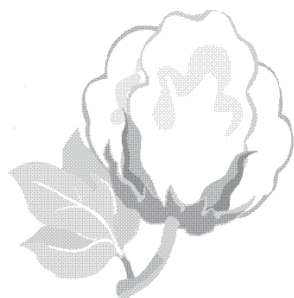


Universitatea „Babeș-Bolyai”, Facultatea de Fizică

&

Universitatea de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu”, Facultatea de Farmacie
Cluj-Napoca, România

**SISTEME NANOSTRUCTURATE CU POSIBILE
APLICAȚII CA AGENȚI DE CONTRAST ÎN
IMAGISTICA DE REZONANȚĂ MAGNETICĂ ȘI
CA TRANSPORTORI DE MEDICAMENTE**



Rezumatul tezei de doctorat

Violeta Corina Moraru (n. Hebrîștean)

Coordinatori științifici:
Prof. dr. Simion SIMON
Prof. dr. Felicia LOGHIN

Cluj-Napoca, 2015

CUPRINS

1. INTRODUCERE	1
2. SINTEZA ȘI CARACTERIZAREA EXTRACTULUI DIN SEMINȚE DE GOSSYPIUM HIRSUTUM NANO-ÎNCAPSULAT ÎN MICROPARTICULE SILICATICE	2
2.1. Obiective principale.....	2
2.2. Metode de sinteză și caracterizare	2
2.3. Rezultate și discuții.....	3
2.4. Concluzii.....	12
3. PARTICULE GADOLINO-SILICATICE ÎNCĂRCATE CU GOSIPOL PENTRU UN EFECT SIMULTAN TERAPEUTIC ȘI CA UN MAI BUN AGENT DE CONTRAST ÎN IRM	13
3.1. Obiective principale.....	13
3.2. Metode de sinteză și caracterizare	13
3.3. Rezultate și discuții.....	14
3.4. Concluzii.....	19
4. NANOPARTICULE GADOLINO-SILICATICE ÎNCĂRCATE CU GOSIPOL ACID ACETIC DUBLU-FUNCȚIONALE PENTRU COMPUȘI TERANOSTICI	20
4.1. Obiective principale.....	20
4.2. Metode de sinteză și caracterizare	20
4.3. Rezultate și discuții.....	21
4.4. Concluzii.....	27
5. LIPOZOMI TERANOSTICI PREPARAȚI CU COMPUȘI DE GADOLINIU ȘI GOSIPOL ACID ACETIC	28
5.1. Obiective principale.....	28
5.2. Metode de sinteză și caracterizare	28
5.3. Rezultate și discuții.....	29
5.4. Concluzii.....	34
6. CONCLUZII GENERALE	34
BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ	36
ANEXE	39
MULȚUMIRI	40

CUVINTE CHEIE: particule silicatic nanostructurate, lipozomi, teranostic, IRM, agenți de contrast, gadoliniu, cancer, gosipol, semințe de bumbac, transportul medicamentelor.

1. INTRODUCERE

În ultimele decenii, nanotehnologia a prezentat un impact semnificativ în terapia clinică. Progrese ale transportorilor nanostructurați de medicamente cum ar fi nanoparticulele silicaticice și lipozomii au permis distribuirea mai eficientă și mai sigură a medicamentelor. Aceste avantaje includ o farmacocinetică îmbunătățită și o reducere a efectelor adverse. În tratamentul cancerului, vascularizația tumorală mai permeabilă determină acumularea nanoparticulelor la nivelul țesutului tumoral, ca urmare a efectului vascular de retenție și de permeabilitate ridicat. Aceste beneficii au catalogat nanoparticulele ca buni candidați pentru înlocuirea chimioterapiei tradiționale, cu bune rezultate în limitarea efectelor secundare. Materialele nanostructurate sunt în mod particular potrivite aplicațiilor teranostice (terapie simultan cu diagnostic), deoarece pot încărca atât agenți de contrast pentru urmărirea distribuției medicamentului în organism cât și medicamente pentru intervenții terapeutice efective.

Acest studiu a fost realizat cu scopul de a aplica inovațiile din nanotehnologia materialelor în îmbunătățirea unor sisteme de cedare a medicamentelor, precum și de a obține sisteme teranostice, cu abilitate simultană de a trata și de a diagnostica.

Această teză de doctorat este împărțită în cinci capitole, incluzând prezenta introducere și concluziile generale. Capitolul 2 prezintă materialele silicaticice și lipozomii precum și subiecte referitoare la aplicațiile lor ca sisteme de transport a medicamentelor. Acest capitol continuă cu prezentarea unor aspecte referitoare la compușii propuși în această teză de a fi încărcați în materiale poroase silicaticice și lipozomi, mai specific *Gossypium hirsutum* (bumbac) și compuși de gadoliniu, împreună cu proprietățile lor terapeutice. Capitolul 3 prezintă aspecte teoretice ale principiilor de operare a dispozitivelor utilizate pentru acest studiu. Capitolul 4, care cuprinde patru subcapitole, prezintă rezultatele experimentale și discuții, organizate în articole științifice publicate sau pregătite pentru publicare. În Subcapitolul 4.1 se discută modul de încărcare a extractului din semințe de bumbac în matrice silicatică preparată prin metoda sol-gel și se evaluează noile sale proprietăți precum și efectul procesului de uscare asupra cedării compușilor din matrice. În Subcapitolul 4.2 este propus un sistem teranostic pilot, în care particule gadolino-silicaticice sunt preparate prin metoda sol-gel și încărcate cu gosipol, un compus polifenolic prezent în bumbac, iar caracteristicile acestor sisteme sunt evaluate pentru a fi folosite ca sisteme teranostice cu efecte anticanceroase datorate gosipolului și cu proprietăți de diagnostic datorate gadoliniului utilizat ca agent de contrast în imagistica de

rezonanță magnetică. În Subcapitolul 4.3 sistemul propus este similar cu cel discutat în Subcapitolul 4.2, dar cu unele avantaje: particulele prezintă mărimi nanometrice, sunt foarte poroase, capabile de a încărca o mai mare cantitate de gosipol și cu proprietăți relaxometrice potrivite pentru a fi utilizate ca agenți de contrast în imagistica de rezonanță magnetică. Capitolul 4.4 continuă cu un nou sistem care încapsulează compuși de gadolinu și gosipol: lipozomii. În final, Capitolul 5 prezintă concluziile generale, care recapitulează importanța studiului prezentat în această teză.

2. SINTEZA ȘI CARACTERIZAREA EXTRACTULUI DIN SEMINȚE DE *GOSSYPIUM HIRSUTUM* NANO-ÎNCAPSULAT ÎN MICROPARTICULE SILICATICE

2.1. Obiective principale

Nano-încapsularea compușilor farmaceutici naturali activi în sisteme poroase prin metoda sol-gel poate duce la obținerea de noi materiale cu cedare prelungită a produselor farmaceutice înglobate. Acest studiu prezintă proprietățile microparticulelor inorganice silicatică încărcate cu extract din semințe de bumbac (*Gossypium hirsutum*) și caracteristicile de cedare din matrice, în funcție de metoda de uscare folosită în sinteză: uscare prin încălzire și congelare/liofilizare. Studiul de cedare *in vitro* s-a realizat în două medii cu pH-uri diferite: pH 1.1 și 7.4, iar modele cinetice de cedare au fost aplicate pentru a evalua efectele procesului de uscare și a pH-ului mediului asupra modului de cedare a compușilor. Din cunoștințele noastre nu există studii asupra încapsulării extractului din semințe de *Gossypium hirsutum* în matrici silicatică.

2.2. Metode de sinteză și caracterizare

Extractul din semințe de *Gossypium hirsutum* s-a realizat în etanol, în condiții de întuneric, timp de 30 de zile. Acest extract a fost încărcat în matricea silicatică prin amestecarea sol-ului silicatic, preparat prin metoda sol-gel, cu extractul alcoolic din semințe de *Gossypium Hirsutum* (GH) în raport volumic de 1:2. Jumătate din gel-ul obținut după două săptămâni a fost uscat prin încălzire la 110 °C timp de 1 oră, iar cealaltă jumătate a fost uscată prin congelare/liofilizare. Pentru o bună comparație, ca și control, s-a sintetizat și silice pură, iar pentru o și mai bună evaluare, GH a fost înlocuit cu același volum de etanol 70°. Probele vor fi mai departe denumite SiO₂-HD (HD – uscare prin încălzire) și SiO₂-FD (FD – uscare prin liofilizare), iar probele încărcate cu GH vor fi denumite SiO₂-GH-HD și SiO₂-GH-FD.

GH a fost inițial caracterizat prin cromatografie de lichide de înaltă performanță (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) și spectroscopie în infraroșu cu transformată Fourier (Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FT-IR). Xerogelurile silicatică încărcate și neîncărcate, obținute după uscare prin încălzire și liofilizare au fost mai departe investigate prin FT-IR, difracție prin raze X (X-Ray Diffraction, XRD), difuzia dinamică a luminii (Dynamic Light Scattering, DLS), analiza termică diferențială/analiza termogravimetrică (Differential thermal analysis/Thermogravimetric analysis, DTA/TGA), spectroscopia de reflexie difuză în UV-Vis (UV-Vis Diffuse Reflectance Spectroscopy, UV-Vis DRS) și spectroscopie de fluorescență. Efectele procesului de uscare asupra particulelor silicatică și asupra extractului de plante au fost mai în detaliu investigate prin spectroscopia FT-IR.

Studiile de eliberare *in vitro* a extractului de plante s-a realizat la 37 °C în condiții de agitare, la pH 1.1 și 7.4. Absorbanța a fost măsurată cu ajutorul unui spectrofotometru UV-Vis, la o lungime de undă de 280 nm. Pentru a determina cantitatea de extract eliberată, s-a folosit o curbă de calibrare.

2.3. Rezultate și discuții

Caracterizarea extractului din semințe de Gossypium hirsutum

Prin utilizarea cromatografiei a fost posibilă fracționarea extractului fenolic din extractul din semințe de bumbac. Polifenolii eluați în mai puțin de 35 de minute sunt prezentați în Tabelul 1.

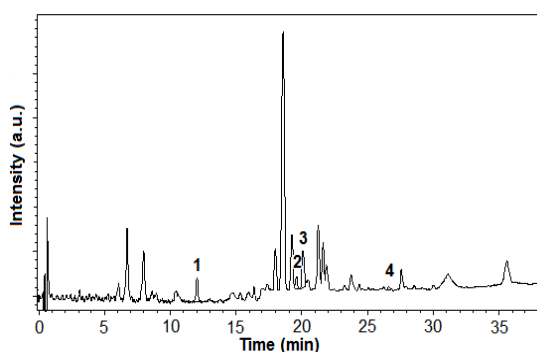


Figura 1. Cromatograma HPLC a polifenolilor identificați

Tabel 1. Principalele peak-uri din HPLC (cromatograma polifenolilor din extract de semințe de bumbac)

Nr.	Compus	Conc. (µg/ml)
	Acid caftaric	-
	Acid gentisic	-
	Acid cafeic	-
	Acid clorogenic	-
	Acid p-cumaric	-
1	Acid ferulic	0.810
2	Isoquercitrina	1.152
3	Rutozida	3.529
4	Quercetolul	0.179

Conform literaturii, polifenolii identificați în frunzele de bumbac sunt acidul galic, cafeic, siringic, clorogenic, ferulic, vanilic, cinamic, p-cumaric, salicilic, galfic, gentisic, protocatecuic, benzoic, p-hidroxibenzoic și sinapic împreună cu catechine și flavonoide (glicozida de izoquercitrin, rutozid și kempferol-3-rutinozid) [1-3]. În extractul de semințe de bumbac, din prezentul studiu, s-au identificat acidul caftaric, gentisic, cafeic, clorogenic, p-cumaric și ferulic împreună cu flavonoide (izoquercitrin, rutozid și cvercetolul) care a fost grupul predominant, cu rutozid (peak-ul nr. 3) componentul major dintre polifenolii identificați (Figura 1 și Tabel 1).

Spectrul de absorbție FT-IR al extractului GH neîncapsulat (Figura 2) prezintă benzi vibraționale care pot fi grupate, mai mult sau mai puțin, conform compușilor constituenți (Tabel 2) [4-7].

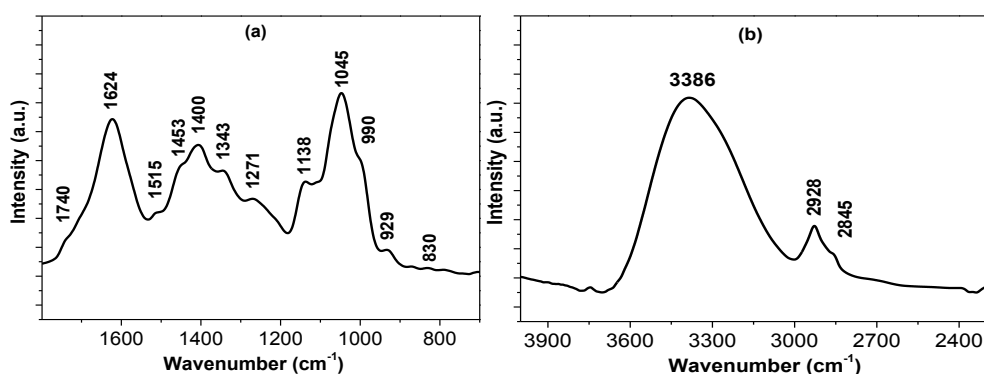


Figura 2. Spectrul FT-IR al GH-ului neîncapsulat pe intervalul (a) 700-1800 cm^{-1} și (b) 2300-4000 cm^{-1}

Toate aceste benzi specifice indică prezența aminoacizilor, carbohidraților, amidelor, aminelor, aldehydelor, chetonelor, esterilor, gliceridelor, alcoolilor, fenolilor, izoprenoidelor și a altor compuși care au în structură grupele funcționale identificate.

Tabel 2. Atribuirea benzilor de absorbție FT-IR

Număr de undă (cm^{-1})	Tipul vibrației	Compuși
<1000 cm^{-1}	Deformare C-H	izoprenoide
997-1130 cm^{-1}	Întindere C-O	mono-,oligo-carbohidrați
1045 cm^{-1}		celuloză și hemiceluloză
1150-1270 cm^{-1}	Întindere carbonil C-O Deformare O-H	
1300-1450 cm^{-1}	Întindere C-O Întindere C-C	amide grupări fenil
1500-1600 cm^{-1}	Domeniu aromatic Deformare N-H	compuși aromatici amine
1600-1760 cm^{-1}	Deformare N-H	aminoacizi

1740 cm ⁻¹	Întindere C=O	aldehide, chetone, esteri
	Întindere C=C	fenoli totali
2800-2930 cm ⁻¹	Întindere C-H (CH ₃ și CH ₂)	metoxi derivați
	C-H incluzând duble legături <i>cis</i>	din aldehide, lipide
3350-3600 cm ⁻¹	Întindere OH	apă, alcooli, fenoli, carbohidrați, peroxizi, proteine, acizi grași, lignină
3413 cm ⁻¹		celuloză și hemiceluloză
3650 cm ⁻¹	Întindere NH	amide

Deoarece metoda de uscare poate determina schimbări în structura chimică a compușilor farmaceutici activi din extractul de semințe de bumbac, s-a considerat necesar investigarea acestui lucru prin spectroscopia FT-IR.

Banda de absorbție din jurul valorii de 1624 cm⁻¹, pentru GH uscat prin liofilizare (vibrații de întindere C=O și C=C) scade, sugerând faptul că grupările chetonice și legăturile duble nesaturate reacționează chimic. Este posibil ca inelul-B din flavonoide să sufere modificări, deoarece nici o bandă specifică nu a fost observată în jurul valorii de 1557 cm⁻¹. Scăderea benzii de la 1343 cm⁻¹ a GH-ului uscat prin liofilizare indică reacția grupărilor dihidroxilice adiacente din inelul-B al flavonoidelor [8] (Figura 3a).

Banda de absorbție din jurul valorii de 1045 cm⁻¹ înregistrată pentru GH uscat la 37°C, este deplasat spre valori mai mari (în jur de 1085 cm⁻¹), în cazul GH uscat prin încălzire. Această bandă este caracteristică vibrațiilor de întindere C-O din mono-și oligo-carbohidrați și dovedește schimbări în compoziția chimică a carbohidraților. Intensitatea benzilor dintre 700 și 950 cm⁻¹ crește de asemenea, demonstrând schimbări în structura chimică a izoprenoidelor.

Spectrul FT-IR al GH-ului uscat prin încălzire cât și prin liofilizare prezintă schimbări și în cazul benzii largi din jurul valorii de 3400 cm⁻¹ (Figura 3b) corespunzătoare vibrațiilor de întindere a grupării O-H din alcooli (3600-3300 cm⁻¹) și din acizi carboxilici (3300-2500 cm⁻¹) prezenți în carbohidrați. Umărul care apare în jurul valorii de 3200 cm⁻¹ în spectrul extractului uscat prin încălzire poate indica o creștere a acizilor carboxilici formați datorită oxidării primare a OH și/sau hidrolizării grupărilor acetyl din carbohidrați.

Toate aceste efecte legate de condițiile de uscare ale compușilor investigați poate influența compoziția GH-ului și este dificil de a anticipa modul în care vor fi afectate și proprietățile lor terapeutice

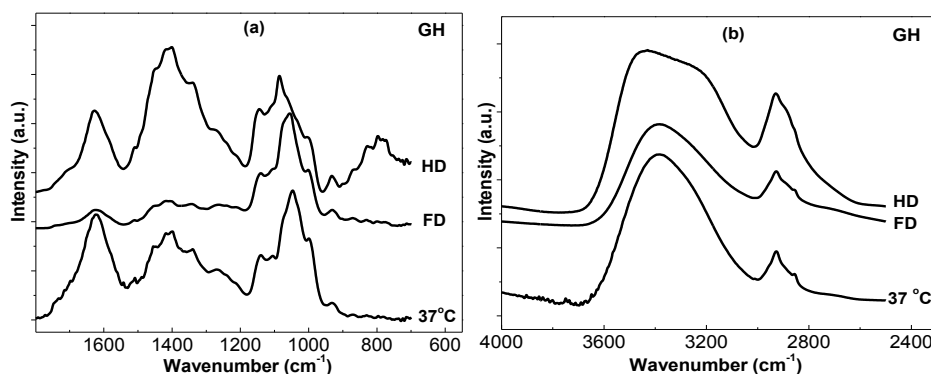


Figura 3. Spectrul FT-IR al GH-ului neîncapsulat uscat prin încălzire (HD), uscat prin liofilizare (FD) și uscat la 37 °C pe intervalul (a) 700-1800 cm^{-1} și (b) 2500-4000 cm^{-1}

Caracterizarea Gossypium hirsutum încărcat în silica

Difractograma XRD ale probelor silicaticice (Figura 4) indică o stare amorfă, chiar și după încărcarea cu GH, particulele silicaticice amorse fiind considerate mai puțin toxice decât cele cristaline [9, 10].

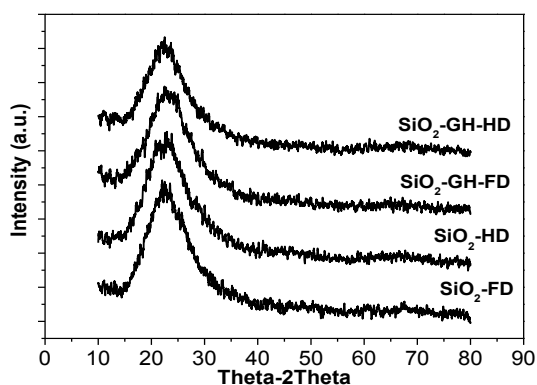


Figura 4. Difractograma XRD ale probelor investigate

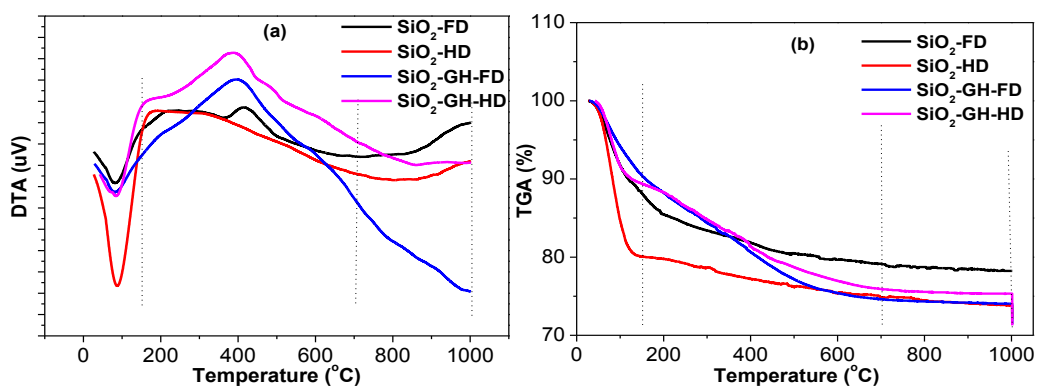
Rezultatele analizei DLS arată că particulele neîncărcate prezintă dimensiuni medii mai mari decât cele încărcate, datorită unei contractări mai intense a matricei și astfel o rezistență mai mare la mojarare în lipsa GH-ului, în principal cauzată de creșterea timpului de gelare a sol-ului în lipsa GH-ului (Tabel 3). Ținând cont de faptul că nano-încapsularea compușilor farmaceutici naturali activi presupune încărcarea de particule cu dimensiuni între 1 și 1000 nm [11], dimensiunea particulelor (Tabel 3) sugerează faptul că GH este nano-încapsulat în microparticulele silicaticice (nano în micro). O încărcare electrică ușor mai negativă este observată pentru probele $\text{SiO}_2\text{-FD}$, comparativ cu probele $\text{SiO}_2\text{-HD}$ (Tabel 3), deoarece uscarea prin liofilizare duce la obținerea unor particule silicaticice mai hidroxilate ca o consecință a predominării reacției de hidroliză față de reacția de condensare. Particule silicaticice mai hidroxilate determină o densitate mai mare a grupărilor Si-O^- în medii cu pH neutru spre basic. Densitatea sarcinilor negative de la suprafața

particulelor silicaticice este mai mare în probele pure, comparativ cu probele silicaticice care încorporează GH, ceea ce poate demonstra încărcarea cu GH, deoarece o parte din grupările silanolicice se leagă prin legături de hidrogen de compușii organici din GH. Diferența între valorile potențialului zeta dintre probele încărcate și neîncărcate este mai mică pentru particulele SiO₂-FD comparativ cu particulele SiO₂-HD, datorită unei legări mai scăzute a grupărilor silanolicice de compușii organici din GH, în timpul procesului de uscare prin liofilizare, sau datorită altor reacții chimice greu de identificat, care pot duce la formarea de noi compuși.

Tabel 3. Valorile dimensiunilor medii și a potențialului zeta a particulelor sintetizate

	SiO ₂ -HD	SiO ₂ -GH-HD	SiO ₂ -F□	SiO ₂ -GH-FD
Dimensiune medie (μm)	1,2	1	1,1	1
Potențialul zeta (mV)	-32.7	-12.3	-37.6	-20.7

În curbele DTA (Figura 5) se poate observa un eveniment endotermic în jurul temperaturii de 90-100°C, corespunzător eliminării apei de la suprafață și a solvenților utilizați în sinteză, însoțită de o pierdere drastică de masă de aprox. 10-20%. În probele pure, a doua cădere de masă, la peste 100°C corespunde eliberării apei rămase în pori, descompunerii precursorilor reziduali, dehidroxilării datorită condensării grupărilor OH din particulele silicaticice și datorită condensării grupărilor silanolicice la siloxani. Numărul grupărilor hidroxilice de pe particulele silicaticice, n_{OH} , poate fi determinat prin termogravimetrie [12]. Rezultatele obținute sunt: 10.55 și 6.88 mM/g SiO₂ pentru SiO₂-FD și respectiv SiO₂-HD, demonstrând că probele SiO₂-FD sunt mai hidroxilate în comparație cu SiO₂-HD, confirmându-se astfel rezultatele obținute prin analiza DLS (potențialul zeta). Evenimentul exotermic de la 440°C în SiO₂-FD se datorează probabil restructurării matricei printr-un proces incipient de cristalizare. Pentru probele cu GH, descompunerea compușilor organici începe pe la 150°C și corespunde evenimentelor endoterme observate între 150°C și 650°C. În acest interval de temperatură, comparând curbele TGA ale probelor pure cu cele încărcate se poate observa că pierderea de masă totală pentru probele cu extract de plante este mai mare decât pentru probele pure, demonstrându-se astfel încorporarea compușilor organici în interiorul matricei silicaticice (Tabel 4).



Tabel 4. Pierderea de masă procentuală (analiza TGA) pentru probele investigate

Temperatura → Proba ↓	20-150°C	150-650°C	650-1000°C
SiO ₂ -FD	12%	8.3%	1.2%
SiO ₂ -GH-FD	9.8%	15.□%	0.9%
SiO ₂ -HD	19.9%	4.8%	1.4%
SiO ₂ -GH-HD	10.6%	12.9%	1%

Majoritatea benzilor de absorbție identificate în spectrul FT-IR sunt specifice matricei silicatică (Figura 6).

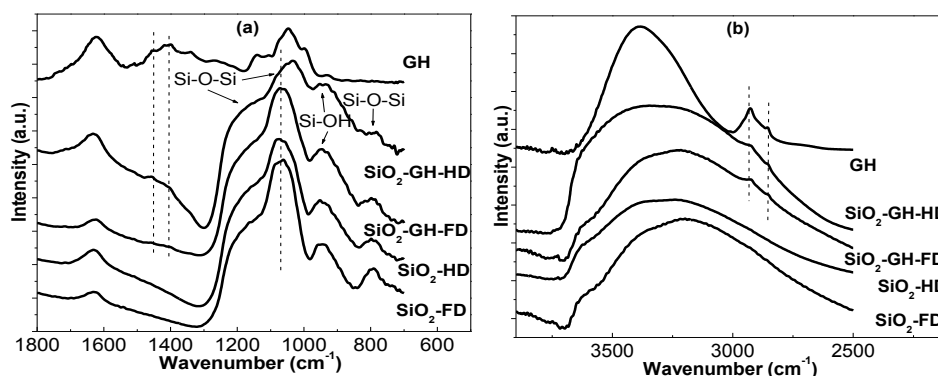


Figura 6. Spectrul FT-IR al probelor investigate între (a) 700-1800 cm⁻¹ și (b) 2500-4000 cm⁻¹

Matricea silicatică cu GH determină modificări minore a spectrului FT-IR. Apar benzi specifice la 2928, 2845, 1453 și 1400 cm⁻¹ caracteristice GH-ului. Mai mult, prezența legăturilor de hidrogen multiple, evidențiate prin benzile de absorbție de la 3450 cm⁻¹ (Figura 6), confirmă de asemenea încapsularea GH în microparticulele silicatică [13]. Banda caracteristică GH de la 1045 și 990 cm⁻¹ este mai evidențiată în SiO₂-HD decât în SiO₂-FD, datorită faptului că în timpul uscării prin încălzire are loc o contractare mai puternică a matricei silicatică, determinând o mai mare cantitate de GH pe unitatea de volum silicatic în comparație cu proba SiO₂-GH-FD.

Analiza prin spectroscopia UV-Vis (Figura 7) prezintă o bandă largă în jurul valorii de 560 nm care apare în probele cu conținut de GH. Această bandă poate fi asociată prezenței grupărilor aromatice care conțin cromofori a unor legături OH multiple originare din polifenoli [13], unor compuși organometalici care pot fi de asemenea prezenți în extract și a căror electroni “d” pot fi excitați dintr-o stare electronică în alta sau ca o consecință a formării de noi compuși. Această bandă este mai bine evidențiată pentru SiO₂-GH-HD decât pentru SiO₂-GH-FD, deoarece temperatura de uscare mai ridicată și pe perioade mai îndelungate, împreună cu contractarea matricei silicatică promovează formarea grupărilor cromofore.

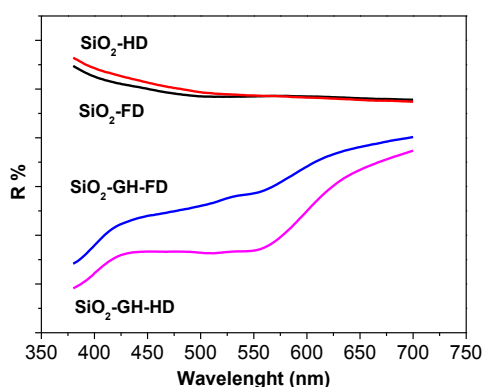


Figura 7. Spectrul UV-Vis DRS al probelor investigate

Spectrul de fluorescență tipic al GH se poate observa în intervalul 350 - 500 nm cu două maxime localizate la aproximativ 420 și 460 nm (inset la Figura 8a,b). Această fluorescență este cauzată de stratul de pigment exterior al învelișului seminței de bumbac care conține polifenoli, cum ar fi antociani sau compuși roanthocianidinici [14] sau datorită altor compuși.

Particulele silicaticice pure (SiO₂-HD și SiO₂-FD) excitate la 260 nm prezintă o bandă de emisie de fluorescență neașteptată la 300 nm (Figura 8a) care se poate observa parțial și la o excitare la 300 nm (Figure 8b). Studii anterioare pe materiale silicaticice au sugerat faptul că fluorescența în intervalul UV-B este asociată cu specii de silice cu dimensiuni nanometrice, pasivate cu hidrogen [15]. Această nanoparticularizare pare a fi mai pronunțată pentru probele uscate prin liofilizare.

Emisia de fluorescență din jurul valorii de 300 nm scade după încărcarea particulelor silicaticice cu GH, în timp ce fluorescența centrată în jurul valorii de 440 nm, specifică GH, este mult amplificată după ce extractul de plantă este încărcat în matricea silicatică, probabil prin evitarea auto-stingerii datorate distribuției omogene a GH-ului în matricea silicatică [13]. Scăderea fluorescenței înregistrată pentru particulele silicaticice

neîncărcate se poate datora unor interacțiuni moleculare cum ar fi reacții în stare excitată, rearanjări moleculare, transfer de energie, formarea de complecși în stare inferioară de energie sau inactivare datorată coliziunilor [16].

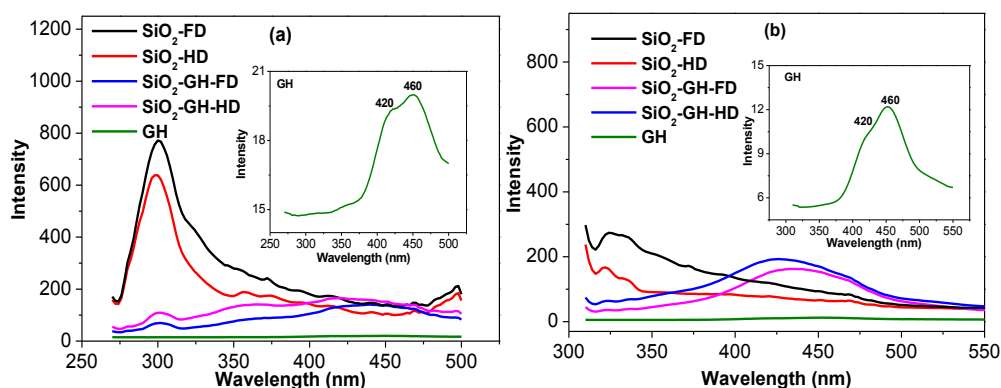


Figura 8. Spectrul de fluorescență ale probelor investigate, excitate la diferite lungimi de undă: 260 nm (a) și 300 nm (b)

Profilele de cedare a GH-ului din SiO₂-GH-FD și SiO₂-GH-HD (Figura 9a) la pH 1.1 și la pH 7.4 prezintă o cedare bruscă inițială în primele 4 ore (Figura 9b), urmată de o eliberare mai lentă pentru următoarele 140 de ore, astfel încât în ambele cazuri cinetica de eliberare este bifazică.

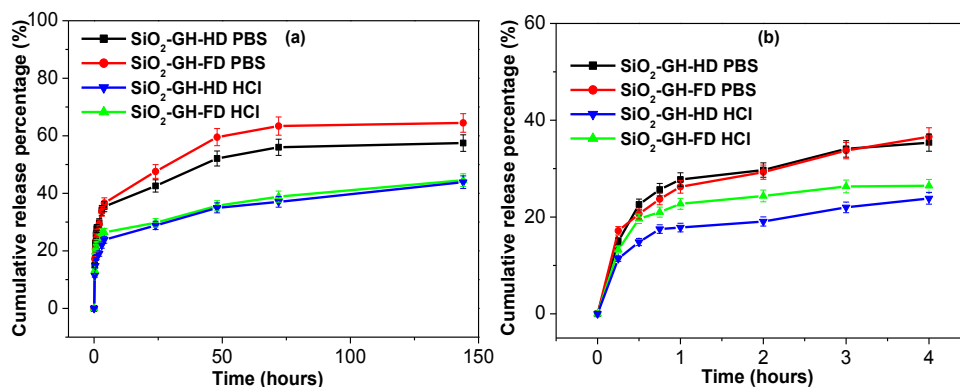


Figura 9. Profilul de cedare *in vitro* a GH-ului din probele preparate, în medii cu pH-uri diferite pentru întregul interval de timp (a) și pentru primele 4 ore (b)

Eliberarea este mai lentă pentru particulele SiO₂-GH-HD decât pentru particulele SiO₂-GH-FD, datorită faptului că în timpul uscării prin încălzire are loc o contractare mai intensă a matricei silicatică comparativ cu uscarea prin liofilizare [17]. Pe lângă o eliberare mai lentă, aceasta presupune și o legare mai puternică a compușilor GH în interiorul matricei silicatică, fapt de asemenea dovedit de măsurătorile DLS (potențial zeta) și DTA/TGA, printr-o scădere a grupărilor Si-OH în probele uscate prin încălzire. O eliberare mai puternică la pH 7.4 se poate datora interacțiunilor electrostatice de respingere dintre

unii compușii din GH și matricea silicatică [18, 19], deoarece potențialul zeta de la suprafața particulelor silicaticice se schimbă când grupările silanolice de la suprafață sunt protonate sau deprotonate în funcție de pH-ul soluției în care sunt suspendate.

Cedarea *in vitro* a fost analizată utilizând diferite modele cinetice pentru a înțelege mecanismul eliberării compușilor activi (Tabel 5). Conform ecuației Korsmeyer-Peppas (reprezentat grafic ca logaritmul din procentul cumulativ al compușilor eliberați față de logaritmul din timp), valorile pantei (valoarea n) este cuprinsă între 0.16 și 0.27 ($n < 0.45$) și subliniază faptul că eliberarea compușilor urmează o difuzie quasi-Fickiană foarte încetă, utilă în formularea peletelor și a învelișurilor pentru eliberare controlată [19, 20].

Tabel 5. Constantele de eliberare cinetică a GH-ului din matricea silicatică

Proba	Cinetica de ordinul zero (R^2)		Cinetica de ordinul I (R^2)		Modelul Higuchi (R^2)		Modelul Korsmeyer-Peppas			
							(R^2)		Valoarea n	
	4 ore	140 ore	4 ore	140 ore	4 ore	140 ore	4 ore	140 ore	4 ore	140 ore
SiO₂-FD PBS	0.931	0.596	0.948	0.628	0.981	0.717	0.991	0.817	0.267	0.168
SiO₂-HD PBS	0.791	0.654	0.825	0.636	0.887	0.770	0.909	0.859	0.279	0.168
SiO₂-FD HCl	0.689	0.922	0.712	0.942	0.810	0.976	0.862	0.993	0.223	0.224
SiO₂-HD HCl	0.862	0.942	0.877	0.958	0.927	0.982	0.947	0.991	0.240	0.229

Trebuie să subliniem faptul că procesul de cedare precum și extractul de bumbac este unul foarte complex. Structura chimică a GH-ului neîncapsulat a fost caracterizat prin FT-IR în funcție de temperatura de uscare, observându-se modificări în structura flavonoidelor, izoprenoidelor și a carbohidraților (Figura 3). Am considerat important să verificăm dacă modificări similare au loc și în timpul uscării în interiorul matricei silicaticice, dar din spectrul FT-IR al probelor silicaticice încărcate cu GH, se pot observa în principal doar benzile de absorbție caracteristice matricei silicaticice (Figura 6). De aceea am decis să investigăm prin spectroscopia FT-IR, structura GH-ului cedat în apă din particulele SiO₂-GH-FD și SiO₂-GH-HD, pentru a vedea dacă au loc schimbări structurale în compoziția GH-ului nano-încapsulat în silica și după tratamentul termic (Figura 10). Probele au fost inițial uscate și apoi analizate prin FT-IR.

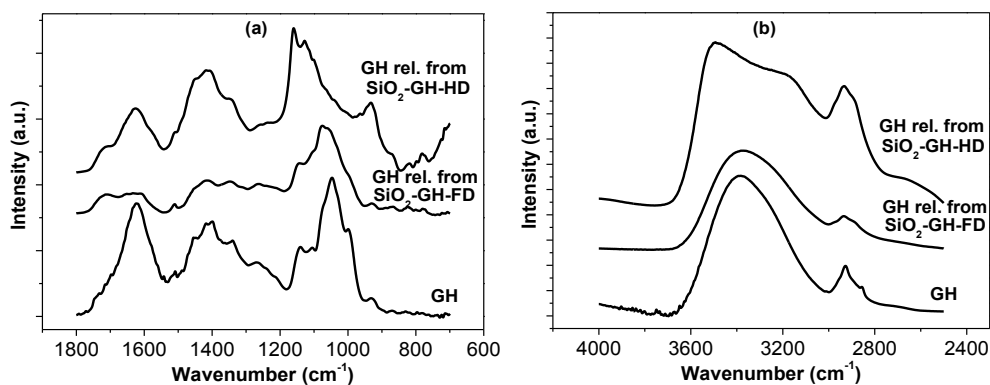


Figura 10. Spectrul FT-IR al GH-ului cedat în apă din SiO₂-GH-FD și SiO₂-GH-HD (uscate) între (a) 700-1800 cm⁻¹ și (b) 2500-4000 cm⁻¹

Principalele diferențe dintre GH-ul eliberat din matricile silicatică tratate termic diferit (Figura 10) apar între 700 și 1800 cm⁻¹. În spectrul GH eliberat din particulele uscate prin liofilizare, se poate observa o scădere a absorbției de la 990 cm⁻¹, aceasta demonstrând schimbări în compoziția chimică a carbohidraților, precum și apariția unei noi benzi la aprox. 1720 cm⁻¹ indicând o saturare a chetonelor/aldehidelor, rezultând chetone/aldehide alifatică. Uscarea prin încălzire și prin liofilizare duce la diferite modificări spectrale pentru GH-ul cedat din matricea silicatică comparativ cu GH-ul neînglobat. Aceste schimbări sunt evidențiate prin vibrațiile de întindere ale C-O din carbohidrați și prin vibrațiile de deformare ale C-H din izoprenoide. Aceasta indică faptul că încapsularea influențează compușii organici captați în interior, însă este dificil de a prezice cum vor fi afectate proprietățile lor terapeutice.

2.4. Concluzii

GH a fost nano-încapsulat cu succes în microparticule silicatică cu un diametru mediu de aproximativ 1 μm, cu ajutorul metodei sol-gel, folosind uscarea prin încălzire și prin liofilizare. Nanoparticularea materialului silicatic a fost evidențiată de rezultatele obținute prin fluorescență, mai ales în cazul probelor uscate prin liofilizare. Evidența încapsulării extractului de plante precum și informații structurale au fost obținute prin TG/DTA, FT-IR, UV-Vis-DRS și spectroscopie de fluorescență. Procesul de uscare influențează atât microparticulele gazdă silicatică cât și extractul de plante. Structura amorfă a sistemului testat, împreună cu proprietățile sale de fluorescență crescute poate duce la viitoare aplicații biomedicale ca markeri fluorescenți pentru celule, mai ales dacă sistemul va fi configurat la dimensiuni nanometrice și/sau funcționalizat cu liganzi specifici. Profilele de cedare ale extractului de plantă au prezentat un caracter bifazic cu o cedare mai prelungită pentru probele uscate prin încălzire comparativ cu cele uscate prin

liofilizare. Cantitatea eliberată a fost mai mare în experimentul realizat în mediu cu pH 7.4 comparativ cu cel care a folosit un mediu cu pH 1.1, indiferent de modul de uscare aplicat în preparare. Aceste rezultate subliniază ideea că particulele silicatică nano-încapsulate cu extract de semințe de *Gossypium hirsutum* pot fi astfel utilizate pentru aplicații în microscopia de fluorescență sau tratamente cu cedare prelungită, ținând cont de posibilele sale proprietăți terapeutice.

3. PARTICULE GADOLINO-SILICATICE ÎNCĂRCATE CU GOSIPOL PENTRU UN EFECT SIMULTAN TERAPEUTIC ȘI CA UN MAI BUN AGENT DE CONTRAST ÎN IRM

3.1. Obiective principale

Încorporarea gosipolului, un compus polifenolic cu un spectru larg de proprietăți terapeutice, într-o matrice poroasă gadolino-silicatică a fost considerată, atât pentru un efect terapeutic cât și ca agent de contrast în imagistica de rezonanță magnetică. Scopul acestui studiu a fost de a evalua încărcarea gosipolului în microparticule gadolino-silicatică preparate la două valori diferite ale pH-ului, ca prim pas în crearea de noi compuși teranostici (terapie și diagnostic).

3.2. Metode de sinteză și caracterizare

Sistemul $98\text{SiO}_2 \cdot 2\text{Gd}_2\text{O}_3$ (mol %) a fost preparat prin metoda sol-gel la două valori diferite ale pH-ului (2 și 5.5). Gelurile umede au fost introduse în criotuburi, înghețate în azot lichid pentru 20 min (FD) și lăsate să se topească la temperatura camerei. Gelurile umede au fost apoi uscate la 110 °C, timp de o oră și mojarate, obținându-se o pudră fină, urmând apoi a fi tratate termic la 500°C, în aer pentru 30 min. Pentru încărcarea cu gosipol, 100 mg din fiecare probă de particule gadolino-silicatică au fost imersate în 2 ml acetonă, care conține 4 mg de gosipol (Gos, $\text{C}_{30}\text{H}_{30}\text{O}_8$, Sigma Aldrich). Amestecul a fost ținut la 4°C pentru 48 de ore, iar supernatantul a fost eliminat prin centrifugare. Particulele rămase (notate FD2-GOS și FD5.5-GOS) au fost uscate la 37 °C. Structura particulelor și încărcarea lor cu gosipol a fost investigată prin XRD, DLS, analiza suprafeței specifice și a volumului de pori prin metoda Brunauer-Emmett-Teller (BET)/Barrett-Joyner-Halenda (BJH), DTA/TGA, FT-IR, rezonanța paramagnetică electronică (Electron Paramagnetic Resonance, EPR) și spectroscopie fotoelectronică de raze X (X-Ray Photoelectron Spectroscopy, XPS). Potențialele aplicații în imagistica de rezonanță magnetică (IRM) a particulelor gadolino-silicatică încărcate cu gosipol au fost testate prin măsuratori IRM.

3.3. Rezultate și discuții

Difractograma XRD (Figura 11) înregistrată înainte și după încărcarea cu gosipol indică o structură prevalent amorfă în toate probele. Se dorește a avea faze amorfă deoarece particulele silicatică amorfă sunt considerate mai puțin toxice decât cele cristaline [9] și, pe de altă parte, medicamentele amorfă prezintă o solubilitate de saturație mai mare decât cele cristaline [21].

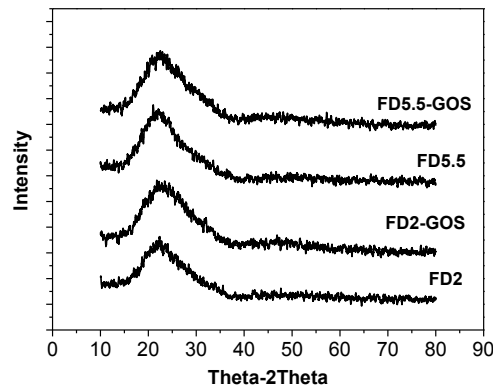


Figura 11. Difractogramele XRD ale probelor investigate

Măsurătorile DLS arată că dimensiunea medie a particulelor este cuprinsă între 0.90 μm și 1.05 μm . Procesul de încărcare afectează ușor dimensiunea medie a particulelor. După încărcarea cu gosipol, probele preparate la pH 2 prezintă o creștere ușor mai mare, comparativ cu probele preparate la pH 5.5 ceea ce poate indica o mai mare încărcare a Gos pe probele preparate la un pH mai scăzut. Valorile potențialului zeta pentru probele încărcate cu Gos sunt în afara intervalului ± 30 mV, indicând posibilitatea de a se evita agregarea particulelor, fiind astfel stabile în suspensii. Deoarece Gos prezintă sarcină negativă la pH neutru [22, 23], încărcarea particulelor cu Gos duce la creșterea valorii negative a încărcării electrice de la suprafață. Acest proces se poate mai bine evidenția pentru probele FD2 și sugerează o încărcare mai mare decât pe probele FD5.5. Gos poate fi fizic adsorbit, dar și legat chimic de matricea gadolino-silicatică [24].

Analiza prin metoda BET arată că atât suprafața specifică cât și volumul porilor scade după încărcarea cu Gos. Această scădere este mai pronunțată pentru probele FD2 în acord cu rezultatele obținute prin măsurătorile DLS și poate sublinia presupunerea că o cantitate mai mare de Gos este încărcată pe probele preparate la un pH mai scăzut.

Curba termică a Gos (inset Figura 12b) indică o reacție endotermică în jurul temperaturii de 180°C și o scădere de masă de aprox. 5,8 %, care se poate datora procesului de topire cu descompunere parțială, temperatura de topire a Gos fiind de 180-214°C [25], urmată de o reacție exotermică bine evidențiată între 450-600°C, cu pierdere

de masă de aprox. 63%, corespunzătoare descompunerii Gos în gaze ca CO₂ și/sau CO și H₂O, ca urmare a combustiei.

Curbele DTA pentru probele FD2 și FD5.5 prezintă două mari regiuni de evenimente termice și corespunde celor două regiuni principale de pierdere de masă din curbele TGA (Figura 12). Pierderea de masă dinaintea de 200°C, cu un eveniment endotermic în DTA, poate fi asociată cu îndepărtarea moleculelor de apă adsorbite la suprafață precum și a etanolului sau a acetonei rămase din sinteză. O parte din pierderea de masă din jurul temperaturii de 180°C, pentru probele FD2-Gos și FD5.5-Gos se datorează descompunerii parțiale a Gos în timpul topirii. Următoarele pierderi de masă corespund dehidroxilării matricei silicatică și descompunerii Gos. Trebuie subliniat faptul că includerea Gos în porii particulelor silicatică îi poate îmbunătăți stabilitatea termică așa cum se întâmplă în cazul incluziei Gos în β-cyclodextrine [26]. Diferența procentului de pierdere de masă dintre probele încărcate și neîncărcate în intervalul de temperatură 20-800°C este de 3.1% și 2.8% pentru FD2 și respectiv FD5.5, ceea ce corespunde cu încărcarea a 3.1 mg și 2.8 mg de Gos pe 100 mg de FD2 și respectiv FD5.5, demonstrând că particulele FD2 încorporează o mai mare cantitate de Gos.

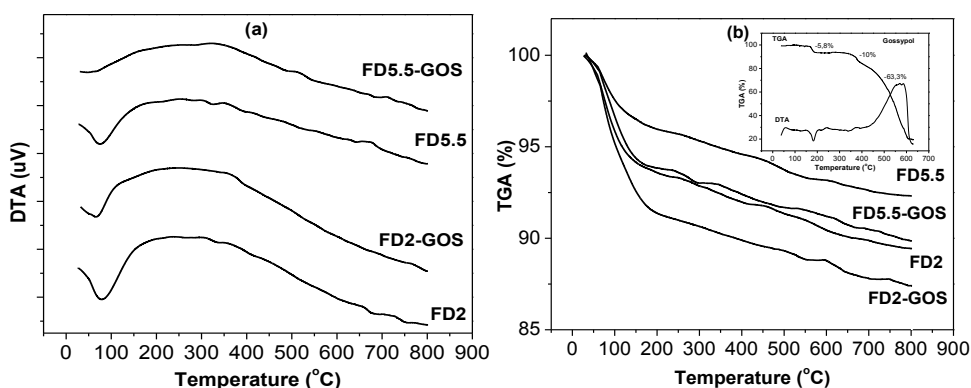


Figura 12. Curbele DTA (a) și TGA (inset curba DTA/TGA a Gos) (b) pentru probele investigate

Tabel 6. Procentul pierderii de masă rezultate din analiza TGA

Temperatura (°C)	FD2 (%)	FD2-Gos (%)	FD5.5 (%)	FD5.5-Gos (%)
20-200	6,7	10	4,4	7
200-800	4,1	3,9	3,7	3,9

Spectrul FT-IR al particulelor gadolino-silicatică încărcate cu Gos conține majoritatea benzilor de absorbție specifice particulelor pure gadolino-silicatică, neputându-se observa noi benzi de absorbție specifice Gos.

Spectrul FT-IR înregistrat pentru Gos și pentru soluția acetonică recuperată de supernatant au fost analizate pentru a obține mai multe informații referitoare la comportamentul Gos, după includerea sa în particulele gadolino-silicatic. În intervalul 3800-3100 cm^{-1} , spectrul FT-IR al soluției inițiale de Gos în acetonă (Figura 13a) prezintă o bandă îngustă în jurul valorii de 3500 cm^{-1} asociată grupărilor hidroxil implicate cu diferite tării în formarea legăturilor de hidrogen, specific structurii tautomerice aldehidice [27-32] și o bandă largă în jurul valorii de 3420 cm^{-1} . Ambele benzi sunt prezente și în spectrul FT-IR a ambelor soluții de Gos recuperate, însă banda de la 3420 cm^{-1} este mult mai largă în cazul probelor de Gos recuperate de pe probele FD5.5. Acest lucru se datorează prezenței ionilor de Na^+ din probele FD5.5, tautomerul aldehidic al Gos schimbându-se în tautomerul chetonic, cu o bandă largă specifică la aproximativ 3420 cm^{-1} [29].

În regiunea spectrală 1700-1500 cm^{-1} (Figura 13b), spectrul FT-IR al Gos și a soluției recuperate de pe probele FD2 prezintă benzi de vibrație specifice tautomerului aldehidic în jurul valorii de 1615 cm^{-1} , asociată cu legăturile C=O și în jurul valorii 1570 cm^{-1} specifică vibrațiilor C=C din inelul naftalenic. Soluțiile recuperate de pe probele FD5.5 prezintă benzi vibraționale specifice tautomerului chetonic; banda de la 1570 cm^{-1} scade și apare o nouă bandă la 1595 cm^{-1} , ceea ce e specific vibrațiilor inelului din tautomerul chetonic [29].

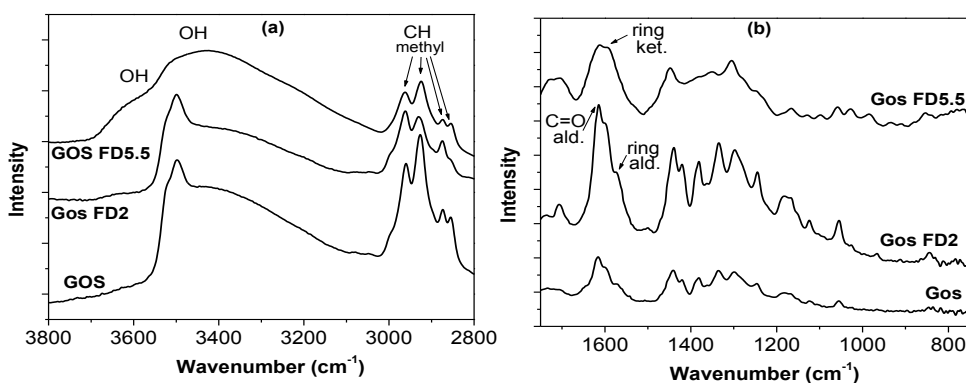


Figura 13. Spectrele FT-IR ale soluțiilor recuperate de Gos între: (a) 3800-2800 cm^{-1} și (b) 1800-700 cm^{-1}

Spectrele EPR în bandă X (Figura 14) prezintă linii de rezonanță la valori $g_{\text{eff}}=5.9$, 2.8 și 2.0, caracteristice așa numitului spectru-U, tipic pentru ionii de Gd^{3+} dispuși în diferite poziții/vecinătăți, unde sunt supuse unui câmp cristalin relativ slab și sunt caracterizate de un număr de coordinare mai mare de șase [33]. Deoarece probele FD5.5 și FD5.5-Gos prezintă linii de rezonanță mai largi decât probele FD2 și FD2-Gos, ne

așteptăm la grad de clusterizare a ionilor de Gd^{3+} mai ridicat în probele FD5.5 comparativ cu probele FD2, datorită intensificării reacției de condensare o dată cu creșterea condițiilor de pH din sinteză [34].

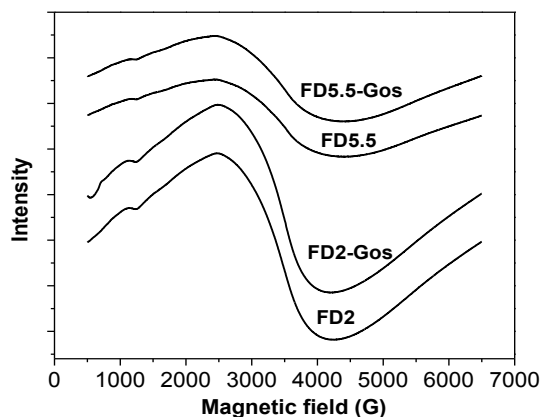


Figura 14. Spectrele EPR experimentale ale probelor investigate între 500-6500G

Comparând compoziția elementală teoretică cu cea obținută în urma analizei XPS (Tabel 7), se poate observa că procentul atomic la suprafața probelor este mai mic decât era de așteptat și acest lucru se datorează clusterizării gadoliniului în interiorul particulelor.

Tabel 7. Procentul relativ al componentelor principale, comparativ cu compoziția teoretică

	<i>Compoziția elementală (at %)</i>		
	O	Gd	Si
FD2	59.8	0.2	40.0
FD5.5	58.7	0.2	41.1
Compoziția teoretică	66.5	1.3	32.2

Concentrația atomică relativă a probelor, înainte și după imersie sunt prezentate în Tabelul 8. Conținutul în carbon crește semnificativ, mai ales pentru probele încărcate cu Gos, preparate la pH 2.

Tabel 8. Procent relativ al principalelor componente, înainte și după încărcarea cu Gos

	<i>Compoziția elementală (at %)</i>			
	<i>Si</i>	<i>Gd</i>	<i>C</i>	<i>O</i>
FD2	39.4	0.2	1.7	58.7
FD2-Gos	35.4	0.2	10.4	54.0
FD5.5	40.7	0.2	1.0	58.1
FD5.5-Gos	40.0	0.2	2.2	57.6

Înainte de imersia în soluția de Gos, semnalul fotoelectronilor O_{1s} prezintă o componentă majoră la 533.2 eV, asociată atomilor de oxigen de legătură implicați în unitățile structurale ale matricei silicatică [35] și un umăr, la energii de legătură mai mari,

corespunzător grupărilor hidroxil [36], care e mai bine evidențiat în probele FD2 spre deosebire de probele FD5.5, datorită unei hidroxilări mai puternice a matricei silicatică din FD2, ca o consecință a scăderii ratei reacției de condensare, în condițiile de sinteză cu pH mai scăzut [34, 37]. După încărcarea cu Gos, în stratul atomic exterior al probelor FD2-Gos se observă o scădere a intensității peak-ului O_{1s} și o mare asemănare cu peak-ul fotoelectronic al Gos (Figura 63), în timp ce în stratul exterior al probei FD5.5-Gos se pot în continuare evidenția oxigenul din matricea silicatică, la fel ca în probele FD5.5 (Figura 15). Rezultatele subliniază din nou o încărcare mai mare cu Gos a probelor FD2.

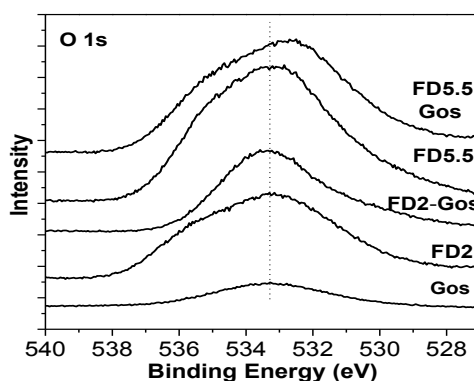


Figura 15. Spectrele XPS de înaltă rezoluție înregistrate pentru O_{1s}

Legarea gadoliniului la suprafața porilor silicatici determină o reducere a timpului său de corelare rotațional și cauzează astfel scăderea timpului de relaxare T_1 . O clusterizare mai puternică în probele FD5.5 comparativ cu probele FD2 diminuează abilitatea centrilor paramagnetici de a induce relaxarea moleculelor de apă și duce la un T_1 mai lung pentru probele FD5.5 comparativ cu probele FD2 (Figura 16). După încărcarea cu Gos, sfera exterioră a oxidului de gadolinu se modifică, îmbunătățindu-se relaxivitatea, probele FD-Gos prezentând un T_1 mai scurt, decât probele FD. Contrastul în IRM (Figura 17) este îmbunătățit pentru probele încărcate cu Gos, comparativ cu particulele pure gadolino-silicatică. Acest lucru se poate datora legăturilor de hidrogen puternice care se pot forma între grupările carbonil și hidroxil ale Gos cu apa, ceea ce duce la intensificarea implicării sferei secundare în procesul de relaxare. Oricum, concluzii pripite nu ar trebui date acum, ci ar trebui luate în considerare studii și măsurători viitoare pentru a determina nu doar timpii de relaxare ci și valorile relaxivității efective, parametri potriviți pentru a evalua capacitatea agenților de contrast de a induce relaxarea protonilor.

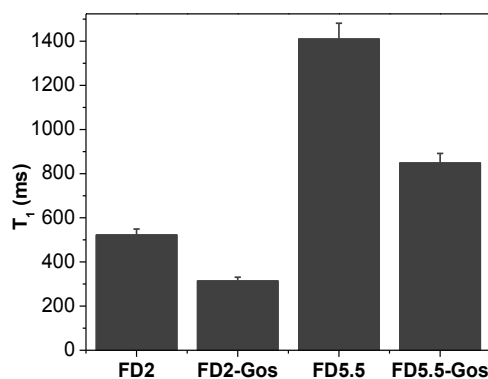


Figura 16. Timpul de relaxare T_1 a probelor, înainte și după încărcarea cu Gos

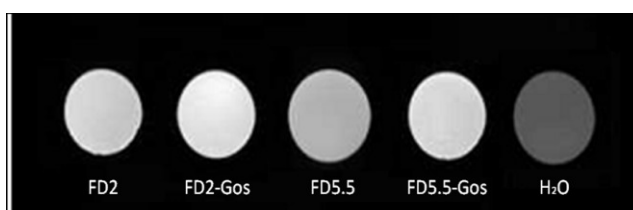


Figura 17. Imagini ecou de spin ponderate în T_1 ale probelor investigate la 7 T cu parametrii următori: TR/TE =1300 ms/9 ms, FOV =2 cm, NEX=1, BW=70 000 Hz, grosimea porțiunii=1.00 mm, matricea =256×256 și temperatura = 20 °C

3.4. Concluzii

Particulele silicatică dopate cu gadolinium au fost preparate prin metoda sol-gel la două pH-uri diferite și apoi încărcate cu Gos. Încărcarea cu Gos afectează ușor dimensiunea particulelor, a căror medie se află în jurul valorii de 1 μm . O cantitate mai mare de Gos este încărcată în probele preparate la pH 2, decât în cele preparate la pH 5.5. Rezultatele FT-IR obținute pe soluțiile recuperate de Gos, indică faptul că Gos rămâne în starea sa tautomerică aldehidică în cazul probelor preparate la un pH scăzut, în timp ce în cazul probelor preparate la un pH mai ridicat are loc schimbarea sa în structura tautomerică chetonică. Analizele EPR și XPS arată că ionii de gadolinium tind să se concentreze în interiorul particulelor și să formeze clusteri, în special în cazul probelor preparate la pH 5.5. Măsurătorile IRM indică scurtarea timpului de relaxare T_1 , în cazul în care particulele silicatică dopate cu gadolinium sunt încărcate cu Gos. Aceste rezultate indică caracteristici potrivite pentru a studia mai departe particulele gadolino-silicatică încărcate cu Gos ca agenți de contrast pentru IRM și ca agenți teranostici.

4. NANOPARTICULE GADOLINO-SILICATICE ÎNCĂRCATE CU GOSIPOL ACID ACETIC DUBLU-FUNCȚIONALE PENTRU COMPUȘI TERANOSTICI

4.1. Obiective principale

În acest studiu, nanoparticule silicatic dublu-funcționale, cu conținut de gadoliniu și gosipol acid acetic au fost investigate cu scopul de a estima posibilitatea utilizării lor ca agenți teranostici, cu proprietăți anticanceroase din partea gosipolului și cu aplicații în IRM din partea gadoliniului. În Subcapitolul 4.2 s-a evaluat încărcarea gosipolului pe două tipuri de microparticule gadolino-silicatic preparate la două valori diferite de pH și au oferit rezultate favorabile referitoare la timpii de relaxare ale microparticulelor. Prin urmare, scopul nostru în acest studiu, este de a obține compuși similari, dar nanodimensionați care sunt capabili de direcționare pasivă, ca urmare a dimensiunilor lor reduse și a efectului vascular de permeabilitate crescut de la nivelul țesutului tumoral.

4.2. Metode de sinteză și caracterizare

Nanoparticulele gadolino-silicatic (SiGd-NPs, $98.4\text{SiO}_2 \cdot 1.6\text{Gd}_2\text{O}_3$ (mol %)) au fost preparate prin metoda sol-gel, folosind surfactanți și polimeri. Contrar rezultatelor prezentate în Subcapitolul 4.2, s-a ales sinteza nanoparticulelor în mediu bazic, deoarece acest tip de sinteză a fost cea mai întâlnită din literatură pentru particule nanodimensionate gadolino-silicatic și am considerat creșterea suprafeței specifice, respectiv a porozității împreună cu concentrația medicamentului și a repetării încărcării, plus sonicarea, metode suficiente pentru a crește cantitatea de medicament încărcat. Precipitatul fin de particule a fost colectat, uscat prin liofilizare și apoi calcinat la 550°C în aer timp de 5 ore pentru a elimina surfactantul și polimerul. Moleculele de gosipol acid acetic (GosAa) au fost încărcate pe porii și suprafața SiGd-NPs prin simplă imersie. Pentru o încărcare mai puternică, la interval de 24 de ore, particulele au fost sonicate în baie de apă timp de 1 oră la 200 W, centrifugate, eliminat supernatantul, uscate prin liofilizare și imersate din nou în soluție de GosAa. Pentru studiile relaxometrice și pentru cele *in vitro* pentru a obține o suspensie stabilă, în ceea ce privește timpul de rămanență în suspensie, probele au fost plasate prin sonicare într-o soluție vâscoasă de carboximetilceluloză (CMC, 2%, Sigma Aldrich) în tampon fosfat (PBS, pH 7.4).

Nanoparticulele (NPs) au fost caracterizate prin Microscopie Electronică de Baleiaj (Scanning Electron Microscopy, SEM), Microscopie Electronică de Transmisie (Transmission Electron Microscopy, TEM), spectroscopia de raze X prin Dispersie de Energie (Energy Dispersive X-ray spectroscopy, EDX), DLS, XRD, BET/BJH, TGA și

FT-IR. Capacitatea SiGd-NPs de a fi folosite ca agenți de contrast au fost determinate prin profilele de Dispersie a Relaxării Magnetice Nucleare (Nuclear Magnetic Relaxation Dispersion, NMRD) și prin experimente IRM *in vitro* de internalizare celulară. De asemenea au fost realizate studii de cedare caracterizate de modele cinetice, precum și studii de citotoxicitate.

4.3. Rezultate și discuții

Imaginile SEM ale nanoparticulelor sintetizate (Figura 18) prezintă aglomerări de particule sferice, nanometrice cu mărimi în jur de 100 nm. Mai mult, procentul atomic al componentelor principale obținute prin spectroscopia EDX sunt bine corelate cu cele calculate din formula de sinteză.

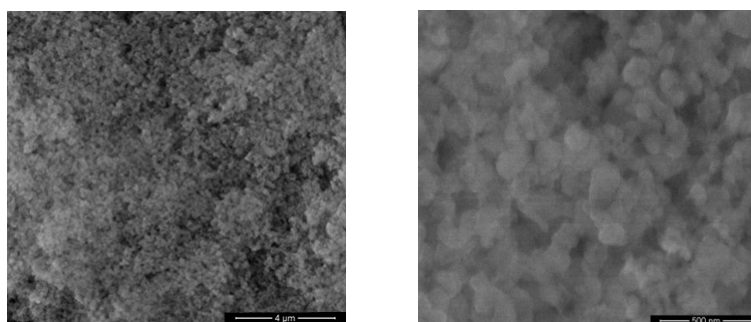


Figura 18. Imaginile SEM ale SiGd-NPs la două mărimi diferite

Imaginile HRTEM ale SiGd-NPs (Figura 19) indică o structură amorfă cu prezența aglomerărilor de Gd în matricea silicatică (puncte închise la culoare), așa cum dovedește și spectrul EDX.

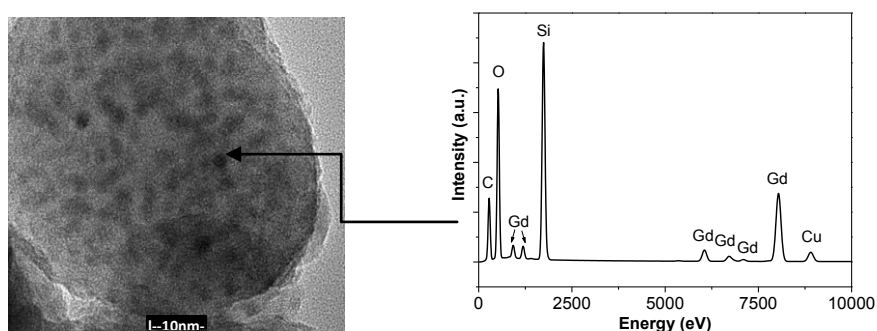


Figura 19. Imagini HRTEM și analiza EDX a unei singure particule de SiGd-NPs

Măsurătorile DLS indică un diametru de 350 nm după sonicare, aceste nanoparticule fiind astfel teoretic capabile de a profita de vasculatura permeabilă și de drenarea slabă a sistemului limfatic al tumorilor pentru a crește timpul de retenție la nivelul țesutului canceros, așa numita direcționare pasivă [38].

Încărcarea sării de GosAa pe SiGd-NPs nu aduce modificări semnificative ale valorilor potențialului zeta. În ambele cazuri, potențialul zeta a fost aproape de -30 mV, determinând o relativă stabilitate a nanosuspensiei (Tabel 9) [21].

Table 9. Mărimea și potențialul zeta ale probelor investigate

	Mărimea medie (nm)	Potențialul zeta (mV)
SiGd-NPs	294	-24,5
SiGd-NPs-GosAa	340	-26,4

Analiza XRD (Figura 20) confirmă structura amorfă a probei gadolino-silicatică evidențiată și prin HRTEM, indicând faptul că GosAa este prezent într-o stare amorfă după procesul de încărcare. S-a dovedit că încapsularea medicamentelor amorse și hidrofile în sisteme anorganice poroase induce o îmbunătățire a procesului de disoluție [39]. Disoluția medicamentelor greu solubile reprezintă un pas limitant în terapie. De aceea este important de a îmbunătăți rata disoluției și astfel de a crește biodisponibilitatea medicamentului.

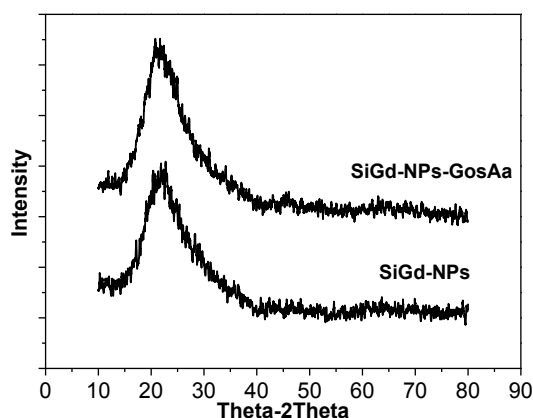


Figura 20. Difractogramele XRD ale SiGd-NPs, înainte și după încărcarea cu GosAa

Analiza volumului de pori și a suprafeței specifice indică faptul că SiGd-NPs prezintă suprafață specifică ridicată și un volum mare de pori (aproximativ 600 m²/g și respectiv 0.6 ml/g), fiind potrivite ca transportori/carriers de molecule medicamentoase în sisteme cu cedare prelungită. Încărcarea cu GosAa pe suprafața nanoparticulelor gadolino-silicatică determină scăderea suprafeței specifice și a volumului de pori a NPs.

Curbele TGA prezentate în Figura 21 prezintă două pierderi de masă: între 20 și 200°C atribuită termodesorbției apei sau a altor solvenți folosiți în sinteză și între 200 și 800°C determinată de descompunerea surfactanților și a polimerilor reziduali folosiți în sinteză, dehidroxilarea Si-OH [40] sau a Gd-OH [41], iar în cazul probelor încărcate cu GosAa pierderea de masă este determinată de descompunerea și combustia medicamentului. Pierderea de masă pentru probele Si-Gd-NPs-GosAa este mai mare

comparativ cu probele SiGd-NPs ceea ce demonstrează încărcarea cu medicament. Diferența de pierdere de masă între probele încărcate și neîncărcate, în intervalul de temperatură de 20-800°C, este de 10%, ceea ce corespunde cu încărcarea a 10 mg de GosAa pe 100 mg de probă de SiGd-NPs.

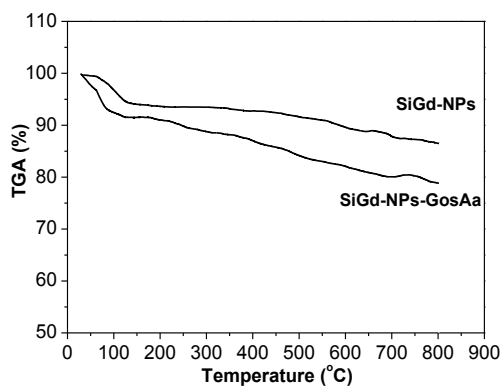


Figura 21. Curbele TGA ale probelor investigate

Figura 22 prezintă spectrele FT-IR ale probelor încărcate și neîncărcate precum și spectrul GosAa pur. Majoritatea benzilor vibraționale investigate identificate corespund matricei silicatică. Se poate observa că probele SiGd-NPs-GosAa prezintă și benzi minore vibraționale specifice GosAa în jurul valorii de 1450 cm^{-1} și a celei de 2920 cm^{-1} corespunzătoare benzilor de vibrație de întindere a C-C, C=C și respectiv a vibrațiilor de întindere a C-H din grupările metilice [32]. Mai mult, creșterea ușoară a intensității benzii largi din jurul valorii de 3400 cm^{-1} și a celei de la 1640 cm^{-1} , poate confirma încărcarea GosAa pe suprafața nanoparticulelor gadolino-silicatică.

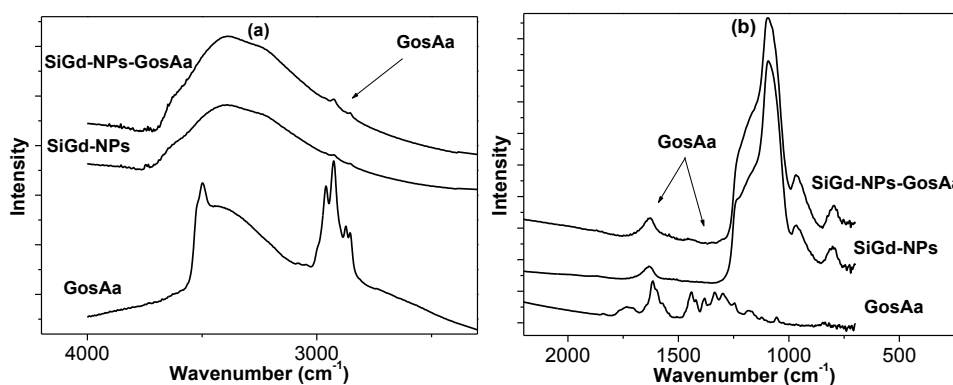


Figura 22. Spectrele FT-IR a GosAa și ale probelor investigate

Profilele NMRD ale probelor investigate sunt prezentate în Figura 23. Banda intensă din jurul valorii de 30 MHz este caracteristică ionilor de Gd legați de macromoleculă. Există unele studii care arată că Gd_2O_3 este puternic legat de matricea silicatică, care se comportă ca o macromoleculă, încetinindu-i mișcarea rotațională și în consecință crescându-i proprietățile relaxometrice ca agent de contrast utilizat în IRM [42,

43]. Această legătură puternică poate sugera, de asemenea, faptul că moleculele de Gd_2O_3 sau ionii de Gd vor disocia greu din matricea silicatică. De aceea, nanoparticulele gadolino-silicaticice nu prezintă teoretic toxicitate, iar prin structura lor poroasă pot oferi acces moleculelor de apă la centrii paramagnetici [44].

Pe deasupra, datele experimentului NMRD (Figura 23) indică faptul că încărcarea GosAa pe suprafața și porii SiGd-NPs duce la creșterea ratei de relaxare pe întregul domeniu de frecvențe investigate, deși SiGd-NPs-GosAa prezintă dimensiuni mai mari decât SiGd-NPs, iar relaxivitatea acestuia ar trebui teoretic să scadă [45]. Putem presupune că această creștere a relaxivității, în cazul probelor încărcate cu GosAa, este influențată de intensificarea legăturilor de hidrogen, interfațate de GosAa, dintre moleculele de apă și grupările polare prezente în sfera secundară sau exterioară de coordinare a ionilor de Gd [46-48].

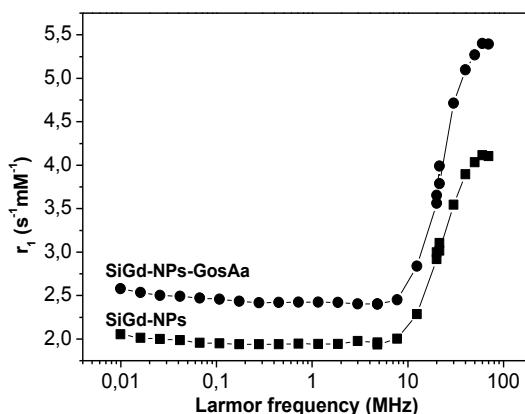


Figura 23. Profilele NMRD ale SiGd-NPs și SiGd-NPs-GosAa în CMC 2%

Încărcarea medicamentului într-un sistem poros determină cedarea prelungită a acestuia când sunt imersate în lichide biologice, minimizând astfel efectele secundare (Figura 24).

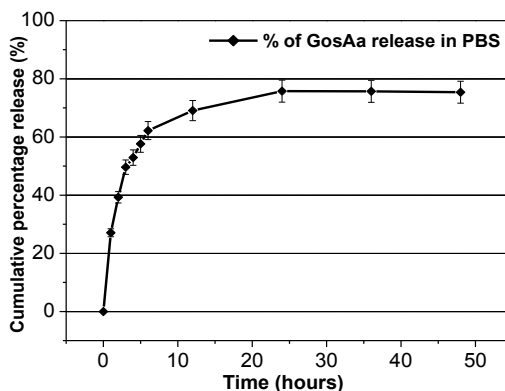


Figura 24. Profilele de cedare a GosAa din SiGd-NPs-GosAa

Modelul cinetic care prezintă liniaritate ridicată în urma experimentului de cedare a fost evaluat cu ajutorul coeficientului de corelație (R^2). Reprezentarea grafică conform ecuației de gradul întâi, prezintă liniaritate scăzută cu valori de regresie de 0.936. Valori ale coeficientului de corelație mai mari de 0.98 s-au obținut prin modelul Korsmeyer-Peppas, prin care se obțin valori ale pantei mai mici de 0.5 ($n < 0.5$), indicând faptul că mecanismul de cedare din nanoparticule a fost realizat prin difuzie [49, 50].

După cum se poate observa din studiile de toxicitate (Tabel 10), s-a obținut o valoare acceptabilă a viabilității, fiind mai mare de 80% pentru toate concentrațiile, toxicitatea crescând odată cu creșterea concentrației de Gd și GosAa ($\{Gd\}$, $\{GosAa\}$). S-a putut observa o mică diferență între celulele incubate cu SiGd-NPs și martor, ceea ce sugerează faptul că SiGd-NPs nu afectează semnificativ viabilitatea celulară la concentrațiile testate, pe o perioadă de 6 ore. Odată ce GosAa este încărcat pe nanoparticulele gadolino-silicaticice, toxicitatea asupra celulelor crește ușor, fapt anticipat datorită activității anticanceroase a GosAa. Se mai poate observa o ușoară scădere a toxicității pentru probele SiGd-NPs-GosAa față de GosAa pur, indicând o descreștere a efectului citotoxic ale SiGd-NPs-GosAa datorită cedării prelungite a medicamentului din nanoparticulele gadolino-silicaticice.

Tabel 10. Studii de citotoxicitate pe celule canceroase de sân TSA

Proba	Viabilitate (%)	Proba	Viabilitate (%)	Proba	Viabilitate (%)
Martor	100				
SiGd-NPs		SiGd-NPs-GosAa		GosAa	
$\{Gd\}$ 20 μ M	97	$\{Gd\}$ 20 μ M $\{GosAa\}$ 0.72 μ M	93	$\{GosAa\}$ 0.72 μ M	91
$\{Gd\}$ 50 μ M	95	$\{Gd\}$ 50 μ M $\{GosAa\}$ 1.72 μ M	89	$\{GosAa\}$ 1.72 μ M	87
$\{Gd\}$ 100 μ M	93	$\{Gd\}$ 100 μ M $\{GosAa\}$ 3.47 μ M	85	$\{GosAa\}$ 3.47 μ M	84

Pentru a evalua cantitatea de SiGd-NPs internalizate de celulele canceroase TSA după 6 ore de incubație, concentrația ionilor de Gd a fost măsurată prin spectrometrie de masă cu plasmă cuplată inductiv (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, ICP-MS). Rezultatele indică faptul că cantitatea de Gd internalizată de către celule este direct proporțională cu cantitatea de SiGd-NPs adăugată mediului celular (Figura 25). Mici

diferențe au fost observate între SiGd-NPs și SiGd-NPs-GosAa, aparent, încărcarea GosAa pe nanoparticule determină o ușoară creștere a procentului de nanoparticule internalizate de către celulele TSA.

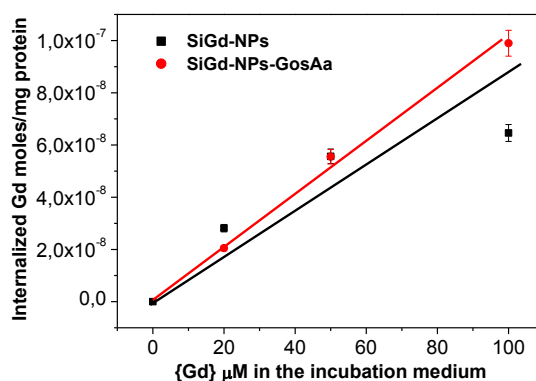


Figura 25. SiGd-NPs încărcate și neîncărcate (exprimate în moli de Gd) internalizate în celulele TSA după 6 ore de incubație la 37°. Cantitatea de Gd asociată celulelor a fost determinată prin ICP-MS.

Imaginile ponderate T_1 și T_2 ale capilarelor cu pelete celulare obținute după incubarea de aproximativ a $2,4 \times 10^6$ celule TSA, conținând cantități de nanoparticule încărcate sau neîncărcate, au fost achiziționate la 7 T (Figura 26). După cum se poate observa, valorile T_1 scad ușor odată cu creșterea concentrației de nanoparticule (Tabel 11), rezultate care sunt în concordanță cu măsurătorile ICP-MS din cadrul experimentului de internalizare. Valorile T_1 înregistrate pentru celulele incubate cu SiGd-NPs-GosAa sunt ușor diferite față de cele neîncărcate, însă mult diferite față de martor (Figura 26), indicând faptul că celulele manifestă o internalizare adecvată a nanoparticulelor gadolino-silicaticice și un efect de contrast potrivit pentru a fi folosite ca agenți de contrast în imagistica de rezonanță magnetică. Nu s-a putut observa prin această metodă o scădere a valorilor T_1 în cazul probelor încărcate cu GosAa față de cele neîncărcate, cum ar fi de așteptat din experimentul de internalizare, din măsurătorile ICP-MS și din profilele NMRD, dar trebuie să luăm în considerare artefactele prezente la achiziția imaginilor IRM, care pot afecta măsurătorile valorilor T_1 .

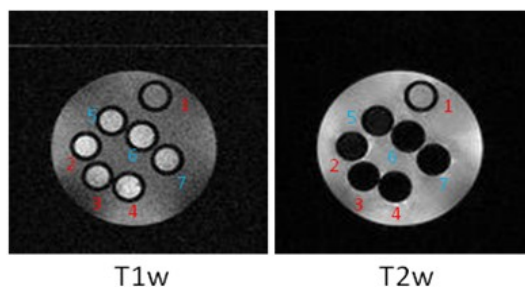


Figura 26. Imaginile ecou de spin ponderate în T_1 și T_2 , înregistrate la 7 T, a peletelor celulare TSA pregătite în capilare, imobilizate apoi în agar. (1) celule control neincubate. (2), (3) și (4) celule incubate timp de 6 ore cu nanoparticule neîncărcate

cu concentrație de Gd de 20, 50 și respectiv 100 μM . (5), (6) și (7) celule incubate cu nanoparticule încărcate cu concentrații de Gd de 20, 50 și respectiv 100 μM

Tabel 11. Valorile T_1 și procentul de descreștere a T_1 , măsurate la 7 T pe peletele celulare TSA

Proba	T_1 (ms)	Procent descreștere T_1 (%)	Proba	T_1 (ms)	Procent descreștere T_1 (%)
(1) Martor	2467				
	SiGd-NPs		SiGd-NPs-GosAa		
(2) {Gd} 20μM	961	61	(5) {Gd} 20μM	1103	55
(3) {Gd} 50μM	640	74	(6) {Gd} 50μM	767	69
(4) {Gd}100μM	560	77	(7) {Gd} 100μM	469	81

4.4. Concluzii

Un nou sistem nanodimensionat bazat pe gadolinium pentru proprietăți imagistice și pe GosAa pentru proprietăți anticanceroase a fost preparat și caracterizat. Analizele SEM și HRTEM au indicat că nanoparticulele prezintă forme sferice, nanometrice cu zone interne concentrate în compuși de Gd. Prin HRTEM s-a confirmat, încă o dată, rezultatele XPS și RES asupra tendinței Gd de a forma clusteri și de a se concentra în interiorul particulelor, așa cum s-a prezentat în Subcapitolul 4.2, independent de parametrii de sinteză aplicați. Capacitatea de încărcare a GosAa a fost evaluată prin măsurători ale suprafeței specifice și ale volumului de pori împreună cu analiza termogravimetrică și indică o mai bună încărcare cu medicament comparativ cu probele FD2 prezentate în Subcapitolul 4.2, în ciuda pH-ului bazic utilizat pentru prepararea SiGd-NPs. Profilele NMRD indică faptul că compușii de Gd sunt puternic legați de matricea silicatică, care se comportă ca o macromoleculă, determinând creșterea relaxivității la câmpuri magnetice înalte și faptul că GosAa induce creșterea relaxivității. Încărcarea GosAa într-un sistem poros cauzează o cedare prelungită, caracterizată în principal prin difuzie, așa cum a fost dovedit de profilele de cedare și de rezultatele din modelele cinetice. Cedarea prelungită a fost de asemenea dovedită prin studiile de citotoxicitate, viabilitatea celulelor fiind ușor crescută pentru nanoparticulele încărcate cu GosAa comparativ cu GosAa pur. Imaginile ponderate în T_1 și T_2 pentru peletele celulare incubate cu nanoparticule prezintă un contrast adecvat pentru a fi considerate candidați potriviți ca agenți de contrast în imagistica de

rezonanță magnetică. În ansamblu, acest studiu a condus la obținerea *in vitro* a unui compus teranostic sigur care necesită cercetări suplimentare, înainte de a oferi oportunități reale în aplicații clinice.

5. LIPOZOMI TERANOSTICI PREPARAȚI CU COMPUȘI DE GADOLINIU ȘI GOSIPOL ACID ACETIC

5.1. Obiective principale

În acest studiu este prezentată sinteza și caracterizarea lipozomilor teranostici cu funcție dublă de terapie și de diagnostic, prin co-încapsularea gosipolului acid acetic și a complexilor de gadolinium. A fost ales acest sistem pentru a avea efecte anticanceroase din partea gosipolului acid acetic și sensibilitate ca agent de contrast în IRM, din partea compușilor de gadolinium, pe lângă, biocompatibilitatea și toxicitatea redusă oferită de lipozomi.

5.2. Metode de sinteză și caracterizare

Lipozomi încărcăți cu GosAa și complex de Gd au fost preparați prin metoda hidratării filmului subțire și a extrudării prin membrana policarbonatică. Compoziția lipozomală folosită POPC/CH/DSPE-PEG/GosAa prezintă raportul molar de 10:2:0.5:1. Pentru comparație, ca și control, au fost sintetizați și lipozomi fără GosAa. Pentru simplificare, lipozomii preparați cu GosAa vor fi mai departe denumiți L-GosAa, iar cei fără, vor fi denumiți L.

Pentru a cuantifica GosAa, lipozomii dializați au fost dizolvați în metanol, iar absorbția lizatului a fost măsurată la 371 nm. Pentru a determina cantitatea exactă de GosAa, s-a folosit și o curbă de calibrare standard. Concentrația de Gd și relaxivitatea (r_1) a formulărilor lipozomale au fost determinate prin procedee relaxometrice folosind un relaxometru Spinmaster NMR (Stelar, Mede, Italy) la o frecvență Larmor de 21 MHz folosind o secvență de puls inversie-revenire standard (standard inversion recovery pulse sequence).

Stabilitatea la depozitare, realizată la 4°C, a fost evaluată prin determinarea procentului de GosAa și Gd din lipozomi, a relaxivității (r_1) și a dimensiunii particulelor, pe o perioadă de o lună.

Stabilitatea în lichide biologice (plasmă) a fost determinată prin măsurarea procentului de GosAa și de compuși de Gd rămas încapsulat și a relaxivității (r_1).

Capacitatea lipozomilor de a fi utilizați ca agenți de contrast a fost determinată prin profilele NMRD și prin experimentul IRM de internalizare *in vitro* la 7T. S-au realizat de asemenea și studii de citotoxicitate.

5.3. Rezultate și discuții

După cum se poate vedea din măsurătorile DLS, toți lipozomii preparați prezintă diametru în jurul valorii de 100 nm (Tabel 12). Indicele de polidispersie mai mic de 0.2 indică un caracter omogen și monodispers al populației de lipozomi. Se pare că prezența GosAa determină o ușoară creștere a fluidității pereților lipozomali, fapt observat și în alte studii [51]. Acest fenomen prezintă consecințe asupra diametrului mediu al lipozomilor care se extrudează mai ușor în comparație cu lipozomii fără GosAa. Prin urmare, L-GosAa prezintă dimensiuni ușor mai reduse în comparație cu L.

Potențialul zeta indică valori mari negative (Tabel 12), ceea ce înseamnă că atracția dintre particule nu depășește respingerea, iar dispersia va fi stabilă electric și nu va prezenta tendința de a coagula sau a flocula [52]. De observat că prezența sării GosAa nu modifică semnificativ valorile potențialului zeta.

Tabel 12. Rezultatele măsurătorilor DLS

	Potențialul zeta (mV)	Dimensiunea (nm)
L	- 45,3	113
L-GosAa	-46,6	97

Pentru lipozomii preparați, concentrația de GosAa și Gd, precum și valorile relaxivității sunt prezentate în Tabelul 13. Eficiența de încărcare a GosAa a fost determinată ca fiind 44%, mult mai scăzută comparativ cu alte studii [53]. Acest lucru se datorează lipidelor speciale, folosite în prezentul studiu, 1-palmito-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfatocolina (1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, POPC) fiind ales datorită capacității sale de a crea o membrană mai permeabilă pentru ca moleculele de apă să aibă acces la centrul paramagnetic din interiorul lipozomilor [54]. Mai mult, adăugarea de GosAa în pereții lipozomilor determină și schimbări ale valorilor relaxivității. Chiar dacă L-GosAa încapsulează cu 12% mai mult Gd decât L, relaxivitatea sa este cu 23% mai mare decât a L. Relaxivitatea ușor mai ridicată a L-GosAa se poate datora diametrului mai mic al lipozomilor preparați în prezența GosAa, știindu-se că s-a observat o relație de inversă proporționalitate între mărimea lipozomilor și relaxivitatea T_1 [55]. Pe de altă

parte, interdigitarea GosAa în stratul bilipidic poate cauza de asemenea o creștere a permeabilității membranei lipozomale cu consecințe în creșterea relaxivității.

Tabel 13. Concentrația compușilor activi și relaxivitatea lipozomilor

	Concentrația GosAa {GosAa}(mg/ml)	Concentrația Gd {Gd} (mM)	r_1 ($s^{-1}mM^{-1}$)
L	0	4.76	4.23
L-GosAa	1.02	5.42	5.55

După cum este prezentat în Figura 27a și Figura 27b, nu există modificări semnificative în ceea ce privește dimensiunea sau valorile relaxivității lipozomilor depozitați la 4°C pentru 30 de zile. Totuși, unele schimbări pot fi observate în ceea ce privește concentrația de Gd și GosAa, în timpul acestei depozitări. Este important de menționat faptul că GosAa prezintă un efect interesant asupra comportamentului lipozomilor în ceea ce privește eliberarea Gd, după cum se poate observa în Figura 27c, cauzând o cedare ușor mai lentă a complexului de Gd prin porii membranei. GosAa însuși este cedat din lipozomi în timpul depozitării (Figura 27d).

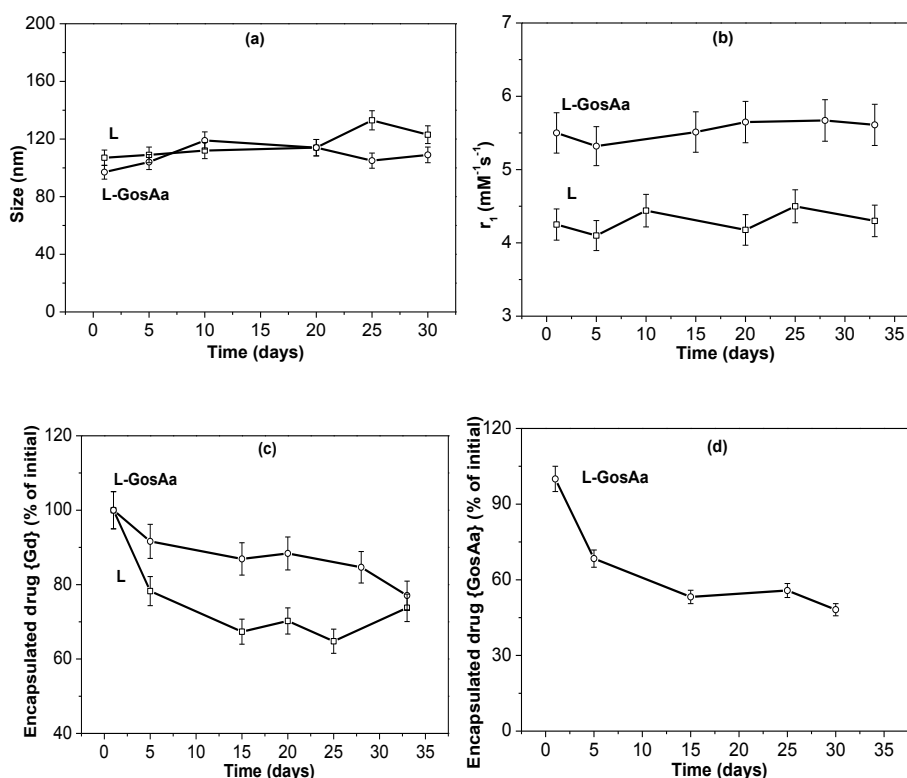


Figura 27. Stabilitatea la depozitare în ceea ce privește modificări ale dimensiunii lipozomilor (a), relaxivității (b), concentrației de Gd {Gd} (c) și concentrației de GosAa {GosAa} (d)

Se pare că reducerea concentrației compușilor de Gd și a GosAa încapsulați are loc mai rapid în cazul studiului stabilității în plasmă comparativ cu studiul de stabilitate la depozitare, în principal datorită temperaturii mai înalte utilizate, dar și datorită mediului biologic utilizat (Figura 28). Se poate observa faptul că în aceste condiții de incubare, prezența GosAa în membrana lipozomilor L-GosAa oferă o ușoară protecție în ceea ce privește cedarea compușilor de Gd, așa cum se întâmplă și în experimentul de stabilitate la depozitare. Deși concentrația de Gd scade, valorile relaxivității rămân aproape neschimbate pe perioada experimentului. Similar, dar într-un mod mai accelerat, concentrația de GosAa continuă să scadă pe parcursul celor 48 de ore de incubare.

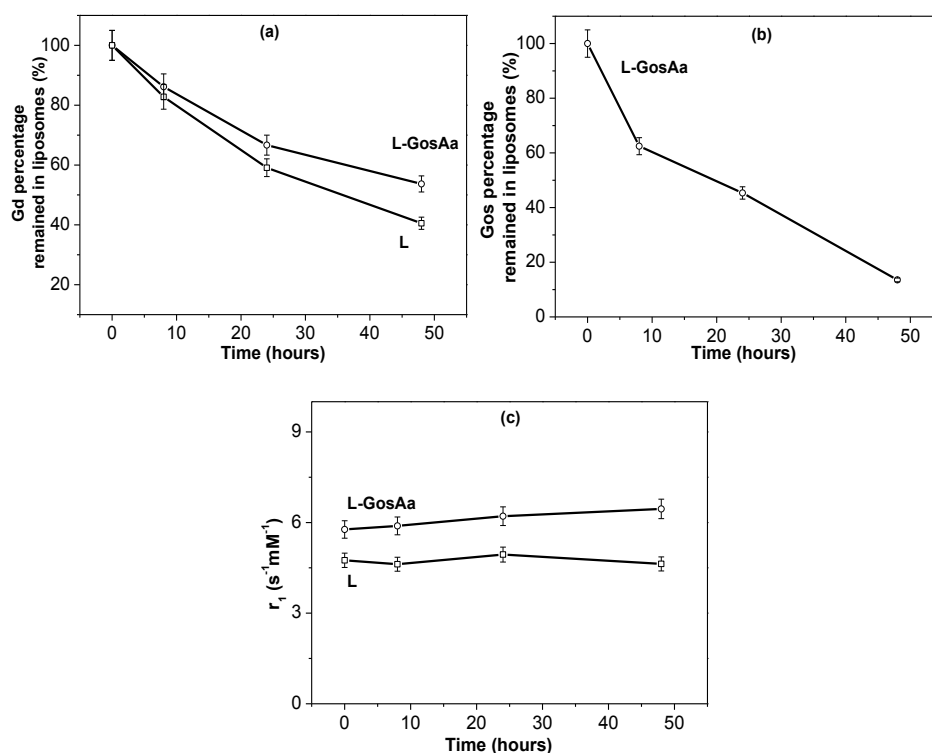


Figura 28. Stabilitatea în plasmă în ceea ce privește modificări ale concentrației de Gd din lipozomi {Gd} (a), concentrației de GosAa {GosAa} (b) și relaxivității (c)

Aceste valori au fost considerate acceptabile, luând în considerare lipidele folosite în sinteză cu scopul de a crește permeabilitatea apei pentru un răspuns favorabil în imagistica de rezonanță magnetică, ceea ce are însă și consecințe asupra cedării compușilor de Gd și a GosAa din interiorul lipozomilor. Studiile viitoare vor încerca să găsească soluții îmbunătățite.

După cum se poate observa, forma profilului NMRD ale probelor L nu diferă semnificativ de cel al gadoteridolului pur (Figura 29) [56], dar prezența GosAa în membrana lipozomală cauzează o creștere a valorii relaxivității și unele mici modificări ale formei profilului NMRD, mai ales la câmpuri magnetice înalte. În gadoteridol, ionul de Gd

este coordonat unui compus macrociclic cu scopul de a-i reduce, ca ion liber, disponibilitatea și astfel efectele adverse, știindu-se că ionii liberi de Gd sunt toxici pentru organismul uman. De aceea putem presupune o interacțiune redusă între GosAa și Gd, însă pe de altă parte putem considera posibilitatea interacțiunii GosAa și partea macrociclică a gadoteridolului. Interacțiunea GosAa cu partea macrociclică a gadoteridolului poate determina formarea unui compus cu o masă moleculară mai mare. Creșterea masei moleculare și respectiv a dimensiunii chelatului paramagnetic, produce o creștere a relaxivității datorată mobilității rotaționale restricționate ale complexului [42] și poate fi observat în profilele NMRD la câmpuri înalte, ca o bandă mai pronunțată (Figura 29).

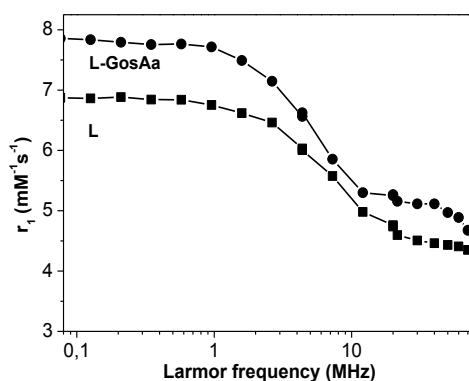


Figura 29. Profilele NMRD ale lipozomilor investigați

Rezultatele studiului de citotoxicitate (Tabel 14) indică faptul că prezența gadoteridolului în interiorul lipozomilor nu schimbă dramatic numărul celulelor viabile comparativ cu cele netratate (martor), complexul de Gd fiind sigur pentru celule. Prezența GosAa în pereții lipozomilor induce o creștere a toxicității asupra celulelor TSA, dovedind astfel proprietățile anticanceroase ale GosAa. De remarcat este faptul că aceeași concentrație de GosAa, dar ne-încapsulată în lipozomi reduce numărul celulelor viabile într-un mod ușor mai accentuat, sugerând faptul că sistemul de transport lipozomal afectează viabilitatea celulară printr-o cedare prelungită a GosAa.

Tabel 14. Studii de citotoxicitate pe celule canceroase de sân

Proba	Viabilitate (%)	Proba	Viabilitate (%)	Proba	Viabilitate (%)
Martor	100				
L		L- GosAa		GosAa	
{Gd} 10μM	98	{Gd} 10μM	94	{GosAa} 2.2 μM	90
		{GosAa} 2.2 μM			
{Gd} 20μM	98	{Gd} 20μM	73	{GosAa} 4.3 μM	71
		{GosAa} 4.3 μM			
{Gd} 50μM	96	{Gd} 50μM	60	{GosAa} 11 μM	57

{GosAa} 11 μ M					
{Gd} 100 μ M	95	{Gd} 100 μ M	38	{GosAa} 22.8 μ M	35
		{GosAa} 22.8 μ M			

Rezultatele incubării celulelor TSA cu L și L-GosAa (Figura 30) arată că internalizarea gadoliniului a fost proporțională cu concentrația de Gd prezentă în mediul de creștere. Mici diferențe au fost observate între probele L și L-GosAa, la concentrații mari de Gd, lipozomii L-GosAa fiind mai puțin internalizați spre deosebire de lipozomii L.

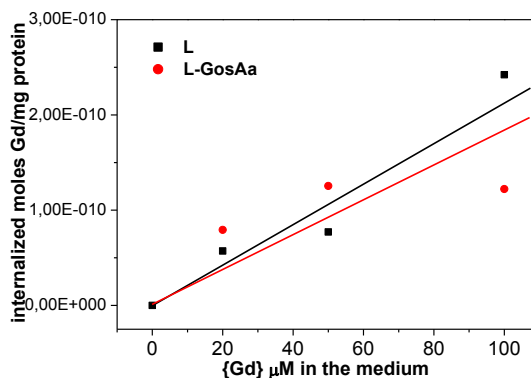


Figura 30. Internalizarea L și a L-GosAa (exprimați în moli de Gd) în celulele TSA după 6 ore de incubare la 37°. Cantitatea de Gd asociată celulelor a fost determinată prin ICP-MS.

Analiza imaginilor IRM (aceste date nu sunt prezentate) obținute pe peletele celulare după 6 ore de incubare, arată o mică intensificare a semnalului comparativ cu martorul. Intensitatea semnalului crește proporțional cu concentrația de Gd, așa cum s-a arătat prin studiul de internalizare și măsurătorile ICP-MS. În acest caz, creșterea intensității semnalului cauzată de prezența GosAa în sistemul lipozomal, a fost confirmată prin măsurarea valorilor T_1 cu ajutorul imaginilor IRM, fiind în bună concordanță cu rezultatele obținute din profilele NMRD (Tabel 15).

Tabel 15. Valorile T_1 și procentului de descreștere a T_1 măsurate la 7 T pe peletele celulare TSA

Proba	T_1 (ms)	Procent descreștere T_1 (%)	Proba	T_1 (ms)	Procent descreșterea T_1 (%)
(1) Martor	2632				
L			L-GosAa		
(2) {Gd} 20μM	2421	92	(5) {Gd} 20μM	2274	86
(3) {Gd} 50μM	2344	89	(6) {Gd} 50μM	2243	85
(4) {Gd} 100μM	2307	88	(7) {Gd} 100μM	2127	81

5.4. Concluzii

În acest subcapitol, un nou sistem lipozomal nanodimensionat, încărcat cu gadoteridol și GosAa a fost sintetizat și caracterizat din punct de vedere al stabilității, proprietăților de rezonanță magnetică și a citotoxicității. Lipozomi de aproximativ 100 nm în diametru au fost sintetizați și încărcăți cu o cantitate mare de GosAa comparativ cu transportorii anorganici prezentați în Subcapitolul 4.2 și 4.3. Studiile de stabilitate la depozitare și în plasmă au indicat un comportament acceptabil la 4°C pentru o lună și la 37°C pentru 48 de ore, luând în considerare compromisul necesar alegerii lipidelor pentru o mai bună permeabilitate pentru apă ca agent de contrast în IRM, precum și o bună încărcare cu GosAa. După cum era de așteptat, lipozomii prezintă o mai bună stabilitate la 4°C decât la 37°C. Interesant, GosAa aduce unele avantaje minore sistemului lipozomal, prin creșterea stabilității lipozomilor și prin reducerea cedării Gd. Din punct de vedere a proprietăților relaxometrice, profilele NMRD indică caracteristici similare gadoteridolului pur prezent în interiorul lipozomilor, dar prezența GosAa determină o creștere a valorilor relaxivității și probabil o legare chimică între GosAa și gadoteridol, fapt sugerat de schimbarea formei profilului NMRD. Cum s-a dovedit și pentru SiGd-NPs anorganice, încărcarea GosAa într-un sistem de transport lipozomal determină o cedare prelungită a acestuia în mediul exterior, fapt dovedit de rezultatele obținute prin studiile de citotoxicitate. Experimentul de internalizare *in vitro*, realizat pe celulele TSA au demonstrat o internalizare moderată a lipozomilor paramagnetici spre deosebire de transportorii anorganici discutați în subcapitolele anterioare. Valorile T_1 obținute din imaginile IRM subliniază încă o dată efectul GosAa asupra creșterii relaxivității.

6. CONCLUZII GENERALE

Patru sisteme de transport a medicamentelor au fost preparate și caracterizate folosind diferite metode de analiză.

În primul rând, extractul din semințe de *Gossypium hirsutum* a fost nano-încapsulat în microparticulele silicice. Procesul de uscare a influențat atât microparticulele silicice gazdă cât și extractul din plantă. S-a putut observa o nanoparticularizare a silicei, specii de silice cu dimensiuni nanometrice, pasivate cu hidrogen, putând fi identificate, datorită unei fluorescențe mărite în probele silicice pure. Extractul din plantă încapsulat în matricea silicică determină o creștere a fluorescenței specifice extractului. Din punct de vedere a profilului de cedare și a modelelor cinetice aplicate, sistemul testat prezintă o cedare

prelungită caracterizată în principal de difuzie, iar cantitatea eliberată a crescut în prezența unui mediu de eliberare cu pH crescut și pentru probele uscate prin liofilizare.

În al doilea rând, s-a încărcat gosipol pe microparticulele gadolino-silicatică preparate prin metoda sol-gel, la două valori diferite ale pH-ului. pH-ul folosit a afectat cantitatea de gosipol încărcată și structura tautomerică a acestuia. pH-ul acid determină o încărcare mai substanțială de gosipol în forma sa tautomerică aldehydică. În ceea ce privește structura gadolino-silicatică, s-a arătat că gadoliniul tinde să se concentreze în interiorul particulelor și să formeze clusteri. Măsurătorile IRM au arătat că probele preparate în condiții acide precum și încărcarea gosipolului pe microparticule, determină reducerea timpului de relaxare.

În al treilea rând, gosipol acid acetic a fost încărcat pe nanoparticule gadolino-silicatică preparate prin metoda sol-gel cu ajutorul surfactanților și a polimerilor. Această metodă de sinteză a determinat obținerea de particule gadolino-silicatică nanometrice, cu clusteri de gadoliniu în interior. În ciuda pH-ului bazic folosit pentru a sintetiza aceste nanoparticule, capacitatea de încărcare a gosipolului acid acetic a fost mai mare comparativ cu microparticulele preparate în mediu acid, datorită suprafeței specifice și a volumului de pori mari, a sonicării, precum și a multiplelor încărcări aplicate în procesul de sinteză. Studiile de relaxivitate au dezvăluit un comportament caracteristic macromoleculor cu relaxivitate mare la câmpuri magnetice înalte. Încă o dată, gosipolul acid acetic a cauzat o creștere a relaxivității sistemului testat. Studiile de cedare și profilele cinetice aplicate au indicat o cedare prelungită, cauzată în principal de difuzie. Cedarea prelungită a gosipolului acid acetic, cu efect anticanceros, a fost dovedită de studiile de citotoxicitate. Studiile de internalizare *in vitro*, au indicat o preluare crescută a nanoparticulelor testate de către celule.

În al patrulea rând, gosipolul acid acetic a fost internalizat în pereții lipozomilor încărcăți cu gadoteridol. S-au obținut lipozomi cu dimensiuni nanometrice și cu stabilitate la depozitare și în plasmă acceptabile. Prezența părții lipofilice din structura lipozomilor a cauzat o bună încărcare cu gosipol acid acetic, comparativ cu sistemele anorganice prezentate anterior. Prezența gosipolului acid acetic în pereții lipozomilor oferă stabilitate suplimentară și proprietăți relaxometrice îmbunătățite. Caracterul de cedare prelungit a gosipolului din sistemul lipozomal a fost dovedit de studiile de citotoxicitate. Spre deosebire de transportorii anorganici prezentați anterior, pentru sistemul lipozomal, experimentul de internalizare *in vitro* a indicat o preluare moderată a lipozomilor de către celule.

Prin acest studiu au fost aduse informații noi structurale și funcționale referitoare la sisteme de transport pe bază de lipide, silice, gosipol și compuși de gadolinu cu scopul de a fi utilizați ca sisteme cu cedare prelungită și/sau cu proprietăți teranostice. Studii viitoare sunt necesare pentru a îmbunătăți și mai mult sistemele testate. Pentru început, un nou sistem hibrid lipozomal și silicatic, poate fi luat în considerare, pentru a obține astfel beneficiile lipozomilor de a încărca cantități mari de gosipol și ale particulelor gadolino-silicatic de a avea stabilitate și proprietăți relaxometrice îmbunătățite.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

- [1] P.U. Rani, S. Pratyusha. Defensive role of *Gossypium hirsutum* L. anti-oxidative enzymes and phenolic acids in response to *Spodoptera litura* F. feeding. J Asia Pac Entomol 2013;16:131-6.
- [2] L. Yildiz-Aktas, S. Dagnon, A. Gurel, E. Gesheva, A. Edreva. Drought tolerance in cotton: Involvement of non-enzymatic scavenging compounds. J Agron Crop Sci 2009;195:247-53.
- [3] K.E. Lege, J.T. Cothren, C.W. Smith. Phenolic acid and condensed tannin concentrations of six cotton genotypes. Environ Exp Bot 1995;35:241-9.
- [4] A. Hashimoto, T. Kameoka. Applications of Infrared spectroscopy to biochemical, food, and agricultural processes. Applied Spectroscopy Reviews 2008;43:416-51.
- [5] Y. Li, S. Sun, Q. Zhou, Z. Qin, J. Tao, J. Wang, X. Fang. Identification of American ginseng from different region using FT-IR and two-dimensional correlation IR spectroscopy. Vib Spectrosc 2004;36:227-32.
- [6] H. Schultz, M. Baranska. Identification and quantification of valuable substances by IR and Raman spectroscopy. Vib Spectrosc 2007;43:13-25.
- [7] S. Zavoi, F. Fetea, F. Ranga, R.M. Pop, A. Baciuc, C. Socaciu. Comparative fingerprint and extraction yield of medicinal herb phenolics with hepatoprotective potential, as determined by UV-Vis and FT-MIR spectroscopy Not Bot Horti Agrobo 2011;39:82-9.
- [8] L. Qiao, Y. Sun, R. Chen, Y. Fu, W. Zhang, X. Li, J. Chen, Y. Shen, X. Ye. Sonochemical effects on 14 flavonoids common in citrus: Relation to stability. Plos One 2014;9:e87766.
- [9] W.J. Sandberg, M. Låg, J.A. Holme, B. Friede, M. Gualtieri, M. Kruszewski, P.E. Schwarze, T. Skuland, M. Refsnes. Comparison of non-crystalline silica nanoparticles in IL-1 β release from macrophages. Part Fibre Toxicol 2012;9:1-13.
- [10] D. Quintanar-Guerrero, A. Ganem-Quintanar, M.G. Nava-Arzaluz, E. Piñón-Segundo. Silica xerogels as pharmaceutical drug carriers. Expert Opin Drug Del 2009;6:485-98.
- [11] C. Pinto Reis, R.J. Neufeld, A.J. Ribeiro, F. Veiga. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. Nanomed-Nanotechnol 2006;2:8-21.
- [12] S. Ek, A. Root, M. Peussa, L. Niinisto. Determination of the hydroxyl group content in silica by thermogravimetry and a comparison with ^1H MAS NMR results. Thermochim Acta 2001;379:201-12.
- [13] I. Lacatusu, N. Badea, D. Bojin, S. Iosub, A. Meghea. Novel fluorescence nanostructured materials obtained by entrapment of an ornamental bush extract in hybrid silica glass. J Sol-Gel Sci Technol 2009;51:84-91.
- [14] G.R. Gamble, J.A. Foulk. Quantitative analysis of cotton (*Gossypium hirsutum*) lint trash by fluorescence spectroscopy. J Agr Food Chem 2007;55:4940-3.
- [15] D.A. Eckhoff, J.D.B. Sutin, R.M. Clegg, E. Gratton, E.V. Rogozhina, P.V. Braun. Optical characterization of ultrasmall Si nanoparticles prepared through electrochemical dispersion of bulk Si. J Phys Chem B 2005;109:19786-97.
- [16] J.R. Lakowicz. Quenching of fluorescence. In: Lakowicz J, editor. Principles of fluorescence spectroscopy: Springer US; 2006. p. 277-330.

- [17] D. Teoli, L. Parisi, N. Realdon, M. Guglielmi, A. Rosato, M. Morpurgo. Wet sol-gel derived silica for controlled release of proteins. *J Control Release* 2006;116:295-303.
- [18] Z. Wu, H. Joo, I.S. Ahn, J.H. Kim, C.K. Kim, K. Lee Design of doped hybrid xerogels for a controlled release of brilliant blue FCF. *J Non-Cryst Solids* 2004;342:46-53.
- [19] E. Verraedt, M. Pendela, E. Adams, J. Hoogmartens, J.A. Martens Controlled release of chlorhexidine from amorphous microporous silica. *J Control Release* 2010;142:47-52.
- [20] S. R. Veith, E. Hughes, S.E. Pratsinis. Restricted diffusion and release of aroma molecules from sol-gel-made porous silica particles. *J Control Release* 2004;99:315-27.
- [21] R.H. Muller, C. Jacobs, O. Kayser. Nanosuspensions as particulate drug formulations in therapy Rationale for development and what we can expect for the future. *Advanced drug delivery reviews* 2001;47:3-19.
- [22] L.C. Weiss, D.P. Thibodeaux. Electrodynamic method for separating components. Google Patents; 1985.
- [23] J. Reyes, J. Allen, N. Tanphaichitr, A. R. Bellve, D. J. Benos Molecular mechanisms of gossypol action on lipid membranes. *The Journal of biological chemistry* 1984;259:9607-15.
- [24] M.S. Kuk, R. Tetlow Gossypol removal by adsorption from cottonseed miscella. *Journal of the American Oil Chemists Society* 2005;82:905-9.
- [25] K.N. Campbell, R.C. Morris, R. Adams. The structure of gossypol. I. *Journal of the American Chemical Society* 1937;59:1723-8.
- [26] Y.L. Shen, S.H. Yang, L.M. Wu, X.Y. Ma. Study on structure and characterization of inclusion complex of gossypol/beta cyclodextrin. *Spectrochimica Acta Part A-Molecular Spectroscopy* 2005;61:1025-8.
- [27] B. Brzezinski, J. Olejnik, S. Paszyc. Fourier transform infrared study on the identification of gossypol tautomers. *Journal of Molecular Structure* 1990;239:23-31.
- [28] M.E.S. Mirghani, Y.B. Che Man. A new method for determining gossypol in cottonseed oil by FTIR spectroscopy. *Journal of the American Oil Chemists Society* 2003;80:625-8.
- [29] B. Brzezinski, B. Marciniak, S. Paszyc, G. Zundel. The tautomerization of gossypol as a function of the presence of Ni²⁺, Cu²⁺ or Zn²⁺ cations. *Journal of Molecular Structure* 1992;268:61-6.
- [30] B. Brzezinski, S. Paszyc, G. Zundel. The structure of Gossypol as a function of the presence of H₂AuCl₄ and of Be²⁺ ions. *Journal of Molecular Structure* 1991;246:45-51.
- [31] P. Przybylski, G. Bejcar, W. Schilf, B. Kamienski, B. Brzezinski. ¹³C, ¹⁵N CP-MAS as well as FT-IR studies of gossypol derivatives with aromatic substituents in solid. *Journal of Molecular Structure* 2007;826:150-5.
- [32] N.S. Ilkevycha, G. Schroeder, V.I. Rybachenko, K.Y. Chotiy, R.A. Makarova. Vibrational spectra, structure and antioxidant activity of gossypol imine derivatives. *Spectrochimica Acta Part A* 2012;86:328-35.
- [33] S. Simon, I. Ardelean, S. Filip, I. Bratu, I. Cosma. Structure and magnetic properties of Bi₂O₃-GeO₂-Gd₂O₃ glasses. *Solid State Communications* 2000;116:83-6.
- [34] K. Sinkó. Influence of chemical conditions on the nanoporous structure of silicate aerogels. *Materials* 2010;3:704-40.
- [35] S. Simon, R.V.F. Turcu, T. Radu, M. Moldovan, V. Simon. Multispectroscopic investigation of silanised glass particles for dental fillers. *Journal of Optoelectronics and Advanced Materials* 2009;11:1660-70.
- [36] O. Ponta, C. Gruian, E. Vanea, B. Oprea, H.J. Steinhoff, S. Simon. Nanostructured biomaterials/biofluids interface processes: titanium effect on methaemoglobin adsorption on titanosilicate microspheres. *Journal of Molecular Structure* 2013;1044:2-9.
- [37] C.A. Milea, C. Bogatu, A. Duță. The influence of parameters in silica sol-gel process. *Bulletin of the Transilvania University of Braşov* 2011;4:59-66.
- [38] A. Puri, K. Loomis, B. Smith, J.H. Lee, A. Yavlovich, E. Heldman, R. Blumenthal. Lipid-based nanoparticles as pharmaceutical drug carriers: from concepts to clinic. *Critical Reviews In Therapeutic Drug Carrier Systems* 2009;26:523-80.

- [39] Z. Wang, B. Chen, G. Quan, F. Li, Q. Wu, L. Dian, Y. Dong, G. Li, C. Wu. Increasing the oral bioavailability of poorly water-soluble carbamazepine using immediate-release pellets supported on SBA-15 mesoporous silica. *International journal of nanomedicine* 2012;7:5807-18.
- [40] D. Halamová, M. Badanicová, V. Zelenák, T. Gondová, U. Vainioc. Naproxen drug delivery using periodic mesoporous silica SBA-15. *Applied Surface Science* 2010;256:6489-94.
- [41] M.A. Ballem, F. Söderlind, P. Nordblad, P.-O. Käll, M. Odéna. Growth of Gd₂O₃ nanoparticles inside mesoporous silica frameworks. *Microporous And Mesoporous Materials* 2013;168:221-4.
- [42] S. Aime, D. Delli Castelli, S. Geninatti Crich, E. Gianolio, E. Terreno. Pushing the sensitivity envelope of lanthanide-based magnetic resonance imaging (mri) contrast agents for molecular imaging applications. *Accounts of Chemical Research* 2009;42:822-31.
- [43] S. Aime, M. Botta, M. Fasano, E. Terreno. Lanthanide(III) chelates for NMR biomedical applications. *Chemical Society reviews* 1998;27:19-29.
- [44] Y. Shao, X. Tian, W. Hu, Y. Zhang, H. Liu, H. He, Y. Shen, F. Xie, L. Li. The properties of Gd₂O₃-assembled silica nanocomposite targeted nanoprobe and their application in MRI. *Biomaterials* 2012;33:6438-46.
- [45] C.R. Kim, J.S. Baeck, Y. Chang, J.E. Bae, K.S. Chaecd, G.H. Lee. Ligand-size dependent water proton relaxivities in ultrasmall gadolinium oxide nanoparticles and in vivo T1 MR images in a 1.5 T MR field. *Physical Chemistry Chemical Physics* 2014;16:19866-73.
- [46] C. V. Moraru, E. Vanea, K. Magyari, M. Tamasan, A. S. Farcasanu, F. Loghin, S. Simon. Silica-gadolinium particles loaded with gossypol for simultaneous therapeutic effect and MRI contrast enhancement. *J Sol-Gel Sci Techn* 2014;72:593-601.
- [47] S. Dumas, V. Jacques, W.C. Sun, J. S. Troughton, J. T. Welch, J. M. Chasse, H. Schmitt-Willich, P. Caravan. High relaxivity MRI contrast agents part 1: Impact of single donor atom substitution on relaxivity of serum albumin-bound gadolinium complexes. *Investigative Radiology* 2010;45:600-12.
- [48] V. Jacques, S. Dumas, W.C. Sun, J.S. Troughton, M.T. Greenfield, P. Caravan. High relaxivity MRI contrast agents part 2: Optimization of inner and second-sphere relaxivity. *Investigative Radiology* 2010;45:613-24.
- [49] S. Dash, P. Narasimha Murthy, P. Chowdhury. Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. *Acta Poloniae Pharmaceutica* 2010;67:217-23.
- [50] S. Ullah Shah, K. Ullah Shah, A. Rehman, G.M. Khan. Investigating the in vitro drug release kinetics from controlled release diclofenac potassium-ethocel matrix tablets and the influence of co-excipients on drug release patterns. *Pak J Pharm Sci* 2011;24:183-92.
- [51] M. Ionov, I. Tukfatullina, B. Salakhutdinov, N. Baram, M. Bryszewska, T. Aripov. The interaction of PVP complexes of gossypol and its derivatives with an artificial membrane lipid matrix. *Cellular and Molecular Biology Letters* 2010;15:98-117.
- [52] B. Heurtault, P. Saulnier, B. Pech, J. E. Proust, J.P. Benoit. Physico-chemical stability of colloidal lipid particles. *Biomaterials* 2003;24:4283-300.
- [53] G. Zhai, J. Wu, X. Zhao, B. Yu, H. Li, Y. Lu, W. Ye, Y.C. Lin, R.J. Lee. A liposomal delivery vehicle for the anticancer agent gossypol. *Anticancer Research* 2008;28:2801-6.
- [54] E. Terreno, A. Sanino, C. Carrera, D. Delli Castelli, G. B. Giovenzana, A. Lombardi, R. Mazzon, L. Milone, M. Visigalli, S. Aime. Determination of water permeability of paramagnetic liposomes of interest in MRI field. *Journal of Inorganic Biochemistry* 2008;102:1112-9.
- [55] K. Ghaghada, C. Hawley, K. Kawaji, A. Annapragada, S. Mukundan. T1 relaxivity of core-encapsulated gadolinium liposomal contrast agents—effect of liposome size and internal gadolinium concentration. *Academic Radiology* 2008;15:1259-63.
- [56] M. Filippi, J. Martinelli, G. Mulas, M. Ferraretto, E. Teirlinck, M. Botta, L. Tei, E. Terreno. Dendrimersomes: a new vesicular nano-platform for MR-molecular imaging applications. *Chemical Communications* 2014;50:3453-6.

ANEXE

Lucrări publicate în reviste cotate ISI

1. **C.V. Moraru**, E. Vanea, K. Magyari, M. Tamasan, A. S. Farcasanu, F. Loghin, S. Simon
Silica-gadolinium particles loaded with gossypol for simultaneous therapeutic effect and MRI contrast enhancement.
J Sol-Gel Sci Technol, 2014, 72, (3), 593-601.
2. E. Vanea, **C. Moraru**, A. Vulpoi, S. Cavalu, V. Simon.
Freeze dried and spray-dried zinc-containing silica microparticles entrapping insulin
Journal of Biomaterials Applications, 2014, 28, (8), 1190-1199.

Lucrări publicate în reviste cotate BDI

1. E. Vanea, **C. Moraru**, S. Muresan, R. Moldovan, A. Filip, A. Muresan, S. Simon
High field MRI investigation of eye structures after UV-B irradiation.
Studia UBB Physica, 2013, 58, (LVIII), 2, 67-74.
2. E. Vanea, C. Gruian, L. Păţcaş, **C. V. Moraru**, V. Simon
Preliminary study regarding the biocompatibility of some new biomaterials designed for synergic hyperthermia/radiotherapy applications.
Studia UBB Physica, 2013, 58, (LVIII), 1, 67-76.

Lucrări trimise spre publicare

1. **C.V. Moraru**, K. Magyari, M. Tamasan, S. Suarasan, D. Muntean, L. Vlase, F. Loghin, S. Simon
Synthesis and characterisation of *Gossypium hirsutum* seeds extract nanoencapsulated in silica microparticles.
Journal of Controlled Release

Participări la conferinţe

1. A. Berar, A. Kui, **C. Moraru**, A. Farcasanu, F. Turcu, L. Lascu, S. Simon, R. S. Campian.
Imaging and histopatological evaluation of induced experimentally periapical lesions in rats.
University of Medicine and Pharmacy days "Iuliu Haţieganu" Cluj-Napoca, Romania, 2.12-5.12, 2014
2. **C.V. Moraru**, E. Vanea, M. Tamasan, K. Magyari, A. S. Farcasanu, F. Loghin, S. Simon. Multi functional silica-gadolinium particles loaded with gossypol for theranostic application. Advanced Spectroscopies on Biomedical and Nanostructured Systems, Cluj-Napoca, Romania, 7.09-10.09, 2014.
3. **C.V. Moraru**, E. Vanea, C. Gruian, M. Tamasan, K. Magyari, O. Ponta, A. Vulpoi, F. Loghin, S. Simon. Bovine serum albumin functionalized silica-gadolinium nanoparticles embedded with gossypol as theranostic compounds. ESCDD - 13th European Symposium on Controlled Drug Delivery, Egmond aan Zee, Holland, 16.04-18.04, 2014.
4. E. Vanea, C. Gruian, L. Păţcaş, **C.V. Moraru**, V. Simon. EPR investigation of protein adsorption onto biomaterials designed for dual hyperthermia/radiotherapy applications. Bioceramics 25, 25th Symposium and Annual Meeting of International Society for Ceramics in Medicine. Bucuresti, Romania. 07.11-10.11, 2013.
5. **C.V. Moraru**, S. Suarăsă, E. Vanea, S. Simon. Structural analysis of silica and silica-gadolinium xerogels loaded with *Gossypium hirsutum* seeds extract. Bioceramics 25, 25th Symposium and Annual Meeting of International Society for Ceramics in Medicine. Bucuresti, Romania. 07.11-10.11, 2013.
6. E. Vanea, **C. Morar**, S. Cavalu, V. Simon. Insulin Entrapment and release from zinc-containing silica microparticles. 3rd Termis world congress. Wien, Austria 05.09.08.09, 2012.
7. **C.V. Moraru**, E. Vanea, F. Loghin, S. Simon. Structural analysis of gossypol loaded silica-gadolinium particles intended for cancer treatment. 5th International Conference Biomaterials, Tissue Engineering & Medical Devices. Constanţa, Romania 24.08-01.09, 2012.

MULȚUMIRI

Partea practică a acestei teze a fost realizată, în principal, în cadrul Institutului de Cercetări Interdisciplinare în Bio-Nano-Științe și a Centrului Național de Rezonanță Magnetică din cadrul Universității Babeș-Bolyai, Cluj-Napoca, precum și în cadrul Centrului de Biotehnologie Moleculară, Universitatea Torino, Italia și a Departamentului de Tehnică Farmaceutică și Biofarmacie, Facultatea de Farmacie, Cluj-Napoca.

Aș vrea să îmi exprim sincera recunoștință coordinatorilor Prof. Dr. Simion Simon și Prof. Dr. Felicia Loghin pentru îndrumarea, înțelegerea, atenția și sprijinul lor pe tot parcursul acestei cercetări. Aș dori să-mi extind recunoștința pentru Prof. Dr. Todica Mihai, Conf. Dr. Lucian Baia și Conf. Dr. Raluca Ciceo-Lucăcel, membri a comisiei de îndrumare, pentru furnizarea de sfaturi și recomandări de neprețuit.

De asemenea, aș vrea să mulțumesc membrilor anteriori și actuali din grupul Institutului de Cercetări Interdisciplinare în Bio-Nano-Științe pentru ajutorul oferit pentru măsurători și interpretarea rezultatelor.

Aș vrea de asemenea să mulțumesc membrilor Centrului Național de Rezonanță Magnetică din cadrul Universității Babeș-Bolyai, Cluj-Napoca pentru ajutorul și sfaturile valoroase.

Sunt recunoscătoare Prof. Dr. Silvio Aime pentru oportunitatea de a lucra cu grupul de cercetare din cadrul Centrului de Biotehnologie Moleculară din Torino. Mulțumiri deosebite tuturor membrilor centrului pentru toate discuțiile și ajutorul oferit, în special Dr. Eliana Gianolio pentru interesul și sprijinul manifestat pentru acest studiu.

Aprecieri deosebite sunt oferite Prof. Dr. Sorin Leucuța, Prof. Dr. Marcela Achim și Prof. Dr. Laurean Vlase din cadrul Departamentului de Tehnică Farmaceutică și Biofarmacie, Facultatea de Farmacie, Cluj-Napoca pentru sfaturile, măsurătorile și substanțele oferite pentru acest studiu.

Mulțumiri sunt oferite Prof. Dr. Daniela Popa pentru discuțiile valoroase asupra studiului și Prof. Dr. Arno Gutleb pentru studiile *in vitro* realizate în Luxembourg în cadrul Centrului Public de Cercetare "Gabriel Lippmann", Departamentul Mediul Înconjurător și Agro-Biotehnologii.

Ofer multe mulțumiri Prof. Dr. Simona Mirel pentru oportunitatea de a lucra cu dânsa și pentru sprijinul oferit.

Această lucrare a fost posibilă prin sprijinul financiar oferit de Programul Operațional Sectorial Dezvoltarea Resurselor Umane 2007-2013, cofinanțat prin Fondul Social European, în cadrul proiectului POSDRU/159/1.5/S/132400, cu titlul „Tineri cercetători de succes – dezvoltare profesională în context interdisciplinar și internațional” și a proiectului BIOMAPIN PCCE-101/2008 finanțat de the Consiliului Național al Cercetării Științifice Universitare.

În final, sunt recunoscătoare părinților, surorii și în special soțului pentru sprijinul oferit pe parcursul tuturor acestor ani.