

## **PLATFORME TERANOSTICE ANTITUMORALE PE BAZĂ DE CARBON DOTS ȘI MATRICE POLIMERICE**

Cod proiect: PN-III-P1-1.2-PCCDI-2017-0083

Contract finanțare: 37PCCDI/2018

Director proiect: Acad. Bogdan C. Simionescu

### **Raport de activitate științifică**

#### **Etapa I (2018)**

##### **(a) Rezumat**

Activitățile specifice etapei 2018 specifice celor 3 proiecte componente, au fost îndeplinite în totalitate. Astfel, în cadrul P1 au fost efectuate studii privind adaptarea experimentală a precursorilor de sinteză Carbon Dots imidici, fiind testate proceduri de pre-condiționare (purificare și recristalizare pentru asigurarea granulațiilor compatibile cu sistemul automat de dozare solide utilizat în proces). Studiile privind activitatea antitumorală a Carbon Dots imidici s-au concentrat în această etapă pe tipurile provenite din procesarea termică a precursorilor N-Hidroxiftalimidă, N-Hidroxisuccinimidă. Studiile efectuate cu ajutorul unei noi configurații experimentale au permis decelarea fazelor de proces, optimizarea acestora cât și stabilirea parametrilor pentru fiecare etapă în parte. În cadrul P2 experimentele efectuate pentru obținerea unor geluri cu acțiune anti-tumorală pe bază de Carbon Dots imidici au condus la selecția următorilor polimeri: alginat de sodiu, carboximetil celuloză, guanozină și acid poliacrilic reticulat. Proprietățile biocompatibile, mucoadezive și biodegradabile ale polimerilor selectați permit utilizarea în domeniul biomedical. În cadrul ambelor proiecte au fost evaluate acțiunile biologice pentru formulările de Carbon Dots imidici (P1) în culturi celulare 2D și 3D și respectiv a versiunii inclusă în gel (P2). A fost evaluat domeniul de concentrații, între efect toxic și respectiv impact minimum detectabil în mai multe linii de celule umane nontumorale stabilindu-se o valoare de 50 ug/ml (5%) este corespunzătoare interesului farmacologic, pentru Carbon Dots din NHF și NHS. A fost evaluat impactul asupra unor linii de cancer cu caracteristici diverse biochimice lezionale și histologice (reprezentative pentru neoplasme umane ținta extensivă de interes clinic și de cercetare : sân, pulmonare, glioblastom, colon etc). S-a constatat o afectare diferențiată, atât citotoxică cât și de profil de dezvoltare a diverselor tumori in vitro. Gradul de proliferare, fracția de suicid apoptotic, cât și activitatea metabolică (parametri importanți de agresivitate a cancerului) au fost modulate în proporții diferite, aparent în legătură cu profilul celular al cancerului. În cadrul proiectului P2 au fost concepute sistemele de culturi celulare critice pentru evaluarea nanoformulelor gelificate. În cadrul P3 s-au stabilit în detaliu toate fazele de proces precum și cele suplimentare (pregătirea reactorului de sinteză, evacuarea dispersiei de Carbon Dots, eliminarea inter-șarje a reziduurilor rezultate din procesul pirolitic etc). A fost proiectată instalația la scară micro-pilot de obținere Carbon Dots imidici, a elementelor de automatizare și interfațare.

## **(b) Descriere științifică și tehnică**

### **Proiect component: 1 (P1)**

**Activitate 1.1** - *Studii privind adaptarea experimentală a precursorilor de sinteză la cerințele specifice utilizării în domeniul biomedical (purificare avansată, sterilizare etc.)*

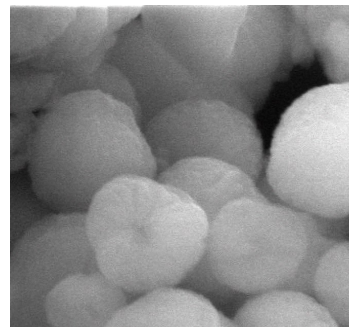
Procesul de obținere a nanostructurilor de tip Carbon Dots imidici utilizabile ca platforme teranostice anti-tumorale implică utilizarea unor compuși organici imidici ( N-Hidroxiftalimida NHF, N-Hidroxisuccinimida NHS, Succinimida SI, Maleimida MI, N-Hidroxinaftalimida NHN) disponibili comercial. Pentru utilizarea acestora ca precursori de sinteză a Carbon Dots destinați aplicațiilor biomedicale sunt necesare o serie de pre-condiționari (purificare și recristalizare pentru asigurarea granulațiilor compatibile cu sistemul automat de dozare solide utilizat în proces. Toți compușii imidici menționați mai sus sunt disponibil comercial la un nivel de puritate de 98-99%. NHF și NHN prezintă o solubilitate redusă în apă și se prezintă sub forma unor pulberi cu granulație uniformă. NHS, SI și MI sunt higroscopice și prin urmare au tendința de aglomerare datorită retenției de apă, ceea ce crează dificultăți la dozarea automată a precursorilor în micro-reactorul de procesare pirolitică.

**Activitate 1.2** - *Prepararea Carbon Dots din precursori imidici (NHS, NHF, SI); caracterizare fizico-chimică; optimizare structurală și optimizare parametri de sinteză;*

Studiile privind activitatea antitumorală a Carbon Dots imidici s-au concentrat în această etapă pe tipurile provenite din procesarea termică a precursorilor N-Hidroxiftalimida (NHF), N-Hidroxisuccinimida (NHS) și Succinimida (SI). Utilizarea Carbon Dots imidici ca platforme teranostice de investigare și tratament antitumoral implică obținerea acestora în condiții de reproductibilitate ridicată a procesului pirolitic, capabil să producă nanostructuri de tip Carbon Dots cu caracteristici fizico-chimice identice de la o șarjă la alta. Procesul de descompunere termică a precursorilor este discontinuu, fiind necesară conceperea unei configurații experimentale care să permită o bună reproductibilitate a proceselor implicate în obținerea Carbon Dots imidici. Studiile anterioare efectuate de către membri ai colectivului de cercetare [1,2,3] au evidențiat atât caracteristicile morfo-structurale pentru nanostructurile de tip Carbon Dots imidici proveniți din procesarea pirolitică a precursorilor menționați anterior cât și o abordare experimentală inițială pentru prepararea acestora. Pentru utilizarea acestora în domeniul medical ca platforme teranostice antitumorale este necesară utilizarea unei configurații experimentale care să permită atât reproductibilitatea ridicată a caracteristicilor morfo-structurale ale Carbon Dots de la o șarjă la alta cât și automatizarea procesului și asigurarea cerințelor de conținut microbiologic specifice. Studiile efectuate cu ajutorul acestei noi configurații experimentale au permis decelarea fazelor de proces, optimizarea acestora cât și stabilirea parametrilor pentru fiecare etapă în parte. Au fost evidențiate o

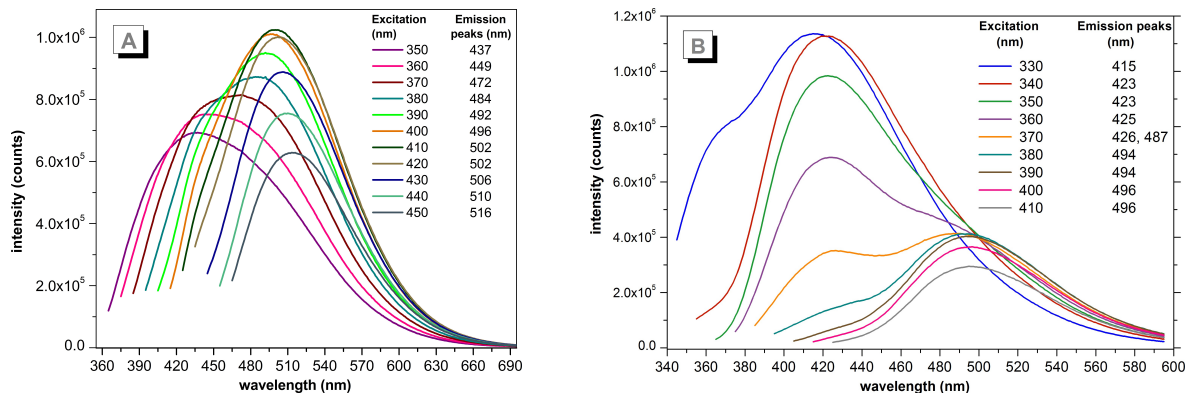
serie de aspecte interesante privind stabilirea parametrilor de lucru. Configurația experimentală rezultată în urma studiilor efectuate permite obținerea de Carbon Dots imidici cu o reproductibilitate ridicată de la o sarjă la alta.

În **Figura 1** este prezentată o imagine SEM a pulberii de Carbon Dots obținute după liofilizare, fiind confirmate observațiile anterioare privind tendința de aglomerare a acestora. După redispersarea acestora în apă, în vederea utilizării, se observă desfacerea agregatelor, obținându-se o bună dispersie a acestora, soluția obținută având un aspect limpede. Pentru evitarea aglomerării Carbon Dots în soluția utilizată pentru investigare/tratament



**Fig. 1.** Imagine SEM Carbon Dots pregătite pentru redispersie și utilizare

antitumoral, concentrația trebuie păstrată în limitele 1-1,5 mg/mL H<sub>2</sub>O. În **Figura 2** (a,b) sunt prezentate spectrele de emisie fluorescentă înregistrate pentru Carbon Dots preparate din NHS, respectiv NHF. Spectrele înregistrate evidențiază dependența peak-urilor de emisie de lungimea de undă a radiației de excitare, aceasta fiind o caracteristică tipică a Carbon Dots. Proprietățile de luminescență ale Carbon Dots sunt în principal bazate pe relaxările radiative ale stărilor excitate apărute în/între grupările funcționale localizate la suprafața acestora, caracteristicile dimensionale având o influență limitată sau un rol indirect în obținerea proprietăților de luminescență.



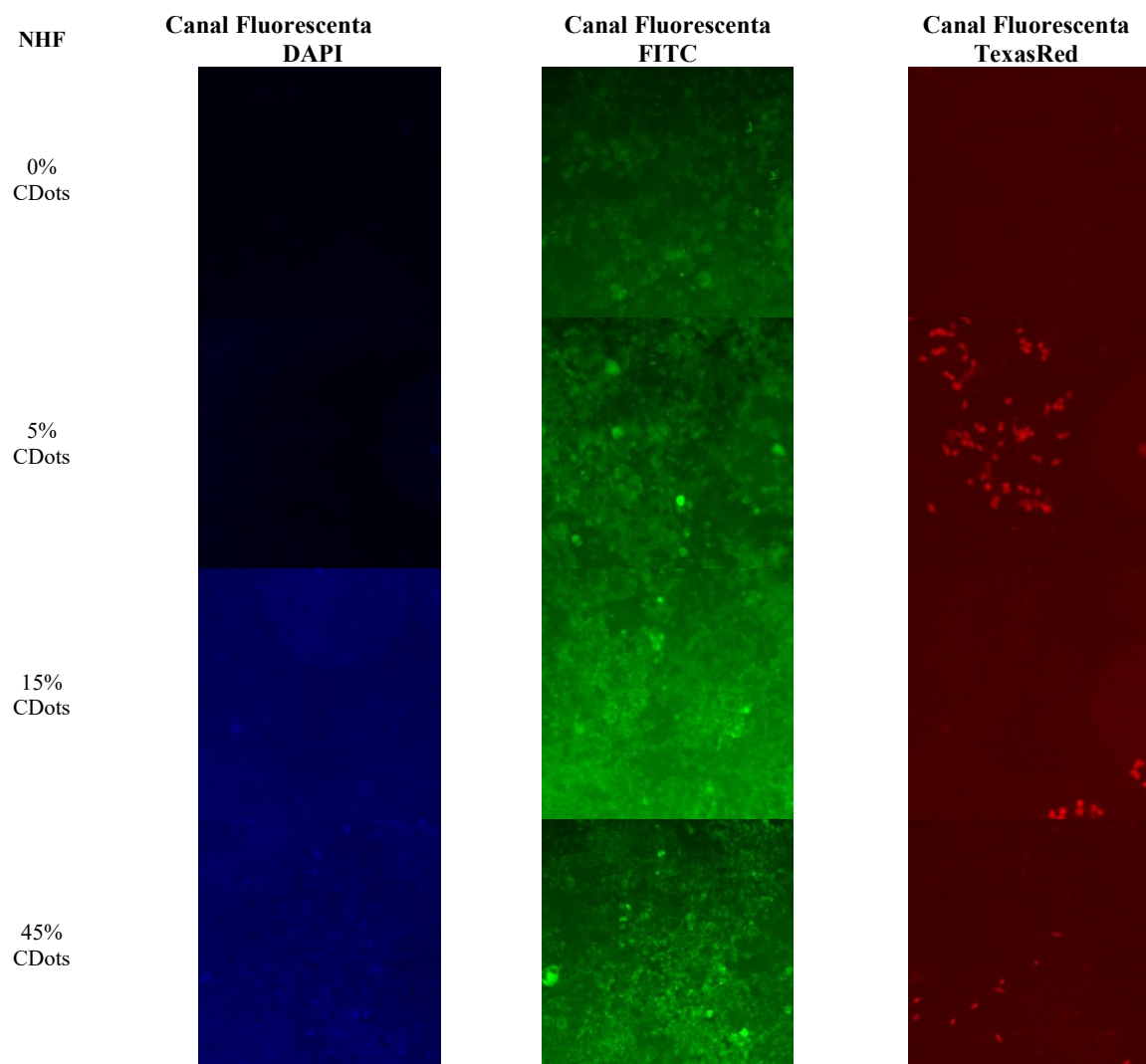
**Fig. 2.** Spectrele de emisie fluorescentă înregistrate pentru Carbon Dots preparate din (a) NHS, (b) NHF

Pentru aplicația vizată sunt de interes valorile înregistrate pentru dispersiile în H<sub>2</sub>O. Studiile experimentale preliminare au condus la obținerea unei valori de 14,22% în cazul Carbon Dots preparate din NHS, respectiv 27,8% pentru cele preparate din NHF. Studiile experimentale efectuate în această etapă au permis creșterea acestora la 20,06% în cazul Carbon Dots preparate din NHS, respectiv 34,2% în cazul celor preparate din NHF. Creșterea randamentelor cuantice de emisie a fost posibilă atât prin optimizarea parametrilor procesului pirolitic cât și prin introducerea

în procesul de obținere, a etapei de răcire bruscă a masei de reacție la sfârșitul etapei de piroliză. Cu instalația realizată la scară de laborator a fost urmată procedura de preparare a Carbon Dots imidici utilizați în activitățile de testare anti-tumorale, precursorii de sinteză purificați și conditionați conform Activității 1 au fost procesați pirolitic în instalația de preparare Carbon Dots imidici. Pentru fiecare testare au fost preparate câte 10 șarje, obținându-se în final cca. 10 g Carbon Dots uscate, șarjele fiind amestecate pe loturi de câte 10. Fiecare lot de Carbon Dots preparate din NHS sau NHF a fost analizat fizico-chimic cu ajutorul următoarelor tehnici de investigare: EDX, FT-IR, SEM, Spectroscopie de Fluorescență (steady state și PLQY absolut). Suplimentar au fost efectuate analize XPS, Spectroscopie Raman și HR-TEM pentru obținerea unor informații aprofundate legate de configurația morfo-structurală necesare pentru desprinderea unor concluzii legate de mecanismul de acțiune anti-tumorală diferențiat în funcție de tipul de Carbon Dots utilizate (preparate din NHS și NHF).

**Activitate 1.3** – *Evaluarea in vitro pe liniile celulare selectate a emisiei fotoluminescente a platformelor teranostice pe bază de Carbon Dots imidici în vederea stabilirii protocolului de diagnostic*

În prima etapă din cadrul acestei activități de evaluare *in vitro* a emisiei fotoluminescente am demarat seria de validări ale proprietăților fotoluminiscente (activitate fluorocromică) – în paralel cu măsurarea comportamentului principal vizat de grant, și anume, a acțiunii citolitice. Am constatat o importantă activitate citolică (citoinhibitorie/citomodulatoare) diferențiată pentru formulările chimice ale acestei etape, și existența unui potențial de reporter molecular de tip fluorocromic promițător (**Figura 3**). Pentru ambele nanoconjugate (NHF și respectiv NHS) am identificat performanțe utile, chiar dacă la limita de detecție prin metodologii standard (microscopie de fluorescență convențională – platforma microscopică Zeiss Observer Z1), și în raport cu dozele citoinhibitorii utile biologic. Avem convingerea că, în aceste condiții ar merita evaluată proprietatea de fotoactivare (intrinsecă multor fluorocromi) ca obiectiv suplimentar (neprevăzut) în propunerea de grant. Putem să formulăm pentru partenerul coordonator sugestia de a optimiza sintezele pentru variante derivate cu activitate fluorocromică (fotoluminescența) de 3-5x mai intensă. Adicional credem că, în condițiile cuplajului la un vector molecular relevant (capabil să asigure concentrație spațială locală mare) chiar și speciile moleculare testate în această etapă ar putea practic fi exploatate ca marcaj de fluorescență. Detectarea CDots prin emisia nativă a fotoluminescenței nu este o caracteristică esențială a efectelor biologice ale CDots întrucât ca orice substanță nu poate fi introdusă în clinică în cantitate arbitrar și fără efecte adverse. De aceea, am considerat că este mai important să ne axăm în această fază (2018) pe investigarea efectelor antitumorale ale acestor tipuri de nanostructuri în doze care să aibă efecte adverse minime.



**Fig. 3.** Efectul de fluorocrom intrinsec al nanconjugatului NHF în fâșii spectrale distincte (stânga: albastră-coresponendă fluorocromului standard DAPI; mijloc: verde – culoare tipic alocată pentru FITC, și respectiv dreapta roșu – tipic pentru fluorocromii înrudiți cu compusul TexasRED) este proporțional cu creșterea concentrației de nanoconjugat în supernatantului de cultură, pe termen scurt (20-minute incubare). Fotografii preluate după spălarea supernatantului în microscopie de fluorescență; x10, Zeiss Observer Z1.

Evidențierea prezenței CDots *in vivo* în diferite organe va fi posibilă și prin complexarea CDots cu diferiți compuși cu Gadolinium. Parametrul biologic în vederea stabilirii protocolului de diagnostic măsurat ca indicator de efect biologic al CDots (NHF și NHS) a fost viabilitatea celulară pe multiple linii reprezentative umane normale și tumorale precum și o linie murină mamară corespondentă cu linie mamară tumorală umană, în vederea perspectivei de testare a efectelor antitumorale pe model animal (**Tabel 1**). Viabilitatea celulară a fost măsurată prin 2 metode: MTT (măsurare prin absorbantă) și Promega (măsurare prin fluorescență). MTT este un indicator de nivel de activitate metabolică celulară; cel de-al doilea test evaluează capacitatea celulelor vii de a

converti de la forma nefluorescentă (resazurin) la forma fluorescentă (resorufin) un indicator redox, capacitate care este pierdută în cazul celulelor moarte.

**Tabel 1.** Efectul C-Dots cu NHF și NHS în diferite tipuri celulare

Tip de celule	Tip de C-Dots	
	NHF	NHS
MDA-MB231 (Human breast adenocarcinoma)	++	+
A549 (Lung carcinoma)	++	+
A375 (Human malignant melanoma)	++	-
RPMI8226 (Plasmacytoma; Myeloma)	++	-
HT29 (Colorectal adenocarcinoma)	-	++
4T1 (Mouse breast cancer)	-	++
L363 (Human malignant melanoma)	-	++
U87 (Glioblastoma astrocytoma - human brain)	-	-
HMLE (Human mammary epithelial cells)	-	-

Scorizarea cu ++, + și - reprezintă: ++ $p < 0.005$ , + $p < 0.05$ , - fara efect

Condițiile de testare au respectat protocolul standard - culturi celulare aderente și în suspensie, în faza de proliferare logaritmică inițiate la 2000 celule per godeu în plăci de 96 godeuri utilizând medii de cultură specifice fiecărei linii celulare; au fost coincubate pentru 72 ore cu doze diferite de CDots în spectrul biologic relevant de concentrații. Observațiile microscopice intercurente pe culturile testate au sugerat că impactul maxim de eficiență nu este în primele ore de coincubare, ci devine vizibil citologic după 48 ore de la administrarea CDots. Având în vedere atât selecția curentă de linii celulare reprezentative dar și utilizarea a două metode complementare de viabilitate în evaluarea noastră prezentăm datele de măsurare scorizate (**Tabel 1**). Parcurgerea tabelului ne indică în primul rând diferențe de sensibilitate între diversele tipuri de linii celulare sub acțiunea celor două tipuri de CDots (NHF și NHS), ceea ce sugerează structuralitate de interacție biologică distinctă (realitate foarte promițătoare pentru dezvoltarea cercetării acestor structuri). În al doilea rând constatăm diferențe de impact între cele 2 formulări chimice de CDots. În ansamblu, considerăm ca efectele CDots sunt realizate prin mecanisme biochimice multiple și diferite reprezentate în mod diferențiat în variate tipuri diagnostice de malignitate. Astfel, pentru fiecare linie celulară în parte am măsurat și comparat semnalele de absorbantă/ fluorescență pentru metaboliți standardizați ca indicator *bona fide* a viabilității la cele două condiții: populația de celule supuse doar solventului (PBS) versus expuse concentrației nominale de nano compus CDot. În concluzie, prin rezultatele obținute am îndeplinit toți indicatorii acestei etape și avem toate argumentele pentru a aprofunda acest plan de cercetare în configurația propusă inițial, trecând la următoarele faze de investigare a potențialului de interacțiuni biologice ale CDots.

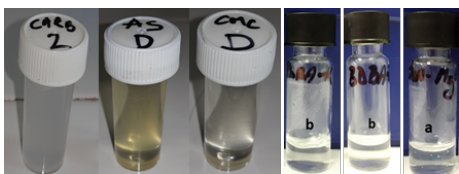
## Proiect component: 2 (P2)

**Activitate 1.4** - *Selecția materialelor polimerice mucoadezive (polizaharide și/sau polimeri sintetici) și a metodelor de preparare pentru obținerea de bio-compozite de tip gel ce includ Carbon Dots imidici*

Hidrogelurile bazate pe polimerii naturali și sintetici reprezintă un domeniu de mare interes pentru o gamă largă de aplicații biomedicale, de la livrarea de medicamente până la ingineria tisulară, datorită proprietăților hidrofile și potențialul acestora de a fi biocompatibile. Cu toate acestea, astfel de geluri sunt adesea fragile, opace și lipsite de capacitatea de auto-vindecare, limitându-se astfel foarte mult aplicarea lor în diverse domenii biomedicale. În cadrul acestei activități s-a urmărit tatonarea unei game variate de polimeri naturali (polizaharide) în vederea obținerii de bio-compozite de tip gel. Lucrând cu organismul uman, selecția polimerilor s-a realizat având în vedere necesitatea de fi îndeplinite anumite constrângeri, printre care biocompatibilitatea, lipsa de toxicitate, biodegradabilitatea acestea fiind esențiale. Acesta este motivul pentru care s-a optat pentru următoarele tipuri de polimeri naturali : chitosan, alginat de sodiu, carboximetil celuloză, xantan, gelan, caragenan, guanozina. Pentru a îmbunătăți biocompatibilitatea cât și proprietățile gelurilor și capacitatea sa de reținere a apei, o parte dintre acestea au fost realizate prin combinarea polimerilor naturali cu un polimer sintetic biocompatibil, respectiv un acid poliacrilic reticulat (numit și Carbomer Ultrez 10) utilizat frecvent ca și agent de stabilizare în diverse aplicații precum industria farmaceutică și cea cosmetică. De asemenea, hidrogelurile supramoleculare sunt o clasă nouă de materiale reticulate necovalent, reprezentând o îmbinare perfectă a avantajelor date de hidrogelurile sintetice și polimerii supramoleculari. În continuare în urma experimentelor preliminare de obținere a gelurilor au fost selectați următorii polimeri: *alginat de sodiu, carboximetil celuloză, guanozina și acid poliacrilic reticulat*. Proprietățile biocompatibile, mucoadezive și biodegradabile ale polimerilor enumerați anterior recomandă materialele bazate pe acestea pentru utilizarea în domeniul biomedical, în special în domeniul furnizării intracelulare a unor molecule de medicament.

**Activitate 1.5** - *Obținerea de biocompozite sub formă de geluri, caracterizarea morfo-structurală, emisie luminescentă și optimizarea parametrilor de preparare*

Au fost preparate o serie de geluri cu diferite concentrații având la bază alginat de sodiu (AS) sau carboximetil celuloză (CMC) și Carbomer Ultrez 10. Toate gelurile preparate au prezentat proprietăți de gel, fiind foarte vâscoase, respectiv acestea prezentând o culoare opalescentă în cazul utilizării **Carbomer**, gălbuie în cazul utilizării **AS** și transparente în cazul gelurilor **CMC**, **BDBA-K**, **BDBA-Ba**, **BDBA-Mg** (**Figura 4**). În urma testării proprietăților reologice ale materialelor obținute cele mai bune formulări au rezultat a fi **Carb-F2**, **AS-F5**, **CMC-F3** și **BDBA-Mg**, acestea fiind luate în considerare pentru încărcarea cu Carbon Dots preparate din *N-HidroxiŃtalimidă* obținută conform protocolului raportat de *Stan și colab*. Structura chimică a gelurilor a fost evidențiată prin metodă spectrală, respectiv prin spectroscopie Raman.



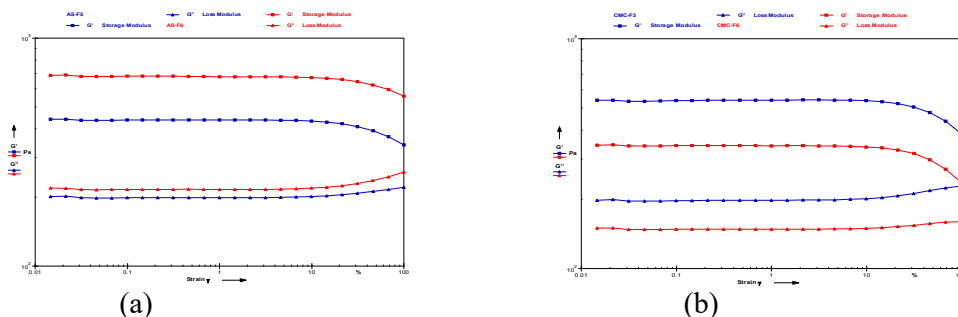
**Fig. 4.** Probe geluri Carb-F2, AS-F5, CMC-F3, BDBA-K, BDBA-Ba, BDBA-Mg

În spectre au fost regăsite benzile de absorbție specifice polimerilor Carb, AS, CMC, BDBA-Mg precum și benzi noi atribuite prezenței CDots și a noilor legături formate cu polimerii constituenți ai gelurilor. Compoziția chimică a gelurilor a fost analizată și prin intermediul analizei EDX (**Tabelul 3**). În cazul formulării AS-F6 sunt de remarcat diferențele dintre raportul atomilor de carbon și cei de oxigen, azot respectiv sodiu comparativ cu CMC-F6. Acest fapt se datorează diferențelor structurale ale polimerilor utilizați pentru prepararea gelurilor.

**Tab. 3.** Concentrațiile C, N, O înregistrate pentru probele AS-F6 și CMC-F6

Element	AS-F6		CMC-F6	
	Wt%	At%	Wt%	At%
<i>CK</i>	51,27	58,98	55,81	62,94
<i>NK</i>	01,60	01,58	01,66	01,61
<i>OK</i>	42,33	36,56	40,37	34,18
<i>NaK</i>	04,79	02,88	02,16	01,27

Proprietățile viscoelastice ale gelurilor preparate au fost evaluate în triplicat. Comportamentul mecanic al gelurilor a fost studiat utilizând măsurători oscilante (amplitudinea, respectiv frecvența). Temperatura a fost stabilită la 25<sup>0</sup> C în toate cazurile. Toate formulările analizate au prezentat caracteristici reologice de gel. Rezultatele obținute au evidențiat faptul că ambele module dinamice sunt constante cu un G' (modul de stocare) mai mare decât G'' (modul de pierdere) pe întregul domeniu de deformație de 0,01 ÷ 100% (**figura 5**), așadar putem concluziona că gelurile prezintă un comportament de tip solid.

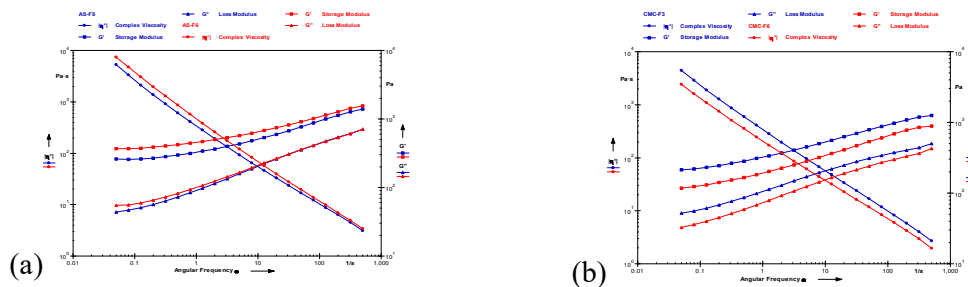


**Fig. 5.** Baleiaj de amplitudine pentru (a) AS-F5 ; AS-F6 și (b) CMC-F3 ; CMC-F6

De asemenea, rezultatele înregistrate au evidențiat faptul că CDots au o influență semnificativă asupra parametrilor reologici indicând valori mai mici ale modulului dinamic (**figura 5 a și b**) și ale limitelor domeniului viscoelastic liniar. În cazul gelurilor AS-F6, prezența CDots induce o ușoară creștere a modulelor dinamice care indică o rigiditate a structurii gelului, comparativ cu gelurile Carb-F4 și CMC-F6, unde efectul CDots a rezultat a fi exact opus. Testele de baleaj de frecvență accentuează răspunsul elastic al hidrogelurilor BDBA, care este ușor dependent

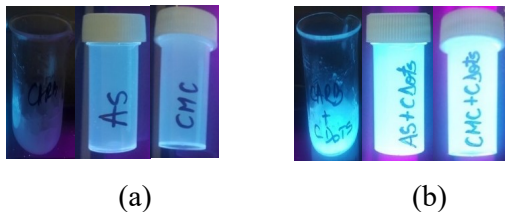


de frecvență pe întreg domeniul  $0,05 \div 500$  1/s. S-a constatat că hidrogelurile BDBA-Mg sunt mai rigide decât BDBA-K, deoarece  $Mg^{+2}$  este un reticulant eficient care îmbunătățește în mod semnificativ structura hidrogelului. Caracterul  $Mg^{+2}$  ca și reticulant este evidențiat prin valorile ridicate ale modulelor ( $G'$  și  $G''$ ) pentru hidrogelurile BDBA-Mg. Testele de baleiaj de amplitudine au permis determinarea limitelor domeniului vâscoelastic liniar pentru geluri. Putem afirma că aceste valori nu sunt afectate de prezența CDots respectiv formulările pe bază de Carb și CMC posedă o structură mai flexibilă comparativ cu cele pe bază de AS ( $\gamma LVE(CMC) > \gamma LVE(Carb) > \gamma LVE(AS)$ ). **Figura 6** prezintă testele de baleiaj de frecvență, aceasta permite evidențierea comportamentului elastic al gelurilor. Prezența legăturii de hidrogen este clar evidențiată de dependența de frecvență a modulelor pe întreaga gamă de  $0,05 \div 500$  1/s (figura 6).



**Fig. 6.** Baleiaj de frecvență pentru (a) AS-F5 ; AS-F6 și (b) CMC-F3 ; CMC-F6

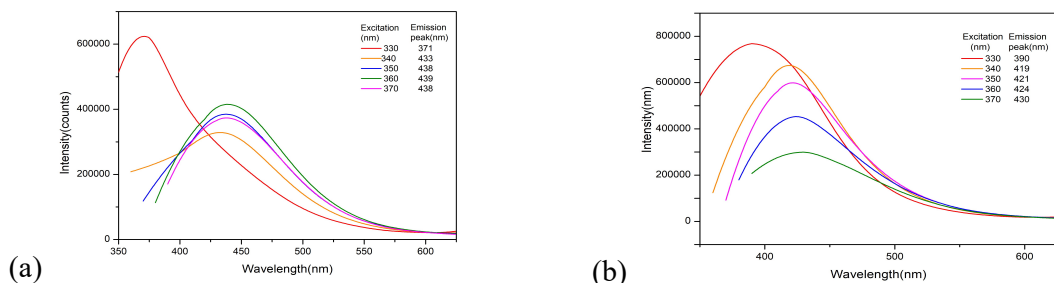
**Figura 7** prezintă fotografiile în ceea ce privește formulările încărcate cu CDots și anume Carb-F4, AS-F6, respectiv CMC-F6 excitate în UV la lungimea de undă 365 nm. În urma acestor imagini s-a observat vizual faptul că formularea CMC-F4 a prezentat o emisie mult mai puternică comparativ cu formulările Carb-F4 și AS-F6.



**Fig. 7.** Imagini cu privire la gelurile pe bază de Carb, AS, respectiv CMC, (a) fără și (b) cu Carbon Dots excitate în UV

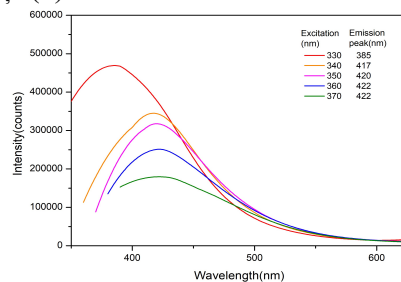
Detaliile furnizate de spectroscopia de fluorescență completează și validează rezultatele obținute la investigările morfo-structurale prezentate anterior. Pentru obținerea spectrelor de emisie, probele de bio-compozite polimerice preparate sub formă de geluri încărcate cu CDots, au fost analizate utilizându-se adaptorul de analiză în fază solidă a spectrofluorometrului Horiba Fluoromax 4P. **Figurile 8, 9** prezintă spectrele de emisie înregistrate la diferite lungimi de undă de excitație pentru Carb-F4, AS-F6, respectiv CMC-F6. Peak-urile de emisie se situează în intervalul 438 – 371 nm (Carb-F4), cel mai intens fiind localizat la 371 nm; 430 – 390 nm (AS-F6) cel mai intens fiind localizat la 390 nm, respectiv 385 – 422 nm (CMC-F6), cel mai intens fiind localizat la 385 nm

(excitare 330 nm). Deviația Stokes este de aproximativ 75 nm. În cazul gelurilor încărcate cu CDots s-a constatat o ușoară scădere a emisiei fotoluminescente comparativ cu suspensia neîncărcată.



**Fig. 8.** Spectrele de emisie înregistrate în intervalul de excitare 350–450 nm pentru probele (a) Carb-F4 și (b) AS-F6

În concluzie, s-au preparat geluri bazate pe carbomer, alginat de sodiu, carboximetil celuloză, respectiv guanozină și acid benzen-1,4-diboronic cu proprietăți fizice guvernate de prezența diferiților cationi, în care au fost încorporate carbon dots-uri. Biocompozitele preparate sub formă de geluri au fost caracterizate prin diferite tehnici de analiză precum spectroscopie Raman,



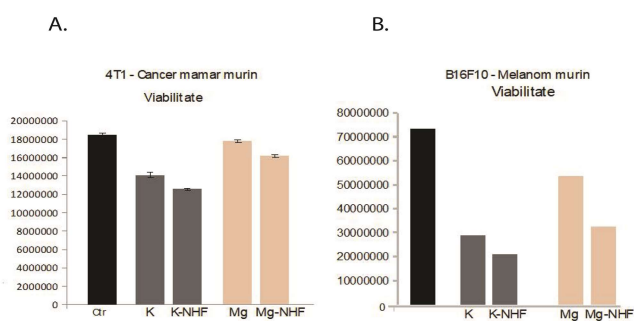
**Fig. 9.** Spectrele de emisie înregistrate în intervalul de excitare 350–450 nm pentru proba CMC-F6

spectroscopie de fluorescență, analiză EDX, teste reologice. Gelurile analizate au prezentat proprietăți și stabilități diferite în timp, dintre care **Carb-F4**, **AS-F6**, **CMC-F6**, respectiv **BDBA-K-CD5NHf** s-au dovedit a fi cele mai durabile din acest punct de vedere. Rezultatele obținute pentru testele de baleiaj de amplitudine permit afirmația că valorile domeniului vâscoelastic liniar nu au fost afectate de prezența CDots, respectiv formulările Carb-F4 și CMC-F6 posedă o structură mai flexibilă comparativ cu cele AS-F6. De asemenea, în cazul hidrogelurilor BDBA în urma testelor reologice s-a determinat influența cationilor  $K^+$ ,  $Mg^{+2}$  și a CDots asupra comportamentului reologic al acestora. S-a observat că hidrogelurile BDBA-Mg sunt mai rigide decât BDBA-K, care prezintă o structură mult mai flexibilă și stabilă. În urma analizei de spectroscopie de fluorescență realizată pentru gelurilor încărcate cu CDots s-a constatat o ușoară scădere a emisiei de lumină albastră comparativ cu suspensia de carbon dots.

**Activitate 1.6 - Evaluarea in vitro pe linii celulare selectate a emisiei luminescente a platformelor teranostice pe bază de C. Dots imidici în vederea stabilirii protocolului de diagnostic**

Comportamentul în gel al acestor nanoparticule ar putea să fie interesant pentru aplicații topice umane. Din gama de geluri chimic compatibile am testat formulările bazate pe geluri de K (cunoscute cu o toxicitate ușor mai ridicată) și acelea cu Mg, furnizate de partenerul Institutul de

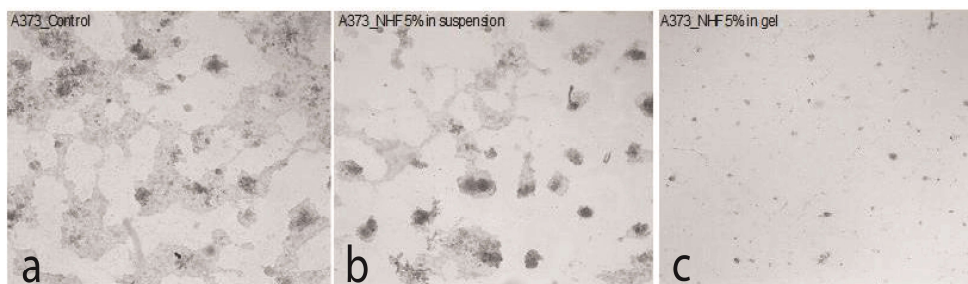
Chimie MacroMoleculara Petru Poni, adițional față de o formulare de gel comercial, deja optimizată pentru alte aplicații. Am testat gelurile în protocolul de sinteză curent al partenerului menționat (**Figura 10**) pe 2 linii agresive murine de cancer mamar (4T1, diagrama din stânga) și respectiv melanom murin (B16, diagrama din dreapta) în culturi 2D. Evaluarea viabilității a fost făcută la 72 de ore. În raport cu viabilitatea culturii de control (coloanele negre de lângă axe) constatăm ca gelul în sine produce efecte toxice, cu mult mai semnificative în cazul formulării pe bază de K, toxicitate care augmentează contribuția creată de particulele de tip NHF (5% pentru fiecare dintre situații). Prin urmare concluzia noastră la această etapă ar fi aceea că atât structura cât și alte aspecte ținând de formularea ambelor categorii de geluri necesită optimizare semnificativă pentru o eventuală utilizare în sens oncologic. Imaginile din **figura 10** cuprind măsurătorile în fluorescența a viabilității (Cell Titer-Blue Cell Viability Assay, Promega) care indică afectare semnificativă a liniei de melanom uman A375 (rezultat concordant cu evaluarea în 2D).



**Fig. 10.** Efectele gelurilor K și Mg asupra viabilității celulare în cancerul mamar murin (4T1 – fig. A.) și în melanomul murin (B16F10 – fig. B. cancer de piele)

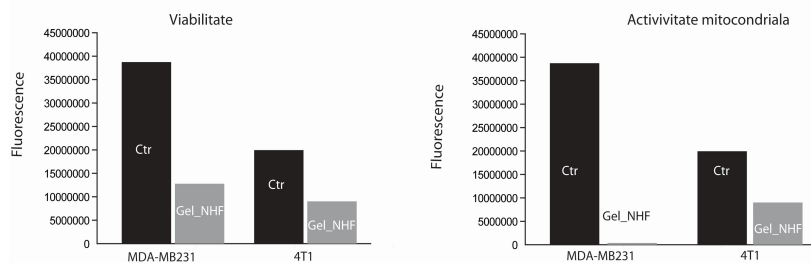
**Figura 11** indică imaginile morfologice de cultură 3D corespondente care relevă un impact detrimental semnificativ în condițiile culturii în gel în următorul construct experimental. Imaginea 11a reprezintă cultura 3D de control în matrigel, figura 11b - cultura 3D în matrigel cu administrare de NHF 5% în supernatantul de cultura, iar figura 11c - 3D în matrigel cu administrare 5% NHF înglobat în gel comercial. Linia celulară a acestei evaluări a fost A375 (melanom uman).

Impactul includerii în gel (comercial) a nanoparticulelor de tip NHF ne relevă o potențare a activităților toxice peste nivelul asigurat în cazul administrării în soluție.



**Fig. 11.** Efectele gelurilor cu NHF 5% în melanomul uman (A375), condiții de cultură diferite

Astfel atât viabilitatea (Cell Titer-Blue Cell Viability Assay, Promega) cât și activitatea mitocondrială (evaluare în fluorescență folosind MitoTracker Red, Molecular Probe) sunt diminuate mult mai intens – diagramele descriind liniile MDA-MB231 și 4T1.



**Fig. 12.** Efectul NHF 5% inclus în gel comercial asupra liniilor MDA-MB231 și 4T1 în evaluare de viabilitate (stânga) și de activitate mitocondrială (dreapta).

Magnitudinea de semnal de fluorescență în cultura în acest gel comercial (cu NHF) este diferită între cele 2 linii, chiar la cultura de control, deoarece aceste linii chiar au caracteristici biologice diferite. Explorarea în fluorescență a indicat rezultate similare.

În concluzie constatăm că identitatea tipului de gel folosit este într-adevăr importantă în ceea ce privește caracteristicile de cultură sub influența carbondots-urilor și protocolul de evaluare folosit de noi asigură sensibilitate de detecție a contribuției fiecărui ingredient implicat.

### Proiect component: 3 (P3)

#### **Activitate 1.7 - Identificarea etapelor de sinteză a CDots imidici și stabilirea parametrilor de lucru**

Conceptul instalației realizat experimental la scară de laborator în cadrul *Proiectului 1* a constituit baza de studiu pentru proiectul 3 și ulterior realizarea la nivel de micropilot a sistemului de obținere a Carbon Dots imidici utilizabili în aplicații medicale. Procesul de obținere Carbon Dots fiind unul discontinuu, a necesitat decelarea tuturor fazelor de lucru, a parametrilor specifici fiecărei etape în parte și optimizarea acestora. De asemenea studiile au vizat, alegerea unor variante care să poată oferi baza automatizării procesului. Este de menționat faptul că datorită domeniului țintă de aplicații este necesară menținerea în limite strânse a configurației fizico-chimice a Carbon Dots produși la fiecare șarjă în parte. Aceste cerințe pot fi satisfăcute prin stabilirea detaliată a tuturor fazelor procesului pirolitic, a celor suplimentare (pregătirea reactorului de sinteză, evacuarea dispersiei de Carbon Dots după finalizarea procesului, eliminarea inter-șarje a reziduurilor rezultate din procesul pirolitic etc). Configurația experimentală presupune pe lângă micro-reactorul de sinteză, sisteme de control temperatură, debit, dozare lichide și pulberi, sisteme de centrifugare și uscare la vid.

#### **Activitate 1.8 - Configurarea unui minireactor de procesare pirolitică a precursorilor imidici, identificarea soluțiilor tehnice de control a parametrilor de proces**

Soluția tehnică la care s-a ajuns în urma evaluărilor experimentale presupune utilizarea unui cuve de reacție confecționată din cuarț sau material ceramic datorită atât temperaturilor ridicate la care se

desfășoară secvența principală a procesului pirolitic cât și etapei de răcire bruscă a masei de reacție care presupune rezistența cuvei la șocuri termice repetate. Cuvă de reacție este dotată cu o serie de elemente de injecție/evacuare lichide. Mantaua micro-reactorului permite obținerea temperaturilor necesare fiecărei etape. Eliminarea reziduurilor după fiecare șarjă/curațarea minireactorului se realizează atât prin introducerea/evacuarea unor solvenți, procesul fiind asistat ultrasonic. Evacuarea dispersiei de Carbon Dots, eliminarea reziduurilor se realizează cu micropompe controlate digital. Introducerea/dozarea diverselor lichide pe parcursul procesului este realizată cu ajutorul unor micro-electrovalve controlate digital. Toate sistemele și dispozitivele vor fi controlate și interfațate cu un calculator dotat cu un software particularizat.

### **(c) Diseminarea rezultatelor**

Rezultatele obținute în cadrul Etapei I a proiectului au fost valorificate prin redactarea și trimiterea spre publicare a două lucrări, înregistrarea la O.S.I.M. a unei propuneri de brevet de invenție, respectiv prezentarea unei comunicări orale la manifestări științifice.

### **Lucrări ISI trimise spre publicare**

1. Corina Savin, Catalina A. Peptu\*, Corneliu S. Stan, Crina Tiron, Bogdan C. Simionescu, Maricel Danu, Carbon dots in carbomer gel - New composite with antitumoral activity, *Pharmacological Reports*.
2. Crina Tiron, Corneliu S. Stan\*, Adrian Tiron\*, Catalina A. Peptu, Florin E. Zugun, Bogdan C. Simionescu, Imide derived Carbon Dots – A New Promising Approach in Cancer Treatment, *Journal of Pharmaceutical Sciences*.

### **Propuneri brevet invenție înregistrate O.S.I.M.**

Corneliu S. Stan, Petronela Horlescu, Bogdan C. Simionescu, Cătălina A. Peptu, Sorin Ibănescu, Compuși Coordinativi ai Gd(III) și Mn(II) Utilizabili ca Precursori de Obținere a Nanostructurilor de Tip „Carbon Dots”, A/00704/21.09.2018.

### **Lucrări comunicate la manifestări științifice**

Adina Coroabă, Gabriela Pricope, Bogdan Craciun, Anca E. Chiriac, Mariana Pinteală, "Non-invasive techniques for the investigation of dermatological diseases", *First Balkan Conference on Medical Mycology and Mycotoxicology*, - Balkan Fungus 2018, September 13-15, 2018, Timișoara, România

### **(d) Prezentarea structurii ofertei de servicii de cercetare și tehnologice cu indicarea link-ului din platforma Erris**

Unul din obiectivele proiectului a fost diversificarea ofertei de servicii specializate de CDI oferite atât universităților și institutelor de cercetare cât și industriei și mediului economic. În acest sens, luând în calcul bugetul alocat pentru prima etapă de derulare a proiectului, toți partenerii din consorțiu au achiziționat echipamente necesare derulării în bune condiții a activităților proiectului. Astfel, *instituția coordonatoare* a achiziționat o centrifugă de laborator cu turație ridicată (15000 rpm) Hermle Labortechnik Z446 precum și o sferă de integrare tip Quanta FI necesară determinării randamentelor cuantice de emisie absolute și a parametrilor cromatici, un accesoriu important al

spectrometrului de fluorescență Horiba Jobin Yvon Fluoromax 4P existent în dotarea colectivului. *Partenerul P1* a îmbunătățit infrastructura colectivului prin achiziția unor calculatoare, a unei balanțe analitice și a unui agitator mecanic. *Partenerul P2* a achiziționat un modul de pretratare a probelor biologice, iar *Partenerul P3* a achiziționat un incubator cu CO<sub>2</sub>. Toate aceste echipamente au fost introduse în platforma ERRIS pe paginile corespunzătoare fiecărei instituții :

<https://erris.gov.ro/Centrul-de-Cercetare-POLIMER>

<https://erris.gov.ro/ICMPP>

<https://erris.gov.ro/INSTITUTUL-REGIONAL-DE-ONCOL>

<https://erris.gov.ro/INSTITUTUL-NATIONAL-DE-CERCE-31>

#### **(e) Locuri de muncă susținute prin program, inclusiv resursa umană nou angajată**

Derularea proiectului a permis angajarea cu normă întreagă a unui număr de 9 noi cercetători care lucrează cu normă întreagă în cadrul proiectului dintre care 3 cercetători au fost nominalizați în echipa proiectului din faza de propunere, iar 6 cercetători au ocupat pozițiile vacante prevăzute în contractul de cercetare. Alți 2 cercetători vor ocupa pozițiile vacante prevăzute de partenerul P1 începând cu luna ianuarie 2019.

#### **(f) Prezentarea valorificării/ îmbunătățirii competențelor/ resurselor existente la nivelul consorțiului (cecuri)**

Partenerii P1, P2 și P3 au avut prevăzute sume pentru valorificarea competențelor în domeniul lor de activitate. În acest sens, sumele au fost utilizate prin cecuri de tip A1, ținând cont de faptul că toate instituțiile din consorțiu sunt din Iași. Au fost astfel realizate o serie de analize în conformitate cu obiectivele proiectului și cu contractele încheiate între instituțiile implicate.

#### **Referințe**

[1] C. S. Stan\*, P. Horlescu, L. E. Ursu, M. Popa, C. Albu, Facile preparation of highly luminescent composites by polymer embedding of carbon dots derived from N-hydroxyphthalimide, Springer- J. of Material Science 52(1), pp. 185-196, 2017. doi 10.1007/s10853-016-0320-y.

[2] C. S. Stan\*, A. Coroaba, M. Popa, C. Albu, D. Sutiman, One step synthesis of fluorescent Carbon Dots through pyrolysis of N-hydroxysuccinimide, RSC-Journal of Materials Chemistry C 3, pp.789-795, doi: 10.1039/C4TC02382J, 2014.

[3] C. S. Stan, P. Horlescu, C. Albu, Fluorescent Carbon Dots Prepared Through Thermal Processing of Succinimide, Digest J. of Nanomaterials and Biostructures 11(1):133-139, 2016.

[4] A. Hellerbach, V. Schuster, A. Jansen, J. Sommer, MRI Phantoms – Are There Alternatives to Agar? PLoS ONE, 8(8): e70343. doi:10.1371/journal.pone.0070343, 2013

[5] A. Rotaru, G. Pricope, T.N. Plank, L. Clima, E.L. Ursu, M. Pinteala, J.T.Davis, M. Barboiu, Chemical Communications, 53, 12668-12671, 2017.