea de a viza zonele tumorale și de a provoca moartea celulelor cancerioase prin hipertermie.

SPIONs cu suprafața modificată cu β -CD și încărcati cu PTX, atât ca nanopulberi ca și filme subțiri obținute prin metoda MAPLE par să aibă proprietăți corespunzătoare pentru a fi utilizati ca sisteme de transport a medicamentelor pentru zonele tinta tumorale. Fluenta laser optimă a fost de 400mJ/cm^2 , filmele subțiri având cea mai ridicată integritate structurală. Nanocompozitele magnetice prezintă biocompatibilitate și citotoxicitate, astfel cum au arătat și teste MTT realizate pe osteoblaste și celule de osteosarcom. Analizând filmele subțiri după aceea au fost încărcate cu PTX, acestea au arătat o afinitate semnificativ crescută față de celulele cancerioase.

Medicamentele citostatici disponibile în acest moment reprezintă o problema majoră pentru organism, atacând astăzi celulele cancerioase cât și cele sănătoase. Astfel, ca și soluție pentru a face față situației, au fost efectuate teste in vitro pe liniile celulare MCF7 și celule sănătoase VERO pentru nanoacoperirile pe bază de nanoparticule încărcate cu medicamente citostatici (fludarabina, gemcitabina, carboplatin, doxorubicina și paclitaxel) și uleiuri esențiale (rozmarin, busuioc, ghimbir, cimbru și oregano), obținute prin metoda MAPLE.

Toate nanoacoperirile obținute au arătat o activitate citotoxică impresionantă împotriva liniilor celulare tumorale, însă cele încărcate cu cimbru și rozmarin au prezentat o citotoxicitate remarcabilă împotriva celulelor cancerioase. Ca și confirmare a acestui rezultat, nanoparticulele de argint încărcate cu ulei esențial de rozmarin au fost testate cu ajutorul microscopiei cu fluorescție, arătând că în celulele tumorale alterate au avut o afinitate ridicată, efectul nefiind atât de intens pentru liniile celulare normale.

Nanoparticulele de argint obținute au avut dimensiuni cuprinse între 20 și 60nm, cele functionalizate cu uleiuri esențiale având dimensiuni mai mari.

Cel mai mare potențial de a elimina viabilitatea celulelor MC7 l-au avut acoperirile care contin gemcitabine, carboplatin și doxorubicina, în timp ce cele care contin paclitaxel și fludarabine au prezentat un potențial mai scăzut, viabilitatea celulară fiind redusă cu 33% și respective 25%.

Testele pentru activitatea antibiofilm si antimicrobiana au fost realizate impotriva E. coli, S. aureus si Candida albicans, viabilitatea celulara fiind semnificativ scazuta de toate nanoacoperirile ce contin uleiuri esentiale, cea mai eficienta activitate antibiofilm fiind demonstrata de nanoparticulele de argint ce contin cimbru si ghimbir.

Ca si concluzie generala, a fost demonstret ca, nanoacoperirile ce contin compusi naturali au prezentat activitati citotoxice similar cu medicamentele citostatiche traditionale utilizate impotriva celulelor canceroase, scaderea viabilitatii celulelor normale fiind mult mai scazuta decat in cazul utilizarii citostaticelor. Citotoxicitatea selective este un factor important ce recomanda dezvoltarea nanoacoperirilor ca si solutie alternativa pentru terapia cancerului, cel putin pentru cancerul de san.

Bibliography

1. Ulu, G., Y. Kiraz, and Y. Baran. *Personalized biomedicine in cancer: from traditional therapy to sustainable healthcare*. 2020.
2. Rawal, S. and M.M.J.J.o.c.r. Patel, *Threatening cancer with nanoparticle aided combination oncotherapy*. 2019. **301**: p. 76-109.
3. Byrne, J.D., T. Betancourt, and L. Brannon-Peppas, *Active targeting schemes for nanoparticle systems in cancer therapeutics*. Adv Drug Deliv Rev, 2008. **60**(15): p. 1615-26.
4. Reddy Panyala, N., E. Peña-Méndez, and J. Havel, *Gold and nano-gold in medicine: Overview, toxicology and perspectives*. Journal of Applied Biomedicine, 2009. **7**.
5. Ulu, G.T., Y. Kiraz, and Y. Baran, *Chapter 22 - Personalized biomedicine in cancer: from traditional therapy to sustainable healthcare*, in *Biodiversity and Biomedicine*, M. Ozturk, D. Egamberdieva, and M. Pešić, Editors. 2020, Academic Press. p. 441-457.
6. Parveen, S., R. Misra, and S.K. Sahoo, *Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging*. Nanomedicine, 2012. **8**(2): p. 147-66.
7. Gabizon, A.A., R.T.M. de Rosales, and N.M. La-Beck, *Translational considerations in nanomedicine: The oncology perspective*. Adv Drug Deliv Rev, 2020. **158**: p. 140-157.
8. Raja, G., et al., *Microcellular Environmental Regulation of Silver Nanoparticles in Cancer Therapy: A Critical Review*. Cancers (Basel), 2020. **12**(3).
9. Skóra, B., K.A. Szuchowski, and J. Gmiński, *A concise review of metallic nanoparticles encapsulation methods and their potential use in anticancer therapy and medicine*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2020. **154**: p. 153-165.
10. Abdal Dayem, A., et al., *The Role of Reactive Oxygen Species (ROS) in the Biological Activities of Metallic Nanoparticles*. Int J Mol Sci, 2017. **18**(1).
11. Bandeira, M., et al., *Green synthesis of zinc oxide nanoparticles: A review of the synthesis methodology and mechanism of formation*. Sustainable Chemistry and Pharmacy, 2020. **15**: p. 100223.
12. Vijayaraghavan, K. and T. Ashokkumar, *Plant-mediated biosynthesis of metallic nanoparticles: A review of literature, factors affecting synthesis, characterization techniques and applications*. Journal of Environmental Chemical Engineering, 2017. **5**(5): p. 4866-4883.
13. Abd El-Sadek, M.S., H.S. Wasly, and K.M. Batoo, *X-ray peak profile analysis and optical properties of CdS nanoparticles synthesized via the hydrothermal method*. Applied Physics A, 2019. **125**(4): p. 283.
14. Montero-Muñoz, M., et al., *Growth and formation mechanism of shape-selective preparation of ZnO structures: correlation of structural, vibrational and optical properties*. Physical Chemistry Chemical Physics, 2020. **22**(14): p. 7329-7339.
15. Shard, A.G., L. Wright, and C.J.B. Minelli, *Robust and accurate measurements of gold nanoparticle concentrations using UV-visible spectrophotometry*. 2018. **13**(6): p. 061002.
16. Keshavarz, M., et al., *Metal-oxide surface-enhanced Raman biosensor template towards point-of-care EGFR detection and cancer diagnostics*. 2020. **5**(2): p. 294-307.
17. Selmani, A., D. Kovačević, and K. Bohinc, *Nanoparticles: From synthesis to applications and beyond*. Advances in Colloid and Interface Science, 2022. **303**: p. 102640.
18. Mérai, L., et al., *Fast optical method for characterizing plasmonic nanoparticle adhesion on functionalized surfaces*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2020. **412**(14): p. 3395-3404.
19. Lai, Y.H., et al., *Rapid screening of antibody–antigen binding using dynamic light scattering (DLS) and gold nanoparticles*. Analytical Methods, 2015. **7**(17): p. 7249-7255.
20. Garcia, P.R.A.F., et al., *An in situ SAXS investigation of the formation of silver nanoparticles and bimetallic silver–gold nanoparticles in controlled wet-chemical reduction synthesis*. Nanoscale Advances, 2020. **2**(1): p. 225-238.
21. Kim, A., et al., *Validation of Size Estimation of Nanoparticle Tracking Analysis on Polydisperse Macromolecule Assembly*. Scientific Reports, 2019. **9**(1): p. 2639.

22. Shivakumara, S., T.R. Penki, and N. Munichandraiah, *High specific surface area α -Fe2O3 nanostructures as high performance electrode material for supercapacitors*. Materials Letters, 2014. **131**: p. 100-103.
23. Conde, J., G. Doria, and P. Baptista, *Noble Metal Nanoparticles Applications in Cancer*. Journal of Drug Delivery, 2012. **2012**: p. 751075.
24. Efendic, F., et al., *Histological and biochemical apoptosis changes of female rats' ovary by Zinc oxide nanoparticles and potential protective effects of l-arginine: An experimental study*. Annals of Medicine and Surgery, 2022. **74**: p. 103290.
25. Lyu, Y., et al., *Synthesis of silver nanoparticles using oxidized amylose and combination with curcumin for enhanced antibacterial activity*. Carbohydrate Polymers, 2020. **230**: p. 115573.
26. Iqbal, S., et al., *Application of silver oxide nanoparticles for the treatment of cancer*. Journal of Molecular Structure, 2019. **1189**: p. 203-209.
27. Danişman-kalındemirtaş, f., et al., *Selective cytotoxicity of paclitaxel bonded silver nanoparticle on different cancer cells*. Journal of Drug Delivery Science and Technology, 2021. **61**: p. 102265.
28. Castañeda, A.M., et al., *Synergistic effects of natural compounds and conventional chemotherapeutic agents: recent insights for the development of cancer treatment strategies*. Heliyon, 2022. **8**(6): p. e09519.
29. Pairoj, S., et al., *Antiradical properties of chemo drug, carboplatin, in cooperation with ZnO nanoparticles under UV irradiation in putative model of cancer cells*. Biocybernetics and Biomedical Engineering, 2019. **39**(3): p. 893-901.
30. Sharma, A., A.K. Goyal, and G. Rath, *Recent advances in metal nanoparticles in cancer therapy*. Journal of Drug Targeting, 2018. **26**(8): p. 617-632.
31. Salehi, F., et al., *Stabilization of Zataria essential oil with pectin-based nanoemulsion for enhanced cytotoxicity in monolayer and spheroid drug-resistant breast cancer cell cultures and deciphering its binding mode with gDNA*. International Journal of Biological Macromolecules, 2020. **164**.
32. Sharma, M., et al., *Essential oils as anticancer agents: Potential role in malignancies, drug delivery mechanisms, and immune system enhancement*. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2022. **146**: p. 112514.
33. Gudovan, D., et al., *Functionalized magnetic nanoparticles for biomedical applications*. Current Pharmaceutical Design, 2015. **21**(42): p. 6038-6054.
34. Dulińska-Litewka, J., et al., *Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles-Current and Prospective Medical Applications*. Materials (Basel), 2019. **12**(4).
35. Puiu, R.A., et al., *Anti-Cancer Nanopowders and MAPLE-Fabricated Thin Films Based on SPIONs Surface Modified with Paclitaxel Loaded β -Cyclodextrin*. 2021. **13**(9): p. 1356.
36. Wang, Y.-X.J.J.Q.I.i.M. and Surgery, *Superparamagnetic iron oxide based MRI contrast agents: Current status of clinical application*. 2011, 2011. **1**(1): p. 35-40.
37. Rahmani, R., et al., *Plant-mediated synthesis of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) using aloe vera and flaxseed extracts and evaluation of their cellular toxicities*. Ceramics International, 2020. **46**(3): p. 3051-3058.
38. Jafarizad, A., et al., *Gold Nanoparticles and Reduced Graphene Oxide-Gold Nanoparticle Composite Materials as Covalent Drug Delivery Systems for Breast Cancer Treatment*. 2017. **2**(23): p. 6663-6672.
39. Hyun, H., et al., *Engineered beta-cyclodextrin-based carrier for targeted doxorubicin delivery in breast cancer therapy in vivo*. Journal of Industrial and Engineering Chemistry, 2019. **70**: p. 145-151.
40. Jeon, H., et al., *Poly-paclitaxel/cyclodextrin-SPION nano-assembly for magnetically guided drug delivery system*. Journal of Controlled Release, 2016. **231**: p. 68-76.
41. Kong, T., et al., *Enhancement of Radiation Cytotoxicity in Breast-Cancer Cells by Localized Attachment of Gold Nanoparticles*. 2008. **4**(9): p. 1537-1543.

42. Musielak, M., I. Piotrowski, and W.M. Suchorska, *Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) as a multifunctional tool in various cancer therapies*. Reports of Practical Oncology & Radiotherapy, 2019. **24**(4): p. 307-314.
43. Miller, K.D., et al., *Cancer statistics for adolescents and young adults*, 2020. 2020. **70**(6): p. 443-459.
44. Chi, Y.-N., et al., *Development of protective agents against ovarian injury caused by chemotherapeutic drugs*. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2022. **155**: p. 113731.
45. Fares, J.E., et al., *Metronomic chemotherapy for patients with metastatic breast cancer: Review of effectiveness and potential use during pandemics*. Cancer Treatment Reviews, 2020. **89**: p. 102066.
46. Papavlu, A.P., et al., *Matrix-assisted pulsed laser evaporation of organic thin films: Applications in biology and chemical sensors*. 2017: p. 171-189.
47. Bonciu, A., et al., *Interfaces obtained by MAPLE for chemical and biosensors applications*. Sensors and Actuators Reports, 2021. **3**: p. 100040.
48. Zhai, Y., et al., *Synthesis of magnetite nanoparticle aqueous dispersions in an ionic liquid containing acrylic acid anion*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2009. **332**(2): p. 98-102.
49. AbouAitah, K. and W. Lojkowski, *Nanomedicine as an Emerging Technology to Foster Application of Essential Oils to Fight Cancer*. Pharmaceuticals (Basel), 2022. **15**(7).