

(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2021 00573

(22) Data de depozit: 23/09/2021

(41) Data publicării cererii:  
30/03/2023 BOPi nr. 3/2023

(71) Solicitant:  
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE  
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU  
FIZICA LASERILOR, PLASMEI ȘI  
RADIĂȚIEI-INFLPR, STR. ATOMIȘTILOR  
NR.409, MĂGURELE, IF, RO

(72) Inventatori:  
• LUNGU IULIA IOANA,  
STR.REMUS OPREANU, NR.12, ET.1,  
AP.10, CONSTANȚA, CT, RO;  
• FLEACA CLAUDIU- TEODOR,  
ALEEA POIANA CERNEI NR.4, BL.E 4,  
SC.A, ET.7, AP.37, SECTOR 6,  
BUCUREȘTI, B, RO;

• GAVRILA-FLORESCU LAVINIA,  
STR.MALCOCI, NR.2, BL.36 B, AP.98,  
SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;  
• BALAS MIHAELA, BLD.RĂMNICU SĂRAT,  
NR.22, BL.7A, SC.2, ET.5, AP.20,  
SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;  
• NISTORESCU IOANA-SIMONA,  
ȘOS.BUCUREȘTI- MĂGURELE, NR.51D,  
SC.B, AP.5, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B,  
RO;  
• MORJAN ION, STR.CAZANULUI, NR.83 V,  
AP.4, COMUNA BERCEI, IF, RO;  
• NICULESCU ANA-MARIA, STR. VICINA  
NR. 3, BL. 33, SC. 2, AP. 71, SECTOR 5,  
BUCUREȘTI, B, RO;  
• DUMITRACHE FLORIAN, STR.14, NR.27,  
COMUNA 1 DECEMBRIE, IF, RO

(54) PROCEDEU DE OBTINERE A NANOPARTICULELOR  
DE OXID DE FIER ȘI DE SUSPENSII BIOCOMPATIBILE  
STABILIZATE CU CARBOXIMETIL CELULOZĂ DE SODIU  
(CMCNa)

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere prin piroliză laser, într-o singură etapă, a nanopulberilor sub forma de nanoparticule de oxid de Fe și stabilizarea acestora în suspensii biocompatibile stabilizate cu carboximetil celuloză de sodiu CMCNa, destinate, dar nu limitate, la folosirea acestora în aplicații biomedicale precum cele oncologice. Procedeu conform invenției constă în interacțiunea dintre radiația fascicolului laser cu CO<sub>2</sub> având puterea nominală de 1300 W cu lungimea de undă  $\lambda = 10,59 \mu\text{m}$  și un flux de gaze reactive format din aer sintetic, vapori de pentacarbonil de Fe și etilenă, procedeu având loc într-o cameră de reacție în formă de cruce la o presiune constantă de 300 mbar, iar obținerea suspensiilor biocompatibile stabilizate de nanoparticule de oxid de Fe și CMCNa este realizată prin utilizarea unei băi de ultrasunete termostată la 20°C și frecvența de 59 kHz urmată de eliminarea excesului de stabilizator prin spălări și redispersări repetate.

Revendicări: 5  
Figuri: 10

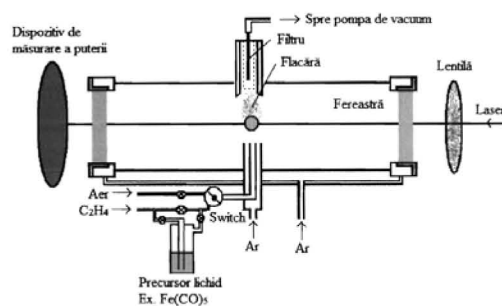


Fig. 2

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).



## DESCRIEREA INVENTIEI

## TITLUL INVENTIEI

OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI	
Cerere de brevet de invenție	
Nr. a	2021 0573
Data depozit	23-09-2021

**Procedeu de obținere a nanoparticulelor de oxid de fier și de suspensii biocompatibile stabilizate cu carboximetil celuloză de sodiu (CMCNa)**

## DOMENIUL TEHNIC

Inventia face parte din domeniul tehnic al nanotehnologiilor: utilizarea proprietăților materialelor nanometrice, diferite de proprietățile atomilor, moleculelor și materiei în vrac, pentru a crea materiale, dispozitive și sisteme îmbunătățite care exploatează aceste proprietăți noi.

Prezenta invenție se referă la un procedeu de obținere de nanoparticule de oxid de fier prin piroliză laser și de suspensii biocompatibile stabilizate cu CMCNa destinate, dar nu limitate la folosirea acestora în aplicații biomedicale, precum cele oncologice.

## STADIUL TEHNICII

Stadiul tehnicii este caracterizat printr-un înalt nivel de interdisciplinaritate printre care menționăm: studiul nano-bio-materialelor, radiația laser și procesarea fasciculului, interacțiune fascicul-materie, realizarea de pulberi nanometrice și de suspensii stabilizate și biocompatibile, tehnologie și inginerie.

Progresele realizate în domenii precum nanomedicină și nanotehnologie au dus la o dezvoltare semnificativă în ceea ce privește folosirea nanomaterialelor pentru aplicații biomedicale precum terapie, diagnostică și imagistică. Nanomaterialele au o dimensiune considerabil mai mică comparativ cu macromoleculele biologice. Astfel, prin comparație cu microparticulele, nanoparticulele prezintă o absorbție intracelulară superioară, făcându-le potrivite ca vehicule pentru transportul de medicamente în ceea ce privește tratarea cancerului. Mai mult decât atât, datorită dimensiunilor, nanomaterialele au potențialul de a depăși barierele biologice. Un alt avantaj al dimensiunii acestora este suprafața superficială crescută datorită căreia se crește posibilitatea încărcării cu agenți activi sau stabilizatori. Cel mai important, nanomaterialele pot depăși limitările impuse de tratamentele convenționale pentru cancer, precum lipsa de specificitate sau concentrații crescute de agent activ [1].

Interesul pentru nanoparticule magnetice cu aplicații în diverse aplicații, în principal cele biomedicale, este în creștere. În mod special, nanoparticulele magnetice de oxid de fier sunt



Mati A

stabile din punct de vedere fizico-chimic și biocompatibile, astfel prezentând caracteristici unice pentru aplicații clinice. Mai mult decât atât, în momentul în care nanoparticulele de magnetită ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) sau maghemită ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) ajung la dimensiuni mai mici de 20 de nm, acestea prezintă un comportament superparamagnetic. În ciuda numeroaselor rezultate ce atestă utilitatea nanoparticulelor superparamagnetice în domeniul biomedical, acestea se află încă în stadiile incipiente ale investigațiilor clinice, studiile demonstrând o nevoie de îmbunătățire a acestora înainte de comercializare [2].

Un factor determinant al proprietăților finale ale particulelor este metoda de sinteză folosită. Tehnica de piroliză laser este o metodă ce se bazează pe rezonanța dintre radiația laser și un senzitivant gazos obținută în urma interacțiunii dintre un laser de mare putere și un mediu omogen în fază gazoasă. Versatilitatea metodei permite obținerea de nanoparticule uniforme, cu distribuție uniformă și mărimi controlabile [3, 4].

În vederea îmbunătățirii sistemelor de țintire selectivă a zonelor tumorale, o clasă de nanomateriale hibride compuse dintr-o arhitectură de tip anorganic-organic a devenit intens studiată ca nanoplatforme multifuncționale *smart*. Astfel, pentru dezvoltarea de nanoconjugate magnetice pentru aplicații în terapia oncologică, alegerea unei molecule biologice potrivite ca acoperire organică activă a nanoparticulelor anorganice este pivotală. Acest sistem hibrid va deține atât proprietățile componente anorganice (proprietăți magnetice), cât și cele ale componente organice (caracteristici de suprafață fizico-chimice și morfologice, biocompatibilitate ridicată). Carboximetil celuloza de sodiu (CMCNa) este un important derivat din celuloză ce deține grupări funcționale carboxil și hidroxil, cu un spectru larg de caracteristici unice precum natural, hidrofilic, non-toxic, biocompatibil și biodegradabil, necostisitor și stabil chimic. Mai mult decât atât, CMCNa este aprobat de către FDA (*Food and Drug Administration*) pentru o zonă largă de aplicații ce include nutriție, aplicații biomedicale și farmaceutice [5].

Brevetul [US 2013/025,6583 A1] prezintă o metodă de preparare a unei dispersii de nanoparticule de oxid de fier stabilizate de tip miez-înveliș prin metoda precipitării chimice în mod avantajos. O altă invenție [US 9,125,941 B2] descrie obținerea de nanoparticule de oxid de fier solubile în apă, acoperite cu dextran, cu proprietăți magnetice unice, inclusiv superparamagnetice, preparate special pentru studii *in vivo* și pentru aplicații clinice, ca agenți injectabili de contrast RMN (imagistică prin rezonanță magnetică). Invenția [WO 2017/065600 A1] oferă o metodă pentru producerea de nanoparticule de oxid de fier având o structură de magnetită cu proprietăți superioare în comparație cu alte nanoparticule de oxid de fier (o dimensiune a diametrului de particule de la 7 la 27 nm atunci când este măsurată cu ajutorul transmisiei microscopice electronice și o putere de magnetizare ( $M_s$ ) de la 60 la 80 emu/g. Cererea de brevet [134544 A2]



prezintă procedeul de obținere a unui nanocompozit gamma-oxid de fier-polimer biocompatibil (polietilenă) utilizat ca trasor magnetic ne-radioactiv în metode de diagnostic tumoral.

Următoarea invenție [EP13771761.7A] este direcționată către un agent de contrast T2 RMN, cuprinzând un nanocompozit oxid de fier care include o nanoparticule oxid de fier, în care nanoparticulele de oxid de fier menționate sunt încapsulate cu un surfactant și respectivul agent tensioactiv este încapsulat cu polietilen glicol – fosfolipid. Brevetul [EP 2 277 544 A1] prezintă o metodă de preparare de nanoclustere magnetice biocompatibile care conțin oxid de fier, respectiv oxid de fier-bor, cu utilizare primară în direcționarea magnetică a medicamentelor și terapia cu captare a neutronilor de bor.

### PREZENTAREA PROBLEMEI TEHNICE PE CARE INVENȚIA O REZOLVĂ

Scopul acestei invenții constă în obținerea prin piroliză laser a unei nanopulberi sub forma de nanoparticule de oxid de fier și stabilizarea acestora în suspensii biocompatibile folosind CMCNa. Procedeul de obținere al nanoparticulelor de oxid de fier constă în interacția dintre radiația fascicolului laser (laser cu CO<sub>2</sub>, 130W putere nominală,  $\lambda=10,59 \mu\text{m}$ ) și un flux de gaze reactive (aer sintetic, vapori de pentacarbonil de fier, etilenă). Procedeul se realizează într-o cameră de reacție având configurație 'în cruce' la presiune constantă de 300 mbar. Obținerea de suspensii biocompatibile stabilizate de nanoparticule de oxid de fier și CMCNa este realizată prin utilizarea unei băi de ultrasunete termostatată (59 kHz, 20°C) și eliminarea excesului de stabilizator prin spălări și redispersări repetate.

Dezavantajele obținerii de nanoparticule de oxid de fier și a suspensiilor stabilizate pe baza acestora prin alte metode de sinteză:

- Implică mai multe etape pentru sinteza de NPs;
- Timp îndelungat sau procedeu discontinuu pentru obținerea de nanoparticule;
- Contaminarea rezultatului final;
- Cantitate mica a produsului final;
- Control minim asupra parametrilor finali: dimensiune, formă, etc. generând o polidispersitate dimensională mare a nanoparticulelor
- Prezența stabilizatorului liber/nelegat în suspensia finală.

Problema tehnică rezolvată prin folosirea tehnicii de piroliză laser și procedeului de stabilizare este eliminarea din dezavantajele prezentate anterior prin:

- Obținerea nanoparticulelor de oxid de fier într-o singură etapă într-un regim staționar continuu;



- Timp de lucru mai mic și cantități mai mari de produs final comparativ cu metodele clasice, ajungându-se la producții de 5 g/h utilizând un sistem experimental de laborator;
- Produsele finale sunt de înaltă puritate iar contaminarea este redusă la minim datorită faptului că zona de reacție (flacăra de piroliză) este departe de surse de contaminare;
- Control asupra proprietăților produsului final prin controlul parametrilor din timpul reacției.
- Obținerea de suspensii stabilizate de oxid de fier și CMCNa, fără exces de stabilizator.

Prezenta invenție oferă posibilitatea de scalare a sistemului la dimensiuni industriale pentru obținerea de nanoparticule/suspensii stabilizate cu dispersie mică a diametrelor particulelor și productivitate ridicată.

### EXPUNEREA INVENȚIEI

Principiul metodei de piroliză laser, în fază gazoasă/vapori. Metoda de piroliză laser pentru sinteza de nanoparticule de oxid de fier se bazează pe transferul energetic rezonant între radiația laser monocromatică având o lungime de undă de 10,59  $\mu\text{m}$  și moleculele de gaz senzitivant – etilenă ( $\text{C}_2\text{H}_4$ ), către amestecul reactiv precursor în care pentacarbonilul de fier ( $\text{Fe}(\text{CO})_5$ ) este donor de fier, iar oxigenul provine din fluxul de aer sintetic. Ca și particularitate, piroliza laser în fază gazoasă este coordonată de fascicolul laser incident și astfel prin focalizarea lui se produce într-un volum mic, definit de intersecția dintre fascicolul laser focalizat și fluxul de gaze aflat în curgere laminară. Rezultatul este un timp de reacție foarte redus ce conduce la produși condensabili având diametre foarte uniforme și reduse (nanometrice).

### PREZENTAREA AVANTAJELOR INVENȚIEI ÎN RAPORT CU STADIUL TEHNICII

În raport cu stadiul actual al altor tehnici de obținere a nanoparticulelor de oxid de fier/suspensii biocompatibile stabilizate cu CMCNa, raportate până în prezent în literatura de specialitate, invenția prezintă următoarele avantaje:

- Obținerea de nanoparticule de oxid de fier realizate printr-o singură etapă;
- Reacția are loc în flux continuu de gaz/vapori obținându-se pulberi cu un grad ridicat de uniformitate dimensională;
- Datorită controlului precis asupra parametrilor ce sunt implicați în procesul de piroliză laser, se asigură un grad ridicat de reproductibilitate;
- Proprietățile finale ale nanoparticulelor pot fi controlate prin parametrii externi, precum puterea laser, debitele de gaz/vapori, presiunea din camera de reacție. Astfel, se pot obține pulberi cu o distribuție îngustă de dimensiuni ale particulele;



- Procesul poate fi cu ușurință folosit pentru aplicații industriale datorită metodei de obținere continuă de materiale nanostructurate și a randamentului de sinteză;
- Stabilizarea se poate realiza cu ușurință urmând pașii menționați anterior și având în vedere stabilizatorul folosit, costurile de obținere a produsului final: suspensie stabilizată de oxid de fier în mediu apos, este unul cu un preț redus spre moderat. În estimarea noastră, pentru 100 mL suspensie având concentrația de 1 g/L nanoparticule și 0,6 g/L CMCNa, aceasta este de 200 euro.

### PREZENTAREA FIGURILOR DIN DESENE

**Fig. 1.** Etapele procesului de obținere a nanoparticulelor de oxid de fier. Desen sugestiv pentru a facilita înțelegerea prezentei invenției

**Fig. 2.** Schema instalației de piroliză laser pentru sinteza de nanoparticule de oxid de fier (130W putere maximă,  $\lambda=10,59 \mu\text{m}$ )

**Fig. 3.** Imagini TEM cu probele din studiul infulenței puterii radiante 35-85W.

**Fig. 4.** Analiza de difracție de raze X pentru probele din studiul influenței puterii radiante: 35-85 W.

**Fig. 5.** Test MTT. Viabilitate pentru celulele MCF7 și MCF-12A după 24 și 48h incubare cu suspensiile realizate din  $\text{Fe}_x\text{O}_y$ -55W și  $\text{Fe}_x\text{O}_y$ -55W stabilizată cu CMCNa (mean  $\pm$  SD,  $n = 3$ ). Semnificația statistică a rezultatelor a fost notată cu (\*) după cum urmează: \* $p < 0.05$  (slab semnificativ); \*\* $p < 0.01$  (moderat semnificativ); \*\*\* $p < 0.001$  (foarte semnificativ)

**Fig. 6.** Morfologia celulară (imagini în câmp luminos) și Live/Dead Staining (imagini fluorescență) pentru celulele MCF7 și MCF-12A după 24 și 48h de incubare la concentrațiile 12.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$   $\text{Fe}_x\text{O}_y$ -55W și  $\text{Fe}_x\text{O}_y$ -55W stabilizată cu CMCNa (scale bar pentru imaginile în câmp luminos = 20  $\mu\text{m}$ ; scale bar pentru imaginile în fluorescență = 100  $\mu\text{m}$ )

**Fig. 7.** Nivelul de LDH eliberat după deteriorarea membranei celulelor MCF7 și MCF-12A incubate cu suspensiile realizate din  $\text{Fe}_x\text{O}_y$ -55W și  $\text{Fe}_x\text{O}_y$ -55W stabilizată cu CMCNa pentru 24 și 48h (mean  $\pm$  SD,  $n = 3$ ). Semnificația statistică a rezultatelor a fost notată cu (\*) după cum urmează: \* $p < 0.05$  (slab semnificativ); \*\* $p < 0.01$  (moderat semnificativ).

**Fig. 8.** Generarea de ROS în celulele MCF7 și MCF-12A după 4, 24, și 48h de incubare cu suspensiile realizate din  $\text{Fe}_x\text{O}_y$ -55W și  $\text{Fe}_x\text{O}_y$ -55W stabilizată cu CMCNa (mean  $\pm$  SD,  $n = 3$ ). Semnificația statistică a rezultatelor a fost notată cu (\*) după cum urmează: \* $p < 0.05$  (slab semnificativ); \*\* $p < 0.01$  (moderat semnificativ).



**Fig. 9.** Nivelul de NO eliberat în mediul de cultura al celulelor MCF7 și MCF-12A după 24 și 47 h de incubare cu suspensiile realizate din  $\text{Fe}_x\text{O}_y$ -55W și  $\text{Fe}_x\text{O}_y$ -55W stabilizată cu CMCNa (mean  $\pm$  SD,  $n = 3$ ). Semnificația statistică a rezultatelor a fost notată cu (\*) după cum urmează: \* $p < 0.05$  (slab semnificativ).

**Fig.10.** Procentajul de consum al AMDA în prezența suspensiei din  $\text{Fe}_x\text{O}_y$ -55W stabilizată cu CMCNa sau Roz bengal.

### PREZENTAREA ÎN DETALIU A UNUI MOD DE REALIZARE CU REFERIRE LA DESENE

Prezenta invenție reprezintă o continuare a investigațiilor realizate de inventatori în domeniul nanomaterialelor:

- Instalație de sinteză de nanoparticule prin piroliză laser din precursori solizi/a **2013 00984**
- Metodă de sinteză de NP/nanostructuri de  $\text{TiO}_2$  prin piroliză cu laser de  $\text{CO}_2$ /a **2015 00534**
- Metodă de sinteză de nanotuburi și/sau NP/nanostructuri în flux direct prin piroliză laser/a **2015 00205**
- Procedeu de preparare a straturilor subțiri de nitrură de carbon de tip  $\text{CN}_x$ , cu laserul/113231 B1 **1998**
- Procedeu de producere a unor pulberi ultrafine, de nitrură de carbon cristalină, cu laserul/115621 B1-2000
- Instalație de sinteză de nanoparticule prin piroliză laser/RO1266602014 **30.12.2014**

**Figura 2** reprezintă schema de funcționare de instalației de piroliză laser pentru obținerea de nanoparticule de oxid de fier. Sursa de fascicul este un laser industrial, comercial compus din: **tub laser** achiziționat de la firma Beijing EFR LASER S&T CO., LTD, tip ZS-1650, putere nominală 130W și **sursă laser** achiziționată de la firma Beijing EFR LASER S&T CO., LTD, model PS-N130/180 compatibilă cu laseri cu putere nominală între 130-180W.

Descrierea procesului. Etapele procedurii de obținere de nanoparticule de oxid de fier sunt prezentate în **Figura 1**.

**Sinteza de NP prin piroliza laser:** Procesul de piroliză de laser este realizat într-o cameră de reacție configurație 'în cruce'; un traseu orizontal este destinat traseului fascicolului laser, iar un traseu vertical fluxului de gaze aflat în curgere laminară. Se utilizează un laser cu  $\text{CO}_2$  având emisia pe lungimea de fundamentală 10,59  $\mu\text{m}$ , valoare la care  $\text{C}_2\text{H}_4$  are o absorbție moleculară semnificativă. așa cum este descrisă în **Figura 2**. Zona de reacție se evidențiază ușor printr-o flacără ce emite și în spectrul vizibil. Parametrii experimentali sunt aleși astfel încât temperatura



din această zonă, citită cu un pirometru optic, să rămână constantă în timpul reacției. Cu această ocazie s-a realizat un studiu parametric relativ la influența variației puterii laser (între 35W și 85W), menținând parametrii de focalizare, presiune și debitele principalelor gaze. Astfel puterea laser a generat o temperatură în flacăra de piroliză variind între 520 – 630 °C. Influența puterii laser asupra structurii NPs se evidențiază prin analiza XRD (**Figura 4**). Prin această metodă se pot sintetiza nanoparticule de oxid de fier folosind un amestec reactiv ce conține aer sintetic, vapori de pentacarbonil de fier antrenate de un flux de etilenă și etilenă. Mai mult, etilena utilizată are rol și ca agent de transfer de energie. Admisia gazelor în camera de reacție se face prin două duze tubulare poziționate concentric, iar confinarea precursorilor în direcția axei de curgere a particulelor proaspăt nucleate este realizată prin intermediul unui flux coaxial de argon. Amestecurile de gaze intră în camera de reacție prin duza centrală. Fluxurile reactive, introduse în camera de reacție prin duza centrală sunt antrenate de un flux de argon de confinare, timp în care presiunea este menținută constantă. Există, de asemenea, și două fluxuri laterale de argon pentru cele două ferestre de ZnSe, utilizare ca element de transparență pentru fascicolul laser. Rolul acestor fluxuri este de a nu permite contaminarea lor în timpul experimentului. Datorită absorbției fotoilor laserului în infraroșu de către moleculele de  $C_2H_4$  și interacției cu moleculele (ciocniri intramoleculare) din amestecul gazos, prin transfer energetic, urmat de descompunerea precursorilor, în zona de reacție apare o flăcără și este inițiat procesul de descompunere al  $Fe(CO)_5$  în atmosferă oxidantă, din care rezultă nanoparticulele de oxid de fier, care, antrenate de fluxul de argon menționat anterior, sunt colectate pe un filtru ceramic poros (învelit într-o hârtie de filtru pentru a facilita colectarea) aflat în camera de colectare. Obținerea nanoparticulelor de oxid de fier este puternic dependentă de o serie de parametri precum: temperatura în zona de reacție (aceasta poate fi controlată prin puterea fascicolului laser incident), debitele gazelor reactive și presiunea din camera de reacție. Debitul de gaze sunt controlate masic pentru a se evita erorile cauzate de variația volumului cu temperatura și presiunea.

**Realizarea suspensiilor:** Pentru realizarea suspensiilor biocompatibile cu nanoparticulele obținute anterior și stabilizate cu CMCNa se cântăresc cantitățile corespunzătoare concentrațiilor dorite în acord cu volumul de apă distilată necesar pentru suspensia finală. Pulberile de nanoparticule și stabilizator se amestecă mecanic pe o folie de aluminiu și se adaugă în recipientul cu apă distilată. Acest recipient se adaugă în baia de ultrasunete prevăzută cu un sistem de răcire termostată. Suspensiile se lasă la omogenizat în baia de ultrasunete 1h. După omogenizare, acestea sunt centrifugate la 10K rpm în vederea eliminării excesului de CMCNa.





Depozitul solid este redispersat în apă distilată păstrând volumul inițial al suspensiei folosind baia de ultrasunete în aceleași condiții.

**Figura 3.** prezintă imaginea TEM pentru pulberile sintetizate prin procesul prezentat anterior pentru studiul infueței puterii radiante între 35 – 85 W. Aceste nanoparticule prezintă o formă sferică cu tendință de aglomerare în agregate. Modul de organizare al acestora fiind sub formă de lanțuri de nanoparticule.

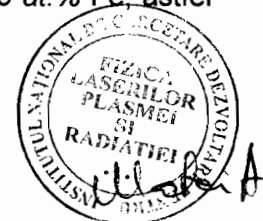
**Tabelul 1.** Date extrase din spectrul XRD (**Figura 4**)

Probe	a (Å) (constanta de rețea)	Dimensiunea de cristalit D (nm)
Fe <sub>x</sub> O <sub>y</sub> -55W	8.364	4.5
Fe <sub>x</sub> O <sub>y</sub> -45W	8.377	3.0
Fe <sub>x</sub> O <sub>y</sub> -35W	8.377	3.0
Fe <sub>x</sub> O <sub>y</sub> -85W	8.353	6.2
Fe <sub>x</sub> O <sub>y</sub> -70W	8.359	5.5

Dimensiunea de nanoparticulele s-a calculat din lărgimea maximelor la semiînălțime (FWHM) folosind ecuația Scherrer. Trebuie subliniat faptul că lărgimea foarte mare a maximelor de difracție se asociază atât formării unor particule de dimensiuni extrem de mici cât și unui grad înalt de dezordine structurală/cristalografică. Astfel, în domeniul "nano", creșterea dimensiunii de particulă semnifică și creșterea ordinii cristalografice denumită generic "cristalinitate". Este cazul probei selectate (Fe<sub>x</sub>O<sub>y</sub>-55W) care are maxime de difracție mai înguste decât maximele probelor realizate la puteri mai mici (35, 45W). Fe metalic poate fi indentificat numai în urme prin prezenta unui maxim de foarte mica intensitate la  $2\theta=44.7$ .

În cazul probei selectate, spectrul XRD prezentat în **Figura 4** indică:

- $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3/\text{Fe}_3\text{O}_4$  (magnetita), faza majoritară, cu rețea cristalină cubică cu fețe centrate, cu maximul principal la unghiul  $2\theta = 18,37^\circ$  ce corespunde familiei de plane cristaline de indici Miller (111), cu parametrul rețelei cristaline  $a_0=8,39 \text{ \AA}$ ;
- Fe, cu rețea cristalină cubică cu volum centrat sau carburi derivate, având maximul principal la unghiul  $2\theta = 44,64^\circ$ ; ce corespunde familiei de plane cristaline de indici Miller (110) în cazul  $\alpha\text{Fe}$ ;
- Nu sunt evidențe ale prezenței carbonului grafitic sub formă cristalină.
- Pentru evaluarea compoziției probelor sintetizate s-au realizat analize EDX. Rezultatele obținute pe proba Fe<sub>x</sub>O<sub>y</sub>-55W indică: 9.75 at. % C, 55.12 at. % O și 35.09 at. % Fe, astfel



că formula stoichiometrică ar fi  $\text{Fe}_2\text{O}_{3+0.14}$ . Formula obținută este foarte apropiată de cea a fazei de  $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ . Continutul de carbon în NPs sintetizate crește cu creșterea puterii laser, astfel ajunge la 13.3 at.% la NPs de Fe<sub>x</sub>O<sub>y</sub>-85W.

Rezultatele testului MTT, prezentate în **Figura 5**, indică faptul că cele două suspensii evaluate, nanoparticule simple și nanoparticule stabilizate cu CMCNa nu induc efecte citotoxice asupra liniilor celulare MCF-7 și MCF-12A

Din imaginile de microscopie de fluorescență prezentate în **Figura 6** se poate observa faptul că celulele rămân viabile după expunerea la tratamentul cu suspensiile de nanoparticule stabilizate sau nu cu CMCNa de concentrație 12.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Determinarea cantitativă a enzimei LDH eliberată în mediul de cultură după 24 și 48h de la expunerea la tratament (**Figura 7**) indică faptul că nanoparticulele (atât stabilizate, cât și simple) nu deteriorează integritatea membranelor a liniilor celulare testate. Mai mult decât atât, acest rezultat nu a fost raportat anterior și este o constatare importantă, care relevă oportunități pentru noi abordări terapeutice în combaterea acestei boli.

În **Figura 8** se observă faptul că tratamentul cu nanoconjugatele determină o creștere dependentă de timp și concentrație a ROS intracelular în ambele tipuri celulare, MCF7 și MCF-12A. Totuși, se observă o diferență între liniile celulare, nivelul ROS este mai ridicat cu aproximativ 20% în cazul celulelor tumorale comparativ cu celulele MCF-12A tratate cu  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{-CMCNa}$ . În plus, stabilizarea cu CMCNa a suspensiei de nanoparticule conduce la creșterea producției de ROS pentru ambele linii celulare, acest lucru poate fi datorat încărcăturii negative a nanoparticulelor cu CMCNa care ar putea atrage un număr mai mare de proteine pe suprafața nanoparticulelor. Se știe că celulele canceroase își acidifică mediul și, în consecință, proteinele serice tind să aibă sarcini pozitive care interacționează cu grupările funcționale carboximetil ale CMCNa și înconjoară nanoparticulele formând o biocoroană de proteine.

Nivelul NO produs în mediul de cultură al celulelor mamare tumorale și normale pare a fi similar la interacția cu ambele tipuri de suspensii. După cum se poate vedea în **Figura 9**, expunerea la  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  și  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{-CMCNa}$  simple într-o doză de 12,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  a dus la o creștere semnificativă statistic a producției de NO începând cu 24 h pentru celulele normale și 48 h pentru celulele tumorale sugerând un ușor potențial inflamator al nanoparticulelor.

În **Figura 10** este reprezentat procentajul de consum al AMDA pentru amestecul de AMDA\_RB, precum și AMDA\_  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{-CMCNa}$ . Rezultatul obținut demonstrează faptul că suspensia de nanoparticule stabilizată cu CMCNa nu consumă AMDA, randamentul generării fiind de 0,02, ceea ce înseamnă că amestecul nu produce oxigen singlet.



### MODUL ÎN CARE SE POATE APLICA INDUSTRIAL

Având în vedere stadiul tehnicii, aplicația industrială este obiectivul principal urmărit deoarece acest procedeu poate fi aplicat ca posibil vehicul pentru eliberarea controlată de medicamente în aplicații pentru terapia oncologică sau în procese farmacologice vizând procese de purificare prin separări magnetice.

Datorită metodei de sinteză cu reproductibilitate ridicată și procesului de realizare de suspensii stabilizate versatil, cerințele care sunt satisfăcute sunt următoarele:

- Se asigură o producție, într-un singur pas, de nanoparticule de oxid de fier de puritate înaltă;
- Proprietățile nanoparticulelor pot fi controlate facil prin parametrii externi;
- Există un risc minim de contaminare a produsul final;



## REFERINȚE

1. Lungu, I.I., et al., *Nanobiomaterials Used in Cancer Therapy: An Up-To-Date Overview*. 2019. **24**(19): p. 3547.
2. Arias, L.S., et al., *Iron Oxide Nanoparticles for Biomedical Applications: A Perspective on Synthesis, Drugs, Antimicrobial Activity, and Toxicity*. Antibiotics (Basel, Switzerland), 2018. **7**(2): p. 46.
3. Dumitrache, F., et al., *Highly magnetic Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles synthesized by laser pyrolysis used for biological and heat transfer applications*. Applied Surface Science, 2015. **336**: p. 297-303.
4. Morjan, I., et al., *Iron oxide-based nanoparticles with different mean sizes obtained by the laser pyrolysis: structural and magnetic properties*. J Nanosci Nanotechnol, 2010. **10**(2): p. 1223-34.
5. Leonel, A.G., et al., *Synthesis and characterization of iron oxide nanoparticles/carboxymethyl cellulose core-shell nanohybrids for killing cancer cells in vitro*. Int J Biol Macromol, 2019. **132**: p. 677-691.

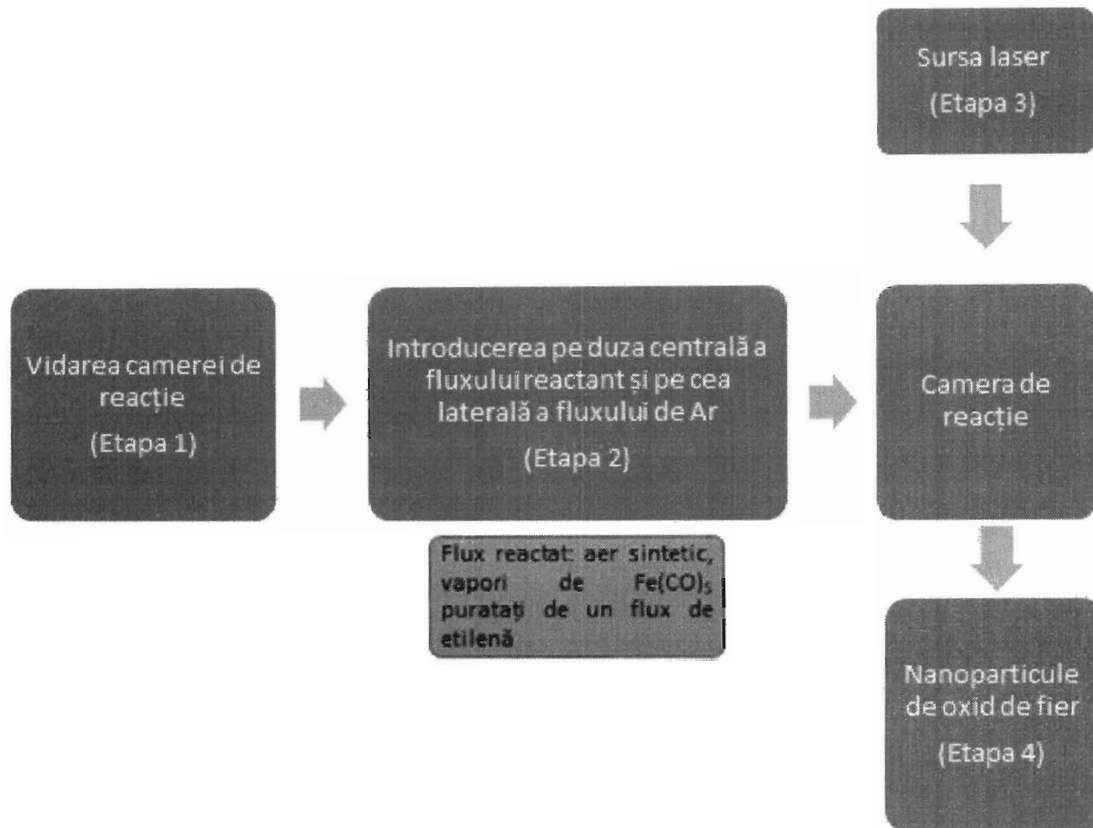


**REVEDICĂRILE**

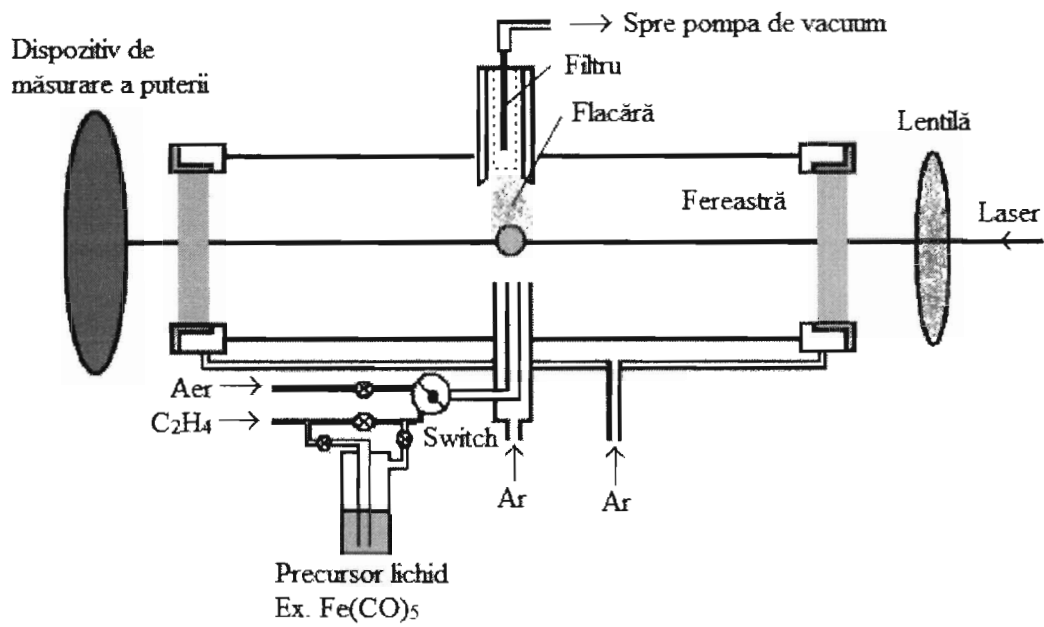
- 1. Procedul de obținere a nanoparticulelor de oxid de fier și de suspensii biocompatibile stabilizate cu carboximetil celuloză de sodiu (CMCNa) caracterizat prin aceea ca:**
  - a) Asigură în flux continuu obținerea de nanoparticule de oxid de fier de puritate înaltă, utilizând un laser cu CO<sub>2</sub> având emisia pe lungimea de fundamentală 10,59 μm;
  - b) Asigură controlul productivității nanoparticulelor prin controlul parametrilor externi (puterea laser, debitele de gaz/vapori, presiunea din camera de reacție). Parametrii de sinteză pentru care se obțin aceste nanoparticule sunt: presiune constantă din camera de reacție de 300 mbar, puterea laserului după absorbție 53-85W.
  - c) Asigură obținerea de suspensii stabilizate de oxid de fier și CMCNa, fără exces de stabilizator
- 2. Suspensii bicompatibile stabilizate cu CMCNa obținute conform revendicării 1 care nu induc efecte citotoxice.**
- 3. Suspensii bicompatibile stabilizate cu CMCNa obținute conform revendicării 1 care nu deteriorează integritatea membranașă a liniilor celulare.**
- 4. Suspensii bicompatibile stabilizate cu CMCNa obținute conform revendicării 1 care determină o creștere a speciilor de oxigen reactiv (ROS) intracelular în mod diferențiat pentru celule tumorale versus non-tumorale.**
- 5. Suspensii bicompatibile stabilizate cu CMCNa obținute conform revendicării 1 care nu produc oxigen singlet în culturi celulare.**



## DESENELE EXPLICATIVE



**Fig. 1.** Etapele procesului de obținere a nanoparticulelor de oxid de fier. Desen sugestiv pentru a facilita înțelegerea prezentei invenției



**Fig. 2.** Schema instalației de piroliză laser pentru sinteza de nanoparticule de oxid de fier (130W putere maximă,  $\lambda=10,59 \mu\text{m}$ )

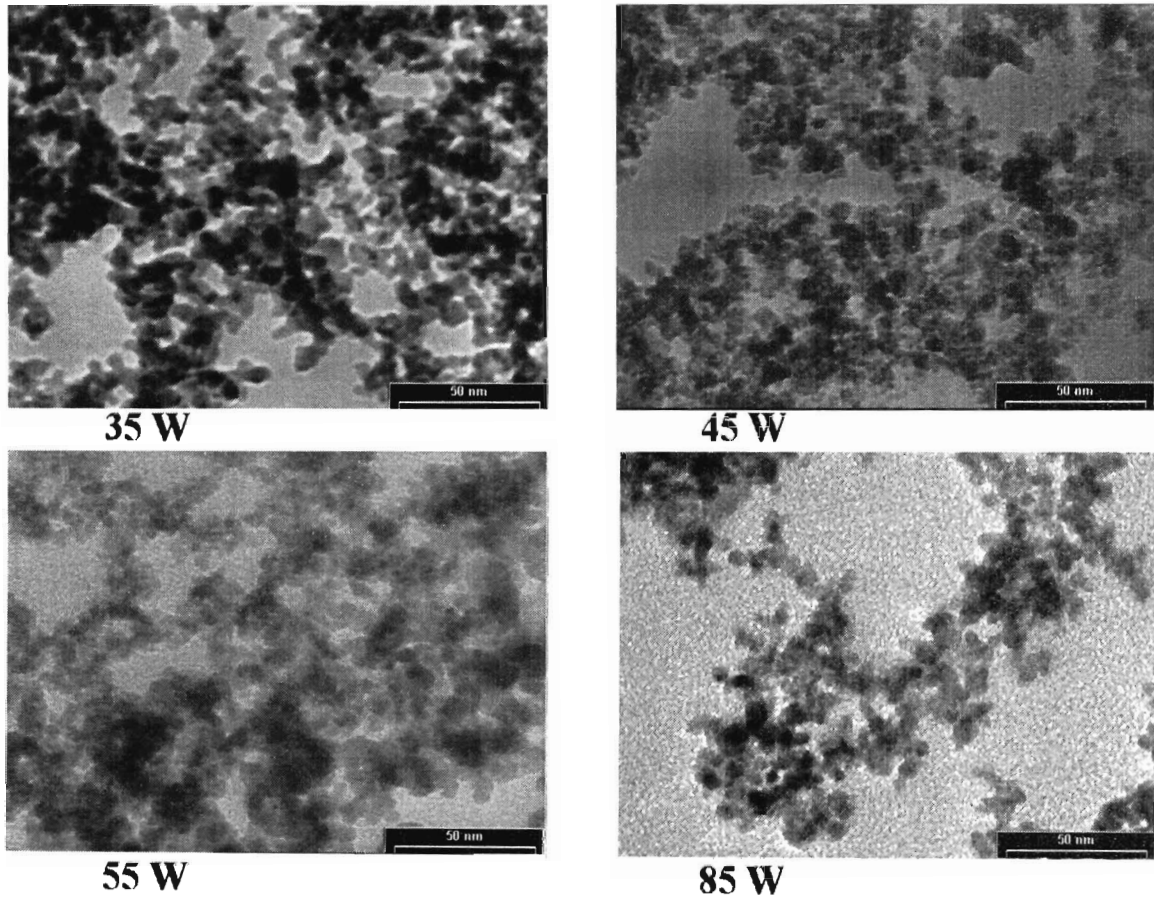
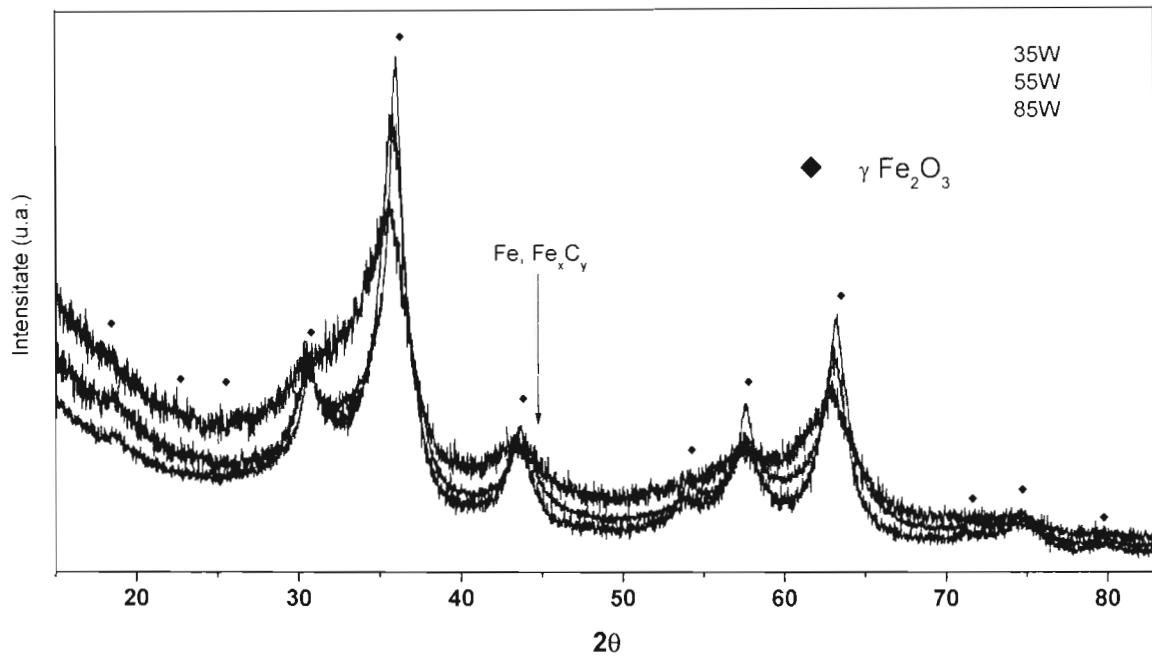


Fig. 3. Imagini TEM cu probele din studiul influenței puterii radiante: 35-85 W

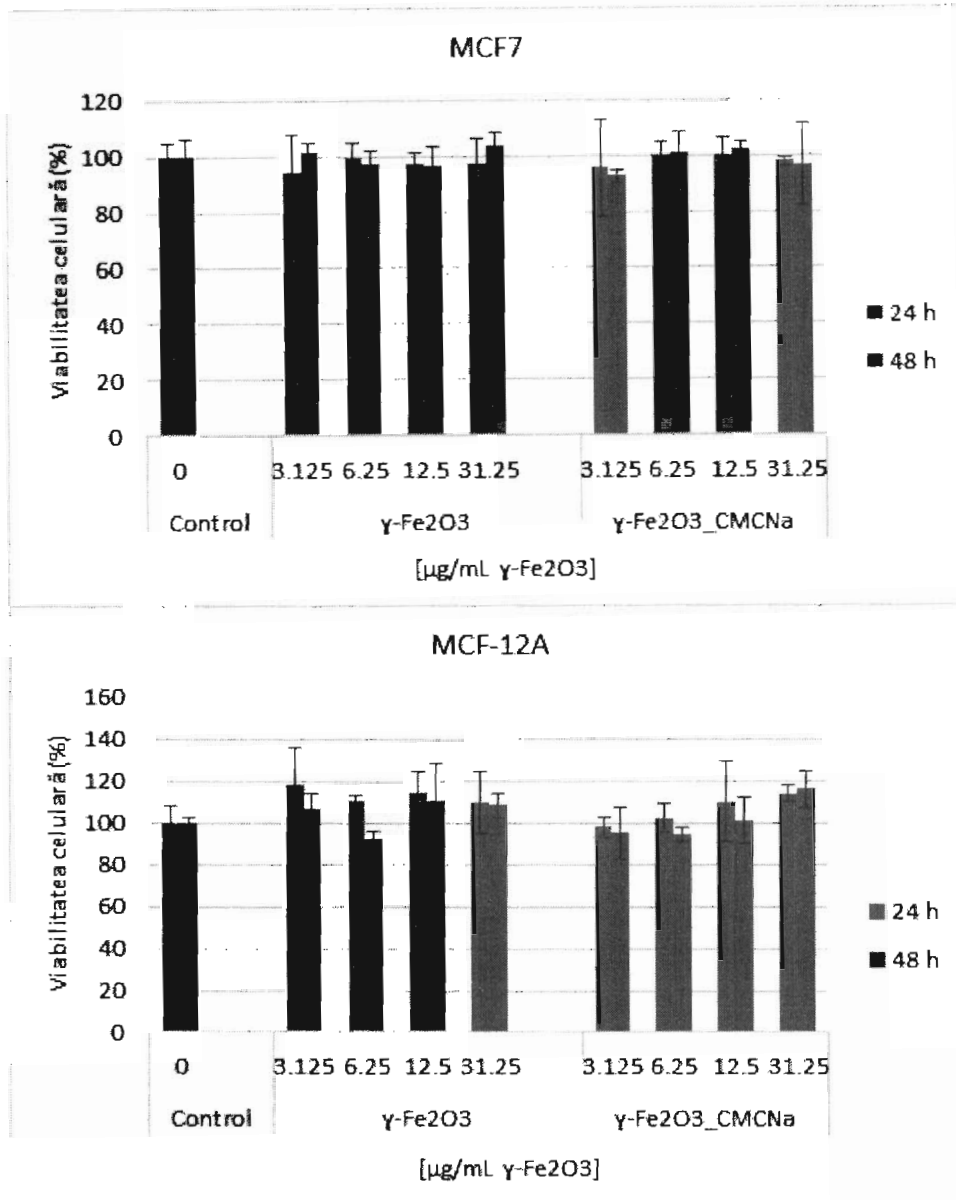




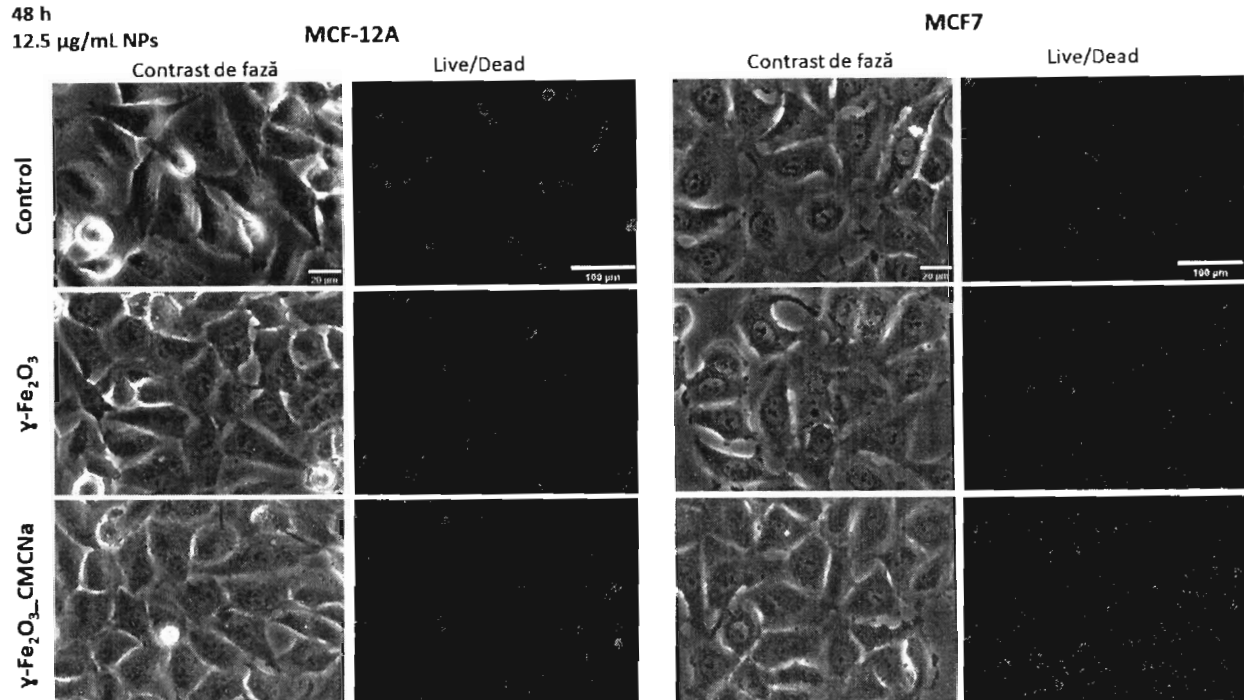


**Fig. 4.** Analiza de difracție de raze X pentru probele din studiul influenței puterii radiante: 35-85 W

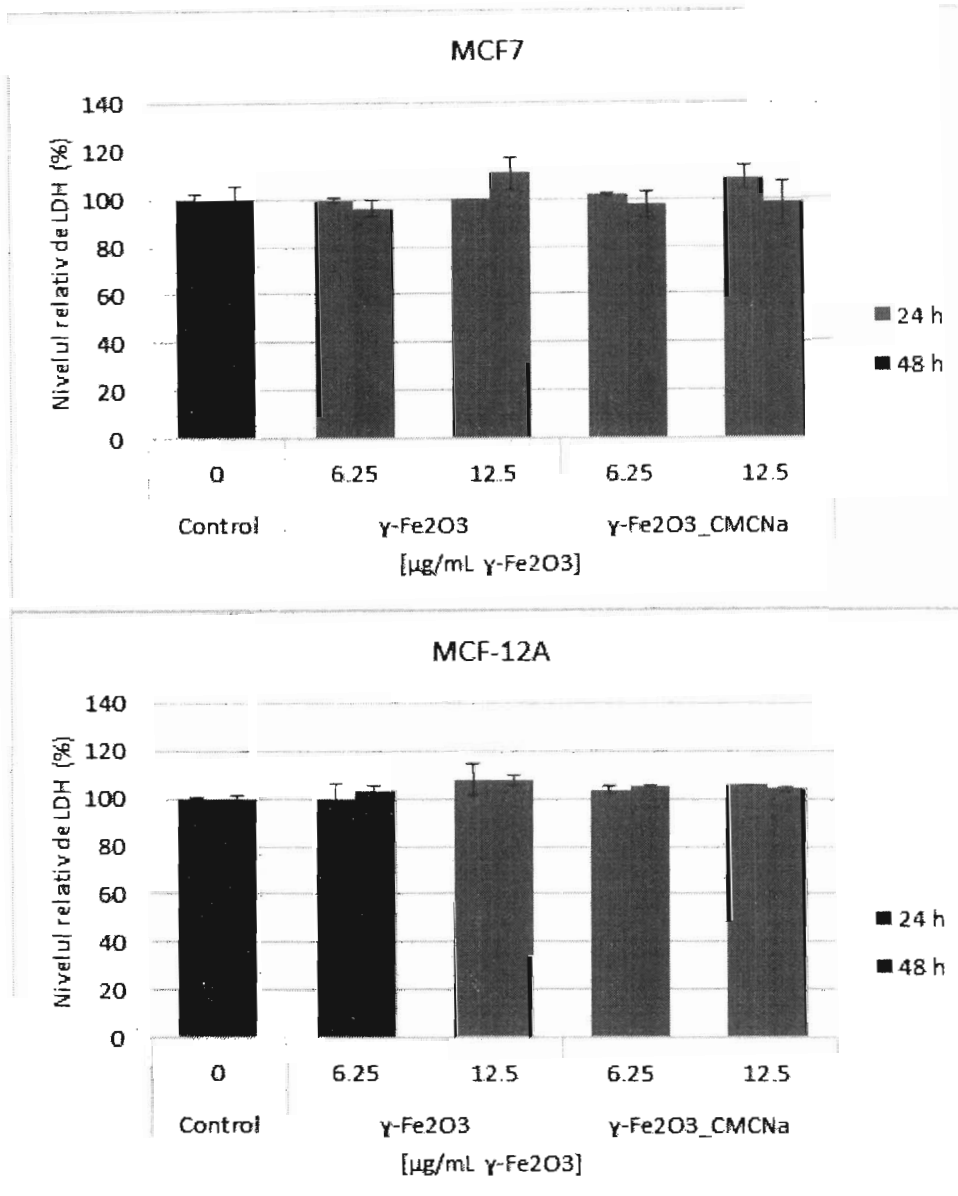




**Fig. 5.** Test MTT. Viabilitate pentru celulele MCF7 și MCF-12A după 24 și 48h incubare cu suspensiile realizate din  $\text{Fe}_x\text{O}_y$ -55W și  $\text{Fe}_x\text{O}_y$ -55W stabilizată cu CMCNa (mean  $\pm$  SD,  $n = 3$ ). Semnificația statistică a rezultatelor a fost notată cu (\*) după cum urmează: \* $p < 0.05$  (slab semnificativ); \*\* $p < 0.01$  (moderat semnificativ); \*\*\* $p < 0.001$  (foarte semnificativ)

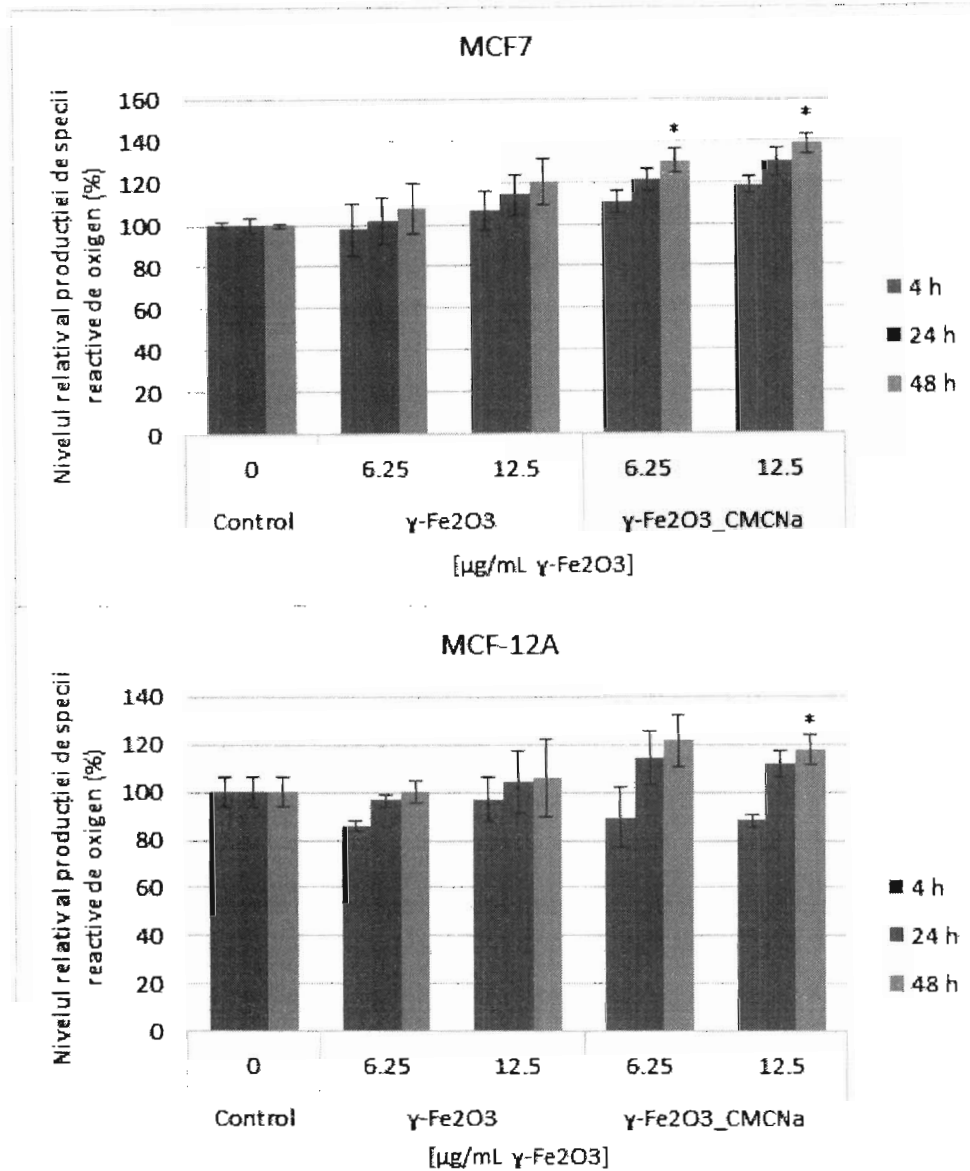


**Fig. 6.** Morfologia celulară (imagini în câmp luminos) și Live/Dead Staining (imagini fluorescență) pentru celulele MCF7 și MCF-12A după 24 și 48h de incubare la concentrațiile 12.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$   $\text{Fe}_x\text{O}_y$ -55W și  $\text{Fe}_x\text{O}_y$ -55W stabilizată cu CMCNa (scale bar pentru imaginile în câmp luminos = 20  $\mu\text{m}$ ; scale bar pentru imaginile în fluorescență = 100  $\mu\text{m}$ )

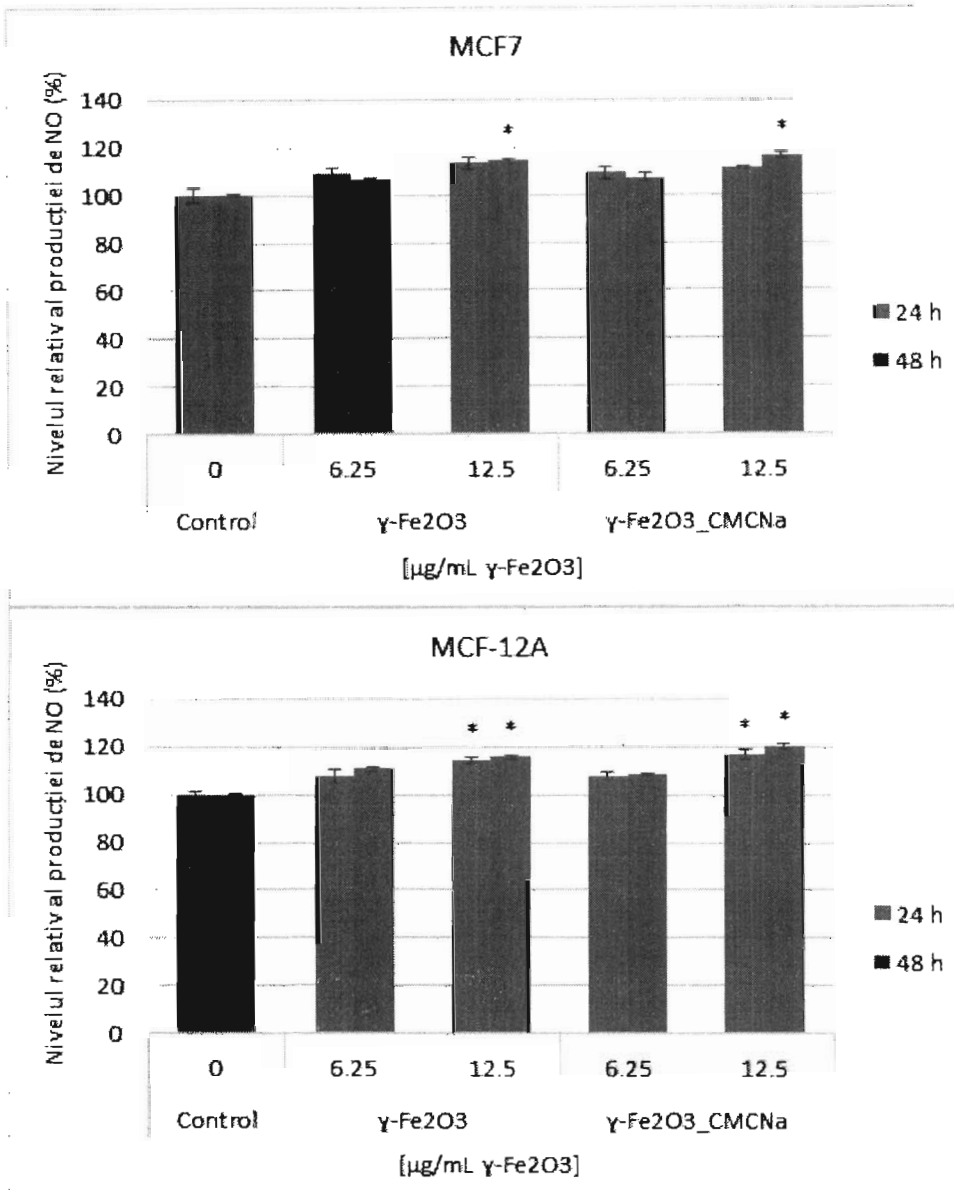


**Fig. 7.** Nivelul de LDH eliberat după deteriorarea membranei celulelor MCF7 și MCF-12A incubate cu suspensiile realizate din  $\text{Fe}_x\text{O}_y\text{-55W}$  și  $\text{Fe}_x\text{O}_y\text{-55W}$  stabilizată cu CMCNa pentru 24 și 48h (mean  $\pm$  SD,  $n = 3$ ). Semnificația statistică a rezultatelor a fost notată cu (\*) după cum urmează: \* $p < 0.05$  (slab semnificativ); \*\* $p < 0.01$  (moderat semnificativ).

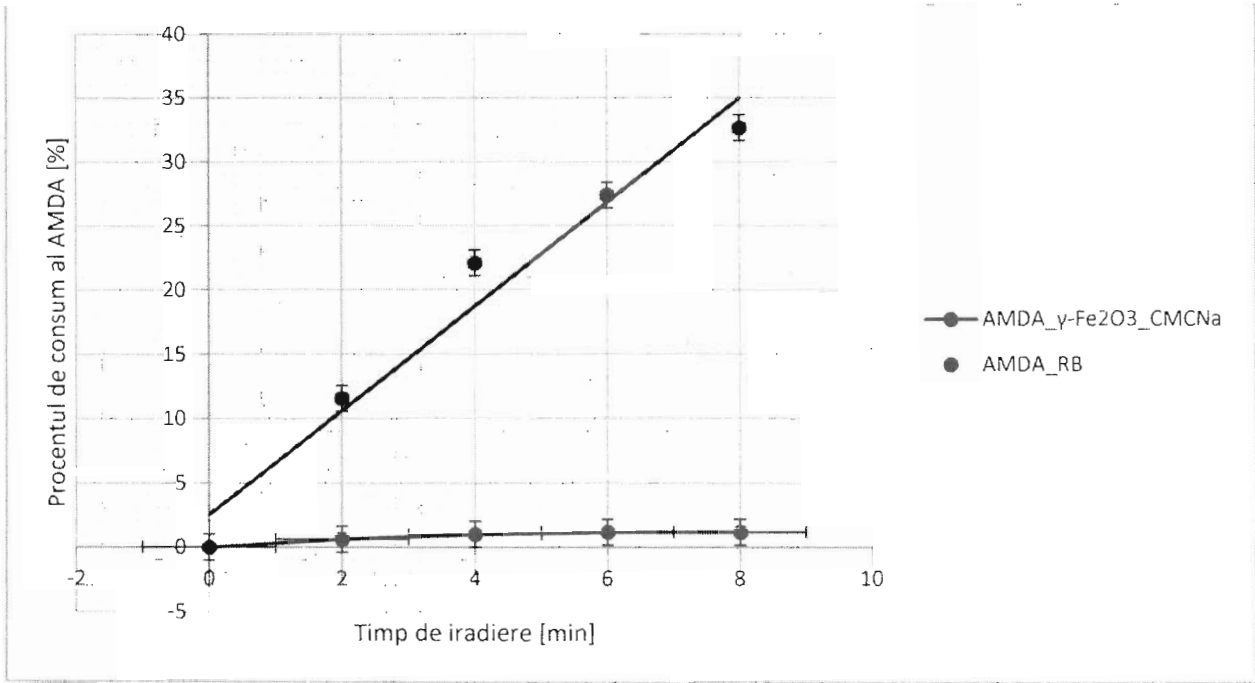




**Fig. 8.** Generarea de ROS in celulele MCF7 și MCF-12A după 4, 24, și 48h de incubare cu suspensiile realizate din  $\text{Fe}_x\text{O}_y$ -55W și  $\text{Fe}_x\text{O}_y$ -55W stabilizată cu CMCNa (mean  $\pm$  SD,  $n = 3$ ). Semnificația statistică a rezultatelor a fost notată cu (\*) după cum urmează: \* $p < 0.05$  (slab semnificativ); \*\* $p < 0.01$  (moderat semnificativ).



**Fig. 9.** Nivelul de NO eliberat in mediul de cultura al celulelor MCF7 și MCF-12A după 24 și 48 h de incubare cu suspensiile realizate din  $\text{Fe}_x\text{O}_y$ -55W și  $\text{Fe}_x\text{O}_y$ -55W stabilizată cu CMCNa (mean  $\pm$  SD,  $n = 3$ ). Semnificația statistică a rezultatelor a fost notată cu (\*) după cum urmează: \* $p < 0.05$  (slab semnificativ).



**Fig.10.** Procentajul de consum al AMDA în prezența suspensiei din  $Fe_xO_y$ -55W stabilizată cu CMCNa sau Roz bengal.

