

UNIVERSITATEA “BABEȘ-BOLYAI” CLUJ-NAPOCA
FACULTATEA DE FIZICĂ
SPECIALIZAREA FIZICĂ MEDICALĂ

LUCRARE DE LICENȚĂ

Coordonatori științifici:
Prof. Dr. Simion Aștilean
Dr. Suărășan Sorina

Absolvent:
Ibrian Miruna Alexandra

Cluj-Napoca
2023

UNIVERSITATEA "BABEȘ-BOLYAI" CLUJ-NAPOCA
FACULTATEA DE FIZICĂ
SPECIALIZAREA FIZICĂ MEDICALĂ

LUCRARE DE LICENȚĂ

**ROLUL NANOPARTICULELOR DE AUR ANIZOTROPE ÎNCĂRCATE CU
DOXORUBICINĂ ÎN TERAPIA CANCERULUI**

Coordonatori științifici:

Prof. Dr. Aștilean Simion

Dr. Suărășan Sorina

Absolvent:

Ibrian Miruna Alexandra

Cluj-Napoca

2023

Cuprins

Capitolul I: Considerente teoretice	7
I.1 Nanoștiința și nanotehnologia.....	7
I.2 Nanoparticulele de aur	8
I.3 Proprietățile nanoparticulelor de aur.....	8
I.3.1 Rezonanța plasmonică localizată de suprafață.....	8
I.4 Terapia cancerului.....	12
Capitolul II: Tehnici și metode experimentale	15
II.1 Sinteza nanoparticulelor de aur anizotrope în prezența gelatinei	15
II.2 Caracterizarea nanoparticulelor de aur	15
II.2.1 Spectroscopia de absorbție UV-Vis-NIR.....	15
II.2.2 Microscopie electronică de transmisie (TEM).....	17
II.2.3 Împrăștierea dinamică a luminii (DLS)	17
II.2.4 Potențialul Zeta.....	18
Capitolul III: Formarea complexului nano-chimioterapeutic-fototermic pe baza nanotriunghiurilor de aur încărcate cu DOX	19
III.1 Studierea eliberării de doxorubicină.....	21
III.2 Investigarea eficienței de conversie a radiației laser în căldură	22
Concluzii și planuri de viitor	26
Anexe	27
Bibliografie	31

Abstract

This thesis investigates the development and characterization of gelatin-coated gold nanoparticles incorporating doxorubicin, which is an anticancer drug. The unique physicochemical properties and potential for targeted therapy are the reason why gold nanoparticles received a lot of attention in the medical field. Their utility for a wide range of biomedical applications comes from using gelatin as a reducing and stabilizing agent, which offers control over the size, shape and stability of the gold nanoparticles (AuNPs@gelatin), without using other toxic-reducing agents, in aqueous solution of tetrachloroauric acid (HAuCl_4). The gelatin biopolymer concentration (1%-2%), viscosity and temperature (80°C) are some of the factors that contribute to the formation of triangular and spherical nanoparticles. The attention of this study will be strictly on the gold nanotriangles (AuNTs) due to their localised surface plasmon resonance. The LSPR value is very important because it needs to be in resonance with the laser, which emits a wavelength of 785nm, in order to be used for chemotherapy and photo-thermal therapy that are combined in the treatment of cancer. The combination of the two types of cancer therapy have the potential of a beneficial outcome for the patient, with minimal side effects.

In this work doxorubicin was loaded to the surface of AuNPs@gelatin through a pH-sensitive hydrazine bond in order to create a new nano-chemotherapeutic-photothermal system AuNPs@gelatin-hyd-DOX, which was characterized using techniques such as UV-Vis-NIR spectroscopy, fluorescence spectroscopy, dynamic light scattering and zeta potential. The compound was tested in different media with pH : 7.4, 5.3, and 4.6 at a temperature of 37°C for 24h.

The use of photothermal therapy earned a lot of attention in the biomedical field due to the local hyperthermia resulted upon laser irradiation. Therefore the final purpose of this study is to study the combination of chemotherapy resulted from doxorubicin drug and photothermal therapy induced by triangular AuNPs irradiated by a 785 nm laser line. The compound AuNPs@gelatin-hyd-DOX incorporated in agarose-based biological phantoms and irradiated by a laser in resonance with AuNTs LSPR band show the release of the drug and temperature increase by $45,88^\circ\text{C}$ following a 15 minutes laser exposure.

Introducere

Dezvoltarea aplicațiilor și tratamentelor în nanomedicină reprezintă un domeniu în continuă evoluție ce pornește din dorința de a descoperi metode cât mai eficiente și minim invazive pentru combaterea afecțiunilor grave cu care oamenii se confruntă în viața de zi cu zi. Termenul de nanoparticulă are menirea de a descrie particulele ce au dimensiunea de 1-100nm și reprezintă o întreagă clasă de compuși cu diferite forme, funcții și caracteristici ce servesc la o multitudine de aplicații din domeniul medical și al cercetării. Importanța nanoparticulelor de aur va fi dezvoltată în acest studiu, astfel lucrarea prezentă “Rolul nanoparticulelor de aur anizotrope încărcate cu doxorubicină în terapia cancerului” are scopul de a explicita beneficiile combinației dintre chimioterapie și hipertermia locală în regiunea NIR. Aceasta poate fi realizată folosind nanoparticule de formă anizotropă cu răspuns plasmonic în regiunea spectrală NIR, încărcate cu medicamentul Doxorubicină (DOX).

Aplicabilitatea nanoparticulelor în domeniul medicinei se datorează capacității de transport țargetat și de funcționare ca agent de fluorescență în imagistica și diagnosticarea pacienților. Este posibilă sintetizarea nanoparticulelor de aur pentru a controla forma și dimensiunea acestora, astfel ele vor avea un interval larg de funcții pe care le pot îndeplini.

Tratamentele actuale pentru cancer precum chimioterapia, radioterapia și operația aduc odată cu ele un nivel anume de toxicitate și efecte adverse în urma interacțiunii cu tumorile și cu țesuturile ce le înconjoară. Din această cauză, descoperirea altor mijloace de tratare a acestei boli a fost și continuă să fie o necesitate, pentru a scădea toate efectele negative existente în procedurile uzuale.

Tratarea cancerului este o dorință continuă a omenirii, astfel terapia fototermică este din ce în ce mai studiată. Împletirea chimioterapiei și a celorlalte practici cu terapia fototermică (PTT) este posibilă datorită faptului că PTT folosește nanoparticulele de aur care, în contact cu țesuturile umane nu induc efecte adverse și nu sunt toxice. Desigur, fiecare tip de cancer necesită un tratament diferit, în funcție de cât de avansat și cât de în profunzime este, întrucât unele tipuri de cancer nu pot fi tratate prin operație, iar PTT nu poate fi folosită pentru metastaze.

Datorită nontoxicității nanoparticulelor de aur și a posibilității lor de a converti energie în căldură, producerea de hipertermie distruge celulele tumorale sub acțiunea laserului NIR. Folosirea laserului cu lungimea de undă de 785nm necesită ca nanoparticulele de aur să aibă un

Rolul nanoparticulelor de aur anizotrope încărcate cu doxorubicină în terapia cancerului răspuns plasmonic foarte apropiat de aceasta, astfel, prin încercarea mai multor sinteze, am găsit proba care are maximul de absorbție de 780 nm, ceea ce este foarte potrivit pentru studiul dorit.

Doxorubicina este un antibiotic derivat din bacteria *Streptomyces peucetius*. Aceasta a fost introdusă încă din 1960 și face parte din grupul de agenți chimioterapeutici antracicline. Doxorubicina se folosește pentru tratarea cancerului precum cel de sân, de vezică, ovare sau tiroidă. De asemenea se folosește atât pentru tratarea leucemiei limfoblastică și mieloblastică acută cât și pentru eliminarea celulelor mici de cancer de plămân.[1]

Statisticile recente indică faptul că îmbolnăvirea de cancer este a doua cauză globală de deces în rândul oamenilor, iar tratamentul cel mai întâlnit și eficient este chimioterapia care, din nefericire, aduce odată cu ea multe efecte adverse în corpul celui bolnav. Aceste efecte au dus la dorința de a se descoperi și alte tratamente pentru cancer care să afecteze mai puțin sau chiar deloc țesutul înconjurător.[2]

Lucrarea este clădită în trei capitole principale. Primul capitol este o prezentare generală pentru nanoparticulele de aur, respectiv istoria acestora, proprietățile optice ce le fac unice, la bază fiind LSPR-rezonanța plasmonică localizată de suprafață și proprietăți fizice și chimice ale acestora. Este prezentată și terapia fototermică (PTT), proces important în combaterea cancerului și care, fără implicarea nanoparticulelor de aur, nu ar fi posibilă.

Al doilea capitol este constituit din protocolul de sinteză al nanoparticulelor de aur necesar pentru obținerea AuNPs@gelatin cu un răspuns plasmonic apropiat de lungimea de undă a laserului folosit la PTT și modalitățile de caracterizare a proprietăților optice, precum spectroscopia de absorbție UV-Vis-NIR, împrăștierea dinamică a luminii(DLS) și potențialul Zeta.

Cel de-al treilea capitol se concentrează pe formarea amestecului nano-chimioterapeutic-fototermic AuNPs@gelatin-hyd-DOX, încărcarea DOX pe nanotriunghiurile de aur cu răspuns plasmonic în rezonanță cu laserul 785 nm, studierea procesului de eliberare controlată al doxorubicinei din compusul AuNPs@gelatin-hyd-DOX în medii cu pH diferit și emisia de fluorescență a medicamentului folosit sub acțiunea radiației luminoase.

Capitolul I: Considerente teoretice

I.1 Nanoștiința și nanotehnologia

Nanoștiința se poate defini drept știința care studiază moleculele, respectiv structurile foarte mici, de ordinul nanometrilor. Evoluția nanoștiinței a fost și este foarte importantă, mai ales în domeniul medical, unde descoperirile recente aduc progrese semnificative în rândul tratamentelor și a diagnosticării. Nano-oncologia este în continuă dezvoltare prin prisma funcționalizării nanoparticulelor cu medicamente anti-cancer pentru a reduce toxicitatea acestora, pe care o au în mod normal în formă liberă. Acest domeniu oferă posibilitatea de a studia elementele și structurile de la nivel macro la cel nano, iar un exemplu este culoarea pe care nanoparticulele de aur o prezintă. La nivel de nanoparticule, cele de dimensiune mai mare absorb lumina la un maxim de aproximativ 520 nm, rezultând culoarea roșie. [3]

Nanoparticulele de aur au fost introduse atât în rândul tratamentelor pentru combaterea cancerului, cât și în analizele imagistice. Multitudinea de funcții pe care acestea le dețin se datorează caracteristicilor acestora. Ele pot funcționa drept mecanism de transport pentru medicamente și agent de imagistică, având proprietăți fluorescente, astfel nanoparticulele de aur activează și în regiunea de diagnosticare, cât și de tratament. Gradul de reducere al toxicității este foarte mare, iar efectele secundare sunt minime, în comparație cu metodele convenționale care se folosesc de mai mulți ani.[4]

Nanotehnologia reprezintă manipularea și studierea materialelor la nivel atomic și molecular. Structurile ce pot fi considerate drept nano sunt cele cu mărimea între 1 și câteva sute de nanometri în cel puțin o dimensiune, iar tocmai din acest motiv acestea pot fi folosite în diferite contexte medicale cum ar fi transportul de medicamente. Această posibilitate de livrare a medicamentelor pe care ne-o oferă nanotehnologia este revoluționară pentru lumea medicinei. Prin intermediul acesteia se poate trece de anumite bariere, respectiv ajungerea medicamentelor direct la celule și la țesuturi mai adânci, transportul medicamentelor mai puțin sau deloc solubile și combinarea mai multor tipuri de terapii. Începuturile nanotehnologiei au fost încă din 1960, iar prima aplicație posibilă a fost în 1976. Mai multe sisteme pentru livrarea medicamentelor capabile să reziste la schimbările de pH din corpul uman au fost prezentate pentru prima dată în 1980. [5]

I.2 Nanoparticulele de aur

Interesul față de aur a fost sporit încă de la descoperirea acestuia, neputând trece neobservat datorită multitudinii de beneficii și caracteristici pe care le poartă. Încă din timpuri de mult trecute, aurul a fost folosit în vaste domenii, precum cea culinară, financiară și, mai târziu, în medicină. Aurul pur nu este toxic și nici iritant dacă este ingerat, iar faptul că acesta era asociat cu longevitatea, i-a făcut pe oameni să îl introducă în toate domeniile de interes ale societății. Proprietățile nanoparticulelor au fost introduse pentru prima dată prin prisma “paharului roșu” ce a apărut odată cu fabricarea sticlei în Mesopotamia, Egipt. Culoarea roșie a paharului era dată de către cuprul adăugat, ceea ce necesită o atmosferă redusă ce rezultă în raritatea acestei sticle. [6]

I.3 Proprietățile nanoparticulelor de aur

Diferitele metode de sintetizare, posibilitatea de a modifica suprafața, capacitatea de a focusa proprietățile optice și de a fi biofuncționalizate sunt beneficiile pe care nanoparticulele de aur le dețin și datorită cărora au fost introduse în domeniul de tratare al cancerului. [7]

I.3.1 Rezonanța plasmonică localizată de suprafață

Nanoparticulele de aur reprezintă candidatul ideal în ceea ce privește nanomedicina datorită multitudinii de caracteristici utile pentru acest domeniu. Acestea prezintă o stabilitate atât fizică, cât și chimică, respectiv biofuncționalizarea lor cu anumite medicamente și proprietățile optice-plasmonii de suprafață (SP-Surface Plasmon).

Termenul de plasmon descrie mișcarea de oscilație a colectivului de electroni liberi în urma excitației cu radiație luminoasă, spre exemplu laserul.

SP este reprezentată de o bandă de absorbție ce este prezentă atunci când frecvența fotonului incident se află în rezonanță cu oscilația colectivă a electronilor din banda de conducție. Fenomenul se produce de regulă la suprafața metalului, fapt datorat pătrunderii în interior a unei electromagnetice ce reduce perturbația și se numește rezonanță plasmonică de suprafață (Surface Plasmon Resonance-SPR). Un alt efect al interacțiunii cu unda electromagnetică este rezonanța plasmonică localizată de suprafață (LSPR) ce are loc în nanoparticule, respectiv în volume mici, în dimensiuni comparabile cu lungimea de undă a razei incidente. Datorită LSPR, câmpul electromagnetic ce înconjoară nanoparticula de aur va fi amplificat, iar în regiunile cu o curbură locală mai mare, acesta va avea un ordin de mărime și mai ridicat. [8]

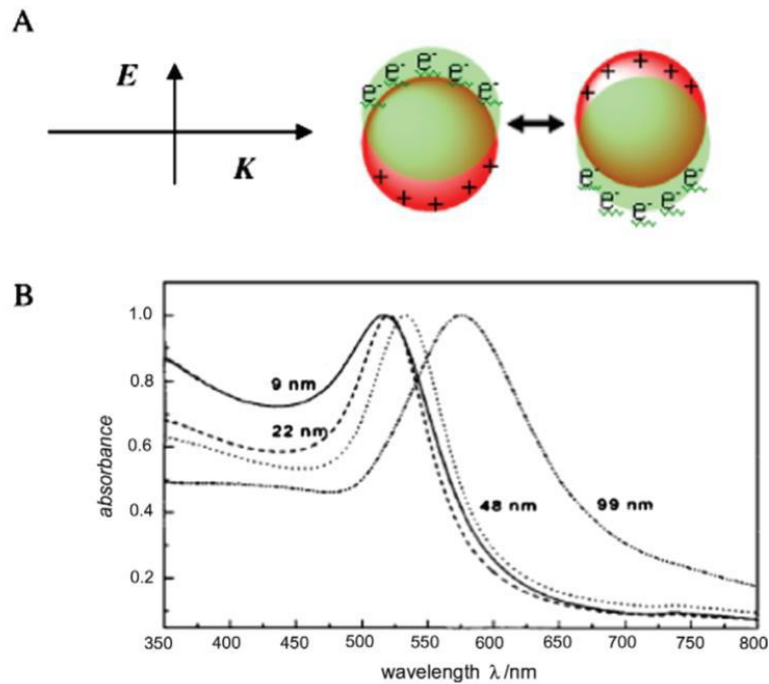


Figura I.1 (A). Reprezentare schematică a rezonanței plasmonice de suprafață în nanoparticulele plasmonice. (B). Spectrul de extincție ale AuNPs de dimensiuni diferite. Câmpul electric al radiației incidente induce oscilații colective [7]

În aplicațiile biomedicale în care se folosesc nanoparticulele de aur, dimensiunea acestora este un factor extrem de important. Astfel, cele mai mari se folosesc în domeniul imagisticii, având o eficiență mai mare în cazul împrăștierei luminii, iar cele cu mărime mai redusă sunt preferate pentru terapia fototermică, datorită procesului dominant de conversie al luminii în căldură.[7]

Rezonanța plasmonică localizată de suprafață (LSPR) în cazul nanoparticulelor de aur sintetizate, respectiv nanosfere și nanotriunghiuri, se prezintă printr-o rezonanță dipolară longitudinală pentru primele, aflată în jurul valorii de 550 nm, iar pentru cele din urmă corespunde o rezonanță dipolară transversală, în NIR, de aici rezultând cele două benzi din spectroscopia UV-Vis-NIR.[9]

Nanoparticulele de aur care prezintă un răspuns LSPR aflat în regiunea NIR, respectiv 650-900nm, constituie un ideal pentru aplicațiile dezvoltate în nanomedicină. Cele care se încadrează în această categorie sunt acelea cu geometrie mai complexă, cum ar fi: nanoshell, nanocage, nanorod sau nanotriunghiuri. Rezonanța plasmonică localizată de suprafață (LSPR) a nanotriunghiurilor prezintă un răspuns aflat într-un interval cuprins între Vizibil și NIR și poate fi

Prin abilitatea de a schimba forma, dimensiunea și compoziția nanoparticulelor de aur, se pot induce anumite efecte și modificări la nivelul proprietăților lor optice, astfel se pot obține îmbunătățiri ale secțiunilor transversale de absorbție și împrăștiere. [12]

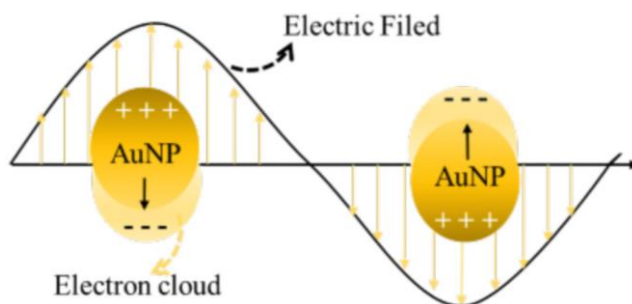


Fig. I.2 Rezonanța plasmonică localizată de suprafață [8]

Dimensiunea și forma AuNPs reprezintă factorii principali în discuția despre proprietățile intrinseci ale nanoparticulelor. Lungimea de undă a răspunsului plasmonic depinde în mod direct de dimensiunea nanoparticulelor.

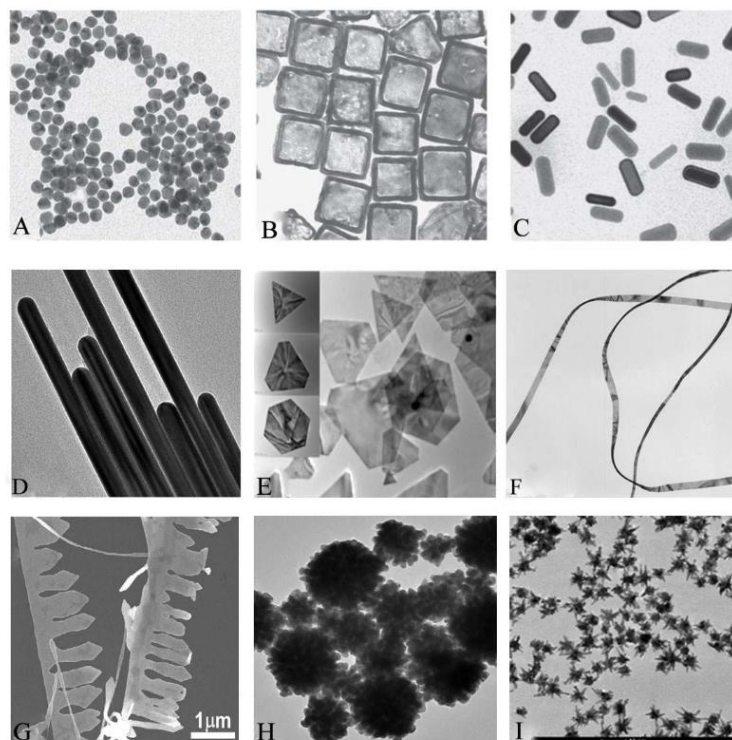


Fig. I.3 Imagini obținute cu TEM a diferitelor forme ale AuNPs sintetizate prin diferite metode, astfel A-nanosfere; B-nanocage; C-nanorod; D-nanowire; E-nanoplate; F-nanobelt; G-nanocomb; H-nanoflower; I-nanostar; [12]

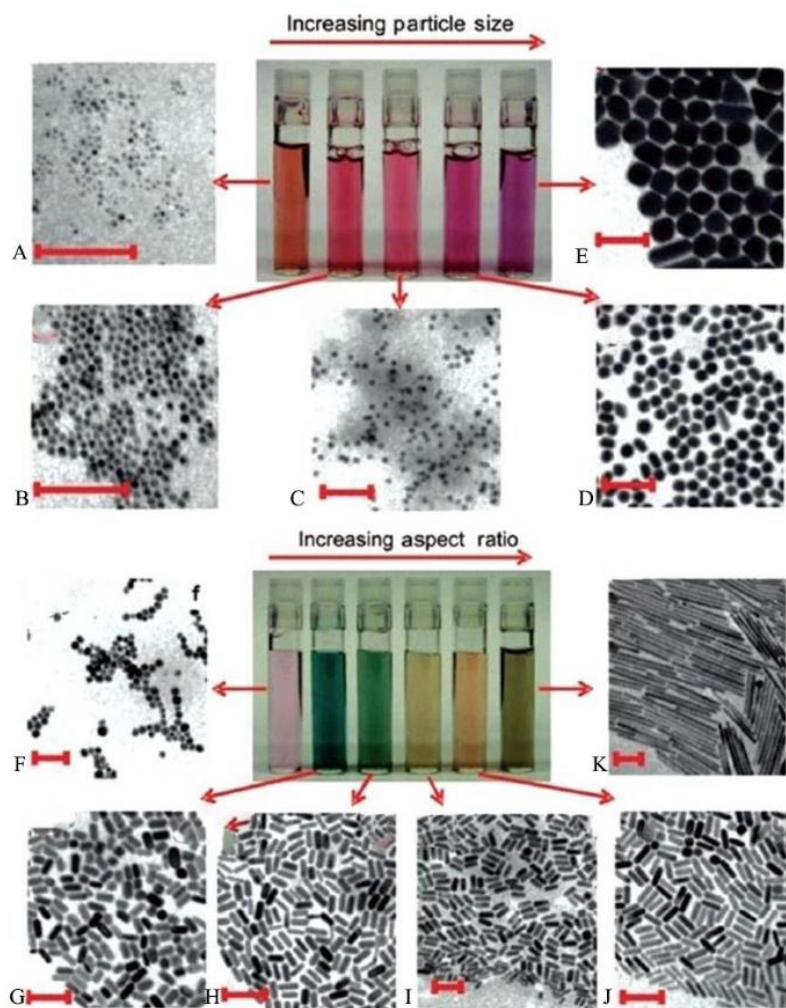


Fig. 1.4 Soluții de AuNPs de diferite forme, respectiv nanosfere și nanoroduri cu imaginile corespunzătoare de TEM (scala 100nm) [12]

I.4 Terapia cancerului

Cancerul reprezintă, de câteva sute de ani, una din principalele cauze ale decesului, iar apariția lui se datorează mai multor factori ce fac parte din mediul care ne înconjoară constant și rămâne în continuare o provocare pentru medicii și cercetătorii din domeniul biomedical. Fiecare persoană are un sistem imunitar care, teoretic, ar trebui să poată combate și eradică celulele tumorale, însă în realitate, acestea formează în jurul lor un micromediu tumoral (TME) ce învinge sistemul antitumoral al organismului atacat. Tumoarea creează anumite condiții pentru supraviețuire încât se sporește dezvoltarea metastazelor. Pentru tratarea cancerului, multiple modalități de combatere au fost testate, precum: operația, imunoterapia, terapia cu hormoni, chimioterapia, chiar și injectarea cu molecule de ARN. Cea care are o rată mare de succes în cazul metastazelor este chimioterapia, însă aceasta nu a ajuns într-un punct în care să fie posibilă eradicarea completă a celulelor tumorale, ceea ce duce la posibilitatea de reapariție a cancerului.[13]

Medicamentele care sunt folosite în cadrul chimioterapiei nu pot distruge complet zona afectată, iar efectele secundare ale acestei metode sunt foarte multe, de aceea este necesară colaborarea dintre ea și alte procese de tratare. Efectele negative ale chimioterapiei apar datorită distribuției nespecifice și a capacității celulelor tumorale de a se dezvolta în așa fel încât să reziste la tratament. Cu ajutorul dezvoltării eficiente a nanotehnologiei este posibilă folosirea unor agenți multifuncționali de dimensiune nanometrică ce prezintă un potențial incredibil în cazul diagnosticării și al tratamentelor. În acest caz, al cancerului, deși efectele chimioterapiei sunt vizibile, poate aduce consecințe amenințătoare pentru sănătatea pacientului. Cercetarea micromediului tumoral (TME), înțelegerea pe deplin a acestuia și apariția nanomedicinei sunt factori ce au condus la dezvoltarea tratamentelor ce nu se mai bazează doar pe o singură tehnică de tratare, ci combinarea mai multora. Astfel, există în prezent nanoparticule care au fost dezvoltate ținându-se cont de pH, potențialul redox, lumină, magnetism și raze X, care au posibilitatea de a efectua transportul de medicament și de a participa în diferite tipuri de terapie, precum cea fototermică (PTT), dinamică (PDT), chimiodinamică (CDT). [14]

Terapia fototermică (Photo-thermal therapy-PTT) este o metodă ce tratează local, minim invazivă, ce se bazează pe încălzirea până la hipertermie a celulelor canceroase. Această tehnică funcționează pe baza folosirii unor compuși numiți fotosensibilizatori, ce au rolul de a încălzi zona în care se află nanoparticulele atunci când ele sunt stimulate de radiație electromagnetică ce are o frecvență anume și o lungime de undă la care nanoparticulele au maximul absorbției. [15]

Hipertermia este procesul prin care temperatura mediului crește până la 40° - 45° cu scopul de a crea disconfort celulelor canceroase până când membrana acestora este degradată iar proteinele se denaturează.[16]

Un aspect mai puțin bun al PTT este faptul că acest tip de tratament necesită laseri cu putere mare pentru a distruge celulele tumorale. Pe de altă parte, mai există cazul în care se folosesc agenți fototermali pentru a facilita încălzirea locală, fără afectarea țesutului înconjurător. Acești agenți fototermali trebuie să aibă coeficientul de absorbție mare și să fie biocompatibili, iar domeniul sursei de lumină să fie Near-IR (Infraroșu Apropiat-NIR). [16]

Întreaga atenție a acestei proceduri se află asupra nanoparticulelor de aur întrucât ele sunt agentul terapeutic de care este nevoie. Acționează ca și sistem de livrare țintit și contribuie la încălzirea locală, fără ca țesutul din jur să fie afectat. Acest lucru îl face posibil LSPR, respectiv mișcarea colectivă a electronilor conductori localizați în suprafața metalică, ce amplifică absorbția radiației luminoase. Odată realizat acest lucru, se creează un fenomen de cascadă datorat excitării norului de electroni, ce formează ulterior disiparea de căldură. Procesul de formare a căldurii în zona dorită se realizează prin intermediul oscilației particulelor datorată absorbției fotonilor incidenti. Fenomenul de împrăștiere elastică electron-electron până la atingerea echilibrului Fermi conduce la creșterea foarte rapidă a temperaturii locale. [17]

În momentul în care agentul fototermic este excitat de către radiația laser, anterior fixată la o anumită lungime de undă, căldura care este degajată va distruge tumoarea sau se va concentra la nivelul leziunilor. Datorită absorbției luminii de către nanoparticule într-un mod eficient, pentru ablația tumorii este nevoie de o energie mică, iar acest fapt ajută la un proces selectiv și minim invaziv, cu deteriorarea cât mai mică a țesutului înconjurător. Laserii cu lungime de undă mare, respectiv energie mică, care se află în regiunea NIR-II sunt cei preferați pentru intervenția de îndepărtare completă a tumorii sau pentru penetrarea țesuturilor adânci din corp în cadrul PTT.[18]

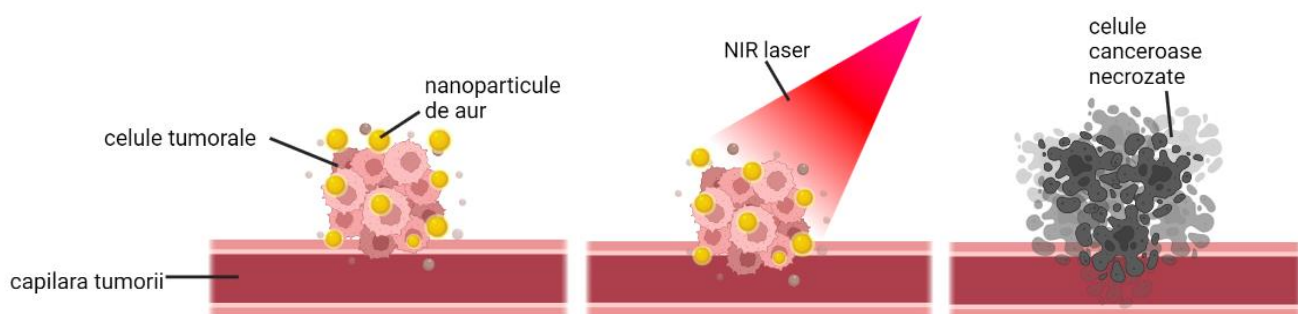


Fig. I.6 Reprezentarea schematică a fenomenului ce are loc în PTT

Pe lângă beneficiile aduse prin procedura PTT, creșterea temperaturii în anumite zone prin anumite procedee poate aduce îmbunătățiri vieții omului precum regenerarea țesutului, stimularea emisiei de medicament sau transportul acestuia.[18]

Capitolul II: Tehnici și metode experimentale

II.1 Sinteza nanoparticulelor de aur anizotrope în prezența gelatinei

În cadrul acestei lucrări de licență, nanoparticulele de aur au fost sintetizate într-o soluție de apă și gelatină de diferite concentrații. Procesul constă în trei etape principale: i) crearea soluției stoc de acid cloroauric (HAuCl_4); ii) amestecarea acidului cloroauric cu soluția de apă și gelatină; iii) formarea efectivă a nanoparticulelor de aur prin punerea probelor în etuvă la 80°C timp de 6h. Soluția stoc de gelatină se obține solubilizând 700 mg pudră de gelatină în 7 ml apă ultrapură prin agitare pe agitatorul magnetic la o temperatură potrivită pentru a preveni fierberea gelatinei. În urma solubilizării, se diluează soluția stoc în funcție de concentrațiile de gelatină finale care sunt folosite în sinteză, respectiv concentrații în intervalul 1-2% și se amestecă cu soluția de HAuCl_4 de concentrație 3 mM. Amestecul de HAuCl_4 și gelatină se amplasează în etuvă la 80°C timp de 6 ore. În urma acestui întreg proces de formare a nanoparticulelor de aur, soluția și-a schimbat culoarea din galben în maroniu. [9]

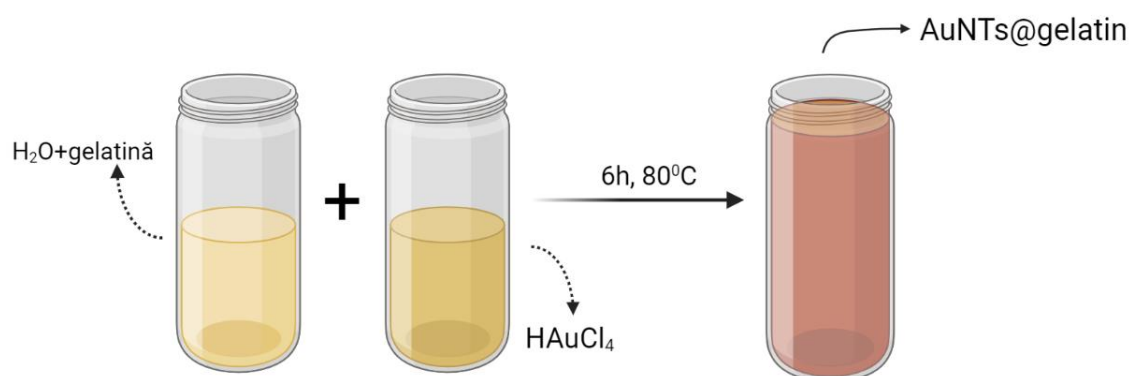


Fig. II.1 Schemă reprezentativă a sintezei nanoparticulelor de aur

II.2 Caracterizarea nanoparticulelor de aur

Caracterizarea proprietăților optice și morfologice ale nanoparticulelor a fost făcută cu ajutorul unei serii de tehnici spectroscopice: spectroscopia de extincție UV-Vis-NIR, potențialul Zeta și spectroscopia de fluorescență.

II.2.1 Spectroscopia de absorbție UV-Vis-NIR

Primul pas după sintetizarea nanoparticulelor de aur (AuNPs) este caracterizarea acestora cu ajutorul spectroscopiei de extincție UV-Vis-NIR, iar mai multe detalii despre acest proces se regăsesc în cadrul Anexei 1. Această procedură se bazează pe absorbția radiațiilor din domeniul ultraviolet și vizibil de către substanța cu care interacționează. Absorbția radiațiilor duce la excitarea electronilor de pe nivelul fundamental pe un nivel energetic mai ridicat. Această metodă de caracterizare ne indică spectrul de extincție al răspunsului optic al nanoparticulelor. [19]

În urma sintetizării nanoparticulelor de aur prin această metodă, rezultă nanosfere, care corespund primului peak al graficului și nanotriunghiuri, ce corespund celui de-al doilea. Pentru întregul studiu, dat fiind faptul ca laserul are lungimea de undă de 785nm, nanotriunghiurile sunt cele care creează interes. În soluție ele sunt suspendate și amestecate, însă prin centrifugare și scoaterea peletului și înlocuirea lui cu apă pură, este posibilă îndepărtarea parțială a nanosferelor, așa încât în soluție să rămână cât mai puține pentru ca rezultatele să fie datorate în mare parte nanotriunghiurilor.

Această măsurătoare este foarte importantă deoarece răspunsul plasmonic al nanoparticulelor trebuie să fie în rezonanță cu lungimea de undă a radiației electromagnetice emise de către laser, respectiv 785nm. Răspunsul plasmonic al nanotriunghiurilor de 780nm este cel ideal pentru studiile pe care această lucrare se concentrează.

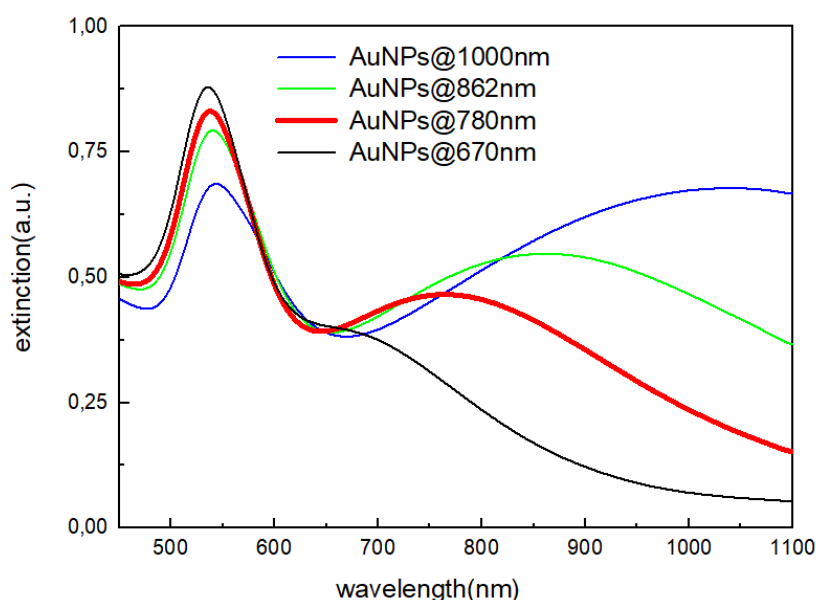


Fig. II.2 Spectrul de extincție ale AuNPs sintetizate în prezența gelatinei

În spectrele prezentate se pot observa două benzi principale ce se caracterizează prin poziția lor și forma răspunsului plasmonic și se datorează dimensiunii și formei AuNPs. Benzile aflate în jurul valorii de 540nm a LSPR reprezintă răspunsul dat de nanosfere, în timp ce LSPR al nanotriunghiurilor poate varia între domeniile Vizibil și NIR, motiv pentru care benzile acestora au format acest spectru.

În urma măsurătorilor de absorbție a luminii, se observă că spectrul de culoare roșie AuNPs@780 are maximumul intensității la 780nm, ceea ce este cel mai aproape de lungimea de undă a laserului care se folosește pentru PTT, respectiv cel cu lungimea de undă de 785nm. De aici se

poate concluziona că proba cu nanoparticule de aur care are maximul de absorbție la 780nm este cea mai potrivită pentru studiul PTT și încărcarea cu DOX.

II.2.2 Microscopie electronică de transmisie (TEM)

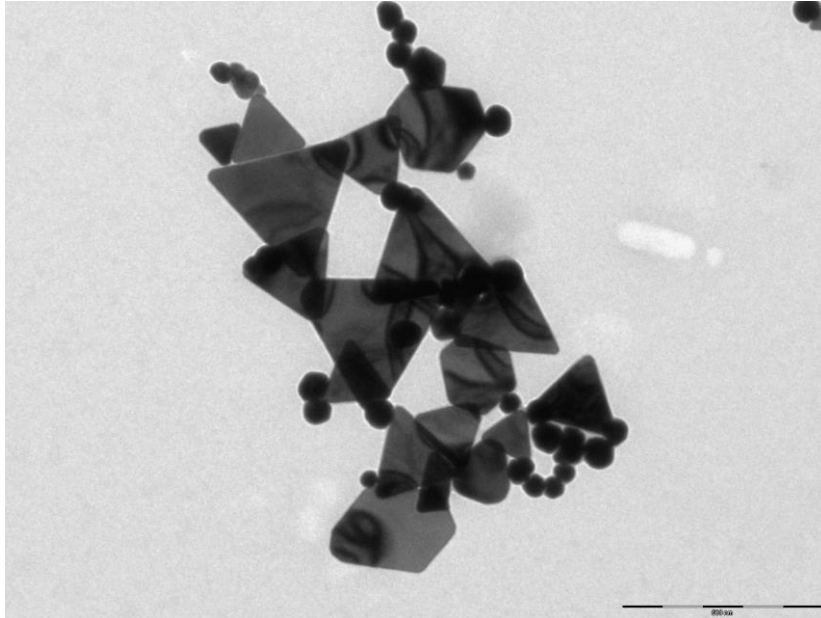


Fig. II.3 Imagine TEM a nanoparticulelor de aur (nanosfere și nanotriunghiuri)

Imaginea II.3 realizată prin microscopie electronică de transmisie demonstrează sintetizarea nanoparticulelor de formă triunghiulară, care se regăsesc în număr mai mare și sferică, în număr mai mic.

II.2.3 Împrăștierea dinamică a luminii (DLS)

Următoarea caracteristică a nanoparticulelor sintetizate este mărimea acestora pe care am aflat-o cu ajutorul împrăștierii dinamice a luminii (Dynamic Light Scattering - DLS). Atunci când vine vorba de DLS, există mai mulți factori ce pot influența măsurătoarea, precum temperatura, stabilitatea probei, cât și calitatea aparatului. Aceasta este o metodă non-invazivă de aflare a dimensiunii nanoparticulelor și măsoară dependența fluctuației de intensitate a luminii împrăștiată de către probă, aceasta aflându-se într-o continuă mișcare Browniană. Descrierea detaliată a acestei proceduri se regăsește în Anexa 2.

În urma măsurătorii prezentată în Fig.II.4 s-a constatat că diametrul nanoparticulelor de formă triunghiulară cu rezonanța la 780nm (AuNTs@780) este de aproximativ 120nm.

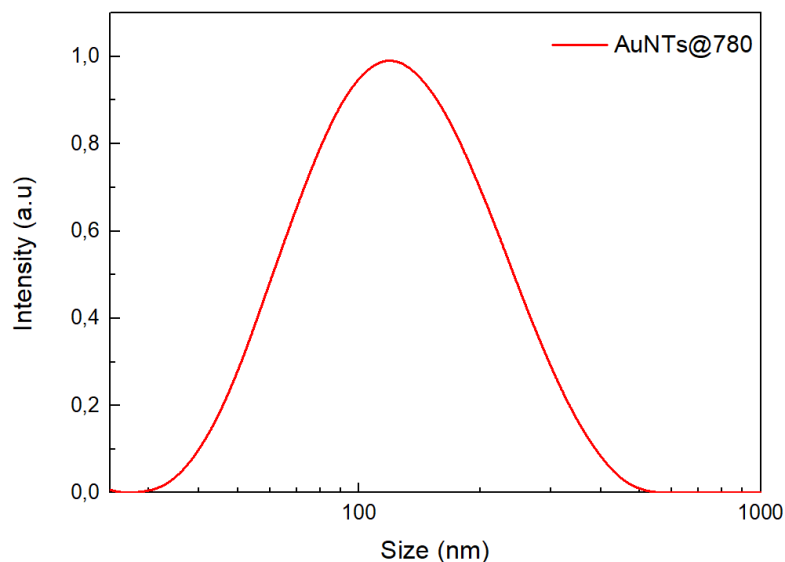


Fig. II.4 Spectrul DLS al probei AuNTs@780

II.2.4 Potențialul Zeta

În final, au fost efectuate măsurători de determinare a stabilității nanoparticulelor. Potențialul Zeta poate fi definit drept diferența de potențial aflată între mediul de dispersie și stratul staționar de fluid de la suprafața particulei. [20]

Scopul acestei măsurători este de a afla gradul de stabilitate al nanoparticulelor de aur din soluția sintetizată. Potențialul Zeta reprezentat în Figura II.5 al nanoparticulelor a fost aflat cu ajutorul aparatului Zetasizer Nano ZS90, iar mai multe detalii se pot regăsi în Anexa 3.

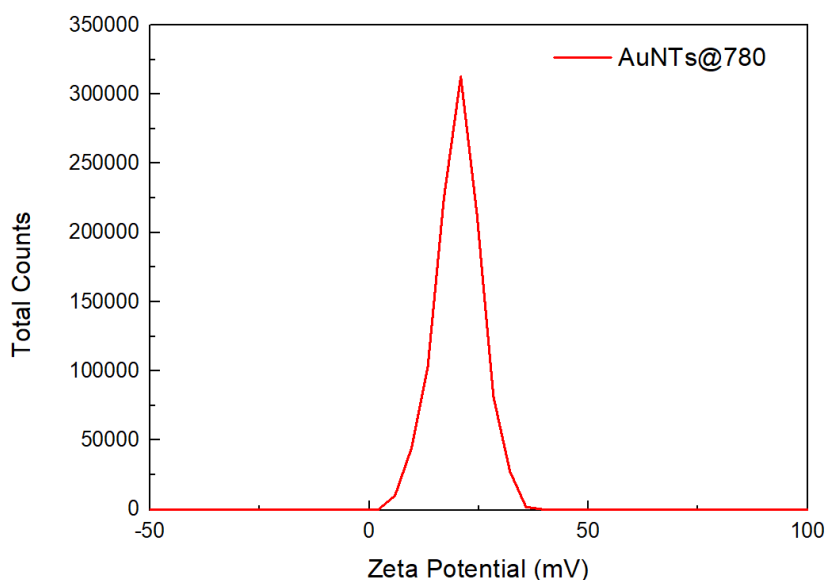


Fig. II.5 Spectrul Potențialului Zeta al probei AuNTs@780

Potențialul Zeta al probei alese este de +20,9 mV, ceea ce înseamnă că suprafața e încărcată pozitiv și nu se formează agregate în soluție.

Capitolul III: Formarea complexului nano-chimioterapeutic-fototermic pe baza nanotriunghiurilor de aur încărcate cu DOX

În acest capitol vor fi descrise procesele de biofuncționalizare ale nanoparticulelor prin încărcarea doxorubicinei.

O modalitate de transport și livrare de medicament, în acest caz doxorubicina, este prin intermediul nanoparticulelor sintetizate în gelatină. Gelatina este un biopolimer care ajută la controlarea mărimii nanoparticulelor și este biocompatibil, astfel, corpul uman acceptă acest compus. Utilizarea nanoparticulelor în acest caz este posibilă datorită biocompatibilității eficiente, afinitate chimică specifică și proprietăți optice unice datorită rezonanței plasmonice localizate de suprafață (LSPR).[2]

Compusul nano-chimioterapeutic-fototermic (AuNPs@gelatin-hyd-DOX) a fost realizat prin amestecarea a 1 mL de soluție de nanoparticule sintetizate anterior AuNPs@gelatin cu 100 μ L de hidrazină. Compusul format a fost agitat timp de 24h, iar mai apoi din soluția nou formată AuNPs@gelatin-hyd a fost extras 1 mL pentru a fi amestecat cu 300 μ L de doxorubicină de concentrație 10^{-3} M. O altă incubație de 24h a avut loc, iar mai apoi compusul format AuNPs@gelatin-hyd-DOX a fost centrifugat la 8000 rpm timp de 10 minute din care s-a scos supernatantul, soluție în care se află medicamentul ce nu s-a legat de nanoparticulele de aur și s-a măsurat spectrul de fluorescență al acestuia, prezentat în Figura III.3. [2]

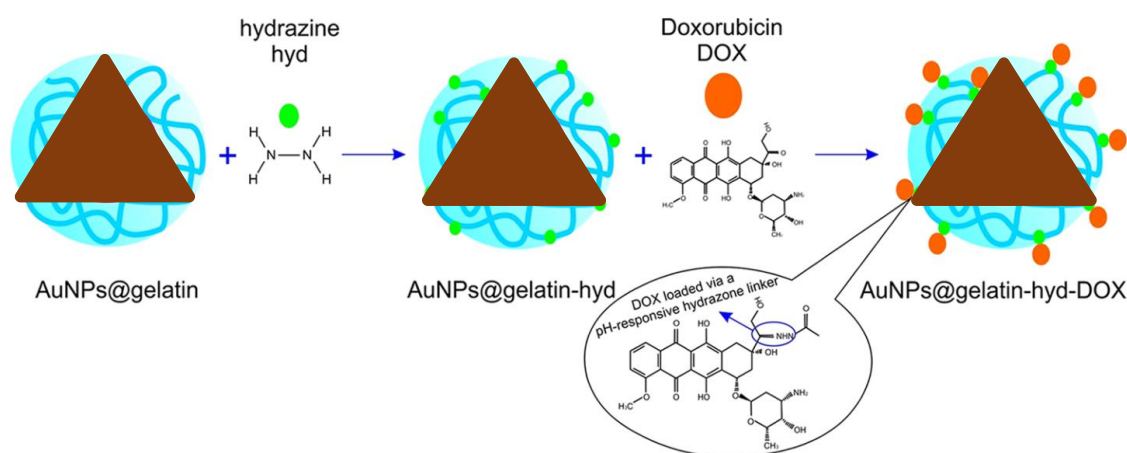


Fig. III.1 Reprezentare schematică a legării doxorubicinei de AuNPs@gelatin

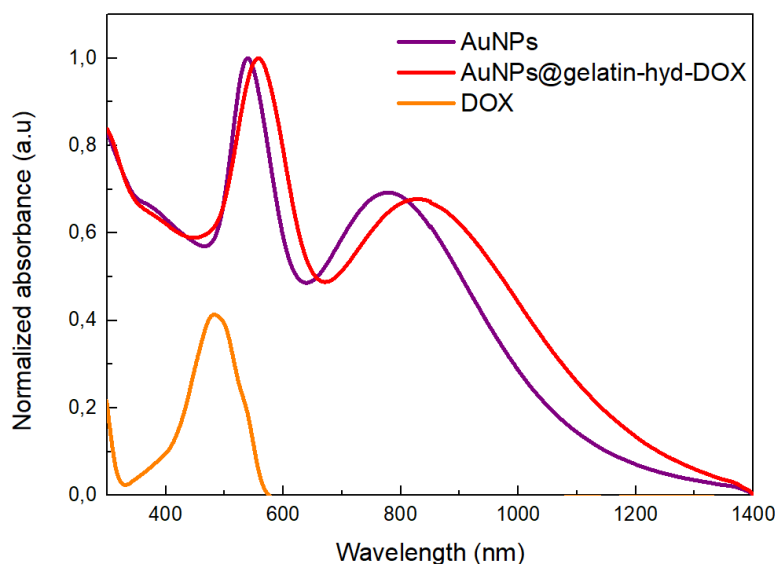


Fig. III.2 Spectrele de absorbție ale probelor AuNPs, AuNPs@gelatin-hyd-DOX și DOX

În Figura III.2 sunt reprezentate răspunsurile LSPR corespunzătoare probelor cu nanotriunghiuri simple, nanotriunghiuri încărcate cu DOX și respectiv, DOX liberă. Se poate observa cum proba AuNPs@gelatin-hyd-DOX capătă un shift spre NIR față de spectrul AuNPs ce provine de la medicament.

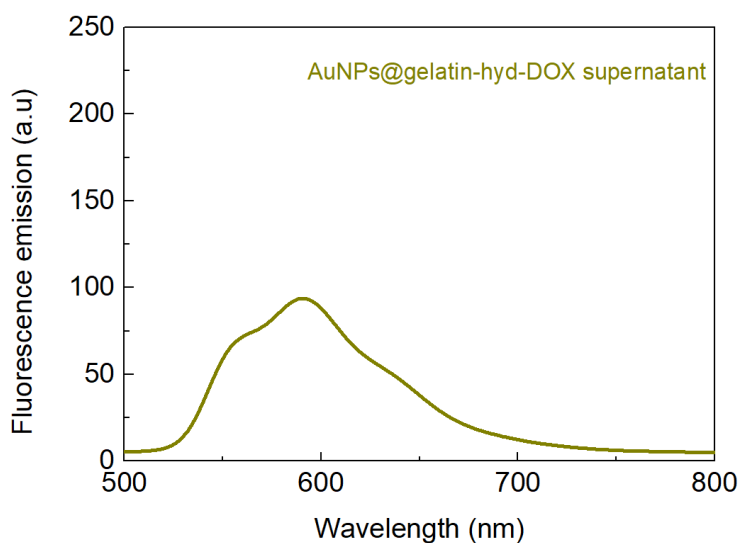


Fig III.3 Spectrul de fluorescență al supernatantului după centrifugarea AuNPs@gelatin-hyd-DOX

Pentru a calcula eficiența încapsulării din complexul AuNPs@gelatin-hyd-DOX am investigat curba de calibrare a emisie de fluorescență a DOX, Figura III.5. Pentru aceasta am efectuat o diluție succesivă a soluției de doxorubicină liberă, pornind de la concentrația de 10^{-4} M. Emisia de fluorescență a probelor a fost măsurată cu ajutorul spectrofluorometrului Jasco FP6500, iar mai multe detalii despre această practică se pot găsi în Anexa 4. Curba de calibrare a fost

construită prin reprezentarea grafică a emisiei de fluorescență a DOX în funcție de concentrație.

În urma calculelor, s-a aflat o eficiență de încapsulare de 91%.

$$EE = \frac{total_{DOX} - free_{DOX}}{total_{DOX}} \times 100 \quad [2], \text{ unde EE reprezintă eficiența încapsulării}$$

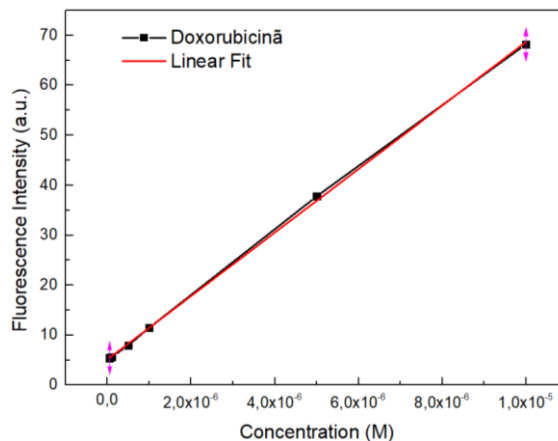
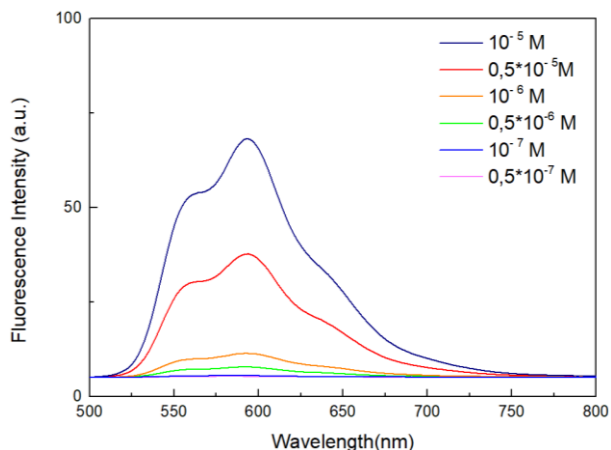


Fig. III.4 Spectrul de fluorescență al probelor diluate

Fig. III.5 Curbă de calibrare pentru fluorescență

III.1 Studiarea eliberării de doxorubicină

Următorul pas în acest studiu este determinarea eliberării de DOX care este monitorizată prin investigarea emisiei de fluorescență a AuNPs@gelatin-hyd-DOX. Eliberarea controlată este un element foarte important în cazul tratamentului pentru cancer, astfel se urmărește activitatea doxorubicinei în mai multe soluții cu pH-uri diferite: 7.4, 5.3 și respectiv 4.6 pentru a mima atât mediul fiziologic normal al corpului cât și cel acid al tumorii. Probele cu cele 3 pH-uri au fost ținute la 37° timp de 24h, iar cantitatea de doxorubicină emisă a fost măsurată la anumite intervale de timp pe baza fluorescenței acesteia. [2]

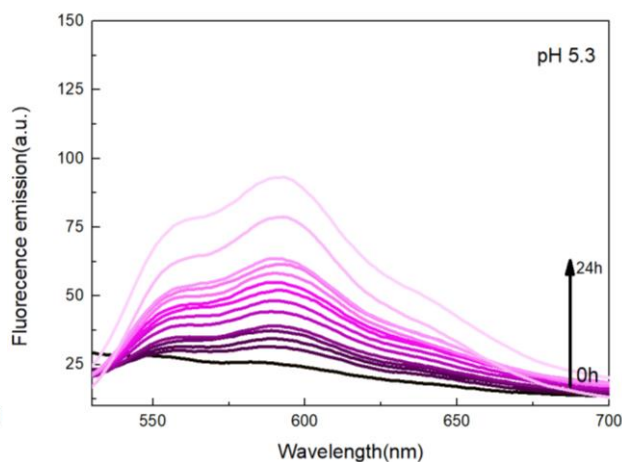
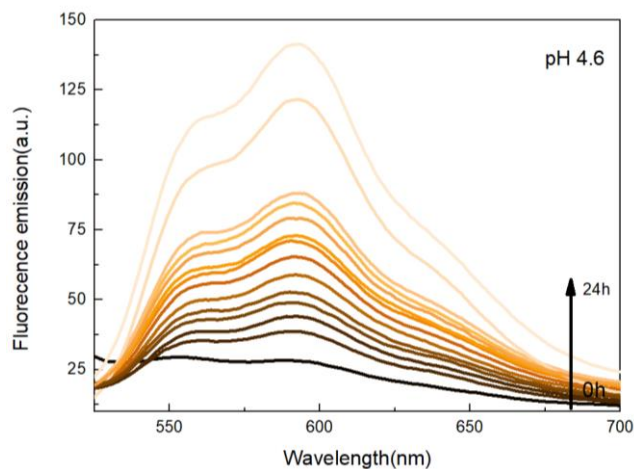


Fig. III.6 Emisie de doxorubicină în pH 4,6

Fig. III.7 Emisie de doxorubicină în pH 5,3

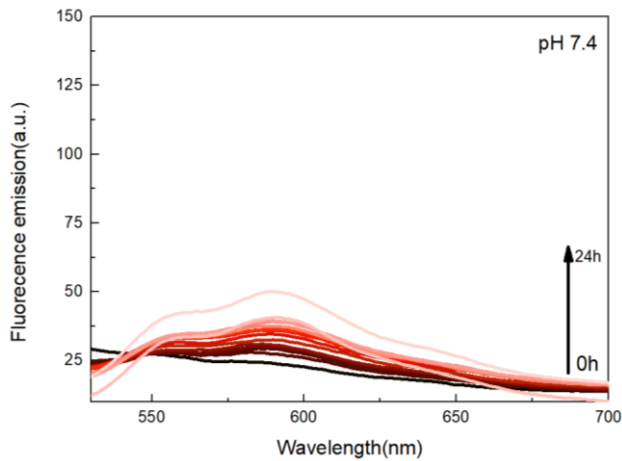


Fig. III.8 Emisie de doxorubicină în pH 7,4

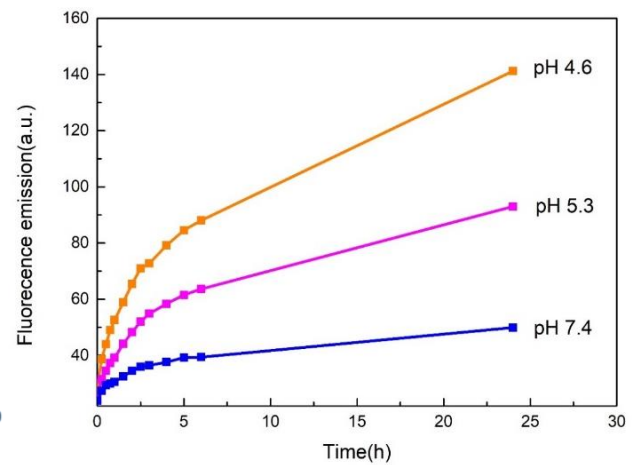


Fig. III.9 Dependența emisieii de fluorescență în funcție de pH în 24h

Pentru aflarea procentului de medicament eliberat pentru fiecare pH în parte, am folosit următoarea formulă:

$$\% \text{drug}_{\text{released}} = \frac{I_{ti}}{I_0} \times 100\% \quad [2]$$
 , unde I_i reprezintă intensitatea emisieii de fluorescență a doxorubicinei eliberate corespunzătoare fiecărui pH , iar I_0 intensitatea emisieii de fluorescență a doxorubicinei totale încărcate în AuNPs@gelatin(205 a.u.).

În cazul fiecărui pH în care a fost realizată eliberarea de DOX, am obținut valoarea de 68% pentru pH 4.6 , 45% pentru pH 5.3 și 24% pentru pH 7.4.

Rezultatele obținute indică faptul că proba AuNPs@gelatin-hyd-DOX este dependentă de pH-ul zonei în care se află. Emisia de doxorubicină fiind mare în mediul acid al tumorii (Fig. III.9), confirmă eficiența folosirii acestei metode pentru încărcarea și eliberarea controlată a DOX, fapt ce este sporit și cu ajutorul legăturii de hidrazină. [2]

Investigarea potențialilor transportori de medicamente care să aibă un răspuns pozitiv în urma interacțiunii cu diferite pH-uri a dus la descoperirea acestui compus, AuNPs@gelatin-hyd-DOX. În urma emisieii de doxorubicină, spectrul de fluorescență își păstrează forma. [21]

III.2 Investigarea eficienței de conversie a radiației laser în căldură

Pentru următorul pas din acest studiu, probele de AuNPs@gelatin-hyd-DOX au fost introduse într-un compus care simulează mediul biologic (biological phantoms). Acestea au fost iradiate cu laserul de 785 nm timp de 15 minute.

Mediile biologice simulate bazate pe un amestec semi solid de apă, agaroză și intralipid ce mimează țesuturile pielii umane și sunt folosite pentru cercetarea interacțiunii cu tratamentul pentru cancer în experimente in vitro. Acestea sunt încărcate cu AuNPs@gelatin-hyd-DOX pentru ca ulterior să fie descoperită temperatura maximă pe care o atinge amestecul în urma interacțiunii cu radiația luminoasă. Astfel, în Figura III.10, sub influența laserului, compusul atinge temperatura maximă de 45,88°C, care reprezintă pragul de încălzire al acestuia.[22]

Proba de control este mediul biologic simulat (biological phantom) simplă bazată pe agaroză, fără nanoparticulele de aur, astfel aceasta nu se încălzește, rezultând o temperatură constantă pe tot timpul iradierii cu laserul de 785nm. Încălzirea probei de phantom cu AuNPs@gelatin-hyd-DOX este datorată conversiei de energie luminoasă în căldură, un răspuns al LSPR al nanoparticulelor de aur, comportament similar cu răspunsul dat de AuNPs@780, ceea ce se poate observa și din grafic. Nanoparticulele de aur încălzite au capacitatea de a păstra căldura formată datorită rezonanței cu laserul. Astfel ele ajung la o temperatură mai înaltă prin transformarea energiei optice în energie termică. De asemenea se poate observa faptul că, AuNPs@gelatin-hyd-DOX odată introdus în acest mediu biologic simulat, nu își schimbă proprietatea de conversie, temperatura maximă de încălzire fiind aceeași. Este important de menționat faptul că, pentru a mări și mai mult siguranța țesutului sănătos, se pot efectua tratamente folosind laserul cu o putere mai scăzută și în regim de impulsuri, nu continuu. [22]

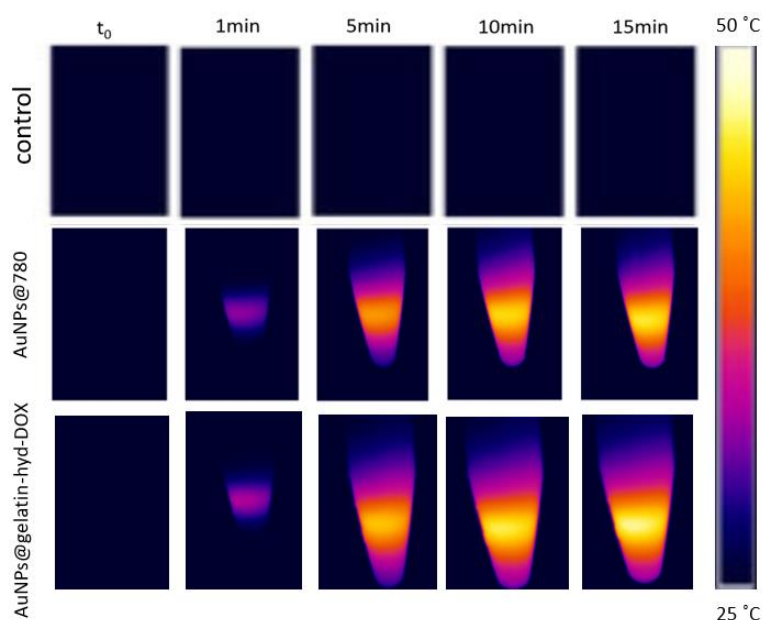


Fig. III.10 Imaginile termografice înregistrate în timpul iradierii probelor control în biological phantom, AuNPs@780 și AuNPs@gelatin-hyd-DOX

Având în vedere efectele pe care creșterea temperaturii le poate reda asupra diferitelor tipuri de celule, controlarea acesteia este un pas foarte important întrucât, dacă este mult prea ridicată, există posibilitatea de moarte a celulelor sănătoase din jurul celulelor canceroase. Astfel, controlul temperaturii reprezintă un element critic atunci când vine vorba de PTT, unde se poate ajunge până la maxim 50°C pentru a distruge tumoarea, însă nu și a țesutului din jur. [22]

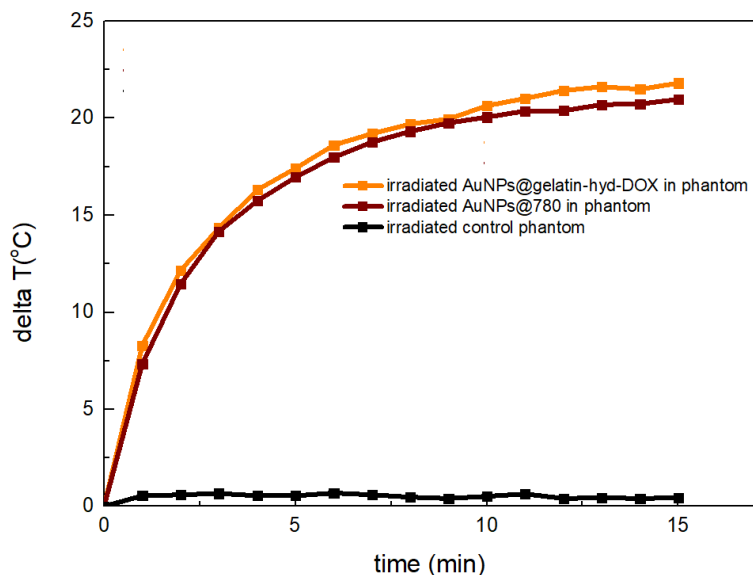


Fig. III.11 Curbele termice extrase din imaginile termografice înregistrate în timpul iradierii probelor în biological phantoms

Se poate observa din Figura III.11 că graficul nanoparticulelor simple și cel al nanoparticulelor încărcate cu doxorubicină nu diferă foarte mult, ambele având un ΔT asemănător. Măsurătoarea a fost realizată la temperatura camerei de 25°C, ceea ce reprezintă punctul de pornire. AuNPs@gelatin-hyd-DOX se încălzesc cu un ΔT de 21,81°C, iar AuNPs@780 cu 20,98 °C. Acestea fiind spuse, se poate afirma că AuNPs@gelatin-hyd-DOX se încălzesc până la aproximativ 46,86°C, incluzând temperatura camerei, ceea ce duce la distrugerea celulelor canceroase.

Creșterea temperaturii are, de asemenea, efecte și asupra gelatinei ce înconjoară nanoparticulele, sporind eliminarea de doxorubicină din compusul încărcat în mediul biologic. Figura III.12 este realizată cu ajutorul microscopiei confocale de fluorescență cu re-scanare (RCM) și prezintă în cazul (A) mediul biologic încărcat cu AuNPs@gelatin-hyd-DOX înainte de iradiere, iar (B) după iradierea cu laserul de 785nm timp de 15 minute. Se poate observa că în urma acționării radiației luminoase, accentuarea eliminării de medicament este vizibilă.

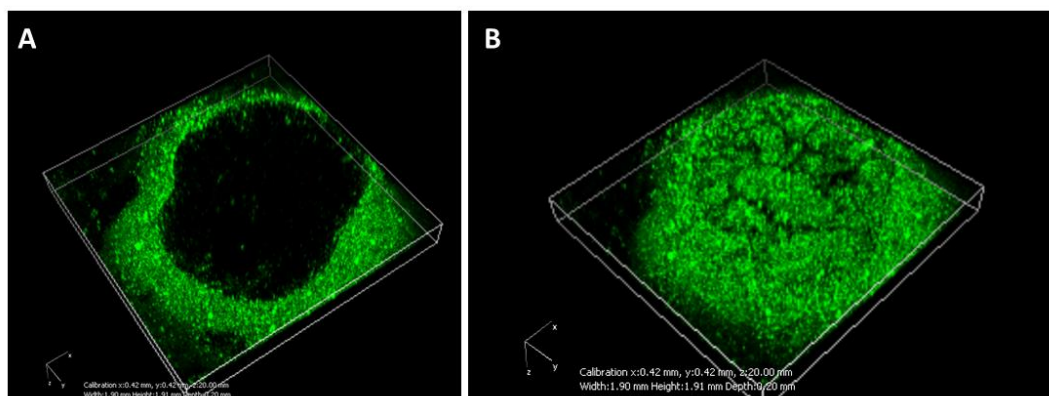


Fig. III.12 Imagini RCM a mediului biologic simulat încărcat cu AuNPs@gelatin-hyd-DOX înainte și după iradiere

În ceea ce privește eliberarea de DOX sub acțiunea laserului, nanoparticulele de aur se încălzesc, astfel sporindu-se efectul de eliberare, ceea ce se poate observa și din Figura III.13.

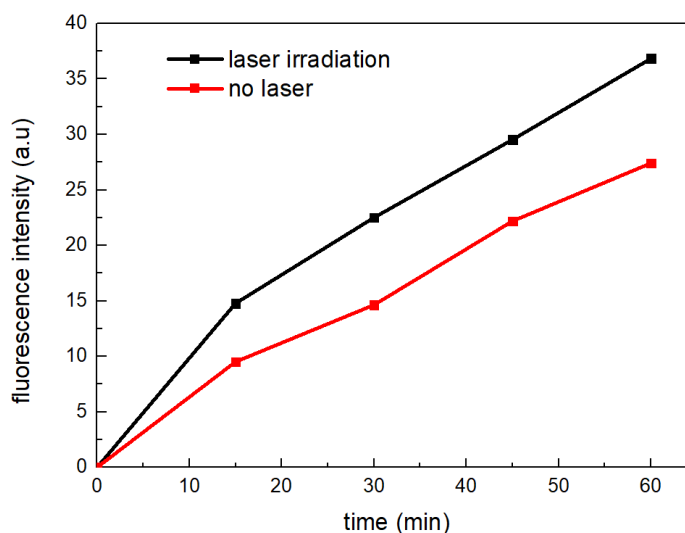


Fig. III.13 Eliberarea de DOX din proba AuNPs@gelatin-hyd-DOX sub și fără acțiunea laserului

Pe baza rezultatelor prezentate de-a lungul acestei lucrări, am arătat faptul că agentul terapeutic propus AuNPs@gelatin-hyd-DOX este capabil să funcționeze drept tratament medical personalizat, să transporte țintit și să fie folosit în imagistică.

Concluzii și planuri de viitor

Sintetizarea nanoparticulelor de aur în modul prezentat în această lucrare s-a dovedit a fi potrivită pentru tipul de studiu efectuat, obținând nanotriunghiuri cu răspuns plasmonic corespunzător pentru folosirea lor în PTT, respectiv pentru iradierea acestora cu laserul de 785nm pentru a atinge temperatura necesară distrugerii celulelor canceroase. Încărcarea cu succes a doxorubicinei pe suprafața nanoparticulelor și testarea eliberării medicamentului în pH de 7.4, 5.3, 4.6 timp de 24h s-a dovedit a fi eficientă, întrucât în mediul acid de 4.6 al tumorii rezultatul a fost cel mai bun, comparativ cu celelalte două cazuri.

În cadrul planurilor de viitor, testarea compusului AuNPs@gelatin-hyd-DOX in vitro și in vivo prin înglobarea acestuia în celule care să mimeze diferite tipuri de cancer reprezintă un pas înainte.

Anexe

Anexa 1

Spectroscopia UV-Vis

În acest studiu au fost investigate proprietățile optice ale nanoparticulelor de aur folosind spectrometrul JASCO V-670 UV-Vis-NIR cu o lățime de bandă de 2, iar pentru probe a fost folosită o cuvă de cuarț de 2mm, utilizând apă distilată drept soluție de referință. Razele de lumină din domeiul ultraviolet și vizibil ce sunt emise de către sursă întâlnesc o prismă care are rolul de separare. O rază este deviată pentru a trece prin sistemul de oglinzi și analizează proba, iar cea de-a doua trece prin proba de referință. Diferența dintre intensitatea luminii după trecerea prin cele două soluții este analizată și mai apoi prezentată sub forma unui grafic de absorbantă sau transmitanță, în funcție de lungimea de undă. [19]

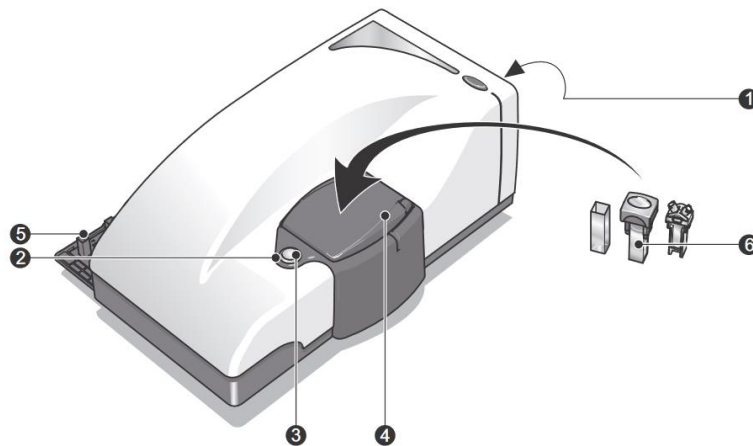


Fig. Spectrometrul UV-Vis utilizat pentru acest studiu

În principal, pentru acest studiu, spectrometrul UV-Vis-NIR a fost utilizat pentru identificarea maximului de absorbție al probelor sintetizate, urmărind să obținem o probă cu maximul apropiat de lungimea de undă a laserului folosit de 785 nm.

Anexa 2**DLS**

Această modalitate de măsurare a dimensiunii nanoparticulelor se bazează pe iluminarea acestora cu un laser și se analizează fluctuațiile de intensitate a luminii împrăștiată. Prin plasarea unui ecran în fața soluției cu particule se preia lumina care ulterior este împrăștiată de acestea și se formează o imagine cu zone întunecate și luminoase. De aici reiese fluctuația de intensitate a luminii. Dimensiunea nanoparticulelor ajunge să influențeze viteza cu care acestea se deplasează în lichidul în care se află, astfel cele mai mari se mișcă mai lent, iar cele cu dimensiune mai redusă au o viteză mai mare. Mișcarea mai rapidă a particulelor cu dimensiune redusă determină o fluctuație mai rapidă a luminii, pe când particulele mai mari corespund unei fluctuații mai lente a modelului. [20]



Anexa 3

Potențialul zeta

Acesta poate fi înțeles drept potențialul de la suprafața particulelor ce are o anumită influență asupra ionilor aflați în interior, creând o concentrație mai mare de ioni de semn opus în jurul acesteia, respectiv, se formează un dublu strat electric.

Valoarea acestui potențial indică gradul de stabilitate al soluției analizate, astfel dacă rezultatul este peste +30mV sau mai mic -30mV, aceasta este considerată stabilă, adică nu există riscul de formare a agregatelor, particulele având forțe de respingere îndeajuns de mari pentru a se îndepărta reciproc.

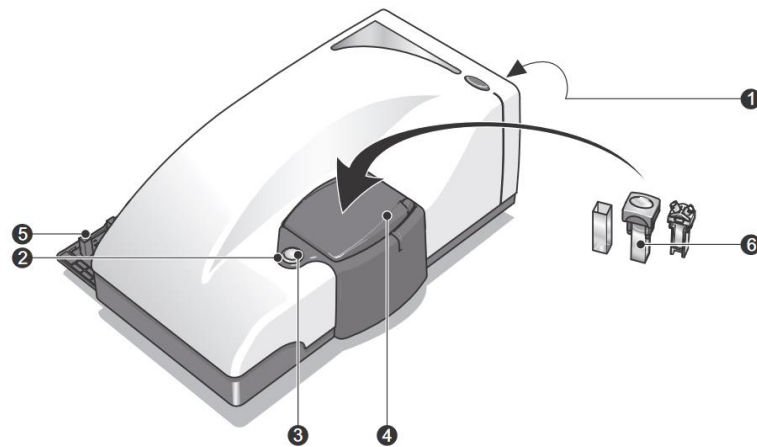


Fig. Aparatul Zetasizer Nano ZS90 [23]

Unde 1-panou; 2-indicator; 3-buton de acces; 4-celula; 5-suport pentru cuvetă; 6-cuvete;

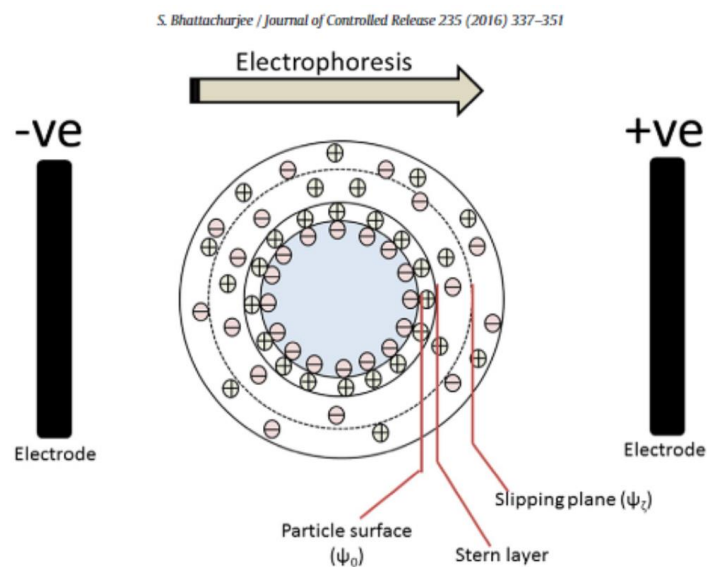


Fig. Reprezentare schematică a potențialului zeta [24]

Anexa 4**Spectroscopia de fluorescență**

Fig. A4.1 Aparatul spectrofluorometru Jasco FP6500 folosit în cadrul măsurătorilor din această lucrare [25]

Fenomenul de fluorescență are loc în urma absorbției luminii incidente de către elementele moleculei care prezintă interes pentru studiu și este descrisă prin emisia de fotoni în urma dezexcitării respectivei molecule de la o stare cu energie ridicată la una cu energie mai joasă.

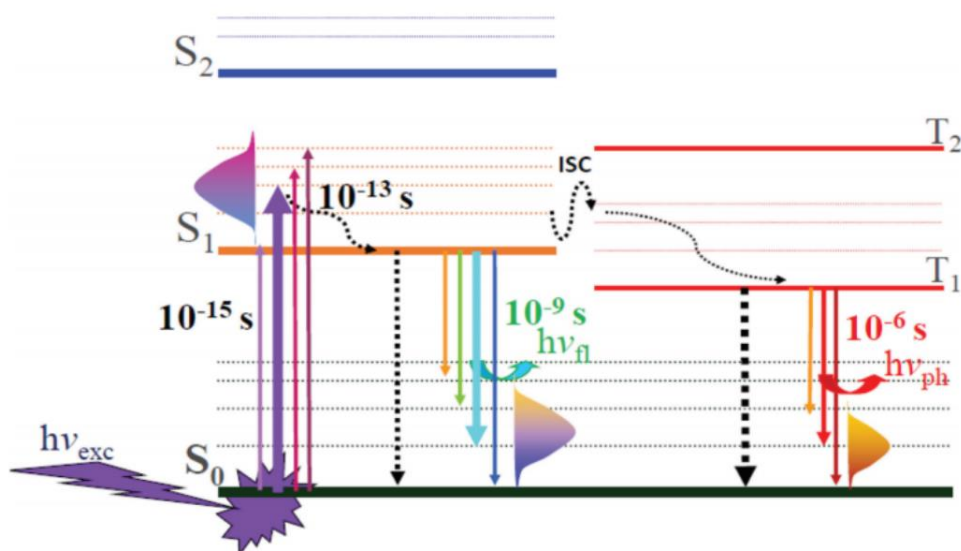


Fig. A4.2 Diagrama Jablonski [26]

În cadrul spectroscopiei de fluorescență, raza incidentă de lumină ce ponaște de la sursă trece prin-un filtru de culoare, respectiv un monocromator, pentru ca mai apoi să ajungă la probă.

Bibliografie

- [1] K. Johnson-Arbor și R. Dubey, „Doxorubicin”, în *StatPearls*, Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2023. Data accesării: 30 aprilie 2023. [Online]. Disponibil la: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459232/>
- [2] S. Suarasan *et al.*, „Doxorubicin-Incorporated Nanotherapeutic Delivery System Based on Gelatin-Coated Gold Nanoparticles: Formulation, Drug Release, and Multimodal Imaging of Cellular Internalization”, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 8, nr. 35, pp. 22900–22913, sep. 2016, doi: 10.1021/acsami.6b07583.
- [3] S. Bayda, M. Adeel, T. Tuccinardi, M. Cordani, și F. Rizzolio, „The History of Nanoscience and Nanotechnology: From Chemical–Physical Applications to Nanomedicine”, *Molecules*, vol. 25, nr. 1, Art. nr. 1, ian. 2020, doi: 10.3390/molecules25010112.
- [4] S. Parvanian, S. M. Mostafavi, și M. Aghashiri, „Multifunctional nanoparticle developments in cancer diagnosis and treatment”, *Sensing and Bio-Sensing Research*, vol. 13, pp. 81–87, apr. 2017, doi: 10.1016/j.sbsr.2016.08.002.
- [5] O. C. Farokhzad și R. Langer, „Impact of Nanotechnology on Drug Delivery”, *ACS Nano*, vol. 3, nr. 1, pp. 16–20, ian. 2009, doi: 10.1021/nn900002m.
- [6] C. Louis și O. Pluchery, *Gold Nanoparticles For Physics, Chemistry And Biology (Second Edition)*. World Scientific, 2017.
- [7] X. Huang și M. A. El-Sayed, „Gold nanoparticles: Optical properties and implementations in cancer diagnosis and photothermal therapy”, *Journal of Advanced Research*, vol. 1, nr. 1, pp. 13–28, ian. 2010, doi: 10.1016/j.jare.2010.02.002.
- [8] X. Bai *et al.*, „The Basic Properties of Gold Nanoparticles and their Applications in Tumor Diagnosis and Treatment”, *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 21, nr. 7, Art. nr. 7, ian. 2020, doi: 10.3390/ijms21072480.
- [9] S. Suarasan, M. Focsan, O. Soritau, D. Maniu, și S. Astilean, „One-pot, green synthesis of gold nanoparticles by gelatin and investigation of their biological effects on Osteoblast cells”, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 132, pp. 122–131, aug. 2015, doi: 10.1016/j.colsurfb.2015.05.009.
- [10] P. K. Jain, X. Huang, I. H. El-Sayed, și M. A. El-Sayed, „Noble Metals on the Nanoscale: Optical and Photothermal Properties and Some Applications in Imaging, Sensing, Biology, and Medicine”, *Acc. Chem. Res.*, vol. 41, nr. 12, pp. 1578–1586, dec. 2008, doi: 10.1021/ar7002804.
- [11] Y. Liu, L. Yang, și Y. Shen, „Hydrothermal synthesis of gold nanoplates and their structure-dependent LSPR properties”, *Journal of Materials Research*, vol. 33, nr. 18, pp. 2671–2679, sep. 2018, doi: 10.1557/jmr.2018.274.
- [12] M. Shah, „Gold nanoparticles: various methods of synthesis and antibacterial applications”, *Front Biosci*, vol. 19, nr. 8, p. 1320, 2014, doi: 10.2741/4284.
- [13] N. Behranvand *et al.*, „Chemotherapy: a double-edged sword in cancer treatment”, *Cancer Immunol Immunother*, vol. 71, nr. 3, pp. 507–526, mar. 2022, doi: 10.1007/s00262-021-03013-3.
- [14] W. Wu, Y. Pu, și J. Shi, „Nanomedicine-enabled chemotherapy-based synergetic cancer treatments”, *Journal of Nanobiotechnology*, vol. 20, nr. 1, p. 4, ian. 2022, doi: 10.1186/s12951-021-01181-z.
- [15] G. Eskiizmir, Y. Baskın, și K. Yapıcı, „Graphene-based nanomaterials in cancer treatment and diagnosis”, în *Fullerens, Graphenes and Nanotubes*, Elsevier, 2018, pp. 331–374. doi: 10.1016/B978-0-12-813691-1.00009-9.

- [16] R. Bhole, „A Comprehensive Review on Photodynamic Therapy (PDT) and Photothermal Therapy (PTT) for Cancer Treatment”, *TJ Oncol*, 2021, doi: 10.5505/tjo.2020.2400.
- [17] A. Campu, A.-M. Craciun, M. Focsan, și S. Astilean, „Assessment of the photothermal conversion efficiencies of tunable gold bipyramids under irradiation by two laser lines in a NIR biological window”, *Nanotechnology*, vol. 30, nr. 40, p. 405701, oct. 2019, doi: 10.1088/1361-6528/ab2d90.
- [18] X. Cui *et al.*, „Photothermal Nanomaterials: A Powerful Light-to-Heat Converter”, *Chem. Rev.*, mai 2023, doi: 10.1021/acs.chemrev.3c00159.
- [19] D. A. Skoog, F. J. Holler, și S. R. Crouch, *Principles of Instrumental Analysis*. Cengage Learning, 2017.
- [20] „Malvern Zetasizer ZS DLS user manual.pdf”. Data accesării: 28 aprilie 2023. [Online]. Disponibil la:
<https://www.chem.uci.edu/~dmitryf/manuals/Malvern%20Zetasizer%20ZS%20DLS%20user%20manual.pdf>
- [21] S. Suarasan, A.-M. Craciun, E. Licarete, M. Focsan, K. Magyari, și S. Astilean, „Intracellular Dynamic Disentangling of Doxorubicin Release from Luminescent Nanogold Carriers by Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy (FLIM) under Two-Photon Excitation”, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 11, nr. 8, pp. 7812–7822, feb. 2019, doi: 10.1021/acsami.8b21269.
- [22] „IJMS | Free Full-Text | Assessing the Efficiency of Triangular Gold Nanoparticles as NIR Photothermal Agents In Vitro and Melanoma Tumor Model”. <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/22/13724> (data accesării 15 iunie 2023).
- [23] „Malvern Zetasizer ZS DLS user manual.pdf”.
- [24] S. Bhattacharjee, „DLS and zeta potential – What they are and what they are not?”, *Journal of Controlled Release*, vol. 235, pp. 337–351, aug. 2016, doi: 10.1016/j.jconrel.2016.06.017.
- [25] „FP6500_072.pdf”. Data accesării: 18 iunie 2023. [Online]. Disponibil la:
http://jascoinc.com/docs/product-spec-sheets/FP6500_072.pdf
- [26] Z. (Karol) Gryczynski și I. Gryczynski, *Practical Fluorescence Spectroscopy*. CRC Press, 2019.

DECLARAȚIE PE PROPRIE RĂSPUNDERE

Subsemnatul, Miruna Alexandra Ibrian, declar că Lucrarea de licență pe care o voi prezenta în cadrul examenului de finalizare a studiilor la Facultatea de Fizică, din cadrul Universității Babeș-Bolyai, în sesiunea de vară 2023 , sub îndrumarea Prof. Dr. Simion Aștilean, reprezintă o operă personală. Menționez că nu am plagiat o altă lucrare publicată, prezentată public sau un fișier postat pe Internet. Pentru realizarea lucrării am folosit exclusiv bibliografia prezentată și nu am ascuns nici o altă sursă bibliografică sau fișier electronic pe care să le fi folosit la redactarea lucrării.

Prezenta declarație este parte a lucrării și se anexează la aceasta.

Data,

28.06.2023

Nume,

Ibrian Miruna Alexandra

Semnătură