

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:	<u>Dr. Szabó László</u> , Dr. Nicolae Leopold, Dr. Vasile Chiş, Drd. István Sz. Tódor, Drd. Simon L. Botond

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

### Raport științific sintetic intermediar (Mai 2013-Noiembrie 2014)

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

#### 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 două vizite de studiu la Technische Universität Chemnitz din Germania, respectiv Universitatea Nottingham din Anglia, vizită prevăzută în planul de activitate al proiectului. De asemenea, respectând planul de activitate al proiectului a fost actualizată pagina web și s-au trimis șase manuscrise în vederea publicării, din care patru sunt acceptate respectiv două sunt sub evaluare.

#### 1.1. Prezentarea rezultatelor comunității științifice:

##### 1.1.1. Articole cotate ISI:

**1. 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 Chiş, *Journal of Molecular Structure*, 1073, (2014) 10-17. [IF. 1.599]**

**2. Towards a Receptor-free Immobilization and SERS Detection of Urinary Tract Infections Causative Pathogens, Nicoleta E. Mircescu, Haibo Zhou, Nicolae Leopold, Vasile Chiş, Natalia P. Ivleva, Reinhard Niessner, Andreas Wieser, Christoph Haisch, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406 (13), (2014) 3051-3058. [IF. 3.659]**

**3. 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 Chiş, *Journal of Molecular Structure*, 1073 (2014) 71–76. [IF. 1.599]**

**4. Gold nanoparticle assemblies of controllable size obtained by hydroxylamine reduction at room temperature, István Sz. Tódor, László Szabó, Vasile Chiş, Oana T. Marişca, Nicolae Leopold, *Journal of Nanoparticle Research* (DOI: 10.1007/s11051-014-2740-4, 2014). [IF. 2.278]**

**5. Spectroscopic and computational investigation of a thiazolidine-2,4-dione derivative, I.B. Cozar, A. Pîrnău, L. Szabó, N. Vedeanu, C. Nastasă, *Romanian Reports in Physics*, (trimis spre publicare noiembrie 2014). [IF. 1.137]**

**6. Anisotropic gold nanoparticles synthesized at room temperature using collagen, Oana T. Marişca, Nicolae Leopold, *Journal of Nanoparticle Research*, (submitted September 2013). [IF. 2.175]**

1.1.2. Lucrări (4) comunicate la conferințe în 2013:

**1. *Popcorn Shaped Gold Nanoparticles with absorbance in NIR*, István Sz. Tódor, Nicolae Leopold, László Szabó, Vasile Chiş The 5<sup>th</sup> National Conference of Applied Physics, CNFA 2013, 23-24 Mai 2013 Iaşi, 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 Chiş, 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.**

**3. *Synthesis of Popcorn Shaped Nanoparticle assemblies*, István Sz. Tódor, László Szabó, Vasile Chiş, 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 Chiş, Conferința Internațională de Fizică TIM 13, 21-24 Noiembrie 2013 - Timișoara, România.**

1.1.3. Lucrări (5) comunicate la conferințe în 2014:

**1. *Characterization of gram positive bacteria using Raman Spectroscopy*, Alia Colnita, Nicoleta E. Dina, Dan Vodnar, Nicolae Leopold, Vasile Chiş, 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.**

**2. *Gold nanoparticle assemblies of controllable size obtained by hydroxylamine reduction at room temperature*, István Sz. Tódor, László Szabó, Oana T. Marişca, Vasile Chiş, Nicolae Leopold, Surface-Enhanced Spectroscopies 2014 (SES 2014), August 7<sup>th</sup>-10<sup>th</sup> 2014, Chemnitz (Germany).**

**3. *Preparation and spectroscopic characterization of heparin-reduced gold nanoparticles at room temperature*, László Szabó, István Sz. Tódor, Botond L. Simon, Vasile Chiş, 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.**

**4. *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.**

**5. *Excited states properties of a set of polycyclic aromatic hydrocarbons: a TD-DFT analysis*, Botond Simon, Vasile Chiş, 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.**

2.2 Actualizarea paginii web a proiectului

A fost actualizată pagina web dedicată proiectului:  
[http://atom.ubbcluj.ro/lzabo/pages/research\\_en.htm](http://atom.ubbcluj.ro/lzabo/pages/research_en.htm)

### 2.3 Trei manuscrise în lucru:

**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. Preparation, spectroscopic characterization and biological evaluation of heparin-reduced gold nanoparticles, [László Szabó, István Sz. Tódor, Botond L. Simon, Nicolae Leopold, Vasile Chiș,** (manuscris în lucru, pentru trimitere spre publicare în *Jurnal of Nanoparticle Research*). [IF. 2.278]

**3. 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]

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 unei lucrări de doctorat, iar o altă mare parte va fi valorificat în teza de doctorat al lui István Sz. Tódor și Botond L. Simon:

Nicoleta Elena Mircescu, *SERS applications - from molecules to microorganisms*, Teză de Doctorat 2013

a trei 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.

a două lucrări de disertație de masterat:

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/echipament laborator

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.

## **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, cuadrupol, etc, spectre vibraționale, RES, RMN, UV-Vis, sarcini atomice parțiale și altele. Cunoșcând 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 electofil, 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:

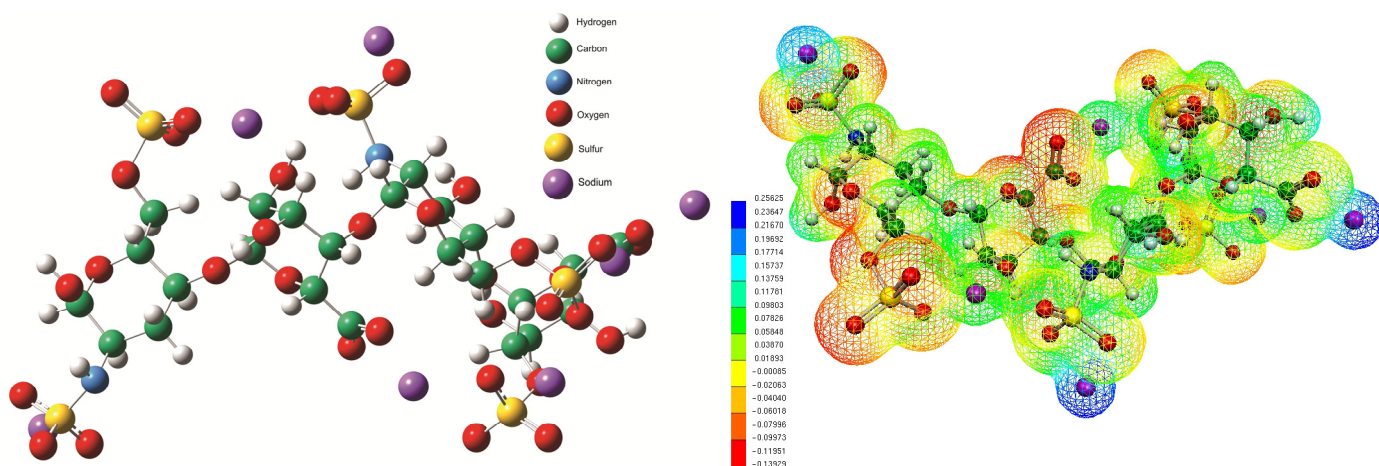
$$I_i = \frac{f(\nu_0 - \nu_i)^4 S_i}{\nu_i \left[ 1 - \exp\left(-\frac{hc\nu_i}{kT}\right) \right]}$$

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.



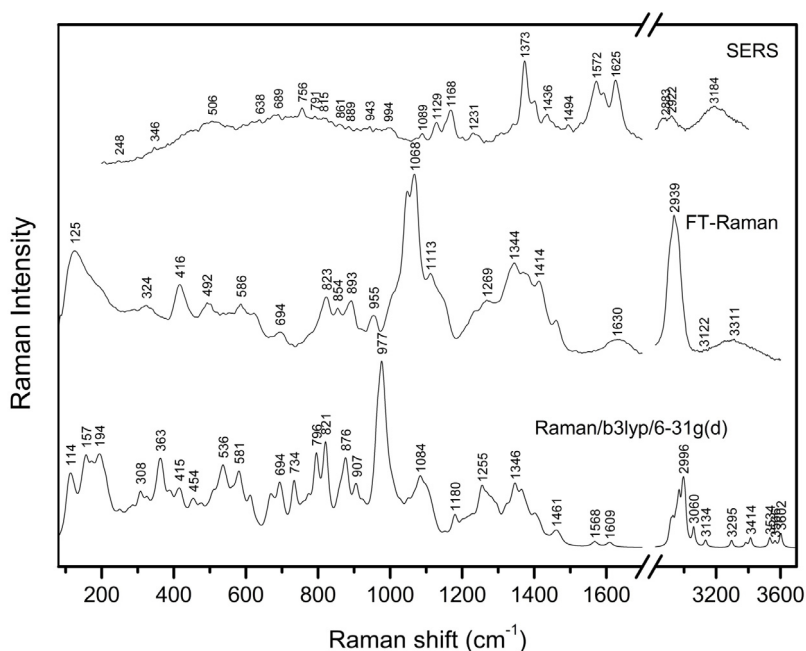
### I. Molecula heparin sodium salt (HSS)

**Fig. 1.** Geometria optimizata 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 situat 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  $\text{S}_{43}\text{O}$  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 buna 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 (cm <sup>-1</sup> )		Calculated wavenumbers (cm <sup>-1</sup> )	
SERS	FT-Raman	B3LYP/6-31g(d)	Band assignment
	125	114	δ(S <sub>8</sub> O, S <sub>16</sub> O, S <sub>12</sub> O, S <sub>43</sub> O) δ(CH (Ring2))
	416	415	δ(O <sub>39</sub> H, N <sub>38</sub> H, C <sub>35</sub> H, C <sub>36</sub> H, C <sub>37</sub> H, S <sub>47</sub> O, O <sub>59</sub> H)
	586	581	op. deformation of Ring1 δ(CH (Ring1), N <sub>7</sub> H, S <sub>16</sub> O)
815	823	821	ip. deformation of Ring1 and Ring2 δ <sub>ip</sub> (C <sub>56</sub> O, C <sub>25</sub> O)
1089	1068	1084	v <sub>as</sub> (S <sub>16</sub> O <sub>17</sub> O <sub>18</sub> ) δ(C <sub>51</sub> H, C <sub>54</sub> H, C <sub>55</sub> H, C <sub>22</sub> H, C <sub>23</sub> H)
1168		1180	v <sub>as</sub> (S <sub>43</sub> O <sub>44</sub> O <sub>45</sub> ) δ(O <sub>59</sub> H, N <sub>38</sub> H, C <sub>23</sub> H, C <sub>34</sub> H, C <sub>35</sub> H, C <sub>36</sub> H, C <sub>54</sub> H)
1373	1344	1346	δ <sub>op</sub> (CH (Ring4) δ(O <sub>59</sub> H)
1572		1568	v <sub>as</sub> (C <sub>56</sub> O) δ( <sub>59</sub> H, C <sub>55</sub> H)
1625	1630	1609	v <sub>as</sub> (C <sub>25</sub> O) δ(C <sub>24</sub> H, C <sub>36</sub> H)
	3122	3134	v(C <sub>51</sub> H)
v-stretching, v <sub>as</sub> - asymmetric stretching, v <sub>s</sub> - symmetric stretching, δ-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> )			

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<sup>-1</sup> atribuită unui mod de vibrație complex implicând vibrații de deformare a inelelor Ring1 și Ring2, respectiv vibrații de alungire asimetrice a grupului O<sub>9</sub>C. Spectrul FT-IR are cea mai intensă bandă format de un dublet cu lungimile de undă la 1619 cm<sup>-1</sup> și 1639 cm<sup>-1</sup>, valori care în spectrul calculat au fost atribuite la 1604 cm<sup>-1</sup> și în spectrul FT-IR/ATR la 1609 cm<sup>-1</sup>. În spectrul calculat cea mai intensă bandă se situează la 979 cm<sup>-1</sup>, 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<sup>-1</sup>.

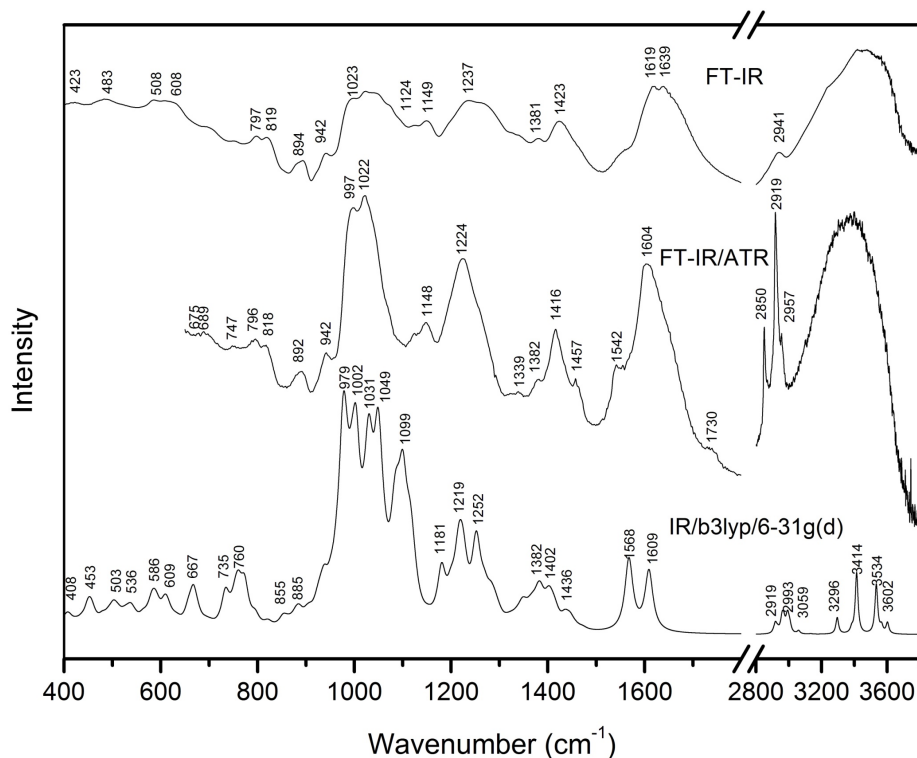


Fig. 3. Spectrul FTIR, FTIR/ATR experimental și IR calculat (B3LYP/6-31g(d)) pentru molecula HSS.

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

Experimental wavenumbers (cm <sup>-1</sup> )		Calculated wavenumbers (cm <sup>-1</sup> )	
FT-IR	FT-IR/ATR	B3LYP/6-31g(d)	Band assignment
585		586	$\delta$ (S16O, O26H, C6H, C20H, C3H, C33H, S12O, S47O, C5H, C3H98)
608		609	op. deformation Ring3
	675	667	$\delta$ (O <sub>26</sub> H, N <sub>7</sub> H, N <sub>38</sub> H, C <sub>6</sub> H, O <sub>8</sub> H)
894	892	885	$\nu_s$ (Ring4) $\nu$ (C <sub>55</sub> C <sub>50</sub> ) $\delta$ (C <sub>56</sub> O, O <sub>59</sub> H, N <sub>38</sub> H)
	997	979	$\nu_s$ (S <sub>12</sub> O, S <sub>16</sub> O) $\nu$ (S <sub>12</sub> N) $\delta$ (N <sub>7</sub> H, C <sub>3</sub> H, C <sub>24</sub> H, N <sub>38</sub> H, C <sub>22</sub> H)
1023	1022	1002	op.deformation Ring1 and Ring2 $\nu_{as}$ (O <sub>9</sub> C) $\delta$ (CH (Ring1, Ring2))
	1224	1219	$\nu_{as}$ (S <sub>63</sub> O <sub>64</sub> O <sub>65</sub> ) $\delta$ (C <sub>52</sub> H, C <sub>54</sub> H, O <sub>59</sub> H, C <sub>23</sub> H, C <sub>24</sub> H, C <sub>22</sub> H)
1381	1382	1382	$\delta$ (C <sub>37</sub> H, C <sub>36</sub> H, C <sub>52</sub> H, C <sub>53</sub> H, O <sub>56</sub> H, C <sub>34</sub> H, C <sub>20</sub> H, C <sub>6</sub> H)
1619	1604	1609	$\nu_{as}$ (C <sub>25</sub> O <sub>31</sub> O <sub>30</sub> ) $\delta$ (C <sub>24</sub> H, C <sub>36</sub> H)
	2919	2919	$\nu$ (C <sub>22</sub> H, C <sub>34</sub> H, C <sub>32</sub> H, C <sub>21</sub> H)

$\nu$ -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>)



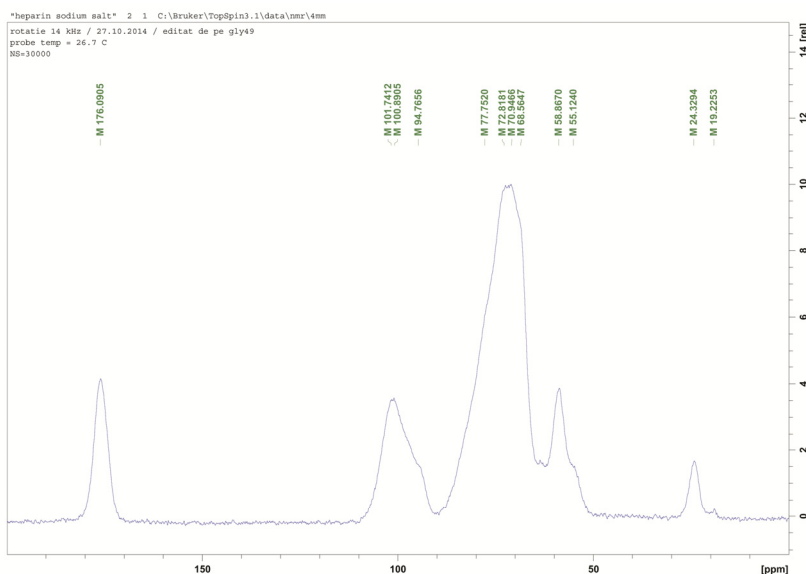
## RMN heparina

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.

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

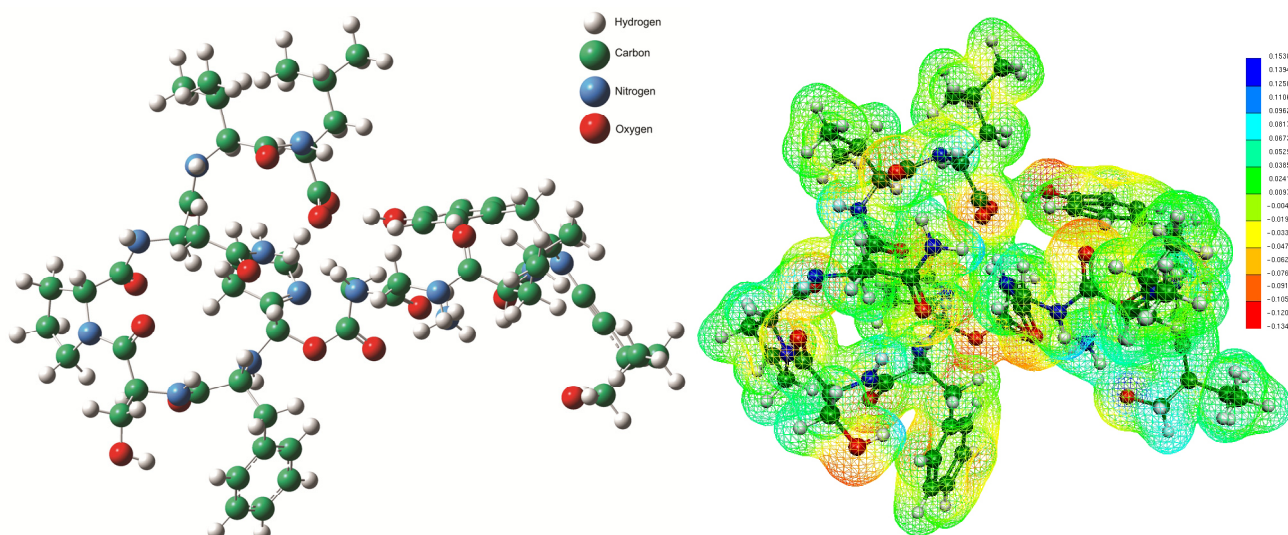
Nucleu	Experimental	Calculat	Nucleu	Experimental	Calculat
		PBE0/ 6-311g(d,p)			PBE0/ 6-311g(d,p)
C(56)		188.86	C(54)		72.43
C(25)		181.22	C(55)		72.27
C(20)		104.05	C(21)		71.91
C(51)		97.78	C(53)		71.24
C(32)		93.26	C(37)		70.21
C(1)		92.55	C(36)		68.97
C(4)		79.42	C(22)		68.41
C(52)		75.28	C(24)		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  $^{13}\text{C}$  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.

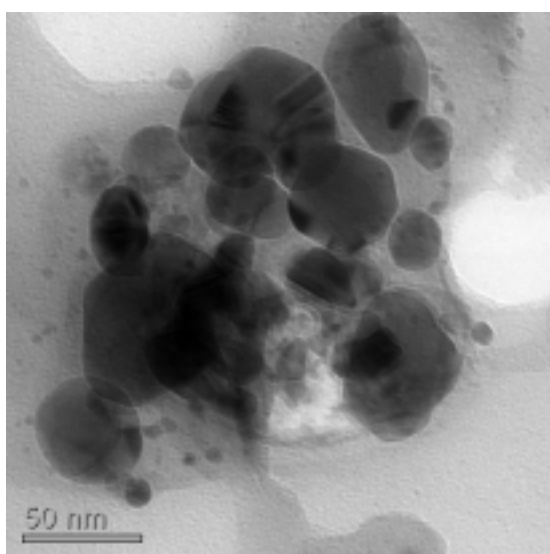
S-au efectuat calcule de optimizare a geometriei pentru un fragment din CRP, potențialul electrostatic a fost mapat.

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.**



### 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.

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

### 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 distribuție 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.6. 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**

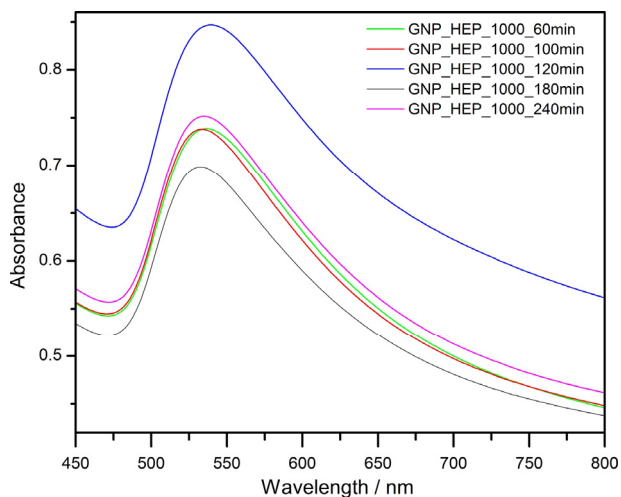
### **II.1. Nanoparticule de aur reduse cu heparină**

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 cloroauric ( 1g  $\text{HAuCl}_4$  / 50mL  $\text{H}_2\text{O}$  , 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 (HCl:HNO<sub>3</sub> 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 măsurărilor 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.

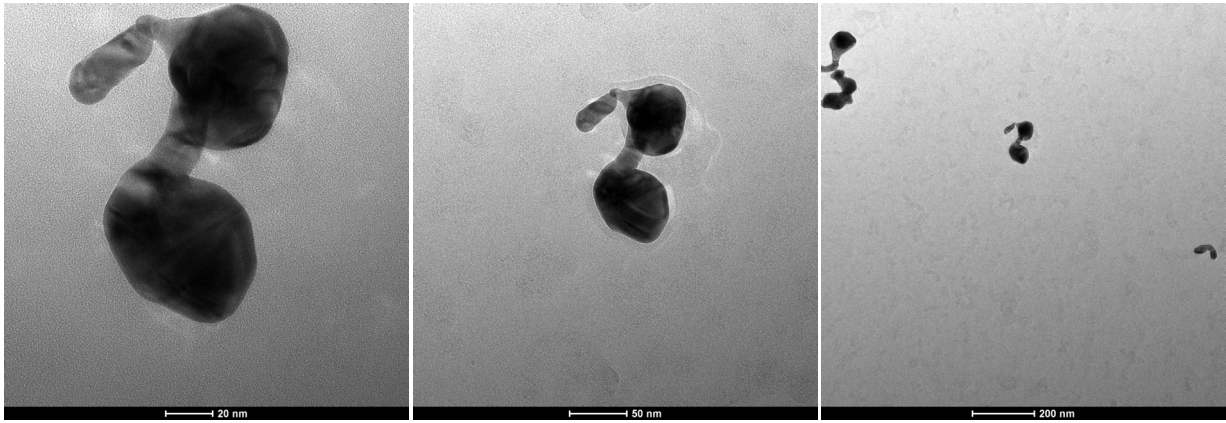


Fig. II.1.2. Imaginile TEM al GNP\_HEP\_1000.

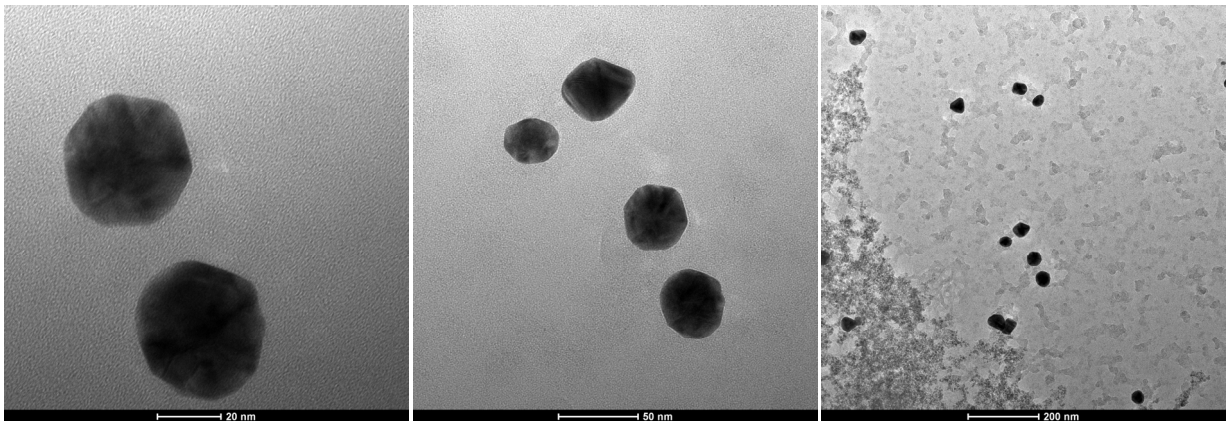


Fig. II.1.3. Imaginile TEM al GNP\_HEP\_2000.

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.

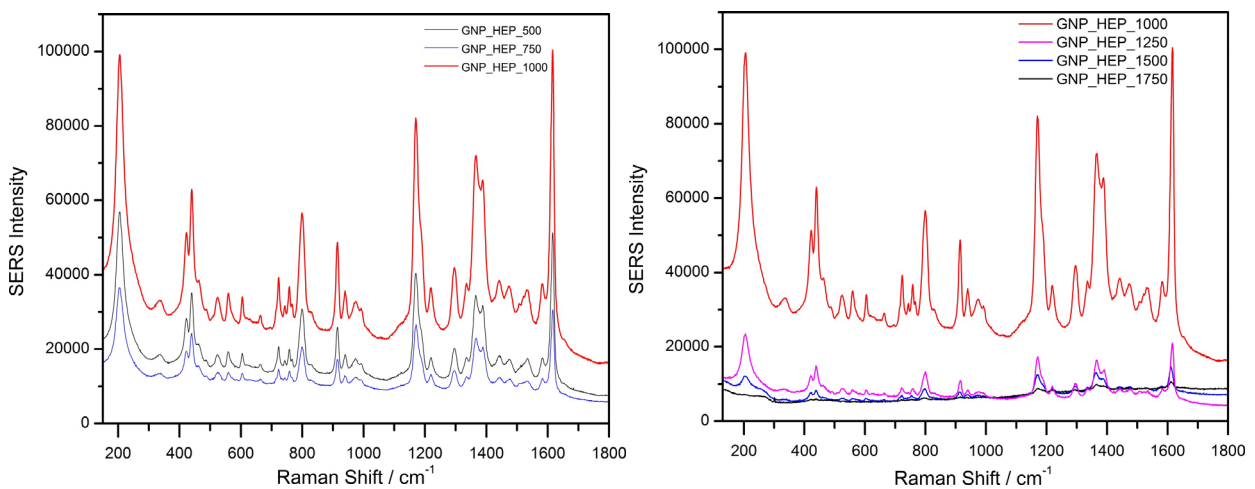
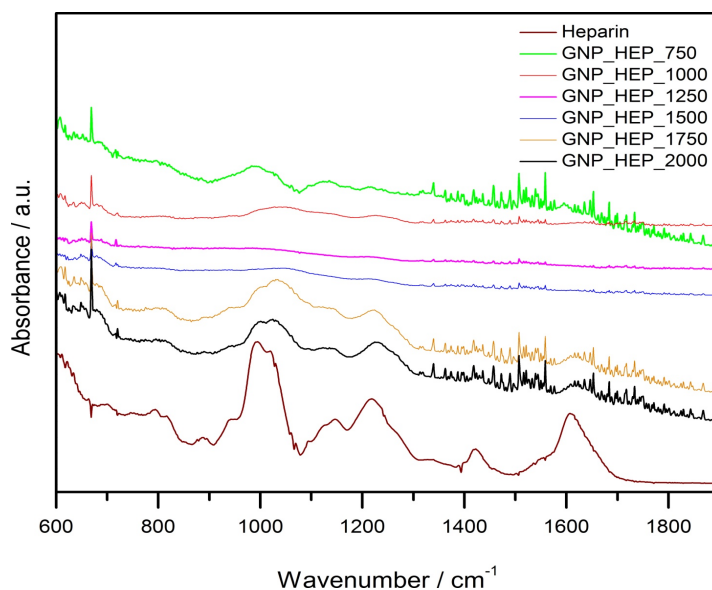


Fig. II.1.4. Spectrele SERS a Cristalului Violet la concentrație de  $10^{-6}$  M obținute pe nanoparticule GNP\_HEP\_500\_750\_1000\_1250\_1500\_1750.

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 o concentrație de heparină mai mare în timpul sintezei, s-a observat formarea unui înveliș de heparină mai grosă 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.

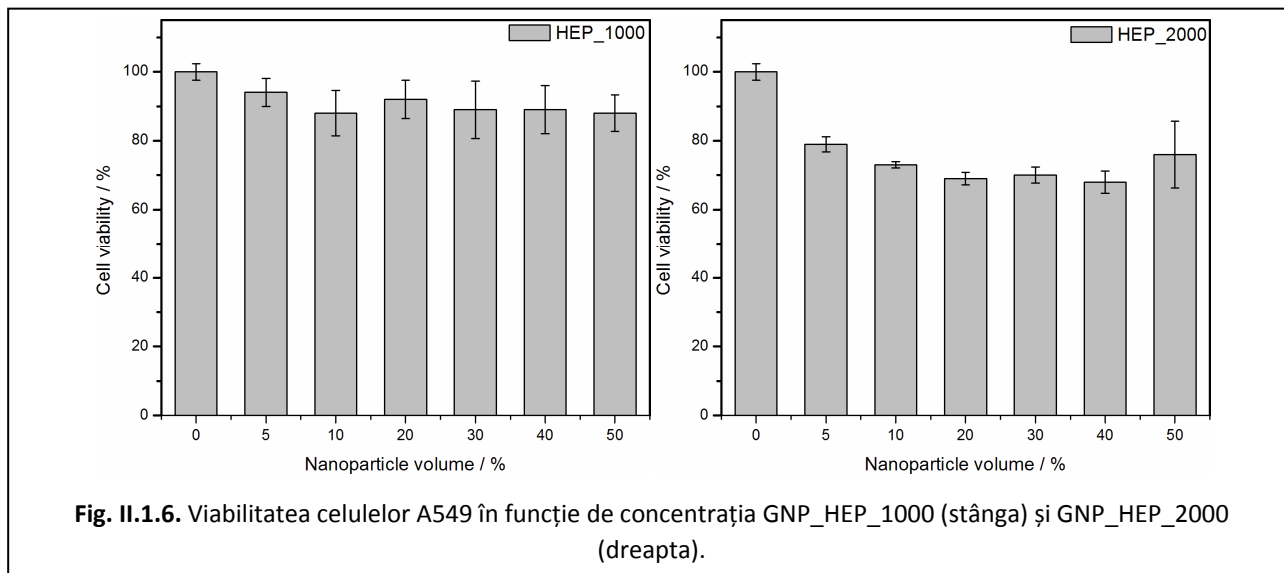
De obicei în timpul sintezei nanoparticulelor coloidale agentul reducător se denaturează de aceea este foarte important verificării prezenței heparinei intacte pe suprafața nanoparticulelor. Prin măsurători FTIR a fost verificată prezența heparinei pe suprafața GNP iar rezultatele aferente sunt prezentate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



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 că 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 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 metoda 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 că 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 colagenului 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 colagen 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 fiind-le evaluate activitatea ca substrat SERS.

Pentru sinteza nanoparticulelor s-a folosit o soluție standard de sare de aur, preparată prin dizolvarea a 1 g hydrogen tetrachloraurate(III) hydrate 99.9% metal basis (Alfa Aesar) în 50 ml de apă ultra pură. De asemenea, colagenul a fost preparat prin amestecarea a 10 ml de apă ultra pură cu 0.02 g de colagen 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 colagenului în apă. Toate substanțele folosite, printre care și: 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 apă ultra pură cu rezistivitatea mai mare de 18 MΩ (Direct-Q 3 UV, Millipore).

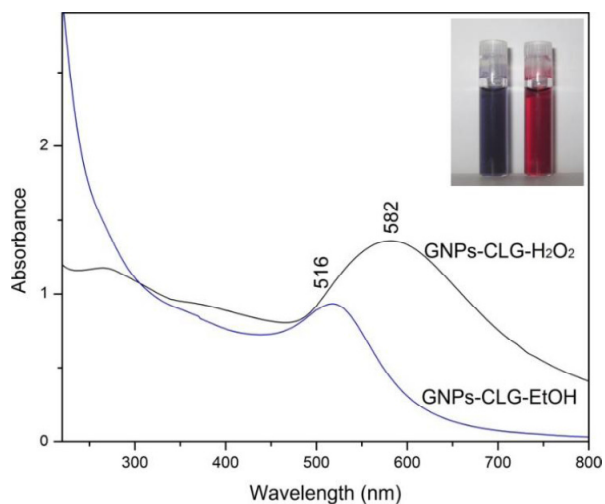
### **Metode**

Trebuie menționat faptul că reducerea ionilor de aur nu a fost posibilă 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 că etanolul sau apă oxigenată denaturează proteina până la o formă moleculară, astfel permițând reducerea ionilor de aur.

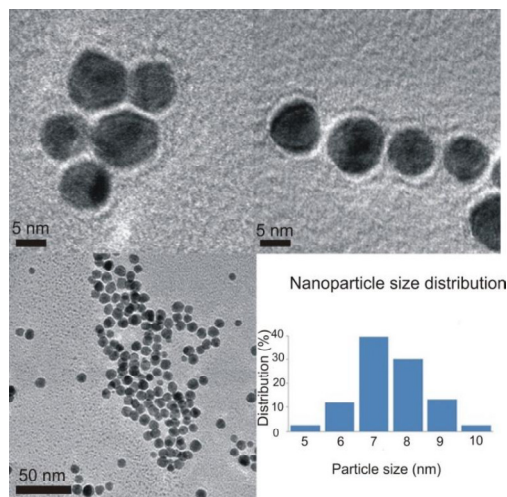
### **Analiza**

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 înaltă 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).

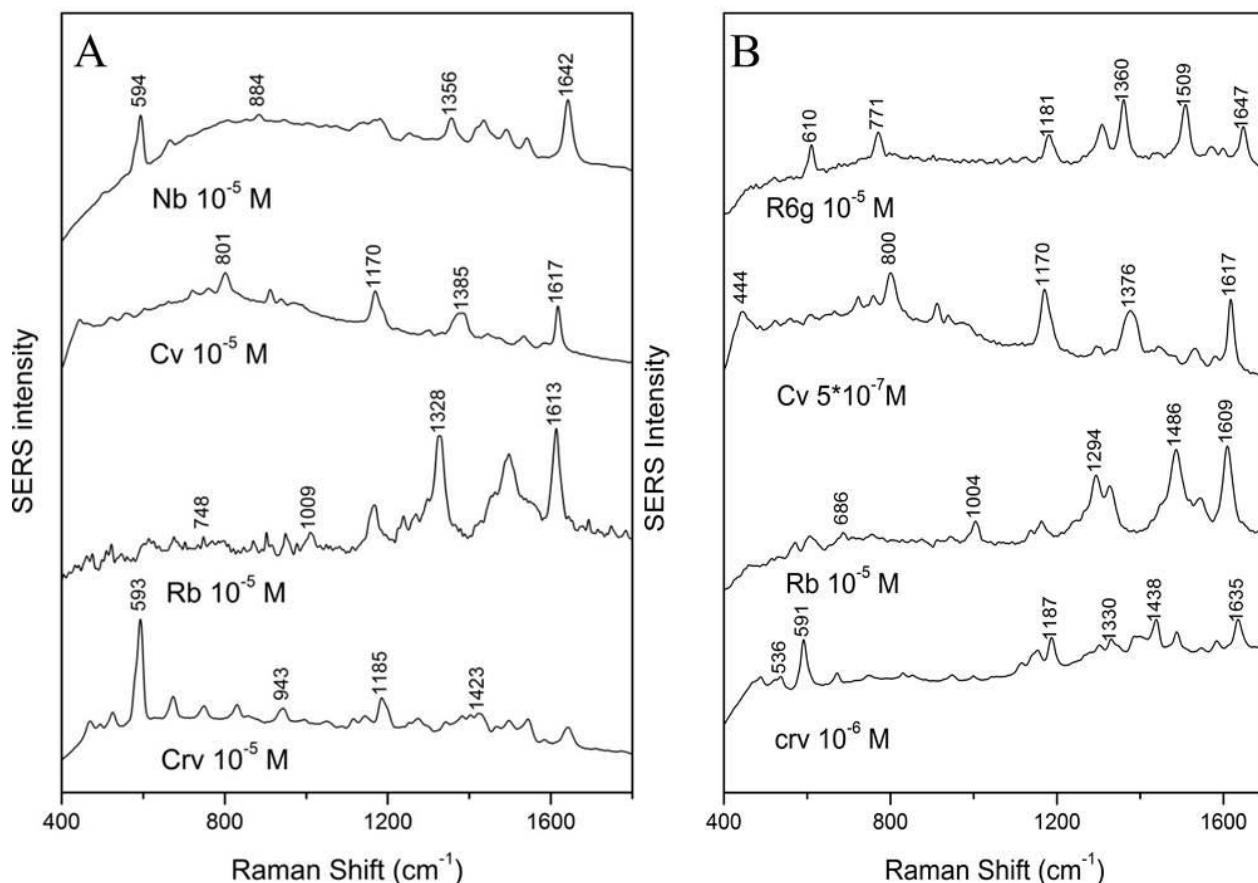
Spectrele SERS au fost înregistrate cu o rezoluție spectrală de  $8 \text{ cm}^{-1}$  de către un spectrometru Raman Advantage 200A (DeltaNu, Laramie, WY), echipat cu un laser de HeNe de 5 mW care emite la 633nm.



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



**Fig. II.2.2.** Imaginea TEM a nanoparticulelor GNP-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 GNP-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 GNP-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 collagenul (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)

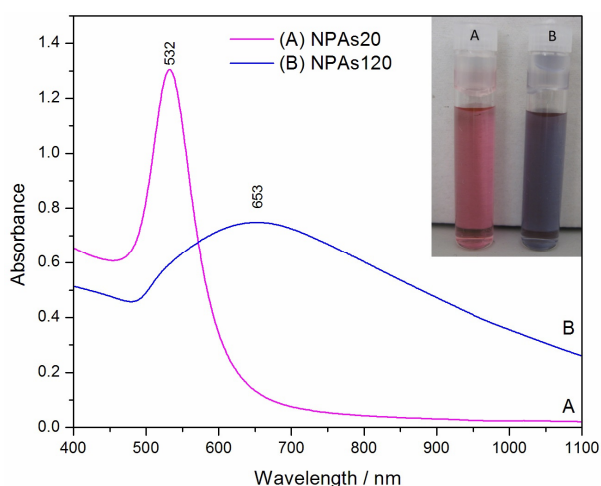
Nanoparticulele de aur au fost preparate pentru prima dată, dintr-un singur pas prin reducerea acidului cloroauric cu hidroxilamină-clorhidrică la temperatura camerei. Schimbând ordinea de adăugare a reactanților am obținut ansambluri de nanoparticule (NPAs) de 20 nm (NPAs20), respectiv de 120 nm (NPAs120).

**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 ansamblelor 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.

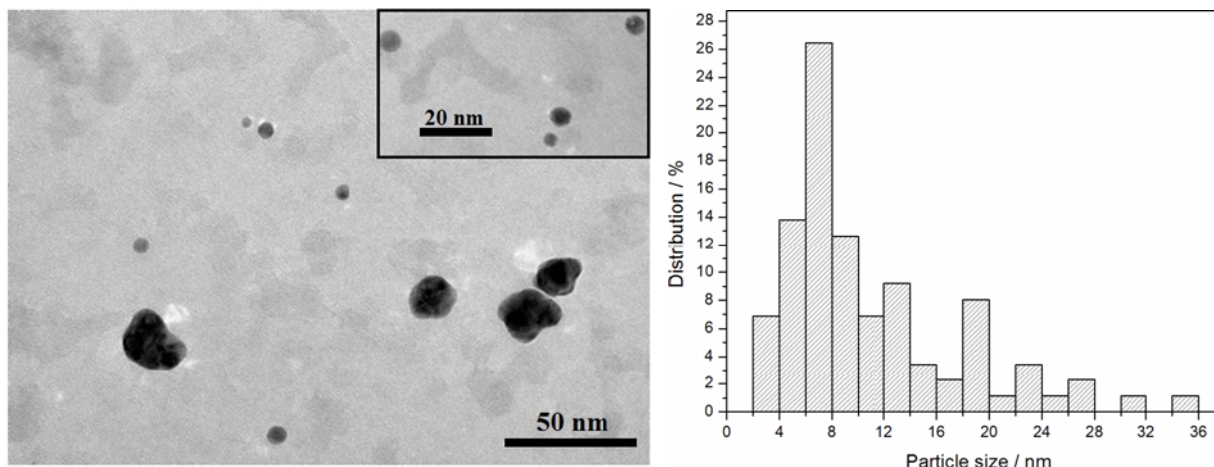
Nanoparticulele au fost caracterizate prin măsurători UV-Vis, TEM și SERS iar toxicitatea lor a fost evaluată prin testul MTT. Fig. II.3.1. prezintă spectrele de absorbție UV-Vis al coloizilor NPAs20 și NPAs120 nm.



**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.



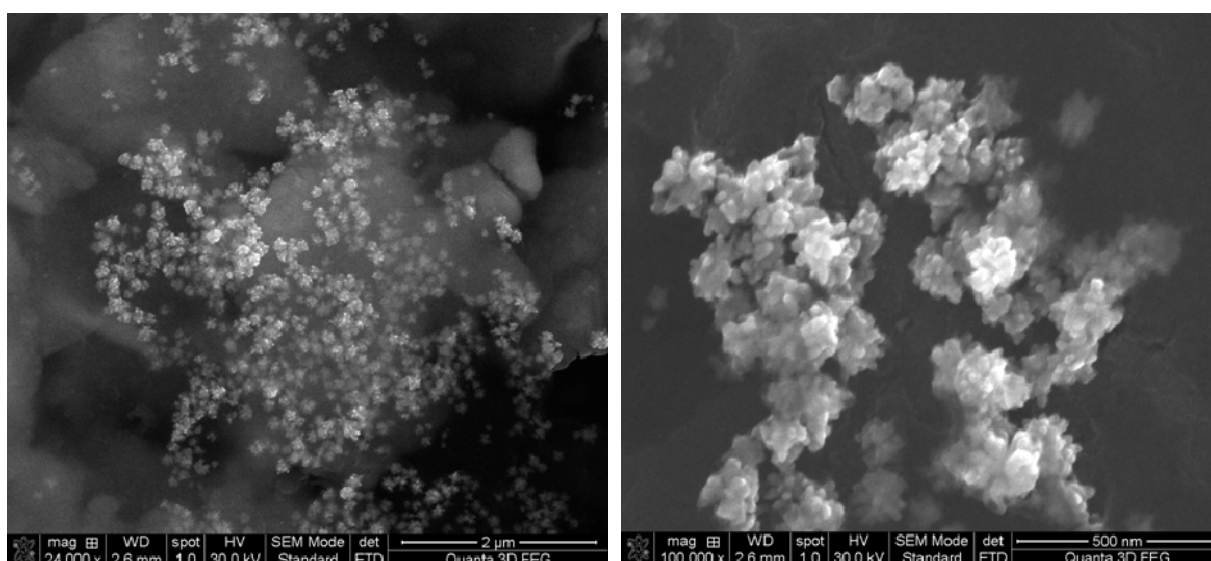
**Fig. II.3.2.** Imagini TEM (stânga) a nanoparticulelor NPAs20, respectiv distribuția lor dimensională (dreapta).

Imaginile TEM a coloidului NPAs20 (Fig. II.3.2) arată asamblări cu diametre 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.

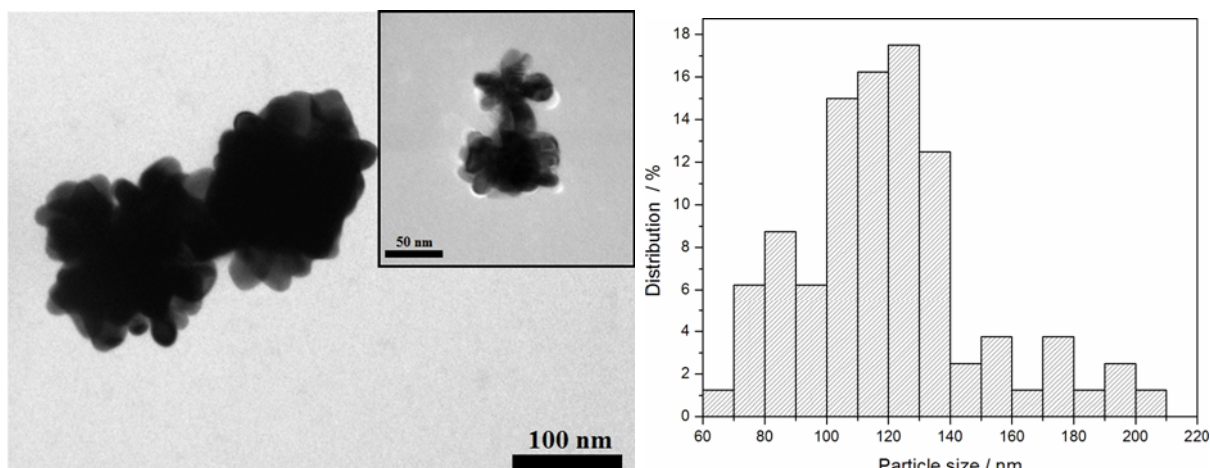
Forma neregulată a nanoasamblărilor conduce la o creștere a lungimilor de undă în spectrul UV-Vis, comparativi cu nanoparticule sferice de aceeași dimensiune. În consecință, conform Haiss et al. (Haiss, Thanh et al. 2007), în spectrul UV-Vis absorbția maximă la 532 nm, corespund nanoparticulelor cu diametrul 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 NPAs120.

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



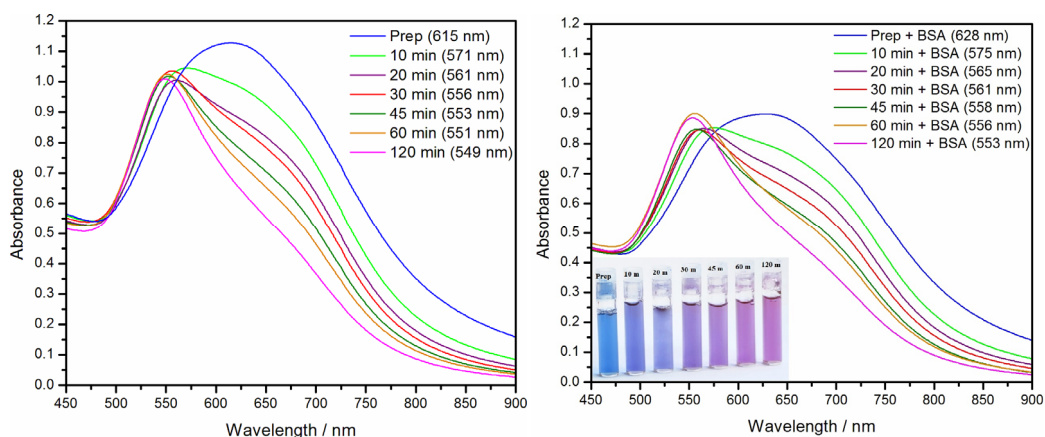
**Fig. II.3.4.** Imagini TEM (stânga) a nanoparticulelor NPAs120, respectiv distribuția lor dimensională (dreapta).

Similar cu nanostructurile găsite în coloidul NPAs20, și la coloidul NPAs120 observăm elemente de construcție ale acestora dar cu diametre cuprinse între 20-30nm. Absorbția UV-Vis a coloidului NPAs120 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 NPAs20, mari asamblări se formează care se rup în părți mai mici în decurs de o zi. Coloidul NPAs20 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 NPAs120 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



**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).

diferite momente 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.

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 continua această evoluție în intervalul de timp de o zi (Fig. II.3.1).

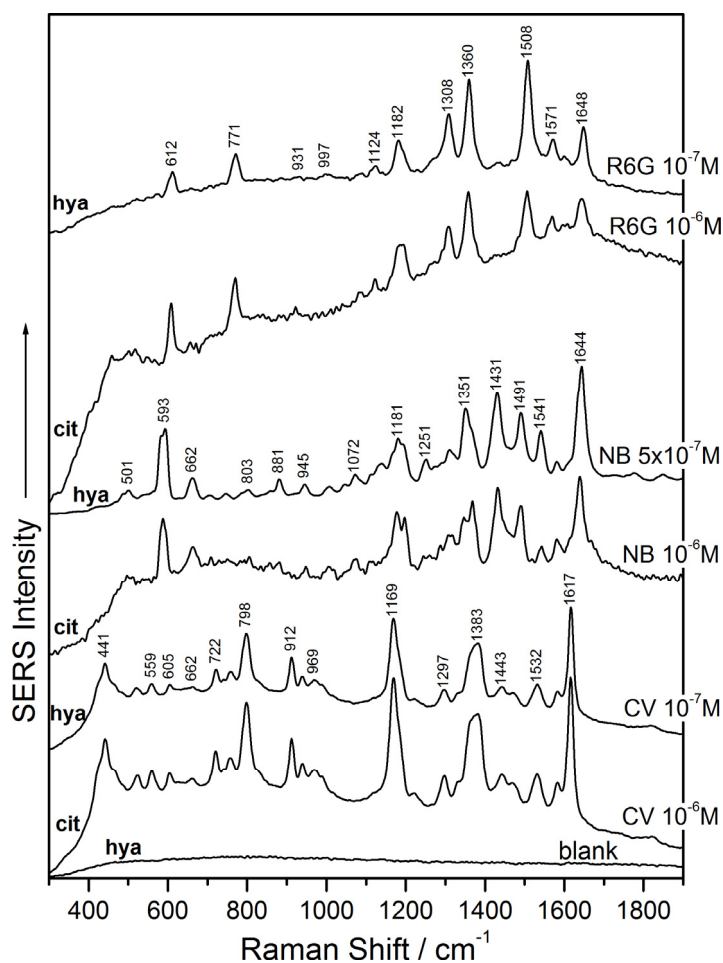
În vederea obținerii nanoparticulelor de dimensiune controlabilă, soluția de coloid cu spectrul de absorbție din Fig. II.3.5(stanga) a fost stabilizat cu BSA. Pentru acest scop la fiecare 4mL de coloid a fost adăugat 500  $\mu$ L albumină la o concentrație de 50mg/10mL. La nanoparticulele stabilizate 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.

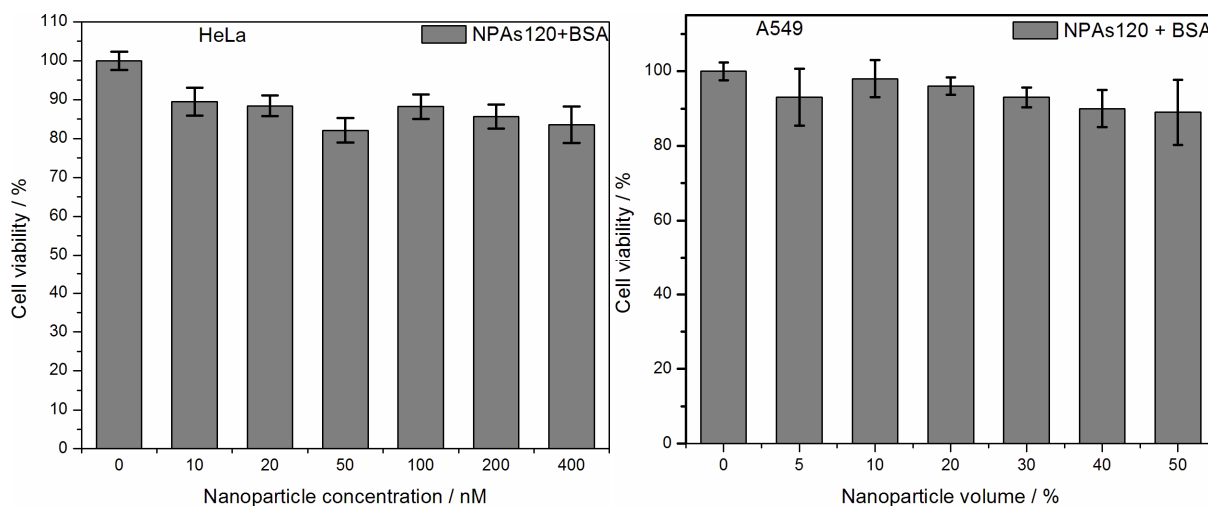
Pentru demonstrarea activității SERS ridicate ale noilor nanoparticule dezvoltate, spectrul SERS al diferitelor molecule de test obținute cu nanoparticule de aur reduse cu hidroxilamină, respectiv cu nanoparticule convenționale reduse cu citrat au fost comparate (Fig. II.3.7.). Spectrele SERS au fost 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  $\mu$ L de probă a fost adăugat la 500  $\mu$ L de coloid de aur. Pentru comparație au fost folosiți trei coloranți diferiți: Cristal Violet, Niel Blue și Rhodamine 6G. Din



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

nefericire nu a fost posibil folosirea aceleiași 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.

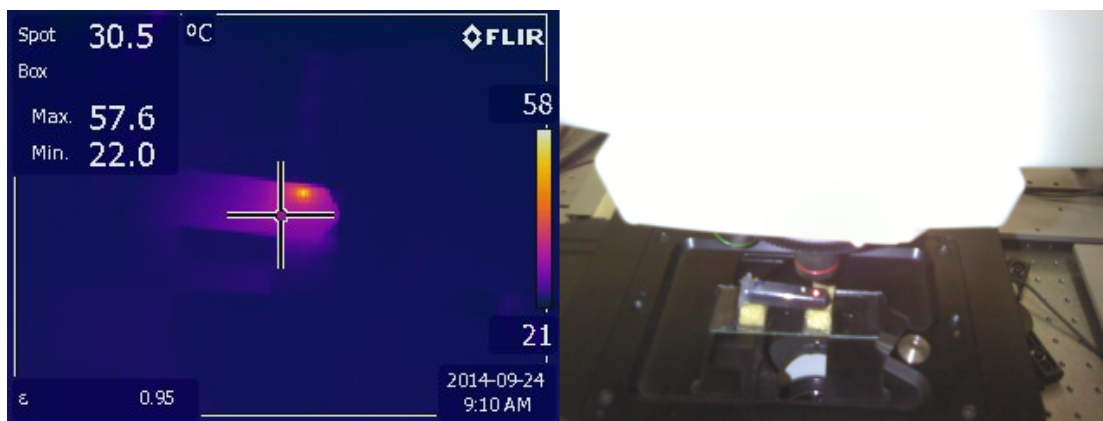
Toxicitatea indusă de nanoparticule de aur a fost evaluată ca și în cazul GNP\_HEP cu testul MTT. Viabilitatea celulelor HeLa, respectiv A549 în funcție de concentrația NPAs120 sunt prezentate pe Fig. II.3.8.



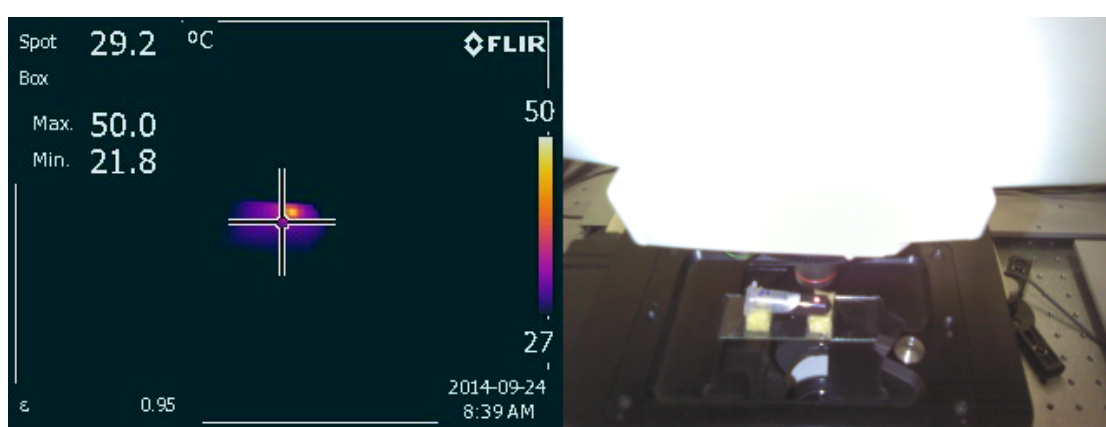
**Fig. II.3.8.** Viabilitatea a liniei celulare HeLa (stânga) și a liniei celulare A549 (dreapta) în funcție de concentrația NPAs120

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.

Cluj-Napoca, 2014

Director proiect  
Dr. Szabo Laszlo