



UNIVERSITATEA POLITEHNICA DIN BUCURESTI
SCOALA DOCTORALA: CHIMIE APLICATA 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 toxicitate sistemica nociva, neurotoxicitate, afectiuni gastrice, anemie, etc si de asemenea, rezultatele terapeutice asteptate nu sunt atinse din cauza solubilitatii scazute 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 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 uleiurile 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 alegerii 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 prevenire 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 arhitectură vasculară defectuoasă, combinată cu un drenaj limfatic scăzut, duce la efectul EPR (permeatie si retentie sporite) [3]. Noile abordari terapeutice sunt foarte necesare pentru a furniza specific agenți terapeutici acolo unde tumora este localizata într-un mod specific, iar un răspuns rapid la această situație este dezvoltarea nanotehnologiei, folosind nanomateriale în 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 crescuta 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 nanometric ace au adresabilitate in diferite domenii ce tin de stiinta si medicina. O gama variata de nanomateriale a fost studiată pentru a putea fi utilizate atat pentru diagnostic (bioimaging, nanobiosenzori) cat si in scop therapeutic (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.

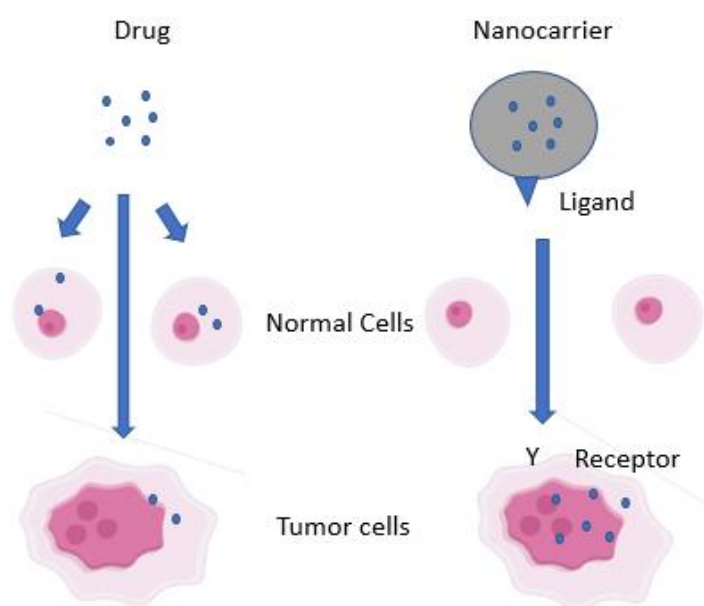


Figura. 1 Comparatie intre eliberarea tinta si netinta a medicamentului

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 canceroase 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.) și nemetalice (acid polylactic, nanotuburi de carbon, etc.) și pot fi obținute prin metode diferite: fizice, chimice și pe baza de microorganism (sinteza “verde”) [9].

Terapia cancerului este aria de interes în care nanoparticulele sunt utilizate constant. Un aspect important ce poate modifica tratamentul cancerului este faptul că celulele canceroase prezintă rezistență la o mare varietate de medicamente lipofile, cauzând rezistență la medicamente și ineficiența chimioterapiei. O varietate de studii au arătat că nanoparticulele metalice cu o suprafață reactivă ridicată pot induce apoptoză, aceasta fiind considerată cea mai eficientă metodă de a elimina celulele canceroase din organism [10].

O mulțime de studii din literatura recentă confirmă efectele nanoparticulelor metalice în terapia cancerului: nanoparticulele de argint prezintă efecte pozitive asupra celulelor cancerului de sân, nanoparticulele de aur prezintă o citotoxicitate de 70% asupra celulelor de adenocarcinom colorectal, iar nanoparticulele de CeO_2 prezintă o activitate eficientă împotriva cancerului pulmonar [9].

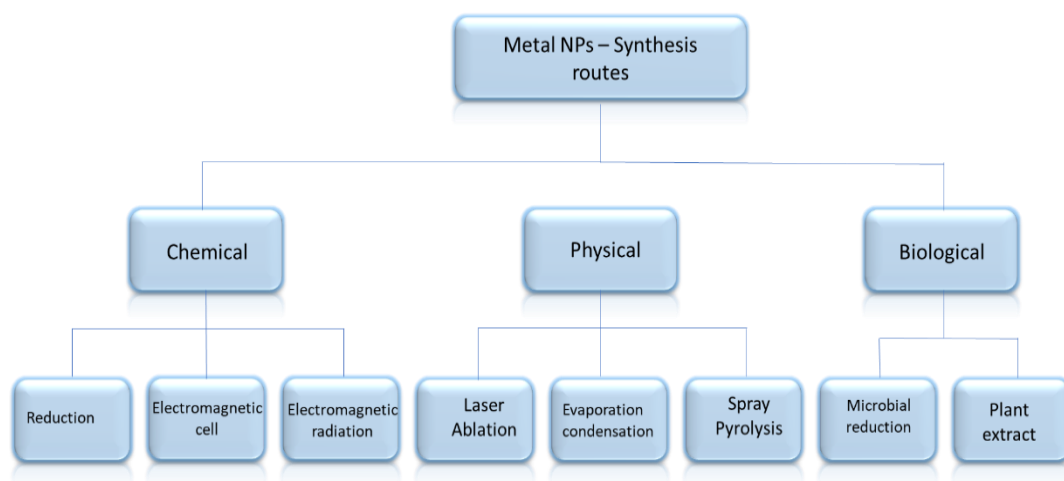


Figura 2. Metode de sinteză a nanoparticulelor metalice

Există o mulțime de rute de sinteză pentru a obține nanoparticule metalice, așa cum se poate observa în figura 2, ce necesită condiții speciale de vid, aparatură performantă și diferiți aditivi chimici, însă totodată sunt și anumiți factori mai puțin plăcuți atunci când sunt utilizate rute de sinteză chimice, precum riscul biologic crescut asupra mediului înconjurător.

Particulele cu dimensiuni nanometrice posedă atât proprietăți moleculare cât și atomice în intervalul nanometric, cu dimensiuni și forme diferite și caracteristici îmbunătățite a suprafețelor ce pot fi personalizate. Raportul suprafață-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 in 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

Categorii	Tehnica	Observatii	Referinte
Spectroscopie	XRD (Difractie cu raze X)	Dimensiunea cristalitului, compozitia, structura cristalinului	[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 luminii)	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 aglomerate in interiorul diferitelor tipuri de cellule, avand o afinitate pentru macrophage si celule reticuloendoteliale. 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 succes 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 promitator 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 mic sa fie mai putin toxice pentru celulele necanceroase si sa tinteasca celulele canceroase in mod direct [27].

Unul dintre cele mai eficiente medicamente chimioterapeutice ce face parte din familia taxanelor este Paclitaxel-ul, aratand activitate antitumorală 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 inhivarea fazelor ciclului celular [29]. Paclitaxelul 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 effect 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 reduca 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 demonstrate 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 citostatice, 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 substante naturale cu o activitate biologica crescuta, pot fi o alta solutie pentru tratamentul cancerului, inducand apoptoza. Uleiurile esentiale extrase din plante aromatice prezinta proprietati antiproliferative, antioxidante si antimutagenice si pot fi un adjuvant ce ajuta la cresterea sensibilitatii celulelor tumorale, fiind o alternativa viabila pentru tratamentul conventional [31].

Exista mai mult de 300 de tipuri de uleiuri esentiale utilizate in diferite domentii, 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 compozitia chimica a acestora [32].

I.5. Utilizarea SPIONs in terapia cancerului

Sunt disponibile o multitudine 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 tinti zone tumorale si sunt aprobate de FDA pentru a fi utilizate in aplicatii clinice ca target tumoral zones and are FDA [36]. Atat administrarea cat si temperatura zonei tinta cresc, fiind indusa moartea celulelor tumorale.

Alt motiv pentru care SPIONs sunt utilizati in aplicatiile biomedicale este toxicitatea scazuta, fara a ramane reziduri magnetice [37]. În ciuda tuturor acestor caracteristici, magnetite tind 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 datorită exteriorului lor care este hidrofil și interiorului hidrofob [39]. Exista un studiu in care un sistem de livrare a medicamentelor cu stabilitate ridicată a fost format prin interacțiunea SPIONs cu β -ciclodextrina și paclitaxel, pentru a îmbunătăți ghidarea magnetica. Sistemul dezvoltat prezinta activitate antitumorală atat *in vitro* cat si *in vivo* [40].

Există o mulțime 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, ceea ce 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 nedorite 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 pacienții 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 ceilalti, 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, inasa 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 stabilit, 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 dezavantajele 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 aderenza 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.

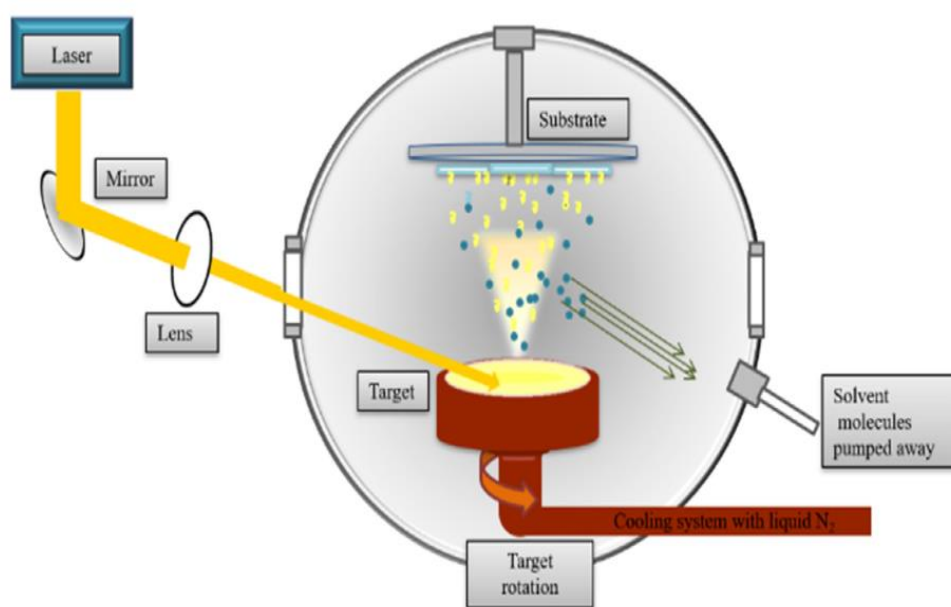


Figura. 3 Instalatia MAPLE [46]

In figura 3 putem observa o instalatie tipica MAPLE, ce consta intr-un laser pulsant ce poate fi infrarosu sau ultraviolet, un fascicul cuprins in gama 1-25 mm² ce trece printr-o camera de vid pe o tinta solida. Fluanta laserului este aleasa astfel incat tinta sa nu fie degradata, fiind cuprinsa intre 0.100J/cm² si 5 J/cm².

Tinta include o matrice inghetata cu azot lichid, ce contine molecule organize dizolvate intr-un solvent absorbant. Omogenitatea tinte 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 ce 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 tinta a medicamentelor, cu farmacocinetica și biodistributie personalizate, care pot livra selectiv agenti anti-cancer direct la locul tumorii acestia fiind o solutie pentru majoritatea dificultăților întâmpinate cand sunt utilizate instrumentele terapeutice convenționale.

Astfel, sunt descrise sinteza, caracterizarea fizicochimica si evaluarea in vitro a biocompatibilitatii si activitatea antitumorală sistemelor de nanoparticule superparamagnetice de oxid de fier pe baza de magnetite (Fe_3O_4), cu o suprafata modificata cu β -ciclodextrina (CD) si paclitaxel (PTX) - ($\text{Fe}_3\text{O}_4@ \beta\text{CD}/\text{PTX}$).

Nanoparticulele de Fe_3O_4 - β -ciclodextrina ($\text{Fe}_3\text{O}_4@ \beta\text{-CD}$) sunt obtinute prin metoda co-precipitarii, ce implica precipitarea simultana ionilor ferosi (Fe^{2+}) si ferici (Fe^{3+}) in solutie apoasa. Pe scurt, solutia 1 (Sn1) a fost preparate prin dizolvarea sulfatului feros si a clorurii ferice (raport molar 1:2) in 300 mL apa demineralizata. Solutia 2 (Sn2) consta in 1 g β -CD si 9 mL hidroxid de amoniu in 300 mL apa demineralizata. In pasul urmator, solutia 1 este adaugata in picurare peste solutia 2, utilizand o palnie de egalizare a presiunii sub agitare magnetica. Nanoparticulele de magnetita ce au format un precipitat sunt colectate magnetic. Dupa decantarea fazei lichide, pulberea rezultata este spalata de trei ori cu apa demineralizata si lasate la uscat la temperatura camerei.

Nanopulberile sunt complet caracterizate prin difractie cu raze X, (XRD), microscopie electronica de scanare (SEM), microscopie electronica prin transmisie (TEM), spectroscopie in infrarosu cu transformata Fourier (FT-IR), si analiza termica (simultan analiza termogravimetrica (TGA) si calorimetrie cu scanare diferentiala (DSC).

Sistemele ce contin PTX- β -CD au fost preparate prin metoda evaporarii solventului. Pentru aceasta, 100 mg nanoparticule $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \beta\text{-CD}$ au fost dispersate in solutia de PTX (10 mg) in cloroform (1 mL) si amestecate intr-un mojar pana cand a fost evaporat complet cloroformul. Ulterior, acestea au fost pastrate la temperatura de at 5°C pentru a fi utilizate ulterior.

Filmele subtiri de $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{PTX} - \beta\text{-CD}$ au fost obtinute prin tehnica MAPLE. Acestea au fost depozitate pe sticla si substrat de Siliciu ce au fost anterior curatate succesiv cu acetone, etanol si apa deionizata in 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 într-un support preracit 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 experimentali (de ex. Temperature 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 CuKα ($\lambda = 1,54056\text{Å}$ la 15 mA și 30 kV) cu unghiul de difracție Bragg 2θ variind între 10 și 80°.

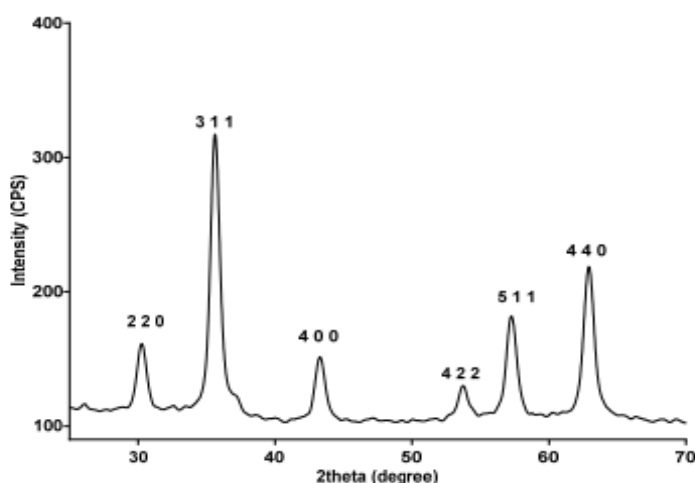


Figura 4. Spectrul XRD al nanopulberilor Fe₃O₄@ β-CD

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 rețelei 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. Imaginile TEM ale nanopulberilor Fe₃O₄@ β-CD sunt reprezentate grafic în Figura 5. La mărituri mai mari, se poate distinge o fază nanocristalină de magnetita fără aglomerari 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.

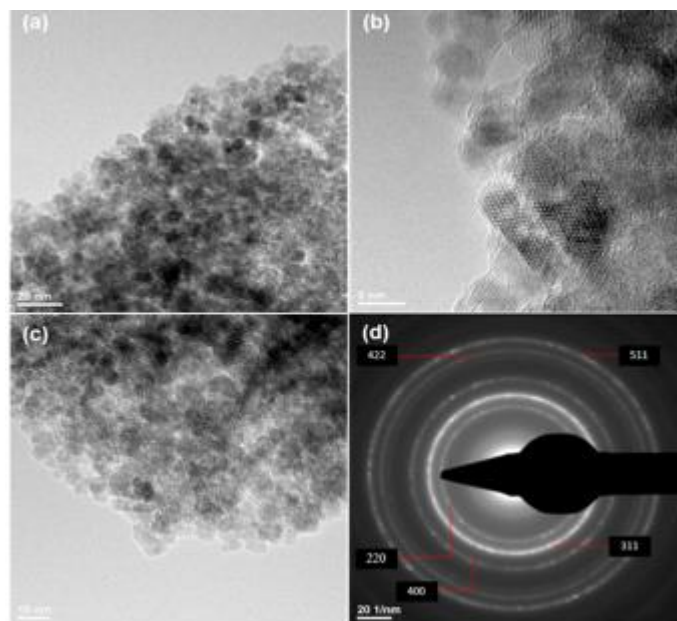


Figura 5. Micrografiile TEM (a,b,c) și modelul SAED (d) pentru pulberile $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \beta\text{-CD}$

Forma și dimensiunea nanodetațiilor 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.

Aglomerările de nanoparticule pot fi observate la o magnificație scăzută (5000X) în micrografiile SEM (Figura 6a). Imaginile la o magnificație crescută (400,000×) prezintă nanoparticule de 3-5nm cu o morfologie sferică bine definită (Figura 6 b,c,d). SEM a fost de asemenea utilizată pentru a determina dimensiunea particulelor, forma, caracteristicile morfologice și texturale ale filmelor subțiri obținute prin. Figura 7a este o micrografie SEM la o magnificație de 200,000 × a filmelor subțiri de $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \beta\text{-CD}$ în secțiune, depuse la o fluență laser de 400 mJ/cm². Astfel se poate observa morfologia uniformă, compactă și aglomerată a filmului. Suprafața filmului subțire expune un aspect neregulat cu o grosime ce variază între 18 și 71 nm (Figura 7b).

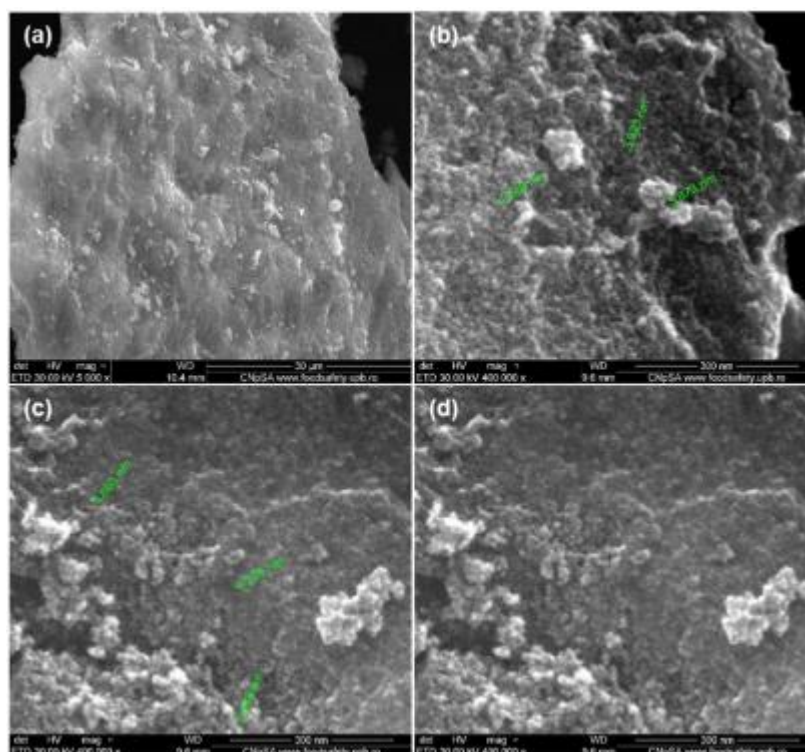


Figura 6: Micrografii SEM ale nanopulberilor Fe₃O₄@ β-CD la (a) magnificatie redusa (5000×) si (b,c,d) magnificatie ridicata (400,000×)

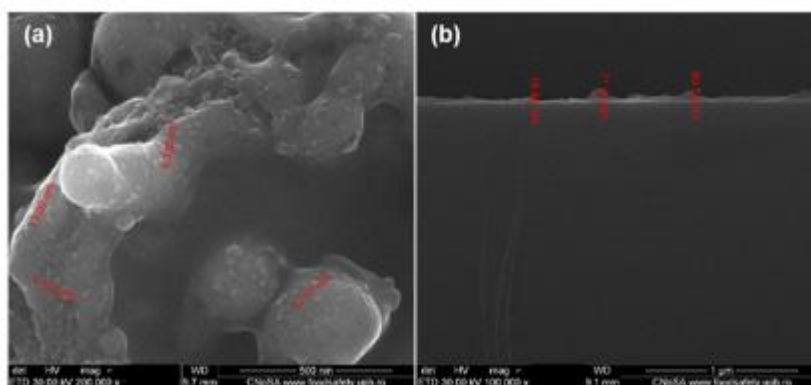


Figura 7: Micrografii SEM cu vedere in plan (a) si in sectiune (b) ale Fe₃O₄@β-CD/PTX depuse la 400 mJ/cm²

Pentru a evalua biocompatibilitatea filmelor magnetice obtinute prin MAPLE, formate din nanoparticule de Fe₃O₄@β-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 β-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 Fe₃O₄@β-CD este de asemenea confirmata si de

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

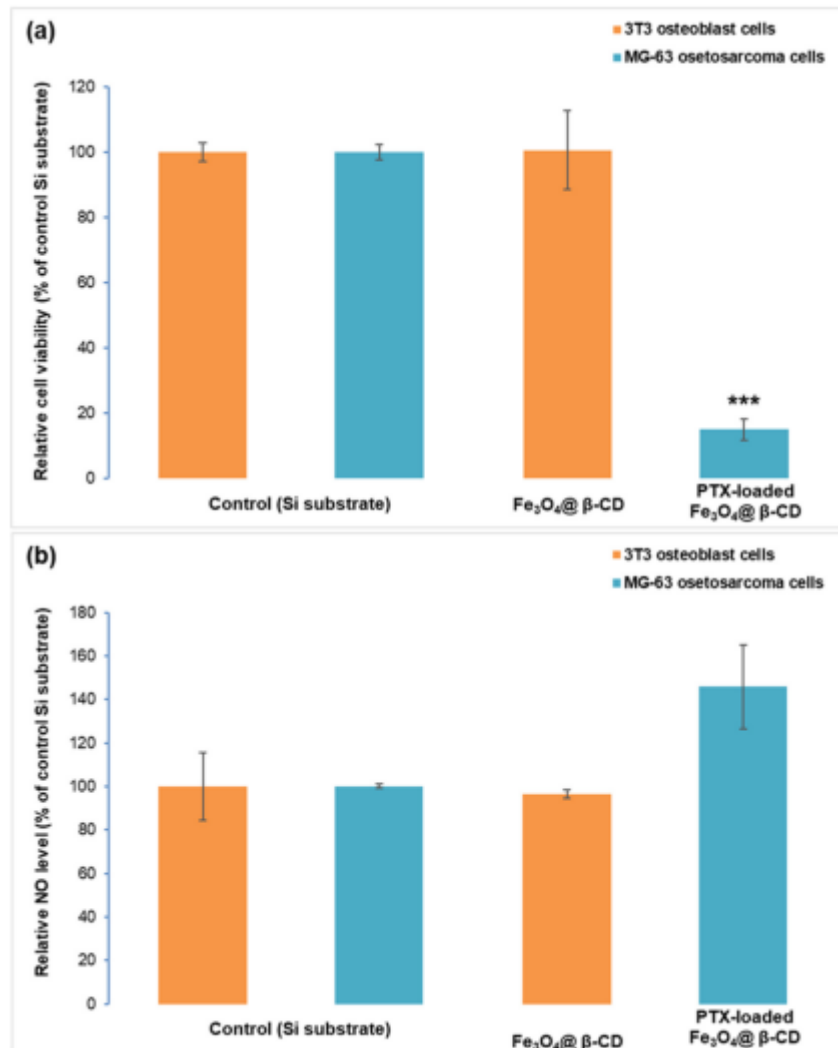


Figura 8. Teste de biocompatibilitate a nanoparticulelor de Fe₃O₄@β-CD pe osteoblastele normale 3T3 (a) și eficiența antitumorală a nanocompozitelor Fe₃O₄@β-CD încărcate cu PTX pe celulele de osteosarcom MG-63 (b) evidențiată de rezultatele MTT (a) și Griess (b). Rezultatele au fost calculate ca valori medii (n = 3) și exprimate în raport cu probele martor (***) p < 0,001).

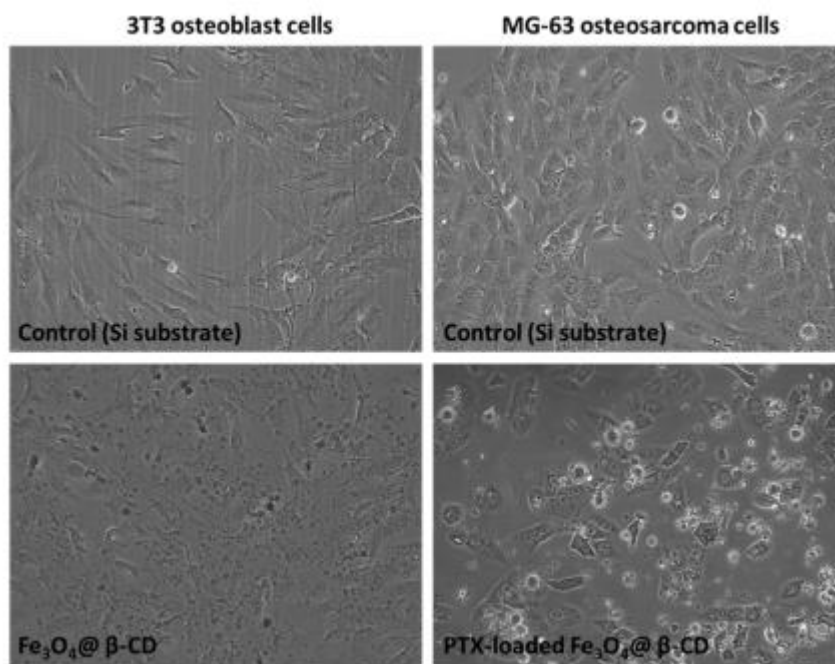


Figura 9. Imagini de microscopie in contrast de faza a osteblastelor din linia celulara 3T3 si culturi celulare de osteosarcom MG-63 pe suprafata acoperirilor Fe₃O₄@β-CD si nanocompozitelor Fe₃O₄@β-CD incarcate cu PTX. Marire: 10X

O scadere semnificativa de 85% a matorului (reprezentat de o lamela de sticla) a demonstrate eficienta crescuta a probelor de β-CD incarcate cu PTX depuse ca film subtire prin tehnica MAPLE pe substrat de sticla (figura 8a). comparand activitatea antitumorală slabă a medicamentelor simple cu eficienta ridicata a SPIOns modificate la suprafata cu β-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 Fe₃O₄@β-CD incarcate cu PTX, in imaginile de microscopie in contrast de faza (Figura 9).

Nanopulberile β-CD modificate la suprafata și filmele subtiri au aratat o biocompatibilitate excelenta și un efect noncitotoxic. Pe de alta parte, filmele subtiri 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 reprezentative (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 diferentiale, spectroscopie in infrarosu cu transformata Fourier, maparea in infrarosu si microscopie electronica cu scanare.

Scopul acestui studio a fost de a evalua comparativ activitatea citotoxica impotriva celulelor tumorale MCF7 si a liniilor celulare sanatoase VERO a nanoparticulelor de argint incarcate cu citostatice respectiv uleiuri esentiale, incorporate intr-o matrice biopolimerica biocompatibila optinuta prin metoda MAPLE, ce pot fi utilizate in aplicatii anti-tumorale. De asemenea, a fost testata si activitatea antibacteriana si antibiofilm a nanoacoperirilor obtinute impotriva unor tipuri reprezentative 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 citotoxica impotriva ambelor tipuri de celule – tumorale is normale, cele incarcate cu ulei esential 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 preparate 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 citostatice, 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 subt 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 observant in figura 10. Au fost masurate patru intensitati difractate in intervalul 20° – 80° . Modelele obtinute in urma difractiei de raze X confirma 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° , si 78.05° , ce corespund planurilor de difractie (1 1 1), (2 0 0), (2 2 0), si (3 1 1) specific nanoparticulelor de argint.

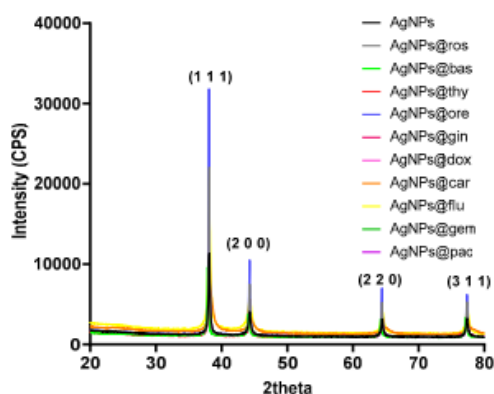


Figura 10: Modelul XRD al pulberii de nanoparticule de argint

Micrografiile SEM (Figura 11) arata dimensiunea nanometrica a nanoparticulelor de argint. Particulele au o forma cvasi-sferica, cu diameter ce variaza intre 20 si 60nm. De asemenea, poate fi observant 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.

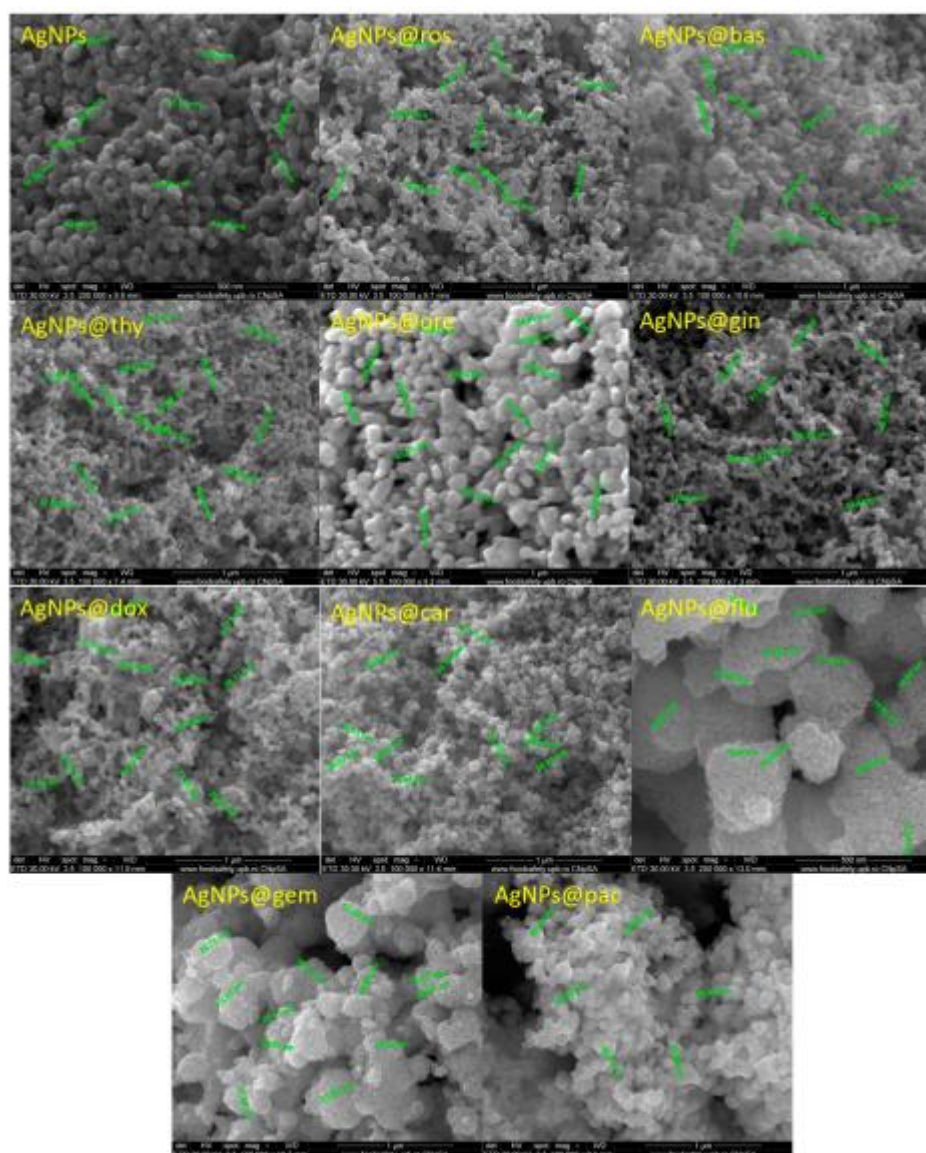


Figura 11: Nanoparticule de argint functionalizate cu diverse citostatice si uleiuri esentiale

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

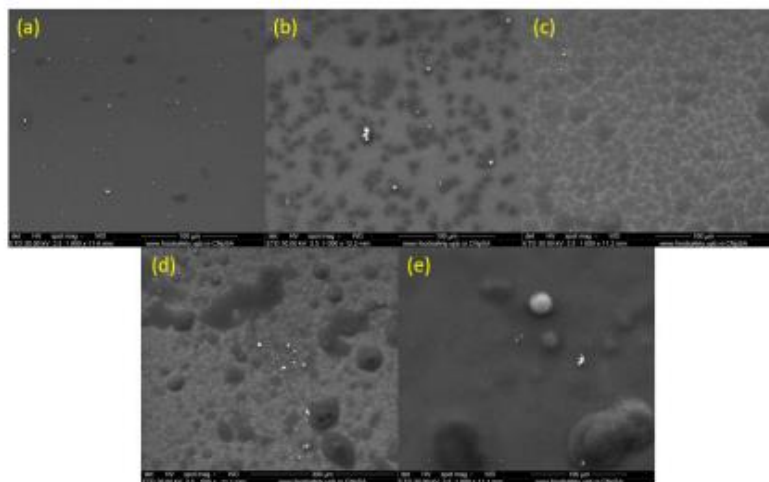


Figura 12: Imagini SEM ale acoperirilor PHBV/AgNPs la $1000\times$ (a–e), obtinute la fluente laser de (a) 200 mJ/cm^2 ; (b) 300 mJ/cm^2 ; (c) 400 mJ/cm^2 ; (d) 500 mJ/cm^2 ; si (e) 600 mJ/cm^2 .

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

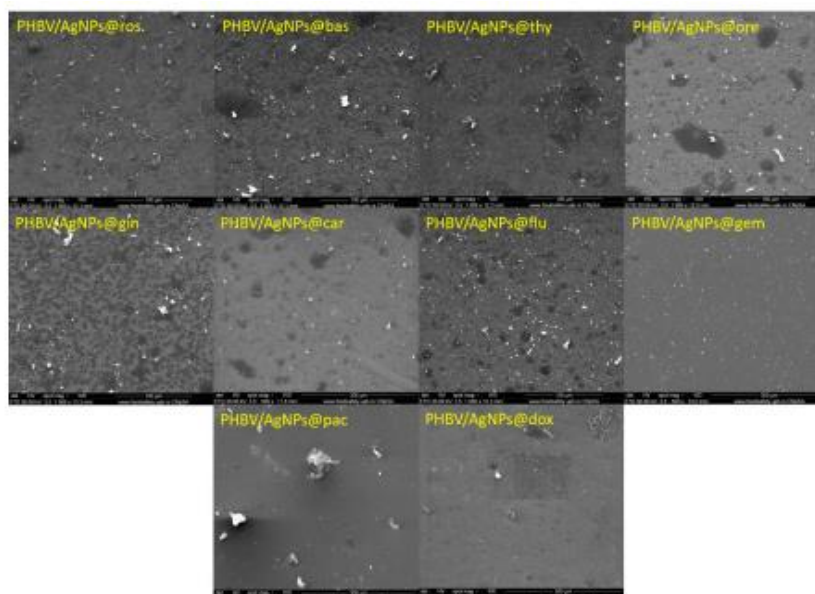


Figura 13: Imagini SEM ale acoperirilor ($500\text{--}1000\times$) obtinute la fluenta laser de 400 mJ/cm^2 .

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 netratata.

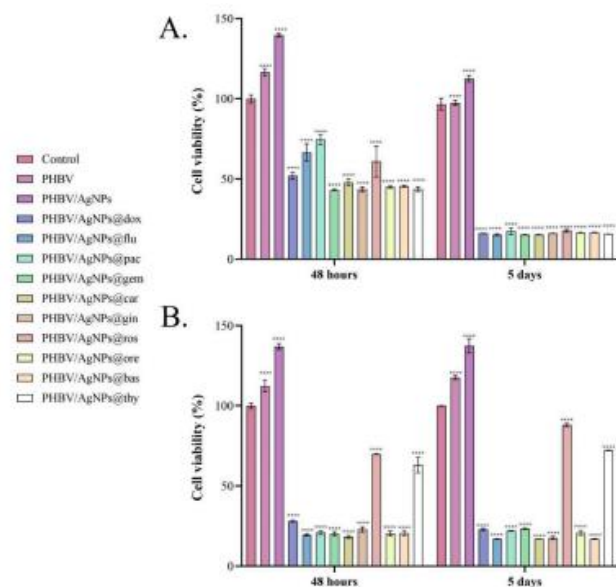


Figura 14: Reprezentare grafica a viabilitatii celulare a (A) celulelor tumorale MCF7 si (B) celulelor VERO dupa 48 h si 5 zile de contact cu probele neacoperite (control) si PHBV, PHBV ce contin citostatice si PHBV ce contin uleiuri esentiale

Profilele citotoxice aratate de testele LDG (figura 15) au confirmat rezultatele obtinute cu ajutorul testului MTT. Comparand nivelurile LDG in toate probele ce contin medicament, cele mai joase niveluri LDH, au fost observate in mediile de cultura corespunzatoare probelor ce contin fludarabine.

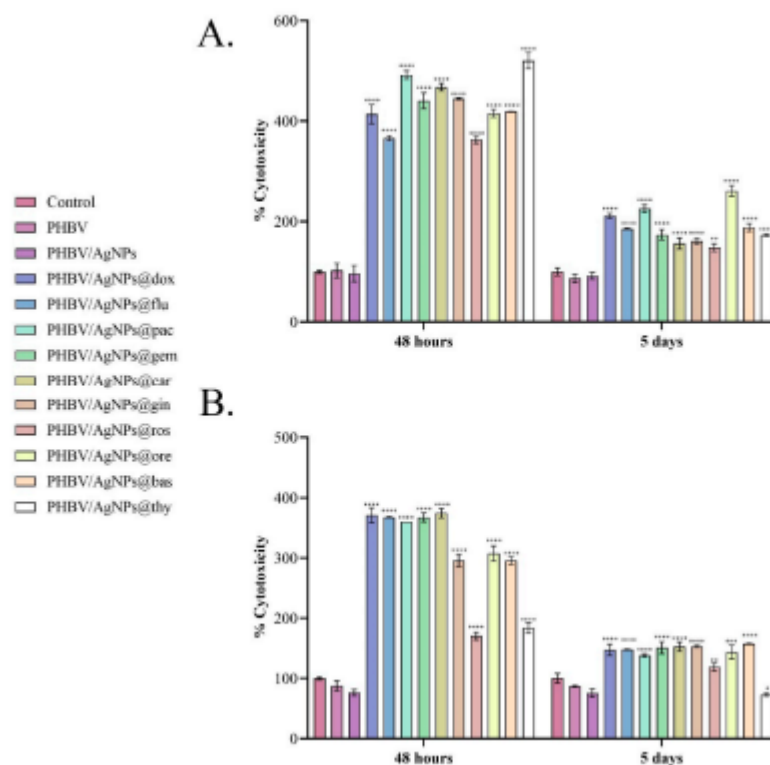


Figura 15. Reprezentarea grafica a proelor neacoperite (control) si PHBV, PHBV/AgNP, incarcate cu citostatice si uleiuri esentiale prezentate in urma testelor LDH, cuantificate in medii de cultura din (A) cellule tumorale MCF7 si (B) celule VERO dupa 48h si 5 zile

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 testele 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 experimentală. 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 fluorescena 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.

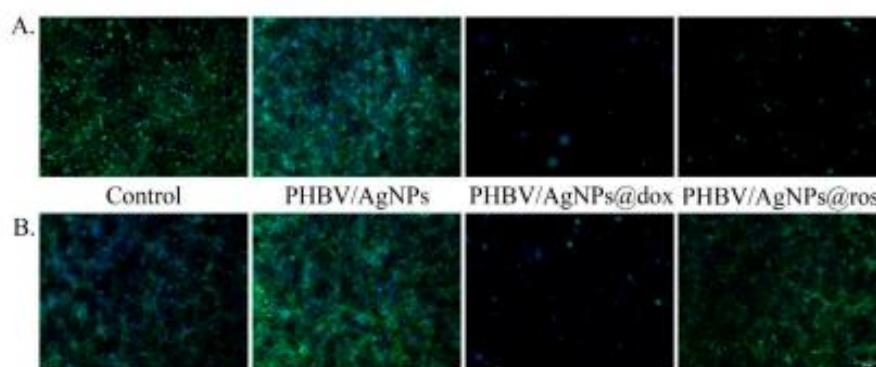


Figura. 16 Micrografii in fluorescent ace prezinta cutoskeletul (A) celulelor MCF7 si (B) l celulelor VERO cells dupa 5 zile de contact cu proba de referinta, PHBV/AgNPs, PHBV/AgNPs@dox, si PHBV/AgNPs@ros. Scale: 100 μ m (verde – filamentele de actina etichetate cu FITC-faloidina; albastru—nucleul celulelor 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 prezenta acoperirilor ce contin uleiuri esentiale 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 observant in Figura 18.

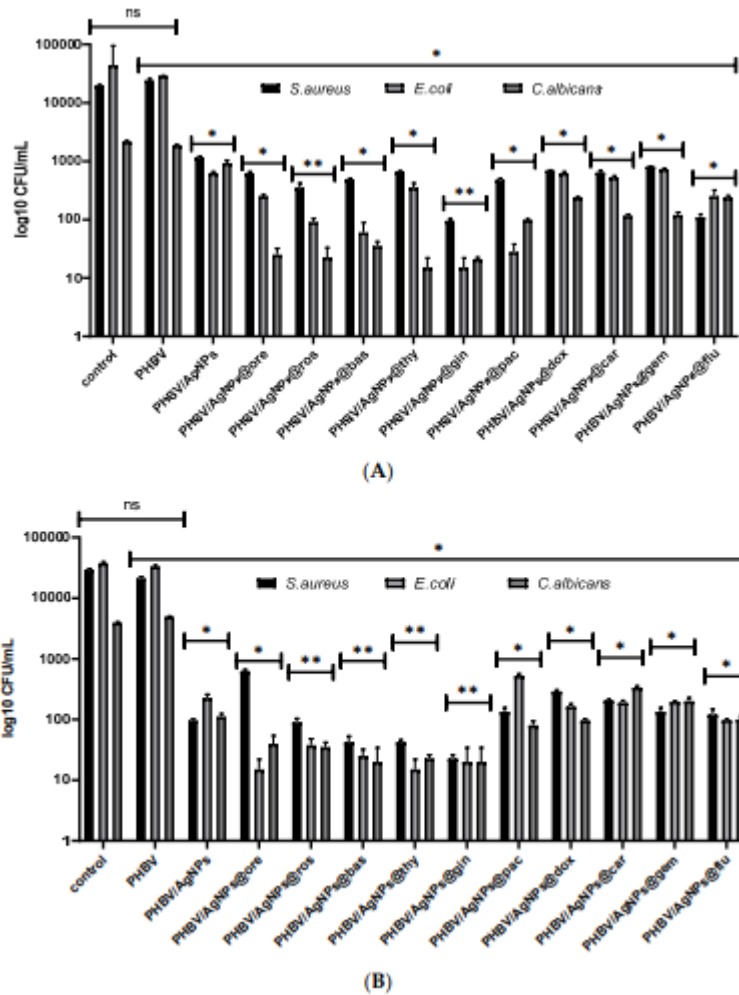


Figura 17.Reprezentare grafica a valorilor log₁₀ CFU/mL obtinute in cadrul testarii tulpinilor microbiene, exprimand viabilitatea bacteriei incubate ca suspensii de 0.5 in PBS pe acoperirile obtinute pentru 2 h (A) si 24 h (B). * p < 0.05; ** p < 0.001 comparand formarea biofilmului pe proba martor PHVB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

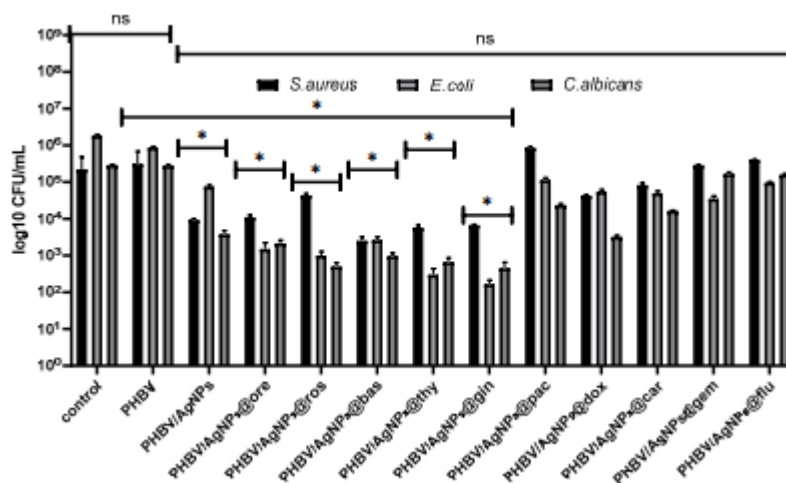


Figura 18. Reprezentare grafica a valorilor log₁₀ CFU/mL obtinute pentru tulpinile microbiene testate, exprimand biofilmul dezvoltat pe proba martor si nanoacoperirile de AgNPs la 24h de la incubare. * p < 0.05; comparand formarea biofilmului in cazul probei martor PHBV si a fiecarei acoperiri pe baza de nanoparticule de argint

Concluzii generale

Administrarea pncientilor 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 si posibila solutie a acestor alternative, au fost studiatii compusi naturali ca si agenti in tratamentul cancerului si au demonstrat a fi eficiente impotriva rezistentei la medicamente, avand si efecte farmacologice.

Studii recente au aratat ca uleiurile esentiale pot fi o solutie naturala terapeutica promitatoare, ce contine o mare varietate de compusi chimici, toate avand potential medical. Structurile chimice complexe ce se gasesc in uleiurile esentiale nu pot fi gasite in alti agenti naturali, oferind avantajul de a fi usor de gasit in natura, costul de productie este scazut, si de asemenea au potentialul de a putea fi produse la o scala larga [49]. Desigur, toate aceste avantaje vin si cu anumite puncta slabe, uleiurile esentiale fiind foarte volatile, slab solubi,e cu stabilitate scazuta s iuneori insuficiente pentru o tintire specifica.

Aceste limitary pot fi depasite cu ajutorul nanomedicinei, prin abordare nanotehnologica, oferind metode de incarcare pentru uleiuri esentiale pentru a imbunatatii tintirea specifica a celulelor de interes.

Nanopurtătorii inteligenți încărcăți 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 canceroase prin hipertermie.

SPIONs cu suprafața modificată cu β -CD și încărcate cu PTX, atât ca nanopulberi ca și filme subțiri obținute prin metoda MAPLE par a avea proprietăți corespunzătoare pentru a fi utilizați ca sisteme de transport a medicamentelor pentru zonele țintă tumorale. Fluentele laser optime au fost de 400mJ/cm^2 , filmele subțiri având cea mai ridicată integritate structurală. Nanocompozitele magnetice prezintă biocompatibilitate și citotoxicitate, așa cum au arătat și testele MTT realizate pe osteoblaste și celule de osteosarcom. Analizând filmele subțiri după ce au fost încărcate cu PTX, acestea au arătat o afinitate semnificativ crescută față de celulele canceroase.

Medicamentele citostatice disponibile în acest moment reprezintă o problemă majoră pentru organism, atacând atât celulele canceroase cât și pe cele sănătoase. Astfel, ca și soluție pentru a face față situației, au fost efectuate teste *in vitro* pe liniile celulare MCF7 și celulele sănătoase VERO pentru nanoacoperirile pe baza de nanoparticule încărcate cu medicamente citostatice (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 canceroase. Ca și confirmare a acestui rezultat, nanoparticulele de argint încărcate cu ulei esențial de rozmarin au fost testate cu ajutorul microscopiei cu fluorescență, 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 funcționalizate cu uleiuri esențiale având dimensiuni mai mari.

Cel mai mare potențial de a elimina viabilitatea celulelor MC7 l-au avut acoperirile care conțin gemcitabine, carboplatin și doxorubicina, în timp ce cele care conțin paclitaxel și fludarabine au prezentat un potențial mai scăzut, viabilitatea celulară fiind redusă cu 33% și respectiv 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 demonstrate de nanoparticulele de argint ce contin cimbru si ghimbir.

Ca si concluzie generala, a fost demonstrate ca, nanoacoperirile ce contin compusi naturali au prezentat activitati citotoxice similar cu medicamentele citostatice 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. Szychowski, 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. Batooh, *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.l.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).