

Programul:	<b>Resurse Umane</b>
Tipul proiectului:	Proiecte de cercetare pentru stimularea constituirii de tinere echipe de cercetare independente
Cod proiect:	<b>PNI-II-RU-TE-2012-3-0227</b>
Contract nr.:	<b>37/29.04.2013</b>
Echipe de cercetare:	<b>Dr. Szabó László</b> , Dr. Nicolae Leopold, Dr. Vasile Chiș, Drd. Tódor Sz. István, <b>†Drd. Simon L. Botond</b> (decedat 15 iulie 2016)

## Nano-biosensing of atherosclerosis and thrombosis by Surface Enhanced Spatial Offset Raman Spectroscopy (SESORS)

Raport științific sintetic (Mai 2013- Septembrie 2016)

întocmit pentru toata perioada de execuție a proiectului pana in prezent.

### Cap. 1. Diseminarea rezultatelor

Diseminarea rezultatelor a fost efectuată în special prin publicații științifice de profil. De asemenea, s-a realizat transferul informațiilor din laborator în activitatea didactică. Ca urmare, activitățile din cadrul acestui proiect pe anul în curs au contribuit la finalizarea unei teze de doctorat, elaborarea a trei lucrări de licență și două lucrări de disertație de masterat.

Rezultatele proiectului au fost diseminate și în cadrul a mai multor vizite de studiu la Technische Universität Chemnitz din Germania, Technische Universität Wien, Universitatea Nottingham din Anglia respectiv Universitatea din Rijeka (Croatia), vizită prevăzută în planul de activitate al proiectului. De asemenea, respectând planul de activitate al proiectului a fost actualizată pagina web, sunt publicate 8 articole ISI, sunt trimise 4 manuscrise (ISI) în vederea publicării (sub evaluare), respectiv se lucrează la 2 manuscrise în vederea trimerii spre publicare. Doua articole au fost publicate în reviste BDI. Am participat la mai multe conferințe internaționale și naționale cu 15 lucrări științifice tip poster respectiv cu 3 prezentări orale.

#### 1.1. Prezentarea rezultatelor comunității științifice:

##### 1.1.1. Articole cotate ISI (8+4):

- 1. Spectroscopic and computational investigation of a thiazolidine-2,4-dione compound, I.B. Cozar, A. Pîrnău, L. Szabó, N. Vedeanu, C. Nastasă, Romanian Reports in Physics, 68(2), 630-641, (2016). [IF. 1.137]**
- 2. Molecular Structure of Phenytoin: NMR, UV-Vis and Quantum Chemical Calculations, Luchian Raluca, Vințel Emil, Chiș Cosmina, Vasilescu Mihai, LEOPOLD Nicolae, CHIS Vasile, Croatica Chemica Acta, 88(4), 511-526, (2016). [IF. 1.19]**
- 3. Spectroscopic and DFT Investigation of Benzaldehyde Isonicotino – Hydrazone Compound, Cozar Ionut Bogdan, Pirnau Adrian, SZABO Laszlo, Vedeanu Nicoleta, Nastasa Cristina, Cozar Onuc Romanian Journal Of Physics, 61(7-8), (2016). [IF. 1.398]**

- 4. Conformational landscape and low lying excited states of imatinib**, Vințeler Emil, Stan Nicoleta-Florina, Luchian Raluca, Căinap Călin, P. Prates Ramalho João, **Chiș Vasile**, *Journal of Molecular Modeling*, (DOI: 10.1007/s00894-015-2639-8), 21:84 (2015), [IF. 1.736]
- 5. Surface-enhanced Raman scattering and DFT investigation of 1,5-diphenylcarbazide and its metal complexes with Ca(II), Mn(II), Fe(III) and Cu(II)**, **László Szabó**, Krisztian Herman, Nicoleta Elena Mircescu, István Szabolcs Tódor, Simon Botond Lorand, Radu Alex Boitor, Nicolae Leopold, Vasile Chiș, *Journal of Molecular Structure*, 1073, (2014) 10-17. [IF. 1.599]
- 6. Towards a Receptor-free Immobilization and SERS Detection of Urinary Tract Infections Causative Pathogens**, **Nicoleta E. Mircescu**, Haibo Zhou, **Nicolae Leopold**, **Vasile Chiș**, Natalia P. Ivleva, Reinhard Niessner, Andreas Wieser, Christoph Haisch, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406 (13), (2014) 3051-3058. [IF. 3.659]
- 7. Adsorption of sulfamethoxazole molecule on silver colloids: a joint SERS and DFT study**, **Alia Ungurean**, Mircea Oltean, Leontin David, **Nicolae Leopold**, João P. Prates Ramalho, **Vasile Chiș**, *Journal of Molecular Structure*, 1073 (2014) 71–76. [IF. 1.599]
- 8. Gold nanoparticle assemblies of controllable size obtained by hydroxylamine reduction at room temperature**, **István Sz. Tódor**, **László Szabó**, **Vasile Chiș**, Oana T. Marișca, **Nicolae Leopold**, *Journal of Nanoparticle Research*, 16(12), (2014). [IF. 2.278]
- 9. Biological evaluation of hydroxylamine reduced gold nanoparticle assemblies with potential photo-thermal applications**, **Loredana F. Leopold**, **István Sz. Tódor**, **László Szabó**, Oana T. Marișca, **Vasile Chiș**, **Nicolae Leopold**, *Journal of Nanoparticle Research*, (in evaluate 2016). [IF. 2.184]
- 10. Anisotropic gold nanoparticles synthesized at room temperature using collagen**, Oana T. Marișca, **Nicolae Leopold**, *Journal of Nanoparticle Research*, (in evaluate 2016). [IF. 2.184]
- 11. Biological evaluation of heparin reduced and covered gold nanoparticles**, **László Szabó**, **Loredana F. Leopold**, **István Sz. Tódor**, **Botond L. Simon**, **Nicolae Leopold**, **Vasile Chiș**, *Journal of Nanoparticle Research* (in evaluate 2016). [IF. 2.184]
- 12. Discrimination of Haloarchaeal Genera using Raman Spectroscopy and Principal Component Analysis (PCA)**, Anda Leș, Nicoleta Elena Dina, Andreea Baricz, **Nicolae Leopold**, Horia Leonard Banciu, *Journal of Biophotonics*, (in evaluate 2016). [IF. 3.818]

#### 1.1.2. Articole cotate BDI (2):

- 1. METHODS AND MODELS FOR CALCULATING NMR SPECTRA: LEVETIRACETAM AS A TEST CASE**, **Raluca Luchian**, Réka-Anita Domokos, Cosmina Chiș, Mihai Vasilescu, Emil Vințeler, **Vasile Chiș**, *STUDIA UBB PHYSICA*, Vol. 59 (LIX), 2, 2014, pp. 85-98 (RECOMMENDED CITATION)
- 2. RAMAN IMAGING OF DENTAL FOLLICLE MESENCHYMAL STEM CELLS**, **Loredana F. Leopold**, Cristina Coman, **Istvan Sz. Todor**, **Laszlo Szabo**, Olga Sorițău, Piroska Virag, Carmen M. Mișu, **Vlad Moisoiu**, **Nicolae Leopold**, *STUDIA UBB PHYSICA*, Vol. 60 (LX), 2, 2015, pp. 69-76 (RECOMMENDED CITATION)

#### 1.1.3. Lucrări (15 postere) comunicate la conferințe

- 1. Structural and Biological Evaluation of Heparin Reduced and Covered Gold Nanoparticles**, **László Szabó**, **István Sz. Tódor**, **Botond L. Simon**, **Loredana F. Leopold**, Oana T. Marișca-Truică, **Vasile Chiș**, **Nicolae Leopold**, Conferința Natională de Biofizică, 2-4 iunie 2016, Cluj-Napoca
- 2. Highly Sers Active Gold Nanoparticle Assemblies of Controllable Size Obtained by Heparin Reduction at Room Temperature**, **István Sz. Tódor**, **László Szabó**, Oana T. Marișca, **Vasile Chiș**,

- Nicolae Leopold**, 8<sup>th</sup> International Conference on Advanced Vibrational Spectroscopy (ICAVS8), July 12<sup>th</sup>-17<sup>th</sup> 2015, Viena (Austria)
3. ***Vibrational features of dacarbazine and deticine revealed by Raman, SERS, THz-Raman and DFT methods***, **Alexandra Fălămaș**, Mihaela Chiș, Călin Căinap, **Nicolae Leopold**, **Vasile Chiș**, 8<sup>th</sup> International Conference on Advanced Vibrational Spectroscopy (ICAVS8), July 12<sup>th</sup>-17<sup>th</sup> 2015, Viena (Austria)
  4. ***Discrimination Between Haloarchaea Genera Using Raman Spectroscopy and PCA***, **Anda Leș**, Dina Nicoleta, Horia Baciuc, Andreea Baricz, **Nicolae Leopold**, 8<sup>th</sup> International Conference on Advanced Vibrational Spectroscopy (ICAVS8), July 12<sup>th</sup>-17<sup>th</sup> 2015, Viena (Austria)
  5. ***UV-VIS Study of 1-(2-Pyridylazo)-2-Naphthol (PAN) and its Metal Complexes with Al(III), Mn(II), Fe(III), Cu(II) and Pb(II)***, **Botond Lorand Simon**, **Laszlo Szabo**, **Vasile Chis**, XIII<sup>th</sup> International Conference on Molecular Spectroscopy „From molecules to molecular materials, biological molecular systems and nanostructures”, September 9<sup>th</sup>-13<sup>th</sup> 2015, Wroclaw (Polonia)
  6. ***Bacteria discrimination at strain level by PCA analysis based on the SERS spectra***, **Nicoleta Dina**, Alia Colniță, Leș Anda, Horia Baciuc, **Vasile Chiș**, **Nicolae Leopold**, 10<sup>th</sup> International Conference on Processes in Isotopes and Molecules (PIM 2015), September 23<sup>th</sup>-25<sup>th</sup> 2015, Cluj-Napoca
  7. ***Characterization of gram positive bacteria using Raman Spectroscopy***, **Alia Colniță**, Nicoleta E. Dina, Dan Vodnar, **Nicolae Leopold**, **Vasile Chis**, Leontin David. The Third International Conference on Analytical and Nanoanalytical Methods for Biomedical and Environmental Sciences “IC-ANMBES 2014” June 13<sup>th</sup>-15<sup>th</sup> 2014, Brasov, Romania.
  8. ***Gold nanoparticle assemblies of controllable size obtained by hydroxylamine reduction at room temperature***, **István Sz. Tódor**, László Szabó, Oana T. Marișca, Vasile Chiș, Nicolae Leopold, Surface-Enhanced Spectroscopies 2014 (SES 2014), August 7<sup>th</sup>-10<sup>th</sup> 2014, Chemnitz (Germany).
  9. ***Preparation and spectroscopic characterization of heparin-reduced gold nanoparticles at room temperature***, **László Szabó**, István Sz. Tódor, Botond L. Simon, Vasile Chiș, Nicolae Leopold, 5<sup>th</sup> Conference on Advanced Spectroscopies on Biomedical and Nanostructured Systems (BioNanoSpec) September 7<sup>th</sup>-10<sup>th</sup> 2014, Cluj-Napoca, Romania.
  10. ***Synthesis of highly sers active gold nanoparticles reduced by glucose at room temperature***, **Radu A. Boitor**, Nicolae Leopold, 5<sup>th</sup> Conference on Advanced Spectroscopies on Biomedical and Nanostructured Systems (BioNanoSpec) September 7<sup>th</sup>-10<sup>th</sup> 2014, Cluj-Napoca, Romania.
  11. ***Excited states properties of a set of polycyclic aromatic hydrocarbons: a TD-DFT analysis***, **Botond Simon**, Vasile Chiș, 5<sup>th</sup> Conference on Advanced Spectroscopies on Biomedical and Nanostructured Systems (BioNanoSpec) September 7<sup>th</sup>-10<sup>th</sup> 2014, Cluj-Napoca, Romania.
  12. ***Popcorn Shaped Gold Nanoparticles with absorbance in NIR***, **István Sz. Tódor**, Nicolae Leopold, **László Szabó**, Vasile Chiș The 5<sup>th</sup> National Conference of Applied Physics, CNFA 2013, 23-24 Mai 2013 Iași, România.
  13. ***Experimental and theoretical investigation of heparin and C-reactive protein***, **László Szabó**, Botond L. Simon, István Sz. Tódor, Nicoleta E. Mircescu, Nicolae Leopold, Vasile Chiș, XII<sup>th</sup> International Conference on Molecular Spectroscopy. From Molecules to Nano- and Biomaterials (ICMS 2013), Kraków – Białka Tatrzańska 8 – 12 September 2013 Polonia.
  14. ***Synthesis of Popcorn Shaped Nanoparticle assemblies***, **István Sz. Tódor**, **László Szabó**, Vasile Chiș, Nicolae Leopold, Conferința Internațională de Fizică TIM 13, 21-24 Noiembrie 2013 - Timișoara, România.

15. ***Theoretical and experimental study of heparin sodium salt and C-reactive protein***, **Botond L. Simon, László Szabó**, István Sz. Tódor, Nicolae Leopold, Vasile Chiș, Conferința Internațională de Fizică TIM 13, 21-24 Noiembrie 2013 - Timișoara, România.

1.1.4. Prezentări orale (3) la conferințe

1. ***Evoluția și perspectivele fizicii medicale la Universitatea "Babeș-Bolyai" din Cluj Napoca***, **Vasile Chiș, Nicolae Leopold, László Szabó**, A XIII-a CONFERINTA NATIONALA DE FIZICA MEDICALA - 7-8 Noiembrie 2015, Cluj Napoca
2. ***Imagistică Raman Celulară***, **Nicolae Leopold, László Szabó, Vasile Chiș, István Sz. Tódor**, Carmen Mișu, Vlad Moisoiu, Radu Boitor, A XIII-a CONFERINTA NATIONALA DE FIZICA MEDICALA - 7-8 Noiembrie 2015, Cluj Napoca
3. ***Raman Imaging of Dental Follicle Mesenchymal Stem Cell***, **Nicolae Leopold**, Conferința Națională de Biofizică, 2-4 iunie 2016, Cluj-Napoca

1.1.5. Manuscrise în lucru (2):

1. ***Theoretical and experimental study of heparin sodium salt***, **Botond L. Simon, László Szabó**, István Sz. Tódor, Nicolae Leopold, Vasile Chiș, (manuscris în lucru, pentru trimitere spre publicare în *Spectrochimica Acta A*). [IF. 2.129]
2. ***Excited states properties of a set of polycyclic aromatic hydrocarbons: a TD-DFT analysis***, **Botond Simon, László Szabó, Vasile Chiș** (manuscris în lucru, pentru trimitere spre publicare în *Spectrochimica Acta A*). [IF. 2.129]

2.2 Actualizarea paginii web a proiectului

A fost actualizată pagina web dedicată proiectului:

[http://atom.ubbcluj.ro/lzszabo/pages/research\\_en.htm](http://atom.ubbcluj.ro/lzszabo/pages/research_en.htm)

Un accent deosebit s-a pus pe formarea tinerilor cercetători, aceștia fiind implicați în toate etapele activităților de cercetare: experimente, calcule teoretice și publicarea rezultatelor. De asemenea, au fost atrași studenți și masteranzi în această tematică de cercetare, oferindu-li-se astfel oportunitatea de a lucra într-un laborator dotat la standarde moderne, cu o echipă tânără, pe o tematică actuală de cercetare.

Pe baza activităților din cadrul acestui proiect, o parte din rezultate a fost valorificată pentru elaborarea a două lucrări de doctorat:

**Nicoleta Elena Dina (Mircescu)**, ***SERS applications - from molecules to microorganisms***, PhD Thesis (2013)

**Alia Colniță (Ungurean)**, ***Optimization of physico-chemical parameters of gold epitaxial films and biomolecular systems for improving life quality***, PhD Thesis (2014)

O altă mare parte va fi valorificată în teza de doctorat al lui Tódor Sz. István și Simon L. Botond.

4 lucrări de licență:

Crainic Larisa-Alexandra, ***Studiul Raman și SERS al antibioticelor oxitetraciclina, ceftriaxon și penicilina G***, Lucrare de Licență 2013

Buja Oana-Maria, ***Synthesis and characterization of polyethylene glycol coated gold nanoparticles of defined size***, Lucrare de Licență 2013

Boitor Radu, ***Novel gold and silver nanoparticles covered by glucose. Biocompatibility and spectroscopic studies***, Lucrare de Licență 2013.

Anda Leș, *Discrimination between different microorganisms species of halophilic Archaea using Raman Spectroscopy and Principal Component Analysis*, Lucrare de Licență 2014

4. lucrări de disertație de masterat:

Boitor Radu, *Intracellular SERS assessment with the use of biocompatibilised novel gold nanoparticles*, Disertație 2015

Oana M. Buja, *On-line detection of different concentration of organic molecules using a SERS microfluidic device*, Disertație 2015

Oana T. Marișca, *Cytotoxicity and internalization of gold nanoparticles depending on physicochemical properties*, Disertație 2014

Kristian Herman, *O nouă abordare pentru detecția în separarea cromatografică folosind metoda Raman ultrasenzitivă (SERS)*, Disertație 2013

***Achiziții accesorii/echipamente/consumabile laborator etc.***

În cadrul acestei activități au fost achiziționate echipamente și accesorii necesare pentru buna desfășurare a studiilor teoretice și experimentale din laborator: Astfel, au fost achiziționate, tehnică de calcul, chimicale, reactivi, solvenți, precum și diverse accesorii și consumabile pentru laborator.

## Cap. 2. Etapa I. finală an 2013

### Obiectivele etapei:

1. Caracterizarea fizico-chimică a moleculei de heparină.
2. Caracterizarea fizico-chimică a proteinei C-reactivă.
3. Diseminarea rezultatelor.

### Rezultate pe activități

- R1.1.** S-au efectuat studii spectroscopice asupra heparinei prin FTIR, Raman, FT-Raman, SERS și UV-Vis.
- R1.2.** A fost realizată investigarea spectroscopică a heparinei la diferite valori de pH și folosind diferiți solvenți.
- R1.3.** Calcule DFT: spectre IR și Raman calculate, sarcini atomice parțiale, potențial electrostatic molecular, momente de dipol și de multipol, energia orbitalilor HOMO-LUMO etc. pentru heparină.
- R1.4.** Prin interpretarea calculelor DFT, cu privire la geometria de adsorbție și posibilele locații de legătură s-a realizat corelația cu datele experimentale.
- R2.1.** Prin investigarea spectroscopică (FTIR, Raman, FT-Raman, SERS și UV-Vis la diferite valori de pH, folosind solvenți diferiți) am dedus câteva proprietăți fizico-chimice a proteinei C-reactive.
- R2.2.** Calcule DFT (spectre IR și Raman calculate, sarcini atomice parțiale, potențial electrostatic molecular, momente de dipol și de multipol, energia orbitalilor HOMO-LUMO etc.) pentru proteina C-reactivă, ne-au validat datele experimentale.
- R2.3.** Au fost începute studii pentru producerea de nanoparticule de aur reduse cu heparină.
- R3.1.** Au fost prezentate rezultate preliminare la următoarele conferințe: XIIth International Conference on Molecular Spectroscopy, Polonia; The 5th National Conference of Applied Physics, CNFA 2013, Iasi, România; Conferința Internațională de Fizică TIM 13 - Timișoara, România.
- R3.2.** În cadrul proiectului, pentru prima etapă au fost trimise spre publicare un număr de trei articole în reviste cotate ISI, respectiv este un manuscris în lucru pentru trimitere spre publicare în revistă cotată ISI.
- R3.3.** Pagina web a proiectului a fost actualizată.

**În conformitate cu obiectivele propuse în cadrul acestui proiect, prima etapa a vizat caracterizarea fizico-chimică - teoretică și experimentală – a moleculelor de heparina sodium salt (HSS) respectiv proteina C reactiva (CRP).**

### Metodele folosite

Spectrele IR au fost înregistrate cu un spectrometru cu transformată Fourier, Bruker Equinox 55. Spectrele prezintă vibrațiile caracteristice grupărilor moleculelor.

Spectrele FT-Raman au fost înregistrate cu un modul Raman FRA 106S, dotat cu laser NdYAG (1064 nm) și detector cu Ge de mare sensibilitate, atașat spectrometrului cu transformată Fourier, Bruker Equinox 55.

Spectrele SERS au fost înregistrate cu spectrometrele: Raman DeltaNu Advantage 532 (DeltaNu, Laramie, WY) echipat cu laser NdYAG de 532 nm cu frecvența dubla cu puterea laserului de 40 mW, respectiv Raman Advantage 200A (DeltaNu, Laramie, WY) echipat cu laser HeNe de 632.8 nm cu puterea laserului de 4 mW, rezoluția spectrală fiind de  $10 \text{ cm}^{-1}$ . Pentru toate măsurătorile SERS s-a folosit 50  $\mu\text{l}$  de analit, 0.5 ml coloid de argint respectiv coloid de aur.

Pentru caracterizarea teoretică fizico-chimică a HSS și CRP, au fost efectuate calcule bazate pe teoria funcționalei de densitate (DFT). În special, aceste calcule sunt folosite pentru elucidarea structurilor geometrice și electronice ale moleculelor și pentru obținerea proprietăților lor electronice precum: orbitali moleculari, momente de dipol, cuadropol, etc, spectre vibraționale, RES, RMN, UV-Vis, sarcini atomice parțiale și altele. Cunoscând aceste proprietăți se poate urmări influența factorilor de structură și electronici asupra reacțiilor în care sunt implicați compușii studiați. Aceste studii contribuie la elucidarea relației dintre structura și activitatea moleculelor și la înțelegerea proprietăților precum și a comportamentului sistemelor moleculare complexe (complexi, clusteri moleculari).

Potențialul electrostatic molecular (MEP) este strâns legat de densitatea electronică și descrie posibilitățile de atac electrofil, reacții nucleofile sau interacții de tip legături de hidrogen. MEP-urile pot de asemenea furniza informații legate de procese de adsorbție la suprafața coloidală, cum ar fi interacțiunea medicament-receptor sau proteina-substrat, deoarece două specii moleculare “se văd una pe cealaltă” prin “potrivirea” potențialul electrostatic molecular.

Pentru o bună înțelegere a spectrelor IR și Raman, este necesară atribuirea corectă a tuturor benzilor vibraționale. Metodele chimiei cuantice, de la calculele semiempirice la metodele de tip DFT, oferă posibilitatea de a determina diferite proprietăți moleculare, fiecare metodă având avantajele ei.

Optimizarea geometriei moleculare și calculul frecvențelor vibraționale au fost efectuate cu pachetul software Gaussian 09W utilizând metode DFT cu funcționalele B3LYP și BLYP. Setul de bază folosit la aceste calcule a fost 6-31G(d). Activitățile Raman calculate ( $S_i$ ) au fost convertite în intensități relative Raman ( $I_i$ ) folosind următoarea ecuație:

$$I_i = \frac{f(\nu_0 - \nu_i)^4 S_i}{\nu_i \left[ 1 - \exp\left(-\frac{hc\nu_i}{kT}\right) \right]}$$

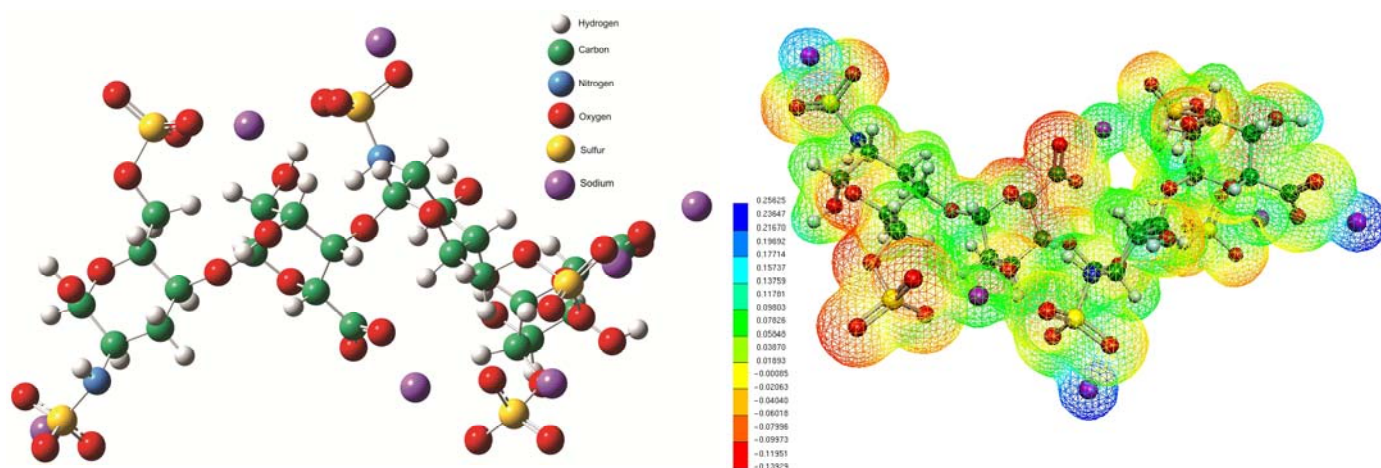
unde  $\nu_0$  numărul de undă al radiației laser excitatoare,  $\nu_i$  număr de undă pentru al i-lea mod de vibrație calculat,  $c$  viteza luminii,  $h$  constanta lui Plank,  $k$  constanta lui Boltzman și  $T$  temperatura. Intensitățile experimentale și calculate sunt exprimate ca procent din cea mai intensă bandă. Geometriile au fost optimizate fără nici o

constrângere asupra simetriei moleculelor, folosind metoda gradientului analitic implementată în programul Gaussian 09W. Atribuirile modurilor vibraționale au fost efectuate prin observarea vizuală a modurilor animate în programul GaussView și prin compararea rezultatelor cu cele obținute pe compuși similari.

În figurile de mai jos sunt prezentate geometriile optimizate cu numerotarea atomilor precum și reprezentările potențialelor electrostatice moleculare, izosuprafața densității electronice fiind de 0.02 a.u.

În continuare, după optimizarea geometriilor moleculare, au fost calculate modurile normale de vibrație ale moleculei de HSS. Frecvențele de vibrație obținute sunt prezentate în tabelele următoare. Numerele de undă calculate au fost scalate cu factorul 0.9614, corespunzător metodei B3LYP/6-31G(d), factor raportat în literatura de specialitate.

## I. Molecula heparin sodium salt (HSS)

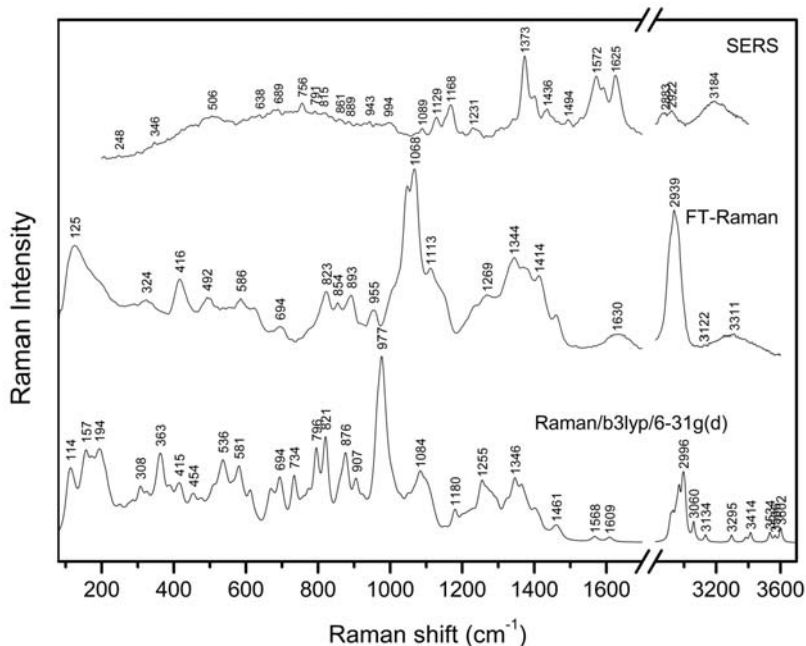


**Fig. 1.** Geometria optimizată și potențialul electrostatic calculat pentru molecula HSS.

Calculul distribuției potențialului electrostatic molecular indică sarcina preponderent negativă în jurul atomilor de oxigen, astfel că am presupus interacțiunea moleculei de HSS cu suprafața metalică ca având loc prin aceștia.

## ***Spectrele vibraționale pentru molecula HSS***

Spectrul FT-Raman are cea mai intensă bandă situată la  $1068\text{ cm}^{-1}$ , bandă atribuită la  $1084\text{ cm}^{-1}$  în spectrul calculat. Această bandă este caracteristică vibrațiilor de alungire asimetrică a grupării  $S_{43}O$  și a unor vibrații de tip bending a grupărilor C-H, N-H și O-H. Tot în spectrul FT-Raman se află o bandă de intensitate mare la  $2939\text{ cm}^{-1}$ , al cărui număr de undă calculat este  $2963\text{ cm}^{-1}$ . Pentru spectrul SERS banda cea mai intensă se situează la  $1373\text{ cm}^{-1}$ , și corespunde vibrațiilor de tip bending a grupărilor C-H din inelul Ring4. Lungimile de undă cuprinse între  $581\text{ cm}^{-1}$  și  $823\text{ cm}^{-1}$  sunt caracteristice mișcărilor de deformare a inelelor. Se observa de asemenea ca în zona numerelor de undă mici o mai bună concordanță a spectrului calculat cu cel experimental. Deviația este mai mare la lungimi de undă mari în spectrul SERS și cel calculat, fiind de  $15\text{ cm}^{-1}$ .



**Fig. 2.** Spectrul SERS, FT-Raman experimental și Raman calculat (B3LYP/6-31g(d)) pentru molecula HSS.

**Tabel 1.** Numerele de undă SERS, FT-Raman experimentale și Raman calculate (B3LYP/6-31g(d)) selectate pentru molecula HSS.

Experimental wavenumbers ( $\text{cm}^{-1}$ )		Calculated wavenumbers ( $\text{cm}^{-1}$ )	
SERS	FT-Raman	B3LYP/6-31g(d)	Band assignment
	125	114	$\delta(S_8O, S_{16}O, S_{12}O, S_{43}O)$ $\delta(\text{CH}(\text{Ring}2))$
	416	415	$\delta(O_{39}H, N_{38}H, C_{35}H, C_{36}H, C_{37}H, S_{47}O, O_{59}H)$
	586	581	op. deformation of Ring1 $\delta(\text{CH}(\text{Ring}1), N_7H, S_{16}O)$
815	823	821	ip. deformation of Ring1 and Ring2 $\delta_{ip}(C_{56}O, C_{25}O)$
1089	1068	1084	$\nu_{as}(S_{16}O_{17}O_{18})$ $\delta(C_{51}H, C_{54}H, C_{55}H, C_{22}H, C_{23}H)$
1168		1180	$\nu_{as}(S_{43}O_{44}O_{45})$ $\delta(O_{59}H, N_{38}H, C_{23}H, C_{34}H, C_{35}H, C_{36}H, C_{54}H)$
1373	1344	1346	$\delta_{op}(\text{CH}(\text{Ring}4))$ $\delta(O_{59}H)$
1572		1568	$\nu_{as}(C_{56}O)$ $\delta(O_{59}H, C_{55}H)$
1625	1630	1609	$\nu_{as}(C_{25}O)$ $\delta(C_{24}H, C_{36}H)$
	3122	3134	$\nu(C_{51}H)$

$\nu$ -stretching,  $\nu_{as}$ - asymmetric stretching,  $\nu_s$ - symmetric stretching,  $\delta$ -bending, ip-in plane, op.-out of plane; Ring1-oxane( $C_1-C_5, O_{10}$ ), Ring2-oxane( $C_{20}-C_{24}, O_{29}$ ), Ring3-oxane( $C_{32}-C_{36}, O_{41}$ ), Ring4-oxane( $C_{51}-C_{55}, O_{60}$ )



După cum se observă forma și trăsăturile principale ale spectrelor IR și Raman sunt bine reproduse de calcule. Spectrul experimental FT-IR/ATR are cea mai intensă bandă la  $1022\text{ cm}^{-1}$  atribuită unui mod de vibrație complex implicând vibrații de deformare a inelelor Ring1 și Ring2, respectiv vibrații de alungire asimetrice a grupului  $\text{O}_3\text{C}$ . Spectrul FT-IR are cea mai intensă bandă format de un dublet cu lungimile de undă la  $1619\text{ cm}^{-1}$  și  $1639\text{ cm}^{-1}$ , valori care în spectrul calculat au fost atribuite la  $1604\text{ cm}^{-1}$  și în spectrul FT-IR/ATR la  $1609\text{ cm}^{-1}$ . În spectrul calculat cea mai intensă bandă se situează la  $979\text{ cm}^{-1}$ , bandă caracteristică unor vibrații de alungire a grupărilor S-O, S-N, și a unor vibrații de tip bending a grupărilor N-H, C-H. De asemenea se observă un foarte bun acord între experiment și teorie, deviația fiind mai mică de  $10\text{ cm}^{-1}$ .

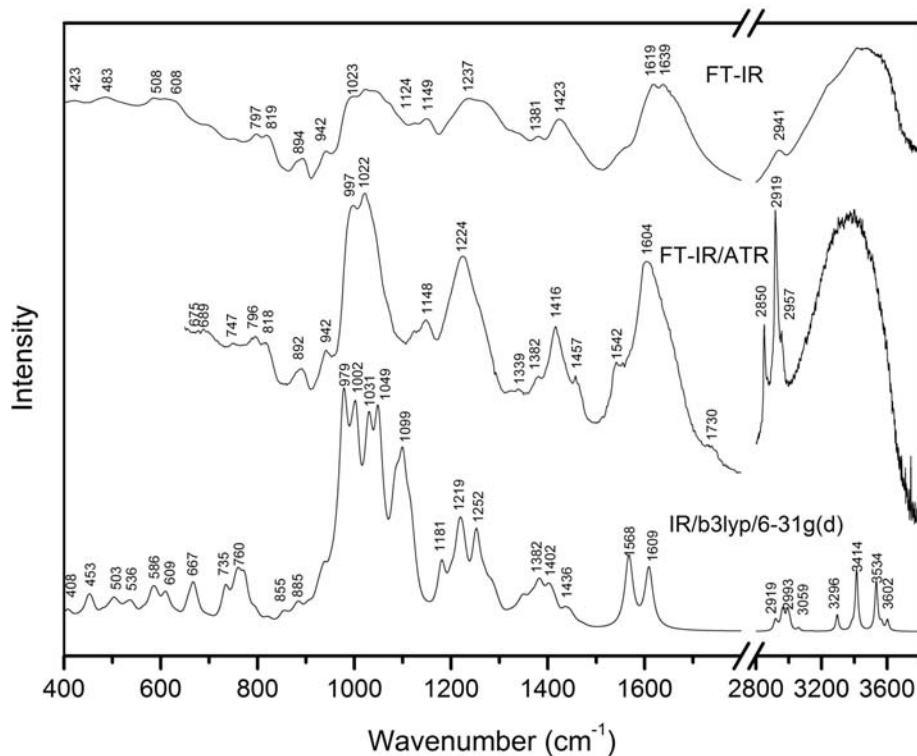


Fig. 3. Spectrul FTIR, FTIR/ATR experimental și IR calculat (B3LYP/6-31g(d)) pentru molecula HSS.

Tabel 2. Numerele de undă FTIR, FTIR/ATR experimentale și IR calculate (B3LYP/6-31g(d)) selectate pentru molecula HSS.

Experimental wavenumbers ( $\text{cm}^{-1}$ )		Calculated wavenumbers ( $\text{cm}^{-1}$ )	
FT-IR	FT-IR/ATR	B3LYP/6-31g(d)	Band assignment
585		586	$\delta(\text{S}_{16\text{O}}, \text{O}_{26\text{H}}, \text{C}_6\text{H}, \text{C}_{20\text{H}}, \text{C}_3\text{H}, \text{C}_{33\text{H}}, \text{S}_{12\text{O}}, \text{S}_{47\text{O}}, \text{C}_5\text{H}, \text{C}_{3\text{H}98})$
608		609	op. deformation Ring3
	675	667	$\delta(\text{O}_{26\text{H}}, \text{N}_7\text{H}, \text{N}_{38\text{H}}, \text{C}_6\text{H}, \text{O}_8\text{H})$
894	892	885	$\nu_s(\text{Ring4}) \nu(\text{C}_{55}\text{C}_{50}) \delta(\text{C}_{56}\text{O}, \text{O}_{59}\text{H}, \text{N}_{38}\text{H})$
	997	979	$\nu_s(\text{S}_{12}\text{O}, \text{S}_{16}\text{O}) \nu(\text{S}_{12}\text{N}) \delta(\text{N}_7\text{H}, \text{C}_3\text{H}, \text{C}_{24}\text{H}, \text{N}_{38}\text{H}, \text{C}_{22}\text{H})$
1023	1022	1002	op.deformation Ring1 and Ring2 $\nu_{as}(\text{O}_3\text{C}) \delta(\text{CH}(\text{Ring1}, \text{Ring2}))$
	1224	1219	$\nu_{as}(\text{S}_{63}\text{O}_{64}\text{O}_{65}) \delta(\text{C}_{52}\text{H}, \text{C}_{54}\text{H}, \text{O}_{59}\text{H}, \text{C}_{23}\text{H}, \text{C}_{24}\text{H}, \text{C}_{22}\text{H})$
1381	1382	1382	$\delta(\text{C}_{37}\text{H}, \text{C}_{36}\text{H}, \text{C}_{52}\text{H}, \text{C}_{53}\text{H}, \text{O}_{56}\text{H}, \text{C}_{34}\text{H}, \text{C}_{20}\text{H}, \text{C}_6\text{H})$
1619	1604	1609	$\nu_{as}(\text{C}_{25}\text{O}_{31}\text{O}_{30}) \delta(\text{C}_{24}\text{H}, \text{C}_{36}\text{H})$
	2919	2919	$\nu(\text{C}_{22}\text{H}, \text{C}_{34}\text{H}, \text{C}_{32}\text{H}, \text{C}_{21}\text{H})$

v-stretching,  $\nu_{as}$ - asymmetric stretching,  $\nu_s$ - symmetric stretching,  $\delta$ -bending, ip-in plane, op.-out of plane; Ring1-oxane(C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>,O<sub>10</sub>), Ring2-oxane(C<sub>20</sub>-C<sub>24</sub>,O<sub>29</sub>), Ring3-oxane(C<sub>32</sub>-C<sub>36</sub>,O<sub>41</sub>), Ring4-oxane(C<sub>51</sub>-C<sub>55</sub>,O<sub>60</sub>)

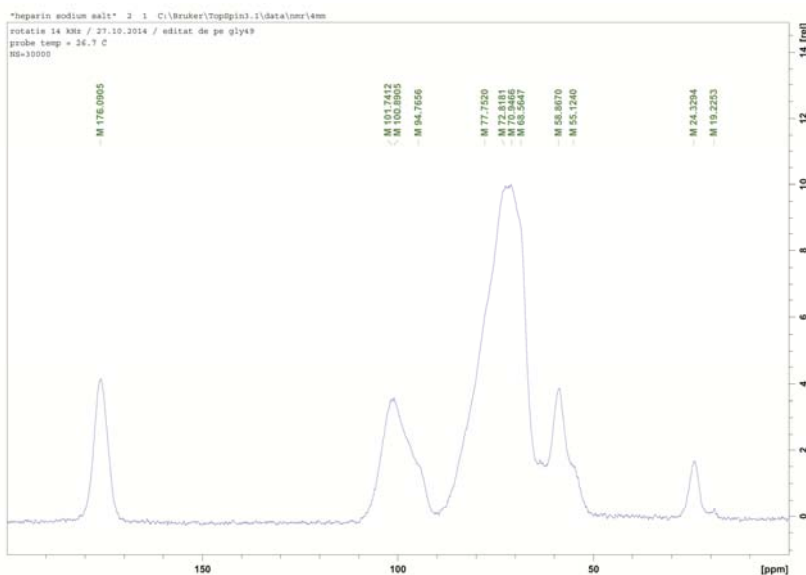
## RMN heparina

Pentru calculul spectrului RMN am folosit metoda GIAO (Gauge-Including Atomic Orbitals) implementata în programul Gaussian, cu funcționala hibridă PBE0, împreună cu setul de bază 6-311g(d,p). Pentru exprimarea deplasărilor chimice în ppm s-a folosit ca standard molecula de tetrametilsilan a cărei geometrie a fost optimizată

și apoi a fost calculat spectrul RMN al acesteia cu aceeași metodă și același set de bază ca și cel folosit pentru calculul moleculei de heparina.

**Table 3.** Deplasările chimice experimentale și teoretice pentru molecula de heparină (în ppm).

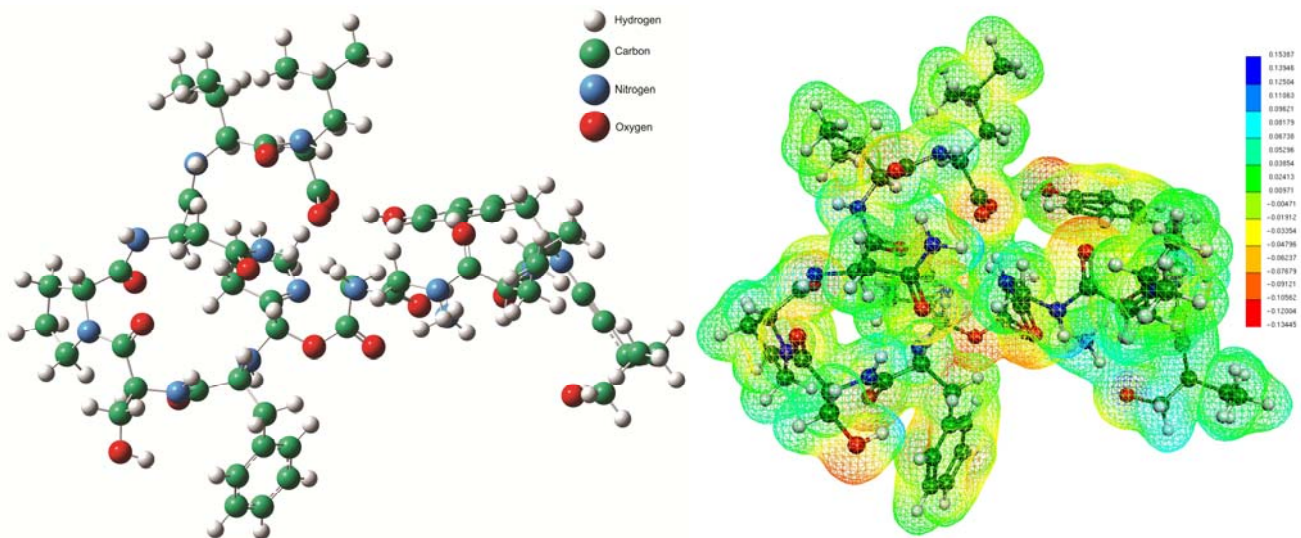
Nucleu	Experimental	Calculat	Nucleu	Experimental	Calculat
		PBE0/ 6-311g(d,p)			PBE0/ 6-311g(d,p)
C(56)		188.86	C(54)		72.43
C(25)		181.22	C(55)		72.27
C(20)		104.05	C(21)		71.91
C(51)		97.78	C(53)		71.24
C(32)		93.26	C(37)		70.21
C(1)		92.55	C(36)		68.97
C(4)		79.42	C(22)		68.41
C(52)		75.28	C(24)		68.05
C(5)		74.14	C(6)		67.73
C(23)		73.83	C(33)		62.41
C(34)		73.27	C(2)		55.20
C(35)		72.55	C(3)		34.55



**Fig. 4.** Spectrul <sup>13</sup>C NMR al heparinei pe proba solida.

## II. Proteina C-reactiva (CRP)

Proteina C reactivă (CRP) este o proteină sintetizată în ficat, ale cărei niveluri în sânge cresc în inflamație. Ea nu este însă specifică, adică nu poate indica natura sau localizarea respectivului proces inflamator. Valorile normale sunt de 0-1 mg/dL sau sub 10 mg/L, crescând însă de zeci sau sute de ori în cazul unei inflamații.



**Fig. 5.** Geometria optimizata și potențialul electrostatic calculat pentru CRP.

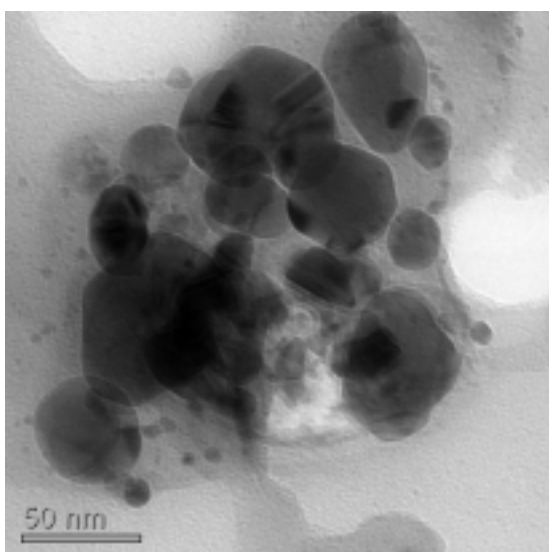
S-au efectuat calcule de optimizare a geometriei pentru un fragment din CRP, potențialul electrostatic a fost mapat.

CRP este format din 5 loburi însumând în total 16250 atomi, astfel o entitate este format din 3250 atomi majoritari C,H,O și N. În afară de acești atomi în număr mic mai conține atomi de S,P și Ca. Datorita dimensiunii mari a proteinei calcule de chimie cuantică încă nu am putut efectua, dar am reușit achiziționarea unui server cu 64 de procesoare și urmează efectuarea acestor calcule.

Va urma înregistrarea spectrelor FT-Raman, FTIR, SERS, respectiv conjugarea nanoparticulelor de aur cu CRP.

**Aceste rezultate vor fi folosite în continuare pentru modelarea nanoparticulelor de aur conjugate cu HSS respectiv CRP.**

**III. În cadrul acestui proiect au fost depuse eforturi pentru prepararea unor noi substraturi pentru amplificarea semnalului Raman. De asemenea, s-a urmărit ca aceste substraturi să fie biocompatibili, un aspect util în interacțiunea moleculelor de HSS respectiv CRP cu aceste substraturi.**



**Fig. 6.** Imagine TEM a nanoparticulelor de argint stabilizate cu PEG8000.

### 1. Nanoparticule de argint stabilizate cu PEG8000

Astfel, a fost sintetizat un substrat coloidal de argint folosind ca agent reducător și stabilizator polietilen glicol cu lanț lung (PEG8000). Imaginile TEM prezintă nanoparticule cu o dispersie în dimensiune de 10-100 nm. Proprietățile optimizate ale acestui coloid au fost stabilitatea și amplificarea Raman, rezultatele obținute fiind promițătoare.

## Cap. 3. Etapa II. finală an 2014

### Obiectivele etapei:

1. Prepararea nanoparticulelor de aur.
2. Funcționalizarea nanoparticulelor de aur.
3. Diseminarea rezultatelor.

### Rezultate pe activități

**R1.1.** S-au efectuat studii pentru optimizarea modelului nanoparticulelor de aur (dimensiune și formă).

**R1.2.** A fost realizată optimizarea modelului nanoparticulelor de aur reduse cu heparina (dimensiune și formă).

**R1.3.** Prin studii spectroscopice (SERS, UV-Vis, IR, AFM, TEM, SEM) am reușit caracterizarea fizico-chimică a nanoparticulelor de aur.

**R2.1.** Am efectuat primele încercări pentru funcționalizarea nanoparticulelor de aur optimizate cu PEG/albumina, ca un înveliș pentru încapsularea heparinei și a proteinei C-reactive.

**R2.2.** Calcule DFT (spectre IR și Raman calculate, sarcini atomice parțiale, potențial electrostatic molecular, momente de dipol și de multipol, energia orbitalilor HOMO-LUMO etc.) pentru heparină, respectiv proteina C-reactivă, ne-au validat datele experimentale.

**R2.3.** Am început testarea și încapsularea (heparinei și proteinei C-reactive) nanoparticulelor de aur funcționalizate prin metode spectroscopice (SERS, UV-Vis, IR, AFM, TEM, SEM).

**R3.1.** Au fost prezentate rezultate preliminare la următoarele conferințe: IC-ANMBES 2014, June 13<sup>th</sup>-15<sup>th</sup> 2014, Brasov, Romania; Surface-Enhanced Spectroscopies 2014 (SES 2014), August 7<sup>th</sup>-10<sup>th</sup> 2014, Technische Universität Chemnitz (Germany); 5<sup>th</sup> Conference on Advanced Spectroscopies on Biomedical and Nanostructured Systems (BioNanoSpec) September 7<sup>th</sup>-10<sup>th</sup> 2014, Cluj-Napoca, Romania.

**R3.2.** În cadrul proiectului, pentru etapa a doua au fost trimise spre publicare un număr de trei articole în reviste cotate ISI, respectiv se pregătesc un număr de 2 manuscrise pentru trimitere spre publicare în reviste cotate ISI.

**R3.3.** Pagina web a proiectului a fost actualizată.

**În conformitate cu obiectivele propuse în cadrul acestui proiect, a II-a etapă (2014) a vizat prepararea și funcționalizarea nanoparticulelor de aur.**

### I. Metodele folosite

#### I.1. Măsurători spectroscopice UV-Vis

Aceste măsurători au servit la determinarea benzii plasmonice și estimarea distribuției uniforme ale nanoparticulelor de aur (GNP) etc. Spectrele UV-Vis ale GNP au fost înregistrate cu un spectrofotometru UV-Vis Jasco V-630, prin utilizarea unor cuve de cuarț cu un drum optic de 2 cm.

#### I.2. Măsurători spectroscopice FTIR

Prin măsurători FTIR a fost verificată prezența heparinei pe suprafața GNP reduse cu heparină. Spectrele IR au fost înregistrate cu un spectrometru cu transformată Fourier, Bruker Equinox 55, respectiv un Jasco 4000 FTIR spectrometer in attenuated total reflectance (ATR).

#### I.3. Măsurători spectroscopice TEM (Transmission Electron Microscopy)

Dimensiunea și morfologia nanoparticulelor de aur au fost determinate prin utilizarea microscopiei electronice TEM. Măsurătorile TEM au efectuate cu un microscop JEOL JEM 1010 cu o tensiune de accelerare de 100 kV și echipat cu o cameră CCD de MegaViewIII. De asemenea, au fost efectuate și imagini TEM de înalta rezoluție cu ajutorul unui microscop PHILIPS CM 20, operat la 200 kV. Diametrele nanoparticulelor au fost evaluate din imaginile TEM cu ajutorul programului ImageJ 1.45s, program procurat din Wayne Rasband, NIH, USA.

#### **I.4. Măsurători spectroscopice SERS (Surface-Enhanced Raman Spectroscopy)**

Prin aceste măsurători a fost determinat capacitatea de amplificare a nanoparticulelor coloidale.

Spectrele SERS au fost înregistrate cu spectrometrele: Raman DeltaNu Advantage 532 (DeltaNu, Laramie, WY) echipat cu laser NdYAG de 532 nm cu frecvența dubla cu puterea laserului de 4 mW, respectiv Renishaw InVia Raman Microscope cu un laser Cobalt de 532 nm, Diode Pumped Solid State (DPSS), cu puterea de 200 mW.

#### **I.5. Teste de citotoxicitate (MTT)**

Protocolul cel mai des folosit pentru evaluarea citotoxicității implică folosirea sării de tetrazoliu MTT. Sarea de tetrazoliu este redusă la formazan, o formă colorată insolubilă în apă, doar de celule active metabolic, deci această analiză detectează doar celulele viabile. După solubilizare, formazanul produs se poate evalua cantitativ prin spectroscopie de absorbție, pentru că are o maximă de absorbție la 570 nm.

Toxicitatea indusă de nanoparticule de aur asupra celulelor epiteliale de carcinom pulmonar A549 a fost evaluată cu un test MTT. Celule au fost puse în plăci cu 96 de godeuri la o densitate de 5000 de celule/godeu cu 24 de ore înainte de efectuarea experimentului. Au fost incubate diferite concentrații de nanoparticule timp de 4 ore cu celule A549. După aceea mediul cu excesul de nanoparticule a fost înlăturat iar celule au fost cultivate în continuare timp de 20 de ore. După aceea a fost efectuat testul MTT conform instrucțiunilor producătorului.

## **II. Rezultate obținute**

### **II.1. Nanoparticule de aur acoperite cu proteina collagen**

Nanoparticulele de aur acoperite cu proteine sunt baza fundamentala a unui număr mare de aplicații în biomedicina. În cadrul acestui proiect s-a dezvoltat o metodă simplă și inovativă pentru sinteza unei substanțe coloidale de nanoparticule acoperite cu collagen foarte stabile. S-au obținut nanoparticule de dimensiuni și forme distincte prin utilizarea collagenului și a etanolului sau a collagenului și a peroxidului de hidrogen ca agent reducător dar și prin variația temperaturii, efectuată înaintea procesului de reducere. Nanoparticulele de aur au fost caracterizate prin spectroscopie de absorbție UV-vis și microscopie electronica de transmisie (TEM). Din datele experimentale s-a putut observa ca nanoparticulele sintetizate sub fierbere prin utilizarea mixturii de collagen cu etanol ca agent reducător sunt sferice cu diametrul mediu de 7-8 nm. În cazul nanoparticulelor sintetizate la temperatura camerei prin reducerea sării de aur cu mixtura de collagen cu apă oxigenată s-a putut observa o forma de zmeura (rasberry) a nanoparticulelor, cu o dimensiune medie de 70 nm. De asemenea s-a evaluat activitatea SERS a ambelor tipuri de nanoparticule prin utilizarea unui număr mare de analiți în concentrații variind de la  $10^{-5}$  M la  $10^{-7}$  M.

Așadar, procesul de sinteza prin amestecarea collagenului cu etanol necesită fierbere, rezultând în substanța coloidală preponderent nanoparticule sferice. Aceste nanoparticule vor fi numite în continuare GNPs-CLG-EtOH și au o dimensiune medie de 7-8 nm. În cazul în care agentul de reducere folosit a fost amestecul dintre collagen și apă oxigenată, sinteza a fost efectuată la temperatura camerei. Aceste nanoparticule au un diametru mediu de 70 nm și sunt anizotrope, având forma unei zmeure, fiind denumite GNPs-CLG-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Nanoparticulele obținute au fost caracterizate prin spectroscopie de absorbție UV-Vis și prin microscopie electronica TEM, mai apoi fiindu-le evaluate activitatea ca substrat SERS.

Pentru sinteza nanoparticulelor s-a folosit o soluție standard de sare de aur, preparata prin dizolvarea a 1 g hydrogen tetrachloraurate(III) hydrate 99.9% metal basis (Alfa Aesar) în 50 ml de apa ultra pură. De asemenea, collagenul a fost preparat prin amestecarea a 10 ml de apa ultra pură cu 0.02 g de collagen bovin extras din tendonul lui Achille (Sigma-Aldrich) în prezența a 500 μl de acid clorhidric 37% (Sigma Aldrich), utilizat pentru obținerea unei solubilități complete a collagenului în apa. Toate substanțele folosite, printre care si: hidroxid de sodiu (Fluka), apă oxigenată 10% (AppliChem), etanol, clorura de sodiu (Merck), clorura de crystal violet (Merck), rhodamine 6G (Sigma-Aldrich), rose bengal (Alfa Aesar), perclorat cresyl violet (Aldrich), clorura de Nile blue (Sigma Aldrich) și methylene blue (Alfa Aesar) au fost de puritate analitică. Toate soluțiile au fost preparate în apa ultra pură cu rezistivitatea mai mare de 18 MΩ (Direct-Q 3 UV, Millipore).

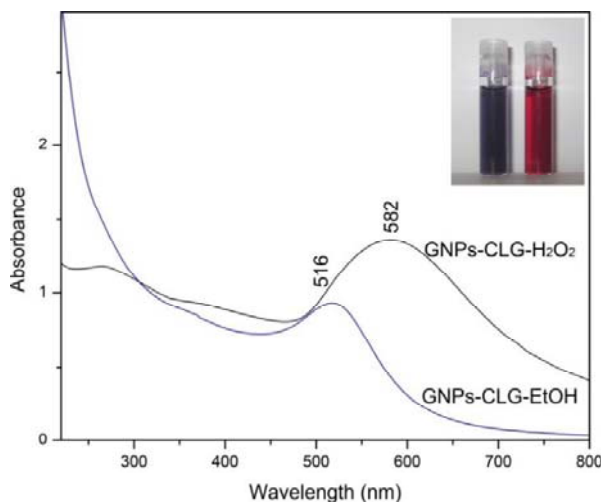
## **Metode**

Trebuie menționat faptul ca reducerea ionilor de aur nu a fost posibila prin utilizarea unei soluții simple, apoase, de colagen. Astfel, înainte de adăugarea colagenului sării de aur, s-a adăugat etanol sau apă oxigenată soluției apoase de colagen. Presupunem ca etanolul sau apă oxigenată denaturează proteina pana la o forma moleculara, astfel permițând reducerea ionilor de aur.

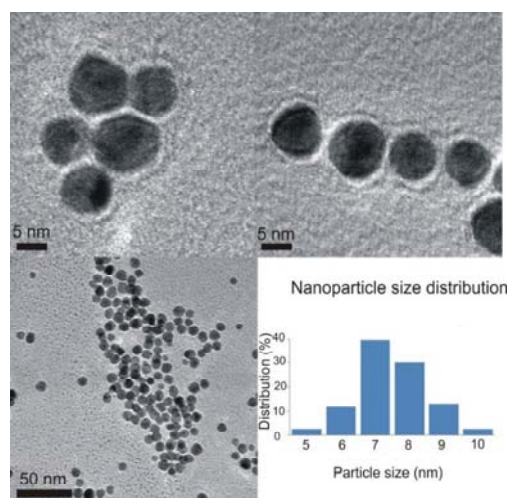
### Analiza

Spectrele UV-vis ale coloizilor de aur au fost înregistrate cu un spectrofotometru UV-vis Jasco V-630, prin utilizarea unor cuve de cuarț cu un drum optic de 2 cm. Dimensiunea și morfologia nanoparticulelor de aur au fost determinate prin utilizarea microscopiei TEM, efectuată cu un microscop JEOL JEM 1010. De asemenea, au fost efectuate și imagini TEM de înalta rezoluție cu ajutorul unui microscop PHILIPS CM 20, operat la 200 kV. Diametrele nanoparticulelor au fost calculate din imaginile TEM cu ajutorul programului ImageJ 1.45s (Wayne Rasband, NIH, USA).

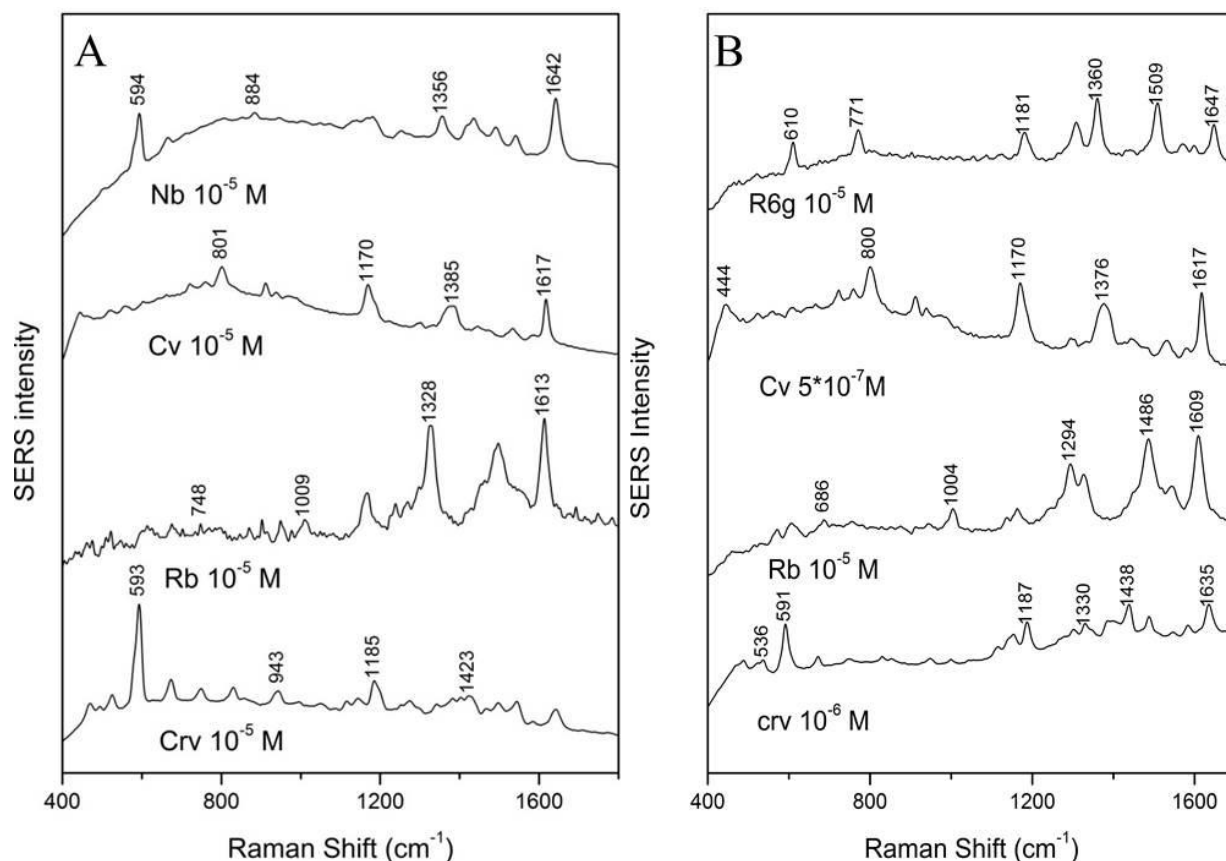
Spectrele SERS au fost înregistrate cu o rezoluție spectrală de  $8 \text{ cm}^{-1}$  de către un spectrometru Raman Advantage 200A (DeltaNu, Laramie, WY), echipat cu un laser de HeNe de 5 mW care emite la 633nm.



**Fig. II.2.1.** Spectrele UV-vis ale coloizilor de aur GNP<sub>s</sub>-CLG-EtOH (sticluța dreapta) și GNP<sub>s</sub>-CLG-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (sticluța stânga).



**Fig. II.2.2.** Imaginea TEM a nanoparticulelor GNP<sub>s</sub>-CLG-EtOH și distribuția lor dimensională.



**Fig. II.2.3.** (A) Spectrul SERS al analiților: cresyl violet (Crv), rose bengal (Rb), crystal violet (Cv) și nile blue (Nb) având ca substrat coloidal de GNPs-CLG-EtOH, (B) Spectrul SERS al analiților: cresyl violet (Crv), rose bengal (Rb), crystal violet (Cv) și nile blue (Nb) având ca substrat coloidal de GNPs-CLG-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Ușurința de preparare, timpul de stabilitate a acestor coloizi și capacitatea de a obține nanoparticule de diferite forme și dimensiuni oferă o gamă largă de aplicații ale acestora. Mai mult decât atât, datorită faptului că colagenul (proteină) este un agent de reducere și de stabilizare credem că pot fi utilizate cu succes în aplicații biomedicale.

### II.3. Nanoparticule de aur funcționalizate cu proteina BSA (Bovine Serum Albumin)

Nanoparticulele de aur au fost preparate pentru prima dată, dintr-un singur pas prin reducerea acidului cloroauric cu hidroxilamină-clorhidrică la temperatura camerei. Schimbând ordinea de adăugare a reactanților am obținut ansambluri de nanoparticule (NPAs) de 20 nm (NPAs20), respectiv de 120 nm (NPAs120).

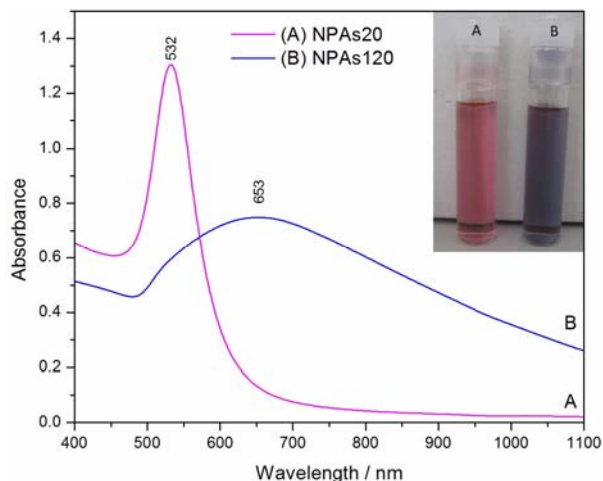
**NPAs20 nm:** Într-un pahar Erlenmeyer umplut cu 100 mL de apă ultra pură 20 mg de hidroxilamină-clorhidrică și 500  $\mu$ L de acid cloroauric la  $6 \times 10^{-2}$  molar au fost adăugate și mixate timp de 5 minute la o viteză de 250 rpm. După aceasta 1 mL NaOH 1% a fost adăugat.

**NPAs120 nm:** Într-un pahar Erlenmeyer umplut cu 100 mL de apă ultra pură 20 mg de hidroxilamină-clorhidrică și 1.2 mL NaOH 1% au fost adăugate și mixate timp de 5 minute la o viteză de 250 rpm. După cele 5 minute de mixare 500  $\mu$ L de acid cloroauric la  $6 \times 10^{-2}$  molar a fost adăugat și mixat în continuare timp de 10 minute.

**Stabilizarea/funcționalizarea nanoparticulelor cu BSA:** Dimensiunea ansamblurilor de nanoparticule poate fi contralată între 20-120 nm prin oprirea procesului de fragmentare naturală a nanoparticulelor, la diferite momente de timp după prepararea, folosind BSA. În acest scop la fiecare 4 mL de nanoparticule a fost adăugat 500  $\mu$ L de soluție BSA la o concentrație de 50 mg/10 mL.



Nanoparticulele au fost caracterizate prin măsurători UV-Vis, TEM și SERS iar toxicitatea lor a fost evaluată prin testul MTT. Fig. II.3.1. prezintă spectrele de absorbție UV-Vis al coloizilor NPAs20 și NPAs120 nm.

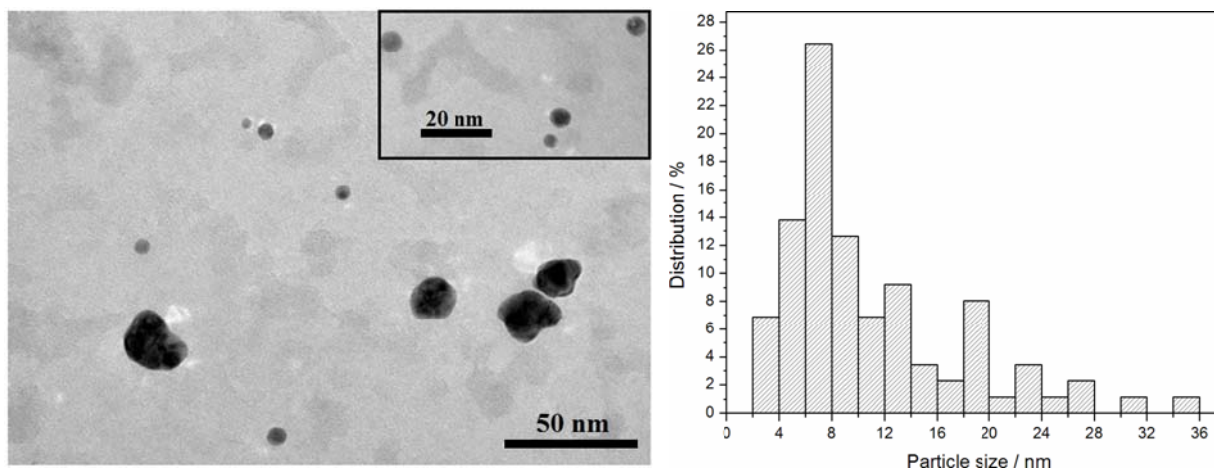


**Fig. II.3.1.** Spectrele de absorbție UV-Vis al coloizilor de aur reduse cu hidroxilamină NPAs20 (A), respectiv NPAs120(B), achiziționate la o zi după preparare.

Din spectrele UV-Vis se poate prezice că NPAs120 au diametre mai mari și distribuție dimensională mai mare decât ansamblul de nanoparticule de 20nm. NPAs120 sunt stabile din momentul preparării și prezintă o culoare de albastru închis însă NPAs20 se stabilizează după o zi de la preparare, având culoarea magenta. Spectrul UV-Vis al NPAs20 după preparare prezintă o bandă largă și se îngustează după o zi. Acest fapt poate fi explicat prin formarea unor agregări mai mari după prepararea, care se rup în ansamble de nanoparticule mai mici pe durate unei zi. Această restructurare ne permite un control

mai bun asupra dimensiunilor nanoparticulelor care este un factor foarte important în aplicații in-vivo.

Morfologia și dimensiunea nanoparticulelor de aur cu spectrul de absorbție prezentat în Fig. II.3.1, au fost determinate cu ajutorul microscopului electronic. În Fig. II.3.2 este prezentat imaginea TEM a coloidului de NPAs20 și analiza distribuției de masă a nanostructurilor, bazat pe înregistrările micrografice TEM.



**Fig. II.3.2.** Imagini TEM (stânga) a nanoparticulelor NPAs20, respectiv distribuția lor dimensională (dreapta).

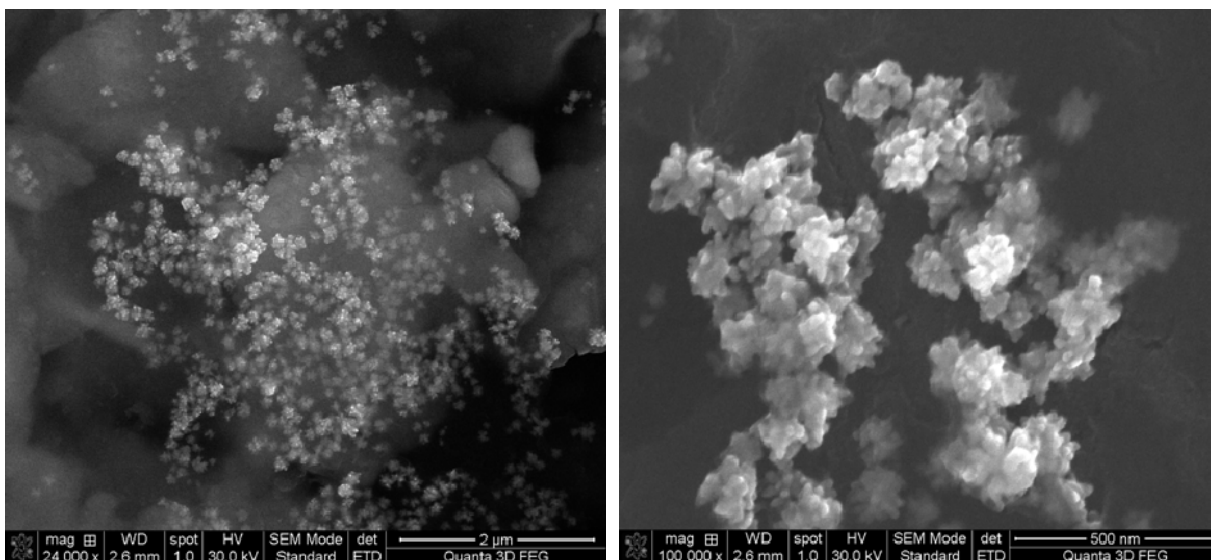
Imaginile TEM a coloidului NPAs20 (Fig. II.3.2) arată asamblări cu diametrele cuprinse între 10-35 nm, dar și nanoparticule cu diametre între 4-8 nm. Morfologia nanoasamblărilor observate în micrografiile TEM arată că nanoparticulele de 4-8 nm sunt elementele de construcție a nanoasamblărilor de 10-35nm.

Se știe că nanoparticulele se auto-asamblează în structuri mari prin procesul de creștere. Procesul de creștere este limitat de echilibrul dintre repulsia electrostatică și atracția van der Waals.

Forma neregulată a nanoasamblărilor conduce la o creștere a lungimilor de undă în spectrul UV-Vis, comparativ cu nanoparticule sferice de aceeași dimensiune. În consecință, conform Haiss et al. (Haiss, Thanh et al. 2007), în spectrul UV-Vis absorbția maximă la 532 nm, corespund nanoparticulelor cu diametrul de 53nm. Așa cum se observă în imaginea TEM, coloidul NPAs20 conține nanostructuri mai mici cu dimensiunea medie de 20nm.

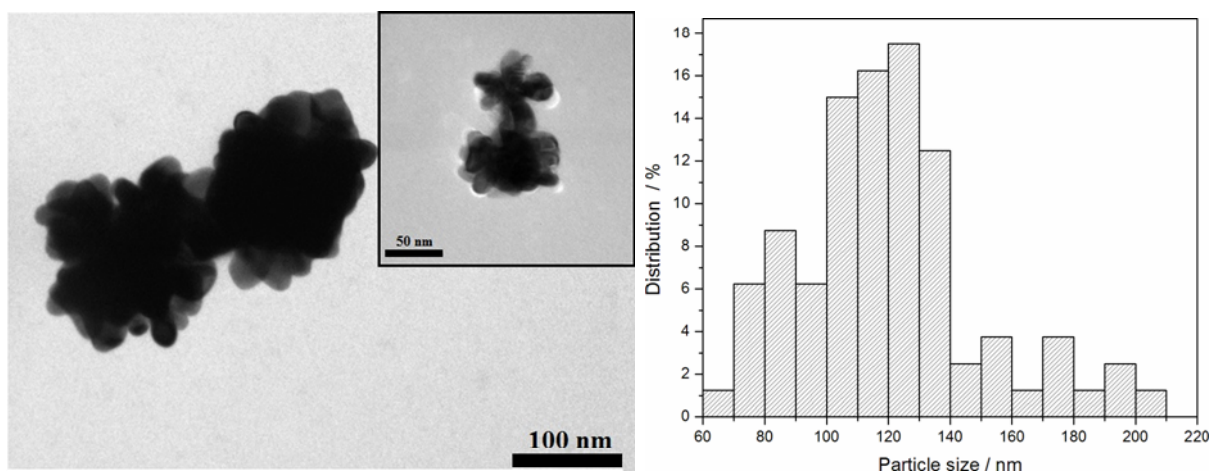
În coloidul NPAs120 observăm nanostructuri de formă neregulată cu o distribuție a dimensiunii cuprinse între 80-140nm, forme ce sunt prezentate în micrografiile SEM (Fig. II.3.3) și TEM (Fig. II.3.4).





**Fig. II.3.3.** Imagini SEM a nanoparticulelor NPA120.

Morfologia nanoparticulelor se poate observa mai clar în Fig. II.3.4, unde sunt imaginile TEM reprezentative împreună cu analiza distribuției de masă.



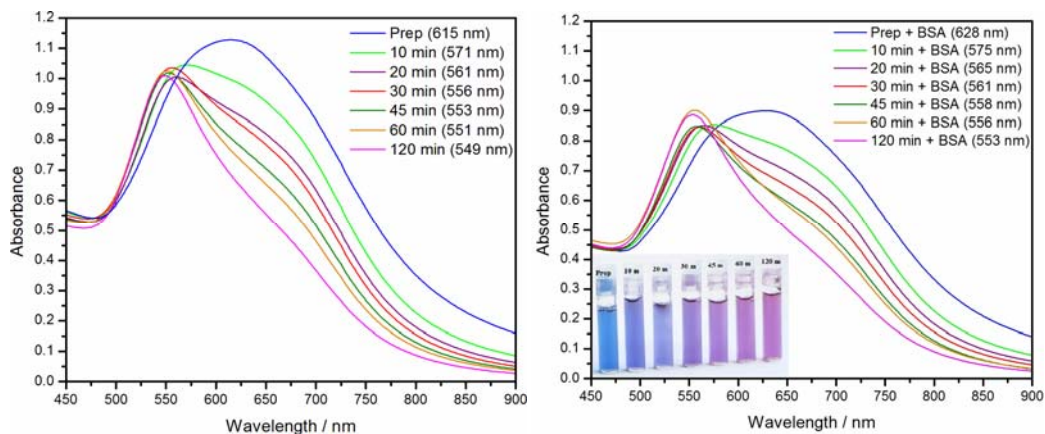
**Fig. II.3.4.** Imagini TEM (stânga) a nanoparticulelor NPA120, respectiv distribuția lor dimensională (dreapta).

Similar cu nanostructurile găsite în coloidul NPA20, și la coloidul NPA120 observăm elemente de construcție ale acestora dar cu diametre cuprinse între 20-30nm. Absorbția UV-Vis a coloidului NPA120 în domeniul NIR poate fi datorat formei neregulate a nanoparticulelor.

Bazat pe spectrul UV-Vis și a microgرافیilor electronice a celor doi coloizi, sinteza și stabilizarea procesului poate fi explicat cu ajutorul următorului proces. Imediat după amestecarea reactivilor și sintetizarea coloidului NPA20, mari asamblări se formează care se rup în părți mai mici în decurs de o zi. Coloidul NPA20 imediat după preparare are o culoare albastru închis cu o bandă de absorbție largă cu maximul în jur de 615 nm (Fig. II.3.5.). A doua zi după preparare absorbția maximă în spectrul UV-Vis suferă o deplasare mare (~ 80nm), și rămâne stabil la 532 nm. Banda largă inițială devine îngustă iar culoarea coloidului se modifică din violet în purpuriu în timp de o zi.

Coloidul NPA120 imediat după preparare are banda de absorbție la 706 nm, care în timp de o zi se deplasează la 653 nm. În acest caz procesul de fragmentare a nanoasamblărilor este slab și nici schimbări de culoare notabile nu s-au observat după o zi, la fel și banda de absorbție rămâne largă în spectrul de absorbție.

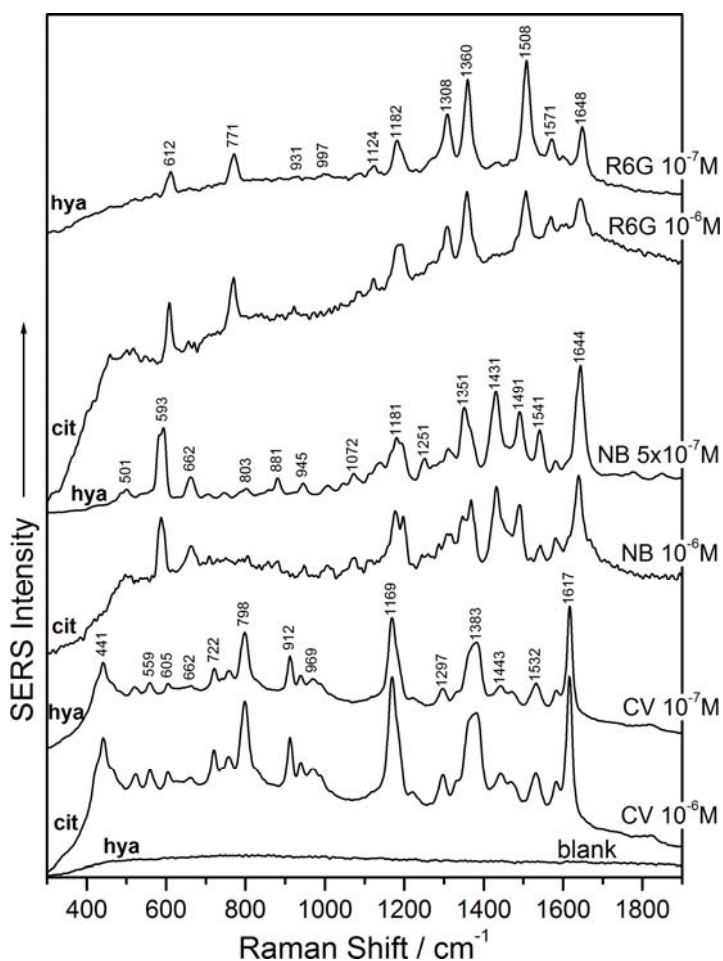
**NPA stabilizat cu BSA.** În următoarea secțiune prezentăm o posibilitate de a obține nanoparticule de dimensiune controlabilă, prin oprirea procesului de fragmentare naturală a asamblărilor de nanoparticule la diferite momente



**Fig. II.3.5.** Spectrul UV-Vis a NPAs20 achiziționate la diferite intervale de timp după sintetizare (stânga). Spectrul UV-Vis a NPAs20 achiziționate la 7 zile după ce au fost stabilizate cu proteina (dreapta).

după sintetizare folosind BSA (bovine serum albumin).

Așa cum am prezentat anterior coloidul NPAs20 chiar după sintetizare conține nanoasamblări mari, care prezintă o bandă largă de absorbție la 615 nm. În Fig. II.3.5 este prezentat banda de absorbție a coloidului NPAs20 chiar după sintetizare și la diferite intervale de timp în decurs de 120 minute, ilustrând deplasarea vârfului de rezonanță plasmonică de suprafață (surface plasmon resonance peak) la lungimi de undă mai mici.



**Fig. II.3.7.** Spectrul SERS al Crystal Violet (CV), Niel Blue (NB) și Rhodamine 6G (R6G) obținute cu nanoparticule reduse cu hydroxylamine (h), și cu citrat (c)

Astfel se poate observa că în decurs de 120 minute vârful de rezonanță plasmonică de suprafață se mută de la 615 la 549 nm, și continuă să se deplaseze până la 532 nm după o zi (Fig. II.3.1). În plus, banda de absorbție devine considerabil mai îngust după două ore și își continuă această evoluție în intervalul de timp de o zi (Fig. II.3.1).

În vederea obținerii nanoparticulelor de dimensiune controlabilă, soluția de coloid cu spectrul de absorbție din Fig. II.3.5(stanga) a fost stabilizat cu BSA. Pentru acest scop la fiecare 4mL de coloid a fost adăugat 500  $\mu$ L albumină la o concentrație de 50mg/10mL. La nanoparticulele stabilizate cu albumină sa observat că sunt foarte stabile, spectrul UV-Vis înregistrat după o săptămână este prezentat în Fig. II.3.5(dreapta).

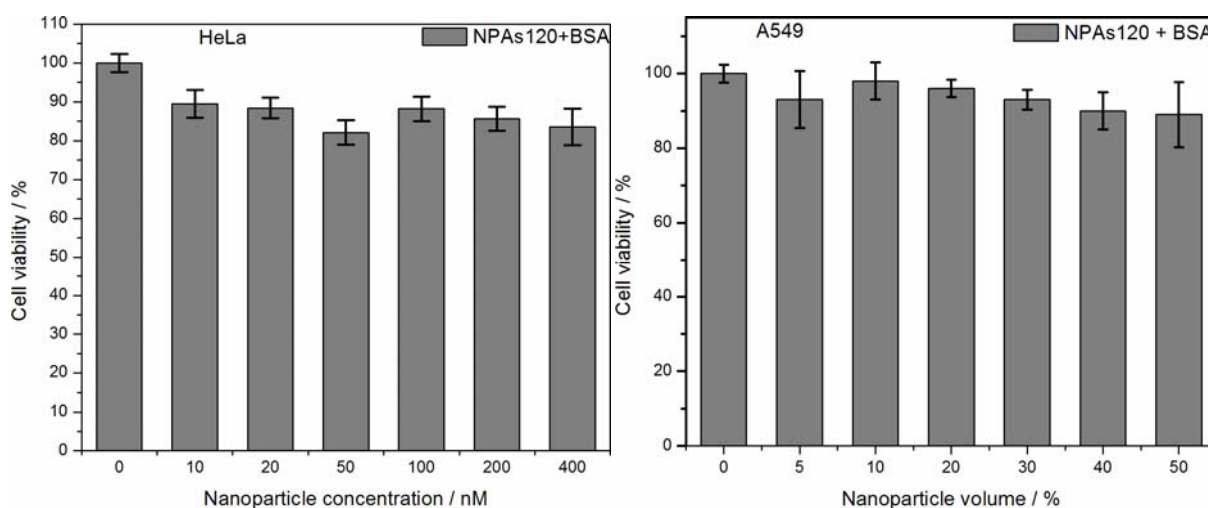
Din comparația spectrelor UV-Vis din Fig. II.3.5. se observă faptul că, la coloidul stabilizat cu albumină apare o deplasare de 4-5 nm. Această deplasare în spectrul UV-Vis este datorat formării de coroane de nanoparticulă-proteină, menționat în literatură de Podila (Podila, Chen et al. 2012). O excepție observată din compararea celor doua spectre imediat după preparare este o

deplasarea cu 13 nm după stabilizarea cu albumină. Acest dezacord este datorat faptului că procesul de stabilizare naturală este foarte rapid în primele 10 minute, în timp ce înregistrarea unui spectru UV-Vis necesită în jur de 2 minute.

Similar se pot obține nanoparticule de dimensiuni controlabile prin stabilizarea coloizilor NPAs120 cu albumină în intervalul de timp de 2 ore.

Pentru demonstrarea activității SERS ridicate ale noilor nanoparticule dezvoltate, spectrul SERS al diferitelor molecule de test obținute cu nanoparticule de aur reduse cu hidroxilamină, respectiv cu nanoparticule convenționale reduse cu citrat au fost comparate (Fig. II.3.7.). Spectrele SERS au fost înregistrate cu un spectrometru Raman Aavantage 200A (DeltaNu USA). Laserul HeNe emițând la 632.8 nm cu o putere de 3mW. Rezoluția spectrală a fost de  $\sim 10 \text{ cm}^{-1}$ . Pentru fiecare măsurătoare SERS 50  $\mu\text{L}$  de probă a fost adăugat la 500  $\mu\text{L}$  de coloid de aur. Pentru comparație au fost folosiți trei coloranți diferiți: Cristal Violet, Niel Blue și Rhodamine 6G. Din nefericire nu a fost posibil folosirea aceluiași cantități de analit pentru doi coloizi deoarece în cazul coloidului 20 nm NPAs20 la o concentrație de  $10^{-6}$  M semnalul a fost atât de intens încât chiar și la o secundă de timp de integrare detectorul se saturaseră. Pe de altă parte în cazul nanoparticulelor reduse cu citrat concentrația de  $10^{-7}$  M a fost prea puțin pentru a obține un semnal SERS acceptabil. Toate spectrele SERS au fost înregistrate cu același putere a laserului și același timp de înregistrare. Așa cum este vizibil, spectrele SERS obținute cu nanoparticulele reduse cu hidroxilamină sunt cel puțin atât de rezolvate ca și celelalte spectre, mai mult de atât în ciuda folosirii concentrațiilor de 10 ori mai mici raportul semnalul-zgomot are o calitate superioară față de spectrele obținute cu nanoparticulele de aur reduse cu citrat.

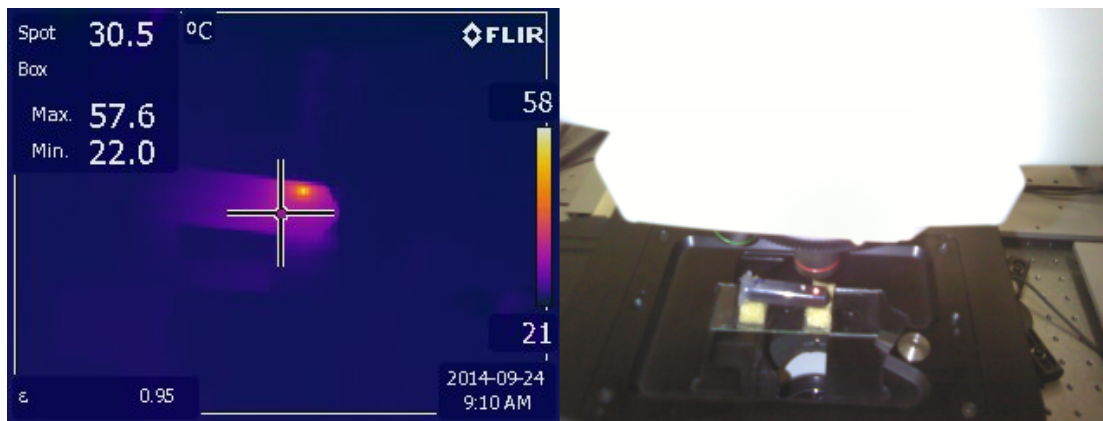
Toxicitatea indusă de nanoparticule de aur a fost evaluată ca și în cazul GNP\_HEP cu testul MTT. Viabilitatea celulelor HeLa, respectiv A549 în funcție de concentrația NPAs120 sunt prezentate pe Fig. II.3.8.



**Fig. II.3.8.** Viabilitatea a liniei celulare HeLa (stânga) și a liniei celulare A549 (dreapta) în funcție de concentrația NPAs120

Testele de toxicitate MTT arată că nanoparticulele au un efect non-toxic pentru ambele linii celulare, HeLa și A549. Astfel se observă că în ambele cazuri viabilitatea celulară este peste 85% pentru toate concentrațiile de nanoparticule folosite ceea ce indică un grad mare de biocompatibilitate a acestor nanoparticule învelite cu proteina BSA.

Datorită toxicității reduse pe lângă faptul ca aceste nanoparticule ar putea fi folosite ca și vehicule de transport pentru molecule biologice de interes, ele ar putea servi ca și agenți terapeutici prin hipertermie locală, fiind cunoscut faptul că nanoparticulele au capacitatea de a transforma energia absorbită în căldură. Datorită formei anizotrope a nanoparticulelor NPAs120, au bandă de absorbție care se suprapune parțial cu banda de tratament NIR, adică 675-875 nm. În această zonă laserele NIR penetrează cel mai bine țesutul biologic. Conform celor spuse mai devreme a fost testată răspunsul fototermic a NPAs120. Au fost iradiate cu un laser de 785 nm două tipuri de NPAs120 iar rezultatele iradierii sunt prezentate pe figurile Fig. II.3.9 și Fig. II.3.10.



**Fig. II.3.9** Răspunsul fototermic a NPAs120 învelite cu BSA la iradierea lor cu laserul 785nm.



**Fig. II.3.10.** Răspunsul fototermic a NPAs120 învelite cu heparină la iradierea lor cu laserul 785nm.

Atât nanoparticulele de aur învelite cu proteina BSA cât și cele cu heparină transformă lumina absorbită în căldură. Rata de transformare a energiei adsorbite a NPAs120 cu BSA este mai mare, nanoparticulele generând și temperaturi de 57 °C în timp ce cele cu heparină doar de 50°C. În cazul tratamentelor prin hipertermie menținerea temperaturii peste pragul terapeutic de 42 °C, timp de 30 de minute, țesutul țintit se consideră distrus. În consecință ambele categorii de nanoparticule pot fi opțiuni viabile pentru tratamentul prin hipertermie. Aceste nanoparticule sintetizate de la punctele 1, 2, 3 și 4 vor fi analizate mai profund (citotoxicitate, viabilitate, biocompatibilitate etc.), vor fi folosite mai departe pentru tehnica SESORS.

## Cap. 4. Etapa III. finală an 2015

### Obiectivele etapei:

1. Testarea viabilității respectiv biocompatibilitatii nanoparticulelor de aur.
2. Optimizarea configurației Raman offset (SORS și SESORS).
3. Diseminarea rezultatelor.

### Rezultate pe activități

**R1.1.** S-au efectuat teste de viabilitate cu nanoparticule de aur funcționalizate cu heparină și cu proteina C reactivă. Consultare cu experți biologi și medicali.

**R1.2.** Am început teste de biocompatibilitate cu nanoparticule de aur funcționalizate cu heparină și cu proteina C reactivă. Consultare cu experți biologi și medicali.

**R1.3.** S-a efectuat un stagiul de documentare și cercetare la Chemnitz, Germania.

**R2.1.** Am efectuat primele încercări pentru teste inițiale de SORS și SESORS cu privire la rezultatele obținute la testele de viabilitate.

**R2.2.** Îmbunătățiri pe nanoparticulele de aur funcționalizate după testele inițiale făcute cu configurația Raman offset.

**R2.3.** S-a efectuat un stagiul de documentare și cercetare la Chemnitz, Germania.

**R3.1.** Au fost prezentate rezultatele preliminare la următoarele conferințe internaționale: Conference on Advanced Vibrational Spectroscopy (ICAVS8), July 12<sup>th</sup>-17<sup>th</sup> 2015, Viena (Austria); XIII<sup>th</sup> International Conference on Molecular Spectroscopy, September 9<sup>th</sup>-13<sup>th</sup> 2015, Wrocław (Polonia)10<sup>th</sup>; International Conference on Processes in Isotopes and Molecules (PIM 2015), September 23<sup>th</sup>-25<sup>th</sup> 2015, Cluj-Napoca; A XIII-a Conferința Națională de Fizică Medicală - 7-8 Noiembrie 2015, Cluj Napoca.

**R3.2.** În cadrul proiectului, pentru etapa a treia a fost publicat un articol ISI, au fost trimise spre publicare un număr de 3 articole în reviste cotate ISI, respectiv sunt în pregătire un număr de 2 manuscrise pentru trimitere spre publicare în reviste cotate ISI.

**R3.3.** Pagina web a proiectului a fost actualizată.

**În conformitate cu obiectivele propuse în cadrul acestui proiect, a III-a etapă (2015) a vizat testarea viabilității respectiv biocompatibilitatii nanoparticulelor de aur și primele teste pentru optimizarea configurației Raman offset (SORS și SESORS).**

### I. Metodele folosite

#### **I.1. Măsurători spectroscopice UV-Vis**

Aceste măsurători au servit la determinarea benzii plasmonice și estimarea distribuției uniforme ale nanoparticulelor de aur (GNP) etc. Spectrele UV-Vis ale GNP au fost înregistrate cu un spectrofotometru UV-Vis Jasco V-630, prin utilizarea unor cuve de cuarț cu un drum optic de 2 cm.

#### **I.2. Măsurători spectroscopice FTIR**

Prin măsurători FTIR a fost verificată prezența heparinei pe suprafața GNP reduse cu heparină. Spectrele IR au fost înregistrate cu un spectrometru cu transformată Fourier, Bruker Equinox 55, respectiv un Jasco 4000 FTIR spectrometer in attenuated total reflectance (ATR).

#### **I.3. Măsurători spectroscopice TEM (Transmission Electron Microscopy)**

Dimensiunea și morfologia nanoparticulelor de aur au fost determinate prin utilizarea microscopiei electronice TEM. Măsurătorile TEM au efectuate cu un microscop JEOL JEM 1010 cu o tensiune de accelerare de 100 kV și echipat cu o cameră CCD de MegaViewIII. De asemenea, au fost efectuate și imagini TEM de înalta rezoluție cu



ajutorul unui microscop PHILIPS CM 20, operat la 200 kV. Diametrele nanoparticulelor au fost evaluate din imaginile TEM cu ajutorul programului ImageJ 1.45s, program procurat din Wayne Rasband, NIH, USA.

#### I.4. Măsurători spectroscopice SERS (Surface-Enhanced Raman Spectroscopy)

Prin aceste măsurători a fost determinat capacitatea de amplificare a nanoparticulelor coloidale.

Spectrele SERS au fost înregistrate cu spectrometrele: Raman DeltaNu Advantage 532 (DeltaNu, Laramie, WY) echipat cu laser NdYAG de 532 nm cu frecvența dubla cu puterea laserului de 4 mW, respectiv Renishaw InVia Raman Microscope cu un laser Cobalt de 532 nm, Diode Pumped Solid State (DPSS), cu puterea de 200 mW.

#### I.5. Teste de citotoxicitate (MTT)

Protocolul cel mai des folosit pentru evaluarea citotoxicității implică folosirea sării de tetrazoliu MTT. Sarea de tetrazoliu este redusă la formazan, o formă colorată insolubilă în apă, doar de celule active metabolic, deci această analiză detectează doar celulele viabile. După solubilizare, formazanul produs se poate evalua cantitativ prin spectroscopie de absorbție, pentru că are o maximă de absorbție la 570 nm.

Toxicitatea indusă de nanoparticule de aur asupra celulelor epiteliale de carcinom pulmonar A549 a fost evaluată cu un test MTT. Celule au fost puse în plăci cu 96 de godeuri la o densitate de 5000 de celule/godeu cu 24 de ore înainte de efectuarea experimentului. Au fost incubate diferite concentrații de nanoparticule timp de 4 ore cu celule A549. După aceea mediul cu excesul de nanoparticule a fost înlăturat iar celule au fost cultivate în continuare timp de 20 de ore. După aceea a fost efectuat testul MTT conform instrucțiunilor producătorului.

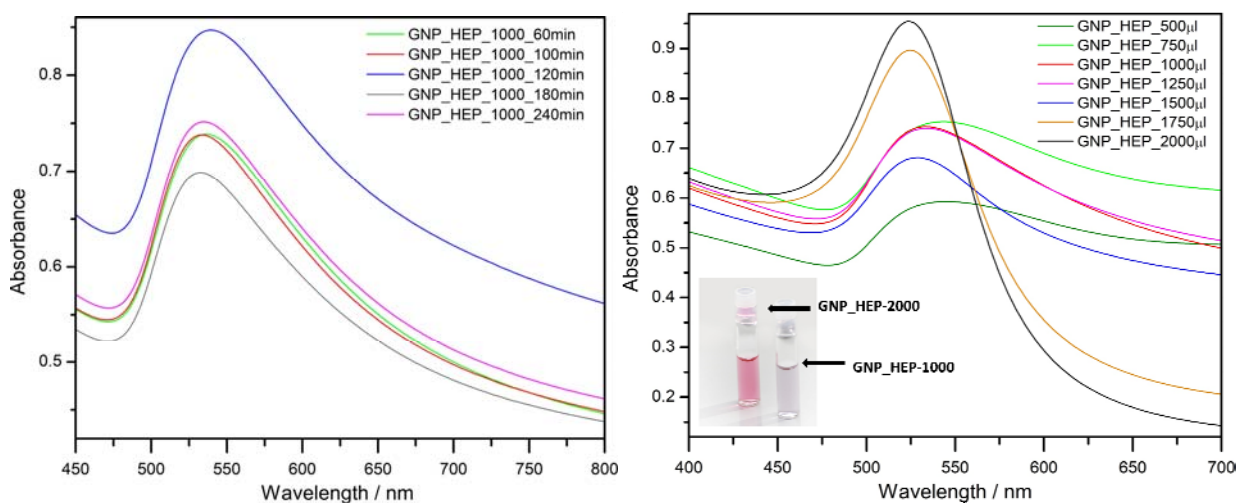
## II. Rezultate obținute

### II.1. Nanoparticule de aur reduse cu heparină

În această etapă am dezvoltat o metodă simplă de preparare a nanoparticulelor de aur în soluție apoasă, folosind ca agent de reducere și stabilizare sarea de sodiu a heparinei și ca precursor  $\text{HAuCl}_4$ . Nanoparticulele de aur reduse cu heparina (GNP\_HEP) obținute au fost investigate prin spectroscopia UV-Vis, FTIR, SERS și TEM iar toxicitatea lor a fost evaluată prin testul MTT.

**Sinteza nanoparticulelor:** Într-un balon cu fund rotund de 100-mL a fost adăugat acid clorauric (1 g  $\text{HAuCl}_4$  / 50 mL  $\text{H}_2\text{O}$ , 100  $\mu\text{L}$ ), și soluția astfel obținută a fost încălzită până la fierbere. Apoi, o soluție de heparina (1%) a fost injectată sub agitare încălzind amestecul aproximativ 120 minute. Toata sticlăria utilizată a fost curățată în baie de apă regală ( $\text{HCl}:\text{HNO}_3$  3:1) proaspăt preparată apoi clătită complet cu apă înainte de utilizare.

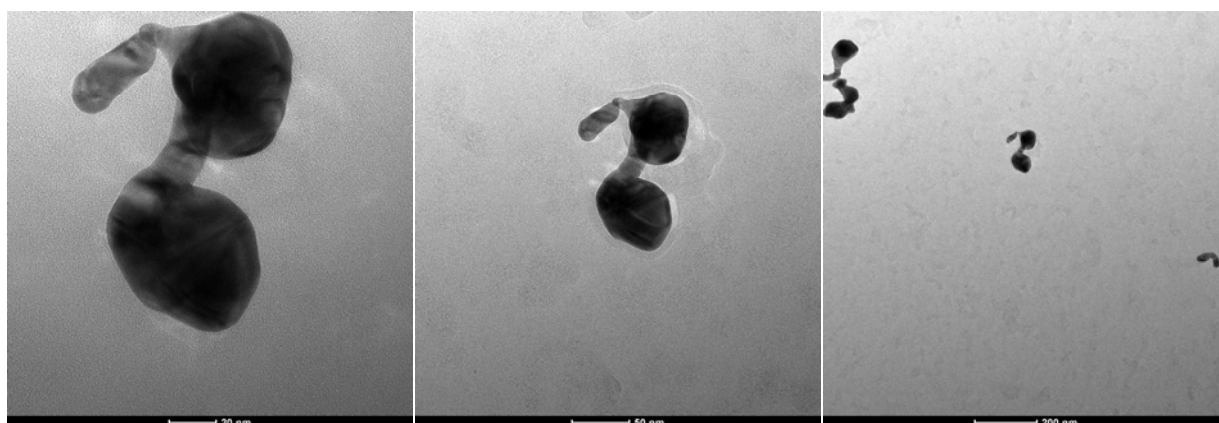
La sinteza nanoparticulelor a fost studiată atât influența concentrației heparinei adăugate cât și timpul de fierbere. În Fig. II.1.1 sunt prezentate spectrele UV-Vis al GNP\_HEP în funcție de concentrația heparinei adăugate în timpul preparării și în funcție de timpul de preparare.



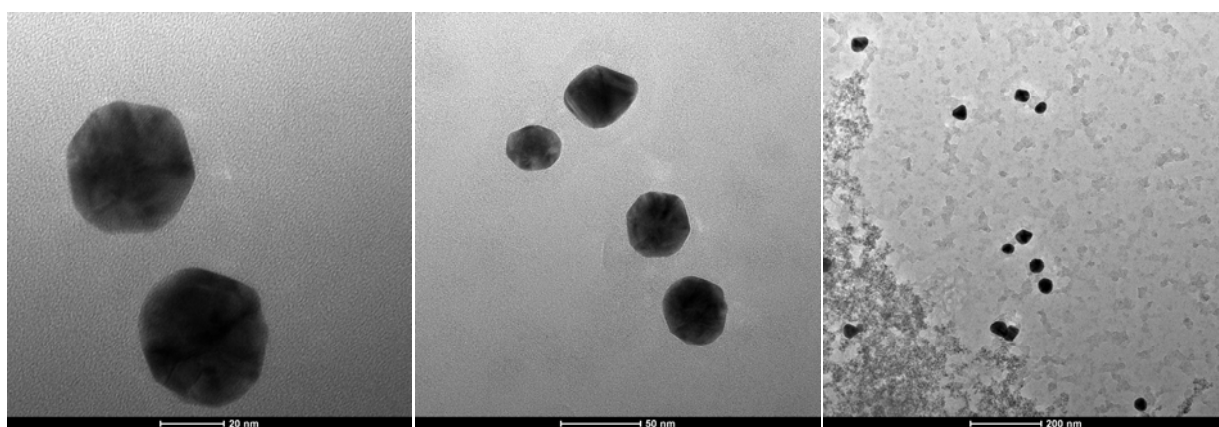
**Fig. II.1.1.** Spectrele UV-Vis a GNP\_HEP în funcție de timpul de fierbere (stânga) și în funcție de concentrația heparinei din nanoparticule (dreapta).

Pentru nanoparticulele de aur preparate la concentrații diferite de heparină, valorile  $\lambda_{\max}$  au fost observate în domeniul 524-543 nm, valori caracteristice rezonanței plasmonice a nanoparticulelor de aur. Conform spectrelor UV-Vis se poate observa ca intensitatea benzii plasmonice este dependentă de timpul de fierbere, ajungând la o intensitate maximă la o fierbere timp de 120 de minute a coloidului. În continuare toate nanoparticulele au fost preparate prin fierbere timp de 120 de minute. Se poate observa din spectrele UV-Vis a coloizilor ca nanoparticulele cu cea mai mică dimensiune și cu cea mai mare monodispersitate se pot obține prin folosirea în timpul sintezei unor concentrații mai mari de heparină. Ținând cont de forma spectrelor UV-Vis și de rezultatele măsurătorilor SERS și IR, care vor fi prezentate mai târziu, au fost selectate două tipuri de nanoparticule pentru continuarea studiului, GNP\_HEP\_1000 și GNP\_HEP\_2000 cu spectrele din Fig. II.1.1.

Așa cum era de așteptat din rezultatele UV-Vis, nanoparticulele GNP\_HEP\_2000 au dimensiuni mai mici decât cele GNP\_HEP\_1000 confirmat și de micrografiile TEM. Imaginile TEM a GNP\_HEP\_1000 sunt prezentate de Fig. II.1.2 iar cel a GNP\_HEP\_2000 de Fig. II.1.3.



**Fig. II.1.2.** Imaginile TEM al GNP\_HEP\_1000.



**Fig. II.1.3.** Imaginile TEM al GNP\_HEP\_2000.

Imaginile TEM a GNP\_HEP\_1000 prezintă nanoparticule cu un diametru de 50 nm iar cel a GNP\_HEP\_2000 indică nanoparticule cu dimensiuni de 25 nm. Ambele nanoparticule prezintă distribuție îngustă a dimensiunilor cu o dimensiune care se pretează (între 10 la 100 nm) pentru injectare în sisteme vii.

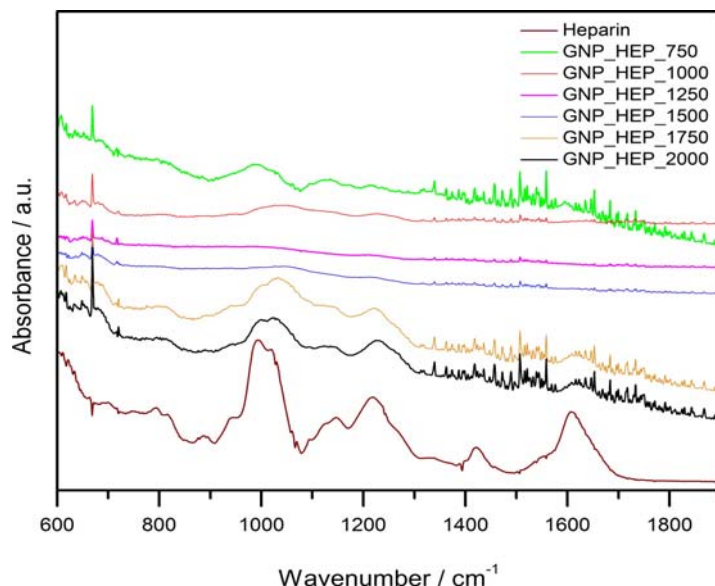
În continuare a fost determinată capacitatea de amplificare a suprafețelor nanoparticulelor coloidale prin spectroscopia SERS. Fig. II.1.4 arată spectrele SERS al cristalului violet la o concentrație de  $10^{-6}$  M obținute pe nanoparticule GNP\_HEP\_:-500-750-1000-1250-1500-1750.



**Fig. II.1.4.** Spectrele SERS a Cristalului Violet la concentrație de  $10^{-6}$  M obținute pe nanoparticule GNP HEP 500 750 1000 1250 1500 1750.

Spectrele SERS au fost înregistrate cu un spectrometru Renishaw, rezoluția spectrală a fost de  $\sim 4$   $\text{cm}^{-1}$ . Pentru fiecare măsurătoare SERS 70  $\mu\text{L}$  de probă a fost adăugat la 630  $\mu\text{L}$  de coloid de aur. Așa cum se poate observa cea mai mare amplificare SERS a fost obținută la folosirea GNP\_HEP\_1000. Folosind a concentrație de heparină mai mare în timpul sintezei, s-a observat formarea unui înveliș de heparină mai groasă pe suprafața nanoparticulelor ceea ce împiedică adsorbția analitului la suprafața metalică. Folosind o concentrație mai mică de heparină conduce sinteza la formarea de nanoparticule coloidale într-un număr mai mic, ceea ce conduce la o amplificare mai slabă.

De obicei în timpul sintezei nanoparticulelor coloidale agentul reducător se denaturează de aceea este foarte important verificării prezenței heparinei intacte pe suprafața nanoparticulelor. Prin măsurători FTIR a fost verificată prezența heparinei pe suprafața GNP iar rezultatele aferente sunt prezentate pe Fig. II.1.5.

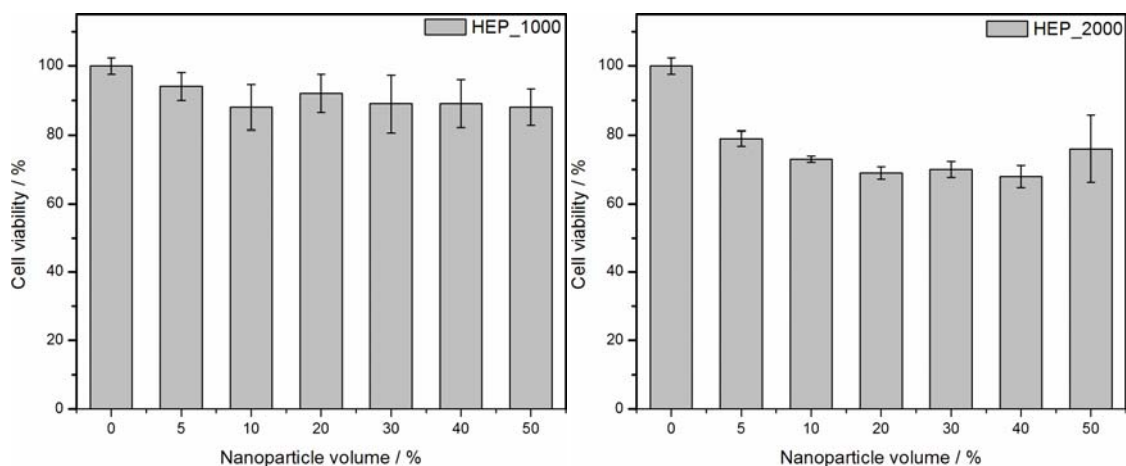


**Fig. II.1.5.** Spectrele FTIR al heparinei și a GNP\_HEP sintetizate cu concentrații diferite de heparina.

Măsurătorile FTIR au arătat că heparina este prezentă pe suprafața GNP\_HEP-ului.

Pe lângă dimensiunea nanoparticulelor pentru aplicații in-vivo un alt aspect foarte important este toxicitatea. Toxicitatea indusă de nanoparticule de aur a fost evaluată cu un test MTT. Viabilitatea celulelor în funcție de concentrația GNP\_HEP\_1000 și GNP\_HEP\_2000 sunt prezentate pe Fig. II.1.6.





**Fig. II.1.6.** Viabilitatea celulelor A549 în funcție de concentrația GNP\_HEP\_1000 (stânga) și GNP\_HEP\_2000 (dreapta).

Testele de toxicitate MTT arată că nanoparticulele au un efect non-toxic pentru linia celulară A549. Astfel se observă că în cazul nanoparticulelor GNP\_HEP\_1000 viabilitatea celulară este peste 80% pentru toate concentrațiile de nanoparticule folosite, ceea ce indică un grad mare de biocompatibilitate a acestor nanoparticule. Pentru nanoparticulele GNP\_HEP\_2000 viabilitatea celulară scade până la aproximativ 70%, deci caracterul non-toxic al nanoparticulelor se păstrează și pentru acest tip de nanoparticule. Diferențele dintre cele două teste se pot corela cu diferențele între proprietățile fizico-chimice ale celor două tipuri de nanoparticule.

Pentru nanoparticulele de aur preparate la concentrații diferite de heparină, valorile  $\lambda_{\max}$  au fost observate în domeniul 524-543 nm, valori care sunt tipic benzi de rezonanță plasmonică pentru nanoparticulele de aur. Din spectrele UV-Vis înregistrate în funcție de timpul de preparare reiese că timpul ideal pentru a obține nanoparticule cât mai uniforme este 120 de minute. Spectrele SERS al cristalului violet obținute cu nanoparticulelor GNP\_HEP au demonstrat ca pentru acest tip de măsurători nanoparticule cele mai adecvate sunt GNP\_HEP\_1000. Măsurătorile FTIR au demonstrat prezența heparinei pe suprafața nanoparticulelor de aur.

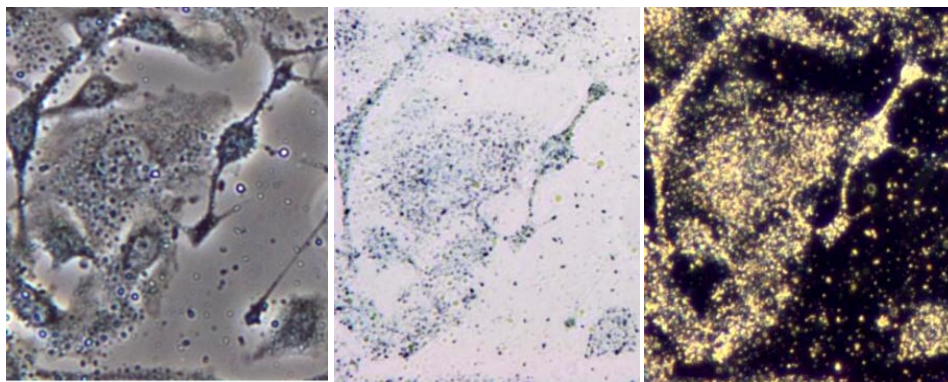
Luând în considerare rezultatele menționate mai sus și faptul că heparina se leagă de țesuturi trombotice, GNP\_HEP sunt adecvate pentru spectroscopia SESORS (Surface Enhanced Spatial Offset Raman Spectroscopy) în monitorizarea trombozei. Ca perspectivă, aceste GNP vor fi injectate la diferite adâncimi de țesut pentru a stabili o limită de detecție pentru SESORS.

## II.2. Nanoparticule de aur reduse cu hidroxilamina pentru imagistica Raman/SERS necesare pentru configurația SESORS

Așteptările societății de la nanotehnologie sunt foarte mari. Nanotehnologia urmează să schimbe puternic modul în care trăim. În mod particular, nanomedicina promite noi metode de diagnostic și tratament mult superioare față de cele existente. Nanoparticulele de aur reprezintă o componentă importantă prin care nanomedicina își propune să revoluționeze diagnosticul și tratamentul. Astfel, suprafața nanoparticulelor de aur poate fi modificată cu receptori și molecule funcționale, fiind capabile să detecteze molecule sau celule relevante pentru diagnostic, sau să fie funcționalizate cu medicamente și livrate vectorizat (țintit) în scop de tratament. Astfel de nanoparticule, cu proprietăți teranostice trebuie însă testate și din punct de vedere biologic, pentru a evalua citotoxicitatea acestora.

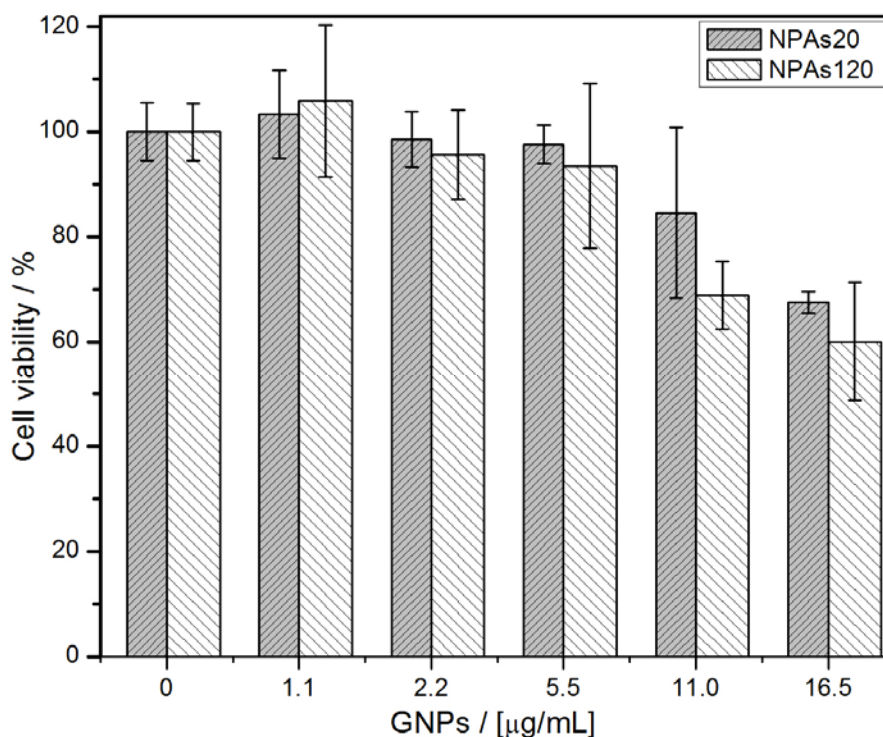
În cadrul acestui proiect a fost sintetizate nanoparticule de aur, folosind hidroxilamina respectiv heparina ca agent reducător (ref. articol J nanopart research). Așa cum a fost descris și în rapoartele anterioare, din condițiile de sinteză se pot obține nanoparticule de diferite dimensiuni între 20 și 120 nm și diferite forme geometrice. Nanoparticulele au fost caracterizate din punct de vedere fizico-chimic (UV-Vis, TEM, Zeta-potențial, DLS, SERS) în etapa trecută a proiectului.

În această etapă au fost efectuate activități privind evaluarea impactului biologic al nanoparticulelor (internalizarea celulară și citotoxicitatea) precum și eficiența acestora în mappingul Raman, respectiv SERS. Pentru a urmări internalizarea celulară a nanoparticulelor de aur, acestea au fost incubate cu celule tip A549 timp de 24h, după care celulele au fost spălate pentru a îndepărta nanoparticulele de pe suprafața acestora. Astfel, imaginile de microscopie tip phase-contrast, bright-field și dark-field au pus în evidență agregatele de NP internalizate în celule. Figura II.2.1. prezintă imaginile de microscopie obținute, demonstrând eficiența în internalizare a NP în celule tip A549.



**Figura II.2.1.** Imagini microscopice phase-contrast, bright-field și dark-field ce pun în evidență internalizarea NP de aur în celule A549.

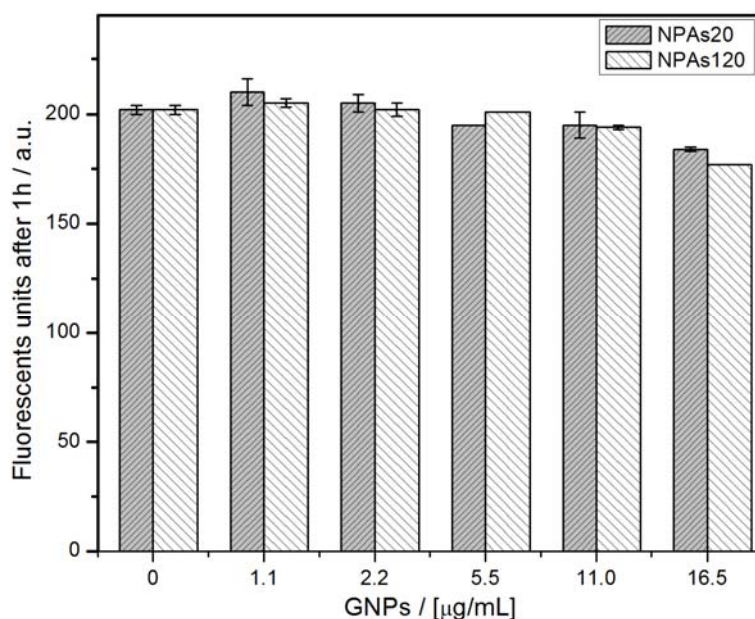
Citotoxicitatea NPAs20 și NPAs120 a fost evaluată folosind teste de tip MTT. Figura II.2.2. prezintă viabilitatea celulară pentru linia de A549 tratată cu NPAs20, respectiv NPAs120 la concentrații în domeniul 1.1 la 16.5  $\mu\text{g/mL}$ .



**Figura II.2.2.** Viabilitatea celulară pentru culturi celulare tip A549 tratate cu NPAs20, respectiv NPAs120 de diferite concentrații.

După cum se poate observa în Fig. II.2.2., nici una din cele 2 tipuri de nanoparticule nu induc toxicitate semnificativă până la o concentrație de 5.5  $\mu\text{g/mL}$ . Începând cu concentrații de 5.5  $\mu\text{g/mL}$  viabilitatea celulară începe să scadă, dar rămâne însă peste 60% în domeniul de concentrații examinate.

Speciile reactive de oxigen (ROS) sunt foarte dăunătoare pentru celulele datorită reactivității mari a acestora. ROS reacționează ușor cu membrana celulară sau cu ADN-ul celular cauzând deteriorări ireversibile ce duc la moarte celulară. Astfel, am fost interesați în acest studiu dacă NP internalizate contribuie la o creștere a concentrației de ROS în celule. Figura II.2.3. prezintă testul ROS la diferite concentrații de NP de aur.

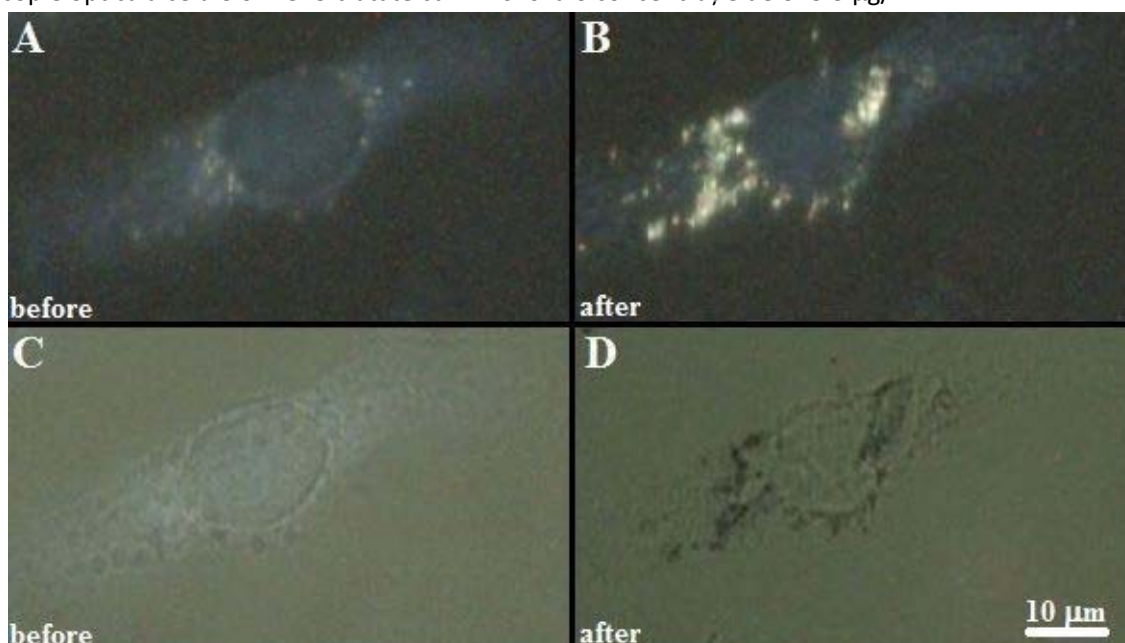


**Figura II.2.3.** Teste ROS pe celule tip A549 la diferite concentrații de NPs20, respectiv NPs120.

Așa cum se observă din Figura II.2.3., nici una din cele 2 tipuri de NP nu induce o creștere semnificativă a speciilor ROS. Scăderea speciilor ROS în domeniul concentrațiilor 11-16.5 μg/mL este pus pe seama scăderii viabilității celulare.

Testele ROS și testele MTT au fost efectuate la aceleași concentrații de NP. Astfel, pe baza acestor teste putem concluziona că NP de aur reduse cu hidroxilamină, cu dimensiuni între 20 și 120 nm pot fi folosite în domeniul de concentrații de aur 1-5,5 μg/mL, fără a induce efecte biologice în mod semnificativ.

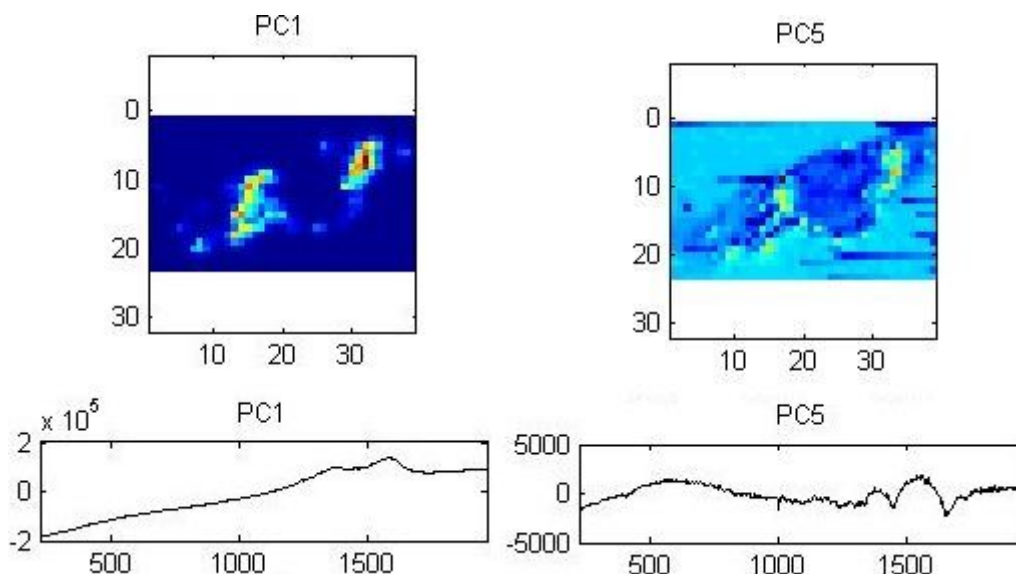
Internalizarea NP de aur poate fi pusă în evidență și prin imagistica Raman. Figura II.2.4. prezintă imagini de microscopie optică a celulelor A549 tratate cu NPs20 la o concentrație de 5.5 μg/mL.



**Figura II.2.4.** Imagini de microscopie optică dark field (A,B) și bright field (C,D) a celulelor A549 tratate cu nanoparticule, înainte și după maparea Raman.

Pentru a ilustra cât mai bine modul în care np pot fi evidențiate prin imagistica Raman, au fost alese celule pentru care agregatele de NP sunt clar vizibile în imaginile de microscopie optică. După cum se observă în Figura II.2.4., scanarea suprafeței cu laserul 532 nm, celula este evident afectată prin distrugerea membranei, datorită energiei radiative absorbite de NP și cedate sub formă de căldură (Figura II.2.4. B,D).

Hărțile Raman sunt în foarte mare concordanță cu cele afirmate anterior. Se observă o foarte bună corelare a zonelor din imaginile de microscopie optică și a celor false obținute pe baza unor componente principale din map-ul Raman, Figura II.2.5.



**Figura II.2.5.** Harti Raman a celor mai relevante componente principale, în cazul de față PC1 și PC5, obținute în urma analizei în componente principale.

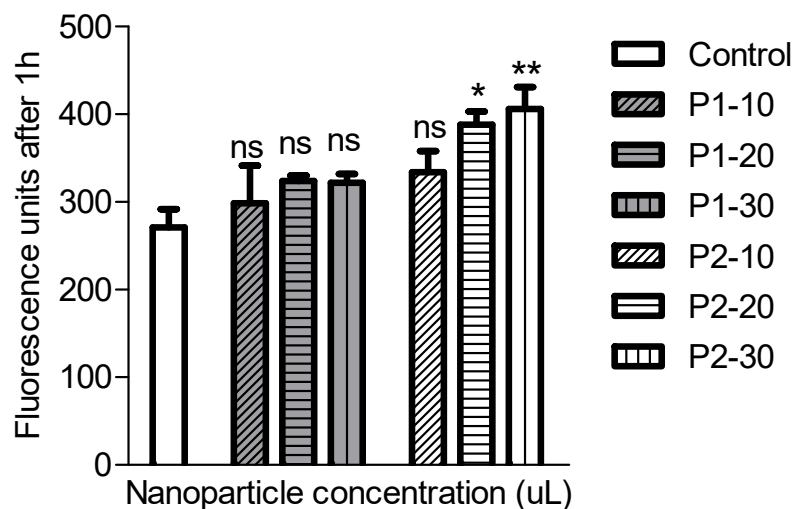
Astfel, internalizare NP poate fi pusă în evidență și pe baza mapping-ului Raman. În acest caz, imaginea este reconstruită pe baza benzilor ce conțin informație structurală moleculară.

Pentru a evita deteriorarea celulei, este necesară reducere concentrației de NP sau a intensității laser. Astfel, imagistica Raman reprezintă o metodă promițătoare pentru monitorizarea internalizării NP funcționalizate.

### **II.3. Nanoparticule de aur reduse cu heparina pentru imagistica Raman/SERS necesare pentru configurația SESORS**

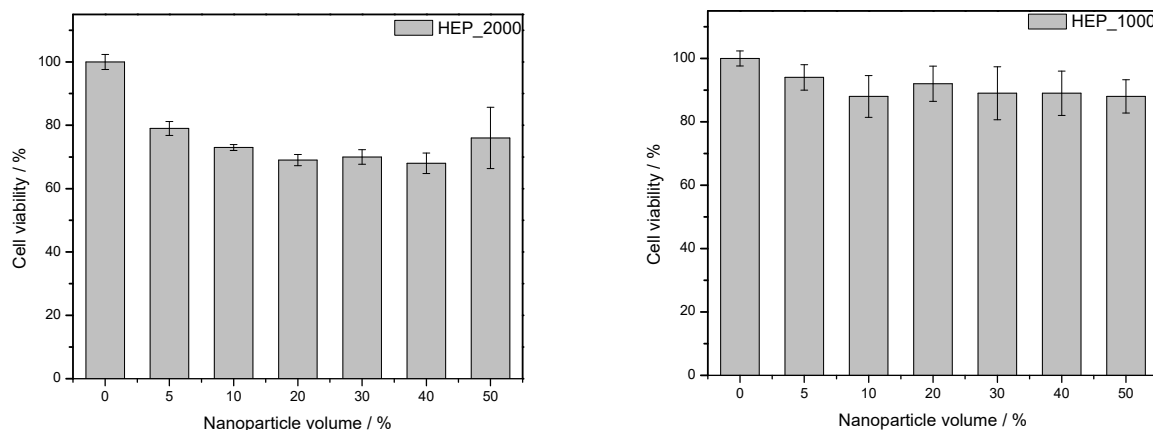
Mai jos sunt prezentate câteva rezultate obținute cu nanoparticule de aur reduse cu heparina.

1. Rezultate ROS ale nanoparticulelor P1=HEP-1000 și P2=HEP-2000



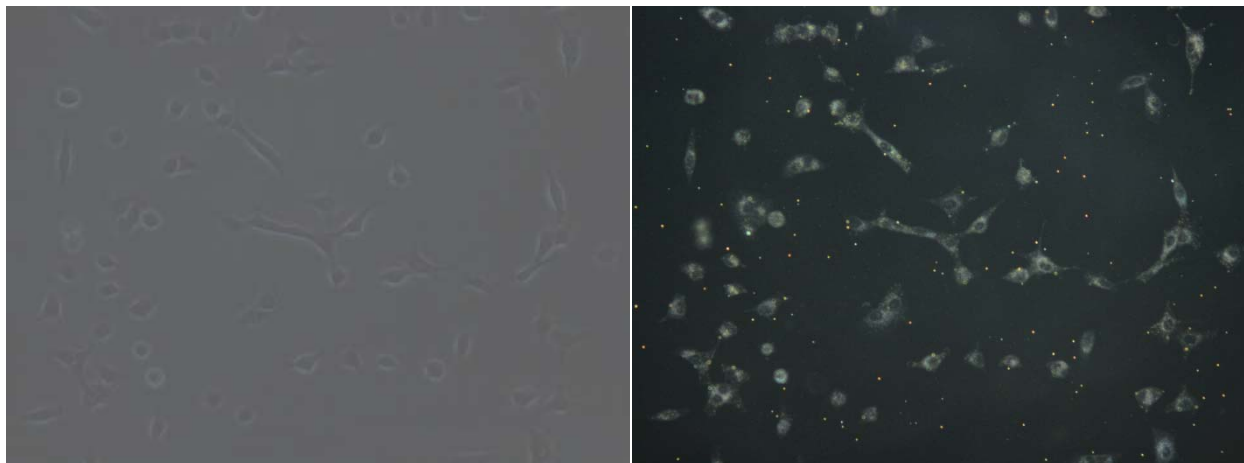
**Figura II.3.1.** Teste ROS pe celule tip A549 cu nanoparticule la diferite concentrații P1=Hep-2000 și P2=HEP-2000.

2. Toxicitatea indusă de nanoparticule de aur a fost evaluată cu un test MTT. Viabilitatea celulelor în funcție de concentrația GNP\_HEP\_1000 și GNP\_HEP\_2000 sunt prezentate pe Fig. II.3.2.

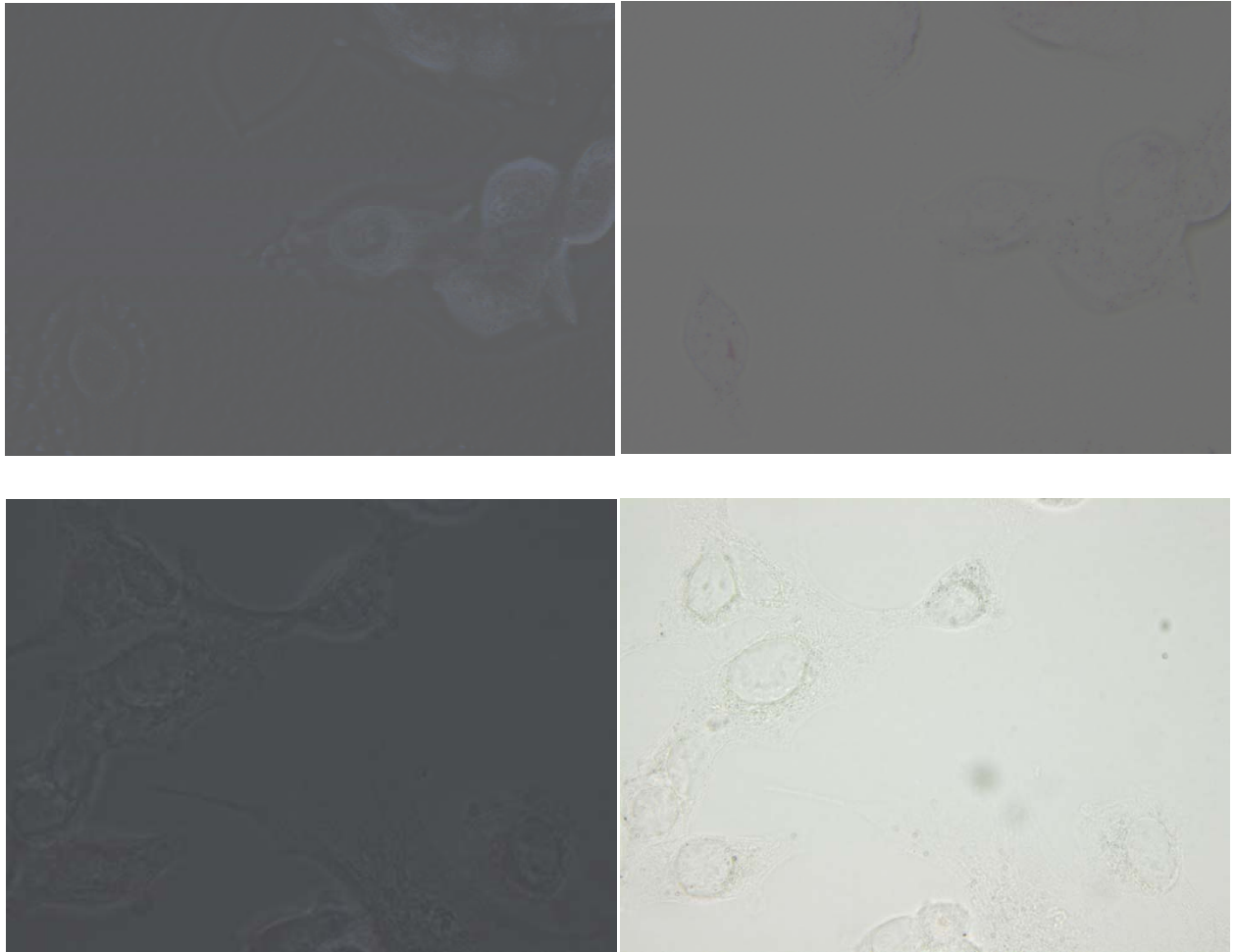


**Fig. II.3.2.** Viabilitatea celulelor A549 în funcție de concentrația GNP\_HEP\_2000 (stânga) și GNP\_HEP\_1000 (dreapta).

3. Imagini microscopice phase-contrast, bright-field și dark-field ce pun în evidență internalizarea NP de aur reduce cu heparina în celule A549. Fig. II.3.2.







**Fig. II.3.2.** Imagini microscopice ce pun în evidență internalizarea NP de aur reduse cu heparina în celule A549.

Primele teste pentru optimizarea configurației Raman offset (SORS și SESORS) au fost efectuate la INCDTIM Cluj-Napoca, în Laboratorul de Laser Femtosecunde care este dotat cu:

- Laser Femtosecunde: emisie la 1030 nm, durata puls <200 fs, putere 6W@80kHz
- Amplificator Optic Parametric cu emisie acordabila (210-2600 nm), 120-200 fs
- NOPA - Amplificator Necolinar, emisie între 500-900 nm, durata ~30-50 fs
- Modul pentru generarea armonicilor - II (515 nm), III (310 nm), și IV (285 nm)
- Aplicații: ablație, imprimare, microfabricație, măsurători pe țesuturi vii etc.

## Cap. 5. Etapa IV. finală an 2016

### Obiectivele etapei:

1. Testarea metodei SERS/SORS/SESORS pe celule vii.
2. Testarea metodei SERS/SORS/SESORS pe țesuturi moi respectiv șobolani de laborator.
3. Diseminarea rezultatelor.

### Rezultate pe activități

R1.1. S-a efectuat testarea configurației Raman offset cu nanoparticule de aur funcționalizate în celule vii împreună cu experți biologi.

R1.2. S-a efectuat un stagiu de documentare și cercetare în Germania.

R2.1. Am efectuat primele teste a configurației Raman offset cu nanoparticule de aur funcționalizate în țesuturi moi selectate împreună cu experți biologi și medicali.

R2.2. SESORS pe șobolani de laborator.

R3.1. Au fost prezentate rezultatele preliminare la următoarea conferința internațională: Conferința Națională de Biofizică, 2-4 June 2016, Cluj Napoca, Romania etc.

R3.2. În cadrul proiectului, pentru etapa a patra au fost publicate 3 articole ISI, un articol BDI și sunt sub evaluare un număr de 4 articole în reviste cotate ISI, respectiv sunt în pregătire un număr de 2 manuscrise pentru trimitere spre publicare în reviste cotate ISI.

R3.3. Pagina web a proiectului a fost actualizată.

**În conformitate cu obiectivele propuse în cadrul acestui proiect, ultima etapa a vizat testarea metodei SERS/SORS/SESORS pe celule vii și țesut.**

### **I. Evaluarea intracelulară SERS utilizând noi nanoparticule de aur cu biocompatibilitate ridicată**

Scopul principal al acestui studiu a fost acela de a dezvolta un nou mod de a sintetiza nanoparticule de aur extrem de active SERS/SESORS, prin utilizarea de materiale complet biocompatibile care nu cauzează toxicitate tisulară la restul organismului și care pot ocoli securitatea integrată a celulelor maligne. Aceste nanoparticule sintetizate prin reducere cu heparina (GNP\_HEP) sunt, prin urmare, acoperite cu glucoza, care este un polizaharid care furnizează energie pentru majoritatea celulelor și este căutat în mod activ prin ele. Acest lucru ar trebui să dea nanoparticulelor capacitatea de a fi ușor internalizate. Ei au fost funcționalizate cu albumina, având în vedere abundența sa în țesut, care acționează, de asemenea, ca agent de stabilizare pentru nanoparticule, ca atare devenind stabil în formă coloidală timp de câteva luni.

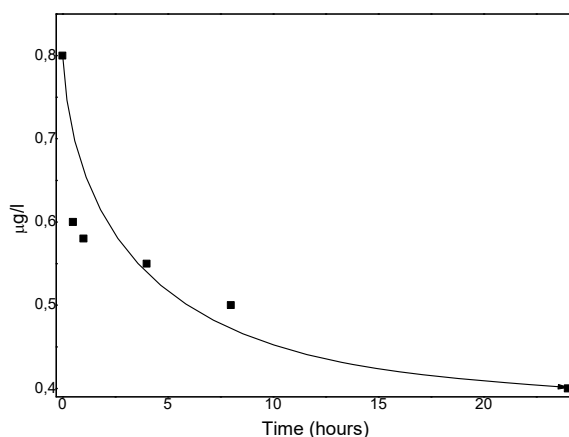
Nanoparticulele sintetizate au fost supuse mai multor teste de biocompatibilitate care indică o mai mare biocompatibilitate medie, cu necroză celulară minimă.

În cele din urmă, nanoparticulele au fost utilizate în investigarea SERS a celulelor HFL1, cu o rată mare de succes, identificând în mod corespunzător componente celulare în celulele investigate.

Acest lucru ar trebui să permită nanoparticulelor utilizarea lor ca sonde de imagistică a celulelor interioare și a microorganismelor.

#### **I.1. Biodistributia și biocompatibilitatea nanoparticulelor de aur sintetizate**

După ce cantitatea de aur, din probele de sânge, a fost măsurată prin spectroscopie ICPMS, am procesat rezultatele. Fiecare șoarece a fost injectat cu 0,8 μg/L.



**Figura I.1.1.** Scăderea concentrației nanoparticulelor GNP\_HEP acoperite cu glucoza (GNP\_HEP\_gl) in timp.

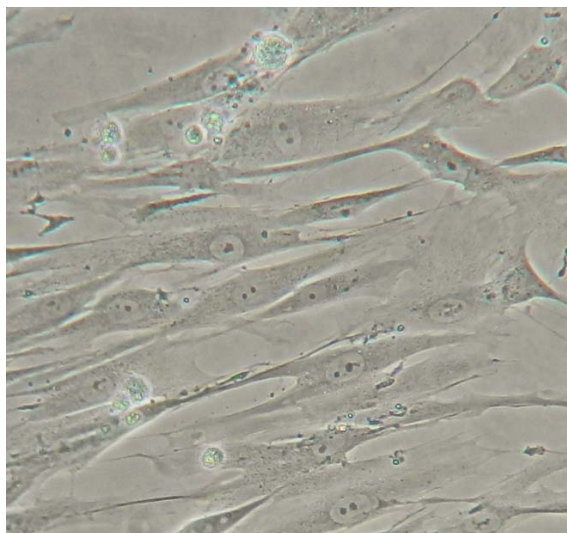
Se poate observa din Figura I.1.1. cum concentrația nanoparticulelor de aur a scăzut treptat în timp din inițialul de 0,8 µg/L de la momentul injectării, până la 0.4µg/L după 24 de ore. Acest lucru sugerează că nanoparticulele care au fost sintetizate prezintă o biodistribuție bună, cu o eliminare de jumătate din concentrația de aur în 24 de ore. Acest lucru face ca nanoparticulele sintetizate prin reducere cu heparina și acoperite cu glucoza (GNP\_HEP\_gl) sunt comparabile cu alte nanoparticule care au o biodistribuție la fel de mare, dar ele au, de asemenea, un avantaj asupra lor prin costul lor scăzut de producție. Acest lucru este benefic pentru utilizarea lor, ca nanoparticule care au cât mai puțin contact cu organismul, după terminarea misiunii lor. După aceea, au fost efectuate studiile de biocompatibilitate. Nanoparticulele au fost comparate cu nanoparticule reduse în citrat după ce au fost incubate cu celule umane fetale a fibroblastelor pulmonare (HFL1) pentru 24 și 48 de ore. Celulele din grupul de control sunt prezentate în figura I.1.2.



**Figura I.1.2.** Celulele HFL1 din grupul de control.

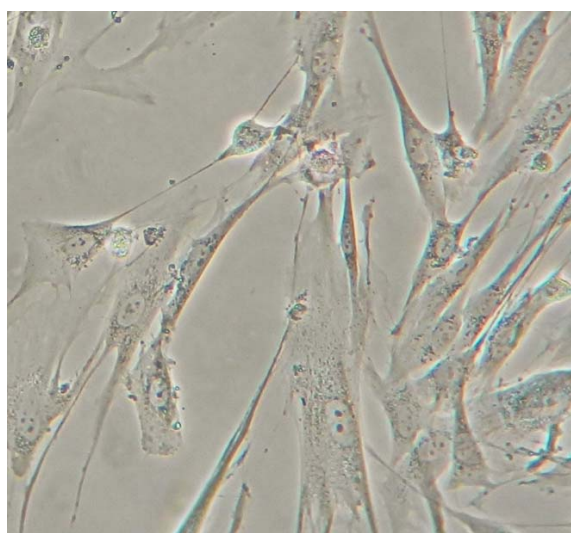
Se poate observa clar că există o abundență de celule găsite în grupul de control, cu aceeași concentrație de celule regăsindu-se în alte grupuri.





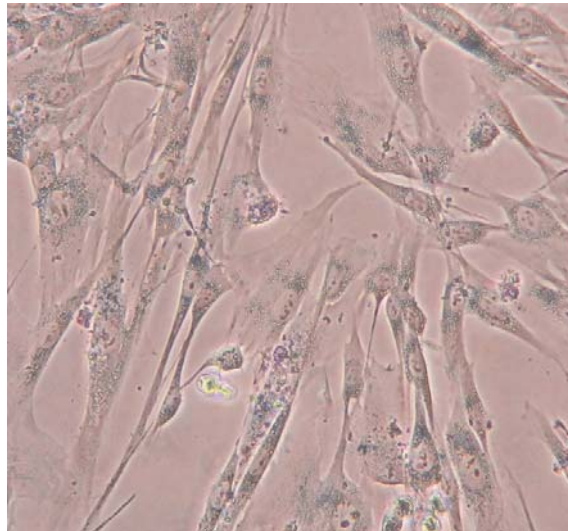
**Figura I.1.3.** Celulele HFL1 din grupul de control, incubate 24 h.

Celulele HFL1 din grupul de control (Figura I.1.3.) pot fi identificate cu ușurință datorită formei alungite și plasarea nucleului. După perioada de incubare de 24 de ore, se poate observa că există o moarte celulară minimă cu o concentrație mică de celule moarte în colțul din stânga sus a figurii. Acestea fiind spuse, moartea celulară este prezentă chiar și în grupul de control.



**Figura I.1.4.** Celulele HFL1 incubate 24 ore cu nanoparticule conventionale reduse cu citrat.

În figura I.1.4. sunt reprezentate celulele HFL1 incubate cu nanoparticule conventionale reduse cu citrat. Se poate observa cum concentrația celulară este semnificativ mai mică decât concentrația celulară în grupul de control. Pot fi de asemenea observate un număr de celule moarte în imaginile obținute, chiar și în figură afișată. De asemenea, doar un număr mic de nanoparticule au fost internalizate de celule, foarte puține grupuri fiind vizibile. Ca atare, imaginile microscopice prelevate din celulele HFL1 incubate cu nanoparticule conventionale reduse cu citrat, sunt comparabile cu imaginile luate din grupul de control



**Figura I.1.5.** Celulele HFL1 incubate 24 ore cu nanoparticule GNP\_HEP\_gl.

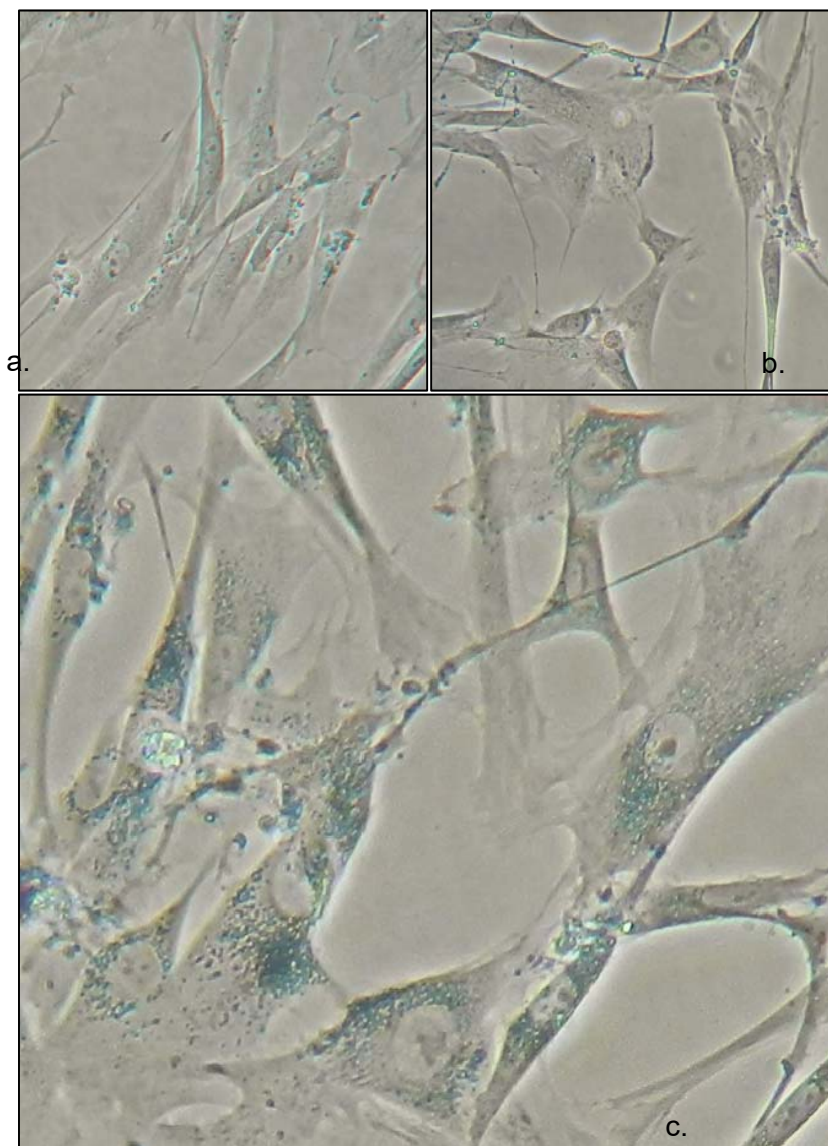
Din figura I.1.5., se poate observa că după ce au fost incubate alături de celulele HFL1 timp de 24 de ore, nanoparticulele GNP\_HEP\_gl au fost mult internalizate de către celule. Clusterelor de nanoparticule pot fi ușor observate ca mici puncte albastre în interiorul celulelor. Cea mai mare îmbunătățire în internalizare, comparativ cu nanoparticulele convenționale reduse cu citrat, se datorează cel mai probabil acoperirii cu glucoza a acestor nanoparticule, care oferă, cum era de așteptat, o metodă mai eficientă de a insera nanoparticule în celule. Densitatea celulară este de asemenea mai mare decât cea prezentă în figura I.1.4., cu un număr mai mic de celule moarte perceptibile.

Aceleași rezultate pot fi observate chiar și după 48 de ore timp de incubare (Figura I.1.6.) cu nanoparticule GNP\_HEP\_gl, existența lor fiind în mod clar vizibilă.

Nanoparticulele GNP\_HEP\_gl s-au dovedit a fi în mod substanțial mai mult biocompatibile decât nanoparticulele convenționale, cu o mare retenție de nanoparticule chiar și după 2 zile de la internalizarea inițială. Acest lucru ar trebui să dea medicamentului care este purtat de nanoparticule timp suficient pentru a acționa asupra celulei țintă, dar ar trebui să dea, de asemenea, o fereastră mai mare de detecție în timpul utilizării lor ca biosenzori.

O altă constatare care poate fi preluată din figura I.1.6. este că densitatea celulară nu a scăzut odată cu absorbția nanoparticulelor GNP\_HEP\_gl, chiar și după 48 de ore de incubare. Acest lucru sugerează cu tărie că celulele sunt încă în viață, cu efect nociv minim cauzat de prezența nanoparticulelor. Această teorie necesită un studiu suplimentar.

De aceea, nanoparticulele GNP\_HEP\_gl s-au dovedit a fi extrem de biocompatibile și au o biodistribuire ridicată, ca atare fiind activate pentru utilizare *in vivo*, într-o varietate de aplicații medicale ca exemplu detecția trombozei și a aterosclerozei.



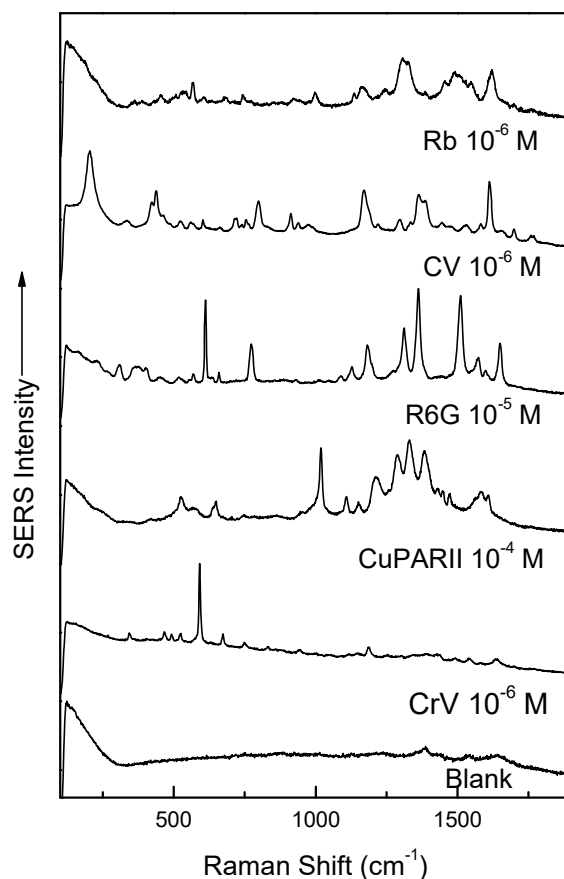
**Figura I.1.6.** Celulele HFL1 din grupul de control (a), incubate timp de 48 ore in nanoparticule de aur reduse cu citrat (b) si nanoparticule GNP\_HEP\_gl (c) for 48 h.

## **I.2. Evaluarea SERS a nanoparticulelor GNP\_HEP acoperite cu glucoza (GNP\_HEP\_gl)**

Ulterior, nanoparticule au fost utilizate în investigarea intracelulară a diferiților constituenți celulari.

Înainte de aceasta, eficiența nanoparticulelor a fost testat pe diversi analiți cunoscuti, pentru a evalua în mod corespunzător eficiența generală a acestora ca substrat SERS.

După cum sa menționat, evaluarea SERS a fost efectuată prin utilizarea mai multor analiți, cum ar fi rodamină 6G (R6G), clorura de cristal violet (CV), clorura de cresyl violet (CrV), Rose Bengal (Rb) și CuPAR II (Figura I.2.1.).



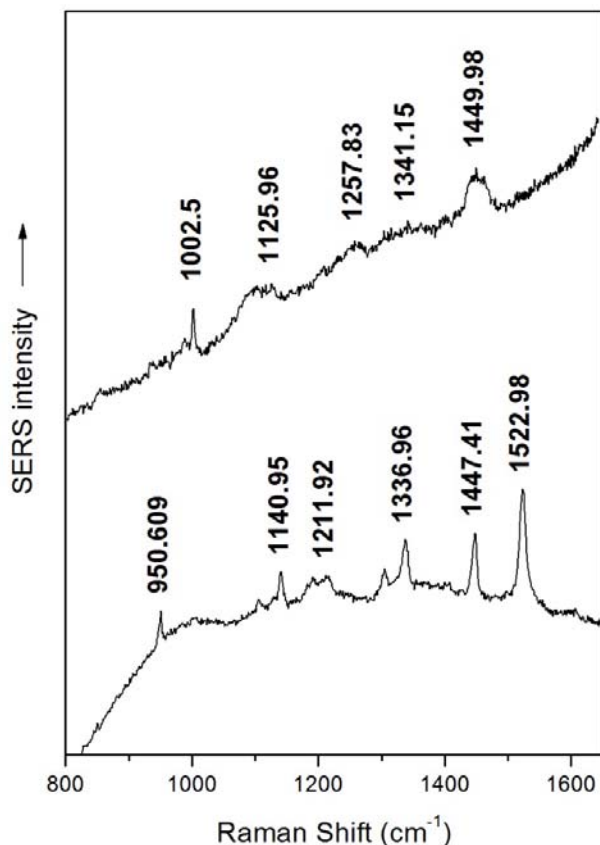
**Figura 1.2.1.** Spectrele SERS a Cresyl violet (CrV), CuPAR II, Rhodamina 6G (R6G), Cristal violet (CV) și Rose bengal (Rb) la diferite concentrații, având ca substrat nanoparticule GNP\_HEP\_gl.

Cum glucoza e ușor de înlocuit pe suprafața nanoparticulelor de către alți liganzi, așa cum reiese prin modificarea suprafeței jgheabului prin adsorbanta de albumină, analiții investigați ar putea ajunge cu ușurință pe suprafața nanoparticulelor, oferind un semnal Raman puternic și de încredere. Spectrele SERS au fost efectuate imediat după amestecarea nanoparticulelor GNP\_HEP\_gl cu analitul selectat, fara nici o întârziere în absorbția analitului pe suprafața nanoparticulelor, cu nici o interferență din existența acoperirii de glucoză. Acest rezultat este de asemenea susținut de mici cantități de fluorescență, care au apărut imediat după ce amestecul a fost obținut, fluorescența fiind indusă de moleculele de analit care nu sunt adsorbite pe nanoparticule. De asemenea, trebuie remarcat faptul că cantitățile mici de fluorescență prezente în spectre au scăzut rapid datorită nanoparticulelor care au efectul de stingere a fluorescenței.

Cele mai importante benzi ale fiecărui analit au fost identificate cu ușurință dovedind că nanoparticule sintetizate pot fi utilizate în mod eficient în detectarea analiților investigați chiar și în concentrații micromolare. Astfel nanoparticulele pot fi folosiți ca o sondă pentru metodă imagistică a analiților selectați, folosiți ca agenți de contrast. De asemenea concentrația glucozei sau albuminei, care sunt agenți de plafonare, permit ca nanoparticulele să fie utilizați în mod eficient în obținerea imaginii în interiorul celulei, cu un grad ridicat de precizie prin imagistica SERS.

Ca atare, nanoparticule s-au dovedit a fi substraturi SERS bune în concentrații micromolare pentru o gamă largă de analiți cu numeroase aplicații SERS posibile.

Ulterior, celulele HFL1 au fost incubate cu nanoparticule GNP\_HEP\_gl timp de 6 ore, iar apoi celulele au fost imediat investigate prin spectroscopie SERS.



**Figura I.2.2.** Spectrele SERS intracelulare a nanoparticulelor GNP\_HEP\_gl din interiorul celulelor HFL1.

Din interiorul celulelor investigate, ar putea fi identificate 2 spectre distincte figura I.2.2. Din aceste 2 spectre, la  $1125\text{ cm}^{-1}$  și  $1140\text{ cm}^{-1}$  benzile pot fi atribuite întinderii asimetrice a grupării  $\text{PO}_3^{2-}$ . Banda  $1211$  poate fi atribuită în principal C-H de îndoire în timp ce banda prezentă la  $1257$  poate fi atribuită unei grupări CH în deformare planară sau o întindere C-N. Benzile duble de la  $1302$  și  $1336$  pot fi, de asemenea, atribuite grupului  $\text{CH}_2$  cu vibrație de tip twisting și wagging. Benzile de la  $1447$  și  $1449$  pot fi atribuite în principal grupului  $\text{CO}_2$  cu întindere simetrică din acizi grași și fosfolipide. Banda de la  $1522\text{ cm}^{-1}$  poate fi atribuită C-H banding cuplat cu C-C întindere.

Ca atare, nanoparticule sintetizate, sau dovedit capabile pentru utilizare ca sonde în investigarea Raman intracelulara a celulelor, semnalul Raman fiind înregistrat la diferite puncte din interiorul celulelor vizate.

### I.3. Concluzii

A fost elaborat o metodă nouă de sinteză a nanoparticulelor de aur sferice. Nanoparticulele au fost sintetizate la temperatura camerei cu utilizarea heparinei ca agent de reducere și acoperite cu glucoza. Nanoparticule au fost stabilizate și activate pentru a fi utilizate în fluide biologice prin funcționalizarea cu albumină.

Dimensiunea nanoparticulelor a fost măsurată cu un microscop electronic de transmisie și a fost confirmat și prin împrăștierea dinamică a luminii. Micrografii TEM au arătat că nanoparticulele au avut un diametru mediu de  $8,5\text{ nm}$ . Nanoparticulele s-au dovedit a fi stabil la temperatura camerei timp de mai multe săptămâni, fapt care mai târziu a fost explicată prin potentialul de suprafață de  $-38.7\text{ mV}$  înregistrat prin măsurători de potențial Zeta.

Nanoparticulele au fost investigate ca substrat SERS/SEORS. Cresyl violet (CrV), CuPAR II, Rhodamina 6G (R6G), Cristal violet (CV) și Rose bengal (Rb) au fost folosiți ca analiți în această investigație și au fost detectate cu ușurință în substanță coloidală, chiar la concentrații micromolare.

Nanoparticulele au fost de asemenea folosite ca sonde SERS/SEORS pentru investigarea constituenților intracelulare din celulele HFL1. Nanoparticulele au amplificat semnalul Raman a constituenților din celule, care au fost apoi detectate cu ușurință din interiorul celulei. Având în vedere creșterea factorului de amplificare Raman, sinteza nanoparticulelor reduse cu heparina, acoperite cu glucoza și funcționalizate cu albumina în același pas la

temperatura camerei, pot oferi avantaje importante comparativ cu nanoparticule convenționale în ceea ce privește utilizarea lor în medicină, în special posibilitatea lor de utilizare ca sonde intracelulare în imagistica SERS/SESORS.

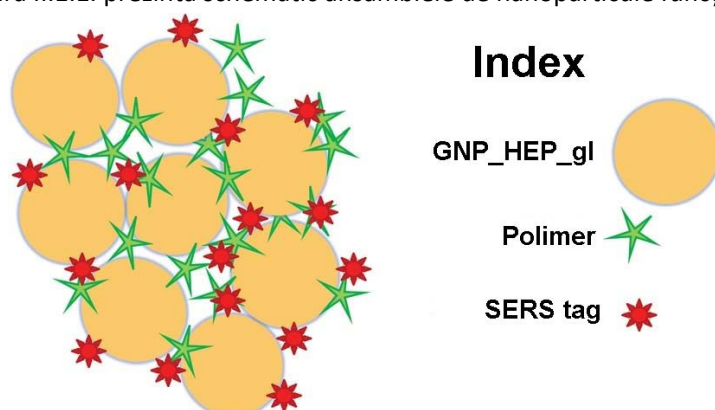
## II. SESORS pe țesuturi de origine animală

Am investigat prin spectroscopia Raman adâncă, particular spectroscopia raman amplificată de suprafață spațial ofset (SESORS), pentru detectare non-invazivă din cadrul țesuturilor de origine animală, prin aplicarea unor ansamble de nanoparticule de aur reduse cu heparina acoperite cu glucoza și funcționalizate cu 2-quinolinethiol (GNP\_HEP\_gl\_2QT) ca agenți de diagnostic. Acest concept a fost confirmat experimental printr-un sistem Raman clinic relevant folosind linia de excitație de 785 nm în condiții ex-vivo. Am arătat că sistemul nostru SORS, cu un ofset fix de 2-3 mm, a oferit sensibilitate pe proba de la GNP\_HEP\_gl\_2QT injectate prin țesut animal care conținea atât proteine cât și lipide. Raportăm că aceste ansamble de nanoparticule pot fi ușor detectate la adâncimi de 7-8 mm din cadrul țesutului animal proteiform cu raport semnal zgomot ridicat. Mai mult pot fi detectate și sub 1-2 mm de țesut animal cu conținut mare de lipide, ceea ce în general reprezintă o provocare datorită absorbției ridicate a lipidelor în zona infraroșu apropiat. De asemenea am arătat că intensitatea semnalului și raportul semnal zgomot într-o anumită adâncime este o funcție a concentrației de agenți (tag) SERS folosiți și că limita de detecție a sistemului SORS în cazul 2-quinolinethiol este de  $10^{-6}$  M. Obținerea unor adâncimi de detecție mai mari ar putea fi realizat prin optimizarea ansamblelor de nanoparticule și îmbunătățirea instrumentației. Astfel de ansamble de nanoparticule oferă perspectivă *in-vivo*, detectare non-invazivă a trombozei împreună cu încorporarea medicamentelor și eliberarea lor direcționată și controlate la locurile cu trombozate. Acești agenți de diagnostic combinate cu sisteme de livrare a medicamentelor pot servi pentru integrarea diagnosticii și terapiei într-o singură platforma.

### II.1. Parte experimentală

#### II.1.1. Ansamble de nanoparticule și funcționalizare SERS

Ansambele de nanoparticule GNP\_HEP\_gl au fost preparate conform celor raportate în studiul precedent printr-o procedură de trei pași. Ansamblele care au oferit cel mai intens semnal SERS au fost alese pentru experimentul SESORS. Pentru acest studiu a fost aleasă molecula 2-quinolinethiol (2QT) care a fost adăugată la ansamblele de nanoparticule pentru a fi adsorbite pe suprafața nanoparticulelor și în hotspoturi astfel sunt pot fi folosiți ca agenți de diagnostic. Figura II.1.1. prezintă schematic ansamblele de nanoparticule funcționalizate.



**Figura II.1.1.** Schema ansamblelor de nanoparticule funcționalizate.



### II.1.2. Sistem SORS cu ofset fix

Sursa de excitare a fost o diodă laser emițând în infraroșu apropiat (785 nm) cu putere de 400mW pe probă pe o suprafață cu diametru de 1 mm. Fotonii Raman au fost colectați în geometria backscattering printr-o sondă optică care a fost conectat cu sistemul de detectare cu fibră optică. Proba a fost plasată la 6 cm de sonda optică. Excitarea a fost focalizată în mijlocul unui inel de fibre optice unde inelul proceda ca și parta de colector a sistemului de fibre. Acesta creând un spațiu ofset datorită diametrului inelelor de fibră. După care sistemul de fibre direcționează fotonii la spectrometru. Fotonii Raman au fost detectați cu o cameră CCD. Toate spectrele SESORS au fost achiziționate în condiții identice cu un interval spectral de 350-1800  $\text{cm}^{-1}$  și timp de 10 acumulări de 30 de secunde. Măsurătorile nu au deteriorat țesutul.

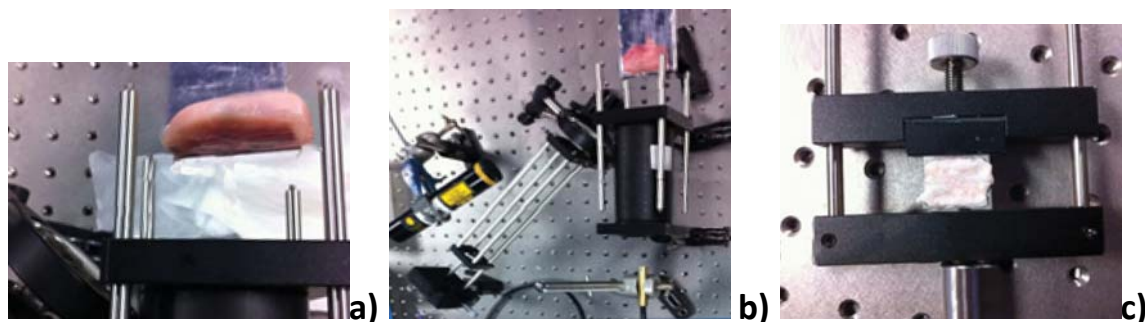
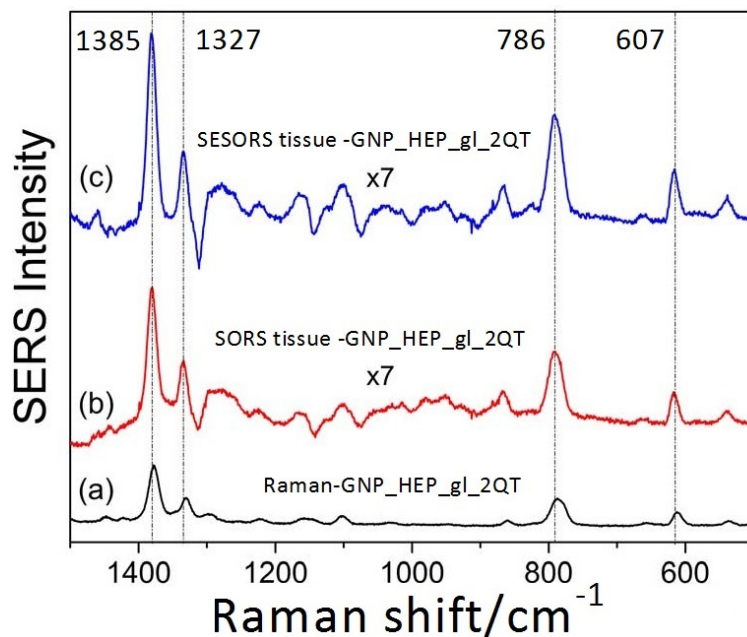


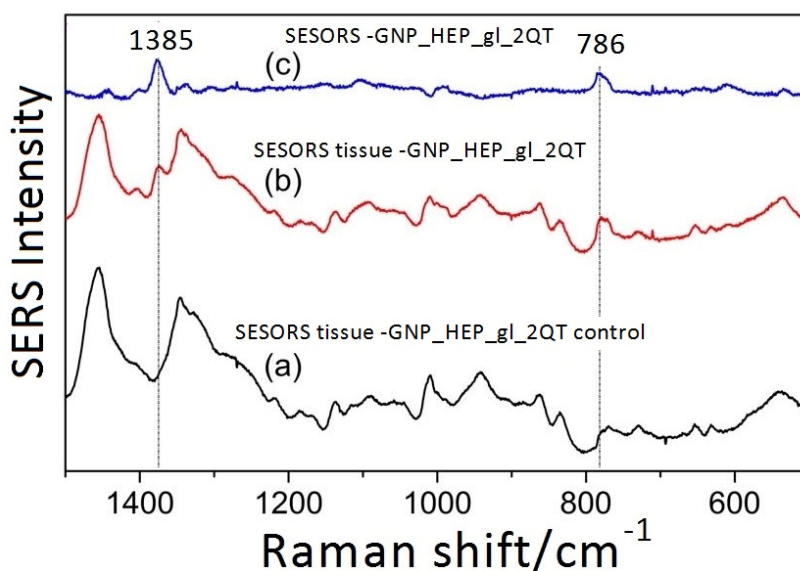
Figura II.1.2. Sistem SORS cu ofset fix

### II.2. Detectarea proteinelor din țesutul de origine animală

Au fost efectuate cercetări considerabile pentru a dezvolta ansamble de nanoparticule de aur pentru utilizare ca agenți de diagnosticare biomedicală, care ar trebui să fie stabile în soluție, să fie injectabile, și să ofere un semnal SERS din interiorul țesutului îmbunătățit. Astfel, ansamblele de nanoparticule GNP\_HEP\_gl\_2QT, cu toate proprietățile menționate mai sus în sine demonstrează a fi un candidat potențial pentru aplicații biomedicale. Am arătat mai devreme ca, ansamblurile de nanoparticule GNP\_HEP\_gl funcționalizate cu albumina și 2-quinolinethiol (2QT), oferă posibilitatea de multiplexare. Am optat pentru utilizarea 2-quinolinethiol (2QT) din cauza semnalului Raman mai mare, obținut cu acesta, pe lângă faptul că este o moleculă relativ mică și are o grupare tiol, cu o afinitate puternică pentru atașare la suprafețele de aur. Am investigat astfel potențialul ansamblurilor 2-quinolinethiol (2QT) ca agenți de diagnostic pentru țesutul profund de detecție Raman.



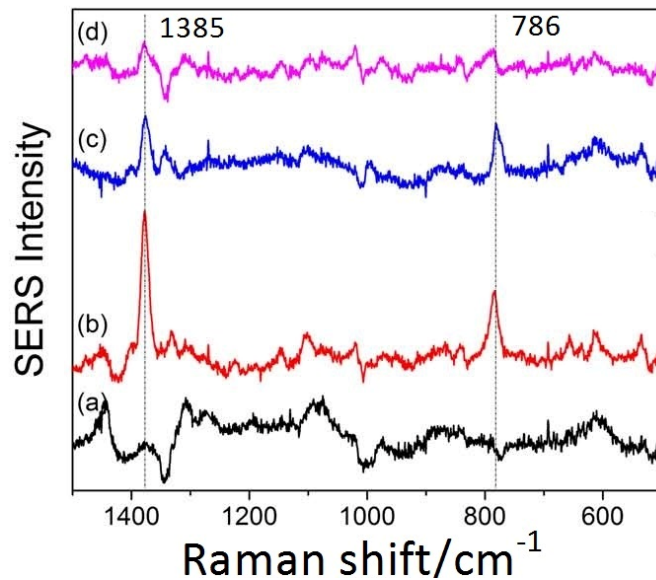
**Figura II.1.3.** Spectrele Raman GNP\_HEP\_gl\_2QT (a), SORS țesut -GNP\_HEP\_gl\_2QT (b), SESORS țesut lipidic (1-2 mm adincime) -GNP\_HEP\_gl\_2QT.



**Figura II.1.4.** Spectrele: SESORS de control țesut proteic GNP\_HEP\_gl\_2QT (a), SESORS țesut proteic (3-4 mm adâncime) -GNP\_HEP\_gl\_2QT (b), SESORS după extracția spectrului de țesut.

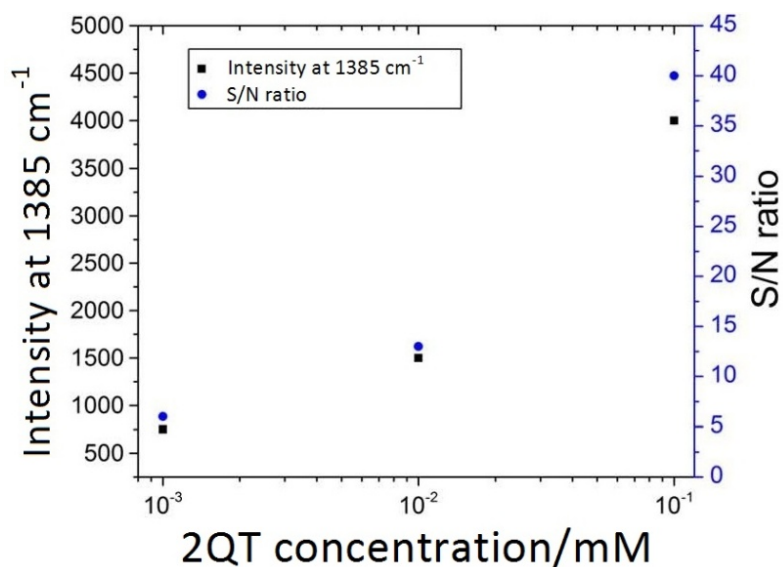
Am utilizat țesutul de șobolan. La injectarea ansamblurilor GNP\_HEP\_gl funcționalizate cu 2-quinolinethiol (2QT) în țesutul proteiform la adâncimi de 3-4mm, au fost observate benzi suplimentare (Figura II.1.4. spectrul b). După scăderea spectrului de țesut (Figura II.1.4. spectrul b), s-au observat benzile specifice ale 2QT SERS de la 1385 și 786  $\text{cm}^{-1}$  (Figura II.1.4. spectrul c). Acest lucru confirmă faptul că soluția stabilă a ansamblului GNP\_HEP\_gl\_2QT poate fi detectată cu ușurință prin 3-4mm țesutului proteiform cu geometria SORS backscattering. S-a încercat de asemenea și cu agregate de ansamble GNP\_HEP\_gl\_2QT, la adâncimi de injectare similare de 3-4 mm, pentru a compara beneficiile utilizării ansamblurilor ca agent de diagnosticare. Folosind o concentrație identică de nanoparticule de aur și 2QT, sistemul de nanoparticule agregate [Figura II.1.5., spectrul b] a avut o sensibilitate de detecție semnificativ mai mare comparativ cu cea a nanoparticulelor neagregate [Figura II.1.5., spectrul a].





**Figura II.1.5.** Spectrele SESORS după extracția spectrului de la țesut proteic (3-4 mm adâncime): GNP\_HEP\_gl\_2QT cu NP ne-agregate (a), GNP\_HEP\_gl\_2QT cu NP agregate și concentrație 2QT  $10^{-4}$  (b), GNP\_HEP\_gl\_2QT cu NP agregate și concentrație 2QT  $10^{-5}$  (c), GNP\_HEP\_gl\_2QT cu NP agregate și concentrație 2QT  $10^{-6}$  (d).

De fapt, în condițiile acestui experiment, benzile SERS a moleculei 2QT nu a putut fi observate atunci când nanoparticulele sunt ne-agregate. Experimente similare au fost realizate cu diferite concentrații de 2QT în ansamblurile de nanoparticule-SERS pentru a determina sensibilitatea minimă de detecție a sistemului, așa cum se arată în Figura II.1.5. (spectrele b-d). După scăderea spectrală a țesutului, raportul semnal/zgomot (S/N), a scăzut odată cu scăderea concentrației 2QT în ansamblurile de nanoparticule. Acest lucru este prezentat în Figura II.1.6.



**Figura II.1.6.** Reprezentarea grafică a intensității semnalului SESORS la  $1385\text{cm}^{-1}$ , iar raportul S/N față de concentrația 2QT adăugat la ansamblurile GNP\_HEP\_gl.

În aceste condiții, apare o concentrație minimă de 2QT în jur de 106M care este necesară pentru a obține o adâncime de penetrare de aproximativ 3-4mm. Au fost de asemenea investigate adâncimi mai mari de aproximativ 7-8mm. Se poate observa din Figura II.1.6., ca benzile primare de la  $1385$  și  $786\text{cm}^{-1}$  (marcate cu o linie punctată) pot fi identificate cu ușurință în modul backscattering SORS. Adâncimea maximă de detecție

investigata cu aceste ansambluri de nanoparticule-SERS a fost de 7-8 mm. Din Figura II.1.5. si Figura II.1.6. , este clar că atunci când se folosește o concentrație ridicată de 2QT, se obține un raport semnal/zgomot (S/N) rezonabil de mare la ambele 3-4 si 7-8mm adâncimi in țesutul proteinic, ceea ce ar permite ca datele să fie obținute chiar și la adâncimi mai mari, iar abordarea backscattering este probabil mai util într-un mediu clinic.

### II.3. Concluzii

A fost studiat posibilitatea de a folosi SESORS pentru detectare non-invazivă din țesutul de origine animală folosind ansamble de nanoparticule SERS ca agenți de diagnostic. Conceptul a fost verificat experimental folosind un sistem Raman cu linia de excitare de 785 nm în condiții ex-vivo folosind geometria "backscattering", care este mai adecvat pentru aplicații clinice decât configurația prin transmisie, care a fost raportat în studii precedente pentru experimente ex-vivo. Am demonstrat că ansamblele de nanoparticule mediate cu 2QT agregate au sensibilitate de detecție significant mai mare față de nanoparticule SERS neagregate. Intensitatea semnalului și raportul semnal/zgomot într-o anumită adâncime depinde de concentrația markerilor SERS. Aceste ansamble de nanoparticule se comportă bine ca agenți de diagnostic si pot fi ușor detectate cu raport semnal/zgomot mare în adâncimi de 7-8 mm din cadrul țesutului animal proteic și cu dedesubt de 1-2 mm de țesut animal cu conținut mare de lipide. A fost interesant de observat că folosind sistemul nostru nu am avut probleme de detectare prin țesutul cu concentrație mare de lipide, care în general creează motiv de îngrijorare datorită absorbției mare a lipidelor în NIR. În acest studiu scopul nostru nu era găsirea adâncimii maxime de detectare deoarece acesta este dependent de ansamblele de nanoparticule ,de sistemul Raman și offsetul folosit. Adâncimi de detecție mai mari ar putea fi obținute prin optimizarea mărimii, formei, morfologiei și densitatea hot spoturilor ansamblelor de nanoparticule și îmbunătățirea geometriei SORS și instrumentației sistemului nostru Raman.

Cluj-Napoca, 2016

Director proiect

Dr. Szabo Laszlo