

Programul:	Resurse Umane
Tipul proiectului:	Proiecte de cercetare pentru stimularea constituirii de tinere echipe de cercetare independente
Cod proiect:	PNI-II-RU-TE-2012-3-0227
Contract nr.:	37/29.04.2013

Sinteza privind activitatea de cercetare și obiectivele îndeplinite în cadrul proiectului

NANO-BIO DETECȚIA ATEROSCLEROZEI și TROMBOZEI PRIN TEHNICA SURFACE ENHANCED SPATIAL OFFSET RAMAN SPECTROSCOPY (SESORS)

la etapa: **finală an (unică) 2013**

Obiectivele etapei:

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

Valorificarea rezultatelor:

a) Articole trimise spre publicare în cadrul fazei:

1. Anisotropic gold nanoparticles synthesized at room temperature using collagen, Oana T. Marișca, **Nicolae Leopold**, *Journal of Nanoparticle Research*, (submitted September 2013) [IF. 2.278].

2. Surface-enhanced Raman scattering and DFT investigation of 1,5-diphenylcarbazine 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* (submitted November 2013) [IF. 1.599]

3. 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* (submitted November 2013) [IF. 3.659]

4. Manuscrisul cu titlul *Theoretical and experimental study of heparin sodium salt and C-reactive protein*, **[Botond L. Simon, László Szabó, István Sz. Tódor, Nicolae Leopold, Vasile Chiș]** se pregătește pentru trimitere spre publicare (*Spectrochimica Acta A*).

b) Lucrări comunicate la conferințe:

1. Popcorn Shaped Gold Nanoparticles with absorbance in NIR, **István Sz. Tódor**, Nicolae Leopold, **László Szabó**, Vasile Chiș The 5th National Conference of Applied Physics, CNFA 2013, 23-24 Mai 2013 Iași, România.

2. 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, XIIth International Conference on

Molecular Spectroscopy. From Molecules to Nano- and Biomaterials (ICMS 2013), Kraków – Białka Tatrzańska 8 – 12 September 2013 Polonia.

3. *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.

4. *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.

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, iar rezoluția spectrală este de 10 cm^{-1} . Pentru toate măsurătorile SERS s-a folosit 50 μl 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, cuadrupol, 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 (complecși, clusteri moleculari).

Potențialul electrostatic molecular (MEP) este strâns legat de densitatea electronică și descrie posibilitățile de atac electrolif, 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 "se văd una pe cealaltă" prin 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:

$$I_i = \frac{f(v_0 - v_i)^4 S_i}{v_i \left[1 - \exp\left(-\frac{hc v_i}{kT}\right) \right]}$$

unde v_0 numărul de undă al radiației laser excitatoare, v_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.

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

I. Molecula heparin sodium salt (HSS)

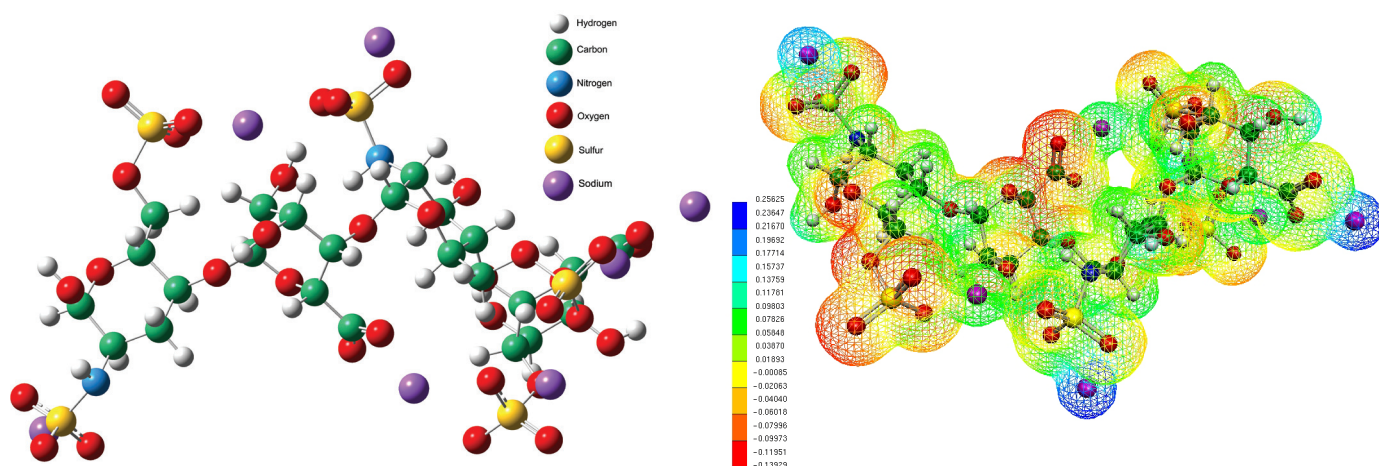


Fig. 1. Geometria optimizată și potențialul electrostatic calculat.

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

Spectrele vibraționale pentru molecula HSS

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

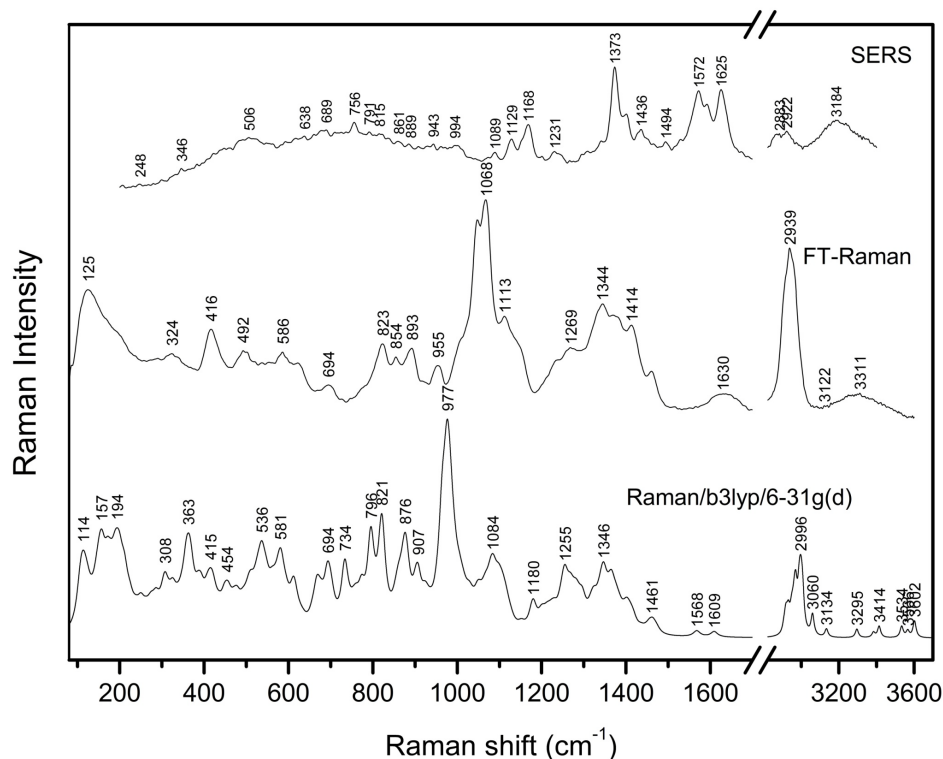


Fig. 2. Spectrul SERS, FT-Raman experimental și Raman calculat (B3LYP/6-31g(d)) pentru molecula HSS.

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

Experimental wavenumbers (cm ⁻¹)		Calculated wavenumbers (cm ⁻¹)	
SERS	FT-Raman	B3LYP/6-31g(d)	Band assignment
	125	114	δ (S ₈ O, S ₁₆ O, S ₁₂ O, S ₄₃ O) δ (CH (Ring2))
	416	415	δ (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 δ (CH (Ring1), N ₇ H, S ₁₆ O)
815	823	821	ip. deformation of Ring1 and Ring2 δ_{ip} (C ₅₆ O, C ₂₅ O)
1089	1068	1084	ν_{as} (S ₁₆ O ₁₇ O ₁₈) δ (C ₅₁ H, C ₅₄ H, C ₅₅ H, C ₂₂ H, C ₂₃ H)
1168		1180	ν_{as} (S ₄₃ O ₄₄ O ₄₅) δ (O ₅₉ H, N ₃₈ H, C ₂₃ H, C ₃₄ H, C ₃₅ H, C ₃₆ H, C ₅₄ H)
1373	1344	1346	δ_{op} (CH (Ring4) δ (O ₅₉ H)
1572		1568	ν_{as} (C ₅₆ O) δ (₅₉ H, C ₅₅ H)
1625	1630	1609	ν_{as} (C ₂₅ O) δ (C ₂₄ H, C ₃₆ H)
	3122	3134	ν (C ₅₁ H)

ν -stretching, ν_{as} - asymmetric stretching, ν_s - symmetric stretching, δ -bending, ip-in plane, op.-out of plane; Ring1-oxane(C₁-C₅,O₁₀), Ring2-oxane(C₂₀-C₂₄,O₂₉), Ring3-oxane(C₃₂-C₃₆,O₄₁), Ring4-oxane(C₅₁-C₅₅,O₆₀)

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 cm⁻¹ atribuită unui mod de vibrație

complex implicând vibrații de deformare a inelelor Ring1 și Ring2, respectiv vibrații de alungire asimetrică a grupului O₉C. Spectrul FT-IR are cea mai intensă bandă formată de un dublet cu lungimile de undă la 1619 cm⁻¹ și 1639 cm⁻¹, valori care în spectrul calculat au fost atribuite la 1604 cm⁻¹ și în spectrul FT-IR/ATR la 1609 cm⁻¹. În spectrul calculat cea mai intensă bandă se situează la 979 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 cm⁻¹.

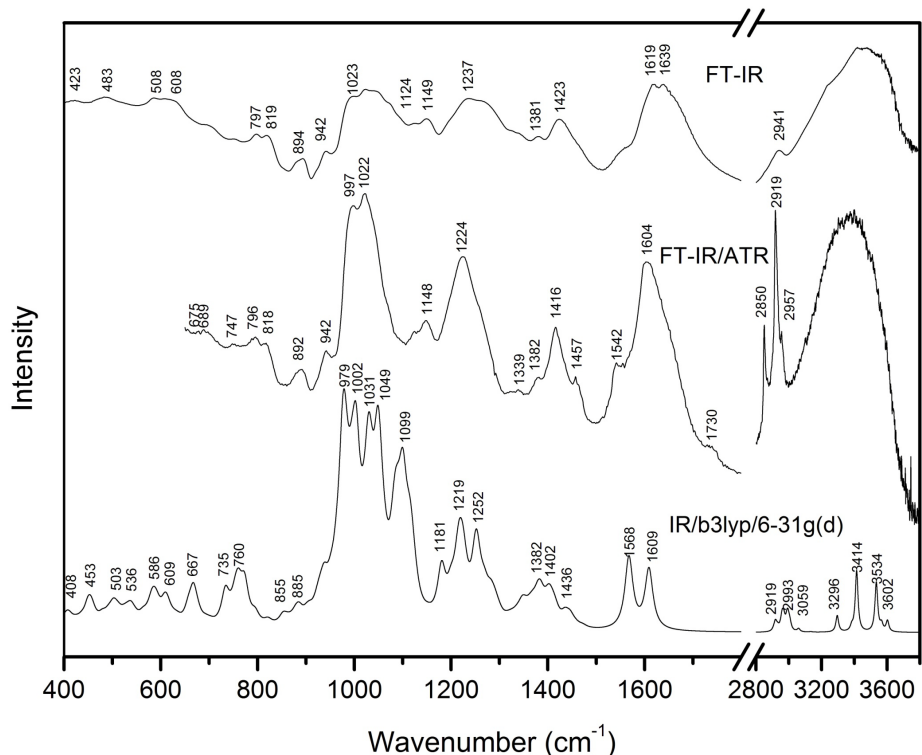


Fig. 3. Spectrul FTIT, FTIR/ATR experimental și IR calculat (B3LYP/6-31g(d)) pentru molecula HSS.

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

Experimental wavenumbers (cm ⁻¹)		Calculated wavenumbers (cm ⁻¹)	
FT-IR	FT-IR/ATR	B3LYP/6-31g(d)	Band assignment
585		586	δ(S16O, O26H, C6H, C20H, C3H, C33H, S12O, S47O, C5H,
608		609	op. deformation Ring3
	675	667	δ(O ₂₆ H, N ₇ H, N ₃₈ H, C ₆ H, O ₈ H)
894	892	885	v _s (Ring4) v(C ₅₅ C ₅₀) δ(C ₅₆ O, O ₅₉ H, N ₃₈ H)
	997	979	v _s (S ₁₂ O, S ₁₆ O) v(S ₁₂ N) δ(N ₇ H, C ₃ H, C ₂₄ H, N ₃₈ H, C ₂₂ H)
1023	1022	1002	op.deformation Ring1 and Ring2 v _{as} (O ₉ C) δ(CH (Ring1, Ring2))
	1224	1219	v _{as} (S ₆₃ O ₆₄ O ₆₅) δ(C ₅₂ H, C ₅₄ H, O ₅₉ H, C ₂₃ H, C ₂₄ H, C ₂₂ H)
1381	1382	1382	δ(C ₃₇ H, C ₃₆ H, C ₅₂ H, C ₅₃ H, O ₅₆ H, C ₃₄ H, C ₂₀ H, C ₆ H)

1619	1604	1609	$\nu_{as}(C_{25}O_{31}O_{30}) \delta(C_{24}H, C_{36}H)$
	2919	2919	$\nu(C_{22}H, C_{34}H, C_{32}H, C_{21}H)$

ν -stretching, ν_{as} - asymmetric stretching, ν_s - symmetric stretching, δ -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($C_{51}-C_{55},O_{60}$)

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.

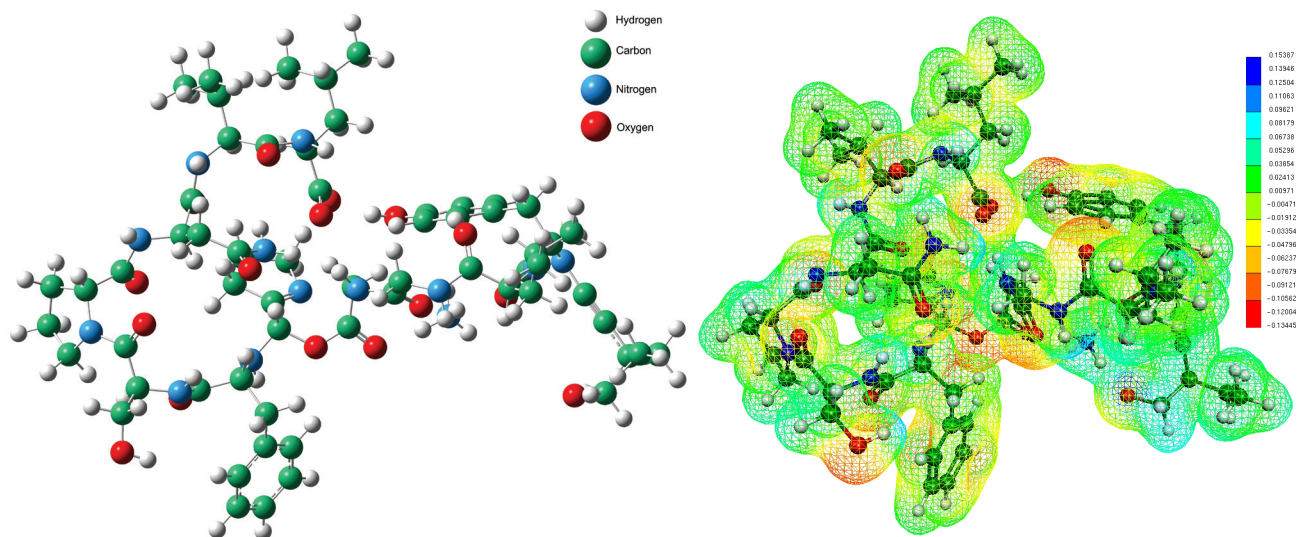


Fig. 4. Geometria optimizată și potențialul electrostatic calculat pentru CRP.

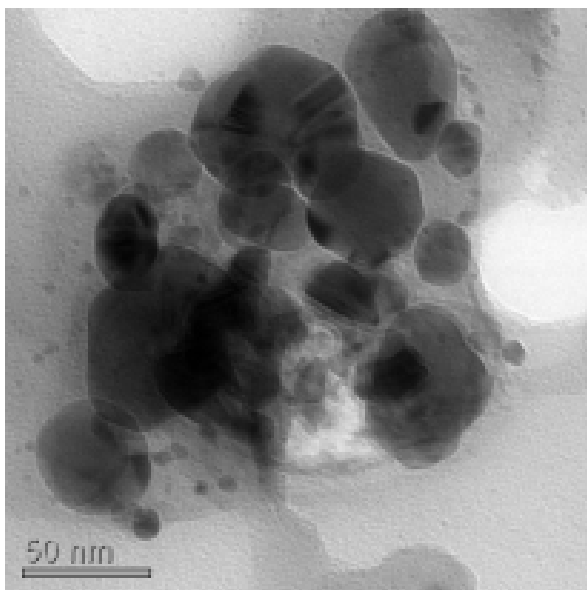
S-au efectuat calcule de optimizare a geometriei pentru un fragment din CRP, potențialul electrostatic a fost mapat.

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.

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 biocompatibile, un aspect util în interacțiunea moleculelor de HSS respectiv CRP cu aceste substraturi.

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 lan 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.

2. Nanoparticule de aur acoperite cu collagen (proteina)

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 metoda ușoara și inovativa 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 peroxid de hidrogen 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 analiti 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 peroxid de hidrogen, 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-H₂O₂.

Nanoparticulele obținute au fost caracterizate prin spectroscopie de absorbție UV-Vis și prin microscopie electronica TEM, mai apoi fiind-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, colagenul a fost preparat prin amestecarea a 10 ml de apa ultra pură cu 0.02 g de colagen bovin extras din tendonul lui Achille (Sigma-Aldrich) în prezenta a 500 μ l de acid clorhidric 37% (Sigma Aldrich), utilizat pentru obținerea unei solubilități complete a colagenului în apa. Toate substanțele folosite, printre care si: hidroxid de sodiu (Fluka), peroxid de hidrogen 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 grad (calitate) analitic. Toate soluțiile au fost preparate în apa ultra pură cu rezistivitatea mai mare de 18 M Ω (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 peroxid de hidrogen soluției apoase de colagen. Presupunem ca etanolul sau peroxidul de hidrogen 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 1 cm.

Dimensiunea și morfologia nanoparticulelor de aur au fost determinate prin utilizarea imagisticii TEM, efectuata 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, program procurat din Wayne Rasband, NIH, USA.

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

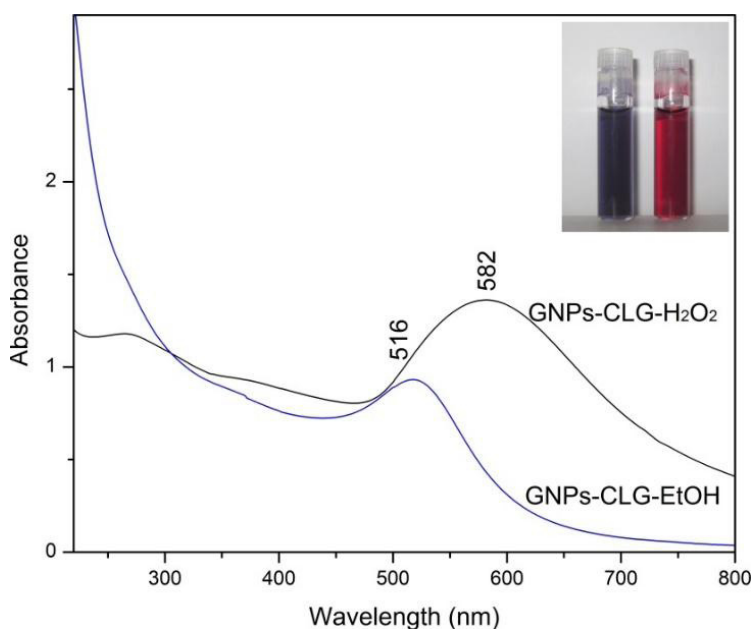


Fig. 5 UV-vis spectra of GNP-CLG-EtOH and GNP-CLG-H₂O₂ gold colloidal solutions. The inset shows pictures of the two colloids GNP-CLG-EtOH (right) and GNP-CLG-H₂O₂ (left).

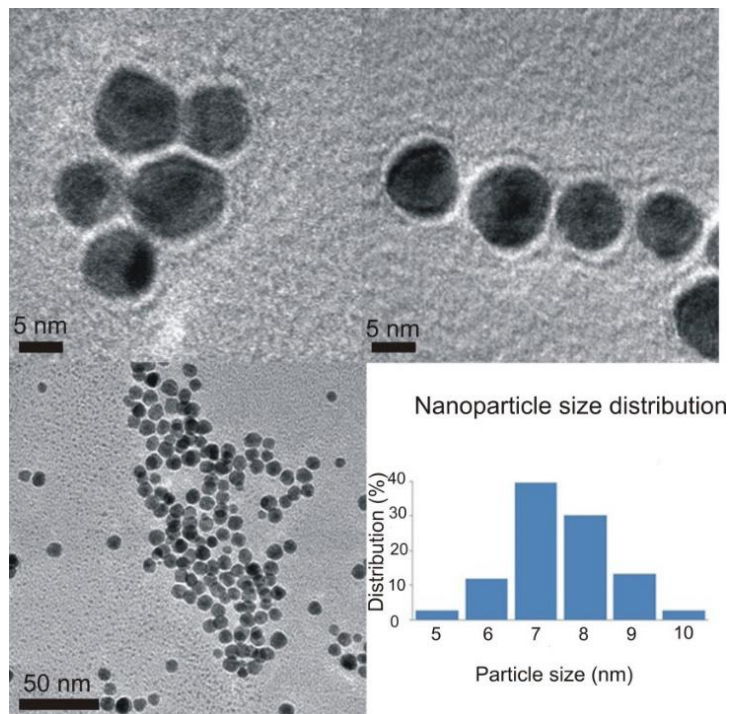


Fig. 6 TEM images of GNP-CLG-EtOH nanoparticles and their size distribution.

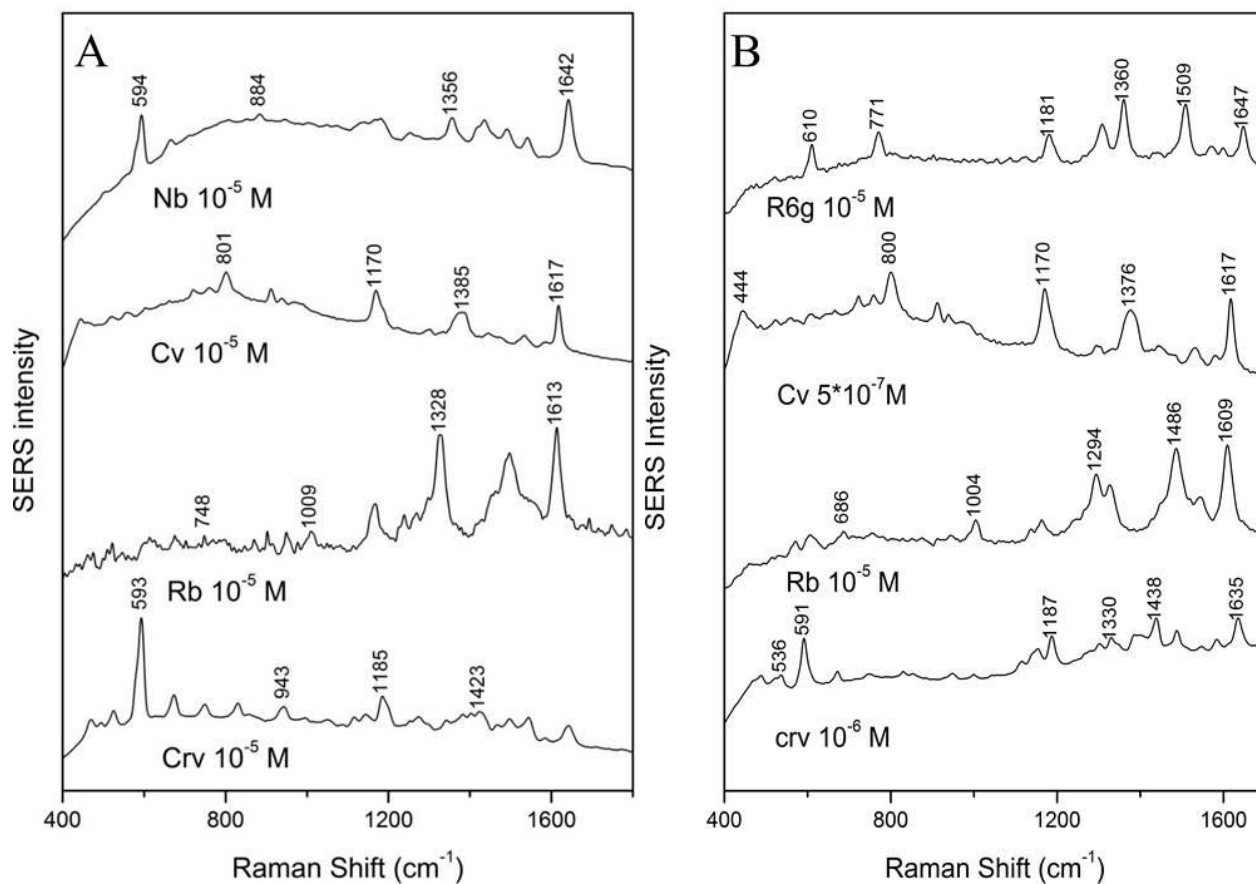


Fig. 7 (A) SERS spectra of cresyl violet (Crv), rose bengal (Rb), crystal violet (Cv) and Nile blue (Nb) having as substrate GNP-CLG-EtOH nanoparticles, (B) SERS spectra of cresyl violet (Crv), rose bengal (Rb), crystal violet (Cv) and Nile blue (Nb) having as substrate GNP-CLG-H₂O₂ nanoparticles.

The ease of preparation, the stability in time of the colloids and the ability of obtaining nanoparticles of different shape and size offer a wide range of applications of these gold nanoparticles. Moreover, due to the fact that collagen is the reducing and stabilizing agent we believe that they can be successfully used in biomedical applications.

3. Popcorn shaped nanoparticle assemblies obtained by hydroxylamine reduction at room temperature

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

20 nm NPA: Într-un pahar Erlenmeyer umplut cu 100 mL de apă ultra pură 20 mg de hidroxilamină-clorhidrică și 500 μL de acid clorauric la 6×10^{-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.

120 nm NPA: 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 μL de acid clorauric la 6×10^{-2} molar a fost adăugat și mixat în continuare timp de 10 minute.

Nanoparticulele au fost caracterizate prin măsurători UV-Vis, TEM și SERS. Nanoparticulele au fost

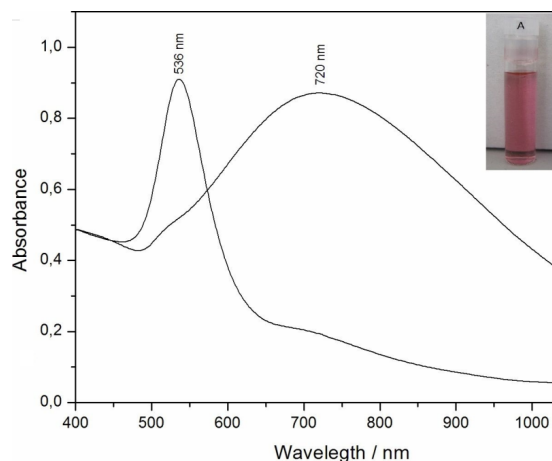


Fig. 8. Spectrele de absorbție UV-Vis al coloizilor de aur reduse cu hidroxilamină 20nm NPA (A), respectiv 120nm NPA(B).

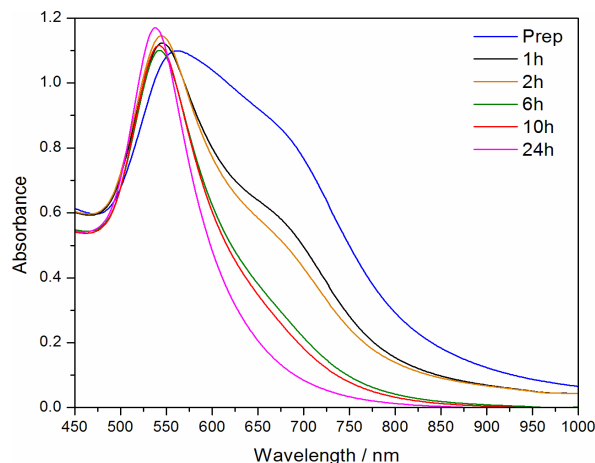


Fig. 9. Spectrul UV-Vis al 20nm NPA la diferite momente de timp după preparare.

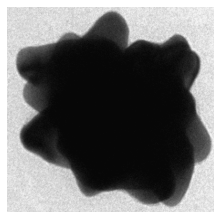


Fig. 10. Imagine TEM 50x50 nm al 20nm NPA.

Fig. 11. Imagine TEM 100x100 nm al 120nm NPA.

caracterizate prin măsurători UV-Vis, TEM și SERS. Figura 8 prezintă spectrele de absorbție UV-Vis al coloizilor colectate cu un spectrometru Jasco V-630 la o rezoluție spectrală de 4 nm. Din spectrele UV-Vis se poate prezice că 120nm NPA au diametre mai mari și distribuție dimensională mai mare decât ansamblul de nanoparticule de 20nm. 120nm

NPA sunt stabile din momentul preparării și prezintă o culoare de albastru închis însă 20nm NPA se stabilizează după o zi de la preparare, având culoarea magenta. Figura 9 prezintă spectrul UV-Vis al 20nm NPA care după preparare prezintă o bandă largă și se îngustează după o zi. Acest fapt poate fi explicat prin

formarea unor agregăți 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 în-vivo.

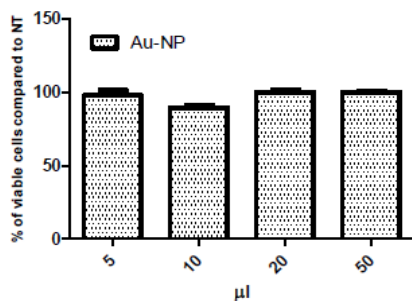


Fig. 12. Test de citotoxicitate a nanoparticulelor reduse cu hidroxilamină.

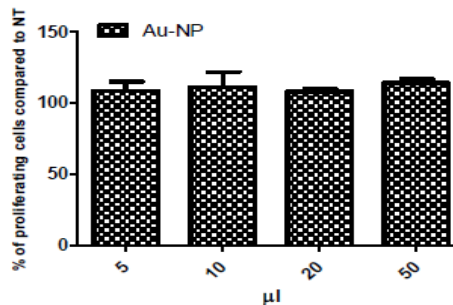


Fig. 13. Test de proliferare a nanoparticulelor reduse cu hidroxilamină.

Imaginile de microscopie electronică cu transmisie au fost înregistrate cu un microscop JOEL JEM 1010, operând la o tensiune de accelerare de 100 kV și echipat cu o camera CCD MEgaViewIII și sunt prezentate pe Figura 10 și Figura 11.

Pentru aplicații in-vivo un alt aspect foarte important este toxicitatea nanoparticulelor. Au fost efectuate teste preliminare de toxicitate și de proliferare, iar rezultatele sunt prezentate pe Figura 12 și Figura 13. Așa cum se poate observa de pe figurile 12. și 13. nanoparticulele reduse cu hidroxilamină nu sunt nici toxice și nici nu reprezintă efecte de proliferare.

Pentru demonstrarea activității SERS ridicate ale noilor nanoparticule dezvoltate, spectrul SERS al diferitelor molecule de test pătate cu nanoparticule de aur reduse cu hidroxilamină, respectiv cu nanoparticule convenționale reduse cu citrat au fost comparate (Figura 14). 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 50μL de probă a fost adăugat la 500 μL de coloid de aur. Pentru comparație au fost folosiți trei coloranți diferiți: Crystal 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 NPA 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

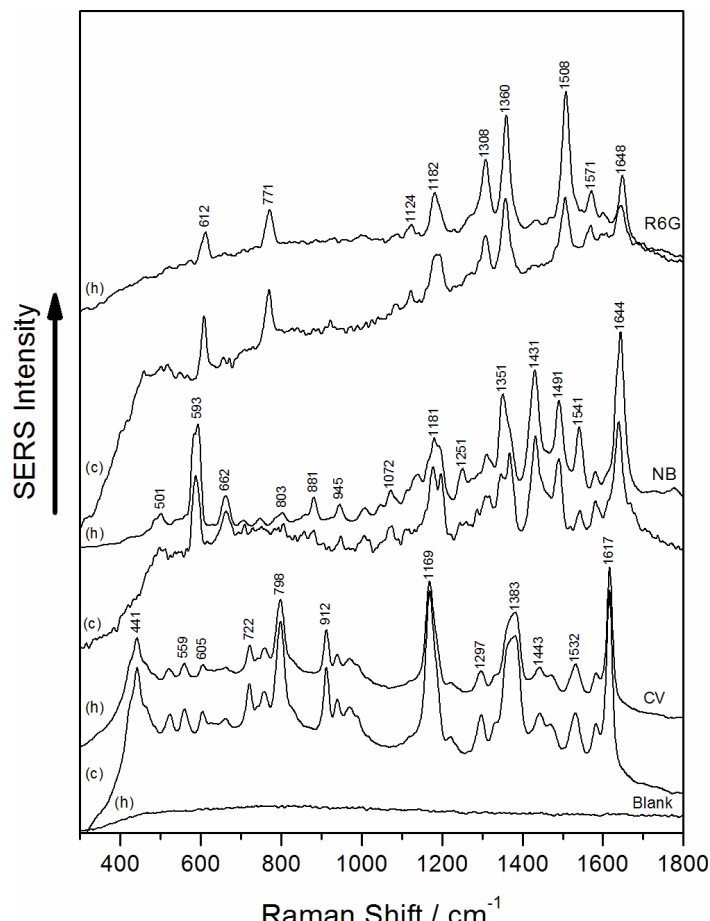


Fig. 14. Spectrul SERS al Crystal Violet (CV), Niel Blue (NB) și Rhodamine 6G (R6G) obținute cu nanoparticule reduse cu hidroxilamină (h), (CV 10^{-7} M , NB $5 \times 10^{-7} \text{ M}$, R6G 10^{-7} M) și cu citrat (c) (CV 10^{-6} M , NB 10^{-6} M , R6G 10^{-6} M).

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 semnal-zgomot are o calitate superioară față de spectrele obținute cu nanoparticulele de aur reduse cu citrat.

4. Nanoparticule de aur reduse cu heparină

Nanoparticulele de aur au fost sintetizate în urma reducerii chimice a acidului clorauric cu heparină la temperatura camerei. Pentru obținerea unui coloid stabil și cât mai concentrat am folosit diferite cantități de heparină. Ca prim pas au fost preparate soluții de 0.5mM HAuCl₄·3H₂O și 2.5mM heparină. Apoi 5mL din soluția 0.5mM HAuCl₄·3H₂O a fost mixat cu diferite cantități din soluția 2.5mM heparină și cu apă în așa fel încât volumul final să fie de 10mL. Figura 15 prezintă spectrul UV-Vis al nanoparticulelor de aur reduse cu diferite cantități de heparină, 250μL, 500μL și 1000μL din soluția 2.5mM heparină.

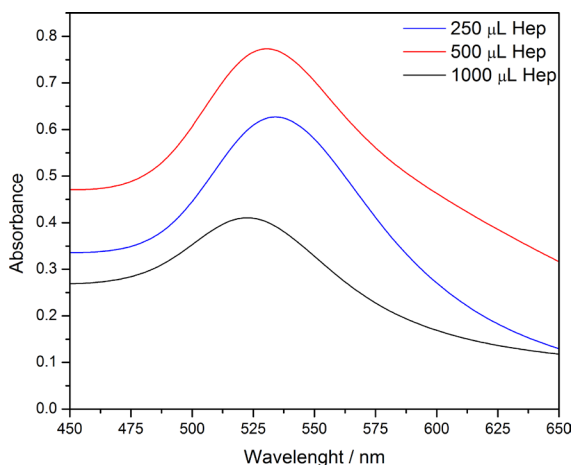


Fig. 15. Spectrul UV-Vis al nanoparticulelor de aur reduse cu diferite cantități de heparină.

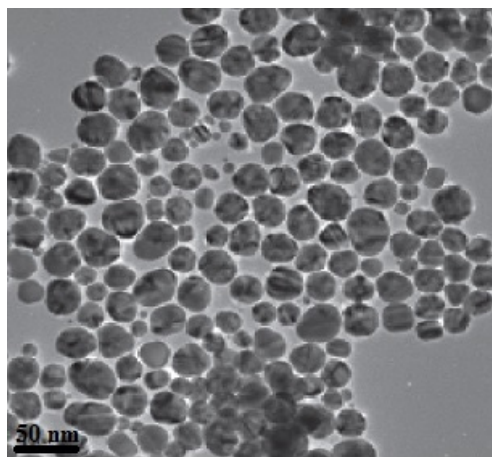


Fig. 16. Imagine TEM al nanoparticulelor de aur reduse cu heparină.

Din spectrele UV-Vis se poate observa că coloidul preparat cu 500μL de heparină este cea mai concentrată. Iar din lărgimea benzii se poate ajunge la concluzia că distribuția dimensională a nanoparticule de aur nu este mare, ceea ce ulterior a fost confirmat de măsurătorile TEM (Figura 16). Cu această metodă am reușit să preparăm nanoparticule de aur cu dimensiuni de 20nm având banda plasmonică între 522nm și 534nm.

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 prepararea și funcționalizarea nanoparticulelor de aur folosite pentru tehnica SESORS.

Cluj-Napoca, 2013

Director proiect
Dr. Szabo Laszlo