UNIVERSITATEA POLITEHNICA DIN BUCUREȘTI
ȘCOALA DOCTORALĂ CHIMIE APLICATĂ ȘI ȘTIINŢA MATERIALELOR

Sisteme cu eliberare țintită de substanțe farmaceutic active

Targeted delivery systems for active pharmaceutical ingredients

CONDUCĂTOR ȘTIINȚIFIC

Prof.dr.ing. Daniela Berger

AUTOR

Ing. Doina Georgescu

BUCUREȘTI 2017

Cuvinte cheie: sisteme cu eliberare controlată de medicamente; sisteme cu eliberare țintită de medicamente; magnetită; ferită de cobalt; compozite magnetice; magnetită-silice pură și funcționalizată; compozite silice-dioxid de titan de tip SBA-15.

CUPRINS

	Partea I. Studiu de literatură	7
I.1	Introducere	7
I.2	Sinteza și proprietățile silicelor mezoporoase cu rețea de pori hexagonală 1D	9
I.3	Aplicații ale silicei mezoporoase în domeniul biomedical	12
I.3.1	Influența parametrilor texturali ai materialului mezoporos asupra capacității de adsorbție a moleculelor biologic active	15
I.3.2	Nanoparticule de silice mezoporoasă multifuncționale	17
I.3.3	Exemple de transportori anorganici pe bază de silice mezoporoasă	19
I.4	Importanța particulelor magnetice pentru biomedicină	30
I.4.1	Proprietăți magnetice ale materialelor	30
I.4.2	Aplicații ale nanoparticulelor magnetice și ale materialelor compozite magnetice	35
I.4.3	Metode de sinteză a nanoparticulelor magnetice	42
I.4.4	Acoperirea nanoparticulelor magnetice	47
I.5	Materiale compozite mezoporoase silice-dioxid de titan	49
I.5.1	Sinteza și caracterizarea materialelor compozite mezoporoase silice -dioxid de titan	49
I.5.2	Efectul încorporării heteroatomului de titan asupra caracterului hidrofil al suprafeței materialului compozit TiSBA-15	56
I.5.3	Aplicații ale materialelor compozite mezoporoase silice – dioxid de titan	57
	Bibliografie	60
	Partea a II-a. Contribuții originale	76
II.1	Justificarea alegerii temei	76
II.2	Metode de investigare a compușilor sintetizați	77
II.3	Obținerea și caracterizarea nanoparticulelor magnetice	80
II.3.1	Sinteza și caracterizarea feritelor mezoporoase în prezența copolimerului P123 pentru aplicații biomedicale	80
II.3.2	Sinteza și caracterizarea nanoparticulelor de ferită în prezența acidului oleic drept stabilizator	87
II.3.3	Sinteza magnetitei în prezență de CTAB	91
II.4	Acoperirea nanoparticulelor de ferite cu silice mezoporoasă	94
II.4.1	Sinteza și caracterizarea materialelor compozite magnetice	96
II.4.1.1	Studii asupra toxicității la nivel celular a materialelor composite magnetice	103
II.4.2	Obținerea și caracterizarea compozitelor magnetice Fe_3O_4@MCM-41 sintetizate în prezență de CTAB	104
II.4.3	Concluzii parțiale privind sinteza și proprietățile materialelor magnetice	109
II.5	Sisteme cu eliberare controlată de antibiotice	112
II.5.1	Sinteza și caracterizarea materialelor compozite mezoporoase silice –dioxid de titan	112
II.5.2	Evaluarea materialelor compozite mezoporoase silice - dioxid de titan în sisteme cu eliberare controlată de medicamente	118
II.5.2.1	Obținerea și caracterizarea materialelor compozite mezoporoase silice–dioxid de titan încărcate cu oxitetraciclină	120
II.5.2.2	Determinarea profilelor de eliberare *in vitro* a oxitetraciclinei din materialele compozite mezoporoasă silice–dioxid de titan	123
II.5.2.3	Evaluarea activității antimicrobiene a sistemelor cu eliberare controlată de oxitetraciclină	127
II.5.3	Dioxidul de titan ca transportor în sisteme cu eliberare controlată de medicamente	128
II.5.3.1	Sinteza și caracterizarea dioxidului de titan	128
II.5.3.2	Testarea dioxidului de titan mezoporos drept suport pentru oxitetracilină	136

II.5.3.3	Determinarea profilului de eliberare *in vitro* a oxitetraciclinei	138
II.5.4	Concluzii privind aplicarea compozitelor mezoporoase silice-dioxid de titan drept transportori de molecule biologic active	139
II.6	Sisteme cu eliberare țintită pe bază de doxorubicină	141
II.6.1	Sinteza nanoparticulelor de magnetită folosind ca precursor $Fe(acac)_3$	144
II.6.2	Obținerea și caracterizarea transportorilor magnetici	147
II.6.3	Sinteza și caracterizarea sistemelor cu eliberare țintită de doxorubicină	157
II.6.4	Studii de eliberare in vitro a doxorubicinei de pe transportori de tip magnetită-silice mezoporoasă	161
II.6.5	Evaluarea efectului sistemelor cu eliberare țintită de doxorubicină la nivel celular	165
II.6.6	Concluzii parțiale privind sistemele cu eliberare țintită de doxorubicină	167
II.7	Concluzii finale	168
	Bibliografie	174

Partea a II-a. Contribuții originale

II.1 Justificarea alegerii temei

Prezenta teză de doctorat, *Sisteme cu eliberare țintită de substanțe farmaceutic active,* se încadrează într-un domeniu interdisciplinar, cel al nanotehnologiilor aplicate în medicină. Cancerul, această teribilă maladie fiind cauza principală a mortalității, elaborarea unor terapii moderne prin dezvoltarea unor sisteme cu eliberare țintită de agenți antitumorali poate conduce la creșterea speranței de viață prin îmbunătățirea eficienței tratamentului. În prezent, numeroase grupuri de cercetare interdisciplinare abordează domeniul sistemelor cu eliberare controlată de medicamente.

Scopul acestei lucrări de doctorat a fost *elaborarea unor sisteme cu eliberare țintită de agent antitumoral pe bază de transportori anorganici ce conțin nanoparticule magnetice- silice mezoporoasă pură și funcționalizată.* Drept agent antitumoral s-a ales doxorubicina, care prezintă o toxicitate ridicată, utilizată în chimioterapia leucemiei, limfom Hodgkin, cancer de stomac, sân, plămâni, ovare, etc. Pentru atingerea scopului acestei teze de doctorat, s-au stabilit următoarele obiective:

- ✓ Obținerea și caracterizarea unor nanoparticule de ferită superparamagnetice, dispersabile.
- ✓ Acoperirea nanoparticulelor magnetice de ferită cu silice mezoporoasă pură și funcționalizată în vederea obținerii de transportori magnetici care pot acomoda o cantitate suficientă de agent terapeutic.
- ✓ Caracterizarea transportorilor magnetici prin tehnici variate: difracție de raze X, spectroscopie FTIR, microscopie electronică de baleiaj și în transmisie, izoterme de adsorbție-desorbție a azotului, măsurători magnetice la temperatura camerei.
- ✓ Încapsularea doxorubicinei în transportorii anorganici magnetici.
- ✓ Caracterizarea unor sisteme cu eliberare țintită de doxorubicină pe bază de transportori magnetici.
- ✓ Determinarea profilelor de eliberare *in vitro* a doxorubicinei din transportorii magnetici.

Un obiectiv derivat al acestei teze de doctorat a fost obținerea și caracterizarea unor materiale mezoporoase compozite silice-dioxid de titan de tip SBA-15, care au fost utilizate drept transportori de substanțe farmaceutic active. Aceste compozite mezoporoase s-au comparat cu silicea de tip SBA-15, respectiv cu dioxidul de titan mezoporos. Drept moleculă model, în studiul comportării acestor transportori mezoporoși anorganici s-a utilizat oxitetraciclina, un antibiotic cu spectru larg, din clasa tetraciclinelor.

II.3 Obținerea și caracterizarea nanoparticulelor magnetice

II.3.1 Sinteza și caracterizarea feritelor mezoporoase în prezența copolimerului P 123 pentru aplicații biomedicale

În cadrul tezei de doctorat pentru prepararea nanoparticulelor de ferite mezoporoase s-a folosit metoda coprecipitării, în prezența diferiților stabilizatori și metoda descompunerii unor combinații complexe.

Unul dintre stabilizatorii utilizați a fost copolimerul tribloc Pluronic P123, care funcționează în același timp și ca formator de pori. Pentru prepararea nanoparticulelor de magnetită, 0,1875 g Pluronic P123 s-a dizolvat sub agitare magnetică în 30 mL amestec de apă și etanol, în raport volumic (vol.) 1:1. Au fost dizolvate sărurile de fier și anume, 4,9819 g clorură ferică și 2,5668 g sulfat feros în volum minim de apă după care soluția de săruri de fier s-a adăugat peste soluția de Pluronic P123. Amestecul rezultat a fost menținut la 40°C, în atmosferă de argon pentru evitarea oxidării ionilor de fier divalenți, sub agitare mecanică. După 1 oră, în

amestecul de reacție care conține ioni de fier, s-a adăugat agentul de precipitare, 20 mL soluție apoasă de amoniac 25 %. Amestecul de reacție a fost omogenizat mecanic timp de 1 h obținându-se un precipitat de culoare neagră care a fost separat prin decantare magnetică, spălat cu amestec de etanol și apă, în raport volumic (v/v) de 1:1 **[6].**

Nanoparticulele de ferită de cobalt s-au preparat asemănător, folosindu-se drept precursori, 4,9819 g $FeCl_3 \cdot 6\ H_2O$ și 2,1968 g $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, iar agentul de precipitare a fost 10 mL soluție apoasă de hidroxid de sodiu 10 M. Sinteza feritei de cobalt s-a făcut în prezența aceluiași agent de stabilizare, tribloc copolimerul Pluronic P123 (0,1875 g Pluronic P123 s-a dizolvat sub agitare magnetică în 30 mL amestec apă-etanol 1:1(vol)), care ca și în cazul magnetitei are rolul de a genera porozitate, de a forma mezoporii interparticule. Pentru obținerea precipitatului negru de ferită de cobalt, cristalină, a fost necesară o etapă de maturare lungă, la 60°C, timp de 20 h **[6].**

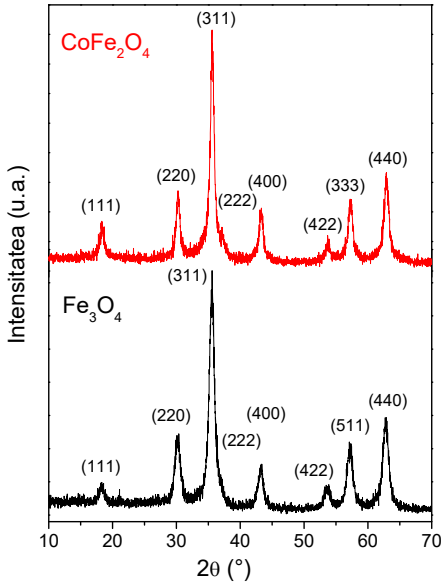


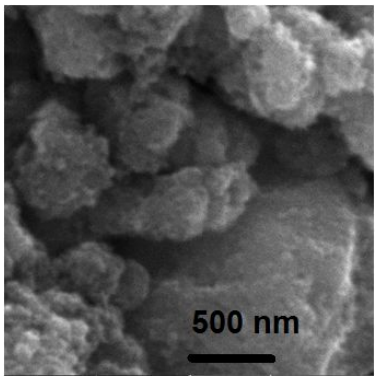
Fig.II.2 Difracții de raze X ale nanopulberilor de magnetită și ferită de cobalt

Din difractogramele de raze X la unghiuri mari (Fig.II.2) se observă că pulberile de ferită de cobalt și magnetită sintetizate prin metoda coprecipitării prezintă o structură de spinel invers cu simetrie cubică. Nanopulberile de magnetită și ferită de cobalt au fost indexate conform standardelor ICDD 79-0418 și respectiv ICDD 22-1086. *Parametrul celulei elementare* pentru magnetită, Fe_3O_4, a fost de 7,0137 Å, iar pentru ferita de cobalt s-a obținut o valoare mai mică de 6,9813 Å. Dimensiunile cristalitului pentru nanopulberile de ferită au fost calculate pe baza ecuației Sherrer's din toate reflexiile Bragg utilizând software-ul Rigaku PDXL. Dimensiunea cristalitului pentru magnetită este de 9 nm, valoare mai mică decât pentru ferita de cobalt (12 nm) **[6].**

Spectrele FTIR ale nanopulberilor sintetizate au demonstrat atât formarea feritelor, cât și prezența agentului de direcționare a structurii. S-a demontrat că interacțiunile dintre copolimerul Pluronic și suprafața feritelor cu structură de spinel nu sunt puternice deoarece agentul de stabilizare a fost eliminat în timpul izolării și spălării probelor, rolul acestui polimer fiind de a forma mezopori între particule. În spectrul FTIR al probei de magnetită s-au putut observa benzi la 450, 580 and 630 cm^{-1} caracteristice vibrațiilor de întindere a legăturii Fe-O care corespund legăturilor Fe(II)-O and Fe(III)-O în ambele geometrii octedrică și tetraedrică [7-9]. În spectrul FTIR al probei de magnetită se observă cu greu benzile corespunzătoare polimerului utilizat ca agent porogen **[6]**.

Morfologia probelor de magnetită și ferită de cobalt a fost investigată prin microscopie electronică de baleiaj. Probele prezintă o morfologie similară având particule sferice cu dimensiuni nanometrice, cu o distribuție îngustă de dimensiuni, având tendința de a forma

aglomerate sferice (Fig.II.4). Analiza TEM a nanopulberilor de $CoFe_2O_4$ demonstrează prezența unor particule mici cu diametrul în domeniul 8-16 nm. Probele prezintă porozitate datorită prezenței porilor între particule (Fig.II.5) **[6]**.



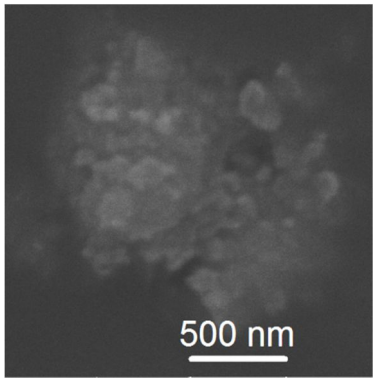


Fig.II.4 Micrografuri SEM a probelor de Fe_3O_4 (stânga) și $CoFe_2O_4$ (dreapta)

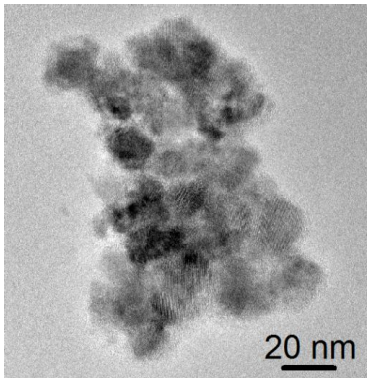


Fig.II.5 Micrograf TEM a $CoFe_2O_4$ preparate în prezența P123

Izotermele de adsorbție-desorbție ale azotului la temperatura azotului lichid 77 K ale celor două ferite sintetizate în prezența Pluronic P123 sunt de tipul IV, prezintă histeresis de tipul H1 și sunt specifice materialelor mezoporoase (Fig.II.6). Parametrii texturali pentru probele de ferite sintetizate sunt prezentați în Tabelul II.1. Valorile volumului total al porilor au fost determinate la presiunea relativă, p/p_0=0,9900, suprafețele specifice au fost calculate folosind metoda Brunauer–Emmett–Teller (BET) din analiza de regresie multi-punct în domeniul presiunilor relative 0,05-0,30, iar distribuția de dimensiuni a porilor a fost calculată cu modelul Barrett-Joyner-Halenda (BJH) pe baza ecuației Kelvin din ramura de desorbție a izotermelor. Ambele probe au o distribuție unimodală a dimensiunilor porilor, iar diametru mediu al porilor pentru ferita de cobalt (8,34 nm) este mai mic decât cel al magnetitei (11,42 nm). Dimensiunea porilor celor două probe se situează în domeniul mezoporilor. Magnetita și ferita de cobalt prezintă suprafețe specifice mari, 120 m^2/g și respectiv 155 m^2/g.

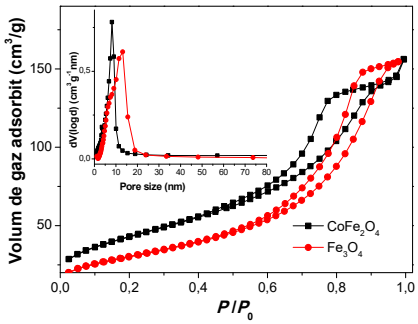


Fig.II.6 Izoterme de adsorbție-desorbție a N_2 pentru nanopulberile de Fe_3O_4 și $CoFe_2O_4$

Tabelul II.1 Proprietăți ale feritelor cu structură de spinel sinetizate

Probă	*Ms (emu/g)*	$\chi_g x10^6$	*Mr/Ms*	S_{BET} (m^2/g)	V_p (cm^3/g)	d_{BJH} *(nm)*
Fe_3O_4	49,73	970,26	0	120	0,24	11,42
$CoFe_2O_4$	42,47	583,30	0,257	155	0,24	8,34

Proprietățile magnetice ale magnetitei și feritei de cobalt au fost studiate prin măsurarea magnetizării în funcție de câmpul magnetic aplicat în domeniul -10000 …10000 Oe. La o anumită valoare a câmpului magnetic aplicat, magnetizarea depinde de momentul magnetic, iar momentul magnetic este influentat de dimensiunea particulei. Magnetizarea totală este suma a

trei componente feromagnetică (magnetizarea histeretică), superparamagnetică (fitată printr-o funcție Langevin) și paramagnetică [1,2].

Valorile magnetizării de saturație pentru cele două ferite sintetizate au fost determinate prin fitarea datelor experimentale luând în considerație componentele paramagnetice și feromagnetice pentru ferita de cobalt care arată o comportare ferimagnetică și componenta superparamagnetică pentru magnetită. Curba de histeresis a magnetitei prezintă coercitivitate și magnetizare remanentă zero care indică o comportare superparamagnetică a probei (Fig II.8). Magnetizarea de saturație a magnetitei (49,73 emu/g) este mai mică decât cea a magnetitei obținute similar prin metoda coprecipitării în prezența bromurii de cetiltrimetil amoniu (59,81 emu/g) **[10]**.

Ferita de cobalt obținută prin utilizarea stabilizatorului Pluronic P123 prezintă coercitivitate ridicată H_c=468.87 Oe și o magnetizare remanentă de 10.93 emu/g, demonstrând o comportare ferimagnetică (Tabelul II.1). Pentru ferita de cobalt sintetizată folosind Pluronic P123 s-a obținut o magnetizare de saturație, 42,47 emu/g, mai mică decât ferita de cobalt sintetizată în prezența agentului de direcționare a structurii acid oleic (52,33 emu/g), cu o dimensiune medie a particulei de 13 nm [11].

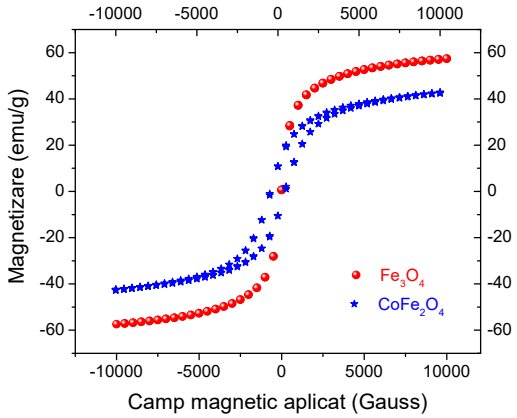


Fig.II.8 Magnetizarea în funcție de câmpul magnetic aplicat pentru nanopulberile de ferite mezoporoase

II.3.2 Sinteza și caracterizarea nanoparticulelor de ferită în prezența acidului oleic drept stabilizator

Magnetita și ferita de cobalt au fost sintetizate similar tot prin coprecipitare dar drept stabilizator s-a utilizat acidul oleic. Față de sinteza nanoparticulelor magnetice în prezența Pluronicului P123 care a decurs la 40°C prepararea nanoparticulelor de magnetită și ferită de cobalt folosind acidul oleic s-a făcut la temperatura camerei și respectiv la 90°C. Pentru sinteza magnetitei precursorii metalici folosiți au fost clorura ferică, $FeCl_3 \cdot 6\ H_2O$ și clorura feroasă, $FeCl_2 \cdot 4H_2O$, iar pentru sinteza feritei de cobalt precursorii metalici utilizați au fost tot clorura ferică, $FeCl_3 \cdot 6\ H_2O$ și clorura de cobalt $CoCl_2 \cdot 6H_2O$. De asemenea, s-au utilizat aceeași agenți de precipitare, în cazul magnetitei soluția de amoniac concentrat 25 % [14], iar pentru ferita de cobalt soluția concentrată de hidroxid de sodiu, NaOH 10 M. Pentru a obține ferita de cobalt cristalină a fost necesară o etapă de maturare lungă a precipitatului obținut, timpul și temperatura la care s-a desfășurat procesul fiind similare feritei de cobalt obținute în prezența Pluronic P123.

Apa deionizată a fost purjată cu argon timp de 10 minute, apoi au fost dizolvate sărurile solide (pentru prepararea magnetitei clorura ferică, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ și clorura feroasă, $FeCl_2 \cdot 4H_2O$, respectiv pentru sinteza feritei de cobalt clorura ferică, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ și clorura de cobalt, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$) urmate de adăugarea acidului oleic în amestecul de reacție în atmosferă inertă. În cazul preparării magnetitei, Fe_3O_4, atmosfera inertă a contribuit la evitarea formării fazei de maghemită γ-Fe_2O_3. Pe parcursul sintezelor amestecurile de reacție au fost omogenizate mecanic. Raportul molar al ionilor metalici: acid oleic a fost de 1:0,0965. Amestecurile de reacție au fost încălzite la 90 °C, timp de 30 minute urmate de adăugarea agentului de precipitare (în cazul magnetitei, Fe_3O_4, soluția de amoniac concentrat 25 %, iar în cazul sintezei feritei de

cobalt, $CoFe_2O_4$, soluția de hidroxid de sodiu 10 M). Amestecurile de reacție au fost încălzite din nou la 90°C, timp 2,5 ore. Precipitatul de ferită de cobalt a fost maturat la 60°C, timp de 20h. Precipitatele solide de culoare neagră au fost filtrate și spălate cu cantități mari de apă și etanol **[11]**.

Caracterizarea nanopulberilor de ferite mezoporoase preparate s-a efectuat prin difracție de raze X la unghiuri mari, spectroscopie FTIR, microscopie electronică în transmisie, măsurători magnetice la temperatura camerei. Difractogramele de raze X la unghiuri mari ale nanoparticulelor de magnetită și ferită de cobalt (Fig.II.9 și Fig.II.10) obținute prin metoda coprecipitării în soluție apoasă la temperatura camerei și 90°C în prezența acidului oleic demonstrează că acestea au o structură cristalină de spinel invers cu simetrie cubică aparținând grupului spațial de simetrie $Fd\bar{3}m$ și pot fi indexate cu standardele ICDD 79-0418 și ICDD 22-1086. Dimensiunea medie a cristalitului calculat cu software-ul PDXL pentru magnetită a fost de 8 nm mai mică decât pentru ferita de cobalt 15 nm, iar *parametrul celulei elementare*, *a*, pentru Fe_3O_4 este de 8,478 Å mai mare decât pentru $CoFe_2O_4$ 8,370 Å .

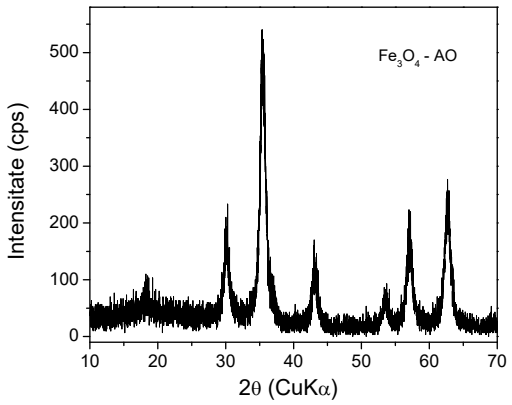


Fig.II.9 Difractograma de raze X la unghiuri mari a pulberii de magnetită obținută în prezență de acid oleic drept stabilizator

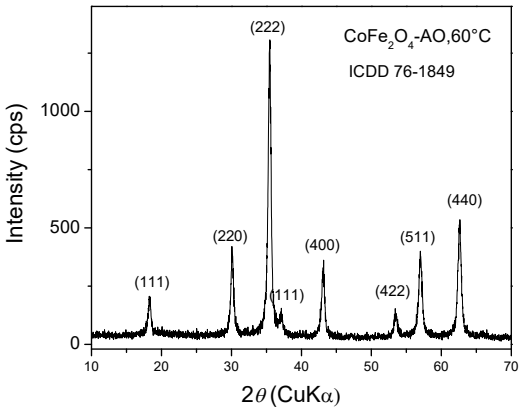


Fig. II.10 Difractograma de raze X la unghiuri mari a pulberii de ferită de cobalt obținută în prezență de acid oleic drept stabilizator

Din spectrele FTIR ale probelor de magnetită și ferită de cobalt obținute în prezență de acid oleic se poate observa o interacțiune mai puternică a surfactantului cu magnetita decât cu ferita de cobalt, în spectrul FTIR al Fe_3O_4 fiind prezente benzile caracteristice ale ionului oleat în domeniul 2800-2900 cm^{-1} (vibrațiile de întindere asimetrice și simetrice ale legăturii C-H din grupările metilenice), precum și cele ale grupării carboxilice în domeniul 1350-1700 cm^{-1}. În ambele spectre s-au putut observa benzile intense de la 580 și 630 cm^{-1} caracteristice vibrațiilor de întindere ce pot fi atribuite legăturilor Fe(II)-O/Co(II)-O și Fe(III)-O atât în înconjurare octaedrică cât și tetraedrică.

Pulberile de ferită cu structură de spinel invers sintetizate în prezență de acid oleic s-au investigat prin microscopie electronică de baleiaj. Așa cum se poate observa din figura II.12 nanoparticulele de magnetită sunt sferice, mici cu o tendință de a se aglomera datorită interacțiilor magnetice în aglomerate sferice. Investigarea nanopulberii de ferită de cobalt prin TEM demonstrează că aceasta se prezintă sub formă de nanoparticulele cu o geometrie poliedrală (Fig.II.13) și cu o distribuție a dimensiunilor îngustă, dimensiune medie fiind de 12 ± 2,5 nm (Fig.II.13 inserare).

Comportarea magnetică a probelor sintetizate la temperatura camerei demonstrează că proba de magnetită prezintă o comportare superparamagnetică, iar proba de ferită de cobalt, $CoFe_2O_4$, are o comportare ferimagnetică prezentând o curbă de histeresis (Fig.II.14) cu magnetizarea remanentă de 12,63 emu/g și coercitivitatea de 369,5 Oe. Ferita de cobalt nu atinge magnetizarea de saturație la un câmp magnetic aplicat de ±10 kOe, la temperatura camerei.

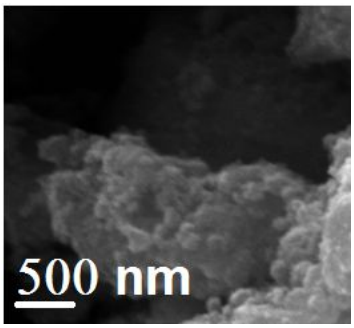


Fig.II.12 Imaginea SEM a pulberii de magnetită obținută în prezență de acid oleic drept stabilizator

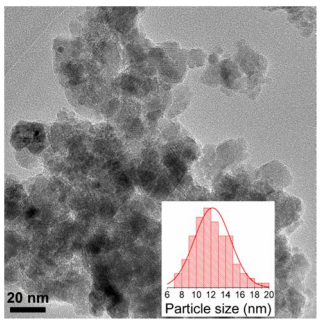


Fig.II.13 Micrograf TEM pentru nanoparticulele de ferită de cobalt obținute în prezență de acid oleic drept stabilizator și distribuția dimensiunii particulei (inserarea)

Valorile magnetizării de saturație calculate pentru magnetită au fost de 57,10 emu/g și pentru ferită de cobalt de 52,33 emu/g. Datorită dimensiunilor nanometrice ale particulelor, valorile magnetizării de saturație ale feritei de cobalt au fost mai mici decât pentru magnetita [12] și ferita de cobalt bulk. Pierderi ale magnetizării de saturație a nanoparticulelor magnetice se produc datorită efectului de suprafață a acestora (*spin canting effect*) și prezenței unui strat neactiv din punct de vedere magnetic pe suprafața particulelor mici [15].

Comportarea superparamagnetică este legată de anizotropia magneto-cristalină care este determinată de puterea de cuplare spin-orbită. Comportarea superparamagnetică a feritei de cobalt este dificil de obținut deoarece dintre feritele cu structură de spinel prezintă cele mai mari valori ale cuplării spin-orbită și a constantei anizotropice, iar dimensiunea critică pentru un comportament superparamagnetic este foarte mică, mult mai mică decât pentru magnetită [16].

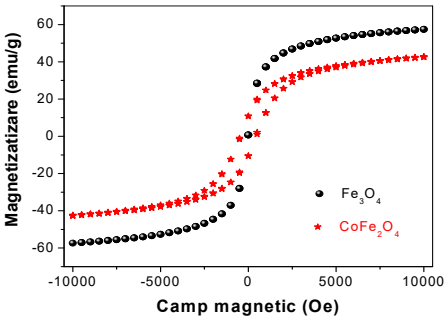


Fig.II.14 Curbele magnetizării la temperatura camerei pentru probele de ferite obținute în prezență de acid oleic drept stabilizator

În literatura de specialitate s-a raportat că nanoparticulele de ferită de cobalt cu un diametru în jur de 25 nm preparate prin metoda coprecipitării în prezența acidului oleic au valori mai mici pentru magnetizarea de saturație (46.2 emu/g) și coercitivitate (147 Oe) [17] decât proba de ferită de cobalt sintetizată **[11]**. S-a obținut o valoare mai mare pentru suprafața specifică BET determinată în domeniul presiunilor parțiale p/p_0 = 0,01-0,25 pentru proba de ferita de cobalt (119 m^2/g) decât pentru magnetită (21 m^2/g) **[11]**.

II.3.3 Sinteza magnetitei în prezență de CTAB

Prepararea magnetitei mezoporoase în prezența CTAB s-a efectuat folosind precursori diferiți. Drept precursor de Fe(II) s-au folosit clorură feroasă sau sulfat feros. Deoarce clorura feroasă este mai instabilă la oxidare decât sulfatul feros aceasta s-a folosit în exces de 20%. Pentru obținerea ionului feric în rețeaua spinelică a magnetitei s-a folosit în ambele cazuri clorura ferică.

Obținerea nanoparticulelor de magnetită din precursorii clorură ferică și clorură feroasă s-a efectuat printr-o metodă într-o singură etapă intitulată „one pot method", în vasul de reacție având loc atât sinteza nanoparticulelor de magnetită obținute cât și încapsularea acestora în matricea de silice de tip MCM-41, sinteza decurgând fără izolarea nanoparticulelor magnetice. În acest capitol se prezintă doar prepararea nanoparticulelor de magnetită. Astfel, 2,5 mL și 3,5 mL soluții apoase de 0,5 M $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ și $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ au fost adăugate sub agitare mecanică peste 54 mL amestec format din 1,2 g CTAB și apă. Clorura feroasă a fost adăugată în exces de 20% față de clorura ferică pentru a se evita formarea fazei de maghemită, γ-Fe_2O_3. Peste amestecul de

reacție s-au introdus 8 mL soluție concentrată de amoniac 25 % la temperatura camerei. S-a format un precipitat de culoare neagră de magnetită **[11]**.

Difractograma de raze X la unghiuri mari a pulberii de culoare neagră sintetizată a demonstrat formarea fazei de magnetită cu structură cristalină de spinel invers (grupul spațial $Fd\bar{3}m$) și simetrie cubică care corespunde tiparului de difracție JCPDS 79-0418.

O altă sinteză a nanoparticulelor de magnetită folosind surfactant CTAB și precursori clorură ferică și sulfat feros s-a efectuat într--o procedură în două etape („two step procedure"), în prima etapă a fost sintetizată nanopulberea de magnetită, iar în etapa a doua nanoparticulele au fost acoperite cu silice de tip MCM-41. Nanoparticulele de magnetită au fost preparate prin metoda coprecipitării în prezența CTAB din $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ și $FeSO_4 \cdot 7H_2O$. 2,73 g CTAB a fost dispersat în 60 mL apă ultrapură. Peste acest amestec s-a adăugat sub agitare mecanică în atmosferă inertă la 40 °C, 18 mL de soluție apoasă 0,5 M $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ și 24 ml soluție apoasă 0,25 M $FeSO_4 \cdot 7H_2O$. După 1 oră, în soluția care conține ioni Fe^{2+} și Fe^{3+} în atmosferă inertă au fost adăugați 20 mL soluție apoasă de amoniac 25 %. Amestecul de reacție a fost omogenizat încă 1 oră la 40 °C și nanoparticulele rezultate au fost spălate cu apă și etanol și recuperate prin decantare magnetică **[10]**.

Difractograma de raze X pentru nanoparticulele de magnetită demonstrează formarea fazei de magnetită pură cu structură de spinel cu simetrie cubică care corespunde cu standardul ICDD 76-1849 (Fig.II.15). Parametrul celulei elementare pentru magnetită calculată din reflexiile Bragg ale difractogramei de raze X are valoarea 0,836 nm și corespunde cu cea obținută din izoterma de adsorbție-desorbție a azotului la temperatura azotului lichid 77 K. Dimensiunea cristalitului pentru magnetită calculată din software-ul Rigaku PDXL pe baza ecuației Scherrer's din toate reflexiile Bragg a fost 11 nm. Suprafața specifică a nanoparticulelor de magnetită obținută din izoterma de adsorbție-desorbție a azotului la temperatura azotului lichid 77 K este de 67,4 m^2/g **[10]**.

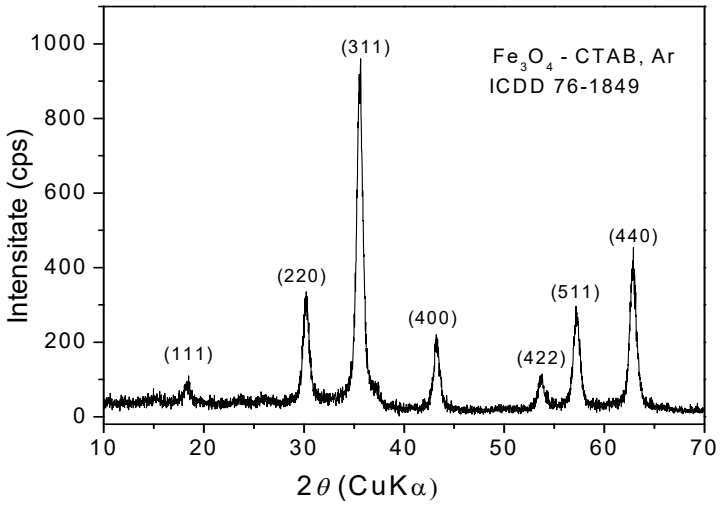


Fig.II.15 Difractograma de raze X a pulberii de magnetită obținută în prezență de CTAB

Morfologia pulberii sintetizată a fost investigată prin microscopie electronică de baleiaj. Particulele de magnetită au formă sferică, sunt de dimensiuni nanometrice și tind să formeze aglomerate sferice cu diametrul în domeniul 50-80 nm (Fig.II.17 (A)) **[10]**.

Proba de magnetită sintetizată în prezență de CTAB prezintă o comportare superparamagnetică la temperatura camerei (Fig.II.18), demonstrând dimensiunea nanometrică a particulelor de magnetită. Magnetizarea de saturație calculată din fitarea curbei de magnetizare cu funcția Langevin a nanoparticulelor de magnetită este mai mică decât a materialului bulk, fiind de 59,81 emu/g. Se observă că magnetizarea nu atinge saturația la câmpul magnetic maxim aplicat **[10]**.

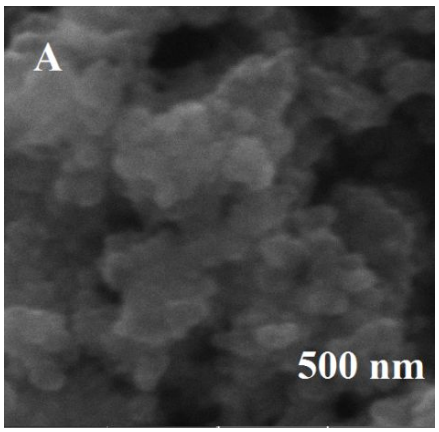


Fig.II.17 Imaginea SEM a pulberii de Fe_3O_4 obținută în prezență de CTAB (A)

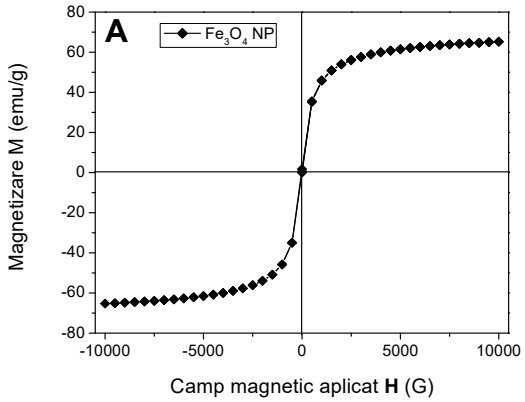


Fig.II.18 Variația magnetizării în funcție de câmpul magnetic măsurată la temperatura camerei pentru nanopaticulele de Fe_3O_4 sintetizate în prezență de CTAB

II.4 Acoperirea nanoparticulelor de ferite cu silice mezoporoasă

Acoperirea nanoparticulelor magnetice se poate realiza cu substanțe organice (polimeri sau surfactanți) [18-22], anorganice (silice [23], carbon [24], metale prețioase cum sunt aurul sau argintul [25-27]) sau fie se poate forma un strat de oxid printr-un proces de oxidare blândă sau fie se acoperă cu un strat suplimentar de oxid [28]. Un caz aparte îl constituie materialele compozite de tip „core-shell" în care nanoparticulele de magnetită sunt dispersate sau acoperite într-o sau cu o matrice de polimer, silice sau carbon. Prin acoperire nanoparticulele magnetice sunt separate una de cealaltă datorită învelișului protector devenind stabile coloidal și pot fi dispersate în diferite medii. Dintre metodele de protejare a nanoparticulelor magnetice, în această lucrare au fost folosite acoperirea cu silice mezoporoasă și obținerea de materiale compozite.

În cadrul acestei lucrări s-au sintetizat și caracterizat compozite magnetice mezoporoase pe bază de ferită de cobalt și magnetită cu structură de spinel invers acoperite cu silice de tip MCM-41 care prezintă o rețea de pori hexagonală, ordonată. În literatură au fost raportate studii referitoare la prepararea compozitelor magnetice magnetită-silice mezoporoasă. Cele mai studiate au fost nanocompozitele magnetice de tip MCM-41 sau SBA-15 cu o rețea a porilor 2D hexagonală, ordonată [36,37].

II.4.1 Sinteza și caracterizarea materialelor compozite magnetice

Pentru sinteza materialelor compozite ferită-silice mezoporoasă s-au folosit nanoparticule de magnetită cu structură de spinel invers și simetrie cubică obținute prin metoda coprecipitării, utilizând ca agent stabilizat CTAB și nanoparticule de magnetita și ferita de cobalt cu structură de spinel care au fost preparate tot în soluție apoasă, prin metoda coprecipitării, dar utilizând ca agent stabilizat acid oleic. Nanoparticulele de magnetită obținute prin metoda coprecipitării în soluție apoasă folosind surfactant CTAB au fost obținute folosind precursori, soluții apoase de clorură feroasă 0,5 M și clorură ferică 0,5 M care au fost adăugate peste dispersia de CTAB în apă, sub agitare mecanică, la temperatura camerei. Precipitarea s-a realizat cu o soluție de amoniac 25 %. S-a obținut un precipitat de culoare neagră de magnetită **[11]**.

Pentru nanoparticule de magnetită și ferită de cobalt preparate în soluție apoasă, prin metoda coprecipitării, dar utilizând ca agent stabilizat acid oleic, precursorii folosiți au fost clorurile metalice dizolvate în apă purjată cu argon peste care a fost adăugat acidul oleic. Peste amestecul încălzit la 90°C, sub omogenizare mecanică, s-a adăugat agentul de precipitare (în cazul magnetitei, Fe_3O_4, soluția de amoniac, iar în cazul feritei de cobalt, $CoFe_2O_4$, soluția de hidroxid de sodiu 10 M. Amestecurile de reacție au fost încălzite din nou la 90°C, timp de 2,5 ore. Precipitatul de ferită de cobalt a fost maturat la 60°C, 20 ore **[11]**.

Pentru încapsularea nanoparticulelor magnetice în matrice de silice mezoporoasă de tip MCM-41 au fost folosite două abordări: metoda de sinteză într-un singur vas de reacție pentru prepararea materialelor compozite de tip Fe_3O_4-MCM-41 fără izolarea nanoparticulelor de magnetită sintetizate și prepararea în două etape în care nanoparticulele magnetice de magnetita și ferita de cobalt au fost sintetizate, izolate, dispersate în cloroform și apoi acoperite cu silice mezoporoasă. În ambele cazuri au fost obținute acoperiri de tipul silice de tip MCM-41 prin metoda sol-gel, asistată de tratament hidrotermal **[11].**

Pentru acoperirea cu silice de tip MCM-41 a nanoparticulelor de magnetită prin metoda într-o *singură etapă* au fost preparate nanoparticule de magnetită în prezența surfactantului CTAB, fără izolarea acestora. Sinteza a continuat cu încapsularea nanoparticulelor magnetice formate în matricea de silice, prin picurarea a 5 mL precursor de silice, tetraetilortosilicat, în amestecul de reacție. Amestecul de reacție a fost omogenizat mecanic la 40 °C, timp de 24 h și apoi a fost supus unui tratament hidrotermal la 100 °C, 24 h. Precipitatul format a fost izolat prin separare magnetică și spălat cu apă și etanol pentru îndepărtarea moleculelor de surfactant. Proba a fost uscată la temperatura camerei, calcinată la 550°C, 5h pentru îndepărtarea completă a surfactantului și etichetată Fe_3O_4-MCM(A) **[11]**.

Pentru prepararea materialelor compozite de tip Fe_3O_4-MCM-41 și $CoFe_2O_4$-MCM-41 în două etape, s-au folosit nanoparticule de magnetită, Fe_3O_4 și ferita de cobalt, $CoFe_2O_4$, preparate în prezența agentului de stabilizare, acid oleic. 0,045 g nanoparticule de magnetită, respectiv ferită de cobalt au fost dispersate în 2,5 mL de chloroform, într-o baie cu ultrasunete. Cloroformul are rolul de a realiza o bună dispersie a nanoparticulelor magnetice acoperite de acid oleic. Suspensia obținută a fost adăugată la 60 mL apă bidistilată care conține 1,2 ml CTAB. Amestecurile de reacție au fost menținute la 60°C, 10 minute în baia de ultrasunete pentru evaporarea cloroformului. Peste amestecurile de reacție s-au adăugat 3 mL soluție apoasă de amoniac 25 % și precursorul de silice 2,95 mL TEOS. Amestecurile de reacție au fost agitate mecanic la 40 °C, 24h și apoi au fost supuse unui tratament hidrotermal la 100°C, 24 h. Precipitatele au fost izolate prin separare magnetică și spălate cu apă și etanol. Probele au fost uscate la temperatura camerei și apoi calcinate la 550 °C, 5h pentru îndepărtarea completă a surfactantului. Materialele sintetizate vor fi denumite în continuare Fe_3O_4-MCM(B) și $CoFe_2O_4$-MCM **[11].**

Difractogramele de raze X la unghiuri mari au demonstrat conservarea structurii cristaline a nanoparticulelor de ferită și formarea fazei amorfe de silice (Fig.II.21 c, d și e), în timp ce difractogramele de raze X la unghiuri mici demontrează formarea stratului de silice mezoporoasă cu rețea de pori ordonată, prin prezența reflexiilor Bragg caracteristice silicei (100), (110) și (200) de tip MCM-41 (Fig.II.22).

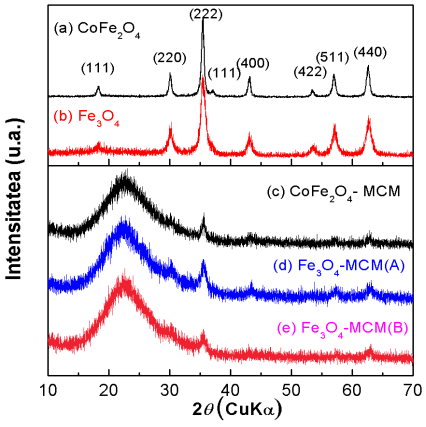


Fig.II.21 Difractograme de raze X ale nanoparticulelor de ferite (a și b) și materialelor compozite (c-e)

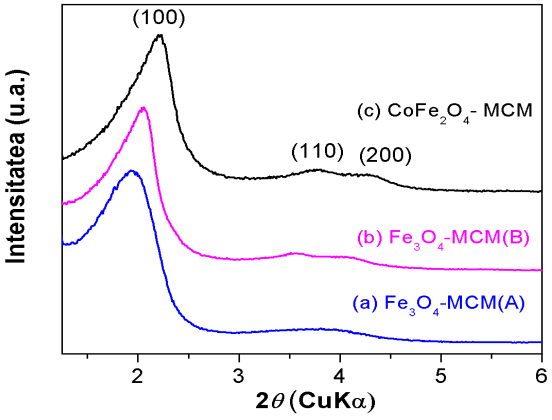


Fig.II.22 Difractograme la unghiuri mici pentru compozitele magnetice

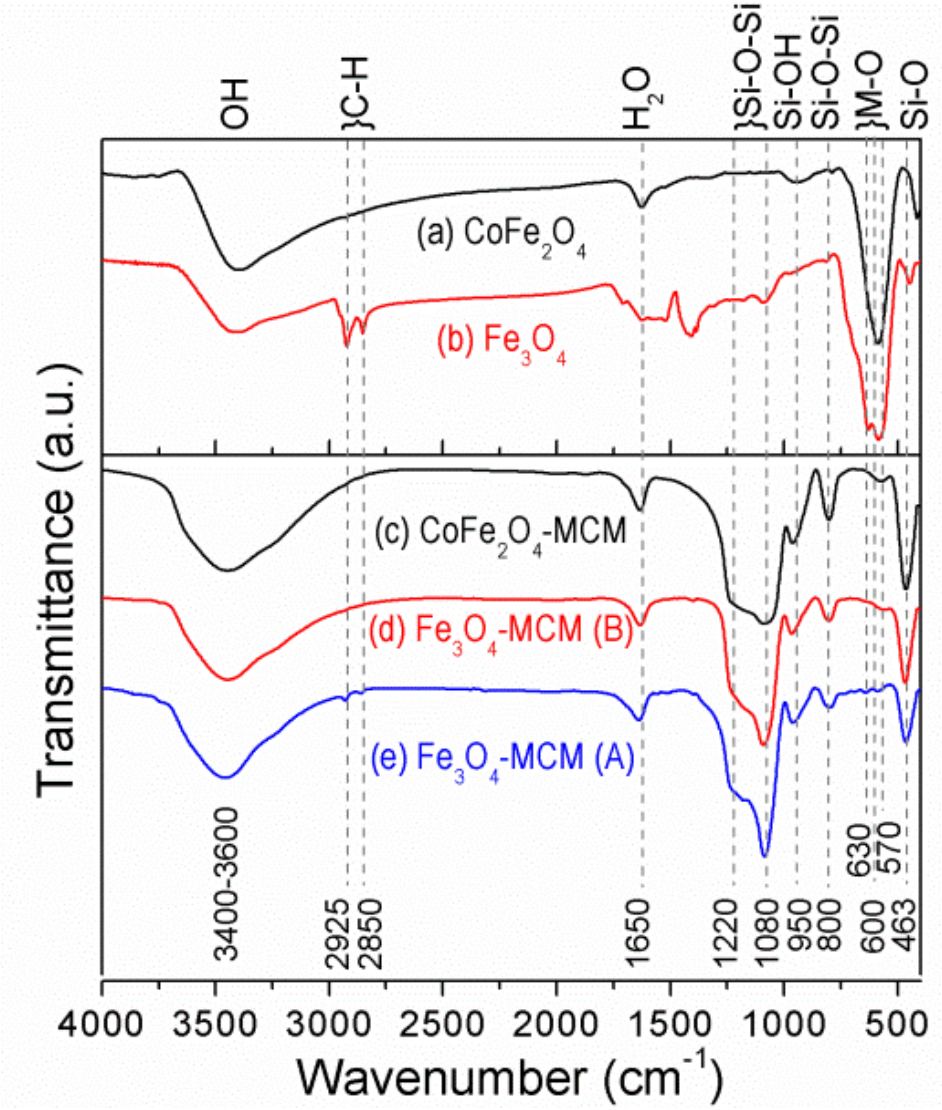


Fig.II.23 Spetrele FTIR ale nanoparticulelor de ferite (a și b) și ale probelor de compozite magnetice (c-e)

În spectrul FTIR al materiale compozite magnetice sintetizate (Fig.II.23) se pot observa vibrațiile caracteristice ale matricei de silice, $\nu_{as,s}$(Si-O-Si) =1080 și 800 cm^{-1}, ν_{as}(Si-OH)=950 cm^{-1}, δ(Si-O)=463 cm^{-1}, benzile moleculelor de apă adsorbite la 1650 cm^{-1}, benzile largi ale vibrațiilor de întindere ale grupelor OH în domeniul 3400-3600 cm^{-1} și vibrațiile de întindere ale legăturii M-O la 570 cm^{-1} și 630 cm^{-1} pentru Fe_3O_4 și 600 cm^{-1} pentru $CoFe_2O_4$ (Fig.II.23 c, d, e). Prezența vibrațiilor silicei în spectrele FTIR ale tuturor compozitelor au demonstrat formarea matricei de silice mezoporoase. Față de spectrul FTIR al probei de ferită de cobalt, $CoFe_2O_4$ (Fig.II.23 a), în spectrul FTIR al probelor de magnetită, Fe_3O_4, s-au observat vibrații caracteristice grupărilor de oleat (Fig.II.23 b) ca rezultat al interacțiunilor mai puternice între nanoparticulele de magnetită și agentul stabilizant.

În Tabelul II.2 sunt prezentate proprietățile texturale (suprafața specifică, S_{BET}, volumul porilor cu diametrul sub 10 nm, V_p, și dimensiunea medie a porilor, d_{BJH}, calculată pe baza ecuației Kelvin prin utilizarea modelului Barett Joyner Halenda), valorile magnetizării de saturație și conținutul de nanoparticule de ferite în compozitele preparate care s-a determinat prin spectrometria de masă cu plasmă cuplată inductiv, ICP-MS. S-a folosit ca echipament de lucru Agilent 8900 Triple Quadrupole ICP-MS.

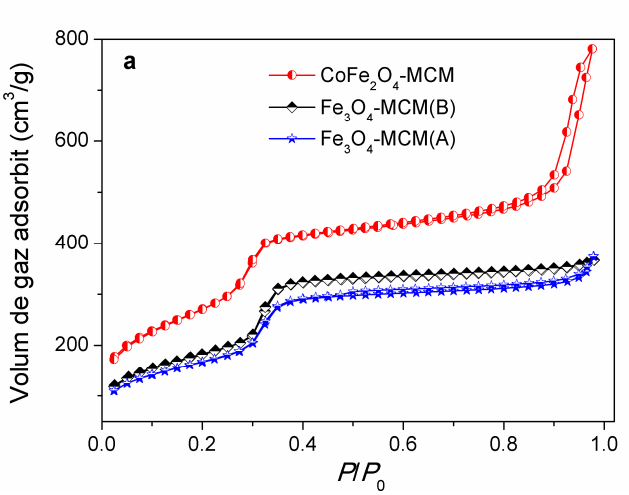


Fig. II.24 a Izotermele de adsorbție-desorbție ale azotului pentru probele de compozite magnetice

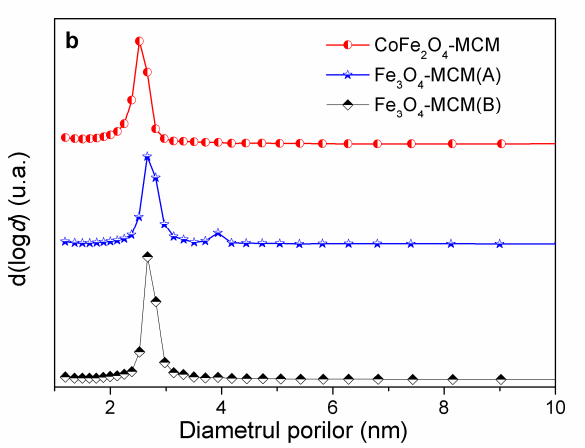


Fig.II.24 b Curbele de distribuție a dimensiunii porilor calculate cu modelul BJH pentru materialele compozite ferită-silice mezoporoasă

Materialele compozite magnetice prezintă izoterme de adsorbție-desorbție a azotului la temperatura azotului lichid, 77 K, de tip IV caracteristice pentru materialele MCM-41 (Fig.II.24 a). Toate compozitele prezintă o suprafață specifică mare și valori ale volumului de mezopori ridicat care sunt necesare în aplicații biomedicale precum transportor de substanțe biologic active (Tabelul II.2). Cea mai mare suprafață specifică a fost determinată pentru proba $CoFe_2O_4$-MCM a cărei izotermă prezintă o fracție de macropori care corespunde unei creșteri bruște a volumului de gaz adsorbit la presiunea relativă, P/P_0, mai mare de 0,9 și care corespunde porilor dintre particule magnetice. Curba distribuției dimensiunilor porilor pentru toate probele este unimodală, iar dimeniunea medie a porilor pentru toate nanocompozitele este caracteristică silicei de tip MCM-41 (Fig.II.24 b). Dimensiunea medie a porilor variază între 2,52 nm pentru proba de $CoFe_2O_4$-MCM și 2,67 nm pentru proba de Fe_3O_4-MCM(B).

Analiza TEM a compozitelor magnetice a demonstrat încapsularea nanoparticulelor de ferite în matricea de silice mezoporoasă cu rețea de pori ordonată. Proba obținută prin metoda într-o singură etapă, Fe_3O_4-MCM(A) prezintă nanoparticule de magnetită mici, dispersate în matricea de silice mezoporoasă, cu o distribuție îngustă de dimensiuni a particulelor și o dimensiune medie a particulelor de 6,5±1,5 nm (Fig.II.25 a). Analiza TEM a probei Fe_3O_4-MCM(B) a demonstrat că nanoparticulele de magnetită sunt încapsulate în matricea de silice mezoporoasă având o distribuție a dimensiunilor particulelor îngustă și un diametru mediu a particulelor de 7±1,7 nm (Fig.II.25 b) **[11]**.

Tabelul II.2 Proprietăți ale materialelor compozite

Probele de compozite	S_{BET} (m^2/g)	V_p (d_{por}<10 nm) (cm^3/g)	d_{BJH} (nm)	M_s (emu/g)	Conținutul de ferite (%gr.)
Fe_3O_4-MCM(A)	612	0,51	2,66	3,77	5,64
Fe_3O_4-MCM(B)	664	0,58	2,67	1,79	3,77
$CoFe_2O_4$-MCM	784	0,66	2,52	1,26	3,10

Nanoparticulele de ferită de cobalt au tendința de a interacționa una cu celalată formând agregate de 2 sau 3 nanoparticule care sunt încapsulate în matricea de silice mezoporoasă formând particule sferice, cu un diametru mediu de 160 nm și cu o distribuție a porilor ordonată, rezultate confirmate și de analiza de difracție de raze X la unghiuri mici (Fig.II.25 c, d). Au fost observate unele particule mai mici cu o dimensiune medie a nanoparticulelor de 27 nm.

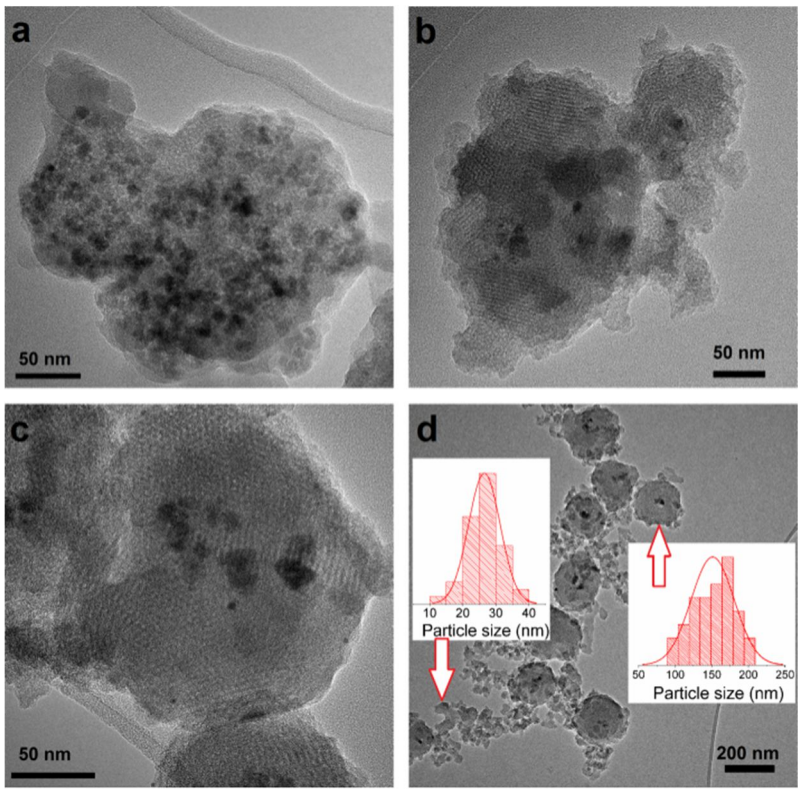


Fig. II.25 Imaginile TEM ale compozitelor magnetice: (a) proba Fe_3O_4-MCM(A), (b) proba Fe_3O_4-MCM(B) și (c și d) proba $CoFe_2O_4$-MCM. Inserat, distribuțiile dimensiunilor particulelor pentru proba $CoFe_2O_4$-MCM

Magnetizarea în funcție de intensitatea câmpului magnetic aplicat măsurată la temperatura camerei a tuturor materialelor compozitelor, a demonstrat că probele de materiale compozite care conțin magnetită, Fe_3O_4, nu prezintă histeresis și au proprietăți superparamagnetice. Proba de material compozit $CoFe_2O_4$-MCM prezintă proprietăți ferimagnetice (Fig.II.26). Pentru ferita de cobalt acoperită cu silice de tip MCM-41 valorile magnetizării remanente și coercitivității sunt 0,38 emu/g și respectiv 427 Oe.

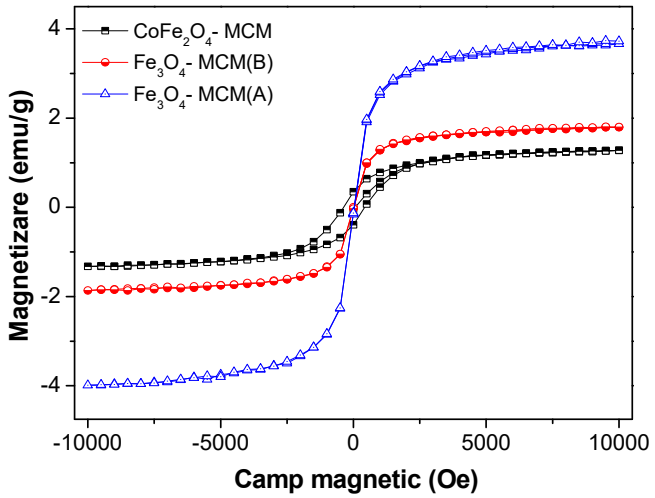


Fig.II.26 Curbele magnetizării materialelor compozite magnetice

Pentru materialul compozit sintetizat $CoFe_2O_4$-MCM-41, cu o compoziție a fazei magnetice de 3,10 %(gr.), valoarea magnetizării de saturație 1,26 emu/g este mai mare decât valoarea magnetizării de saturație de 0,6 emu/g raportată în literatură pentru materialul compozit

obținut prin impregnarea silicei mezoporoase cu nanoparticule de ferită de cobalt cu structură de spinel și un conținut de 6,4 %(gr.) [39].

Rezultate raportate recent în literatură au demonstrat că nanoparticulele de $CoFe_2O_4$ acoperite cu silice amorfă cu o dimensiune a cristalitului 2,2–4,3 nm analizate cu spectrele Mössbauer nu sunt superparamagnetice, ci paramagnetice, această proprietate este specifică nanoparticulelor magnetice izolate cu un material care nu prezintă proprietăți magnetice [40].

II.4.1.1 Studii asupra toxicității la nivel celular a materialelor compozite magnetice

Pentru determinarea toxicității probelor sintetizate s-a folosit linia de celule OK (celule de rinichi aderente de oposum epiteliale). Linia de celule OK a fost expusă 48 ore la nanoparticule de ferită de cobalt, $CoFe_2O_4$ și la nanoparticule de materiale compozite magnetice Fe_3O_4-MCM(B) și $CoFe_2O_4$-MCM de diferite concentrații 50, 100 și 200 μg/mL. Activitatea mitocondrială a celulelor (mitocondria este un organit citoplasmatic format din proteine, lipide și enzime care furnizează energia necesară celulei) a fost evaluată prin reducerea compusului de tipul tetrazol la formazan în celule metabolic active [41,42]. Toxicitatea a fost cuantificată prin măsurarea absorbanței probelor la 490 nm.

Absorbanța produsului derivat formazan care este obținut în celula metabolic activă este direct proporțională cu numărul de celule viabile. După cum se observă în Fig.II.27 chiar la concentrații mari ale probelor magnetice, care uneori în literatură au fost raportate ca fiind concentrații toxice, proliferarea celulară nu a fost afectată. De exemplu, s-a raportat pentru nanoparticulele de ferită de cobalt citotoxicitate pe linii de celule tumorale ale cancerului pancreatic uman și ovarian uman la concentrații mai mari de 0,95 μg/mL [43], în timp ce măsurătorile de viabilitate celulară au arătat o toxicitate scăzută a nanoparticulelor de $CoFe_2O_4$ cu diametrul particulelor de 4 nm pe linia de celule tumorale de plămâni, în domeniul de concentrații 0,2-0,8 μg/mL [44].

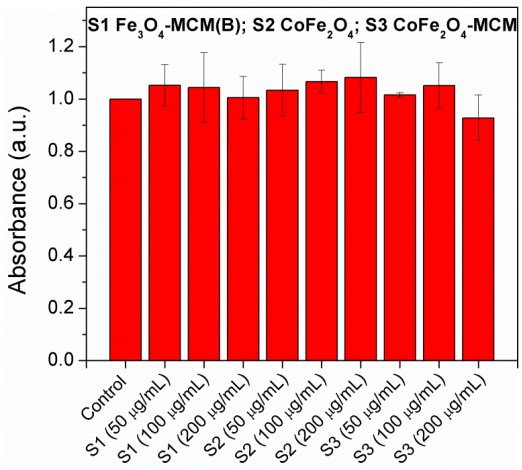


Fig. II.27 Toxicitatea după 48 ore de expunere a probelor magnetice

II.4.2 Obținerea și caracterizarea compozitelor magnetice Fe_3O_4@MCM-41 sintetizate în prezență de CTAB

De asemenea, au fost sintetizate nanocompozite de tip Fe_3O_4@MCM-41 tot printr-o procedură în două etape, dar nanoparticulele de magnetită au fost sintetizate prin metoda co-precipitării folosind ca precursori clorură ferică, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 0,5 M și sulfat feros, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,25 M, în prezența CTAB la temperatura de 40 °C, în atmosferă inertă, prin precipitare cu soluție de amoniac concentrată (25 %). Nanoparticulele de magnetită au fost spălate cu amestec de apă și alcool 50:50 (vol.) și recuperate prin decantare magnetică.

Pentru acoperirea cu silice de tip MCM-41, 0,046 g Fe_3O_4 (0,2 mmoli) au fost dispersate în baia de ultrasunete într-un amestec care conține 0,600 g CTAB (1,64 mmoli) și 2,5 ml amoniac în 30 ml apă. 2,5 ml TEOS (11,2 mmoli) au fost adăugați în amestecul de reacție care a

fost omogenizat mecanic la 40 °C, timp de 24 ore. Amestecul de reacție a fost supus ulterior unui tratament hidrotermal la 150°C pentru 24 ore. Precipitatul solid obținut a fost separat magnetic, iar îndepărtarea surfactantului s-a efectuat prin extracție în soluție alcoolică de azotat de amoniu 2 %(gr.). Pentru proba astfel obținută s-a utilizat denumirea Fe_3O_4@MCM-41E **[10]**.

Difractograma de raxe X la unghiuri mari (Fig.II.28) demonstrează că nanoparticulele de magnetită au fost încapsulate în matricea de silice de tip MCM-41.Proba de Fe_3O_4@MCM-41 (extras) prezintă un bandă largă în domeniul 2θ = 15-35° care demonstrează formarea fazei de silice amorfă. Dimensiunea cristalitului fazei de magnetită (11 nm) nu a fost alterată după procedura de acoperire cu silice de tip MCM-41 și extragere a surfactantului **[10]**. Din difractograma de raze X la unghiuri mici (Fig.II.29) a materialului compozit Fe_3O_4@MCM-41 (extras) se observă trei reflexii Bragg (100), (110) și (200) caracteristice grupului spațial hexagonal *P6m* **[10]**.

Izoterma de adsorbție-desorbție a azotului la temperatura azotului lichid 77 K (Fig.II.30) pentru materialul compozit Fe_3O_4@MCM-41E este de tipul IV, caracteristică pentru materialele mezoporoase [45] și prezintă o curbă de histeresis de tipul H1 caracteristică pentru porii independenți cu un aranjament hexagonal. Curba de distribuție a dimensiunii porilor a fost calculată din ramura de desorbție a izotermei prin utilizarea metodei Barrett Joyner Halenda (BJH) [46]. Teoria BJH este adecvată pentru mezoporii care nu sunt interconectați cum este cazul silicei de tipul MCM-41.

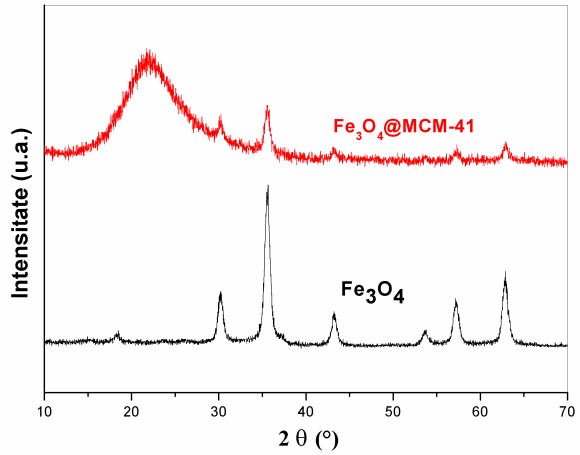


Fig.II.28 Difractograma de raze X la unghiuri mari a Fe_3O_4-MCM-41E în comparație cu cea a pulberii de Fe_3O_4

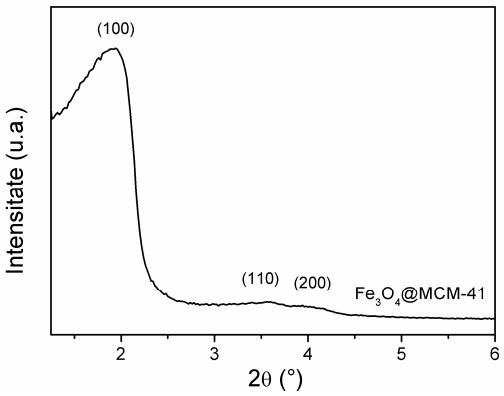


Fig.II.29 Difractograma de raze X la unghiuri mici a compozitului Fe_3O_4@MCM-41E

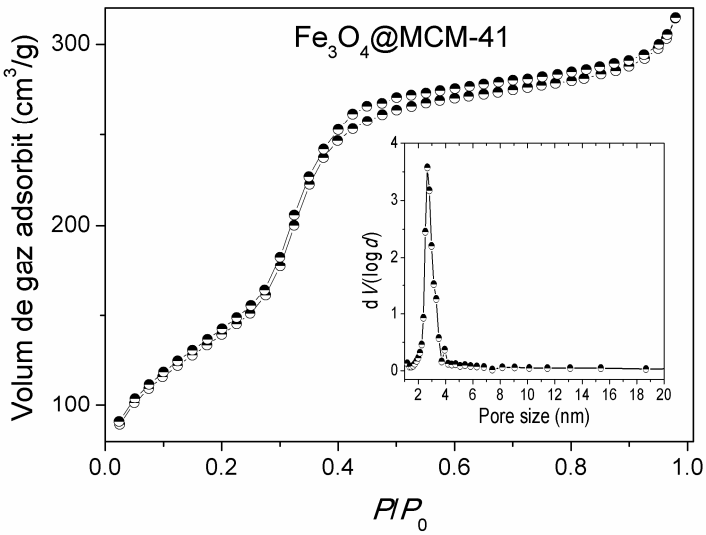


Fig.II.30 Izoterma de adsorbție-desorbție a N_2 și distribuția de dimensiuni a porilor pentru Fe_3O_4@MCM-41E

Tabelul II.3 Parametrul celulei elementare, suprafața specifică, volumul total de pori și diametrul mediu al porilor pentru nanoparticulele de Fe_3O_4 și pentru materialul compozit Fe_3O_4@MCM-41E

Proba	a_0 (nm)*	S_{BET} (m^2/g)	V_{por} (cm^3/g)	d_{por} (nm)
Fe_3O_4	0,836	67,4	-	-
Fe_3O_4@MCM-41E	5,10	515	0,46	2,67

*$a_0=2d_{100}/\sqrt{3}$ pentru silice cu o rețea a porilor hexagonală

În Tabelul II.3 sunt prezentate pentru nanoparticulele de magnetită și Fe_3O_4@MCM-41E valorile parametrului celulei elementare, a_0, și parametrii texturali (suprafața specifică, S_{BET}, volumul total al porilor, V_{por}, diametrul mediu al porilor, d_{por}).

Morfologia materialelor sintetizate a fost investigată prin microscopie eletronică de baleiaj (Fig. II.17 (A) și II.31 B,C). Compozitul Fe_3O_4@MCM-41E (Fig.II.31 B) se prezintă sub forma unor particule sferice mari, polidisperse în dimensiune, cu un diametru între 200 nm și 500 nm. Se poate observa din imaginea SEM obținută prin utilizarea detectorului cu împrăștierea electronilor (*back scatter electrons,* BSE) că materialul compozit sintetizat Fe_3O_4@MCM-41E (Fig.31 B) prezintă o bună dispersie a nanoparticulelor de magnetită (spoturi luminoase) în rețeaua de MCM-41 **[10]**.

Analiza EDX a probei de compozit Fe_3O_4@MCM-41E (Fig.II.31 C) demonstrează o dispersie uniformă a nanoparticulelor de magnetită în matricea de silice. Raportul Fe/Si calculat prin analiza cantitativă EDX în cel puțin cinci zone diferite a fiecărei probe de compozit (Tabelul II.4) este mai mic decât raportul inițial utilizat în sinteză. În proba de compozit Fe_3O_4@MCM-41E conținutul de magnetită este de 7,2% Fe_3O_4 **[10]**.

Spectroscopia FTIR a fost utilizată pentru evaluarea legăturilor chimice în materialele sintetizate (Fig.II.32). Atât pentru nanoparticulele de magnetită cât și pentru materialul compozit pot fi observate vibrații de întindere asociate legăturilor Fe-O la 450, 580 și 630 cm^{-1} care corespund ionilor Fe(II) și Fe(III) în ambele geometrii octaedrice și tetraedrice [7], care demonstrează încorporarea magnetitei în matricea de silice. Vibrația de întindere asociată legăturii Fe-O la 450 cm^{-1} care corespunde geometriei octaedrice a ionilor Fe(II) și Fe(III) se suprapune cu vibrația de deformare asociată legăturii Si-O de la 465 cm^{-1}.

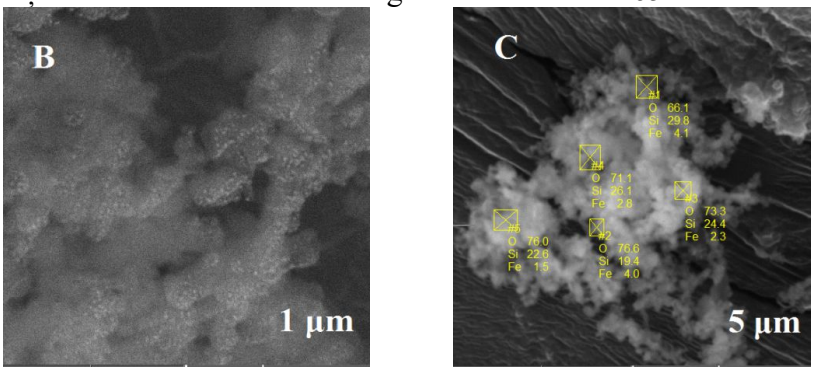


Fig.II.31 Imaginile SEM ale Fe_3O_4@MCM-41E(B), Fe_3O_4@MCM-41E(C) cu distribuția elementelor

Prezența silicei în materialele compozite este demonstrată prin vibrația caracteristică pentru întindere asimetrică a legăturii Si-O-Si la aproximativ 1090 cm^{-1}, vibrația de întindere simetrică asociată legăturii Si-O-Si la aproximativ 800 cm^{-1} și vibrația de deformare caracteristică legăturii Si-OH la aproximativ 960 cm^{-1}. Probele de magnetită și compozit magnetic conțin apă fizioadsorbită și grupe hidroxil pe suprafață care sunt evidențiate de banda de la 1640 cm^{-1} caracteristică vibrației de deformare a apei și banda largă la 3450 cm^{-1} caracteristică vibrației de întindere a legăturii O-H. Existența moleculelor de surfactant în proba de magnetită este demonstrată de benzile la 2850-2925 cm^{-1} date de vibrațiile de întindere a legăturii C-H și benzile la 1200-1500 cm^{-1} caracteristice vibrațiilor legăturilor C-C și C-N **[10]**.

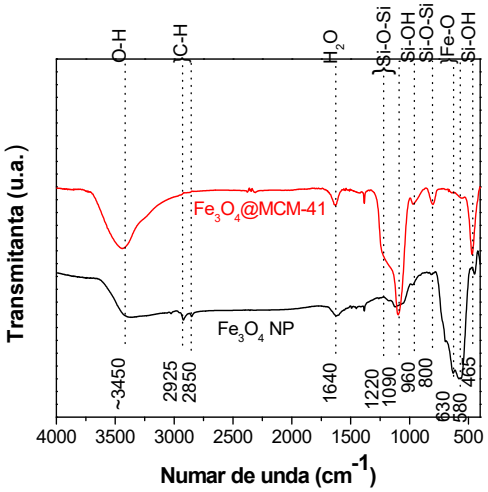


Fig. II.32 Spectrele FT-IR ale nanoparticulelor de magnetită și compozitului magnetită-silice

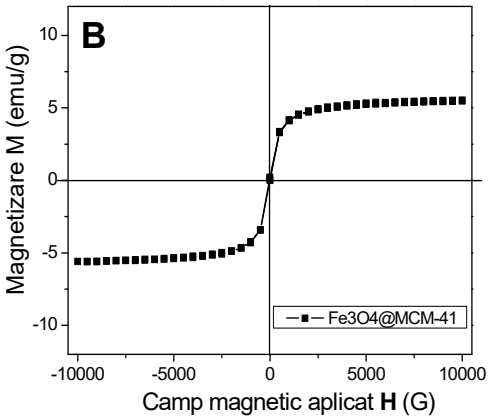


Fig.II.33 Variația magnetizării în funcție de câmpul magnetic pentru compozitul magnetită-silice la 25°C.

Determinarea proprietăților magnetice ale materialelor sintetizate s-au efectuat prin măsurători de susceptibilitate magnetică la temperatura camerei care au demonstrat că proba de magnetită și proba de compozit magnetic Fe_3O_4@MCM-41E prezintă comportare superparamagnetică, iar curbele de magnetizare nu prezintă histerezis (Fig.II.33). Curbele magnetizării (M) în funcție de câmpul magnetic aplicat (H) prezintă o creștere bruscă în magnetizare între -3000 și 3000 G, probele ating magnetizarea de saturație la aproximativ 4000 G. Această comportare este caracteristică magnetitei, Fe_3O_4 [36] și demonstrează conservarea fazei de magnetită în compozitul sintetizat. Compozitul silice-magnetită trebuie să prezinte o magnetizare de saturație mare pentru a fi folosit ca transportor de medicamente sau catalizatori. Datorită dimensiunilor nanometrice a particulelor de magnetită, magnetizarea de saturație a nanoparticulelor de magnetită (59,81 emu/g) este mai mică decât a magnetitei bulk (~95 emu/g) [12], iar magnetizarea de saturație pentru compozitul Fe_3O_4@MCM-41E este 5,2 emu/g **[10]**.

Tabelul II.4 Magnetizarea de saturație (Ms), susceptibilitatea magnetică (χ_g) și conținutul de Fe_3O_4 calculat din măsurători magnetice sau analiza EDX.

Probă	*Ms* (emu/g)	$\chi_g \cdot 10^6$	Conținut de Fe_3O_4 din M_s (%gr.)	Conținut de Fe_3O_4 din EDX (%gr.)
Fe_3O_4 NP	59,81	14,00	-	-
Fe_3O_4@MCM-41E	5,24	1,52	8,7	7,2

Din Tabelul II.4 se observă că valorile susceptibilității magnetice și valorile magnetizării de saturație sunt mai scăzute la pulberea de compozit magnetic, Fe_3O_4@MCM-41E, decât cele ale nanoparticulele de magnetită datorită formării stratului de silice mezoporoasă nemagnetic **[10]**.

II.5 Sisteme cu eliberare controlată de antibiotice

II.5.1 Sinteza și caracterizarea materialelor compozite mezoporoase silice –dioxid de titan

Materialele compozite silice - dioxid de titan cu o compozitie de până la 30% (mol) Ti și o rețea hexagonală 1D a porilor au fost obținute prin metoda sol-gel asistată de tratamentul hidrotermal folosind drept precursori de silice tetraetil ortosilicatul, iar ca precursor de dioxid de titan oxiclorură de titan, ca agent de direcționare a structurii materialelor compozite copolimerul triblock Pluronic P123. Materialele compozite mezoporoase silice -dioxid de titan utilizate ulterior drept transportori de substanțe biologic active au fost comparate cu silicea mezoporoasă de tip SBA-15. Drept precursor de titan s-a folosit oxiclorura de titan prospăt preparată a cărui

sinteză a fost efectuată conform unei proceduri raportată în literatură [47], pornind de la izopropoxid de titan **[48]**.

Difractogramele de raze X la unghiuri mici (Fig.II.35) ale suporturilor preparate prezintă trei picuri caracteristice de difracție care corespund reflexiilor Bragg (100), (110) și (200) ale materialelor de tipul SBA-15, care demonstrează că toate probele sintetizate prezintă o rețea hexagonală ordonată de pori. Creșterea conținutului de titan în materialele compozite conduce la o valoare mare a parametrului rețelei, a_0 așa cum se poate observa în Tabelul II.5 **[48]**.

Difractogramele de raze X la unghiuri mari (Fig.II.36) ale probelor care conțin dioxid de titan prezintă picuri caracteristice fazei anatas, precum și un pic larg care corespunde cu silice amorfă. Excepție face proba Ti4,5SBA-15 pentru care picurile de difracție ale fazei de anatas sunt greu detectabile, sugerând că titanul este încorporat în rețeaua de silice mezoporoasă în cea mai mare parte, în acord cu datele de literatură [**48**,49,50].

Dimensiunea cristalitului, în general, crește cu conținutul de titan, excepție cele ale probelor de Ti10SBA-15 și Ti20SBA-15 care sunt foarte apropiate (Tabelul II.5) **[48]**.

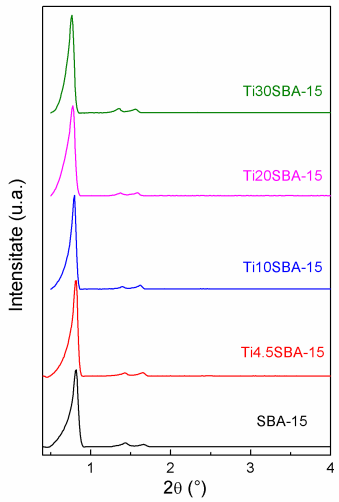


Fig.II.35 Difractograme la unghiuri mici pentru silicea SBA-15 și materialele compozite mezoporoase silice-dioxid de titan

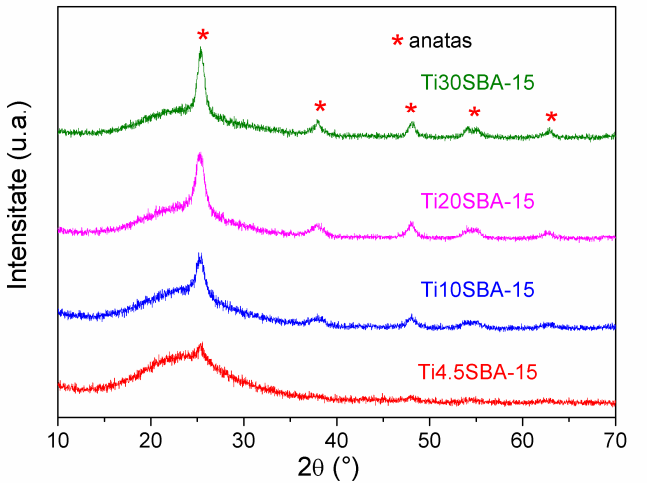


Fig. II.36 Difractograme la unghiuri mari pentru silicea SBA-15 și materialele compozite mezoporoase silice-dioxid de titan

Investigarea prin microscopie electronică a suporturilor de silice-dioxid de titan a demonstrat formarea *fibrelor de silice,* caracteristice materialelor de tip SBA-15, cu un anumit grad de ordonare (fibre mai drepte și mai lungi) pentru pulberea Ti10SBA-15 (Fig.II.38 b).

Morfologia sub formă de fibră devine distorsionată atunci când crește conținutului de titan. Analiza elementară EDX arată o distribuție uniformă a titanului în silice pentru toate probele silice-dioxid de titan (Fig.II.38.a și Fig.II.39), în timp ce nanoparticulele cristaline de dioxid de titan sunt observate în ambele imagini SEM și TEM (Fig. II.38 b, c și d).

Izotermele de adsorbție-desorbție ale azotului pentru toate probele sintetizate sunt de tip IV cu histeresis de tip H1 la presiuni relative ridicate (p/p_0 = 0,6 – 0,8), având o formă bine definită care indică obținerea materialelor mezoporoase cu o dimensiune mare a porilor și o distribuție îngustă de dimensiuni a acestora care sunt în acord cu rezultatele obținute din analizele de difracție de raze X.

Toate probele prezintă izoterme de adsorbție/desorbție cu histeresis, caracteristice materialelor de tip SBA-15 (Fig.II.40 a) și curbele de distribuție a dimensiunilor porilor unimodale (Fig.II.40 b). Au fost obținute pentru silicea de tip SBA-15 valori mai mari ale dimensiunii porilor decât pentru materialele compozite silice-dioxid de titan (Tabelul II.5), sugerând o contractare a rețelei mezoporoase datorită prezenței titanului care are rol de dopant.

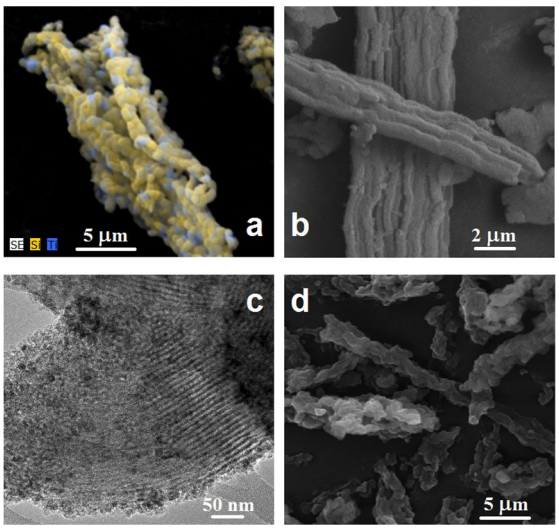


Fig..II.38 Imaginile de microscopie electronică ale suporturilor mezoporoase de silice și dioxid de titan: (a) imagine SEM a probei Ti4,5SBA-15 cu distribuția elementară obținută prin analiza EDX; (b) imaginea SEM a probei Ti10SBA-15; (c) imagine TEM a probei Ti20SBA-15; (d) imagine SEM a probei Ti30SBA-15

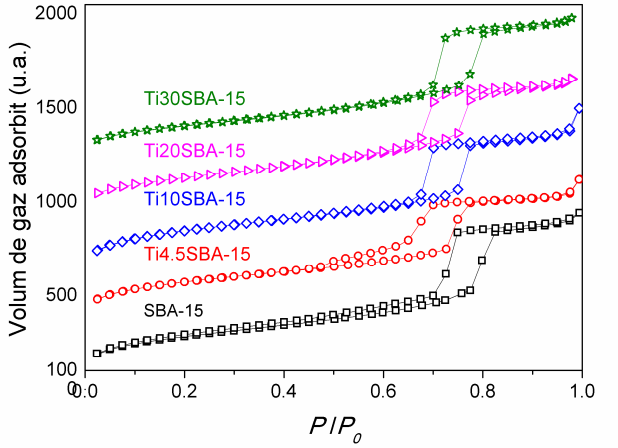


Fig.II.40 a Izotermele de adsorbție /desorbție ale azotului pentru SBA-15 și pentru materialele compozite silice-dioxid de titan

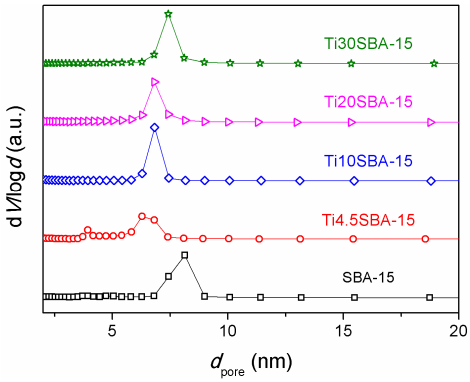


Fig.II.40 b Curbele de distribuție a dimensiunii porilor obținute cu modelul BJH din ramura de desorbție a izotermelor pentru silicea SBA-15 și materialele compozite silice-dioxid de titan

Tabelul II.5 Parametrii texturali și structurali pentru suporturile mezoporoase **[48]**

Probă	Conținut de Ti (% mol)	d_{100} (nm)	a_0 (nm)	*wt* (nm)	S_{BET} (m^2/g)	d_{BJH}* (nm)	V_{pt}/V_p** (cm^3/g)	D_{200}*** (nm)
SBA–15	0	10,960	12,655	4,515	997	8,14	1,49/1,34	-
Ti4,5SBA–15	4.5	11,005	12,707	6,437	959	6,27	1,29/1,10	12.5
Ti10SBA–15	10	11,170	12,898	6,078	1081	6,82	1,50/1,21	75,9
Ti20SBA–15	20	11,479	13,255	6,445	826	6,82	1,50/1,21	78
Ti30SBA–15	30	11,663	13,468	6,058	742	7,41	1,24/1,14	100

* diametrul porilor determinat din ramura de desorbție a izotermelor

** V_{pt} / V_p – volumul total de pori care include mezopori și macropori și volumul mezoporilor calculat pentru porii cu diametrul mai mic de 10 nm; *** dimensiunea cristalitului TiO_2 calculat din picul de difracție (200) (2θ~48°) a fazei de anatas.

Deși se observă o ușoară creștere a dimensiunii porilor cu creșterea conținutului de titan, valorile grosimii peretelui rămân relative constante, indicând saturația mezostructurii în titan. Proprietățile texturale ale probelor de Ti10SBA-15 și Ti20SBA-15, la fel ca și dimensiunea cristalitului fazei cristaline de anatas pentru ambele probe sunt similare, în ciuda diferenței parametrului de rețea, a_0 **[48]**.

II.5.2 Evaluarea materialelor compozite mezoporoase silice - dioxid de titan în sisteme cu eliberare controlată de medicamente

Materiale compozite care conțin oxitetraciclină adsorbită cu un conținut de 25 %(gr.) sau 33 %(gr.) au fost obținute prin *metoda impregnării prin umectare incipientă* utilizând o soluție apoasă concentrată de antibiotic. Astfel, 100 mg de suport mezoporos a fost adăugat peste volumul corespunzător de soluție apoasă de clorhidrat de oxitetraciclină preparată proaspăt cu concentrația de 100 mg/mL. Soluția de antibiotic și suportul au fost amestecate pentru omogenizare și apoi amestecul rezultat a fost uscat la vid, la întuneric, timp de 12 ore **[48]**.

Silicea mezoporoasă de tip SBA-15 și materialele compozite mezoporoase silice-dioxid de titan care conțin oxitetraciclină au fost caracterizate prin difracție de raze X la unghiuri mari, spectroscopie FTIR, izoterme de adsorbție-desorbție ale azotului înregistrate la temperatura azotului lichid. Pentru a pune în evidență prezența moleculelor de antibiotic în mezoporii matricilor anorganice s-a utilizat spectroscopia FTIR. În Fig.II.42 se pot observa spectrele FTIR ale materialelor ce conțin oxitetraciclină pe bază de matrici anorganice mezoporoase în comparație cu spectrul antibioticului.

Benzile caracteristice oxitetraciclinei se pot observa în domeniul 2850-2950 cm^{-1}, vibrațiile de întindere simetrice și asimetrice ale legăturii C-H, 1590-1650 cm^{-1} atribuite grupărilor amidice, și 1310-1410 cm^{-1} date fragmentelor fenolice [54]. Compozitele oxitetraciclină-matrice mezoporoasă anorganică s-au analizat prin difracție de raze X la unghiuri mari. Din difractogramele de raze X la unghiuri mari a compușilor ce conțin oxitetraciclină atât cu un conținut de 25 %(gr.), cât și 33 %(gr.) se poate observa că antibioticul a fost adsorbit în pori sub formă amorfă, observându-se doar picurile de difracție caracteristice anatasului în cazul suporturilor care conțin această fază (Fig.II.44). Corelând spectrele FTIR cu difractogramele de raze X la unghiuri mari în care nu sunt prezente picuri de difracție specifice ale antibioticului, se poate concluziona că moleculele de medicament au fost adsorbite în porii suportului în stare amorfă **[48]**.

Similar cu transportorii mezoporoși anorganici investigați, toate probele oxitetraciclină-matrice anorganică mezoporoasă prezintă izoterme de adsorbție/desorbție ale N_2 de tip IV, dar cu histeresis mai mic (Fig.II.45) care demonstrează că nu toți porii sunt complet umpluți cu molecule de medicament. Totuși probele ce conțin oxitetraciclină prezintă o porozitate mai mică decât suporturile corespunzătoare, mai pronunțată în cazul materialelor care conțin 33 %(gr.) antibiotic (Tabelul II.6) și valori mai mici atât pentru suprafața specifică cât și pentru volumul total al porilor. Pe de altă parte, valorile dimensiunii medii a porilor se micșorează pentru proba care conține drept transportor silicea, în timp ce pentru probele care conțin materiale compozite silice-dioxid de titan rămân aproape neschimbate. Acest lucru indică un mecanism diferit al acomodării moleculelor de medicament în mezoporii suportului, și anume, adsorbția pe suprafața interioară a porilor în cazul silicei SBA-15 și o încărcare care implică înfundarea porilor pentru rețeaua silicei dopată cu titan. Originea acestui comportament opus s-ar putea baza pe proprietățile diferite de umectare a materialelor de silice și silice-dioxid de titan **[48]**.

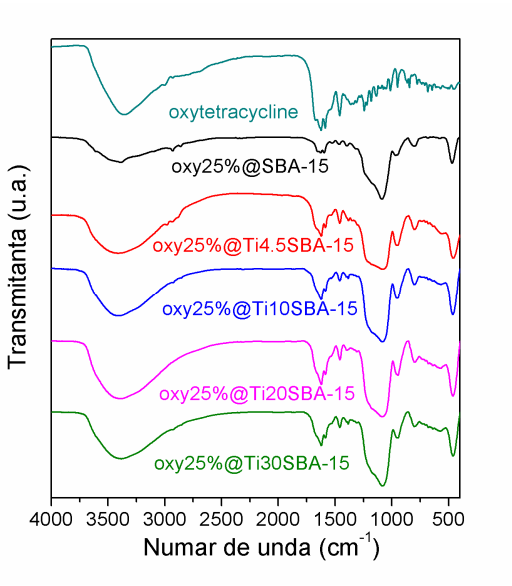


Fig. II.42 Spectrele FTIR ale probelor încărcate cu oxitetraciclină

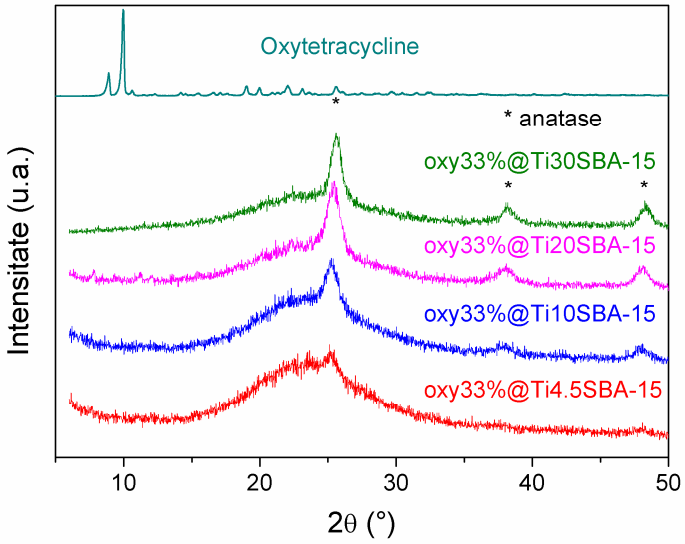


Fig.II.44 Difractogramele de raze X la unghiuri mari ale probelor ce conțin 33 %(gr.) oxitetraciclină

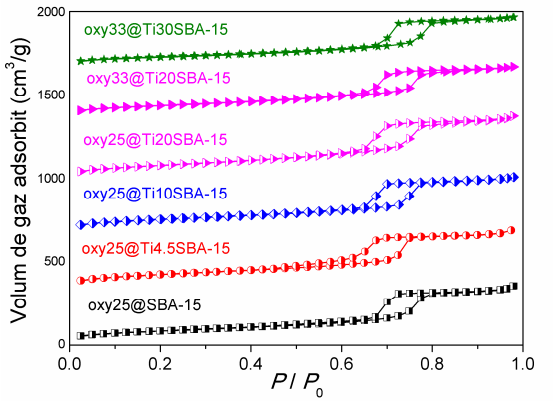


Fig.II.45 Izoterme de adsorbție/desorbție ale materialelor compozite oxitetraciclină-matrice mezoporoasă anorganică

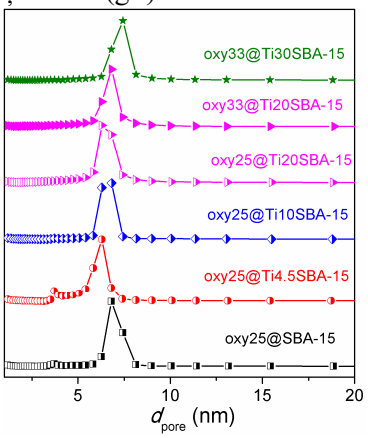


Fig.II.46 Curbele de distribuție a dimensiunii porilor materialelor oxitetraciclină-matrice anorganică

Tabelul II.6 Proprietățile texturale ale suporturilor încărcate cu oxitetraciclină **[48]**

Probe	S_{BET} (m^2/g)	d_{BJH}*(nm)	V_{pt}/V_p**(cm^3/g)
oxy25%@SBA–15	302	6,81	0,5/0,57
oxy25%@Ti4.5SBA–15	333	6,29	0,56/0,51
oxy25%@Ti10SBA–15	337	6,30	0,53/0,48
oxy25%@Ti20SBA–15	353	6.29	0,63/0,57
oxy25%@Ti30SBA–15	314	6,81	0,61/0,68
oxy33%@SBA–15	208	6,28	0,34/0,37
oxy33%@Ti4.5SBA–15	219	6,28	0,36/0,44
oxy33%@Ti10SBA–15	327	6,29	0,48/0,56
oxy33%@Ti20SBA–15	284	6,82	0,47/0,51
oxy33%@Ti30SBA–15	233	7,43	0,45/0,49

* diametrul porului determinat din ramura de desorbție a izotermei

** V_{pt} / V_p – volumul total de pori care include mezopori și macropori, respectiv volumul mezoporilor cu diametrul mai mic de 10 nm.

II.5.2.2 Determinarea profilelor de eliberare *in vitro* a oxitetraciclinei din materialele compozite mezoporoase silice–dioxid de titan

Experimentele *in vitro* de eliberare a oxitetraciclinei au fost efectuate în soluție salină fosfat tampon 0,2 M (PBS), pH 5,7 ca fluid biologic simulat, la 37 °C, sub agitare magnetică (150 rpm). O cantitate de material compozit cu un conținut de medicament de 12,5 mg a fost adăugată în 90 mL PBS. La intervale de timp predeterminate, volume bine determinate de fluid biologic simulat au fost extrase, diluate corespunzător și analizate prin spectroscopie UV-Viz, pentru a determina cantitatea de antibiotic eliberată pe baza curbei de etalonare determinată anterior.

Profilele de eliberare (Fig.II.47 a și b) au demonstrat o micșorare a vitezei de eliberare a antibioticului de pe suporturile mezoporoase anorganice ce conțin nanoparticule de anatas cristaline: Ti30SBA-15, Ti20SBA-15 și respectiv Ti10SBA-15, în timp ce în cazul transportorului Ti4,5SBA-15, profilele de eliberare a oxitetraciclinei sunt similare cu cele înregistrate pentru silice mezoporoasă SBA-15, prezentând chiar un efect *burst* mai pronunțat (Fig.II.48). Dioxid de titan cristalin, localizat pe suprafața trasportorului, contribuie pozitiv la descreșterea vitezei de eliberare a medicamentului. Cele mai mici viteze de eliberare a antibioticului au fost observate pentru probele oxy25@Ti10SBA-15 (Fig.II.48 a) și oxy33@Ti10SBA-15 (Fig.II.48 b), un comportament anticipat pentru suporturile de tip Ti10SBA-15 care se prezintă sub forma celor mai lungi fibre, deci și a unor canale de mezopori mai lungi. Profilele experimentale de eliberare a medicamentului au fost fitate cu un model cinetic teoretic în trei parametrii.

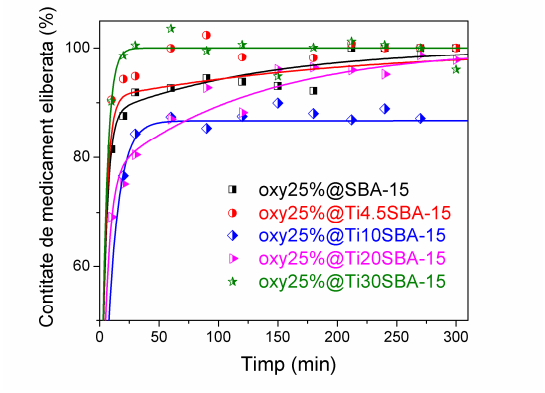


Fig.II.47a Profilele de eliberare a oxitetraciclinei din suporturile mezoporoase silice–dioxid de titan pentru probele cu un conținut de 25 %(gr.) medicament.

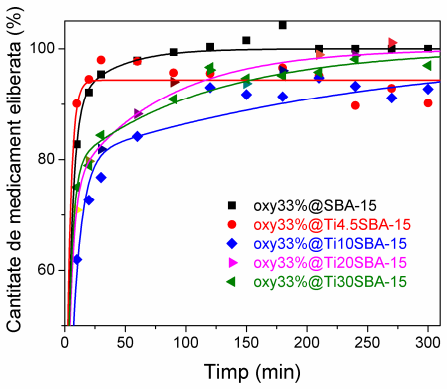


Fig.II.47b Profilele de eliberare a oxitetraciclinei din suporturile mezoporoase silice–dioxid de titan pentru probele cu un conțin de 33 %(gr.) medicament.

Ecuațiile modelului cinetic teoretic

Se presupune că procesele de adsorbție/desorbție urmează o cinetică de ordinal întâi, cu constanta de viteză k_{on} și respectiv k_{off}, entalpia liberă moleculară poate fi scrisă ca :

$$\Delta G = -k_B T \cdot \ln(k_{on}/k_{off})$$

unde k_B reprezintă constanta lui Boltzman, iar T, temperatura.

Ecuația utilizată pentru a fita datele experimentale este prezentată mai jos:

$$\frac{m(t)}{m(0)} = \frac{\lambda_2(k_d-\lambda_2)}{(k_{on}+k_{off})(\lambda_1-\lambda_2)}\left(1-e^{-\lambda_1 t}\right) + \frac{\lambda_1(\lambda_1-k_d)}{(k_{on}+k_{off})(\lambda_1-\lambda_2)}\left(1-e^{-\lambda_2 t}\right),$$

unde $m(t)$ și $m(0)$ reprezintă eliberarea cumulativă a medicamentului la timpul t și cantitatea totală de medicament și

$$\lambda_{1,2} = \left[(k_d + k_{on} + k_{off}) \pm \sqrt{(k_d + k_{on} + k_{off})^2 - 4k_s k_{off}}\right]/2$$

Acest model presupune că există un echilibru între moleculele medicamentului adsorbit și suprafața transportorului și moleculele desorbite din interior mezoporilor [55-57]. Moleculele

sunt transportate prin mezocanale în mediul de eliberare prin difuzie și se presupune că urmează o cinetică de ordinul întâi.

S-a efectuat un studiu de corelație între parametrii cinetici de eliberare și proprietățile texturale ale transportorilor (Tabelul II.8). Coeficienții de corelație au valori între -1 și 1, cu valori apropiate care denotă fie o corelație directă, fie o corelație inversă, iar valorile apropiate de valoarea 0 indică lipsa unei corelații. Rezultatele demonstrează că conținutul de titan este strâns corelat cu *parametrul celulei elementare* (a_0) a mezofazei. De asemenea, acești doi parametrii demonstrează o corelație inversă cu entalpia liberă pentru ambele conținuturi de medicament, 25%(gr.) și respectiv 33%(gr.). Astfel creșterea conținutului de titan este o strategie promițătoare pentru proiectarea unor sisteme cu eliberare controlată de oxitetraciclină.

Tabelul II.7 Parametrii de eliberare cinetici a probelor încărcate cu oxitetraciclină

Proba	25 %(gr.) oxy			33 %(gr.) oxy		
	ΔG (10^{21} J)	k_d (min^{-1})	R^2	ΔG (10^{21} J)	k_d (min^{-1})	R^2
SBA–15	8,67	0,249	0,994	10,08	0,228	0,998
Ti4.5SBA–15	9,95	0,257	0,987	12,05	0,293	0,990
Ti10SBA–15	8,03	0,110	0,997	6,25	0,131	0,985
Ti20SBA–15	5,43	0,203	0,982	5,17	0,242	0,995
Ti30SBA–15	6,26	0,086	0,990	5,90	0,262	0,987

Tabelul II.8 Coeficienții de corelație între parametrii structurali și texturali ai transportorilor și parametrii cinetici de eliberare a medicamentului

Parameterii	*Conținut Ti*	a_0	*wt*	S_{BET}	d_{BJH}	*Vp*
a_0	0,99	1,0				
ΔG, 33% oxy	-0,77	-0,81	-0,30	0,41	-0,07	-0,25
k_d, 33% oxy	0,14	0,12	0.16	-0,62	-0,12	-0,67
ΔG, 25% oxy	-0,83	-0,88	-0,26	0,69	-0,15	-0,13
k_d, 25% oxy	-0,72	-0,69	-0,27	0,27	-0,03	0,20

II.5.2.3 Evaluarea activității antimicrobiene a sistemelor cu eliberare controlată de oxitetraciclină

A fost evaluată activitatea antimicrobiană a probelor care conțin 25 (gr.)% oxitetraciclină pe tulpini bacteriene gram pozitive *Staphylococcus aureus ATCC 25923*, gram negative *Staphylococcus coli* ATCC 25922 și gram negative *Pseudomonas aeruginosa*. După 24 ore de incubare, toate probele au demonstrat o activitate bactericidă bună și asemănătoare cu pulberea de medicament pe tulpinile bacteriene (Fig.II.49). Cea mai bună activitate antimicrobiană a fost observată față de *Staphylococcus aureus*. Diametrele zonei de inhibare a creșterii bacteriene măsurate pentru probele oxitetracilină-matrice mezoporoasă anorganică au fost: 34±2 mm versus 36±1 mm de control pozitiv pentru *S. aureus*, 30±2 mm versus 32±2 mm pentru *E. coli* și 21±2 mm versus 22±1 mm pentru tulpinile *Pseudomonas aeruginosa*.

II.5.4 Concluzii privind aplicarea compozitelor mezoporoase silice-dioxid de titan drept transportori de molecule biologic active

Datorită prezenței nanoparticulelor de dioxid de titan pe suprafața silicei se pot crea interacțiuni puternice între suportul mezoporos anorganic și moleculele de oxitetraciclină datorită formării legăturilor donor-acceptor în care sunt implicați ionii de titan. Doparea rețelei de silice mezoporoasă cu ioni de titan modifică proprietățile suportului, structura și suprafața pereților porilor, determinând în profilele de eliberare a oxitetraciclinei un efect *burst*, în timp ce prezența anatasului cristalin pe suprafața silicei contribuie la o eliberare susținută a acestuia în

etapa a doua a curbei de eliberare, ambele efecte contribuind alternativ la mecanismul de eliberare a moleculelor biologic active. De aceea controlând distribuția și conținutul de titan în rețeaua silicei și sub formă de anatas pe suprafața silicei reprezintă o strategie promițătoare de a dezvolta sisteme cu eliberare controlată de oxitetraciclină, cu modularea cineticii de eliberare a moleculelor de medicament, fără a afecta activitatea bactericidă a antibioticului.

II.6 Sisteme cu eliberare țintită pe bază de doxorubicină

Obținerea unor sisteme de eliberare țintită pe bază de doxorubicină este un obiectiv de importantă strategică în biomedicină având în vedere toxicitatea ridicată a moleculei biologic active precum și utilizarea acesteia în tratamentul diferitelor tumori.

Materialele compozite magnetice utilizate drept transportori pentru agentul citostatic ales, doxorubicină, s-au obținut prin acoperirea nanoparticulelor de magnetită sintetizate prin reducerea trisacetilacetonato de fier (III) cu $NaBH_4$, la temperatura camerei, în amestec de etanol-apă cu silice mezoporoasă de tip MCM-41 (proba denumită Fe_3O_4@MCM-41E) la care agentul de direcționare a structurii a fost CTAB, sau cu silice mezoporoasă funcționalizată cu grupări aminopropil obținută prin co-condensare, probă denumită Fe_3O_4@MCM-APTES. Concentrația de 3-aminopropil trietoxisilan a fost de 5%(mol) față de tetraetil ortosilicat. Ulterior materialul Fe_3O_4@MCM-APTES a fost modificat cu grupări folat prin reacții de condensare care au rol de direcționare către receptorii celulelor tumorale materialul sintetizat fiind denumit Fe_3O_4@MCM-APTES-folat. Un alt transportor utilizat a fost obținut prin acoperirea nanoparticulelor de magnetită cu silice de tip SBA-16 cu rețea de pori cu simetrie cubică, denumit Fe_3O_4@SBA-16.

Sinteza transportorilor pe bază de doxorubicină s-a efectuat prin *metoda impregnării prin umectare incipientă* a suporturilor mezoporoase utilizând o soluție apoasă concentrată de citostatic, probele obținute având un conținut de 5%, respectiv 10% agent antitumoral.

II.6.2 Obținerea și caracterizarea transportorilor magnetici

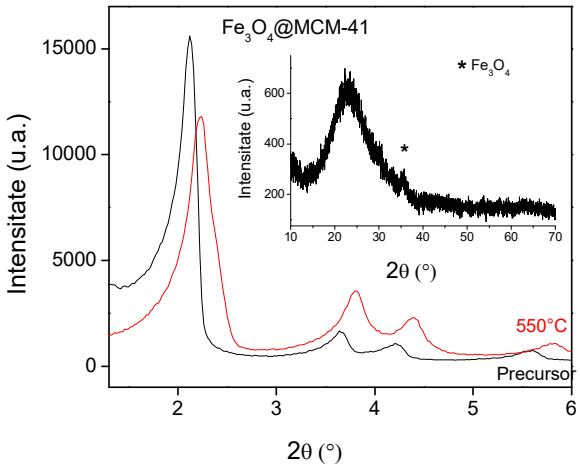


Fig.II.65 Difractogramele de raze X la unghiuri mici ale probei extrase Fe_3O_4@MCM-41 (curba neagră), respectiv calcinată (curba roșie). Inserată difractograma la unghiuri mari a probei calcinate

Din difractograma de raze X la unghiuri mici a nanoparticulelor de magnetită acoperite cu silice de tip MCM-41 se observă formarea unei rețele de pori ordonate, hexagonale, caracteristică acestui tip de silice, fiind prezente cele trei reflexii Bragg (100), (110) și (200) (Fig.II. 65). Difractograma de raze X la unghiuri mari demonstrează formarea stratului amorf de silice și conservarea structurii cristaline a magnetitei (Fig.II.65 inserare).

Parametrii texturali ai materialului compozit Fe_3O_4@MCM-41E s-au determinat prin înregistrarea izotermei de adsorbție-desorbție a azotului măsurată la temperatura azotului lichid 77 K. Izoterma de adsorbție-desorbție este de tip IV, caracteristică silicei mezoporoase de tip MCM-41, complet reversibilă și o distribuție foarte îngustă de dimensiuni a porilor. Din izoterma de adsorbție-desorbție s-au calculat parametrii texturali: S_{BET}=988 m^2/g, d_{BJH}=2,81 nm și V_p=0,99 cm^3/g, materialul compozit sintetizat prezentând o distribuție îngustă de dimensiuni a porilor și o porozitate ridicată.

Proba sintetizată prezintă un comportament superparamagnetic datorită dimensiunii nanometrice a particulelor, magnetizarea remanentă fiind nulă. Valoarea magnetizării de saturație a nanoparticulelor Fe_3O_4@MCM-41E, 1,4 emu/g este mai mică decât magnetizarea de saturație a nanoparticulelor de magnetită sintetizate 50,04 emu/g și decât a magnetitei bulk 95 emu/g.

Încapsularea nanoparticulelor de magnetită în matricea de silice de tip MCM-APTES și MCM-APTES-folat, precum și în silicea SBA-16

Nanoparticulele de magnetită de asemenea anterior preparate prin reducerea precursorului de fier, $Fe(acac)_3$ cu $NaBH_4$ au fost acoperite prin cocondensare cu silice mezoporoasă de tip MCM-41 funcționalizată cu 3-aminopropiltrietoxisilan (APTES). Într-o primă etapă au fost preparate nanoparticulele de magnetită care au fost ulterior izolate. Apoi acestea au fost redispersate în apă bidistilată și s-a efectuat acoperirea cu silice MCM-41 funcționalizată cu grupări aminopropil. Proba a fost denumită Fe_3O_4@MCM-APTES.

Forma curbei de magnetizare a acestui material demonstrează că particulele obținute au dimensiuni în domeniul nanometric care imprimă caracterul superparamagnetic al acestora. Magnetizarea de saturație a probei Fe_3O_4@MCM-APTES are valoarea 5,15 emu/g și este mai mare decât magnetizarea de saturație a nanoparticulelor Fe_3O_4@MCM-41E de doar 1,4 emu/g.

De materialul Fe_3O_4@MCM-41-APTES au fost legate grupări folat prin reacția acestuia cu acid folic în dimetilsulfoxid drept solvent. Materialul astfel obținut a fost notat cu Fe_3O_4@MCM-41-APTES- folat.

Dintre toate probele sintetizate proba Fe_3O_4@MCM-APTES –folat prezintă cea mai mare valoare a magnetizării de saturație (Ms=5,54 emu/g) în timp ce valoarea μ/k s-a menținut constantă față de proba neconjugată. Valoarea Ms mai mare a Fe_3O_4@MCM-APTES –folat demonstrează că proba are un conținut mai mare de magnetită.

Încapsularea nanoparticulelor de magnetită obținute prin descompunerea combinației complexe $Fe(acac)_3$ în silicea mezoporoasă de tip SBA-16 s-a efectuat conform unei proceduri raportate în literatură **[10]**.

Nanoparticulele de magnetită preparate anterior au fost acoperite cu silice mezoporoasă de tip SBA-16 prin utilizarea ca agent de direcționare a structurii copolimerul Pluronic P123.

În tabelul II.10 se prezintă pentru suporturile magnetice sintetizate parametrii texturali obținuți din izotermele de adsorbție-desorbție a N_2.

Tabelul II.10 Parametrii texturali ai suporturilor pe bază de particule magnetice

Matrici mezoporoase magnetice	S_{BET} (m^2/g)	V_{pori} (cm^3/g)	d_{BJH} des(nm)
Fe_3O_4@MCM-41E	988	0,99	2,81
Fe_3O_4@MCM-APTES	378	0.20	1.19
Fe_3O_4@SBA-16	938	0,70	9,10
Fe_3O_4@MCM-APTES-folat	118	0,80	3,70
Fe_3O_4@MCM-41(0.4)	612	0.51	2.66

Tabel II.11 Valorile magnetizării de saturație și momentului magnetic al unei particule raportat la constanta Boltzmann pentru probele de materiale compozite sintetizate

Transportori magnetici	M_s (emu/g)	μ/k (K/Oe)	Observații
Fe_3O_4@MCM-41E	1,40	0,77	SPP
Fe_3O_4@MCM-APTES	5,15	1,16	SPP
Fe_3O_4@SBA-16	5,93	1,11	SPP
Fe_3O_4@MCM-APTES-folat	5,54	1,15	SPP

M_s - magnetizarea la saturație; μ/k - momentul magnetic al unei particule raportat la constanta Boltzmann. SPP reprezintă un comportament superparamagnetic caracterizat prin curbe de histerezis de arie nulă pentru materialele compozite.

II.6.3 Sinteza și caracterizarea sistemelor cu eliberare țintită de doxorubicină

În cadrul acestei teze de doctorat s-au utilizat drept vehicule pentru eliberare vectorizată pe lângă transportorii prezentați în acest capitol și un materialul compozit magnetic Fe_3O_4-MCM-41(0.4), a cărui sinteză și caracterizare este prezentată în capitolele II.3.2 respectiv II.4.1 la care surfactantul a fost îndepărtat prin tratament termic la 550°C,. Materialul Fe_3O_4-MCM-41(0.4) are un conținut de particule magnetice de 4,7 %(gr.).

Sistemele cu eliberare țintită de doxorubicină cu un conținut de 5%, respectiv 10% agent citostatic s-au obținut prin metoda impregnării prin umectare incipientă folosind o soluție apoasă de medicament.

Spectroscopia FTIR s-a efectuat pentru a demonstra existența grupărilor funcționale legate de silicea mezoporoasă, precum și a moleculelor de doxorubicină (Fig.II.74). Spectrele FTIR ale materialelor doxorubicină-suport mezoporos magnetic conțin vibrațiile caracteristice silicei (1080 cm^{-1}, 960 cm^{-1}, 800 cm^{-1}, 460 cm^{-1}), a legăturilor Fe(III)-O la 640 cm^{-1}, a apei adsorbite (1650 cm^{-1}), precum și a medicamentului în regiunea 2840-3000 cm^{-1}, 1725 cm^{-1}, 1290 cm^{-1}. De asemenea, prin spectroscopie FTIR s-a pus în evidență funcționalizarea silicei mezoporoase cu succes prin metoda co-condesării atât cu grupări 3-aminopropil (curba verde), observându-se vibrațiile grupărilor metilenice din regiunea 2850-3000 cm^{-1}, vibrațiilor de întindere simetrce și asimetrice ale legăturii N-H în regiunea 3300-3200 cm^{-1}. Spectroscopia FT-IR a evidențiat prezența agentului citostatic în transportorii de tip magnetită-silice mezoporoasă.

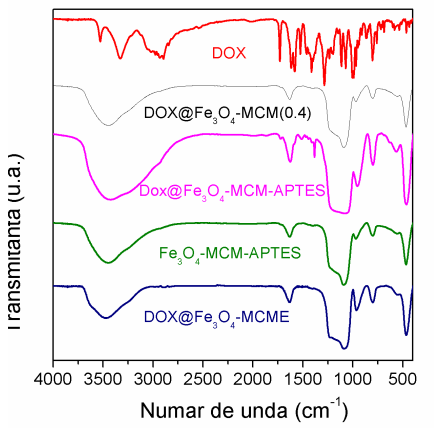


Fig.II.74 Spectrele FTIR ale probelor ce conțin doxorubicină în comparație cu cele ale medicamentului și a transportorului

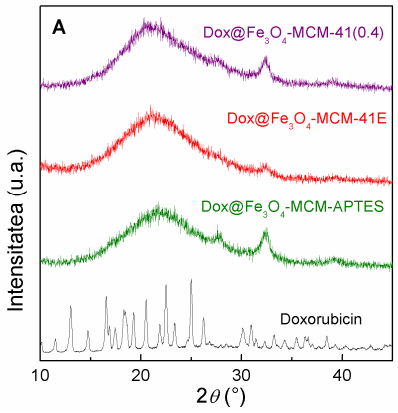


Fig.II.76 Difractogramele de raze X la unghiuri mari pentru probele ce conțin doxorubicină

Tabelul II.12 Parametrii texturali ai materialelor ce conțin agent terapeutic în comparație cu matricea mezoporoasă magnetică corespunzătoare

Material	Material ce conține doxorubicină			Matrice mezoporoasă magnetică			
	S_{BET} (m_2/g)	V_{pori} (cm^3/g)	d_{BJH} (nm)	S_{BET} (m_2/g)	V_{pori} (cm^3/g)	d_{BJH} (nm)	M_s (emu/g)
DOX@Fe_3O_4@MCM-41E	748	0,71	2,97	988	0,99	2,81	1,4
DOX@Fe_3O_4@MCM-41	477	0,47	2,66	612	0,51	2,66	3.77
DOX@Fe_3O_4@MCM-APTES	344	0.15	1,19	378	0,20	1,19	ND
DOX@Fe_3O_4@MCM-APTES-folat	N/A	N/A	N/A	118	0,80	3,70	5,54

Analiza de difracție de raze X la unghiuri mari (Fig.II.76) a materialelor ce conțin doxorubicină prezintă doar picurile de difracție ale magnetitei, alături de picul larg de difracție din domeniul 2θ=20-40° atribuit fazei amorfe de silice. În difractogramele de raze X la unghiuri mari nu se pot observa picurile de difracție asociate doxorubicinei, aceasta fiind prezentă ca fază amorfă în porii suportului mezoporos. În tabelul II.12 sunt prezentați parametrii texturali pentru materialele pe bază de doxorubicină obținuți in izotermele de absorbție-desorbție ale azotului.

II.6.4 Studii de eliberare *in vitro* a doxorubicinei de pe transportori de tip magnetită-silice mezoporoasă

Profilele de eliberare a doxorubicinei de pe transportori magnetici s-au determinat în soluție tampon de fosfat pH=5,7 la 37°C, care simulează mediul celular tumoral. S-a variat concentrația de agent citostatic raportată la volumul de PBS. Astfel, s-au folosit două concentraţii, 0,033 şi 0,016 g DOX/L $_{mediu}$. Se poate observa din Fig.II.79 că la concentraţia mai mare de doxorubicină se atinge un palier în jurul valorii de 65% medicament dizolvat (curba A.DOX). Prin urmare, s-a folosit o concentraţie de doxorubicină în mediu redusă la jumătate, ce poate să determine solubilizarea întregii cantităţi de medicament (curba B.DOX). Studiile de eliberare *in vitro* a medicamentului anticancerigen din probele DOX-Fe_3O_4@MCM41E(10%) (curbe A și B DOX-Fe_3O_4-MCM41E(10%)) au arătat diferenţe mici între cele două metode. Astfel, metoda B folosind 0,016 g DOX / L mediu este metoda optimă de obţinere a curbelor de eliberare *in vitro* a doxorubicinei.

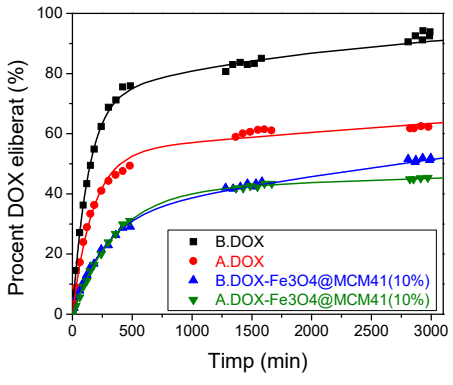


Fig.II.79 Curbele de dizolvare şi eliberare a DOX la două rapoarte DOX/mediu diferite din probele DOX-Fe_3O_4@MCM41E(10%).

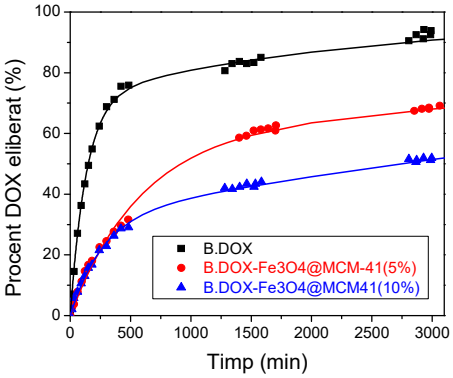


Fig. II.80 Comparaţie între profilele de eliberare ale doxorubicinei din materialele compozite pe bază de Fe_3O_4@MCM-41 cu un conținut diferit de medicament 5% şi 10%

Se poate observa că funcționalizarea silicei cu grupări aminopropil care acoperă nanoparticulele de magnetită are ca efect creşterea vitezei de eliberare în prima etapă a

procesului, dar şi scăderea acesteia în etapa de eliberare susținută (după ~8 ore), față de suportul magnetită-silice nefuncţionalizată.

Tabelul II.13 Experimentele de eliberare a doxorubicinei

Probă	*Concentrație DOX/mediu (gL^{-1})*
A.DOX	0,033
A.DOX-Fe_3O_4@MCM41 (10%)	0,033
B.DOX	0,016
B.DOX- Fe_3O_4@MCM41(10%)	0,016
B.DOX- Fe_3O_4@MCM-41(5%)	0,016
B.DOX- Fe_3O_4@SBA-16(5%)	0,016
B.DOX- Fe_3O_4@MCM41-APTES	0,016

Această observație s-ar putea explica prin existența unor interacţii electrostatice repulsive între grupările amino încărcate pozitiv şi doxorubicină care este parţial protonată. Spre deosebire de transportorul MCM-41, materialul mezoporos de tip SBA-16 prezintă rețea cubică de pori interconectaţi **[10]**, care favorizează difuzia medicamentului. Se poate observa o cinetică de eliberare mult mai rapidă a probei DOX-Fe_3O_4@SBA-16 similară cu curba de dizolvare a doxorubicinei.

Toate datele experimentale ale profilelor de eliberare a doxorubicinei au fost fitate cu modelul teoretic cu trei parametri cinetici. Acesta presupune existenţa moleculelor organice atât adsorbite puternic pe suprafaţa mezoporilor (molecule asociate), cât şi a moleculelor aflate libere în mezopori (molecule disociate). Între cele două tipuri de molecule există un echilibru, caracterizat de constantele de viteză k_{on} şi k_{off}, corespunzând proceselor de asociere şi disociere. Se presupune că ambele procese sunt de ordinul întâi. Moleculele disociate pot fi eliberate în fluidul biologic printr-un proces de difuzie, cu constanta de viteza k_s, care este un proces de ordinul întâi.

Așa cum se poate observa din figura II.82 cinetica de eliberare a doxorubicinei de pe transportorul Fe_3O_4@MCM-APTES--folat este lentă atât în etapa *burst*, cât și în etapa de eliberare susținută, în primele 24 h fiind desorbit un conținut de 44,7% din agentul antitumoral încapsulat, iar după 48 h aproximativ 60%.

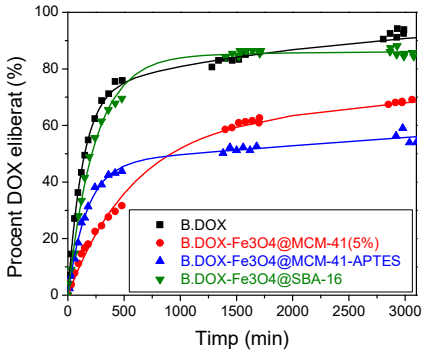


Fig.II.81. Comparaţie între curbele de eliberare a doxorubicinei de pe transportorii Fe_3O_4@MCM-41, Fe_3O_4@MCM-41-APTES, Fe_3O_4@SBA-16

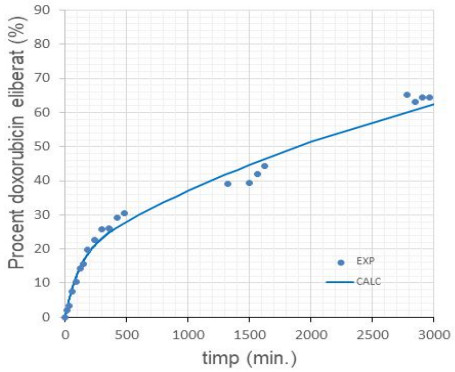


Fig. II.82 Profilul de eliberare a doxorubicinei de pe transportorul Fe_3O_4@MCM-APTES-folat

Viteza de eliberare este direct proporţională cu constanta procesului de difuzie (k_s), pentru că în această etapă se eliberează preponderent moleculele de agent antitumoral disociate, care interacționează mai slab cu transportorul anorganic. După eliberarea moleculelor disociate, procesul limitativ devine cel al disocierii moleculelor asociate, iar viteza etapei de eliberare susţinută (a doua etapă a procesului de eliberare) este direct proporţională cu constanta disocierii, k_{off}. ΔG cu valori negative indică o cantitate mică de medicament eliberată în prima etapă a procesului de eliberare, fapt de dorit pentru a minimiza efectele secundare ale agentului

antitumoral. Cei mai buni transportori din acest punct de vedere sunt Fe_3O_4@MCM-41-APTES și Fe_3O_4@MCM-41-APTES-folat.

Tabelul II.14 Constantele modelului teoretic pentru materialele DOX-suport mezoporos magnetic.

Proba	**ΔG** (10^{-21} J)	k_s ($10^{-3}min^{-1}$)	k_{off} ($10^{-5}min^{-1}$)	k_{on} ($10^{-5}min^{-1}$)	R^2
A.DOX	0,85	5,8	8,1	6,7	0,9966
A.DOX-Fe_3O_4@MCM-41(10%)	-1,34	2,7	2,4	3,2	0,9997
B.DOX	4,65	7,4	42,5	14,3	0,9987
B.DOX-Fe_3O_4@MCM-41(10%)	-2,36	3,5	12,2	21,2	0,9990
B.DOX-Fe_3O_4@MCM-41(5%)	2,22	1,7	10,5	6,2	0,9982
B.DOX-Fe_3O_4@SBA-16	7,42	4,1	2,9	0,5	0,9984
B.DOX-Fe_3O_4@MCM-APTES	-4,03	5,8	6,5	7,1	0,9963
B.DOX-Fe_3O_4@MCM-APTES-folat	-5,06	7,83	30,7	10,0	0,9875

II.6.5 Evaluarea efectului sistemelor cu eliberare țintită de doxorubicină la nivel celular

O selecție a sistemelor cu eliberare țintită de doxorubicină dezvoltate în cadrul acestei teze de doctorat au fost testate pe o linie celulară umană de limfocite. Viabilitatea celulară a fost analizată utilizându-se CellTiter 96®AQ_{ueous} one solution (kit MTS) de la Promega. Pentru testarea toxicității doxorubicinei încapsulate în compozite magnetice s-au ales probe cu un conținut optim de doxorubicină de 5 %(gr.), încapsulată în compozitul magnetic Fe_3O_4@MCM-41 sintetizat într-o singură etapă, și respectiv în transportorul Fe_3O_4@MCM-APTES-folat.

Din figura II.83 se poate observa o toxicitate redusă a doxorubicinei atunci când este încapsulată în transportor magnetic, decât atunci când celulele au fost tratate cu soluție apoasă de agent citostatic. Toxicitatea atât a doxorubicinei încapsulate, cât și ca soluție apoasă este ceva mai mare după 48 h decât după 24 h.

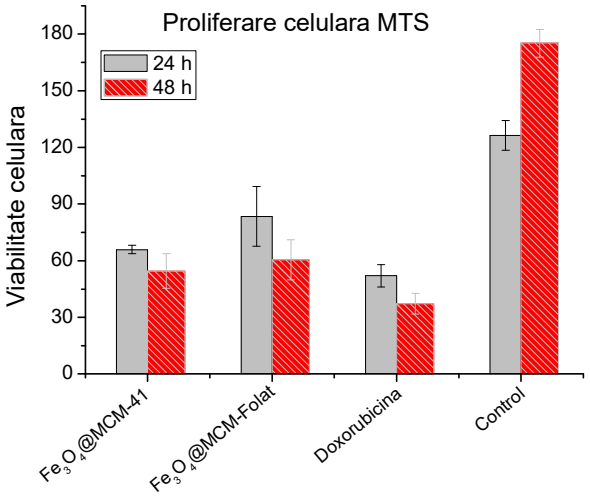


Fig. II.83 Evaluarea toxicității doxorubicinei încapsulată în compozite magnetice de tip magnetită-silice în comparație cu cea a doxorubicinei administrate ca soluție apoasă

II.7 Concluzii finale

În cadrul acestei teze de doctorat s-au sintetizat și caracterizat transportori de tip ferită-silice mezoporoasă de tip MCM-41 și silice -dioxid de titan de tip SBA-15. Moleculele model alese au fost oxitetraciclina și doxorubicina. Pentru sistemele cu eliberare controlată de substanțe farmaceutic active proiectate au fost studiate profilele de eliberare *in vitro* prin spectrometrie UV-vis, efectele la nivel celular a acestora prin determinarea proliferării celulare

sau activitatea antimicrobiană a acestora. Atât transportorii sintetizați, cât și sistemele cu eliberare controlată de medicamente obținute în cadrul acestei lucrări de doctorat au fost caracterizate prin tehnici fizico-chimice variate, spectroscopie FTIR, difracție de raze X la unghiuri mici și mari, izoterme de adsorbție-desorbție a azotului, microscopie electronică de baleiaj și în transmisie, măsurători ale magnetizării în funcție de câmpul magnetic aplicat, efectuate la temperatura camerei etc. pentru elucidarea structurii și proprietăților acestora în vederea înțelegerii interacțiilor dintre substanțele biologic active și vehiculele sintetizate.

Pentru atingerea scopului acestei teze de doctorat, elaborarea unor sisteme cu eliberare țintită de substanțe farmaceutic active, au fost desfășurate mai multe activități care au contribuit la îndeplinirea obiectivelor asumate.

(i) Sinteza unor nanoparticule de magnetita și ferită de cobalt cu structură de spinel invers și simetrie cubică prin metoda coprecipitării sau a descompunerii în soluție a trisacetilacetonato de Fe(III), folosind drept stabilizator diferiți compuși, acid oleic, copolimerul Pluronic P123, sau bromură de cetiltrimetilamoniu. *S-a sintetizat pentru prima dată ferita de cobalt, cristalină, la temperatură joasă, 60ºC* direct în mediul de reacție. Toate probele de magnetită sintetizate au prezentat comportare superparamagnetică, având un singur domeniu magnetic, în timp ce nanoparticulele de ferită de cobalt prezintă proprietăți feromagnetice.

Cele mai mari suprafețe specifice ale nanoparticulelor de ferită s-au obținut în prezența copolimerului Pluronic P123, magnetita și ferita de cobalt fiind mezoporoase. Valoarea magnetizării de saturație (52,33 emu/g) a fost mai mare la feritele sintetizate în prezența acidului oleic. Cea mai mare valoare a magnetizării de saturație (59,81 emu/g) s-a obținut pentru magnetita sintetizată în prezență de CTAB.

(ii) Au fost sintetizate compozite ferită-silice mezoporoasă folosind două abordări: metoda într-o singură etapă pentru prepararea materialelor compozite de tip Fe_3O_4-MCM-41 fără izolarea nanoparticulelor de magnetită și obținerea în două etape în care nanoparticulele de magnetita sau ferita de cobalt au fost întâi sintetizate și izolate, apoi acoperite cu silice mezoporoasă de tip MCM-41. Acoperirea s-a realizat prin metoda sol-gel, asistată de tratament hidrotermal la 100 °C, 24 h. În primul caz magnetita a fost preparată în prezența CTAB, iar în cel de-al doilea caz nanoparticule de magnetita și ferita de cobalt au fost preparate folosind acid oleic, drept stabilizator. Curbele de magnetizare a materialelor compozite magnetice care conțin magnetită, nu prezintă histeresis și au proprietăți superparamagnetice, iar proba $CoFe_2O_4$-MCM prezintă proprietăți ferimagnetice. Ferita de cobalt acoperită cu silice de tip MCM-41 prezintă magnetizare remanentă și coercitivitate cu valori de 0,38 emu/g și respectiv 427 Oe. S-a obținut pentru $CoFe_2O_4$-MCM-41 o valoarea a magnetizării de saturație de 1,26 emu/g la un conținut de 3,10 %(gr.) particule de ferită de cobalt.

Studiile efectuate pentru determinarea toxicității materialelor compozite magnetice de tip ferită-silice mezoporoasă efectuate la diferite concentrații (50, 100 și 200 μg/mL) au demonstrat că proliferarea celulară nu este afectată, acestea nefiind toxice la concentrațiile testate.

Compozitul Fe_3O_4@MCM-41E s-a obținut prin acoperirea nanoparticulelor de magnetită obținute în prezență de CTAB cu silice mezoporoasă de tip MCM-41 obținută prin aceeași metodă ca probele anterior menționate, doar că îndepărtarea surfactantului s-a făcut prin extracție Nanoparticulele de magnetită sunt bine dispersate în rețeaua silicei MCM-41, pulberea de compozit Fe_3O_4@MCM-41E prezentând cele mai mari valori ale magnetizare de saturație dintre toate materialele compozite sintetizate de tip Fe_3O_4@MCM-41, dar valori ale suprafeței specifice și volumul porului mai mici decât celelalte probe.

(iii) Au fost obținute în prezența agentului de direcționare a structurii Pluronic P123 materialele compozite mezoporoase silice-dioxid de titan de tip SBA-15, cu un conținut de 4,5, 10, 20 și respectiv 30%(mol) titan prin metoda sol-gel asistată de cea hidrotermală care au fost testate apoi drept transportori pentru o moleculă model, oxitetraciclina. Toate compozitele silice-dioxid de titan sintetizate au prezentat o mezofază ordonată, iar faza anatas s-a observat în cazul tuturor compozitelor, excepție materialul Ti4,5SBA-15 la care faza de anatas este greu detectabilă datorită conținutului redus de titan, care în cea mai mare parte este încorporat în

rețeaua silicei prin înlocuirea atomilor de siliciu cu cei de titan. Compozitele silice-dioxid de titan au fost comparate atât cu silicea mezoporoasă de tip SBA-15, cât și cu dioxid de titan mezoporos.

(iv) Sistemele cu eliberare controlată de oxitetraciclină pe bază de transportori anorganici silice-dioxid de titan s-au obținut prin adsorbția antibioticului în mezoporii transportorului metoda umectării incipiente considerându-se două concentrații diferite de medicament 25% și 33%. S-au determinat profilele de eliberare a oxitetraciclinei din mezoporii transportorilor mezoporoși silice -dioxid de titan în soluție PBS pH = 5,7 la 37^0C. S-a observat că dioxid de titan cristalin prezent pe suprafața silicei mezoporoasă conduce la o eliberare mai lentă a moleculelor de antibiotic. Datorită particulelor sub formă de fibre cu mezocanale lungi compozitul silice-dioxid de titan cu un conținut de 10% (mol) Ti prezintă cele mai mici viteze de eliberare a medicamentului indiferent de cantitatea de medicament încorporată. Pentru transportorul Ti4,5SBA-15 pentru ambele concentrații de medicament profilul de eliberare al acestuia din mezopori este identic cu al desorbției de pe silicea SBA-15, având cel mai pronunțat efect *burst.* Pentru probele care au un conținut mai mic de medicament adsorbit în pori, s-a observat o eliberare mai lentă a moleculelor de antibiotic în prima etapă a profilului de eliberare. Prezența nanoparticulelor de anatas pe suprafața silicei determină o micșorare a vitezei de eliberare, care se accentuează odată cu mărirea conținutului de titan. Toate probele testate oxitetraciclină-transportor anorganic au prezentat activitate bactericidă bună, similară cu cea a antibioticului, ceea ce demonstrează că activitatea antimicrobiană nu a fost afectată de adsorbția în mezoporii suportului anorganic. Proiectarea unor transportori mezoporoși silice - dioxid de titan cu un conținut optim de titan este necesară pentru obținerea unor sisteme cu eliberare controlată de medicament eficiente.

(iv) Elaborarea unor sisteme cu eliberare țintită de doxorubicină prin utilizarea unor transportori de tip magnetită-silice mezoporoasă de tip MCM-41 cu capacitate absorbantă corespunzătoare și comportament superparamagnetic. Dintre toți transportorii sintetizați și caracterizați pe bază de magnetită acoperită cu silice de tip MCM-41, care prezintă un comportament superparamagnetic, cele mai mari valori ale magnetizării de saturație le au probele Fe_3O_4@MCM-folat (5,54 emu/g) și materialul Fe_3O_4@MCM-APTES (5,15 emu/g), ceea ce demonstrează că aceștia au cel mai mare conținut de magnetită dintre toate probele sintetizate. O valoare a magnetizării de saturație mare a materialelor sintetizate constituie o cerință de bază pentru transportul medicamentului la organul bolnav.

Profilele de eliberare a medicamentul citostatic, doxorubicină, s-au determinat în soluție tampon de fosfat, pH=5,7, la 37°C, care simulează mediul celular tumoral. S-au studiat două concentrații de medicament încapsulat în transportorii magnetici de tipul Fe_3O_4@MCM-41, 5% şi 10% DOX. S-a demonstrat o încapsulare eficientă a agentului citostatic în transportorii propuși, în special în cazul Fe_3O_4@MCM-APTES, profilele de eliberare fiind foarte lente, ceea ce ar permite atingerea țesutului tumoral prin ghidare magnetică sau acumulare pasivă datorită legării pe suprafața silicei a grupărilor folat.

Testele de toxicitate efectuate pe linie celulară umană de limfocite sănătoase au demonstrat o reducere a toxicității doxorubicinei atunci când este încapsulată în transportori de tip magnetită-silice mezoporoasă decât în cazul aplicării unei soluții apoase la aceeași concentrație.

Contribuții originale

- Sinteza și caracterizarea unor sisteme cu eliberare controlată de medicamente pe bază de transportori anorganici, silice-dioxid de titan, mezostructurați de tip SBA-15. Compararea proprietăților materialelor compozite mezostructurate silice-dioxid de titan cu cele ale silicei SBA-15 și a dioxidului de titan mezoporos. Drept moleculă model, în acest caz, a fost utilizată oxitetraciclina.
- Obținerea pentru prima dată a feritei de cobalt prin coprecipitare, direct în soluție apoasă, la temperatură joasă, 60ºC.

- Obținerea unor compozite magnetită / ferită de cobalt-silice mezoporoasă de tip MCM-41 și studiul toxicității acestora, în funcție de concentrație, la nivel celular.
- Încapsularea eficientă a doxorubicinei în vehicule magnetice, magnetită-silice mezoporoasă-funcționalizată cu grupări folat pentru acumulare pasivă în țesut tumoral, cu efecte toxice diminuate față de agentul citostatic administrat ca soluție apoasă.

Perspective

- Utilizarea materialelor magnetice de tip ferită de cobalt-silice mezoporoasă care au demonstrat o toxicitate redusă la nivel celular și în alte aplicații nu numai biomedicale, ci și în domeniul catalizei.
- Testarea compozitelor silice-dioxid de titan drept transportori și pentru alți compuși organici sau în domeniul fotocatalizei.
- Studiul efectelor la nivel celular pe diferite linii celulare atât sănătoase, cât și tumorale atât a transportorilor sintetizați în cadrul acestei teze de doctorat, cât și a sistemelor cu eliberare țintită de doxorubicină.
- Dezvoltarea unor sisteme cu eliberare controlată de substanțe biologic active pe bază de dioxid de titan mezoporos.

ARTICOLE PUBLICATE

1/ R.-A. Mitran, **D.Georgescu**, N.Stănică, C.Matei, D.Berger, Acoperirea nanoparticulelor de magnetită cu un strat de silice mezoporoasă cu pori de dimensiuni și geometrii diferite/Coating magnetite nanoparticles with mesostructured silica shell of different pore and geometry, *Revista Română de Materiale/Romanian Journal of Materials*, 46 (2016), 296-302 (FI=0,56)..

2/ D.Berger, **D.Georgescu**, L.Băjenaru, A.Zanfir, N.Stănică, C.Matei, Properties of mesostructured silica coated $CoFe_2O_4$ *versus* Fe_3O_4-silica composites, *Journal of Alloys and Compounds*, 708 (2017) 278-284 (FI=3,13-ZONE ROȘIE).

3/ **D.Georgescu**, C.Matei, N.Stănică, D.Berger, Mesoporous ferrites obtained in the presence of pluronic copolymer for potential biomedical applications, *UPB Scientific Bulletin*, Series B, 79 (2017) 13-22.

4/ **D.Georgescu**, A.-M.Brezoiu, R.–A.Mitran, D.Berger, C.Matei, B.Negreanu–Pirjol Mesostructured silica–titania composites for improved oxytetracycline delivery systems, *Comptes Rendus Chimie* , 20 (2017) 1017-1025 (FI=1,879-ZONA GALBENĂ).

.

MANIFESTĂRI ȘTIINȚIFICE

1/ Faculty of Chemistry Conference, „Alexandru Ioan Cuza" University Days, Iași, 29-31 Octomber 2015

Prezentare poster „Magnetic mesoporous inorganic composites with biomedical applications", autori **D. Georgescu**, A. Zanfir, N. Stănică, R.A. Mitran, C. Munteanu, C. Matei, D. Berger.

Rezultate obținute : DIPLOMĂ PENTRU REZULTATE DEOSEBITE ÎN ACTIVITATEA DE CERCETARE ȘTIINȚIICĂ, Iași 29-31 Octombrie 2015.

2/National Institute for Research&Development in Chemistry&Petrochemistry ICECHIM, International symposium Priorities of Chemistry for a Sustainable Development PRIOCHEM 12 th Edition Bucharest 27-29 octombrie 2016.

Prezentare poster „OXYTETRACYCLINE DELIVERY SYSTEMS CONTAINING MESOPOROUS SILICA-TITANIA COMPOSITES", autori **D. Georgescu**, A.M. Brezoiu, R.A. Mitran, B. Negreanu-Pirjol, C. Matei, D. Berger.

Bibliografie Selecție

[1] J.C.Cezar, M.Knobel, H.C.N.Tolentino, Magnetic properties of Cu-Permalloy granular alloy, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 226-230 (2001) 1519-1521.

[2] M.Kuźmiński, A.Ślawska-Waniewska, H.K.Lachowicz, M.Knobel, The effect of particle size and surface-to-volume ratio distribution on giant magnetoresistance (GMR) in melt-spun Cu-Co alloys, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 205 (1999) 7-13.

[6] D.Georgescu, **C.Matei, N.Stănică, D.Berger, Mesoporous ferrite obtained in the presence of pluronic copolymer for potential biomedical applications, *UPB Scientific Bulletin*, Series B, 79 (2017) 13-22.**

[7] P.E.G.Casillas, C.A.M.Pérez, C.A.R.Gonzalez (2012), Infrared Spectroscopy – Materials Science, Engineering and Technology, *INTECH Open Access Publisher*, (2012) 405-420.

[8] A.B.Salunkhe, V.M.Khot, N.D.Thorat, M.R.Phadatare, C.I.Sathish, D.S.Dhawale, S.H. Pawar, Polyvinyl alcohol functionalized cobalt ferrite nanoparticles for biomedical applications, Journal Applied surface science, 264 (2013) 598– 604.

[9] C.I.Covaliu, C.Matei, A.C.Ianculescu, I.Jitaru, D.Berger, Fe_3O_4, $CoFe_2O_4$ nanoparticles stabilized in sodium alginate polymer, *UPB Scientific Bulletin, Series B: Chemistry and Materials Science*, 71 (2009) 53-60.

[10] R.A.Mitran, D.Georgescu, N.Stănică, C.Matei, D.Berger, Coating magnetite nanoparticles with mesostructured silica shell of different pore size and geometry, *Revista Română de Materiale / Romanian Journal of Materials*, 46 (2016) 437 – 443.

[11] D.Berger, D.Georgescu, L.Băjenaru, A.Zanfir, N.Stănică, C.Matei, Properties of mesostructured silica coated $CoFe_2O_4$ versus Fe_3O_4-silica composites, *Journal of Alloys and Compounds*, 708 (2017), 278-284.

[14] J.Kim, J.E.Lee, J.Lee, J.Ho Yu, B.C.Kim, K.An, Y.Hwang, C.-H.Shin, J.-G.Park, J.Kim, T.Hyeon, Magnetic fluorescent delivery vehicle using uniform mesoporous silica spheres embedded with monodisperse magnetic and semiconductor nanocrystals, *Journal of the American Chemical Society*, 128 (2006) 688-689.

[15] R.A.Bohara, N.D.Thorat, H.M.Yadav, S.H.Pawar, One-step synthesis of uniform and biocompatible amine functionalized cobalt ferrite nanoparticles: a potential carrier for biomedical applications, *New Journal of Chemistry*, 38 (2014) 2979-2986.

[16] P.Pradhan, J.Giri, G.Samanta, H.D.Sarma, K.P.Mishra, J.Bellare, R.Banerjee, D.Bahadur, Comparative evaluation of heating ability and biocompatibility of different ferrite-based magnetic fluids for hyperthermia application, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 81B (2007) 12-22.

[17] G.Aygar, M.Kaya, N.Özkan, S.Kocabıyık, M.Volkan, Preparation of silica coated cobalt ferrite magnetic nanoparticles for the purification of histidine-tagged proteins, *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, 87 (2015) 64-71.

[18] L.E.Euliss, S.G.Grancharov, S.O'Brien, T.J.Deming, G.D.Stucky, C.B.Murray, G.A.Held, Cooperative assembly of magnetic nanoparticles and block copolypeptides in aqueous media, *Nano Letters*, 3 (2003) 1489-1493.

[19] X.Liu, Y.Guan, Z.Ma, H.Liu, Surface modification and characterization of magnetic polymer nanospheres prepared by miniemulsion polymerization, *Langmuir*, 20 (2004) 10278-10282.
[20] R.Hong, N.O.Fischer, T.Emrick, V.M.Rotello, Surface PEGylation and Ligand Exchange Chemistry of FePt Nanoparticles for Biological Applications, *Chemistry of Materials*, 17 (2005) 4617-4621.
[21] Y.Sahoo, H.Pizem, T.Fried, D.Golodnitsky, L.Burstein, C.N.Sukenik, G.Markovich, Alkyl Phosphonate/Phosphate Coating on Magnetite Nanoparticles: A Comparison with Fatty Acids, *Langmuir*, 17 (2001) 7907-7911.
[22] M.Kim, Y.Chen, Y.Liu, X.Peng, Super-Stable, High-Quality Fe_3O_4 Dendron–Nanocrystals Dispersible in Both Organic and Aqueous Solutions, *Advanced Materials*, 17 (2005) 1429-1432.
[23] Y.Kobayashi, M.Horie, M.Konno, B.Rodriguez- González, L.M.Liz- Marzán, Preparation and Properties of Silica-Coated Cobalt Nanoparticles, J. Phys. Chem. B, 107 (2003) 7420-7425.
[24] A.-H.Lu, W.-C.Li, N.Matoussevitch, B.Spliethoff, H.Bönnemann, F.Schüth, Highly stable carbon-protected cobalt nanoparticles and graphite shells, *Chemical Communication***,** 0 (2005) 98-100.
[25] N.S.Sobal, M.Hilgendorff, H.Möhwald, M.Giersig, M.Spasova, T.Radetic, M.Farle, Synthesis and Structure of Colloidal Bimetallic Nanocrystals: The Non-Alloying System Ag/Co
Nano Letters, 2 (2001) 621–624.
[26] Q.Liu, Z.Xu, J.A.Finch, R.Egerton, A Novel Two-Step Silica-Coating Process for Engineering Magnetic Nanocomposites, *Chemistry of Materials*, 10 (1998) 3936-3940.
[27] J.Lin, W.Zhou, A.Kumbhar, J.Wiemann, J.Fang, E.E.Carpenter, C.J.O'Connor, Gold-Coated Iron (Fe@Au) Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Magnetic Field-Induced Self-Assembly, *Journal of Solid State Chemistry*, 2001, 159 (2001) 26-31.
[28] N.O.Núñez, P.Tartaj, M.P.Morales, P.Bonville, C. J. Serna, Yttria-Coated FeCo Magnetic Nanoneedles, *Chemistry of Materials*, 16 (2004) 3119-3124.
[36] H.H.P.Yiu, M.A.Keane, Z.A.Lethbridge, M.R.Lees, A.J.El Haj, J.Dobson, Synthesis of novel magnetic iron metal–silica (Fe–SBA-15) and magnetite–silica (Fe_3O_4 –SBA-15) nanocomposites with a high iron content using temperature-programed reduction, *Nanotechnology*, 19 (2008) 255606.
[37] X.Zang, W.Xie, Enzymatic interesterification of soybean oil and methyl stearate blends using lipase immobilized on magnetic Fe_3O_4/SBA-15 composites as a biocatalyst, *Journal of Oleo Science*, 63 (2014), 1027-1034.
[39] H.R.Emamian, A.Honarbakhsh-Raouf, A.Ataie, A.Yourdkhani, Synthesis and magnetic characterization of MCM-41/$CoFe_2O_4$ nano-composite, *Journal of Alloys and Compouds*, 480 (2009) 681–683.
[40] I.S.Lyubutin, S.S.Starchikov, N.E.Gervits, N.Yu.Korotkov, T.V.Dmitrieva, C.R.Lin, Y.T.Tseng, K.Y.Shih, J.S.Lee, C.C.Wang, Canted spin structure and the first order magnetic transition in $CoFe_2O_4$ nanoparticles coated by amorphous silica, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials,* 415 (2016) 13-19.
[41] M.V.Berridge, A.S.Tan, Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 303 (1993) 474-482.
[42] T.Bernas, J.W.Dobrucki, The role of plasma membrane in bioreduction of two tetrazolium salts, MTT and CTC, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 380 (2000) 108–116.
[43] V.Pašukonienė, A.Mlynska, S.Steponkienė, V.Poderys, M.Matulionytė, V.Karabanovas, U.Statkutė, R.Purvinienė, J.A.Kraśko, A.Jagminas, M.Kurtinaitienė, M.Strioga, R.Rotomskis, Accumulation and biological effects of cobalt ferrite nanoparticles in human pancreatic and ovarian cancer cells, *Medicina 50* (2014) 237-244.
[44] S.Sabale, V.Jadhav, V.Khot, X.Zhu, M.Xin, H.Chen, Superparamagnetic MFe_2O_4 (M=Ni, Co, Zn, Mn) nanoparticles: synthesis, characterization, induction heating and cell viability studies for cancer hyperthermia applications, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 26 (2015) 127.
[45] K.S.W.Sing, Reporting physisorption data for gas/solid systems with special reference to the determination of surface area and porosity (Recommendations 1984), *Pure and Applied Chemistry*, 57 (1985) 603-619.
[46] J.C.Groen, L.A.A.Peffer, J.Pérez-Ramírez, Pore size determination in modified micro- and mesoporous materials. Pitfalls and limitations in gas adsorption data analysis, *Microporous and Mesoporous Materials*, 60 (2003), 1-17.
[47] S.Y.Chen, T.Mochizuki, Y.Abe, M.Toba, Y.Yoshimura, Ti-incorporated SBA-15 mesoporous silica as an efficient and robust Lewis solid acid catalyst for the production of high-quality biodiesel fuels, *Applied Catalysis B: Environmental*, 148–149 (2014) 344-356.
[48] D.Georgescu, A.-M.Brezoiu, R.–A.Mitran, D.Berger, C.Matei, B.Negreanu–Pirjol Mesostructured silica–titania composites for improved oxytetracycline delivery systems, *Comptes Rendus Chimie*, 20 (2017) 1017-1025 .
[49] M.M.Wan, X.D.Sun, S.Liu, J.Ma, J.H.Zhu, Versatile drug releaser derived from the Ti-substituted mesoporous silica SBA-15, *Microporous and Mesoporous Materials*, 199 (2014) 40-49.
[50] L.Yang, Z.Jiang, S.Lai, C.Jiang, H.Zhon, Synthesis of Titanium Containing SBA-15 and Its Application for Photocatalytic Degradation of Phenol, *International Journal of Chemical Engineering*, 2014 (2014) 691562 7 pagini.