

Universitatea Babeş-Bolyai

Facultatea de Fizică

Rezumatul tezei de doctorat

**Nanoparticule de aur acoperite cu gelatină și
încărcate cu medicamente pentru a îndeplini
funcții terapeutice și imagistice multimodale**

Sorina-Maria Suărășan

**Coordonator științific
Prof. Dr. Simion Aștilean**

**CLUJ-NAPOCA
2015**

Cuprins

Prezentare generală.....	3
Part I Introducere și Documentare Bibliografică	
Capitolul 1: Documentare Bibliografică	
1.1. Introducere	4
1.2. Metode de sinteză a nanoparticulelor de aur	4
1.3. Proprietățile nanoparticulelor de aur	5
1.4. Aplicații biomedicale ale nanoparticulelor de aur.....	5
1.4.1. Nanoparticulele de aur în aplicații de biodetecție	5
1.4.2. Nanoparticulele de aur în imagistică.....	6
1.4.3. Nanoparticulele de aur în livrarea medicamentelor	6
1.4.4. Alte aplicații biomedicale ale nanoparticulelor de aur	6
1.5. Nanoparticulele de aur în detecția, imagistica și tratamentul cancerului	6
Partea II Rezultate și Discuții	
Capitolul 2: Bioconjugate gelatină-nanoparticule de aur: formare, stabilitate și încorporare de funcții terapeutice	
2.1. Funcționalizarea nanoparticulelor de aur	7
2.1.1. Caracterizarea bioconjugatelor gelatină@AuNPs.....	7
2.1.2. Analiza FT-IR a interacțiunii gelatină-AuNPs.....	9
2.2. Bioconjugatele gelatină@AuNPs ca substrat active SERS	10
2.3. Bioconjugatele gelatină@AuNPs ca substrat pentru încărcarea inhibitorilor FLT3	11
Capitolul 3: Sinteza directă și controlată a nanoparticulelor de aur în prezența gelatinei	
3.1. Biosinteza nanoparticulelor de aur	13
3.1.1. Ajustarea formei și dimensiunii AuNPs în funcție de concentrația de gelatină.....	13
3.2. Creșterea și caracterizarea nanoparticulelor de aur	14
3.2.1. Efectul concentrației de gelatină asupra creșterii și morfologiei AuNPs.....	14
3.2.2. Efectul temperaturii de sinteză asupra creșterii nanoparticulelor	15
3.3. Stabilitatea nanoparticulelor acoperite cu gelatină.....	17
3.3.2. Stabilitatea AuNPs în mediu fiziologic simulat și în mediu celular	17
Capitolul 4: Studiul biocompatibilității și a efectelor biologice ale nanoparticulelor de aur învelite în gelatină asupra celulelor Osteoblast	
4.1. Internalizarea nanoparticulelor de aur în celulele osteoblast	18
4.2. Efectul nanoparticulelor asupra proliferării celulelor osteoblast	19
4.3. Efectul nanoparticulelor de aur asupra diferențierii celulelor osteoblast.....	20
Capitolul 5: Realizarea și validarea <i>in vitro</i> a unui nou nano-sistem chimioterapeutic cu eliberare controlată pH a agentului terapeutic Doxorubicină	
5.1. Caracterizarea nano-sistemului chimioterapeutic	22
5.2. Eliberarea DOX din nano-sistemul chimioterapeutic	24
5.3. Efectul nano-sistemului chimioterapeutic asupra liniei celulare de cancer mamar MCF-724	
5.3.1. Înglobarea DOX-AuNPs@gelatină de către celulele MCF-7	24
5.3.2. Eliberarea intracelulară a DOX din AuNPs@gelatină.....	25
5.3.3. Citotoxicitatea <i>in vitro</i> a nano-sistemului chimioterapeutic DOX-AuNPs@gelatină..	30
Capitolul 6: Concluzii finale și perspective	
Partea III Anexe	

Prezentare generală

Scopul acestei teze este proiectarea unor noi structuri plasmonice de nanoparticule de aur (AuNPs) ca agenți biomedicali multimodali eficienți. Ne-am axat pe două aplicații majore ale AuNPs: în medicina regenerativă și în tereapia cancerului.

Teza mea este structurată în trei părți care conțin șase capitole. **Partea I**, intitulată **Introducere și Documentare Bibliografică** constă din **Capitolul 1** care prezintă unele aspecte generale legate de metode de sinteză, proprietăți și aplicații biomedicale ale AuNPs.

Următoarele capitole din **Partea II** prezintă rezultatele obținute în timpul cercetării doctorale la *Centrul de Nanobiofonică* din cadrul *Institutului de Cercetări Interdisciplinare în Bio-nano-științe* al Universității Babeș-Bolyai, în colaborare cu *Laboratorul de Radioterapie, Radiobiologie și Biologie Tumorală* din cadrul *Institutului Oncologic "Prof. Dr. Ion Chiricuță"*, Cluj-Napoca, România.

Capitolul 2 prezintă o abordare ecologică pentru stabilizarea și biocompatibilizarea AuNPs reduse în prezența citratului de sodiu în soluție apoasă, cu scopul de a îmbunătăți proprietățile și aplicațiile biomedicale ale acestora. Am obținut două clase de bioconjugate: una operațională ca substrat pentru amplificarea împrăștierii Raman (SERS) și cealaltă utilă ca platforme de încărcare a diferitor inhibitori FLT3, medicamente utilizate în tratamentul leucemiei.

În **Capitolul 3**, cu scopul de a combina proprietățile unice ale AuNPs cu funcționalitatea gelatinei, dar fără a folosi agenți de reducere și stabilizare toxici, propunem o nouă metodă de a biosintetiza AuNPs. Exploatând avantajul biopolimerului gelatină de a funcționa ca agent unic de reducere, creștere și stabilizare în soluție apoasă a HAuCl_4 , am reușit să controlăm atât dimensiunea cât și forma nanoparticulelor, prin schimbarea parametrilor de sinteză.

În continuare, în **Capitolul 4** pentru a investiga interacțiunea AuNPs cu celulele osteoblast, am selectat cele mai mici AuNPs sferice sintetizate anterior, notate AuNPs@gelatină. AuNPs standard acoperite cu citrat având formă și dimensiuni similare au fost utilizate ca și control. Rezultatele au arătat faptul că atât proliferarea cât și diferențierea celulelor osteoblast au crescut în prezența concentrațiilor mai ridicate de AuNPs@gelatină.

Capitolul 5 descrie fabricarea unui nou nano-sistem chimioterapeutic bazat pe AuNPs@gelatină încărcate cu medicamentul chimioterapeutic Doxorubicină. Am testat eficiența *in vitro* a complexului DOX-AuNPs@gelatină obținut pe linia de celule de cancer mamar MCF-7 cu ajutorul microscopiei de împrăștiere în câmp întunecat, a microscopiei de fluorescență, de fluorescență rezolvată temporal (FLIM), a spectroscopiei SERS și a testului MTT.

Ultimul capitol al tezei, **Capitolul 6**, cuprinde concluziile și perspectivele studiilor mele.

Partea III prezintă anexele acestei teze.

Cuvinte cheie: nanoparticule de aur, gelatină, biosinteză, terapia cancerului, Doxorubicină, culturi celulare, plasmoni de suprafață, microscopie de fluorescență, FLIM, SERS

Part I

Introducere și Documentare Bibliografică

Capitolul 1

Documentare Bibliografică

1.1. Introducere

Având în vedere proprietățile, ușurința sintezei și funcționalizarea AuNPs, acestea sunt în prezent considerate drept cărămizi pentru multe materiale și dispozitive nanostructurate [1]. AuNPs permit dezvoltarea unor nanomateriale sofisticate, complexe ce combină proprietățile diferitelor materiale organice și anorganice care ulterior pot acționa într-o manieră sinergică într-un nano-sistem capabil să treacă toate barierele din corpul uman [2] pentru a repara țesuturile deteriorate și a restabili funcția acestora. Aceste noi materiale au dat naștere la un nou domeniu – nanomedicina – axat în primul rând pe dezvoltarea unor noi nano-sisteme care permit simultan diagnosticul, imagistica și terapia [3], utile în special pentru tratamentul personalizat al cancerului [4].

1.2. Metode de sinteză a nanoparticulelor de aur

Cea mai populară metodă de sinteză a AuNPs sferice este metoda Turkevich care presupune reducerea HAuCl_4 cu citrat de sodiu în soluție apoasă la temperatura de fierbere. În funcție de aplicația dorită, folosind această metodă pot fi obținute nanoparticule de diferite dimensiuni având diametrul cuprins între 10 și 150 nm, doar variind raportul celor doi reactanți.

Printre alte metode pentru sinteza AuNPs se numără metoda Brust-Schiffrin utilizată pentru a produce AuNPs foarte mici în lichide organice sau strategii ce utilizează agenți de acoperire care sunt în măsură să controleze ratele de creștere ale diferitor semințe pentru a obține nanoparticule de metal anizotrope, cum ar fi bastonașe, triunghiuri, stele sau flori.

Deși aceste metode oferă nanoparticule de înaltă calitate, acestea folosesc unii agenți chimici (de exemplu, citratul de sodiu sau borohidrura de sodiu), cunoscuți pentru potențiale riscuri biologice, ce prezintă doar o stabilitate limitată a AuNPs în medii biologice și care mai mult necesită purificarea și biocompatibilizarea AuNPs, pentru a fi utilizate în aplicații biologice/biomedicale.

Cu toate acestea, protocoalele de "chimie verde" au câștigat din ce în mai mult interes în domeniul sintezei NPs datorită materialelor ecologice folosite. De exemplu, protocoalele de sinteză care utilizează bacterii, ciuperci sau drojzii precum și aminoacizi, vitamine, biopolimeri, plante vii sau extracte de plante sunt capabile nu numai să reducă ionii metalici în forme și dimensiuni ale AuNPs bine definite dar ulterior acoperă și protejază NPs formate, în timp ce le

conferă o suprafață funcționalizată [5], într-un singur pas. Prin urmare, biosinteza AuNPs maximizează eficiența și siguranța reacțiilor în timp ce reduce riscurile pentru mediu.

1.3. Proprietățile nanoparticulelor de aur

În domeniul de scară nanometrică, datorită ariei mari de suprafață sau a efectului cuantic, proprietățile fizice și chimice ale materialelor se modifică drastic rezultând unele proprietăți unice. Aceste caracteristici distinctive apar datorită oscilațiilor colective ale electronilor liberi în urma excitării, cunoscute sub numele de rezonanțe plasmonice de suprafață localizate (LSPR). Banda LSPR a AuNPs este extrem de dependentă de mărimea, chimia suprafeței și mediul local din jurul AuNPs, fiind astfel o sondă utilă pentru a monitoriza interacțiunea nanoparticulelor cu probe biologice. Aceste caracteristici unice pot fi reglate cu precizie pentru a interfera în mod specific cu materia organică cu scopul de a facilita aplicarea acestora în domeniul biomedical.

O altă proprietate importantă a AuNPs este câmpul electromagnetic amplificat generat în jurul suprafeței acestora. Acest câmp electromagnetic poate amplifica atât fluorescența unei molecule aflată în proximitatea unei nanoparticule cât și semnalul Raman al moleculelor de pe suprafața metalică.

1.4. Aplicații biomedicale ale nanoparticulelor de aur

Având în vedere versatilitatea AuNPs care oferă materiale complexe, acestea au numeroase aplicații în nanomedicină, cum ar fi livrarea specifică a medicamentelor și genelor, în genomică, biosenzoristică, biodetecție sau bioimagistică optică.

1.4.1. Nanoparticulele de aur în aplicații de biodetecție

Cea mai simplă metodă de detecție bazată pe nanotehnologie este detecția colorimetrică. Aceasta are la bază interacțiunea/legarea dintre AuNPs funcționalizate și analiți, interacțiune care induce agregarea AuNPs și modificarea vizuală ulterioară a culorii de la roșu la albastru.

Biodetecția bazată pe modificarea benzii LSPR este o metodă bazată pe schimbarea intensității și poziției spectrale a benzii LSPR indusă de o variație în mediul local al AuNPs, în urma interacțiunilor biospecifice [6]. Această metodă este mai puțin sensibilă decât testele de agregare, și având în vedere că orice moleculă poate induce o schimbare în banda LSPR a AuNPs, metoda este potrivită exclusiv pentru detecția analiților cunoscuți și numai atunci când AuNPs sunt funcționalizate cu elemente de recunoaștere moleculară, cum ar fi anticorpii.

Pentru detecția și identificarea probelor necunoscute, spectroscopia Raman este cea mai potrivită metoda, deoarece este o tehnică foarte specifică, în măsură să identifice specii moleculare bazată pe amprenta lor unică de vibrație Raman. Semnalul Raman poate fi amplificat drastic atunci când analiții sunt adsorbiți pe suprafețe metalice, efect cunoscut sub numele de împrăștiere Raman amplificată de suprafață. Pentru aplicații de biodetecție eficiente este, prin urmare, esențial substratul SERS. În soluție, AuNPs nanosferice agregate sau anizotrope determină formarea de hot-spoturi între nanoparticulele interconectate care amplifică substanțial

semnalul Raman. La fel de important precum forma AuNPs este funcționalizarea și biocompatibilitatea senzorilor care trebuie să permită adsorbția analiților pentru un semnal SERS eficient, stabil și reproductibil.

1.4.2. Nanoparticulele de aur în imagistică

Proprietățile optice și electronice versatile ale AuNPs au permis imagistica celulară cu o varietate de tehnici, inclusiv împrăștierea luminii în câmp întunecat, tomografia coerentă optică (OCT), tomografia computerizată (CT), microscopia de forță atomică (AFM), fluorescență, microscopia electronică de transmisie și baleiaj (TEM, SEM) precum și spectroscopia SERS. Unele dintre aceste tehnici utilizate în prezent permit chiar și imagistica la nivel unicelular.

1.4.3. Nanoparticulele de aur în livrarea medicamentelor

În funcție de funcționalizarea suprafeței, tipul medicamentelor și de aplicațiile dorite, AuNPs pot fi ușor încărcate cu un singur sau mai multe medicamente sau alte molecule fie prin interacțiuni de conjugare covalente sau necovalente. Încărcarea de medicamente pe suprafața AuNPs îmbunătățesc stabilitatea și biodistribuția acestora în medii biologice având în vedere că sunt protejate în agentul de transport care le conferă în plus o viață mai lungă în sistemele biologice și posibilitatea de a fi livrate fie prin metode specifice sau pasive către locul de acțiune.

AuNPs permit încărcarea unei mari cantități de medicament datorită ariei mari de suprafață și chimiei versatile a suprafeței. Mai mult decât atât, activitatea sporită a medicamentelor livrate de AuNPs face posibilă reducerea dozei de medicament administrat și implicit efectele secundare ale acestuia.

1.4.4. Alte aplicații biomedicale ale nanoparticulelor de aur

În terapia fotodinamică (PDT) AuNPs sunt folosite pe scară largă drept agenți de transport a fotosensibilizatorilor în zona de interes. Acolo, fotosensibilizatorului excitat poate produce o specie de oxigen extrem de reactiv, cunoscut sub numele de oxigen singlet care distruge celulele din apropiere.

AuNPs sunt, de asemenea, frecvent utilizate în terapia fototermică (PTT), datorită interacțiunii lor unice cu radiația laser. AuNPs situate în interiorul sau în jurul celulelor țintă, în urma iradierii cu laser absorb energia fonică, care este transformată în energie termică și induc astfel o creștere a temperaturii locale în jurul AuNPs și, prin urmare, deteriorarea acestora [7].

În plus, AuNPs pot fi aplicate pur și simplu ca agenți terapeutici sau antibacterieni eficienți.

1.5. Nanoparticulele de aur în detecția, imagistica și tratamentul cancerului

Cu scopul de a obține rezultate maxime în detecția și tratamentul cancerului cu efecte secundare minime este esențial ca agenții terapeutici să ajungă la locul tumorii și în interiorul celulelor maligne. Medicina convențională, implică de obicei chimioterapia pentru tratarea cancerului, dar, din păcate, agenții chimioterapeutici nu sunt specifici celulelor canceroase și prin

urmare, distrug atât celulele maligne cât și cele normale și este extrem de toxică, având multe efecte secundare nedorite [8]. Nanomedicina, pe de altă parte, face uz de materiale nanostructurate capabile să transporte și să elibereze medicamente chimioterapeutice specific numai la țesutul canceros.

În această secțiune, sunt discutate pe scurt cele mai importante abordări pentru tratamentul cancerului bazat pe AuNPs și medicamentul doxorubicină – un agent chimioterapeutic utilizat pe scară largă cu efecte dovedite împotriva leucemiei, limfoamelor, cancerului de sân, de ovar și a multor tumori solide.

Partea II

Rezultate și Discuții

Capitolul 2

Bioconjugate gelatină-nanoparticule de aur: formare, stabilitate și încorporare de funcții terapeutice

2.1. Funcționalizarea nanoparticulelor de aur

2.1.1. Caracterizarea bioconjugatelor gelatină@AuNPs

Formarea bioconjugatelor gelatină@AuNPs a fost realizată într-un singur pas prin simpla amestecare a 100 μl soluție de gelatină – având diferite concentrații – cu 1 ml de soluție de aur coloidal. Ulterior, am notat ca 0.03gelatină@AuNPs și 10gelatină@AuNPs bioconjugatele preparate în prezența unei concentrații de gelatină de 0.03 și respectiv 10 mg/ml. Probele au fost centrifugate timp de 10 min la 12000 rpm pentru a îndepărta gelatina nelegată iar apoi au fost redispersate în apă ultrapură.

Poziția și forma benzii LSPR au fost analizate pentru a deduce legarea stratului de gelatină pe suprafața AuNPs sintetizate prin reducerea cu citrat și a decide asupra stabilității bioconjugatelor gelatină@AuNPs.

În primul rând, au fost comparate spectrele a două eșantioane reprezentative preparate cu concentrații mici (Figura 2.1.A) și mari (Figura 2.1.B) de gelatină (probele 0.03gelatină@AuNPs și 10gelatină@AuNPs). Am folosit pentru referință banda LSPR a AuNPs acoperite cu citrat (Figura 2.1.A spectrul a) localizată la 520 nm, tipică pentru nanoparticule sferice cu diametrul de 18 ± 2 nm obținut din măsurători TEM și diametru hidrodinamic de 25 nm. Prezența stratului de citrat la suprafața AuNPs de referință este confirmată de potențialul zeta de -31.5 mV.

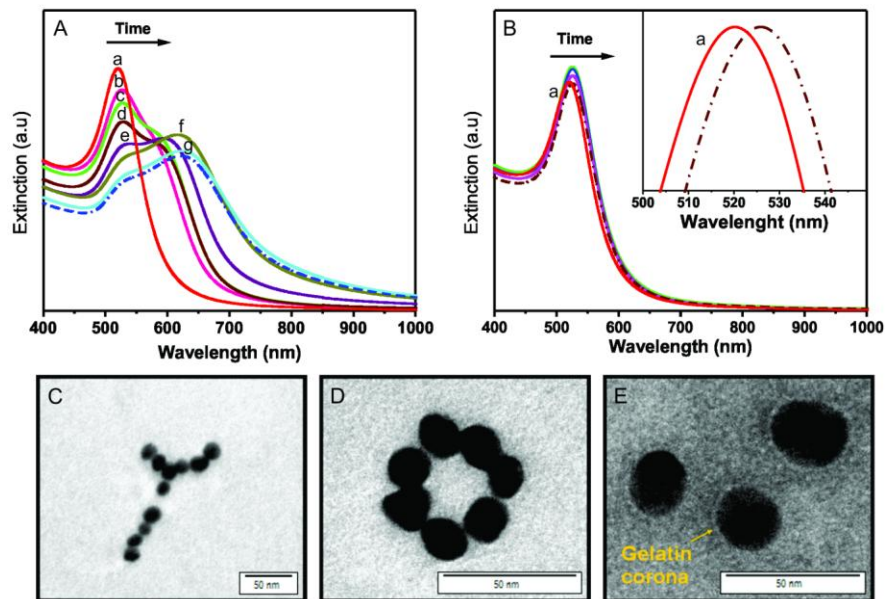


Figure 2.1. A. Evoluția în timp a benzii plasmonice a 0.03gelatină@AuNPs și respectiv B. 10gelatină@AuNPs. C.-D. imaginile TEM a 0.03gelatină@AuNPs și E. 10gelatină@AuNPs, ce prezintă structuri de tip lanț scurt și inele, respectiv AuNPs individuale acoperite cu gelatină

Figure 2.1.A prezintă o selecție de spectre LSPR înregistrate succesiv în timpul procesului de stabilizare a probei 0.03gelatină@AuNPs, care expune două benzi și dezvăluie un proces de agregare controlată. Fenomenul de agregare prin care se formează agregate mici în soluție pe cheltuiala AuNPs libere conduce la formarea unor ansambluri mici de nanoparticule, după cum confirmă imaginile TEM din Figura 2.1.C-D.

În mod similar, am analizat modificările spectrelor LSPR înregistrate la diferite intervale de timp pe parcursul procesului de stabilizare a celei de a doua probe, notată ca 10gelatină@AuNPs (Figura 2.1.B). Prima observație este că procesul de stabilizare este rapid, durează nu mai mult de 15 minute, spre deosebire de aproximativ două zile în cazul 0.03gelatină@AuNPs. Singura modificare observată este o deplasare spre roșu de 5 nm (spectrele și insertul din figura 2.1.B) de la 520 nm la 525 nm, cu aproape nici o schimbare în forma benzii, indicând în mod clar comportamentul nanoparticulelor individuale în soluție. Coroborând dovezile din imaginea TEM (Figura 2.1.E), măsurătorile de împrăștiere dinamică a luminii (DLS) (creșterea diametrului hidrodinamic la 65 ± 5 nm) și măsurătorile de ζ -potențial (creșterea la $+6.44 \pm 2.4$ mV) este confirmată prezența stratului de gelatină pe suprafața AuNPs.

Am investigat, de asemenea, evoluția spectrelor LSPR pentru mai multe probe preparate cu concentrații de gelatină variind de la 0.03 la 10 mg/ml. Toate probele prezintă spectre stabile LSPR (Figura 2.2), după un timp mai scurt sau mai lung de incubare, constând din amestecuri de particule izolate și agregate mici ale căror raporturi pot fi controlate de concentrația de gelatină.

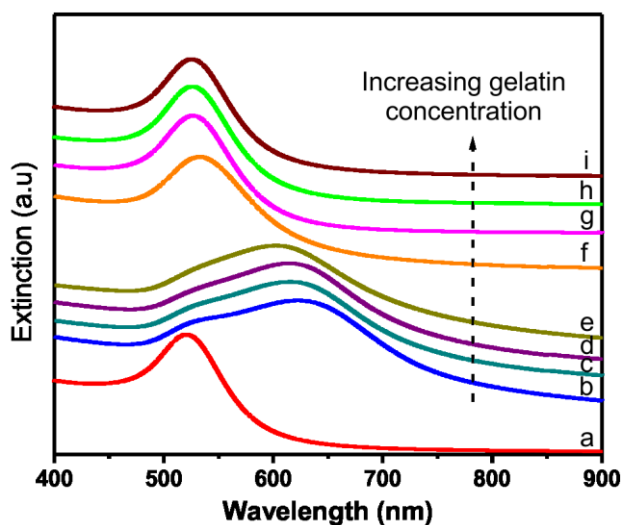


Figure 2.2. Spectrul LSPR al probei de referință (spectrul a) și bioconjugatele gelatină@AuNPs formate în prezența a diferitor concentrații de gelatină: b) 0.03 mg/ml, c) 0.05 mg/ml d) 0.07 mg/ml e) 0.1 mg/ml f) 0.3 mg/ml g) 1 mg/ml h) 5 mg/ml și i) 10 mg/ml

Măsurătorile DLS corespunzătoare furnizează informații suplimentare, confirmând prezența agregatelor cu diametru hidrodinamic mare la concentrație foarte scăzută de gelatină și descreșterea diametrului acestora odată cu creșterea concentrației de gelatină. Sarcina de la suprafața bioconjugatelor, de asemenea variază în funcție de concentrațiile de gelatină până când ajunge la starea de echilibru la o valoare pozitivă $+ 6.44 \pm 2.4$ mV la 10 mg/ml.

2.1.2. Analiza FT-IR a interacțiunii gelatină-AuNPs

Lanțul polimeric al gelatinei prezintă atât amine cât și grupări funcționale carboxil și amide, gelatina fiind încărcată pozitiv la pH fiziologic ceea ce facilitează adsorbția electrostatică la suprafața AuNPs acoperite cu citrat, încărcate negativ.

Detaliile structurii moleculare și interacțiunea specifică a gelatinei cu AuNPs sunt investigate prin spectroscopie FT-IR (Figura 2.3).

Banda amide I, sensibilă la schimbările conformaționale în lanțul gelatinei [9] se deplasează de la 1632 cm^{-1} la 1650 cm^{-1} , ceea ce sugerează faptul că structura secundară a gelatinei s-a schimbat de la structuri β -antiparalele la α -helix, după conjugarea cu AuNPs.

Mai mult, banda amide III observată în cazul gelatinei pure (în principal din cauza vibrațiilor de întindere C–N), dispare în urma legării la suprafața AuNPs. Acest comportament indică blocarea vibrațiilor de întindere datorită coordinării grupărilor funcționale –NH_2 din gruparea amidică la suprafața nanoparticulelor de aur.

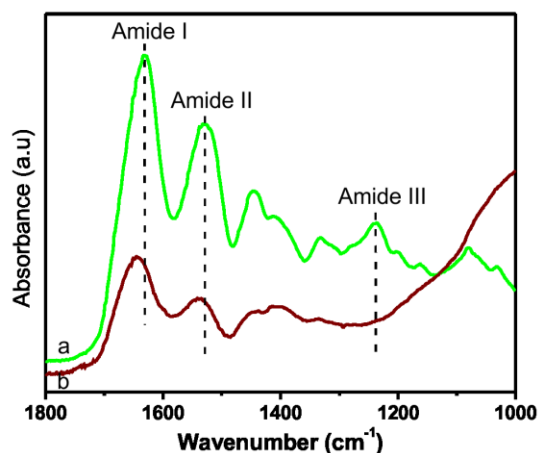


Figure 2.3. Spectrul FT-IR al a) gelatinei și al b) bioconjugatelor 10gelatină@AuNPs

Aceste rezultate sugerează faptul că grupările amide și carboxil pot fi mai ales site-uri active pentru coordonarea cu suprafața AuNPs, indicând în mod clar că nanoparticulele au fost într-adevăr conjugate cu biopolimerul gelatină.

2.2. Bioconjugatele gelatină@AuNPs ca substrate active SERS

Două probe de bioconjugate gelatină@AuNPs (individuale și interconectate) au fost testate ca substrate SERS în soluție de concentrație $3,6 \cdot 10^{-6}$ M Rose Bengal (RB) în urma excitării laser la 532 nm și 633 nm. Nici un semnal Raman nu a fost detectat în soluție de concentrație identică RB ($3,6 \cdot 10^{-6}$ M) preparată fără bioconjugate (Figura 2.4 spectrul a) și, pentru referință, am colectat un spectru Raman normal dintr-o soluție de concentrație mult mai mare (10^{-2} M) sub excitație laser cu linia 633 nm (Figura 2.4 spectrul b).

Măsurătorile SERS dezvăluie prezența moleculelor RB în bioconjugate. Mai exact, în cazul bioconjugatelor individuale incubate cu RB gelatină@AuNPs (RB-10gelatină@AuNPs), linia laser 532 nm, este în același timp în rezonanță cu banda LSPR a AuNPs la 525 nm și cu banda de absorbție electronică a RB la 548 nm, ceea ce permite înregistrarea unui spectru de împrăștiere rezonant Raman amplificat de suprafață (SERRS) (Figura 2.4 spectrul e) [10]. Contribuția RRS este evidențiată în mod clar (Figura 2.4 spectrul e) de apariția a două benzi puternice situate la 1619 cm^{-1} și 1496 cm^{-1} atribuite vibrațiilor moleculare specifice cromoforului excitat. Acest rezultat sugerează faptul că o parte din moleculele RB sunt atașate de polimer, nu direct pe suprafața metalică pentru a preveni stingere fluorescenței, dar nu prea departe de metal pentru a nu compromite activitatea SERS. În cazul bioconjugatelor agregate incubate cu RB (RB-0.03gelatină@AuNPs) banda LSPR de la 622 nm este situată departe de linia de excitație laser la 532 nm. Drept urmare, doar o mică parte din bioconjugatele individuale existente în soluție în prezența bioconjugatelor agregate sunt active SERS, ceea ce face ca fluorescența înregistrată să se suprapună complet cu semnalul SERRS al moleculelor reporter RB.

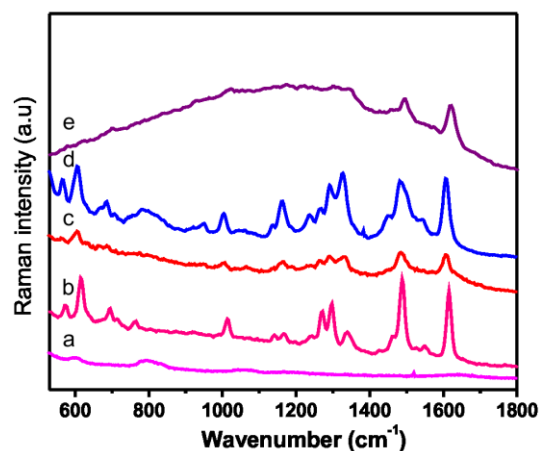


Figure 2.4. Spectrul de referință Raman al RB liber la a) $3.6 \cdot 10^{-6}$ M and b) 10^{-2} M în soluție înregistrat la 633 nm; spectrul SERS al c) RB-individual 10gelatină@AuNPs, d) RB-interconectate 0.03gelatină@AuNPs înregistrat la 633 nm și e) RB-individual gelatină@AuNPs înregistrat la 532 nm.

În continuare am analizat spectrele SERS înregistrate din probele (0.03gelatină@AuNPs și 10gelatină@AuNPs) sub excitație cu linia laser 633 nm. Banda de absorbție electronică a RB fiind situată la 548 nm nici un efect Raman rezonant nu contribuie la semnalul SERS. În cazul probei 0.03gelatină@AuNPs linia laser este rezonantă cu banda LSPR a agregatelor mici la 633 nm, ceea ce permite înregistrarea unui semnal SERS foarte bun (Figura 2.4 spectrul d). Presupunem că o contribuție semnificativă a semnalului SERS provine de la numeroasele „puncte fierbinți” ce apar între golurile mici induse de agregare [11]. Pe de altă parte, în cazul probei 10gelatină@AuNPs, linia laser este în afara rezonanței bioconjugatelor ceea ce face semnalul SERS extrem de slab (Figura 2.4 spectrul c).

2.3. Bioconjugatele gelatină@AuNPs ca substrate pentru încărcarea inhibitorilor FLT3

Propunem aici o nouă metodă de a livra inhibitori ai Fms-ca tirozin kinazei 3 (inhibitori FLT3), la celulele canceroase, prin utilizarea AuNPs individuale protejate într-un strat de gelatină ca agenți de transport ai medicamentelor. Acest complex este capabil să încorporeze concentrații mari de medicament și să le transporte într-o manieră controlată la celulele maligne, reducând astfel doza medicamentului în țesuturile sănătoase și efectele secundare severe care pun viața în pericol. Pentru studiul nostru am selectat patru inhibitori FLT3 diferiți, și anume midostaurin (MDS), sorafenib (SRF), lestaurtinib (LST) și quizartinib (QZR) cu scopul de a proiecta un sistem nou AuNPs-medicament pentru tratamentul leucemiei acute mieloid (AML).

Patru seturi de spectre UV-Vis corespunzătoare celor patru inhibitori FLT3 diferiți (MDS, SRF, LST și QZR) conjugatele cu gelatină@AuNPs sunt prezentate în Figura 2.5 A, B, C și respectiv D. În fiecare caz, spectrul UV-Vis al gelatină@AuNPs (fără medicament) și al medicamentelor libere este prezentat pentru referință.

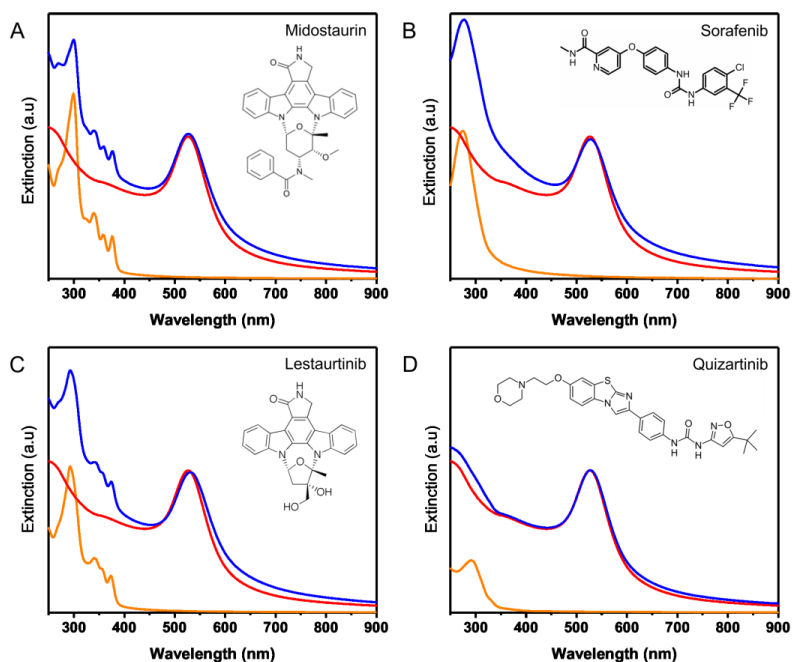


Figure 2.5. Încărcarea inhibitorilor FLT3 (spectrele portocalii) pe gelatină@AuNPs (spectrele roșii) Spectrele albastre reprezintă: **A.** gelatină@AuNPs-MDS, **B.** gelatină@AuNPs-SRF, **C.** gelatină@AuNPs-LST și **D.** gelatină@AuNPs-QZR. Inserțiile prezintă structurile chimice ale inhibitorilor FLT3

Probele gelatină@AuNPs purificate prezintă o semnătură plasmonică LSPR caracteristică care are un maxim centrat la 526 nm (spectrul roșu în fiecare cadran din Figura 2.5). În toate cazurile, după incubarea gelatină@AuNPs cu inhibitori FLT3, complexe prezintă o bandă LSPR deplasată spre roșu împreună cu semnătura medicamentelor în regiunea UV, care poate fi considerată ca fiind o primă dovadă a interacțiunii dintre inhibitorii FLT3 și AuNPs. Forma benzii plasmonice indică faptul că complexe formate sunt dispersate individual în soluție și prezintă stabilitate.

Încărcarea inhibitorilor FLT3 pe gelatină@AuNPs este de asemenea susținută de măsurătorile de potențial zeta și împrăștiere dinamică a luminii (DLS). După purificare, gelatină@AuNPs poartă o sarcină pozitivă de $+22.5 \pm 0.4$ mV care provine de la stratul de gelatină de la suprafața AuNPs. După interacțiunea cu medicamentele, potențialul zeta al nanoparticulelor crește până la $+30.4 \pm 0.8$ mV pentru gelatină@AuNPs-LST și chiar $+32.4 \pm 0.4$ mV pentru gelatină@AuNPs-QZR, confirmând adsorbția medicamentelor pe suprafața particulelor. În plus, o valoare a ζ -potențialului mai mare decât $+30$ mV reprezintă un semn major de stabilitate a complexului. Caracterizarea DLS a gelatină@AuNPs purificate înainte și după interacțiunea cu alte medicamente dezvăluie creșterea diametrului hidrodinamic după încărcarea medicamentelor, confirmând capacitatea stratului de gelatină la suprafața AuNPs de a încorpora o cantitate mare de medicament.

Totuși, pentru a funcționa ca nano-sisteme FLT3 inhibitoare eficiente în aplicații *in vitro* și *in vivo* un semn de întrebare ridică stabilitatea gelatină@AuNPs încărcate cu medicamente în condiții biologice, unde acestea sunt predispuse la agregare. În acest sens, stabilitatea pe termen lung a complexelor noastre cu diferite medicamente încărcate a fost dovedită prin măsurarea răspunsului plasmonic al gelatină@AuNPs după păstrarea în soluție PBS timp de o săptămână.

Capitolul 3

Sinteza directă și controlată a nanoparticulelor de aur în prezența gelatinei

3.1. Biosinteza nanoparticulelor de aur

3.1.1. Ajustarea formei și dimensiunii AuNPs în funcție de concentrația de gelatină

Sinteza AuNPs a fost realizată într-un singur pas prin simpla amestecare a diferitor concentrații ale soluției de gelatină cu o soluție HAuCl₄ de concentrație 3 mM într-un raport volumic de 1:1 urmată de incubarea la 80 °C timp de 6 ore. Am monitorizat formarea AuNPs utilizând atât metode spectroscopice de absorbție în UV-Vizibil cât și imaginile TEM ale nanoparticulelor sintetizate depuse pe grile pentru TEM. În prima serie de experimente am examinat formarea AuNPs în urma incubării unor cantități identice de soluție de acid tetraclorauric (HAuCl₄) cu soluții de gelatină de diferite concentrații. Figura 3.1.A prezintă exemple tipice de spectre LSPR înregistrate din 5 soluții coloidale de AuNPs rezultate după incubarea soluțiilor precursore cu concentrații crescătoare de gelatină: 0.50%, 0.62%, 0.75%, 0.87% și 1%. Toate măsurătorile s-au efectuat după 6 ore de incubare la 80 °C, atunci când formarea nanoparticulelor a fost stopată prin răcirea soluțiilor la temperatura camerei.

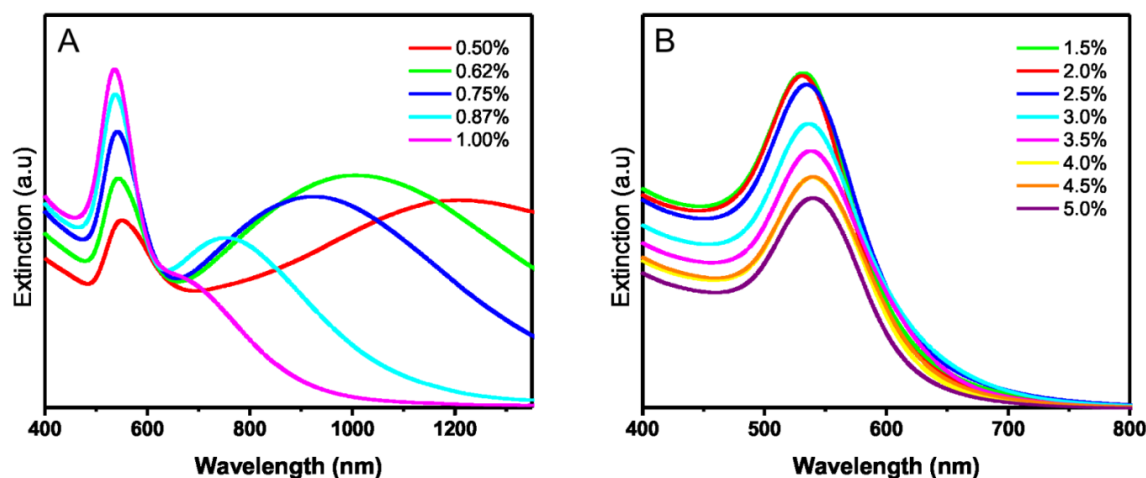


Figure 3.1. Spectre UV-Vis-NIR ale AuNPs sintetizate cu **A.** concentrații mici de gelatină și **B.** concentrații mari de gelatină

În intervalul de concentrații menționate mai sus, spectrele prezintă cel puțin două benzi de extincție care evoluează în funcție de concentrația de gelatină utilizată. Mai exact, poziția primei benzi situată la aproximativ 530 nm rămâne relativ stabilă în timp iar intensitatea acesteia crește constant, în timp ce a doua bandă se deplasează treptat din NIR (~ 1300 nm) spre vizibil (~ 650 nm), devenind mai îngustă pe măsură ce crește concentrația de gelatină. Potrivit literaturii cea de a doua bandă poate fi atribuită rezonanței dipolare în-plan în timp ce prima bandă corespunde rezonanței dipolare în afara planului a AuNPs triunghiulare care se suprapune cu rezonanța plasmonică a AuNPs sferice [12]. Imaginile TEM confirmă prevalența nanoparticulelor triunghiulare (~ 69%) printre nanoparticule sferice (~ 31%) la concentrația cea mai mică de gelatină și prevalența nanoparticulelor sferice (~ 78%) printre nanotriunghiuri extrem de polidisperse (~ 22%) la o concentrație mai mare de gelatină. Deplasarea treptată a rezonanței dipolare în-plan a nanotriunghiurilor din NIR spre vizibil odată cu creșterea concentrației de gelatină este coroborată cu o scădere a laturii nanotriunghiurilor de la 237 ± 17 nm la 52.5 ± 21 nm, după cum rezultă din analiza TEM.

Prin contrast, în a doua serie de experimente realizate la concentrații crescătoare de gelatină de 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 3.5%, 4%, 4.5% și 5%, banda LSPR din NIR dispare complet și banda rămasă în vizibil se deplasează treptat de la 530 nm la 540 nm. Această deplasare spre roșu însoțită de o scădere progresivă în intensitate a benzii, denotă o creștere a dimensiunii nanoparticulelor cu scăderea concentrației de nanoparticule formate (Figura 3.1.B). Din nou, imaginile TEM confirmă formarea AuNPs sferice cu diametrul mediu cuprins între 18 ± 3.5 nm și 57 ± 10 nm.

3.2. Creșterea și caracterizarea nanoparticulelor de aur

3.2.1. Efectul concentrației de gelatină asupra creșterii și morfologiei AuNPs

De asemenea, am monitorizat formarea AuNPs la 80 °C pentru două cazuri reprezentative, mai exact la o concentrație de gelatină mare (1.5%) și respectiv mică (0,5%), în funcție de timpul de incubare, prin măsurarea spectrelor LSPR din soluții la diferite momente în timpul sintezei. În primul caz, banda LSPR și schimbările corespunzătoare în culoarea soluției apar după numai o oră de incubație (Figura 3.2.A). Banda LSPR apare la 540 nm și crește în intensitate simultan cu o deplasare spre albastru progresivă la 530 nm după aproximativ 6 ore. Această deplasare poate fi explicată parțial prin modificarea mediului dielectric al AuNPs care poate fi datorat disocierii clusterelor de gelatină mici apărute atunci când creșterea particulelor este susținută de un proces de coacere controlat de difuzia Ostwald.

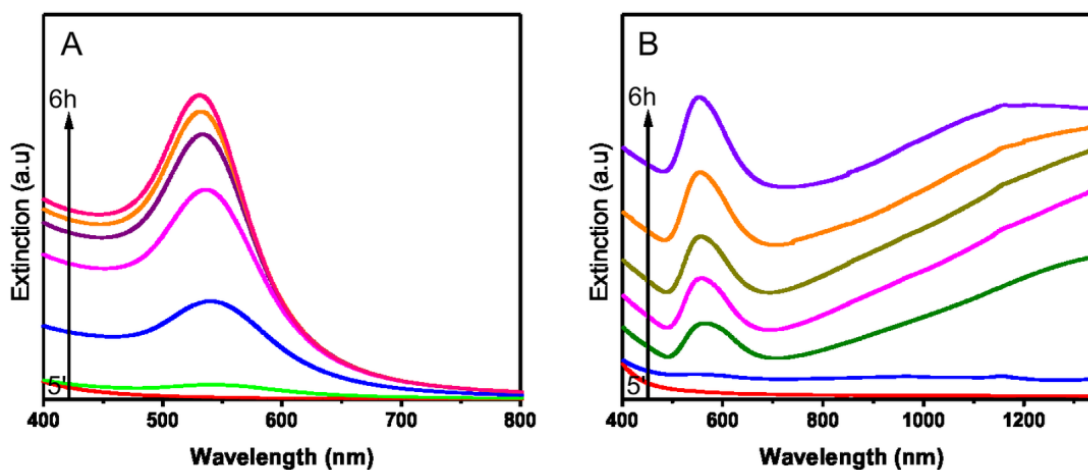


Figure 3.2. Evoluția intensității și poziției spectrale a benzii LSPR asociată cu sinteza AuNPs asistată de gelatină la o **A.** concentrație de gelatină 1.5% și **B.** concentrație de gelatină 0.5% (Spectrele înregistrate au fost translatate în Figura B pentru o mai bună vizualizare)

În ceea ce privește al doilea caz, incubarea ionilor de aur cu concentrație scăzută de gelatină (0.5%) la 80 °C este asociată cu o evoluție mai complexă a spectrului LSPR. Interesant, banda LSPR caracteristică formării AuNPs de forme triunghiulare apare la 1158 nm și pe măsură ce sinteza continuă această bandă evoluează în timp către 1200 nm, după 6 ore (Figura 3.2.B), indicând creșterea nanotriunghiurilor [13]. Prima banda LSPR situată la 553 nm care corespunde rezonanței compuse dipolare în afara planului a nanotriunghiurilor și rezonanței plasmonice a AuNPs sferice are un comportament similar cu cel discutat anterior în cazul sintezei nanosferelor. Este de remarcat faptul că în ambele cazuri reacția de sinteză a fost oprită iar forma și dimensiunea nanoparticulelor formate a rămas neschimbată după răcirea soluției coloidale la temperatura camerei.

3.2.2. Efectul temperaturii de sinteză asupra creșterii nanoparticulelor

Anterior, ne-am axat asupra formării AuNPs acoperite cu gelatină la 80 °C, dar având în vedere că soluția de gelatină este susceptibilă la degradare la temperaturi ridicate, am investigat formarea AuNPs la temperaturi mai scăzute, coroborând rezultatele cu datele obținute din măsurătorile de vâscozitate.

Figura 3.3.A prezintă secvența spectrelor LSPR înregistrate în primele 6 ore din trei soluții identice incubate la temperaturi de 40 °C, 60 °C și 80 °C. Este clar faptul că la temperaturi puțin peste sau la orice temperatură sub punctul de topire al gelatinei sinteza AuNPs nu este fezabilă.

Acest rezultat nu este surprinzător deoarece gelatina prezintă vâscozitate redusă și o conformație cu bucle aleatoare deasupra punctului de topire (~ 35 °C) și o vâscozitate crescută cu regiuni triplu helix sub acest punct (Figura 3.3.B) [14]. Vâscozitatea crescută încetinește sinteza

considerabil datorită transferului de electroni redus între grupările amino ale gelatinei și ionii de aur în timp ce o vâscozitate redusă a gelatinei facilitează o rată crescută a sintezei.

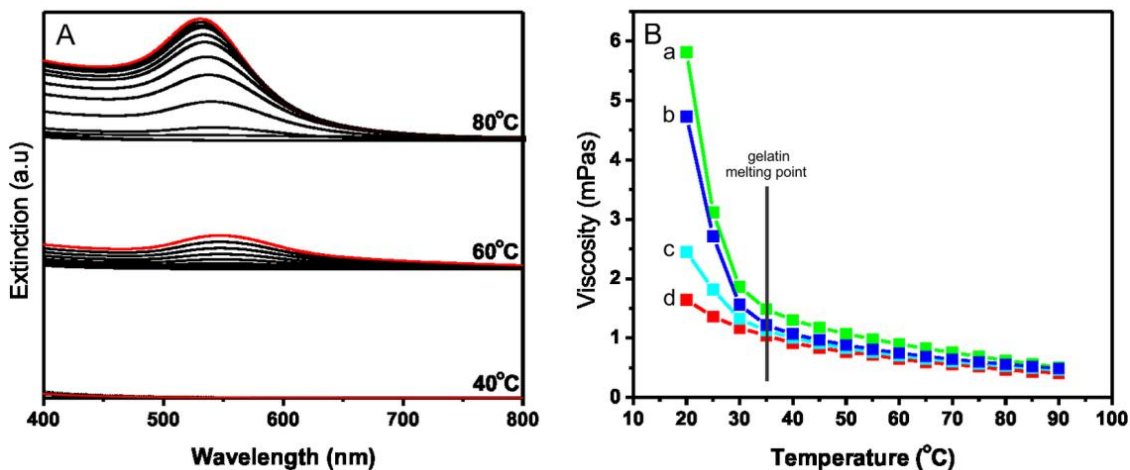


Figure 3.3. **A.** Evoluția în timp a intensității benzii LSPR înregistrată în timpul sintezei AuNPs la 40 °C, 60 °C și 80 °C; **B.** dependența vâscozității de temperatură pentru a) soluția pură de gelatină înainte de tratamentul termic; soluția pură de gelatină după 6 ore de încălzire la b) 60 °C și respectiv c) 80 °C și d) suspensia coloidală de AuNPs acoperite cu gelatină sintetizate la 80 °C

Proba incubată la 80 °C prezintă banda LSPR atribuită AuNPs sferice la 530 nm în timp ce proba incubată la 60 °C prezintă o banda LSPR similară, deplasată spre roșu la 547 nm. Intensitatea benzii LSPR în Figura 3.3 demonstrează că sinteza realizată la 80 °C este mult mai rapidă și furnizează o concentrație mai mare de nanoparticule. Mai exact, o temperatură mai ridicată impune o etapă de nucleație rapidă ceea ce duce ulterior la formarea unui număr mai mare de particule de dimensiuni relativ mai mici, după cum confirmă imaginile TEM (Figura 3.4).

În plus, peste 60 °C, în biopolimerul gelatină se observă o degradare termică și o disociere a legăturilor de hidrogen care impune formarea monomerilor de gelatină [15]. Monomerii de gelatină expun mai multe grupări hidroxil, cunoscute ca agenți de reducere eficienți pentru ionii de aur.

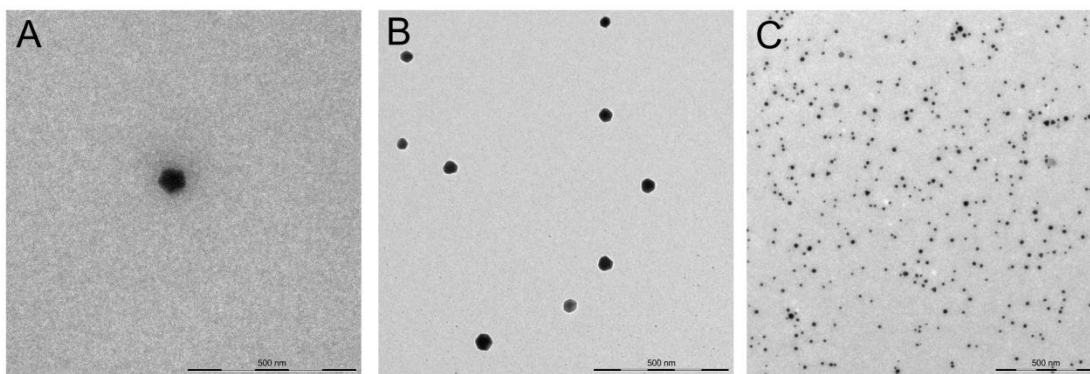


Figure 3.4. Imaginile TEM ale AuNPs bio-sintetizate la **A.** 40 °C, **B.** 60 °C și **C.** 80 °C. Scala arată 500 nm

Prin urmare, reducerea rapidă a ionilor de aur în prezența gelatinei degradate este de preferat [16]. Mai mult decât atât, incubarea gelatinei la temperaturi ridicate promovează creșterea gradului de degradare care poate fi observată prin compararea curbelor de vâscozitate ale unei soluții de gelatină înainte (Figura 3.3 curba a) și după tratamentul termic timp de 6 ore la 60 °C și respectiv 80 °C (Figura 3.3 curbele b și c). Aceste modificări ar putea influența, de asemenea, indicele de refracție al gelatinei, care are un impact asupra deplasării benzii LSPR.

Vâscozitatea AuNPs biosintetizate în prezența biopolimerului gelatină, de asemenea, scade încet în timp ce temperatura crește, datorită modificării vâscozității stratului de gelatină care protejează suprafața acestora (Figura 3.3 curba d).

3.3. Stabilitatea nanoparticulelor acoperite cu gelatină

3.5.2. Stabilitatea AuNPs în mediu fiziologic simulat și în mediu celular

Pentru următoarele studii am selectat din marea varietate de nanoparticule obținute, AuNPs sintetizate cu concentrația de gelatină 1.5% (denumit aici ca AuNPs@gelatină) deoarece acestea sunt cele mai mici sferice obținute și cele mai monodisperse nanoparticule, cu o dimensiune de 18 ± 3.5 nm, după cum reiese din imaginile TEM și histogramele corespunzătoare.

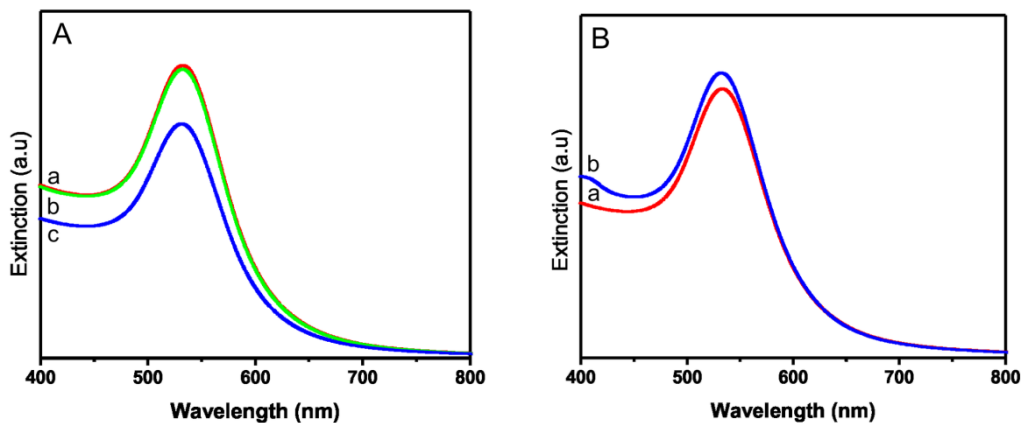


Figure 3.5. A. Spectrul LSPR al AuNPs sintetizate/stabilizate cu gelatină a) după purificare b) la temperatură fiziologică de 37 °C și c) în soluție 0.9% NaCl.
B. Spectrul de extincție al AuNPs@gelatină înregistrat în a) apă ultrapură și b) mediu celular

Având în vedere utilizarea lor în aplicații biomedicale, stabilitatea AuNPs a fost mai întâi demonstrată prin monitorizarea evoluției spectrelor LSPR în condiții fiziologice simulate (adică soluție 0,9% NaCl și 37 °C) și în mediu celular DMEM/F12 la temperatura fiziologică. Nu s-a observat nici un semn de agregare indusă în banda LSPR. Aceste rezultate demonstrează că gelatina acționează ca un agent de acoperire și protecție eficient și oferă în plus garanția că AuNPs@gelatină sunt perfect stabile, atât în mediu simulat cât și în mediu celular la temperatura fiziologică (Figura 3.5).

Studiul biocompatibilității și a efectele biologice ale AuNPs învelite în gelatină asupra celulelor Osteoblast

4.1. Internalizarea nanoparticulelor de aur în celulele osteoblast

Figura 4.1 prezintă imaginile de microscopie în câmp întunecat ale celulelor osteoblast (OBL) tratate cu AuNPs@gelatină (Figura 4.1.B), împreună cu celulele control tratate cu AuNPs acoperite cu citrate – AuNPs@citrat (Figura 4.1.C) și celule netratate (Figura 4.1.A). În celulele control netratate sunt vizibile unele puncte albastrii ce provin din împrăștierea caracteristică intrinsecă a organitelor celulare [17] în timp ce în interiorul celulelor tratate cu nanoparticule apare o împrăștiere puternică sub forma unor puncte gălbui-portocalii care în mod evident confirmă internalizarea AuNPs@gelatină și AuNPs@citrat în OBL.

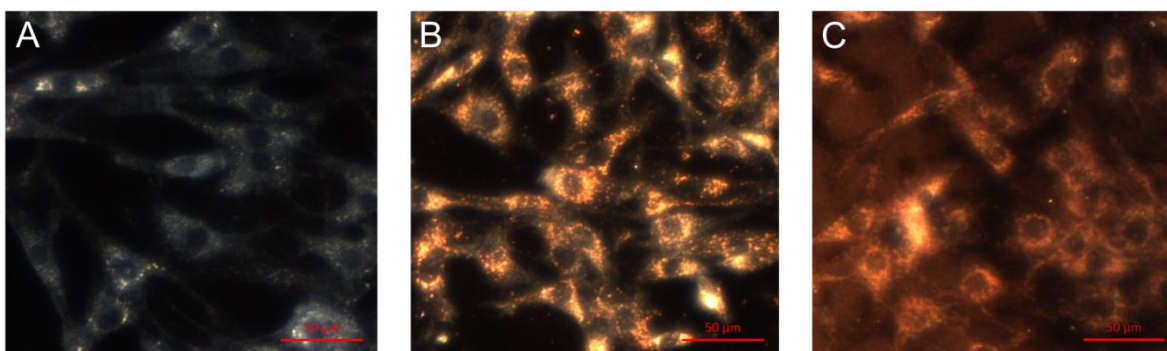


Figure 4.1. Imaginile de microscopie în câmp întunecat ale **A.** celulelor OBL control netratate și tratate cu **B.** AuNPs@gelatină și **C.** AuNPs@citrate. Scala indică 50 μm .

În microscopia în câmp întunecat se observă o diferență semnificativă între internalizarea AuNPs@citrat încărcate negativ (-31.5 ± 1.8 mV) și AuNPs@gelatină încărcate pozitiv ($+ 27 \pm 1.2$ mV) cel mai probabil datorită interacțiunii electrostatice ale nanoparticulelor cu membrana celulară exterioră care este în general încărcată negativ. În plus, în cazul celulelor tratate cu AuNPs@citrat, spre deosebire de celulele tratate cu AuNPs@gelatină, poate fi observată pe substrat o cantitate mare de AuNPs@citrat agregate, sugerând o stabilitate redusă a acestora în absența unui strat protector la suprafață. Spectrele de împrăștiere Rayleigh colectate din interiorul celulelor tratate cu aceeași concentrație de AuNPs@gelatină și AuNPs@citrat confirmă această observație, dovedind stabilitatea AuNPs@gelatină, care prezintă spectrul lor tipic în timp ce AuNPs@citrat prezintă o bandă largă, deplasată spre roșu, caracteristică spectrului nanoparticulelor agregate.

Pentru o investigație mai exactă a AuNPs internalizate, am utilizat microscopia DIC, deoarece aceasta permite secționarea optică a unei celule cu mare precizie, oferind o imagine complexă atât a organelor celulare cât și a AuNPs internalizate.

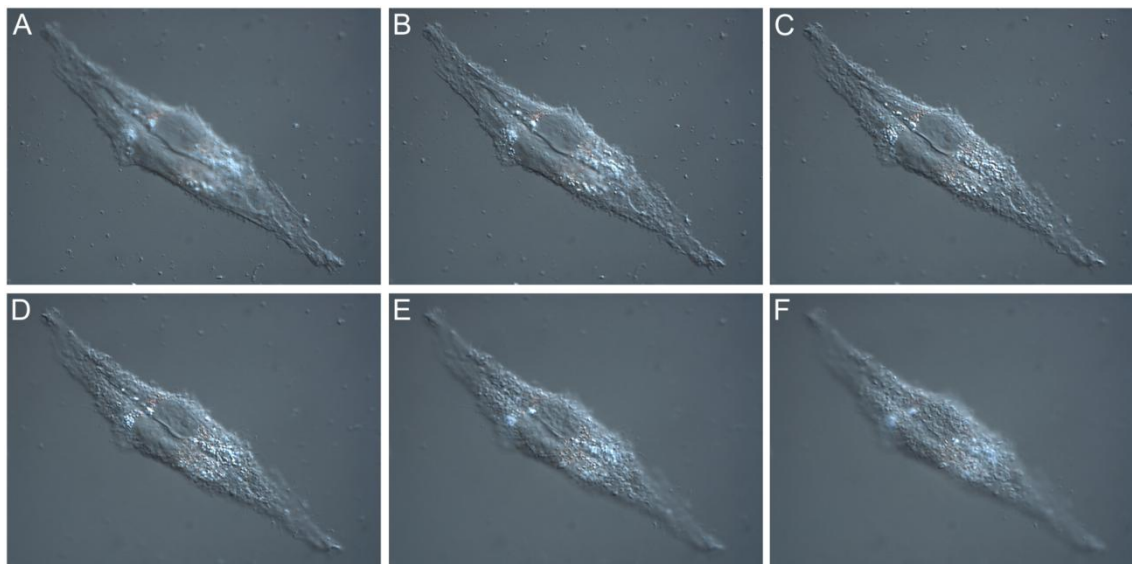


Figure 4.2. Imaginile DIC ale celulelor OBL tratate cu AuNPs@gelatină pentru 24 ore colectate de la diferite adâncimi (A) - (F) Z=3-8 μm

Imagistica celulelor OBL tratate cu AuNPs@gelatină prin focalizarea în diferite planuri ale celulei în direcția Z (Figura 4.2) dezvăluie localizarea AuNPs în întreaga regiune citoplasmatică la toate adâncimile în celule. Imagini DIC confirmă rezultatul microscopiei în câmp întunecat, indicând localizarea AuNPs exclusiv în afara nucleului.

4.2. Efectul nanoparticulelor asupra proliferării celulelor osteoblast

În continuare am investigat biocompatibilitatea/citotoxicitatea AuNPs@gelatină, AuNPs@citrat și a biopolimerului gelatină *in vitro* folosind testul de citotoxicitate MTT asupra celulelor osteoblast tratate. Celulele au fost expuse la diferite concentrații de AuNPs@gelatină, AuNPs@citrat și biopolimer gelatină (1-100 μg/ml) timp de 24, 48 și respectiv 72 ore.

După cum se poate observa în Figura 4.3, celulele OBL tratate prezintă o viabilitate excelentă, AuNPs@gelatină nu prezintă efecte toxice la concentrații ridicate de nanoparticule și nu inhibă proliferarea. În schimb, probele tratate cu AuNPs@gelatină prezintă rate îmbunătățite de creștere și proliferare a celulelor comparativ cu celulele tratate cu AuNPs@citrat sau gelatină, raportat la probele de control netratate. Proliferarea osteoblastelor a fost promovată progresiv în prezența concentrațiilor mai mari de nanoparticule (50-100 μg/ml) chiar și la o expunere pe termen lung (72 ore).

Prezența AuNPs stimulează creșterea și proliferarea celulelor prin stingerea radicalilor liberi formați în timpul creșterii celulare și acționează ca agenți antioxidanți. Mai mult decât atât, presupunem că celulele tratate cu AuNPs@gelatină prezintă o rată crescută de proliferare datorită efectului sinergic dintre AuNPs și stratul de gelatină care acoperă suprafața metalică.

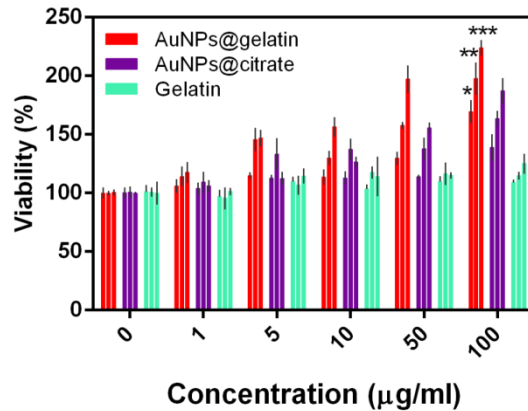


Figure 4.3. Viabilitatea celulelor OBL tratate cu diferite concentrații de AuNPs@gelatină, AuNPs@citrate și gelatină pentru (*) 24, (**) 48, și (***) 72 ore investigată prin testul MTT.

4.3. Efectul nanoparticulelor de aur asupra diferențierii celulelor osteoblast

Celulele OBL tratate cu AuNPs@gelatină prezintă o proliferare remarcabilă și mai interesant un prim semn de diferențiere cu formare de noduli osoși care dezvăluie efectul osteogenic al acestora (Figura 4.4.A).

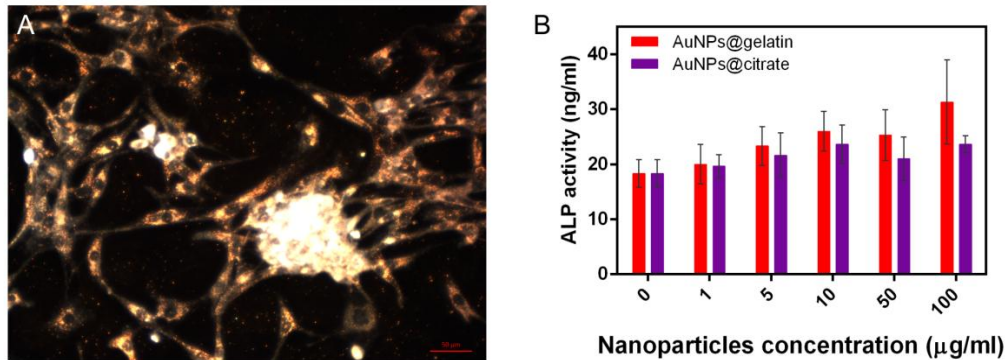


Figure 4.4. A. Imaginea de microscopie în câmp întunecat a celulelor OBL tratate cu AuNPs@gelatină care prezintă un prim semn de diferențiere cu formare de noduli osoși. Scala arată 50 µm. **B.** Efectul dependent de doză al AuNPs@gelatină și AuNP@citrat asupra activității ALP a celulelor OBL după 72 ore tratament.

Diferențierea osteoblaștilor este un aspect esențial al formării și remodelării osoase, prin urmare, efectul AuNPs@gelatină asupra diferențierii OBL a fost investigat prin analiza activității fosfatazei alcaline (ALP), de vreme ce apariția activității ALP este un marker fenotipic timpuriu al diferențierii osteoblaștilor [18]. Activitatea ALP prezentată de celulele OBL tratate timp de 72 ore cu AuNPs@gelatină este semnificativ mai mare decât cea a celulelor tratate cu AuNPs@citrat, în special la concentrații mai mari, adică 50, 100 µg/ml. Ca și în cazul proliferării celulelor, tratamentul celulelor cu biopolimerul gelatină (100 µg/ml) are un efect mai mic asupra activității ALP raportat la celulele tratate cu aceeași concentrație de AuNPs@gelatină.

Expresia proteinei fosfatază alcalină a fost de asemenea investigată prin colorarea imunocitochimică a celulelor OBL tratate cu 100 $\mu\text{g/ml}$ AuNPs@gelatină. Tripla colorare (Figura 4.5) permite observarea adeziunii celulelor OBL și procesul de răspândire marcat de organizarea fibrelor de actina-F (colorate roșu cu faloidină TRITC), nucleelor celulare (colorate albastru cu DAPI) și expresia ALP evidențiată prin colorare verde cu FITC. Aceste rezultate sunt în concordanță cu rezultatele MTT și confirmă încă o dată proliferarea și diferențierea osteoblaștilor în prezența concentrațiilor mai mari de AuNPs@gelatină.

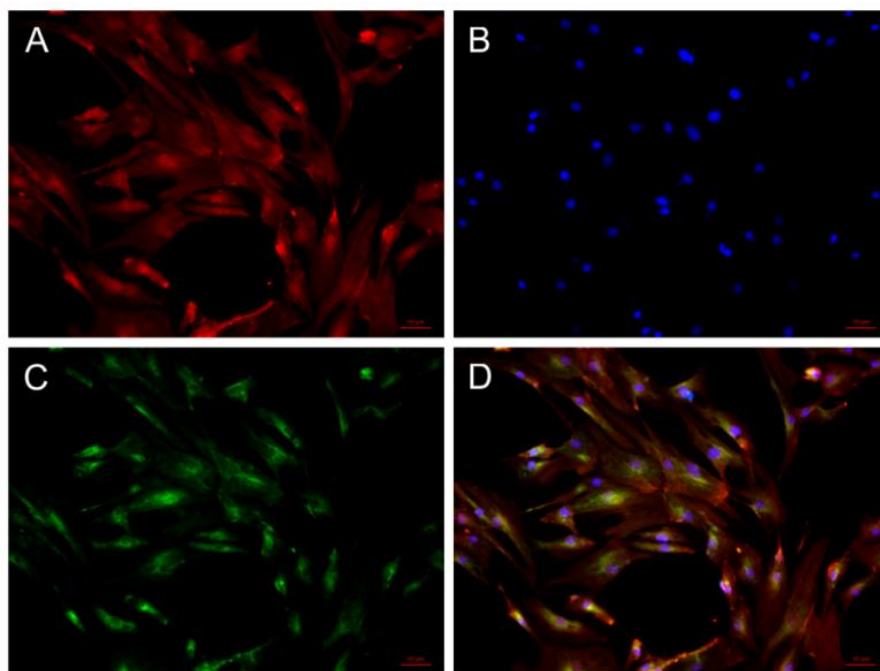


Figure 4.5. Imaginile de fluorescență reprezentând activitatea fosfatazei alcaline (ALP) **A.** fibrele de actină-F sunt vizualizate aplicând colorația cu faloidină-TRITC (roșu). **B.** Nucleii celulelor sunt vizualizați aplicând colorația DAPI (albastru) **C.** expresia proteinei ALP este evidențiată prin colorația verde cu FITC **D.** Imaginile suprapuse A., B. și C. Scala arată 50 μm .

Prin urmare AuNPs@gelatină în afară de proprietățile intrinseci plasmonice deosebite care facilitează imagistica celulară pot deveni promițătoare în medicina regenerativă datorită amplificării creșterii, proliferării și diferențierii celulare.

Realizarea și validarea *in vitro* a unui nou sistem chimioterapeutic cu eliberare controlată pH a agentului terapeutic Doxorubicină

5.1. Caracterizarea nano-sistemului chimioterapeutic

Nano-sistemele chimioterapeutice au fost realizate într-o singură etapă prin amestecarea soluțiilor de doxorubicină (DOX) la pH 5.5 și pH 10.5 cu o soluție coloidală purificată AuNPs@gelatină într-o concentrație finală de 230 μM medicament. Ulterior, am notat ca 5.5DOX-AuNPs@gelatină și 10.5DOX-AuNPs@gelatină sistemele preparate în prezența soluției DOX la pH 5.5 și respectiv pH 10.5.

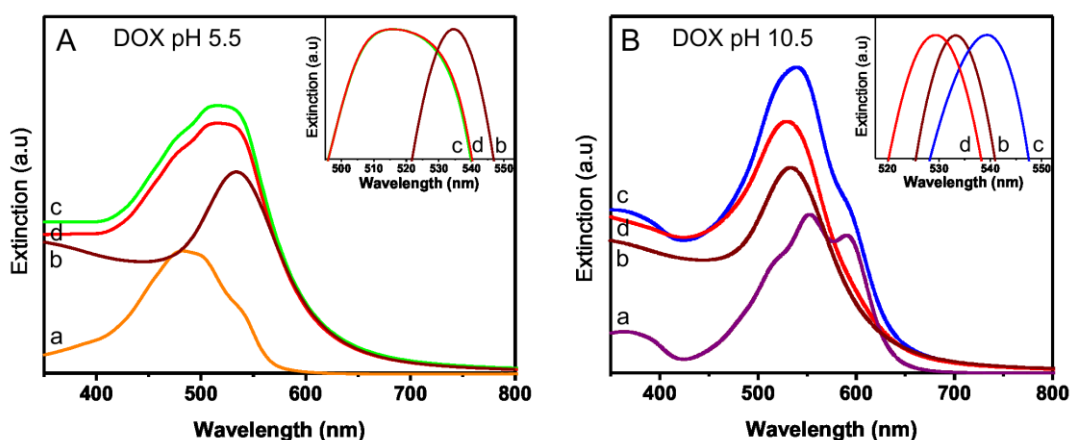


Figure 5.1. a) Spectrul de absorbție al DOX la **A.** pH 5.5 și **B.** pH 10.5; Spectrul de extincție al b) AuNPs@gelatină biosintetizate, c) DOX-AuNPs@gelatină imediat după amestecul lor și d) după 24 ore incubare. Inserturi: spectrul normalizat al b) AuNPs@gelatină, DOX-AuNPs@gelatină c) la momentul inițial și d) după incubare.

Spectrul de absorbție al DOX la pH 5,5 arată două benzi majore centrate la 290 și 485 nm, care corespund tranzițiilor polarizate $\pi \rightarrow \pi^*$ de-a lungul axei scurte și respectiv lungi a moleculei DOX [19]. Banda principală de la 485 nm (Figura 5.1.A spectrul a) este foarte sensibilă la modificările apărute în structura moleculei și prin urmare, la pH alcalin și în prezența AuNPs@gelatină (Figura 5.1.A și B) această bandă este deplasată spre lungimi de undă mai mari și reflectă interacțiunea, încărcarea medicamentelor și formarea complexelor 5.5DOX-AuNPs@gelatină și 10DOX-AuNPs@gelatină la pH 5.5 și respectiv pH 10.5. Pentru a asigura un timp suficient pentru interacțiune, medicamentul și AuNPs au fost incubate la temperatura camerei timp de 24 ore.

Rezultatul LSPR (Figura 5.1) nu este surprinzător având în vedere că în condiții puțin acide (pH 5.5), moleculele DOX sunt aproape complet protonate și interacționează doar cu

puținele grupări carboxil ale stratului de gelatină de la suprafața nanoparticulelor, încărcate negativ. Pe de altă parte, în mediu alcalin la pH 10.5, moleculele DOX sunt deprotonate, posedă o sarcină negativă confirmată de valoare ζ potențial de -34.9 ± 2.4 mV care promovează interacțiunea electrostatică cu stratul de gelatină de pe suprafața AuNPs, încărcat pozitiv. Mai mult decât atât, valoarea ζ potențial pozitiv al AuNPs@gelatină ($+27.72 \pm 1.2$ mV) care provine de la grupările amino ale gelatinei trece la o valoare negativă de -24.5 ± 0.8 mV după interacțiunea cu DOX la pH 10.5, ceea ce confirmă încă o dată încărcarea mai eficientă a medicamentelor în mediu alcalin.

Cu scopul de a evalua calitatea sistemelor chimioterapeutice create, am calculat că doar aproximativ 19% din totalul DOX a fost încărcat pe AuNPs@gelatină în condiții acide, în timp ce o încărcare mult mai mare de $\sim 70\%$ DOX a fost realizată la pH 10.5. Prin urmare, deoarece eficiența de încărcare în mediul alcalin este semnificativ mai mare decât în condiții acide, în studiile ulterioare vom investiga doar sistemul chimioterapeutic cu un conținut mai ridicat de DOX, produs la pH 10,5, denumit simplu DOX-AuNPs@gelatină.

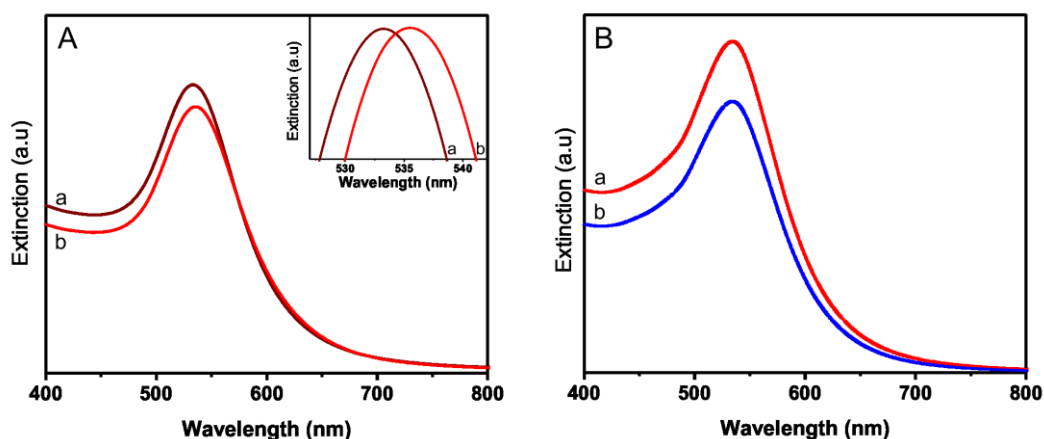


Figure 5.2. A. Spectrul LSPR al a) AuNPs@gelatină și b) al nano-sistemului chimioterapeutic DOX-AuNPs@gelatină și B. spectrul LSPR al DOX-AuNPs@gelatină a) în apa ultrapură și b) la temperatura fiziologică de 37 °C în soluție 0.9% NaCl.

Având în vedere validarea nano-sistemului chimioterapeutic în studii celulare, după incubarea la temperatura camerei timp de 24 ore, complexul a fost purificat prin centrifugare (8.000 rpm timp de 10 min) pentru a îndepărta medicamentul nelegat și apoi redispersat în apă ultrapură. Complexul DOX-AuNPs@gelatină prezintă o ușoară deplasare a benzii LSPR spre roșu (3 nm), comparativ cu AuNPs@gelatină simple (Figura 5.2.A), fără alte modificări optice ceea ce sugerează stabilitatea și încărcarea cu succes a AuNPs. Mai mult decât atât, stabilitatea DOX-AuNPs@gelatină a fost dovedită în condiții fiziologice simulate în soluție 0,9% NaCl și la 37 °C (Figura 5.2.B).

5.2. Eliberarea DOX din nano-sistemul chimioterapeutic

Capacitatea pH-responsivă a nano-sistemului nostru chimioterapeutic DOX-AuNPs@gelatină a fost evaluată la pH 7.4, 5.3 și respectiv 4.6, pentru a imita atât pH-ul fiziologic și cât și mediul acid al organitelor celulare și al țesutului tumoral. Pentru aceasta, o cantitate mică de nanoparticule încărcate cu medicament a fost expusă la diferite soluții tampon și menținute sub agitare blândă la 37 °C. Cantitatea de DOX eliberată a fost măsurată din emisia de fluorescență a mediului de eliberare la intervale de timp predeterminate. Emisia fluorescentă la 593 nm a fost înregistrată prin excitare la 485 nm și reprezentată grafic în funcție de timp pentru a genera un profil de eliberare. Figura 5.3.A arată că rata și cantitatea de DOX eliberată din DOX-AuNPs@gelatină sunt extrem de dependente de pH-ul mediului.

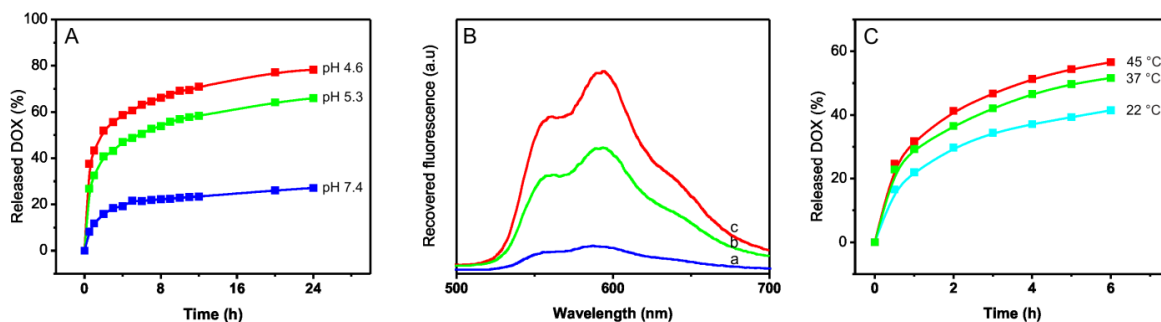


Figure 5.3. **A.** Efectul pH-ului asupra eliberării DOX din AuNPs@gelatină la 37 °C, **B.** emisia de fluorescență a DOX recuperată după 24 ore incubare în soluții tampon la a) pH 7.4, b) pH 5.3 și pH 4.6 și **C.** Efectul temperaturii asupra ratei de eliberare a DOX la pH 4.6.

Mai exact, după 24 ore cantitatea de DOX eliberată cumulativ atinge aproximativ 80% la pH 4.6, care este aproape de valoarea pH-ului tumorilor și numai 25% la pH 7,4, indicând o eliberare minimă la pH fiziologic (Figura 5.3.A, B).

În continuare, pentru un anumit pH – 4.6 impactul temperaturii asupra eliberării DOX a fost investigat în continuare la trei temperaturi diferite și anume temperatura camerei – 22 °C, temperatura fiziologică – 37 °C și temperatura de hipertermie – 45 °C. Curbele de eliberare sunt prezentate în Figura 5.3.C. Comparativ cu eliberarea la 22 °C, se poate observa cu claritate că o temperatură mai ridicată impune o eliberare mai rapidă a DOX (Figura 5.3.C). Acest comportament poate fi atribuit cu siguranță componentei gelatină a nano-sistemului chimioterapeutic, care permite o eliberare a DOX rapidă la 37 °C și 45 °C, datorită dependenței de temperatură a structurii conformaționale a acesteia, capabilă să crească mobilitatea locală în rețeaua sa pe măsură ce crește temperatura.

5.3. Efectul nano-sistemului chimioterapeutic asupra liniei celulare de cancer de sân MCF-7

5.3.1. Înglobarea DOX-AuNPs@gelatină de către celulele MCF-7

Figura 5.4 prezintă imaginile de microscopie în câmp întunecat ale celulelor control – netratate și ale celulelor tratate cu DOX-AuNPs@gelatină timp de 1 oră și respectiv 24 ore.

În celulele control apar unele puncte albastrii datorită împrăștierii caracteristice intrinseci a organitelor celulare (Figura 5.4.A) [17]. După 1 oră de tratament, celulele prezintă o împrăștiere limitată a luminii provenind din organitele celulare și din câteva AuNPs@gelatină încărcate ce pot fi observate mai ales pe membrana celulară (Figure 5.4.B). Contrar, după 24 ore din celulele tratate apare o împrăștiere puternică care prezintă multe puncte luminoase portocaliu-roșiatice strălucitoare situate la nivel citosolic, în afara de nucleilor.

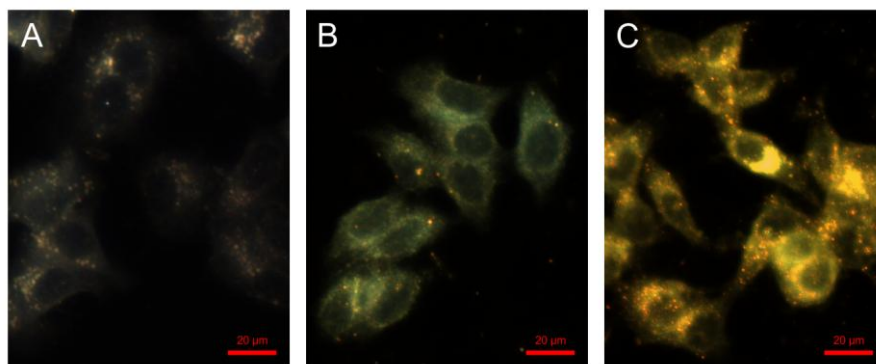


Figure 5.4. Imaginile în câmp întunecat ale celulelor MCF-7 **A.** control – netratate și tratate cu DOX-AuNPs@gelatină timp de **B.** 1 oră și respectiv **C.** 24 ore.

Este plauzibil ca nanoparticulele să penetreze membrana celulelor printr-un proces cunoscut sub numele de endocitoză și să fie situate în interiorul veziculelor endocitotice, dar în afara nucleelor. Petele strălucitoare observate confirmă într-adevăr internalizarea DOX-AuNPs@gelatină în celulele MCF-7.

5.3.2. Eliberarea intracelulară a DOX din AuNPs@gelatină

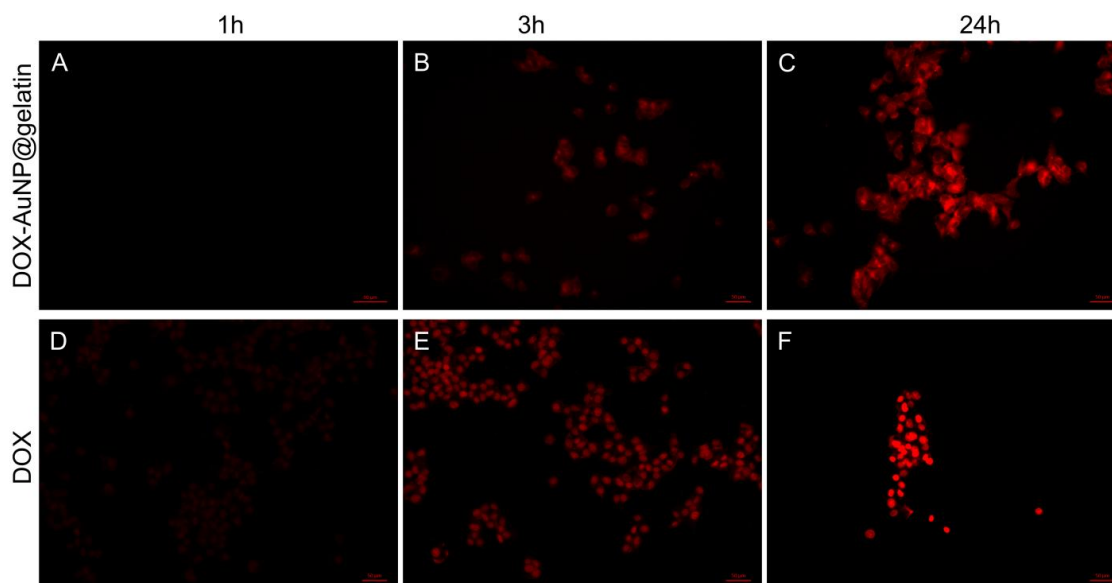


Figure 5.5. Imaginile de fluorescență ale celulelor tratate cu DOX-AuNPs@gelatină timp de **A.** 1 oră, **B.** 3 ore și **C.** 24 ore, și celulele tratate cu DOX timp de **D.** 1 oră, **E.** 3 ore și **F.** 24 ore, care arată localizarea DOX liberă și DOX eliberată intracelular la diferite interval de timp.

Microscopia de fluorescență evidențiază diferențe remarcabile în tiparul internalizării DOX libere sau încărcată pe AuNPs@gelatină, așa cum se poate vedea comparând Figura 5.5 A, B, C și Figura 5.5 D, E, F. Semnalul de fluorescență din celulele tratate cu DOX liberă apare după doar 1 oră de tratament de vreme ce moleculele libere difuzează prin membrana celulară și devine tot mai puternic în timp datorită acumulării medicamentului, care este aproape în exclusivitate nucleară.

În contrast, celulele tratate cu DOX-AuNPs@gelatină timp de 1 oră (Figura 5.5.A) nu arată nici un semnal, în timp ce după 3 ore se poate observa un semnal foarte slab. După 1 oră de incubare, nanoparticule de aur încărcate cu medicamente nu au fost internalizate, cum cum arată microscopia în câmp întunecat. În schimb, la 3 ore după incubare, unele AuNPs încărcate cu medicament au pătruns prin membrana celulelor prin endocitoză și poate fi observată o ușoară fluorescență roșie provenită de la molecule DOX. Aceasta indică localizarea nano-sistemului chimioterapeutic în interiorul celulelor, în compartimentele endocitare, unde începe eliberarea medicamentului, declanșat de pH-ul acid. Aici medicamentul se află în două stări: atașat la suprafața metalică și situat în stratul biopolimeric. Cu toate acestea, în acest moment, cele mai multe molecule DOX sunt încă în imediata apropiere a suprafeței AuNPs având fluorescență stinsă. Judecând după intensitatea fluorescenței DOX putem deduce distribuția medicamentelor în celulă având în vedere că DOX eliberată migrează spre nucleu pentru a se lega de ADN. De aceea, după 24 de ore de tratament (Figura 5.5.C), intensitatea semnalului de fluorescență a DOX eliberate a crescut, indicând eliberarea continuă a acesteia. DOX eliberată este răspândită în principal prin întreaga citoplasmă dar un semnal de fluorescență poate fi observat în nucleul celulelor, provenit de la DOX difuzată care a ajuns la nucleu.

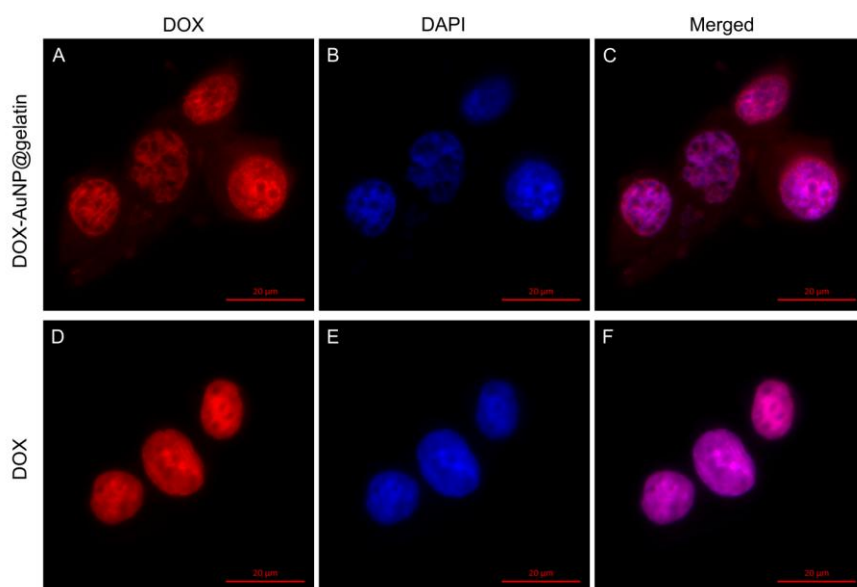


Figure 5.6. Imaginile de fluorescență ale celulelor tratate cu DOX-AuNPs@gelatină și DOX liberă pentru 48 h, care evidențiază internalizarea diferită în nucleu a **A.** DOX eliberată intracelular și **D.** DOX libere; **B., E.** nucleii colorați cu DAPI și **C., E.** imaginile suprapuse

Figura 5.6 arată distribuția DOX în celulele MCF-7 tratate timp de 48 de ore, fie cu DOX liberă sau DOX încărcată pe AuNPs@gelatină, care corelate cu datele anterioare confirmă internalizarea și acumularea diferită a medicamentului. Celulele tratate cu DOX liberă prezintă semnal de fluorescență numai din nucleu, așa cum protocol de colorare DAPI confirmă. În contrast, celulele tratate cu nano-sistemul chimioterapeutic DOX-AuNPs@gelatină prezintă un semnal de fluorescență puternic în nucleu și un semnal slab în citoplasmă. Cu toate acestea, în comparație cu celulele tratate timp de 24 de ore, raportul semnalului DOX în citoplasmă/nucleu este modificat dramatic, un semnal DOX mai intens fiind în nucleu. Această observație dovedește eliberarea în funcție de timp a medicamentului după un proces mai lent de interacțiune între DOX-AuNPs@gelatină și celule, care conduce la o eliberare susținută a medicamentului, difuzia și acumularea ulterioară a DOX în nucleele celulare.

Apoi, microscopia rezolvată temporal (FLIM) a fost folosită pentru vizualizarea asimilării DOX libere sau încărcate pe AuNPs în celule, având în vedere că FLIM este foarte sensibilă chiar și la modificările minore care apar în timpul de viață al moleculelor. Însă, mai întâi a fost investigat timpul de viață fluorescent al DOX libere și încărcată pe AuNPs@gelatină, în soluție. A fost înregistrată o curbă monoexponentială a timpului de viață cu o valoare de 1.0 ns din soluția de DOX liberă, iar o durată de viață medie de 1.9 ns a fost determinată după încărcarea DOX pe AuNPs@gelatină, datorată stratului de gelatină care protejează moleculele de medicament împotriva posibilităților oxidanți. Aceste diferențe între timpul de viață în soluție al DOX ne permit să utilizăm FLIM pentru a monitoriza în continuare eliberarea *in vitro* a DOX din AuNPs@gelatină.

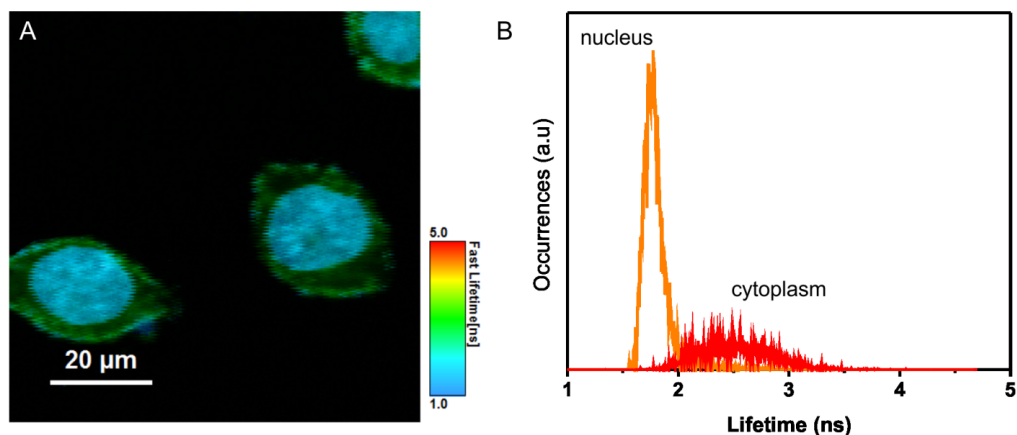


Figure 5.7. **A.** Imaginea FLIM a celulelor MCF-7 tratate cu DOX liberă pentru 3 ore. Legenda culorii prezintă timpul de viață corespunzător ce variază de la 1 ns la 5 ns. **B.** histograma corespunzătoare timpului de viață al DOX în nucleul celulei și citoplasmă

Ulterior, FLIM a fost efectuată pe celule MCF-7 de cancer mamar tratate cu DOX în stare liberă și DOX-AuNPs@gelatină pentru diferite perioade de timp (1, 3, 24 și 48 de ore). Figura 5.7.A prezintă distribuția duratei de viață fluorescentă a DOX libere în celule MCF-7, după 3 ore de incubare. Mai exact, am observat că semnalul de fluorescență este aproape în întregime

nuclear cu o valoare a timpului de viață crescută de 1.6 ns (față de timpul de viață în soluție) (Figura 5.7.A) atribuită intercalării DOX-ADN [20], împreună cu un semnal citoplasmatic slab cu o valoare a timpului de viață de 2.4 ns (Figura 5.7.B). La 48 de ore post-tratament, toate moleculele libere DOX au migrat spre nucleii celulelor iar distribuția semnalului DOX de fluorescență este exclusiv nucleară.

În cazul celulelor tratate cu DOX-AuNPs@gelatină, nu se poate detecta nici un semnal de viață după o oră de tratament. După acest timp, curbele semnalului citoplasmatic din celulele tratate timp de 3 ore sunt bi-exponențiale, cu o durată de viață medie de 4.2 ns. Curbele constau dintr-o componentă a timpului de viață lung corespunzător DOX încărcate și o componentă scurtă, rapidă atribuită medicamentului eliberat.

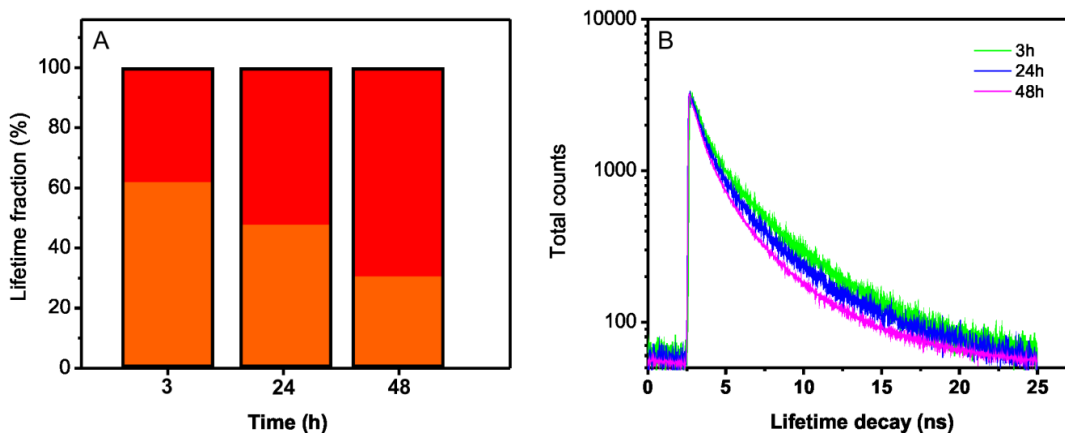


Figure 5.8. A. Valorile componentelor scurte și lungi din citoplasma celulelor tratate cu DOX-AuNPs@gelatină pentru 3 ore, 24 ore și respective 48 ore. **B.** Curbele înregistrate din celulele MCF-7 tratate cu DOX-AuNPs@gelatină la diferite intervale de timp

Cu toate acestea, în următoarele câteva ore, componenta timpului de viață citoplasmatic lung (τ_2) a fost redusă oarecum de la ~ 62% la ~ 30% în favoarea componentei rapide (Figura 5.7). Pe de altă parte, celulele tratate timp de 24 și 48 de ore ilustrează două zone bine definite care corespund nucleului și citoplasmei celulei (Figura 5.8). După 48 de ore de tratament, raportul dintre timpul de viață fluorescent variază în citoplasmă invers proporțional cu durata tratamentului, având în vedere că componenta timpului de viață lent continuă să scadă în timp întrucât crește componenta timpului de viață rapid. Tendința observată reflectă evident eliberarea DOX din AuNPs@gelatină având în vedere faptul că componenta timpului de viață scurt de 1.2 ns (atribuit DOX eliberate) crește în timp.

În paralel, așa cum am menționat anterior, nano-sistemul DOX-AuNPs@gelatină pătrunde întâi în celule, este localizat în organitele celulare acide unde este declanșată eliberarea medicamentului iar apoi medicamentul liber migrează în nucleu unde se acumulează și se leagă de lanțurile ADN. Intercalarea cu ADN-ul este confirmată de creșterea timpului de viață a DOX

la 2.4 ns în interiorul nucleelor după 48 de ore de tratament. Prin urmare, am dovedit încă o dată internalizarea celulară pe căi diferite a DOX și DOX-AuNPs@gelatină folosind FLIM.

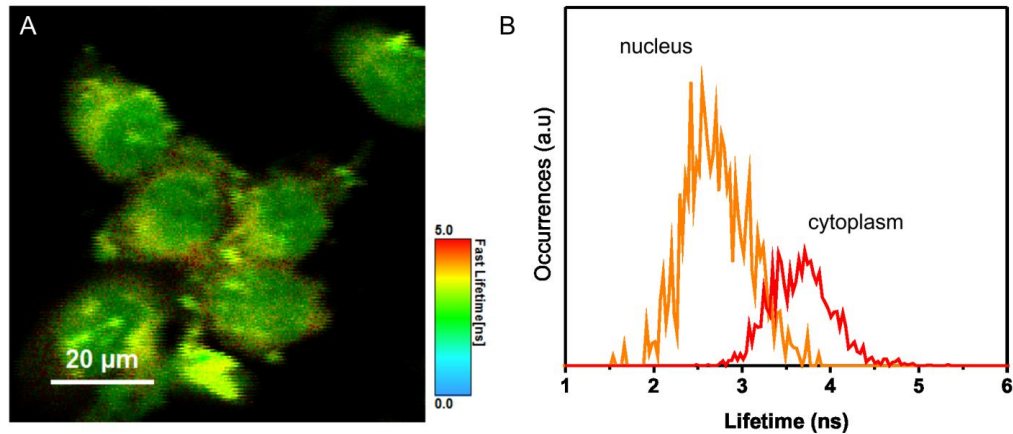


Figure 5.9. A. Imaginile FLIM ale celulelor tratate cu DOX-AuNPs@gelatină pentru 48 ore. Legenda culorii prezintă timpul de viață corespunzător ce variază de la 0 ns la 5 ns.

B. histograma corespunzătoare timpului de viață al DOX în nucleul celulei și citoplasmă

Deși internalizarea DOX-AuNPs@gelatină în celule a fost demonstrată clar prin imaginile de microscopie în câmp întunecat, în următorul experiment am examinat dacă poate fi colectat un semnal amplificat Raman din celule și dacă nanoparticulele pot fi utilizate ca agenți de contrast pentru imagistica SERS intracelulară.

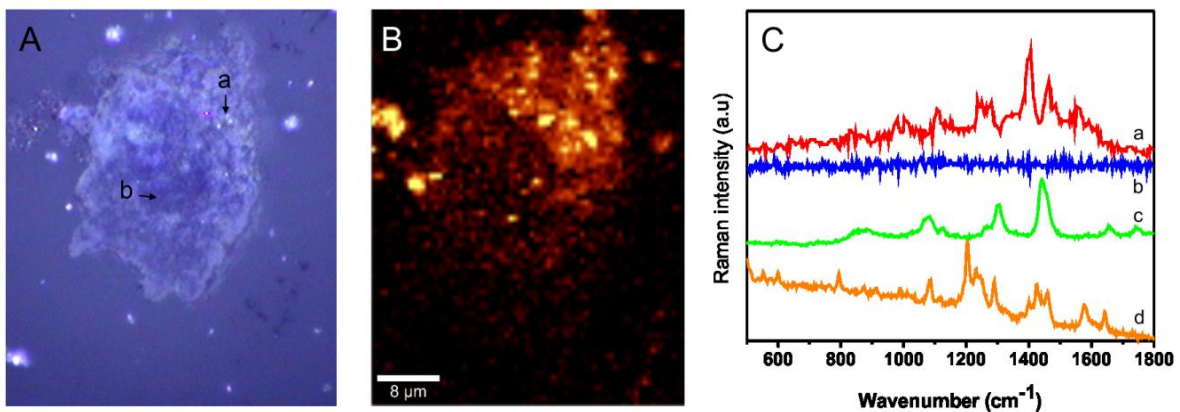


Figure 5.10. A. Imaginea optică a celulei MCF-7 tratată cu DOX-AuNPs@gelatină 24 ore, **B.** harta SERS a aceleiași celule, **C.** spectrul SERS colectat din diferite puncte ale celulei tratate

Figura 5.10 prezintă harta SERS bidimensională a unei celule MCF-7 selectată incubată cu DOX-AuNPs@gelatină timp de 24 ore. Imaginea spectrală univariată în Figura 5.10.B. obținută prin reprezentarea grafică a intensității SERS în intervalul spectral de $600\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$ se aseamănă îndeaproape cu structura celulară vizualizată în imaginea microscopică în câmp luminos (Figura 5.10.A). Punctele luminoase din imagine A. pot fi atribuite nanoparticulelor metalice, cunoscute ca surse de împrăștiere puternică a luminii în raport cu lumina de fundal

împrăștiată de structurile subcelulare precum nucleul și mitocondriile. Figura 5.10.C. spectrul a. și b. ilustrează două spectre SERS reprezentative înregistrate din locații diferite în interiorul unei singure celule MCF-7 incubate cu DOX-AuNPs@gelatină. Pentru comparație, spectrele Raman ale celulei MCF-7 și ale DOX solide sunt de asemenea prezentate în spectre c. și d. din aceeași figură. Majoritatea benzilor vibraționale colectate în prezența DOX-AuNPs@gelatină, pot fi atribuite semnalului Raman amplificat al componentelor celulare (spectrul a. din Figura 5.10.C corespunzătoare punctului a. în Figura 5.10.A). Este evident faptul că anumite benzi vibraționale apar deplasate și având raportul intensităților modificat în comparație cu benzile Raman obișnuite (Figura 5.10.C. spectrelor a, b și d) datorită orientării grupărilor biochimice relativ la suprafața metalică. Presupunem că AuNPs@gelatină agregă în interiorul celulelor datorită învelișului de gelatină care este digerat de matricea metaloproteinazelor (MMP) secretată de celulele MCF-7 canceroase [21]. Prin urmare este favorizată formarea unor puncte fierbinți între nanoparticulele interconectate, puncte care sporesc semnificativ semnalul Raman al moleculelor biologice care vin în imediata apropiere a acestora. Cu toate acestea, amplificarea SERS nu este limitată doar la constituenții celulari din vecinătatea nanoparticulelor ci este, de asemenea, resimțită și de moleculele DOX. Din regiunile fără nanoparticule nu s-a putut detecta nici un semnal Raman (spectru b în figura 5.10.C corespunzătoare locului b din figura 5.10.A)

5.3.3. Citotoxicitatea in vitro a nano-sistemului chimioterapeutic DOX-AuNPs@gelatină

În acest studiu, testul MTT a fost realizat pentru a testa citotoxicitatea DOX liberă și DOX încărcată pe AuNPs@gelatină.

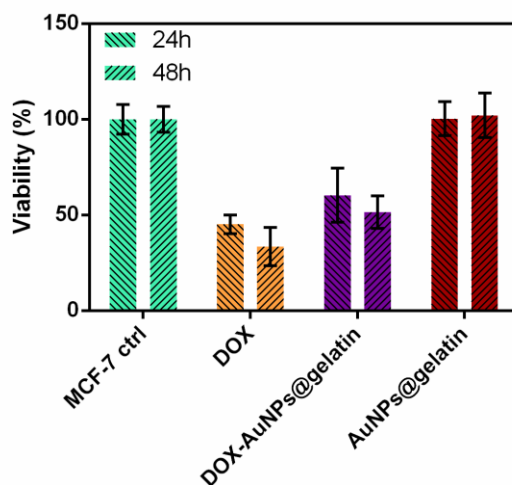


Figure 5.11. Viabilitatea celulelor MCF-7 tratate cu DOX and DOX-AuNPs@gelatină la o concentrație finală de medicament de 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pentru 24 și 48 ore, împreună cu celulele control netratate și tratate cu AuNPs@gelatină, investigată prin testul MTT

Figura 5.11 prezintă viabilitatea celulelor MCF-7 dependentă de timpul tratamentului cu DOX liberă, AuNPs@gelatină și DOX-AuNPs@gelatină. După cum se poate observa, după tratamentul cu AuNPs@gelatină celule prezintă o viabilitate excelentă comparativ cu celulele control netratate, ceea ce sugerează faptul că nu au efect toxic. În schimb, după tratamentul

chimioterapeutic cu DOX liberă și DOX-AuNPs@gelatină într-o concentrație finală de medicament de 5 μg/ml, concentrația inhibitorie (IC₅₀) a DOX libere, viabilitatea celulelor a scăzut considerabil într-o manieră dependentă de timpul tratamentului.

Nu este surprinzător faptul că DOX liberă prezintă o citotoxicitate mai mare decât DOX-AuNPs@gelatină, având în vedere căile diferite de internalizare ale acestora. AuNPs@gelatină eliberează lent și susținut DOX după internalizarea în celule și numai atunci, DOX eliberată difuzează spre nucleu în timp ce DOX liberă pătrunde direct în membrana celulelor și difuzează în nucleu, așa cum am arătat anterior. Prin urmare, o citotoxicitate ridicată a nano-sistemului chimioterapeutic DOX-AuNPs@gelatină *in vitro* este un alt indicator al eliberării eficiente a DOX.

Capitolul 6

Concluzii finale și perspective

- ✓ Am stabilizat și funcționalizat nanoparticulele de aur standard acoperite cu citrat folosind biopolimerul gelatină
- ✓ Am sintetizat nanoparticule de aur cu diferite forme și dimensiuni folosind gelatina
- ✓ Am demonstrat că AuNPs biosintetizate cu gelatină amplifică proliferarea și diferențierea celulelor Osteoblast
- ✓ Am proiectat, fabricat și validat *in vitro* un nou nano-sistem chimioterapeutic bazat pe AuNPs biosintetizate cu gelatină și medicamentul convențional Doxorubicină

Partea III

Anexe

O parte din echipamentele folosite în studiile mele sunt descrise în această parte.

References

- [1] R. Asthana, A. Kumar, N.B. Dahotre, Butterworth-Heinemann, 2006.
- [2] S. Krol, R. Macrez, F. Docagne, G. Defier, S. Laurent, M. Rahman, et al., Chem. Rev. 113 (2013) 1877–1903.
- [3] J.L. Vivero-Escoto, Y.-T. Huang, Int. J. Mol. Sci. 12 (2011) 3888–3927. doi:10.3390/ijms12063888.
- [4] W. Cai, T. Gao, H. Hong, J. Sun, Nanotechnol. Sci. Appl. 2008 (2008).
- [5] M. Potara, D. Maniu, S. Astilean, Nanotechnology. 20 (2009) 315602.
- [6] L. Dykman, N. Khlebtsov, Chem. Soc. Rev. 41 (2012) 2256–2282.
- [7] L.A. Dykman, N.G. Khlebtsov, Acta Naturae. 3 (2011) 34–55.
- [8] A. Shalviri, G. Raval, P. Prasad, C. Chan, Q. Liu, et al., Eur. J. Pharm. Biopharm. 82 (2012) 587–597.

- [9] H.H. Mantsch, D. Chapman, Wiley-Liss, New York, 1996.
- [10] A.M. Gabudean, M. Focsan, S. Astilean, *J. Phys. Chem. C*. 116 (2012) 12240–12249.
- [11] M. Potara, M. Baia, C. Farcau, S. Astilean, *Nanotechnology*. 23 (2012) 055501
- [12] A. Miranda, E. Malheiro, E. Skiba, P. Quaresma, P.A. Carvalho, et al., *Nanoscale*. 2 (2010) 2209–2216.
- [13] W. Wu, J. Huang, L. Wu, D. Sun, L. Lin, Y. Zhou, et al., *Sep. Purif. Technol.* 106 (2013) 117–122.
- [14] V.H. Segtnan, T. Isaksson, *Food Hydrocoll.* 18 (2004) 1–11.
- [15] N.G. Parker, M.J.W. Povey, *Food Hydrocoll.* 26 (2012) 99–107.
- [16] E. van den Bosch, C. Gielens, *Int. J. Biol. Macromol.* 32 (2003) 129–138.
- [17] D. Watson, N. Hagen, J. Diver, P. Marchand, M. Chachisvilis, *Biophys. J.* 87 (2004) 1298–1306.
- [18] D. Liu, J. Zhang, C. Yi, M. Yang, *Chin. Sci. Bull.* 55 (2010) 1013–1019.
- [19] M.M. Fiallo, H. Tayeb, A. Suarato, A. Garnier-Suillerot, *J. Pharm. Sci.* 87 (1998) 967–975.
- [20] J.S. Basuki, H.T.T. Duong, A. Macmillan, R.B. Erlich, L. Esser, et al., *ACS Nano*. 7 (2013) 10175–10189.
- [21] J.-H. Xu, F.-P. Gao, L.-L. Li, H.L. Ma, et al., *Microporous Mesoporous Mater.* 182 (2013) 165–172.