

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "VICTOR
BABEȘ" DIN TIMIȘOARA
FACULTATEA DE MEDICINĂ DENTARĂ
DEPARTAMENTUL I**

POP (DĂNILĂ) I. ALEXANDRA-IOANA



TEZĂ DE DOCTORAT

**ASPECTE EXPERIMENTALE PRECLINICE
RELEVANTE ÎN PRACTICA DENTARĂ**

Coordonator științific
PROF. UNIV. DR. MIHAI ROMÎNU

**Timișoara
2024**

CUPRINS

CUPRINS	II
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT	1
1. INTRODUCERE	1
2. STADIUL ACTUAL AL CUNOȘTIINȚELOR.....	2
3. SCOPUL ȘI OBIECTIVELE TEZEI	8
4. CONTRIBUȚII PERSONALE	11
4.1. CARACTERIZAREA ȘI PROFILUL DE BIOSECURITATE AL EUGENOLULUI ÎNCORPORAT ÎN NANOPARTICULE DE OXID DE FIER	11
4.2. DEZVOLTAREA ȘI CARACTERIZAREA UNUI NANOSISTEM SOLID BAZAT PE CLORHEXIDINĂ ÎNCORPORATĂ ÎN NANOPARTICULE MAGNETICE	12
4.3. SCREENING TOXICOLOGIC <i>IN VITRO</i> ȘI <i>IN OVO</i> AL NANOSISTEMULUI MAGNETIC SOLID PENTRU ADMINISTRAREA CLORHEXIDINEI.....	14

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

1. INTRODUCERE

Dezinfectanții bucali joacă un rol crucial în practica stomatologică prin menținerea sănătății orale și prevenirea transmiterii infecțiilor. Clorhexidina (CHX) și clorura de cetilpiridiniu (CCP) sunt cele mai frecvent utilizate antiseptice datorită proprietăților lor antimicrobiene cu spectru larg. Cu toate acestea, CHX poate provoca efecte adverse precum modificări ale gustului, xerostomie și colorare, ceea ce poate reduce complianța pacienților. Alte antiseptice, precum povidona iodată (PVP-I), împreună cu agenți tradiționali precum hipocloritul de sodiu și peroxidul de hidrogen, sunt, de asemenea, utilizate în stomatologie.

Produsele naturale și pe bază de plante sunt studiate din ce în ce mai mult pentru proprietățile lor antimicrobiene. Eugenolul (EUG), derivat din uleiul de cuișoare, este utilizat în stomatologie pentru efectele sale analgezice, antiinflamatorii, antimicrobiene și antioxidante. Calitățile sale analgezice sunt deosebit de utile pentru gestionarea durerii dentare. Cu toate acestea, utilizarea EUG nu este lipsită de riscuri, deoarece poate provoca reacții adverse precum dermatită alergică de contact și hipersensibilitate la unii pacienți și profesioniști din domeniul dentar.

Medicii stomatologi trebuie să fie conștienți de potențialele efecte secundare ale dezinfectanților bucali și să monitorizeze pacienții pentru reacții adverse. Progresele recente au dus la dezvoltarea nanoparticulelor și a filmelor biocompozite care sporesc stabilitatea și eficacitatea dezinfectanților bucali, reducând în același timp volatilitatea acestora. Aceste inovații evidențiază cercetările în curs care vizează optimizarea utilizării dezinfectanților bucali în stomatologie, echilibrând beneficiile terapeutice cu reducerea riscurilor. Nanosistemele solide, cum ar fi nanoparticulele lipidice, nanoparticulele polimerice, purtătorii pe bază de chitosan, nanoparticulele de argint și nanoparticulele de oxid de fier sunt promițătoare pentru îmbunătățirea administrării medicamentelor, a biodisponibilității, a direcționării către zone

specifice și a minimizării efectelor secundare în comparație cu metodele convenționale.

Această teză vizează proiectarea, caracterizarea și evaluarea *in vitro* a nanoparticulelor de oxid de fier încorporate în eugenol (NP@EUG) pe o linie celulară sănătoasă (JB6 Cl 105 41-5a - celule epidermice murinice). Studiul va compara efectele NPs@EUG cu eugenolul (EUG) singur și cu nanoparticulele de oxid de fier (NPs) goale pentru a determina dacă încorporarea EUG în nanomaterial reduce citotoxicitatea acestuia. Aceste metode experimentale reprezintă un pas preliminar către utilizarea mai eficientă a EUG în domeniul medical.

S-a proiectat și investigat clorhexidina (CHX) încapsulată în nanoparticule de maghemită (CHX-NPS) pentru a reduce toxicitatea și a spori în același timp eficacitatea antimicrobiană. Au fost efectuate examinări toxicologice *in vitro* și *in ovo* pentru a demonstra capacitatea nanoparticulelor de maghemită de a îmbunătăți biodisponibilitatea CHX. Modelele *in vitro* au inclus keratinocite umane HaCaT și celule epidermice murinice JB6, care au fost expuse la maghemită NPS, CHX-NPS și o soluție de CHX 2%. Screeningul *in ovo* a utilizat testul HET-CAM pentru a evalua potențialul iritant asupra membranei corioalantoide a ouălor de găină. Rezultatele vor contribui la confirmarea siguranței și biocompatibilității nanosistemului purtător de CHX, având în vedere utilizarea pe scară largă a CHX ca antiseptic în aplicații dentare și cutanate.

2. STADIUL ACTUAL AL CUNOȘȚINȚELOR

Dezinfectanții bucali sunt esențiali în cabinetele stomatologice pentru a preveni infecțiile încrucișate și a asigura siguranța pacienților. Alegerea dezinfectanților potriviți ajută la minimizarea riscului de boli precum tuberculoza. Dezinfectarea suprafețelor și a instrumentelor între pacienți este esențială pentru menținerea standardelor de igienă. Centrul pentru Controlul și Prevenirea Bolilor (CCPB) pune accentul pe tratarea tuturor pacienților ca fiind potențial infecțioși, necesitând protocoale stricte de dezinfecție. Cu toate acestea, conformitatea este adesea inconsecventă; de exemplu, doar 18% dintre stomatologi dezinfectează în mod obișnuit amprente orale înainte de a

le trimite la laboratoare. Asociația dentară britanică (British Dental Association) subliniază importanța controlului infecțiilor, inclusiv dezinfectarea amprentelor, fiind o etapă fundamentală pentru practica stomatologică. Mulți profesioniști din domeniul dentar nu au o înțelegere solidă a protocoalelor de dezinfecție, ceea ce duce la creșterea riscurilor de infecție încrucișată. Intervențiile educaționale sunt vitale pentru a îmbunătăți gradul de conștientizare și de conformitate în ceea ce privește controlul infecțiilor.

Metodele de dezinfecție în cabinetele stomatologice variază, dezinfecția prin imersie și prin pulverizare fiind cele mai comune. Imersia este preferată pentru a asigura contactul complet cu toate suprafețele, în timp ce dezinfecția prin pulverizare poate lăsa zone netratate. Alegerea dezinfectantului este esențială, deoarece anumiți dezinfectanți pot afecta negativ proprietățile materialelor de amprentă, cum ar fi hidrocoloizii ireversibili. Acest lucru subliniază necesitatea ca medicii stomatologi să aleagă dezinfectanți care să elimine eficient agenții patogeni, menținând în același timp integritatea materialului. Absența unui protocol universal de dezinfecție complică situația, deoarece materialele diferite reacționează diferit. În plus, tehnicienii dentari dezinfectează adesea protezele înainte de a le trimite în clinici, ceea ce demonstrează o sensibilizare sporită cu privire la controlul infecțiilor. Cu toate acestea, re-dezinfectarea amprentelor în laboratoare poate risca să le deterioreze și să compromită acuratețea.

Dezinfectanții bucali sunt esențiali în practica dentară pentru menținerea igienei și prevenirea infecțiilor în timpul procedurilor. Eficacitatea lor antimicrobiană, biocompatibilitatea și metodele de aplicare sunt esențiale pentru siguranța pacienților și succesul tratamentului. Medicii stomatologi trebuie să fie atenți la potențiala rezistență a bacteriilor orale ca urmare a utilizării continue a dezinfectanților. Clasificarea dezinfectanților bucali în funcție de compoziția chimică dezvăluie modul lor de acțiune: compușii halogenați (de exemplu, hipocloritul de sodiu, soluțiile de iod) vizează în mod eficient bacteriile, ciupercile și virusurile; alcoolii sunt utilizați pentru dezinfecția suprafețelor datorită acțiunii lor rapide; compușii fenolici combat în mod eficient bacteriile patogene, ceea ce îi face potriviți pentru curățarea instrumentelor; agenții oxidanți precum peroxidul de hidrogen sunt utilizați pentru dezinfecție și albire în practica stomatologică.

Clorhexidina (CHX), în special în forma sa de gluconat, este un antiseptic de referință în stomatologie, eficient împotriva unei varietăți de microbi și cunoscut pentru impactul său durabil asupra țesuturilor orale. Acesta reduce în mod eficient bacteriile cariogene precum *Streptococcus mutans*, care este asociat cu cariile dentare. O concentrație de 0,12% este utilizată pentru dezinfectia de rutină, în timp ce 2% este pentru problemele parodontale severe. CHX perturbă membranele celulelor bacteriene, provocând moartea celulelor, și aderă la suprafețele orale, oferind o inhibare prelungită a formării plăcii bacteriene și este sigură pentru spălăturile bucale și procedurile dentare. Apa de gură cu clorhexidină ajută, de asemenea, la reducerea mucozitei orale la pacienții cu chimioterapie prin formarea unei bariere protectoare pe suprafețele mucoasei. Aceasta reduce în mod eficient încărcătura microbiană în cavitatea bucală și este recomandată pentru clătirile preprocedurale pentru a reduce încărcăturile virale, inclusiv nivelurile salivare ale SARS-CoV-2. Studiile indică faptul că clătirile bucale cu 2% clorhexidină oferă o eficacitate superioară. Aceasta este utilizată în mod obișnuit ca irigant în tratamentele canalelor radiculare și ajută la prevenirea formării biofilmului, contribuind la sănătatea orală generală. Cu toate acestea, poate provoca efecte secundare precum alterarea gustului, colorarea dinților și iritarea mucoaselor, ceea ce poate afecta complianța pacienților.

Produsele naturale și pe bază de plante sunt explorate tot mai mult pentru proprietățile lor antimicrobiene, alături de dezinfectanții chimici tradiționali. Compușii din plante precum neemul, cuișoarele și guava prezintă potențial ca dezinfectanți bucali, oferind o abordare holistică a igienei orale cu acțiune antimicrobiană eficientă și risc redus de efecte adverse ale agenților sintetici.

Eugenolul, derivat din uleiul de cuișoare, este utilizat pe scară largă în stomatologie pentru proprietățile sale farmacologice. Este esențial în obturațiile temporare, în tratamentele canalelor radiculare și ca sedativ pulpar, în principal în cimenturile oxid de zinc-eugenol (ZOE), cunoscute pentru efectele lor sedative și antibacteriene. Eugenolul ajută la gestionarea durerii dentare și are proprietăți antiinflamatorii prin eliminarea speciilor reactive de oxigen. Activitatea sa antibacteriană semnificativă împotriva agenților patogeni precum *Streptococcus mutans* este deosebit de valoroasă în tratamentele endodontice. Cercetările privind eugenolul evidențiază aplicațiile sale în

stomatologia restaurativă și în tratamentele parodontale datorită proprietăților sale vindecătoare, cercetările în curs investigând efectele sale sinergice cu alți compuși naturali pentru îmbunătățirea rezultatelor pentru pacienți. Cementul oxid de zinc-eugenol (ZOE) este preferat pentru izolarea termică și efectele sale calmante asupra pulpei în timpul tratamentului pulpitei. Proprietățile sale analgezice ajută la ameliorarea durerilor de dinți prin inhibarea căilor de semnalizare a durerii. Progresele recente în domeniul materialelor pe bază de eugenol au îmbunătățit compozitele dentare și cimenturile osoase ortopedice, sporind biocompatibilitatea și rezistența mecanică. În plus, eugenolul este util în procedurile de albire pentru reducerea sensibilității, iar eugenolul nanoîncapsulat în agenți de desensibilizare este promițător pentru atenuarea disconfortului postoperator. Metacrilatul de eugenil, un derivat al eugenolului, îmbunătățește proprietățile antimicrobiene ale adezivilor dentari, dar ridică probleme privind rezistența restaurării în timpul polimerizării. Citotoxicitatea eugenolului este un motiv de îngrijorare; în timp ce concentrațiile scăzute sunt sigure, nivelurile ridicate pot deteriora ADN-ul fibroblastelor din pulpa dentară. O gestionare atentă a concentrațiilor este necesară în cementul oxid de zinc-eugenol (ZOE), care oferă beneficii antiinflamatorii și anestezice, dar poate fi citotoxic la niveluri ridicate. Progresele recente, cum ar fi nanoîncapsularea, au îmbunătățit stabilitatea și eficacitatea eugenolului în stomatologie. Eugenolul nanoîncapsulat poate atenua sensibilitatea dentară după albire, menținând în același timp eficacitatea agenților de albire. În plus, eugenolul prezintă proprietăți antitumorale, în special în ceea ce privește inducerea apoptozei în celulele canceroase, indicând un potențial în terapiile adjuvante pentru cancerul oral.

Utilizarea nanosistemelor solide, cum ar fi nanoparticulele lipidice solide (SLN) și purtătorii lipidici nanostructurați (NLC), a câștigat atenție pentru administrarea medicamentelor datorită capacității lor de a spori biodisponibilitatea și eficacitatea terapeutică. Aceste nanosisteme pe bază de lipide pot încapsula atât medicamente hidrofille, cât și lipofile, reducând toxicitatea și efectele secundare. SLN-urile oferă un mediu stabil pentru eliberarea susținută a medicamentului, în timp ce NLC-urile combină lipide solide și lichide pentru a îmbunătăți capacitatea de încărcare și stabilitatea medicamentului. Această compoziție dublă abordează probleme precum solubilitatea redusă și eficiența scăzută a încărcării. În plus, ele protejează

medicamentele sensibile de degradare, cresc solubilitatea și permit eliberarea controlată, îmbunătățind complianța pacienților și rezultatele terapeutice.

Nanoparticulele polimerice joacă un rol crucial în aplicațiile dentare ca sisteme versatile de administrare a medicamentelor. Fabricate atât din polimeri naturali, cât și sintetici, opțiunile naturale precum chitosanul sunt preferate pentru proprietățile lor biocompatibile și antimicrobiene. Nanoparticulele de chitosan îmbunătățesc administrarea medicamentelor în adezivii și membranele dentare, promovează regenerarea țesuturilor și ajută la prevenirea creșterii microbiene. Capacitatea lor de a forma geluri în salivă îmbunătățește retenția medicamentului la locul țintă.

Încapsularea medicamentelor în nanoparticule le sporește stabilitatea, eficacitatea și reduce efectele secundare. Nanosistemele multifuncționale pot furniza mai mulți agenți, cum ar fi agenți antimicrobieni și antiinflamatori pentru tratamentul parodontal, sporind eficacitatea și conformitatea prin reducerea frecvenței de administrare. Nanosistemele solide sunt, de asemenea, promițătoare în diagnosticarea precoce a cancerului oral, utilizând nanoparticule funcționalizate cu agenți de imagistică. Nanoparticulele magnetice sunt studiate pentru RMN-ul neinvaziv al leziunilor orale. Efectul de permeabilitate și retenție îmbunătățite (EPR) permite nanoparticulelor să se acumuleze preferențial în țesuturile tumorale, îmbunătățind administrarea țintită și reducând toxicitatea.

Integrarea tehnologiilor precum imprimarea 3D în dezvoltarea nanosistemelor permite un control precis asupra formulării și eliberării medicamentelor, sprijinind medicina personalizată.

Nanoparticulele lipidice solide (SLN) și purtătorii lipidici nanostructurați (NLC), fabricați din lipide naturale, sporesc biocompatibilitatea și minimizează reacțiile adverse ca purtători de medicamente. Modificarea proprietăților lor de suprafață poate îmbunătăți interacțiunile cu membranele biologice, crescând absorbția celulară și eficiența administrării medicamentelor. Aceste nanosisteme solide pot penetra barierele biologice, îmbunătățind retenția și biodisponibilitatea medicamentelor, permițând în același timp eliberarea controlată pentru niveluri terapeutice susținute. Cu toate acestea, scalabilitatea, reproductibilitatea și provocările de reglementare rămân, împreună cu necesitatea unor cercetări suplimentare privind stabilitatea și siguranța pe termen lung pentru utilizarea cronică.

Nanoparticulele de oxid de fier (IONP) sunt importante în practica dentară, în principal ca agenți antimicrobieni împotriva agenților patogeni precum *Escherichia coli* și *Staphylococcus aureus*. Cercetările au arătat că acestea combat în mod eficient *Escherichia coli*, reduc formarea biofilmelor de *Staphylococcus aureus* și *Pseudomonas aeruginosa* la concentrații mai mari și omoară în mod semnificativ bacteriile din biofilme, subliniind potențialul lor pentru gestionarea infecțiilor dentare. Ele generează specii reactive de oxigen (SRO) care perturbă membranele bacteriene și sporesc proprietățile mecanice ale materialelor dentare, îmbunătățind rezistența rășinilor compozite pentru stomatologia restaurativă. În endodonție, IONP pot penetra și elimina biofilmele din canalele radiculare, crescând ratele de succes ale tratamentului și reducând riscurile de infecție post-tratament atunci când sunt utilizate în soluții de irigare. De asemenea, ele pot îmbunătăți materialele de etanșare și obturare. Încorporarea IONP în biomateriale a fost, de asemenea, asociată cu osteogeneza îmbunătățită, esențială pentru succesul implanturilor dentare. IONP oferă beneficii potențiale, dar prezintă riscuri toxicologice care necesită o evaluare atentă. Expunerea sistemică poate afecta răspunsurile imunitare, în special la persoanele cu afecțiuni preexistente. Dimensiunile și straturile diferite ale acestora conduc la niveluri de toxicitate diferite, subliniind importanța evaluărilor siguranței înainte de aplicațiile clinice. În plus, proprietățile enzimaticale ale IONP ar putea fi utilizate pentru tratamente dentare inovatoare care vizează infecțiile și promovează vindecarea.

Nanoparticulele de oxid de fier superparamagnetice (SPION), magnetită (Fe_3O_4) și maghemită ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) sunt clasificate în funcție de mărime, proprietăți magnetice și modificări de suprafață, fiecare fiind adaptată pentru aplicații dentare specifice. Metodele de sinteză pentru nanoparticulele de oxid de fier (IONP), cum ar fi coprecipitarea, sinteza hidrotermală și sinteza ecologică, influențează în mare măsură proprietățile și aplicațiile acestora. Prin modificarea suprafețelor IONP, stabilitatea, biocompatibilitatea și activitatea antimicrobiană a acestora pot fi îmbunătățite, ceea ce contribuie la o mai bună integrare cu țesuturile dentare.

Nanoparticulele de oxid de fier, în special nanoparticulele superparamagnetice de oxid de fier (SPION), sunt biocompatibile și multifuncționale, ceea ce le face ideale pentru aplicații terapeutice și de diagnostic dentar. Eficacitatea lor în imagistică, administrarea de medicamente

și tratamentele antimicrobiene se bazează pe proprietăți precum dimensiunea, chimia suprafeței și caracteristicile magnetice. SPION-urile nu au magnetizare remanentă fără un câmp magnetic extern, ceea ce facilitează utilizarea lor în proceduri precum imagistica prin rezonanță magnetică (MRI) pentru a spori contrastul imagistic în structurile dentare.

Nanoparticulele de magnetită (Fe_3O_4) sunt deosebit de valoroase în stomatologie datorită stabilității lor ridicate, biocompatibilității și proprietăților antimicrobiene, care îmbunătățesc administrarea medicamentelor și ajută la prevenirea infecțiilor în timpul procedurilor.

Nanoparticulele de maghemită ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) sunt, de asemenea, importante, oferind o susceptibilitate magnetică ridicată și o chimie de suprafață adaptată pentru o mai bună interacțiune biologică. Acestea sunt eficiente în administrarea de medicamente și în imagistică, sprijinind diverse tratamente dentare.

Administrația pentru alimente și medicamente (FDA) a aprobat mai multe formulări de IONP pentru utilizare clinică, indicând siguranța și eficacitatea acestora. Se preconizează că progresele în nanotehnologie vor conduce la IONP mai sigure și mai eficiente pentru diverse aplicații dentare, îmbunătățind rezultatele pentru pacienți în domeniul stomatologiei.

3. SCOPUL ȘI OBIECTIVELE TEZEI

Scopul acestei teze de doctorat a fost sinteza, caracterizarea și evaluarea biologică a unui nanosistem solid pentru administrarea de eugenol și clorhexidină, două dezinfectante orale des folosite. Scopul a fost de a reduce toxicitatea, sporind în același timp eficacitatea antimicrobiană prin screening toxicologic *in vitro* și *in ovo*. La sfârșitul experimentelor, se poate demonstra versatilitatea nanosistemului purtător de medicament obținut (nanoparticule de oxid de fier), care îmbunătățește biodisponibilitatea dezinfectantului oral.

Noutatea acestei teze de doctorat constă în faptul că cercetarea de față contribuie la domeniul dezinfectanților bucali, concentrându-se pe clorhexidină și eugenol, care pot avea efecte secundare la concentrații ridicate. Un aspect nou al cercetării este utilizarea pentru prima dată în literatura de specialitate a nanoparticulelor de hematită ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$) alături de nanoparticulele de maghemită ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) ca sistem de transport al

medicamentelor. Hematita este cel mai stabil oxid de fier chimic la temperatura camerei, prezentând proprietăți feromagnetice sau antiferomagnetice slabe. Acest studiu urmărește să livreze clorhexidină și eugenol în mod eficient în cavitatea bucală, minimizând în același timp efectele secundare și îmbunătățind proprietățile terapeutice.

Al treilea aspect demn de noutate este reprezentat de investigațiile efectuate *in ovo*. Considerăm că studiul nostru de cercetare este primul care raportează investigații privind posibilele efecte iritante ale acestui tip de nanosistem solid purtător de dezinfectanți orali, prin utilizarea membranei corioalantoide a oului de găină.

În plus, în cadrul scopului acestei teze, se oferă o prezentare detaliată privind:

- i) proiectarea, caracterizarea și evaluarea *in vitro* ulterioară a nanoparticulelor de oxid de fier încorporate în EUG (NP@EUG) pe o linie celulară sănătoasă (JB6 Cl 105 41-5a - celule epidermice murinice) și analiza rezultatelor în comparație cu efectele produse doar de EUG, precum și de NP goale pentru a observa dacă citotoxicitatea EUG poate fi redusă prin încorporarea acesteia în nanomateriale. Rezultatele obținute au fost prezentate în capitolul 2 din cadrul părții speciale a tezei de doctorat.
- ii) sinteza și investigarea CHX încapsulată în nanoparticule de maghemită (CHX-NPS) pentru a reduce toxicitatea CHX și a spori eficacitatea terapeutică. Noul nanosistem magnetic a fost analizat utilizând metode precum spectroscopia în infraroșu cu transformată Fourier (FT-IR) pentru a identifica moleculele funcționale de clorhexidină și microscopia electronică pentru a examina morfologia și ultrastructura acestuia. Rezultatele detaliate sunt prezentate în capitolul 3 din cadrul părții speciale a tezei de doctorat.
- iii) evaluarea versatilității nanosistemelor pe bază de nanoparticule de maghemită în creșterea biodisponibilității clorhexidinei prin screening toxicologic *in vitro* și *in ovo*. Modelele *in vitro* au inclus keratinocite umane sănătoase HaCaT și celule epidermice murine JB6 Cl 41-5a, evaluate la 24 de ore după

expunerea la NPS maghemite, CHX-NPS și o soluție de CHX cu concentrație ridicată (2%). Testarea *in ovo* a utilizat testul HET-CAM pentru a verifica efectele iritante asupra membranei corioalantoide a ouălor de găină. Rezultatele detaliate sunt prezentate în capitolul 4 din cadrul părții speciale a tezei de doctorat.

În ceea ce privește **noutatea și originalitatea acestei teze de doctorat**, aceasta a evaluat un screening toxicologic complex *in vitro* și *in ovo* a două tipuri de nanoparticule de oxid de fier acoperite cu clorohexidină și eugenol, concentrându-se pe efectul lor terapeutic îmbunătățit. Un rezumat al schiței tezei este prezentat mai jos (figura II.1.1).

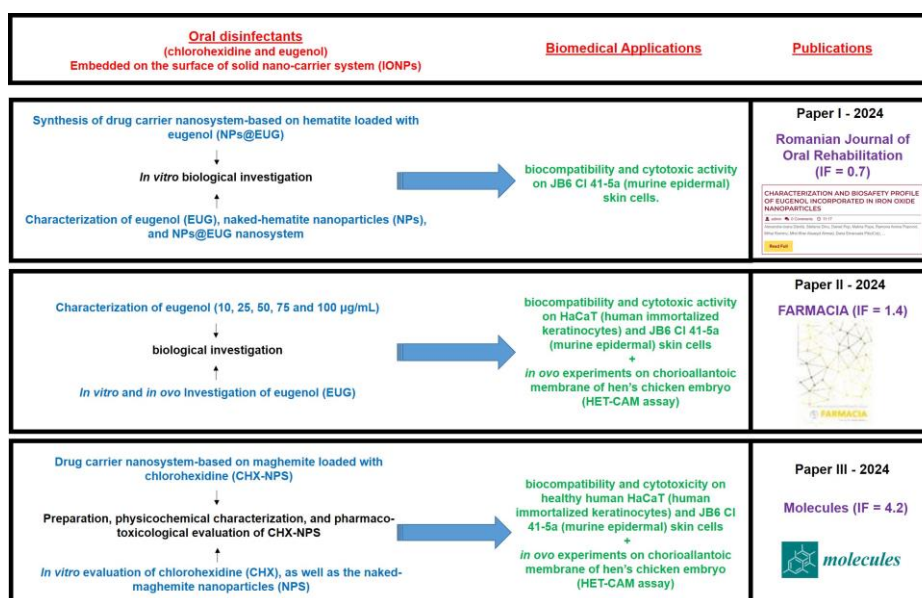


Figura II.1.1. Schița întregii teze de doctorat, domeniul de aplicare și lucrările publicate.

4. CONTRIBUȚII PERSONALE

4.1. CARACTERIZAREA ȘI PROFILUL DE BIOSECURITATE AL EUGENOLULUI ÎNCORPORAT ÎN NANOPARTICULE DE OXID DE FIER

Capitolul 2 prezintă un studiu elaborat pentru prima dată cu privire la o formulă bazată pe nanoparticule de oxid de fier obținute prin metoda combustiei, încorporate pe suprafața lor cu eugenol. Formularea preparată a fost caracterizată prin investigații de microscopie electronică, urmate de o evaluare *in vitro* suplimentară în ceea ce privește biosecuritatea utilizării acestora pe o linie celulară epidermică murinică sănătoasă. Rezultatele obținute au arătat că nanoparticulele de oxid de fier gol sunt biocompatibile și sigure pentru utilizarea pe linia celulară epidermică murinică sănătoasă, în timp ce compusul eugenol prezintă o citotoxicitate dependentă de doză, atingând o valoare de ~17% la cea mai mare doză testată (100 µg/mL). În plus, citotoxicitatea eugenolului a scăzut atunci când acesta a fost încorporat pe suprafața nanoparticulelor de oxid de fier, înregistrând o valoare de 11% la cea mai mare concentrație testată.

Prin urmare, eugenolul ar putea fi utilizat cu succes în practica dentară datorită proprietăților sale analgezice, antiinflamatorii și antimicrobiene. Cu toate acestea, citotoxicitatea potențială și reacțiile adverse asociate cu eugenolul necesită o analiză atentă și o cercetare continuă pentru optimizarea utilizării sale. Pe măsură ce progresele în știința materialelor și farmacologie continuă să evolueze, rolul eugenolului în stomatologie se va extinde probabil, oferind noi oportunități de îmbunătățire a îngrijirii pacienților și a rezultatelor tratamentului. Datorită proprietăților sale în practica dentară, efectele sale analgezice, antiinflamatorii și antimicrobiene contribuie în mod semnificativ la rolul său în gestionarea durerii și controlul infecțiilor.

În concluzie, studiile *in vitro* privind astfel de tipuri de formulări în stomatologie evidențiază aplicațiile multifacetate ale nanoparticulelor de oxid de fier, precum și ale eugenolului, subliniind potențialul acestora pentru avansarea tratamentelor și diagnosticării dentare. Cercetările în curs privind sistemele de livrare și formulările inovatoare vor spori probabil potențialul

terapeutic al eugenolului, asigurând relevanța sa continuă în stomatologia modernă.

Primul studiu de cercetare ("**Caracterizarea și profilul de biosecuritate al eugenolului încorporat în nanoparticule de oxid de fier**") evidențiază necesitatea urgentă de a utiliza dezinfectantul oral de tip compus fenolic obținut din plante, în practica stomatologică, într-un mod sigur pentru pacient. Pentru aceasta, nanoparticulele de hematită au fost utilizate ca suport pentru administrarea în condiții de siguranță a eugenolului.

Principalele constatări cheie prezentate în capitolul 1 au fost:

- ✚ **Profil bun de biosecuritate pentru nanocarrier** – celulele JB6 Cl 41-5a (celule epidermice murinice sănătoase) au fost expuse la concentrația maximă de nanoparticule de oxid de fier (100 µg/mL), iar rezultatele au arătat că nanoparticulele goale de oxid de fier (hematită) sunt biocompatibile și sigure pentru utilizarea pe linia celulară epidermică murinică sănătoasă.
- ✚ **Toxicitate redusă pentru dezinfectantul oral** – noua formulă preparată (NP@EUG) pare să reducă citotoxicitatea EUG asupra celulelor epidermice. Această constatare a fost evidențiată de o viabilitate celulară mai mare în urma tratamentului cu NPs@EUG comparativ cu EUG singur, cu mai puține modificări morfologice și scurgeri mai mici de LDH.
- ✚ În general, se poate afirma că eugenolul încorporat pe suprafața nanoparticulelor de oxid de fier reprezintă o alternativă cu un profil de siguranță îmbunătățit pentru dezinfectantul oral utilizat în practica dentară.

4.2. DEZVOLTAREA ȘI CARACTERIZAREA UNUI NANOSISTEM SOLID BAZAT PE CLORHEXIDINĂ ÎNCORPORATĂ ÎN NANOPARTICULE MAGNETICE

Capitolul 3 prezintă dezvoltarea și caracterizarea fizico-chimică a unui nanosistem solid bazat pe clorhexidină încorporată în nanoparticule magnetice de oxid de fier (maghemită), obținute prin metoda combustiei.

Clorhexidina este o componentă integrantă a practicii dentare moderne, oferind beneficii semnificative în prevenirea și gestionarea bolilor orale.

Activitatea sa antimicrobiană cu spectru larg, împreună cu capacitatea sa de a reduce placa bacteriană și gingivita, subliniază statutul său de standard de aur în domeniul apei de gură dentare. Deși există un potențial de efecte secundare, cercetările în curs continuă să rafineze utilizarea acesteia și să exploreze alternative care pot completa sau spori efectele sale terapeutice. Integrarea clorhexidinei în protocoalele de îngrijire dentară de rutină reflectă importanța acesteia în promovarea sănătății orale și prevenirea bolilor. Rolul clorhexidinei se extinde dincolo de controlul plăcii bacteriene. Ea a fost utilizată în studii clinice, inclusiv pentru dezinfectia preoperatorie în chirurgia dentară și ca măsură preventivă la pacienții cu risc ridicat de carie sau la cei supuși unui tratament ortodontic. Acest lucru este deosebit de important în contextul controlului infecțiilor, în special având în vedere provocările continue reprezentate de infecțiile nosocomiale în cabinetele stomatologice.

Al doilea studiu de cercetare (**“Dezvoltarea și caracterizarea unui nanosistem solid bazat pe clorhexidină încorporată în nanoparticule magnetice”**), evidențiază utilizarea unei matrice magnetice bazate pe nanoparticule de oxid de fier (maghemită) pentru administrarea clorhexidinei. Clorhexidina este un alt dezinfectant considerat standardul de aur în stomatologie, cu proprietăți antimicrobiene bine stabilite. Pentru aceasta, un alt tip de oxid de fier (maghemită – un compus cu proprietăți superparamagnetice) a fost utilizat ca suport pentru administrarea dezinfectantului oral.

Principalele constatări cheie prezentate în capitolul 2 au fost:

- ✚ **Formarea nanosistemului magnetic** pe bază de nanoparticule de oxid de fier încorporate cu soluție de clorhexidină 2% – s-a demonstrat atașarea soluției de clorhexidină 2% pe suprafața nanoparticulelor de maghemită prin spectroscopie FT-IR, prin picul de absorbție situat la 520,78/cm, vizibil pe ambele spectre, care, a evidențiat prezența grupărilor funcționale de întindere C-Cl din soluția CHX.
- ✚ **Dimensiunea nanometrică și forma sferică** – s-a demonstrat că nanosistemul CHX-NPS se afla în domeniul nanometric ($10 \pm 1,8$ nm) cu o formă aproape sferică de $1,24 \pm 0,3$, determinată din imaginea TEM. În plus, în ceea ce privește analiza EDX, rezultatele au arătat prin cartografierea EDS pentru nanosistemul CHX-NPS prezența atomilor de Fe, O și C.

- ✚ În general, se poate afirma că am obținut cu succes un nanosistem magnetic bazat pe nanoparticule de maghemită, pentru administrarea de clorhexidină, cu toxicitate minimă și efect terapeutic îmbunătățit.

4.3. SCREENING TOXICOLOGIC *IN VITRO* ȘI *IN OVO* AL NANOSISTEMULUI MAGNETIC SOLID PENTRU ADMINISTRAREA CLORHEXIDINEI

Capitolul 4 prezintă screeningul toxicologic *in vitro* și *in ovo* al nanosistemului CHX-NPS sintetizat, al matricei purtătoare (maghemită NPS) și al medicamentului care urmează să fie administrat (soluție de CHX), prin utilizarea a două tipuri de linii celulare – keratinocite umane imortalizate HaCaT și celule epidermice murine JB6 Cl 41-5a.

După caracterizarea nanosistemului CHX-NPS sintetizat prin spectroscopie FTIR și microscopie electronică, rezultatele *in vitro* au arătat că eficacitatea antimicrobiană a CHX a fost îmbunătățită atunci când a fost administrată printr-un sistem la scară nanometrică, cu biodisponibilitate îmbunătățită și toxicitate redusă atunci când a fost testat noul nanosistem CHX-NPS. Screeningul *in ovo* a arătat că nanosistemul CHX-NPS nu a provocat niciun semn de iritație asupra vasculaturii membranei corio-palantoide și a fost clasificat ca substanță neiritantă. În ciuda acestui fapt, cercetările viitoare ar trebui să se concentreze pe optimizarea acestui tip de nanosistem și pe efectuarea unor studii *in vivo* cuprinzătoare pentru validarea eficacității și siguranței lor terapeutice în contexte clinice.

În concluzie, clorhexidina rămâne un instrument vital în stomatologia modernă, recunoscut pentru eficacitatea sa în controlul plăcii dentare și prevenirea bolilor parodontale. Rolul său multifacțat cuprinde nu numai acțiunea antimicrobiană, ci și contribuții la controlul infecțiilor clinice și la gestionarea pacienților în cadrul diferitelor proceduri dentare. Cu toate acestea, potențialul de efecte adverse necesită o analiză atentă a aplicării sale, ceea ce determină cercetări continue în vederea optimizării utilizării sale și explorării terapiilor complementare.

Al treilea studiu de cercetare ("**Screening toxicologic *in vitro* și *in ovo* al nanosistemului solid pentru administrarea clorhexidinei**") subliniază rolul crucial al utilizării clorhexidinei în practica dentară.

Principalele constatări cheie prezentate în capitolul 3 au fost:

- ✚ **Activitate antimicrobiană îmbunătățită** – s-a afirmat că integrarea clorhexidinei în materialele dentare a reprezentat un progres semnificativ în îmbunătățirea proprietăților antimicrobiene ale acestora. Constatările noastre întăresc afirmația de mai sus, ceea ce înseamnă că rezultatele obținute *in vitro* au arătat că eficacitatea antimicrobiană a CHX a fost sporită atunci când a fost administrată printr-un sistem la scară nanometrică ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$). Nanosistemul CHX-NPS sintetizat a prezentat proprietăți bacteriostatice și bactericide îmbunătățite împotriva *E. coli*, *S. aureus* și *P. aeruginosa*, comparativ cu soluția CHX, testată la aceleași concentrații ca și nanosistemul sintetizat
- ✚ **Biodisponibilitate îmbunătățită și toxicitate redusă** – constatările noastre privind NPS de maghemită indică o toxicitate foarte scăzută în celulele murinice JB6 Cl 41-5a și în keratinocitele umane HaCaT, chiar și la cea mai mare concentrație testată – 100 $\mu\text{g/mL}$. În ceea ce privește toxicitatea *in vitro* a CHX, soluția de CHX a demonstrat un efect citotoxic dependent de doză și timp, caracterizat printr-o scădere semnificativă a viabilității celulelor și modificări nucleare de tip apoptotic, în timp ce nanosistemul CHX-NPS a arătat un efect citotoxic mai scăzut în comparație cu soluția de CHX, pe ambele linii celulare utilizate
- ✚ **Potențial neiritant** – screeningul toxicologic *in ovo* a arătat că NPS de maghemită, precum și nanosistemul CHX-NPS nou sintetizat, fac parte din categoria substanțelor neiritante, deoarece nu au produs semne de liză, coagulare sau hemoragie pe membrana corioalantoidă a oului de găină embrionat.
- ✚ În general, natura multifuncțională a IOMNPs permite administrarea simultană de clorhexidină și alți agenți terapeutici, ceea ce poate duce la efecte sinergice.

Caracterul original al tezei de doctorat este susținut de 3 lucrări științifice publicate în reviste ISI și indexate și PubMed (una dintre ele) cu I.F. cumulată = 6,3.

**“VICTOR BABEȘ” UNIVERSITY OF MEDICINE AND
PHARMACY FROM TIMIȘOARA
FACULTY OF DENTAL MEDICINE
1ST DEPARTMENT**

POP (DĂNILĂ) I. ALEXANDRA-IOANA



PhD THESIS

**RELEVANT PRECLINICAL EXPERIMENTAL
ASPECTS IN DENTAL PRACTICE**

Scientific Coordinator
PROF. UNIV. DR. MIHAI ROMÎNU

**Timișoara
2024**

TABLE OF CONTENTS

TABLE OF CONTENTS	II
SUMMARY OF THE PhD THESIS	1
1. INTRODUCTION.....	1
2. CURRENT STATE OF KNOWLEDGE.....	2
3. AIM AND OUTLINE	8
4. PERSONAL CONTRIBUTIONS.....	11
4.1. CHARACTERIZATION AND BIOSAFETY PROFILE OF EUGENOL INCORPORATED IN IRON OXIDE NANOPARTICLES.....	11
4.2. DEVELOPMENT AND CHARACTERIZATION OF A SOLID NANOSYSTEM BASED ON CHLORHEXIDINE EMBEDDED IN MAGNETIC NANOPARTICLES.....	12
4.3. <i>IN VITRO</i> AND <i>IN OVO</i> TOXICOLOGICAL SCREENING OF THE MAGNETIC SOLID NANOSYSTEM FOR CHLORHEXIDINE DELIVERY	14

SUMMARY OF THE PhD THESIS

1. INTRODUCTION

Oral disinfectants play a crucial role in dental practice by maintaining oral health and preventing infection transmission. Chlorhexidine (CHX) and cetylpyridinium chloride (CPC) are the most commonly used antiseptics due to their broad-spectrum antimicrobial properties. However, CHX can cause adverse effects like taste changes, xerostomia, and staining, which may reduce patient compliance. Other antiseptics, such as povidone-iodine (PVP-I), along with traditional agents like sodium hypochlorite and hydrogen peroxide, are also employed in dentistry.

Natural and herbal products are being increasingly studied for their antimicrobial properties. Eugenol (EUG), derived from clove oil, is used in dentistry for its analgesic, anti-inflammatory, antimicrobial, and antioxidant effects. Its analgesic qualities are particularly useful for managing dental pain. However, the use of EUG is not without risks, as it can cause adverse reactions such as allergic contact dermatitis and hypersensitivity in some patients and dental professionals.

Dental practitioners must be aware of the potential side effects of oral disinfectants and monitor patients for adverse reactions. Recent advancements have led to the development of nanoparticles and bio-composite films that enhance the stability and efficacy of oral disinfectants while reducing their volatility. These innovations highlight ongoing research aimed at optimizing oral disinfectant use in dentistry, balancing therapeutic benefits with risk mitigation. Solid nanosystems such as lipid nanoparticles, polymeric nanoparticles, chitosan-based carriers, silver nanoparticles, and iron oxide nanoparticles are promising for improving drug delivery, bioavailability, targeting specific sites, and minimizing side effects compared to conventional methods.

This thesis aims to design, characterize, and in vitro assess eugenol-incorporated iron oxide nanoparticles (NPs@EUG) on a healthy cell line (JB6 Cl 105 41-5a – murine epidermal cells). The study will compare the effects of

NPs@EUG with eugenol (EUG) alone and naked iron oxide nanoparticles (NPs) to determine if embedding EUG on the nanomaterial reduces its cytotoxicity. These experimental methods represent a preliminary step toward utilizing EUG more effectively in the medical field.

We designed and investigated chlorhexidine (CHX) encapsulated within maghemite nanoparticles (CHX-NPS) to reduce toxicity while enhancing antimicrobial efficacy. *In vitro* and *in ovo* toxicological screenings were performed to demonstrate the maghemite nanoparticles' capability to improve CHX bioavailability. The *in vitro* models included HaCaT human keratinocytes and JB6 murine epidermal cells, which were exposed to maghemite NPS, CHX-NPS, and a 2% CHX solution. The *in ovo* screening utilized the HET-CAM test to assess potential irritancy on the hen's egg chorioallantoic membranes. The results will help confirm the safety and biocompatibility of the CHX-carrier nanosystem, given CHX's widespread use as an antiseptic in dental and skin applications.

2. CURRENT STATE OF KNOWLEDGE

Oral disinfectants are essential in dental practices to prevent cross-infection and ensure patient safety. Choosing the right disinfectants helps minimize the risk of diseases like tuberculosis. Disinfecting surfaces and instruments between patients is critical for maintaining hygiene standards. The Center for Disease Control and Prevention (CDC) emphasizes treating all patients as potentially infectious, necessitating strict disinfection protocols. However, compliance is often inconsistent; for example, only 18% of dentists routinely disinfect oral impressions before sending them to labs. The British Dental Association highlights that infection control, including the disinfection of impressions, is fundamental to dental practice. Many dental professionals lack a solid understanding of disinfection protocols, resulting in higher risks of cross-infection. Educational interventions are vital to improve awareness and compliance in infection control.

Disinfection methods in dental practices vary, with immersion and spray disinfection being common. Immersion is preferred for ensuring complete contact with all surfaces, while spray disinfection may leave areas untreated.

The choice of disinfectant is crucial, as certain ones can negatively affect the properties of impression materials like irreversible hydrocolloids. This highlights the need for dental practitioners to choose disinfectants that effectively eliminate pathogens while maintaining material integrity. The absence of a universal disinfection protocol complicates matters, as different materials react differently. Additionally, dental technicians often disinfect prostheses before sending them to clinics, showcasing increased awareness of infection control. However, re-disinfecting impressions in laboratories can risk damaging them and compromising accuracy.

Oral disinfectants are essential in dental practice for maintaining hygiene and preventing infections during procedures. Their antimicrobial efficacy, biocompatibility, and application methods are crucial for patient safety and treatment success. Dental practitioners should be cautious of potential resistance from oral bacteria due to the continuous use of disinfectants. The classification of oral disinfectants by chemical composition reveals their modes of action: halogen compounds (e.g., sodium hypochlorite, iodine solutions) effectively target bacteria, fungi, and viruses; alcohols are used for surface disinfection due to their rapid action; phenolic compounds efficiently combat pathogenic bacteria, making them suitable for instrument cleaning; oxidizing agents like hydrogen peroxide are used for disinfection and bleaching in dental practice. Examples of disinfectant compounds include chlorhexidine (CHX), sodium hypochlorite, and peracetic acid.

Chlorhexidine (CHX), particularly in its gluconate form, is a gold-standard antiseptic in dentistry, effective against a variety of microbes and known for its lasting impact on oral tissues. It effectively reduces cariogenic bacteria like *Streptococcus mutans*, which is associated with dental caries. A 0.12% concentration is used for routine disinfection, while 2% is for severe periodontal issues. CHX disrupts bacterial cell membranes, causing cell death, and adheres to oral surfaces, providing prolonged inhibition of plaque formation and is safe for mouthwashes and dental procedures. Chlorhexidine mouthwash also aids in reducing oral mucositis in chemotherapy patients by forming a protective barrier on mucosal surfaces. It effectively reduces microbial load in the oral cavity and is recommended for pre-procedural rinses to lower viral loads, including salivary SARS-CoV-2 levels. Studies indicate that 2% chlorhexidine mouth rinses offer superior effectiveness. It's commonly used

as an irrigant in root canal treatments and helps prevent biofilm formation, contributing to overall oral health. However, it can cause side effects like taste alteration, tooth staining, and mucosal irritation, which may impact patient compliance.

Sodium hypochlorite is commonly used as an endodontic irrigant for disinfecting root canals due to its strong antimicrobial properties, while hydrogen peroxide is known for its bleaching effects and antimicrobial activity. Both agents reduce microbial load but require careful management to avoid damaging dental tissues. Peracetic acid shows promise in disinfecting dental impressions without altering material properties but is underutilized. Quaternary ammonium compounds like cetylpyridinium chloride (CPC) are used in mouthwashes and are effective against oral pathogens, though there are concerns about potential bacterial resistance. Povidone-iodine (PVP-I) also has broad-spectrum antimicrobial properties and is used in dental applications like treating oral mucositis and periodontitis. However, concerns about cytotoxicity in sensitive tissues limit its long-term use.

Ozone is gaining traction in dentistry for its oxidative properties, making it effective for periodontal therapy and root canal disinfection. As a potent oral disinfectant, it kills bacteria, viruses, and fungi and can be delivered as gas, ozonated water, or oil. Despite its antimicrobial effects and healing promotion, clinical use is limited by potential side effects and the need for further research.

Additionally, neutral electrolyzed water effectively disinfects alginate impressions and is safe for oral tissues, combining antimicrobial properties with minimal adverse effects. Research indicates that electrolyzed water (EOW) is more effective than traditional disinfectants like saline and tap water, with efficacy comparable to chlorhexidine and sodium hypochlorite.

Oral disinfectants can be classified by their mechanisms of action. Some disrupt microbial cell membranes, while others interfere with metabolic processes. For example, ozone generates reactive oxygen species that damage microbial cells, and cold atmospheric plasma (CAP) technology uses reactive species for disinfection and healing in oral tissues.

Natural and herbal products are being explored for their antimicrobial properties alongside traditional chemical disinfectants. Compounds from plants like neem, clove, and guava show potential as oral disinfectants, offering a

holistic approach to oral hygiene with effective antimicrobial action and reduced risk of adverse effects from synthetic agents.

Eugenol, derived from clove oil, is widely used in dentistry for its pharmacological properties. It is essential in temporary fillings, root canal treatments, and as a pulp sedative, primarily in zinc oxide-eugenol (ZOE) cements, known for their sedative and antibacterial effects. Eugenol helps manage dental pain and has anti-inflammatory properties by scavenging reactive oxygen species. Its significant antibacterial activity against pathogens like *Streptococcus mutans* is particularly valuable in endodontic treatments. Research on eugenol highlights its applications in restorative dentistry and periodontal treatments due to its healing properties, with ongoing research investigating its synergistic effects with other natural compounds for improved patient outcomes. Zinc oxide-eugenol (ZOE) cement is preferred for its thermal insulation and calming effects on the pulp during pulpitis treatment. Its analgesic properties help relieve toothache by inhibiting pain signaling pathways. Recent advancements in eugenol-based materials have improved dental composites and orthopedic bone cements, enhancing biocompatibility and mechanical strength. Additionally, eugenol is useful in bleaching procedures to reduce sensitivity, and nanoencapsulated eugenol in desensitizing agents shows promise for alleviating post-operative discomfort. Eugenyl methacrylate, a eugenol derivative, improves the antimicrobial properties of dental adhesives but poses challenges to restoration strength during polymerization. Eugenol's cytotoxicity is a concern; while low concentrations are safe, higher levels can damage DNA in dental pulp fibroblasts. Careful concentration management is needed in zinc oxide-eugenol (ZOE) cement, which provides anti-inflammatory and anesthetic benefits but can be cytotoxic at high levels. Recent advancements like nanoencapsulation have improved eugenol's stability and effectiveness in dentistry. Nanoencapsulated eugenol can alleviate dental sensitivity post-bleaching while maintaining the bleaching agents' efficacy. Furthermore, eugenol shows antitumor properties, especially in inducing apoptosis in cancer cells, indicating potential in adjunctive therapies for oral cancers.

The use of solid nanosystems, such as solid lipid nanoparticles (SLNs) and nanostructured lipid carriers (NLCs), has gained attention for drug delivery due to their ability to enhance bioavailability and therapeutic efficacy. These

lipid-based nanosystems can encapsulate both hydrophilic and lipophilic drugs, reducing toxicity and side effects. SLNs provide a stable environment for sustained drug release, while NLCs combine solid and liquid lipids to improve drug loading capacity and stability. This dual composition addresses challenges like poor solubility and low loading efficiency. Moreover, they protect sensitive drugs from degradation, increase solubility, and allow for controlled release, improving patient compliance and therapeutic outcomes.

Polymeric nanoparticles play a crucial role in dental applications as versatile drug delivery systems. Made from both natural and synthetic polymers, natural options like chitosan are preferred for their biocompatibility and antimicrobial properties. Chitosan nanoparticles enhance drug delivery in dental adhesives and membranes, promote tissue regeneration, and help prevent microbial growth. Their ability to form gels in saliva improves drug retention at the target site.

Encapsulating drugs in nanoparticles enhances their stability, efficacy, and reduces side effects. Multifunctional nanosystems can deliver multiple agents, such as antimicrobial and anti-inflammatory agents for periodontal treatment, increasing efficacy and compliance by reducing administration frequency. Solid nanosystems also hold promise in early oral cancer diagnostics, utilizing functionalized nanoparticles with imaging agents. Magnetic nanoparticles are being studied for non-invasive MRI of oral lesions. The enhanced permeability and retention (EPR) effect allows nanoparticles to preferentially accumulate in tumor tissues, improving targeted delivery and reducing toxicity.

Integrating technologies like 3D printing in nanosystem development allows for precise control over drug formulation and release, supporting personalized medicine.

Solid lipid nanoparticles (SLNs) and nanostructured lipid carriers (NLCs), made from natural lipids, enhance biocompatibility and minimize adverse reactions as drug carriers. Modifying their surface properties can improve interactions with biological membranes, increasing cellular uptake and drug delivery efficiency. These solid nanosystems can penetrate biological barriers, improving drug retention and bioavailability while enabling controlled release for sustained therapeutic levels. However, scalability, reproducibility,

and regulatory challenges remain, along with the need for further research on long-term stability and safety for chronic use.

Iron oxide nanoparticles (IONPs) are significant in dental practice, primarily as antimicrobial agents against pathogens like *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. Research has shown that they effectively combat *Escherichia coli*, reduce biofilm formation of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* at higher concentrations, and significantly kill bacteria in biofilms, highlighting their potential for managing dental infections. They generate reactive oxygen species (ROS) that disrupt bacterial membranes and enhance the mechanical properties of dental materials, improving the strength of composite resins for restorative dentistry. In endodontics, IONPs can penetrate and eliminate biofilms in root canals, boosting treatment success rates and reducing post-treatment infection risks when used in irrigation solutions. They can also enhance sealers and obturation materials. Incorporating IONPs into biomaterials has also been linked to enhanced osteogenesis, essential for successful dental implants. IONPs offer potential benefits but pose toxicological risks that need careful evaluation. Systemic exposure may affect immune responses, particularly in individuals with pre-existing conditions. Their varying sizes and coatings lead to different toxicity levels, emphasizing the importance of safety assessments before clinical applications. Additionally, IONPs' enzyme-like properties could be utilized for innovative dental treatments targeting infections and promoting healing.

IONPs are categorized by size, magnetic properties, and surface modifications, including superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs), magnetite (Fe_3O_4), and maghemite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), each tailored for specific dental applications. The synthesis methods for iron oxide nanoparticles (IONPs), such as co-precipitation, hydrothermal synthesis, and green synthesis, greatly influence their properties and applications. By modifying IONPs' surfaces, their stability, biocompatibility, and antimicrobial activity can be improved, which aids in better integration with dental tissues.

Iron oxide nanoparticles, especially superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs), are biocompatible and multifunctional, making them ideal for dental therapeutic and diagnostic applications. Their effectiveness in imaging, drug delivery, and antimicrobial treatments relies on properties like

size, surface chemistry, and magnetic characteristics. SPIONs lack remanent magnetization without an external magnetic field, facilitating their use in procedures like magnetic resonance imaging (MRI) to enhance imaging contrast in dental structures.

Magnetite (Fe_3O_4) nanoparticles are particularly valuable in dentistry due to their high stability, biocompatibility, and antimicrobial properties, which enhance drug delivery and help prevent infections during procedures.

Maghemite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) nanoparticles are also important, offering high magnetic susceptibility and tailored surface chemistry for better biological interaction. They are effective in drug delivery and imaging, supporting various dental treatments.

The Food and Drug Administration (FDA) has approved several IONP formulations for clinical use, indicating their safety and efficacy. Advances in nanotechnology are expected to lead to safer and more effective IONPs for various dental applications, enhancing patient outcomes in the field of dentistry.

3. AIM AND OUTLINE

The aim of this PhD thesis was the synthesis, characterization, and biological evaluation of a solid nanosystem for the delivery of eugenol and chlorohexidine, two oral disinfectants. The goal was to reduce toxicity while enhancing antimicrobial efficacy through *in vitro* and *in ovo* toxicological screening. At the end of the experiments, one can demonstrate the versatility of the obtained drug carrier nanosystem (iron oxide nanoparticles) which improves the oral disinfectant bioavailability.

The novelty of this PhD thesis counts on the fact that the present research contributes to the field of oral disinfectants, focusing on chlorohexidine and eugenol, which can have side effects at high concentrations. A novel aspect of the research is the use of hematite nanoparticles ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$) alongside maghemite nanoparticles ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) as a drug carrier system for the first time in literature. Hematite is the most chemically stable iron oxide at room temperature, exhibiting weak ferromagnetic or antiferromagnetic properties. This study aims to deliver

chlorohexidine and eugenol effectively into the oral cavity while minimizing side effects and enhancing therapeutic properties.

The third aspect worthy of novelty is represented by the *in ovo* investigations carried out. We believe that our research study is the first to report investigations of the possible irritating effects of this type of solid nanosystem carrying oral disinfectants, by using the chorioallantoic membrane of the hen's egg.

Further, within the aim of this thesis, a detailed overview is given concerning:

- i) the design, characterize, and further *in vitro* assessment of EUG-incorporated iron oxide nanoparticles (NPs@EUG) on a healthy cell line (JB6 Cl 105 41-5a – murine epidermal cells), and the analysis of the results in comparison with the effects produced by EUG alone, as well as by the naked NPs to observe if the EUG cytotoxicity can be reduced by embedding it in iron oxide nanoparticles. The obtained results were depicted in Chapter 2;
- ii) the synthesis and investigation of CHX encapsulated in maghemite nanoparticles (CHX-NPS) to reduce CHX toxicity and enhance therapeutic efficacy. The new magnetic nanosystem was analyzed using methods like Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) to identify chlorhexidine functional molecules and electron microscopy to examine its morphology and ultrastructure. Detailed results are found in Chapter 3.
- iii) evaluation of the versatility of maghemite nanoparticles-based nanosystems in enhancing chlorhexidine bioavailability through *in vitro* and *in ovo* toxicological screening. The *in vitro* models included healthy HaCaT human keratinocytes and JB6 Cl 41-5a murine epidermal cells, assessed 24 hours post-exposure to maghemite NPS, CHX-NPS, and a high concentration (2%) CHX solution. The *in ovo* testing used the HET-CAM test to check for irritant effects on hen's egg chorioallantoic membranes. Detailed results are in Chapter 4.

As far as the novelty and originality of this PhD thesis are concerned, it assessed a complex *in vitro* and *in ovo* toxicological screening of two types of iron oxide nanoparticles coated with chlorohexidine and eugenol, focusing on their enhanced therapeutic effect. A summary of the thesis outline is provided below (Figure II.1.1).

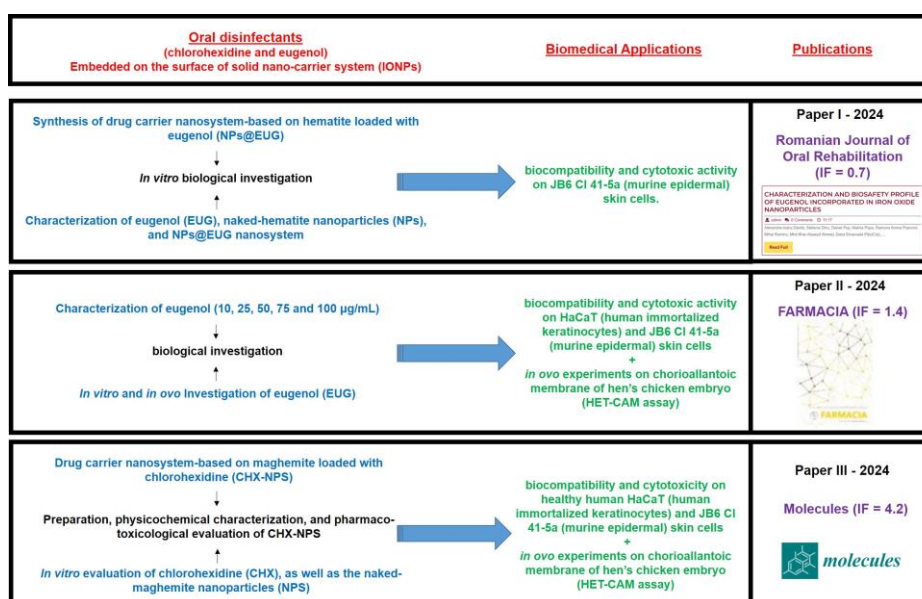


Figure II.1.1. Outline of the entire PhD thesis, field of applications, and the published papers.

4. PERSONAL CONTRIBUTIONS

4.1. CHARACTERIZATION AND BIOSAFETY PROFILE OF EUGENOL INCORPORATED IN IRON OXIDE NANOPARTICLES

Chapter 2 presents a study developed for the first time about a formulation based on iron oxide nanoparticles obtained through the combustion method, embedded on its surface with eugenol. The prepared formulation was characterized through electron microscopy investigations, followed by further *in vitro* evaluation as concerned with their biosafety use on a healthy murine epidermal cell line. The results obtained showed that the naked iron oxide nanoparticles are biocompatible and safe to use on the healthy murine epidermal cell line, while the eugenol compound exhibits a dose-dependent cytotoxicity reaching until a value of ~17% at the highest tested dose (100 µg/mL). In addition, the cytotoxicity of eugenol decreased when this was embedded on the iron oxide nanoparticles surface, recording a value of 11% at the highest concentration tested.

Therefore, eugenol could be used successfully in dental practice due to its analgesic, anti-inflammatory, and antimicrobial properties. However, the potential cytotoxicity and adverse reactions associated with eugenol necessitate careful consideration and ongoing research to optimize its use. As advancements in material science and pharmacology continue to evolve, eugenol's role in dentistry will likely expand, offering new opportunities for enhancing patient care and treatment outcomes. Due to its properties in dental practice, its analgesic, anti-inflammatory, and antimicrobial effects contribute significantly to its role in pain management and infection control.

In conclusion, the *in vitro* studies on such types of formulation in dentistry and dental medicine highlight their multifaceted applications of iron oxide nanoparticles as well as eugenol, emphasizing their potential for advancing dental treatments and diagnostics. Ongoing research into innovative delivery systems and formulations will likely enhance the therapeutic potential of eugenol, ensuring its continued relevance in modern dentistry.

The first research study (“**Characterization and biosafety profile of eugenol incorporated in iron oxide nanoparticles**”) highlights the pressing need for the use of the phenolic compound type oral disinfectant obtained from plants, in dental practice, in a safe manner for the patient. For this, hematite nanoparticles were used as a support for the safe delivery of eugenol.

The main key findings presented in Chapter 2 were:

- ✚ **Good biosafety profile for the nanocarrier** – the JB6 Cl 41-5a cells (healthy murine epidermal cells) were exposed at the maximum concentration of iron oxide nanoparticles (100 µg/mL) and the results showed that the naked iron oxide nanoparticles (hematite) are biocompatible and safe to use on the healthy murine epidermal cell line.
- ✚ **Reduced toxicity for the oral disinfectant** – the newly prepared formulation (NPs@EUG) appears to reduce the cytotoxicity of EUG on the epidermal cells. This finding was evidenced by higher cell viability following the NPs@EUG treatment compared to EUG alone, with fewer morphologic alterations and lower LDH leakages.
- ✚ Overall one can affirm that the eugenol embedded on the surface of iron oxide nanoparticles represents an alternative with an improved safety profile for oral disinfectant used in dental practice.

4.2. DEVELOPMENT AND CHARACTERIZATION OF A SOLID NANOSYSTEM BASED ON CHLORHEXIDINE EMBEDDED IN MAGNETIC NANOPARTICLES

Chapter 3 reports the development and physicochemical characterization of a solid nanosystem based on chlorhexidine embedded in magnetic iron oxide nanoparticles (maghemite), obtained through the combustion method.

Chlorhexidine is an integral component of modern dental practice, offering significant benefits in the prevention and management of oral diseases. Its broad-spectrum antimicrobial activity, coupled with its ability to reduce plaque and gingivitis, underscores its status as the gold standard in dental mouthwashes. While the potential for side effects exists, ongoing research continues to refine its use and explore alternatives that may

complement or enhance its therapeutic effects. The integration of chlorhexidine into routine dental care protocols reflects its importance in promoting oral health and preventing disease. Chlorhexidine's role extends beyond plaque control. It was employed in clinical studies including preoperative disinfection in dental surgeries and as a preventive measure in patients with high caries risk or those undergoing orthodontic treatment. This is particularly important in the context of infection control, especially in light of the ongoing challenges posed by nosocomial infections in dental practices.

The second research study ("***Development and characterization of a solid nanosystem based on chlorhexidine embedded in magnetic nanoparticles***"), highlights the use of a magnetic matrix based on iron oxide nanoparticles (maghemite) for chlorhexidine delivery. Chlorhexidine is another disinfectant considered the gold standard in dentistry, with well-established antimicrobial properties. For this, another type of iron oxide (maghemite – a compound with superparamagnetic properties) was used as a carrier for the delivery of oral disinfectant.

The main key findings presented in Chapter 3, were:

- ✚ ***Formation of the magnetic nanosystem*** based on iron oxide nanoparticles embedded with the chlorhexidine solution of 2% - it was demonstrated the attachment of the 2% chlorhexidine solution onto the surface of the maghemite nanoparticles through FT-IR spectroscopy, by the absorption peak located at 520.78/cm, visible on both spectra, which, highlighting the presence of C-Cl stretching functional groups from the CHX solution.
- ✚ ***The nanosize dimension and spherical shape*** – it was shown that the CHX-NPS nanosystem was in the nanometric domain (10 ± 1.8 nm) with a nearly spherical shape of 1.24 ± 0.3 , determined from the TEM image. Moreover, as regards the EDX analysis, the results showed that the EDS mapping for the CHX-NPS nanosystem highlights the presence of Fe, O, and C atoms.
- ✚ Overall, one can affirm that we successfully obtained a magnetic nanosystem based on maghemite nanoparticles, for the delivery of chlorhexidine, with minimal toxicity and enhanced therapeutic effect.

4.3. *IN VITRO* AND *IN OVO* TOXICOLOGICAL SCREENING OF THE MAGNETIC SOLID NANOSYSTEM FOR CHLORHEXIDINE DELIVERY

Chapter 4 reports the *in vitro* and *in ovo* toxicological screening of the synthesized CHX-NPS nanosystem, of the carrier matrix (maghemite NPS), and of the drug to be delivered (CHX solution), by employing two types of cell lines – HaCaT immortalized human keratinocytes and JB6 Cl 41-5a murine epidermal cells.

After the characterization of the synthesized CHX-NPS nanosystem through FTIR spectroscopy and electronic microscopy, the *in vitro* results showed that the CHX antimicrobial efficacy was enhanced when delivered through a nanoscale system, with improved bioavailability and reduced toxicity when this was tested as the newly CHX-NPS nanosystem. The *in ovo* screening exhibited that the CHX-NPS nanosystem did not cause any sign of irritation on the chorioallantoic membrane vasculature and was classified as a non-irritant substance. Despite this, future research should focus on optimizing this type of nanosystem and conducting comprehensive *in vivo* studies to validate their therapeutic efficacy and safety in clinical settings.

In conclusion, chlorhexidine remains a vital tool in modern dentistry, recognized for its efficacy in controlling dental plaque and preventing periodontal diseases. Its multifaceted role encompasses not only antimicrobial action but also contributions to clinical infection control and patient management in various dental procedures. However, the potential for adverse effects necessitates careful consideration of its application, prompting ongoing research into optimizing its use and exploring complementary therapies.

The third research study ("***In vitro and in ovo toxicological screening of the solid nanosystem for chlorhexidine delivery***") highlights the crucial role of using chlorhexidine in dental practice.

The main key findings presented in Chapter 4, were:

- ✚ **Enhanced antimicrobial activity** – it has been stated that the integration of chlorhexidine into dental materials has been a significant advancement in enhancing their antimicrobial properties. Our findings strengthen the above statement, meaning that our *in vitro* results showed that the CHX antimicrobial efficacy was enhanced when

delivered through a nanoscale system ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$). The CHX-NPS nanosystem synthesized exhibited enhanced bacteriostatic and bactericidal properties against *E. coli*, *S. aureus*, and *P. aeruginosa*, as compared with the CHX solution, tested at the same concentrations as the synthesized nanosystem.

- ✚ **Improved bioavailability and reduced toxicity** – our findings concerning the maghemite NPS, indicate very low toxicity in JB6 Cl 41-5a murine cells and HaCaT human keratinocytes, even at the highest concentration tested – 100 $\mu\text{g/mL}$. As concern the CHX *in vitro* toxicity, the CHX solution proved a dose- and time-dependent cytotoxic effect characterized by a significant decrease in cells' viability and apoptotic-like nuclear changes, while the CHX-NPS nanosystem showed a lower cytotoxic effect as compared to the CHX solution, on both cell lines used.
- ✚ **Non-irritant potential** – the *in ovo* toxicological screening showed that the maghemite NPS, as well as the newly synthesized CHX-NPS nanosystem, belongs to the category of non-irritating substances because they did not produce signs of lysis, coagulation, or hemorrhage on the chorioallantoic membrane of the embryonated hen's egg.
- ✚ Overall, the multifunctional nature of IOMNPs allows for the simultaneous delivery of chlorhexidine and other therapeutic agents, potentially leading to synergistic effects.

The original character of the doctoral thesis is supported by 3 scientific papers published in ISI journals and indexed also PubMed (one of them) with cumulative I.F. = 6.3.