

**Contribuții la studiul radiației cu protoni și a
nanoparticulelor metalice cu aplicații în științele
vieții**

- Teză de doctorat -

**Doctorand:
Anda LEȘ**

**Conducător științific:
Prof. univ. dr. habil. Emilia Dorina CREANGĂ**

**UNIVERSITATEA "ALEXANDRU IOAN CUZA"
IAȘI - 2023**

Cuprins

INTRODUCERE.....	1
CAPITOLUL 1	2
INFLUENȚA RADIAȚIEI IONIZANTE ASUPRA UNOR SEMINȚE DE CEREALE	2
1.1 Introducere	2
1.2. Materiale și metode.....	2
1.2.1. Materialul biologic și condițiile de creștere	2
1.2.2. Expunerea materialului biologic la iradiere cu fasciculul de protoni la vârful Bragg.....	2_Toc144718926
1.2.3. Condiții de creștere a plantulelor.....	3
1.2.4. Analize citogenetice	3
1.2.5. Analiza pigmentilor fotosintetici.....	4
1.2.6. Analiza enzimelor antioxidante.....	4
1.2.7. Testarea antioxidantilor nonenzimatici și a malonedialhidei (MDA)	4
1.2.8. Analiza proteinelor solubile	4
1.2.9. Analiza statistică.....	4
1.3 Rezultate	5
1.3.1. Influența iradierii cu protoni asupra parametrilor citogenetici.....	5
1.3.2. Modificările induse de fascicul de protoni la nivelul fotosintezei plantulelor.....	7

1.3.3. Influența radiațiilor asupra sistemelor de apărare antioxidante	8
CAPITOLUL 2	11
STUDIUL NANOPARTICULELOR MAGNETICE (MNP) STABILIZATE CU MOLECULA RADIOPROTECTOARE DE CISTEAMINĂ R (CYS@MNP) ȘI MOLECUL ANTIOXIDANTĂ DE ACID GALIC (GA@MNP)	11
2.1. Introducere	11
2.2. Abordarea teoretică a învelișului de acoperire moleculară MNP.....	11
2.2.1 Rezultate modelării chimice cuantice pentru învelișul de acoperire moleculară cu cisteamină pentru nanostructurile MNP	11
2.2.2 Rezultate chimice cuantice pentru învelișul de acoperire moleculară a acidului galic pentru nanostructurile MNP	13
2.3 Studiul experimental al nanostructurilor de magnetită acoperite cu cisteamină	15
2.3.1 Metode experimentale	15
2.3.2 Rezultate și discuții	15
2.4 Studiu experimental al nanostructurilor MNP acoperite cu acid galic	20
2.4.1 Metode experimentale	20
2.4.2 Rezultate și discuții	20
2.5. Studiul interacțiunilor intermoleculare ale moleculei antioxidante a acidului galic în soluții binare și ternare	27
2.5.1. Introducere	27
2.5.2 Materiale și metode.....	27
2.5.3 Rezultatele investigației experimentale solvatocromice ale interacțiunilor intermoleculare ale acidului galic cu solvenți puri	27
2.5.4 Rezultatele studiului solvatocromic al interacțiunilor intermoleculare ale acidului galic în solvenți binari (în soluții apoase ternare)	29

CAPITOLUL 3	31
NANOPARTICULE DE ARGINT FITOSINTETIZATE CU EXTRACT DE PĂDUCEL CU IRADIARE UV-C	31
3.1. Introducere	31
3.2 Materiale și tehnici.....	31
3.3. Rezultate și discuții	32
CONCLUZII	38
LISTA PUBLICAȚIILOR.....	40
SELECȚIE DE REFERINȚE:.....	43

INTRODUCERE

Această teză este axată pe trei direcții. În primul rând, am studiat răspunsurile la expunerea la un fascicul de protoni a unei componente importante a mediului - vegetația în fazele ontogenetice timpurii, analizând efectele genotoxice indirecte ale radiațiilor prin intermediul radicalilor liberi eliberați de apă.

În plus, vizând proprietățile biocompatibile ale învelișului molecular de acoperire pentru nanoparticulele de magnetită (MNP), am ales cisteamina, cu acțiune radioprotectoare manifestată prin grupări sulfhidril și acidul galic, cu activitate recunoscută de captare a speciilor reactive de oxigen (ROS), pentru a studia potențialul acestora de a modifica suprafața nanoparticulelor magnetice. Caracterizarea microstructurală și magnetică a celor două tipuri de nanoparticule magnetice a fost completată de testul de nanotoxicitate pe plantule tinere după administrarea de suspensii diluate de nanoparticule magnetice.

În ultimul capitol, cercetarea a continuat cu sinteza verde a nanoparticulelor de argint mediată de radiațiile UV-C, urmărindu-se să asigure o siguranță sporită a mediului după utilizarea și eliberarea nanoparticulelor în biosferă. În plus, a fost efectuat un studiu de nanotoxicitate pe o plantă cunoscută din țara noastră, pepenele galben (familia Cucurbitaceae), pentru a cuantifica impactul asupra pigmentilor de fotosinteză ca mecanism de răspuns al acestei plante la aportul suspensiei de nanoparticule.

În partea finală a acestei teze au fost exprimate principalele concluzii cu privire la toate cele trei studii.

CAPITOLUL 1

INFLUENȚA RADIAȚIILOR IONIZANTE ASUPRA UNOR SEMINȚE DE CEREALE

1.1 Introducere

Scopul acestui capitol este de a evalua efectele induse de iradierea cu protoni asupra materialului genetic celular precum cromozomii și de a evalua modificările parametrilor citogenetici și biochimici ai plantulelor tinere de grâu, care au fost expuse la protoni accelerați (la vârful Bragg) în stadiul de semințe. (Oprica și colab., 2023). Interpretarea s-a axat pe genotoxicitatea exprimată prin acțiunea indirectă a radiațiilor asupra moleculelor de apă care eliberează specii libere reactive ale oxigenului capabile să lezeze principalele biomolecule precum ADN -ul și enzimele.

1.2. Materiale și metode

1.2.1. Materialul biologic și condițiile de creștere

Specia vegetală pentru studiul experimental a fost grâul, *Triticum aestivum* cv. Global. Analizele răspunsurilor plantulelor de grâu la expunerea la radiații au fost realizate în condiții de laborator, prin proiectarea unui experiment randomizat bazat pe trei repetări.

1.2.2. Expunerea materialului biologic la iradiere cu fasciculul de protoni la vârful Bragg

Expunerea probei de semințe la iradierea cu fascicul de protoni s-a realizat la fazotronul centrului JINR din Dubna (Figura 1.2), în cadrul cooperării JINR_Ro. Energia fasciculului la locul expunerii probei a fost egală cu 150 MeV, iar valoarea LET medie, adică dE/dx a fost egală cu 0,539 keV/ μm . Pentru reglarea energiei protonilor accelerați a fost folosit un set de atenuatoare tip PMMA cu grosimi diferite.

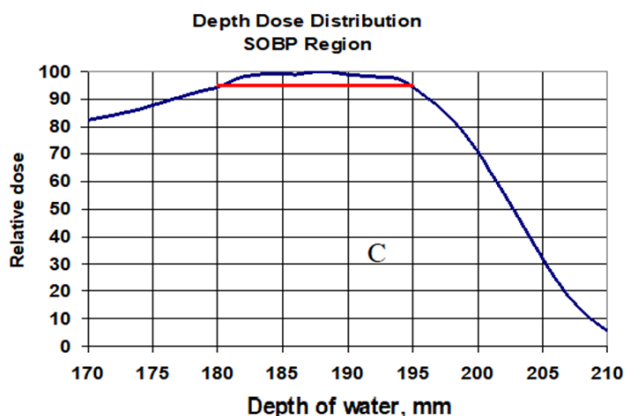


Figura 1.1
Regiunea extinsă a vârfului Bragg (SOBP = spread-out Bragg peak) pentru iradierea probei de semințe – adâncime 180 mm echivalent

Partea de dozimetrie a fost efectuată cu un dozimetru clinic tip PTW UNIDOS-E cu cameră de ionizare tip TM30013. Măsurarea spectrelor LET la diferite adâncimi a fost efectuată cu ajutorul spectrometrului de depozite de energie cu semiconductori, tip Liulin-4C (Kubancák et al., 2013). Iradierea probei de semințe s-a făcut în condiții SOBP (Figura 1.1) de expunere la protoni accelerați și la un debit de doză de 0,55 Gy/min. Dozele aplicate au fost stabilite din motive de conveniență ca 22,4-44,8-56,0-67,2-89,6 Gy.

1.2.3. Condiții de creștere a plantulelor

Pentru fiecare variantă experimentală, douăzeci de semințe expuse din materialul genetic de grâu selectat au fost examinate la șapte zile după germinare pentru investigații biometrice și biochimice.

1.2.4. Analize citogenetice

După un tratament special de fixare a celulelor meristeme, fiecare lamă de microscop a fost examinată cu dispozitivul Nikon Eclipse 600 (cu obiectiv 20 ×) prin vizualizarea și studiul în total a cincizeci de câmpuri de microscop (zece câmpuri pentru fiecare lamă).

1.2.5. Analiza pigmentilor fotosintetici

Conform protocolului din literatură, conținutul de pigmenți de clorofilă *a*, clorofilă *b* și caroteni din eșantioanele de țesut verde a fost calculat pe baza anumitor valori ale extincției luminii măsurate în spectrele de absorbție electronică ale extractelor acetone.

1.2.6. Analiza enzimelor antioxidante

Activitatea superoxid dismutazei (SOD) a fost analizată conform metodei lui Winterbourn (Bonciu et al., 2018) (Oprica et al., 2020). Activitatea peroxidazei (POD) a fost evaluată folosind metoda propusă de (Ranieri et al., 2000). Activitatea catalazei (CAT) a fost evaluată în conformitate cu procedura adaptată după Sinha (Sinha, 1972).

1.2.7. Testarea antioxidanților nonenzimatici și a malonedialdehidei (MDA)

Antioxidanții nonenzimatici analizați în acest experiment au fost polifenolii, conținutul lor total fiind cuantificat prin metoda Folin-Ciocalteu, ușor modificată conform cu Singleton, (1999).

1.2.8. Analiza proteinelor solubile

Conținutul total de proteine solubile (care include toate enzimele menționate) a fost estimat folosind metoda Bradford (Bradford și colab., 1976) considerând ca standard albumina serică bovină. Această determinare a fost necesară pentru calculul activităților enzimatice.

1.2.9. Analiza statistică

Toate măsurătorile au fost repetate de trei ori, iar rezultatele fiecărui test au fost prezentate în termenii valorilor medii \pm abaterea standard.

1.3 Rezultate

1.3.1. Influența iradierii cu protoni asupra parametrilor citogenetici

În primul rând, în cadrul analizelor noastre citogenetice, au fost estimate procentajele de celule găsite în fiecare fază a mitozei (MI) (Figura 1.2).

Am observat, pentru fiecare fază mitotică, tendința generală este de diminuare a procentajului de celule (Figura 1.2), dar cea mai pronunțată scădere a fost găsit pentru profază - de la aproximativ 8,5% la 6%, în raport cu creșterea dozei de radiații.

Parametrul MI a scăzut constant (Figura 1.3) de la aproximativ 13% în probele martor la 9% pentru cea mai mare doză de radiații aplicată de noi, de 89,6 Gy.

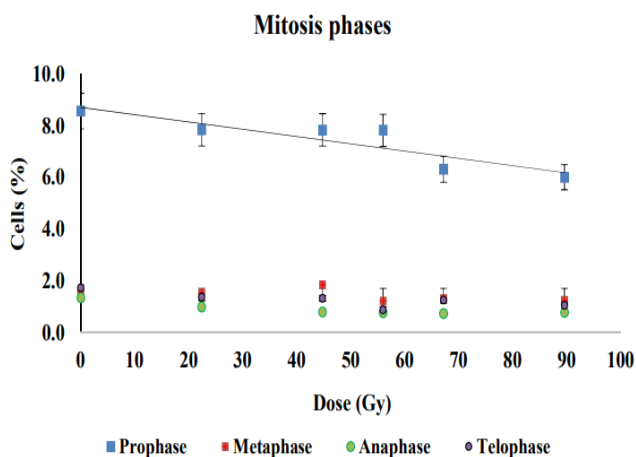


Figura 1.2 Influența fascicului de protoni asupra numărului de celule găsite în fiecare fază a mitozei

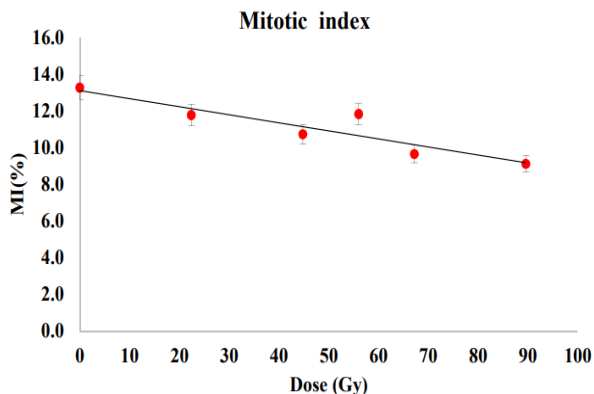


Figura 1.3 Indicele mitotic în relație cu doza de protoni administrată

Cele mai multe celule în diviziune care prezintă aberații cromozomiale au fost identificate în celulele analizate care au fost găsite în anafază sau în telofază. De exemplu, aberația cromozomială cunoscută sub numele de punte intercromatidiană constă într-un fir subțire de material genetic care conectează cele două matrici cromozomiale (Figura 1.4).

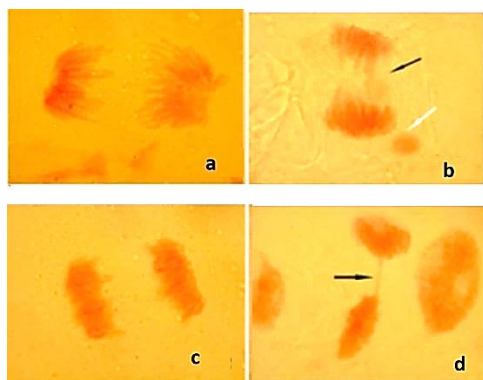


Figure 1.4 (a) Anafază normală în celula neiradiată (b) Anafază aberantă indusă de impactul fasciculului de protoni. Săgeata neagră arată puntea intercromatidiană, săgeata albă arată un micronucleu (c) Telofază normală în celula neiradiată (d) Telofază aberantă cu punte intercromatidiană.

Apariția aberațiilor mitotice și a micronucleilor este prezentată în Figura 1.5, unde au fost evidențiate curbele liniare doză-răspuns.

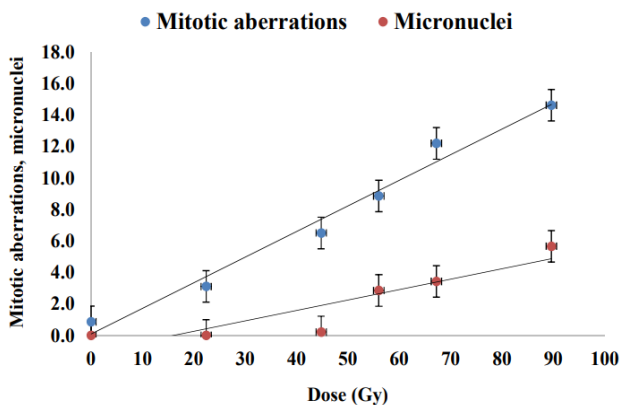


Figura 1.5 Influența expunerii la fascicul de protoni asupra aberațiilor mitotice și a apariției micronucleilor

La nivel molecular majoritatea modificărilor cromozomiale sunt cauzate de leziunile ADN-ului rezultate din acțiunea directă a radiațiilor, cu posibilă inactivare a anumitor enzime. Moleculele de ADN ar putea fi rupte la nivelul unei singure catene de nucleotide, precum și la nivelul unei duble catene de nucleotide. De asemenea, moleculele de ADN sunt adesea afectate indirect de radiație, deoarece iradierea apei din celule generează specii reactive de oxigen (ROS) și acestea sunt capabile să deterioreze moleculele de ADN. Cu toate acestea, ROS poate inactiva și anumite enzime cu rol de reparare a deteriorărilor ADN-ului.

1.3.2. Modificările induse de fasciculul de protoni la nivelul fotosintezei plantulelor

Am calculat raportul dintre cele două conținuturi de clorofilă (Clorofilă *a*/Clorofilă *b*, Figura 1.6), deoarece acesta este considerat un indicator indirect care descrie eficiența fotosintezei.

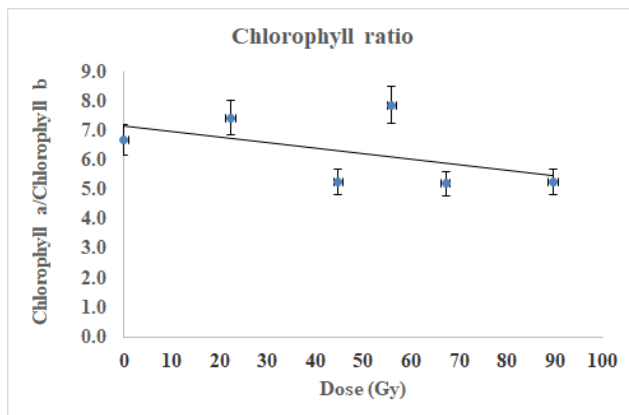


Figura 1.6 Raportul conținuturilor clorofila *a*/clorofila *b*

Raportul conținuturilor de clorofila a fost găsit scăzut cu până la 25% pentru ~90Gy, ceea ce indică perturbarea sistemului fotosintezei PSII care conține principalele echipamente enzimatice care guvernează reacțiile complexe ale fotosintezei (cu toate acestea, înălțimea plantulelor a fost găsită aproape neschimbată – datele nu sunt prezentate).

1.3.3. Influența radiațiilor asupra sistemelor de apărare antioxidante

Activitatea SOD (superoxiddismutazei) a scăzut progresiv cu doza de radiație cu $p < 0,05$ (Figura 1.7), și s-au observat modificări nesemnificative în activitatea CAT (catalazei), în timp ce o ușoară tendință de creștere, nesemnificativă din punct de vedere statistic, ($p > 0,05$) a putut fi evidențiată pentru activitatea POD (peroxidazei).

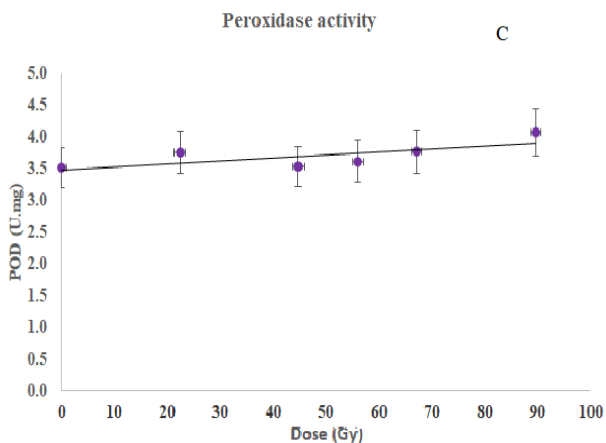
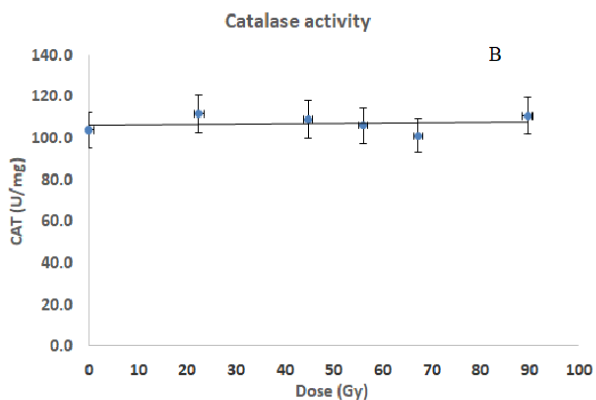
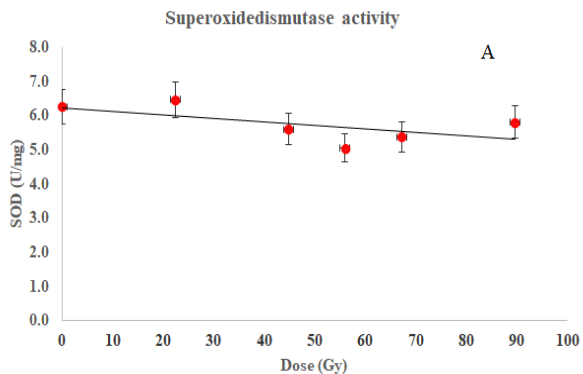


Figura 1.7. Activitățile enzimelor antioxidante din plantule ce s-au dezvoltat din semințele expuse la radiații (A-superoxid dismutază, B - Catalaza, C-Peroxidază

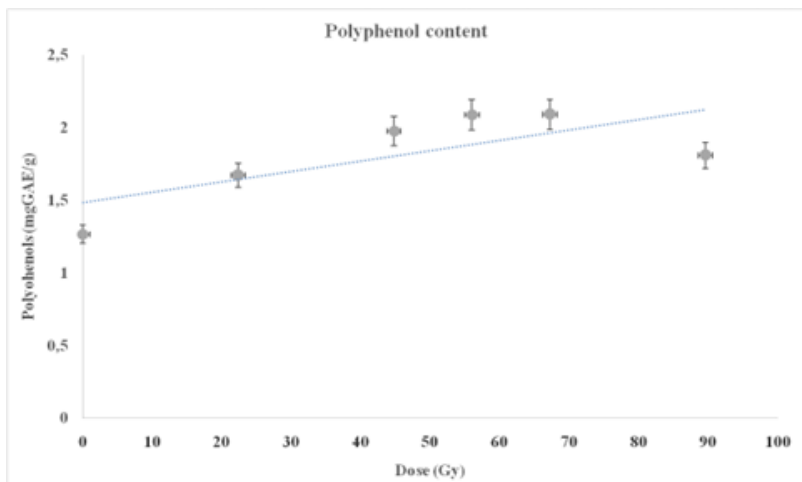


Figura 1.8. Conținutul total de polifenoli

Am găsit creșterea nivelului de polifenoli de la 1,26 mg GAE/g în probele martor, la aproximativ 2,08 mg GAE/g pentru doza de protoni de 60 Gy ($p < 0,05$), astfel că aceasta ar putea fi legată de variațiile conținutului de MDA (malondialdehidă).

În unele studii experimentale (Horendeck et al., 2021) cea mai mare citotoxicitate a fost înregistrată la vârful Bragg al fasciculului de protoni. Einor și colab. (2016) au studiat diverse sisteme biologice și au oferit o analiză care demonstrează modul în care radiațiile ionizante generează ROS chiar și la doze mici. Prin urmare, radiațiile provoacă specii reactive de oxigen abundente prin scindarea moleculelor de apă (radioliză), cum ar fi speciile cu durată scurtă de viață: radicalul hidroxil și radicalul anion superoxid, oxigenul singlet și speciile cu durată lungă de viață precum H_2O_2 (Pospisil și colab., 2019; Georgiou. et al., 2017). Acești radicali sunt cunoscuți a fi toxici pentru majoritatea biomacromoleculelor precum ADN-ul, lipidele și proteinele (Wang și colab., 2022; Martemucci și colab., 2022).

În experimentul nostru, principala țintă a radiațiilor sunt moleculele de ADN, aberațiile cromozomiale identificate de noi fiind posibil responsabile de lezarea genelor (zone ale cromozomilor) care guvernează biosinteza unor molecule antioxidante (enzime precum SOD, CAT, POD etc.) și, de asemenea, antioxidanți neenzimatici precum polifenolii.

CAPITOLUL 2

STUDIUL NANOPARTICULELOR MAGNETICE (MNP) STABILIZATE CU MOLECULA RADIOPROTECTOARE DE CISTEAMINĂ (CYS@MNP) ȘI MOLECULA ANTIOXIDANTĂ DE ACID GALIC (GA@MNP)

2.1. Introducere

În capitolul de față am studiat MNP-urile de oxid de fier, și anume magnetita, precum și învelișul de acoperire constând în molecule specifice precum cisteamină (o moleculă radioprotectoare) sau acidul galic (o moleculă antioxidantă).

2.2. Abordarea teoretică a învelișului de acoperire moleculară MNP

În studiul nostru, modelarea quantum chimică a fost efectuată pe molecule de cisteamină și acid galic - utilizate în acoperirea nanoparticulelor de oxid de fier (cys@MNP și Fe_3O_4 @GA), folosind software-ul Spartan 18 unde a fost aplicată teoria funcțională a densității și metoda B3-LYP/6 -31G* .

2.2.1 Rezultate modelării quantum chimice pentru învelișul de acoperire moleculară cu cisteamină pentru nanostructurile MNP

Rezultatele modelării moleculei de cisteamină - în Figura 2.1, au relevat faptul că valoarea calculată pentru momentul de dipol a crescut de la 2,29 D în mediu gazos la 3,35 D în mediu apos, favorizând astfel interacțiuni mai puternice dipol-dipol între moleculele învecinate - rezultatele fiind în acord cu alte studii axate pe descrierea parametrilor moleculari ai cisteaminei (Pitt Quantum Repository).

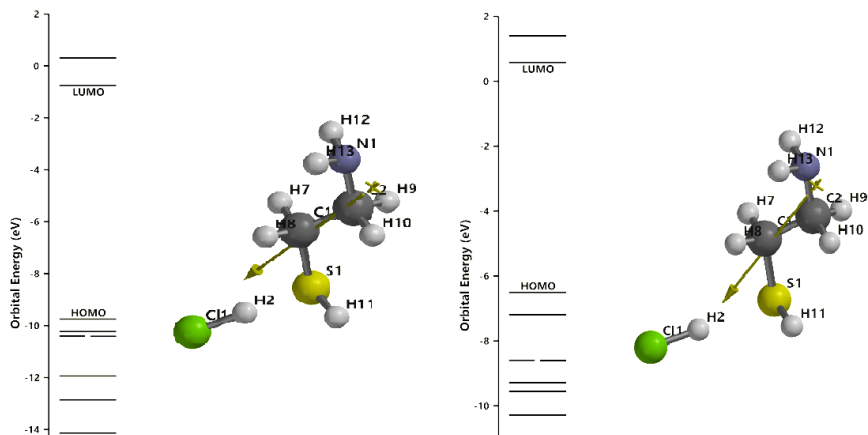


Figura 2.1 Momentul dipol al moleculei de cisteamină în gaz (stânga) și în mediu apos (dreapta)

O constatare importantă legată de principalii descriptori moleculari din tabelul 2.1 este valoarea decalajului de energie de 7,08 eV care situează această moleculă la limita inferioară a intervalului necesar pentru ca o moleculă să fie luată în considerare pentru proiectarea unui sit funcțional în aplicații medicale (Fleishman et. al., 2012).

Table 2.1 Parametri moleculari relevanți pentru molecula de cisteamină

Molecular parameter	Molecular environment	
	Gas	Water
Ionization potential $IP = -E_{HOMO}$	6.74 eV	6.50 eV
Electron affinity $EA = -E_{LUMO}$	-0.12 eV	-0.58 eV
Energy gap $\Delta E = E_{LUMO} - E_{HOMO}$	6.86 eV	7.08 eV
Electronegativity $\chi = (IP+EA)/2$	3.31 eV	2.96 eV
Chemical hardness $\eta = E_{HOMO} - E_{LUMO}$	-6.86 eV	-7.08 eV
Chemical potential $\mu = -(IP+EA) / 2$	-3.31 eV	-2.96 eV
Electrophilicity $\omega = \mu^2 / (2\eta)$	-0.79 eV	-0.61 eV

2.2.2 Rezultate quantum chimice pentru învelișul de acoperire moleculară de acid galic pentru nanostructurile MNP

Metoda quantum chimică a fost aplicată pe molecula de acid galic și pe structurile rezultate din legarea acidului galic la suprafața nanoparticulei magnetice ($\text{Fe}_3\text{O}_4@GA$).

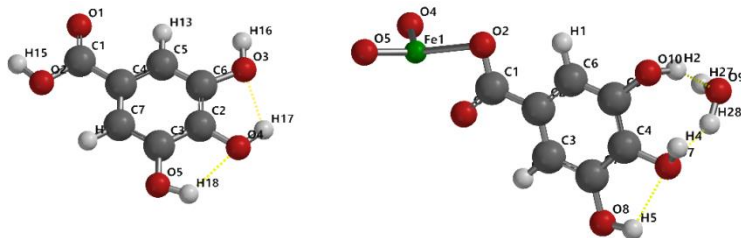


Figura 2.2 Geometria optimizată energetic a moleculei de GA versus structura $\text{Fe}_3\text{O}_4@GA$

Abordarea propusă de noi pentru interacțiunea moleculelor de acid galic cu atomii de fier de pe suprafața MNP a fost bazată pe faptul că fierul tetraedric din planul de cristalizare a magnetitei (111) are starea de oxidare de +3. Mai mult, ionul feric de pe acest prim plan de cristalizare cu ioni de fier de la suprafața magnetitei interacționează cu oxigenii din următorul plan. În modelul nostru, am lucrat cu doi astfel de atomi de oxigen, precum și cu un al treilea oxigen furnizat de gruparea marginală COO a moleculei deprotonate de acid galic.

Sarcina electrică a structurii propuse GA-Fe-2O a fost dată de: $Q = +3 (\text{Fe}_3^+) - 4 (2\text{O}_2) = -1$ și numărul total de electroni nepereche necesari în calcul a fost egal cu 4. Valoarea momentului de dipol al acidului galic a fost găsit ca 2,41 D, ceea ce este în acord cu Pardeshi și colab. (2013). Din Tabelul 2.2 concluzionăm că interacțiunea GA cu fierul de la suprafața a magnetitei a determinat o creștere a momentului de dipol, precum și a suprafeței polarizate, a ariei totale și a volumului.

Table 2.2 Rezultatele modelării quantum-chimice a parametrilor fizico-chimici ai moleculei de acid galic și ai structurii Fe₃O₄@GA

Parameter	Gallic acid (GA)	Fe ₃ O ₄ @GA structure
E _{HOMO} (eV)	-5.99	-1.04
E _{LUMO} (eV)	-1.06	1.80
Dipole moment (D)	2.41	24.9
Polarized Surface Area (Å ²)	89.59	154.45
Area (Å ²)	170.54	238.49
Volume (Å ³)	148.14	194.98

Distribuția spațială a potențialului electrostatic prezintă o zonă electronegativă alungită (în roșu) pentru structura Fe₃O₄@GA (Figura 2.3, imaginea din dreapta) în comparație cu molecula GA (Figura 2.3, imaginea din stânga) care prezintă potențial electric nul la inelul aromatic dar potențial electronegativ la nivelul oxigenului carboxilic (O1). Zonele cu caracter electropozitiv sunt la grupele laterale COH (colorate în albastru), dar pentru nanostructura Fe₃O₄@GA apa adsorbită prin legături de hidrogen este mai puțin electropozitivă la extremitățile menționate. Se poate concluziona că expunerea la atacul electrofil a fost intensificată în regiunea inelului aromatic și a fierului din structura Fe₃O₄@GA.

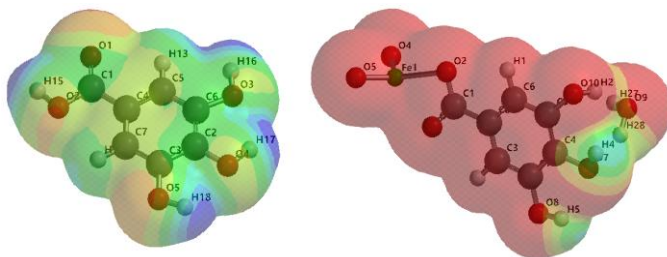


Figura 2.3 Maparea potențialului electric ionizant local pentru molecula de acid galic (stânga) și structura Fe₃O₄@GA (dreapta)

Volumul și suprafața obținute pentru structura optimizată a acidului galic au permis calculul razei moleculei, a , de aproximativ 2,6 Å, în timp ce momentul de dipol al acidului galic pentru starea fundamentală, μ_g a moleculei a fost obținut de aproximativ 5,5 D.

Mai mult, unii autori au descoperit prin abordarea DFT că momentul de dipol electric al moleculelor de acid galic este de aproximativ 2,40 D, $E_{\text{HOMO}} = -5,9$ eV în timp ce $E_{\text{LUMO}} = -1,06$ eV (Domínguez et al., 2019).

2.3 Studiul experimental al nanostructurilor de magnetită acoperite cu cisteamină

2.3.1 Metode experimentale

Nanoparticulele coloidale de magnetită au fost preparate printr-un protocol care cuprinde două etape – sinteza nanoparticulelor de magnetită urmată de funcționalizarea cu înveliș molecular de cisteamină, în care reactivii utilizați au fost săruri ferice și feroase în raport stoichiometric de 2:1, hidroxid de sodiu ca agent de precipitare și cisteamină ca agent de acoperire.

2.3.2 Rezultate și discuții

Atașarea moleculelor de cisteamină la nanoparticulele magnetice este susținută de spectre vibraționale. În acord cu atribuirile menționate de Akafzade și colab. (2019) sunt redată principalele benzi Raman datorate grupărilor funcționale din cisteamină împreună cu valorile obținute din spectrul teoretic al cisteaminei. O oarecare diferență poate apărea datorită faptului că spectrul teoretic a fost generat numai în stare gazoasă.



Figure 2.4 Spectrul Raman comparativ al MNP și MNP@cys

Table 2.3 Atribuirea vibrațiilor pentru structurile moleculare

Theoretical wavenumber (cm ⁻¹)	Experimental Wavenumber (cm ⁻¹)	Intensity (a.u.)	Vibrational assignment
	199.36	38.48	FeS
	288.07	47.80	FeS
	349.67	108.22	FeS
	667.75	51.89	C-S
	770.75	59.15	C-S
	958.01	80.22	C-C-N
	1094.65	208.19	C-C stretching or CH ₂ twisting
1427	1396.16	32.37	CH ₂ scissoring
	1514.39	71.46	NH ₂ scissoring
2574	2427.97	204.40	S-H stretching / N ₂
	2789.40	122.93	CH ₂ symmetric stretching
2908	2934.30	104.85	CH ₂ asymmetric stretching
3301	3167.97	49.30	N-H stretching / scissoring

Rezultatele investigațiilor microstructurale ale probei cys@MNP (Figura 2.5) și anume analiza XDR (în acord cu Ouyang și colab., (2015)) a probei de magnetită acoperită, au relevat maximele de difracție caracteristice ale magnetitei la $2\theta = 30,4^\circ, 35,8^\circ, 43,4^\circ, 53,9^\circ, 57,5^\circ$ și $63,0^\circ$, corespunzătoare planurilor cristaline (220), (311), (400), (422), (511) și

(440) ale magnetitei (Atribuire: Fe_3O_4 , Cubic , Card Nr. ICSD 98-015-8505).

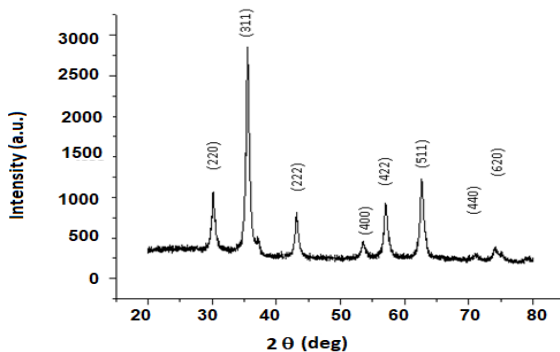


Figura 2.5 Difractograma probei cys@MNP

Tehnica EDAX (Energy-dispersive X-ray analysis) a fost folosită pentru a finaliza investigația SEM (Scanning Electron Microscopy); pentru proba MNP@cys (Figura 2.6) față de proba nativă de MNP (Figura 2.7), s-au găsit benzi suplimentare corespunzătoare atomilor de sulf și clor, atestând astfel prezența agentului de acoperire.

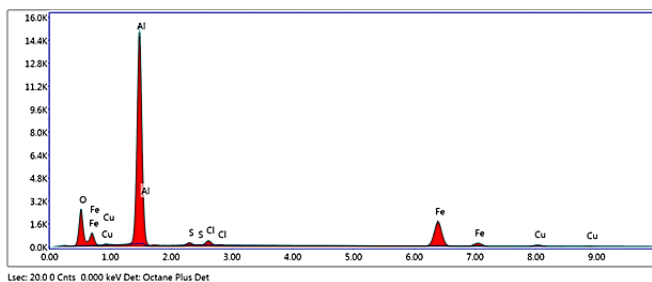


Figura 2.6 Rezultatele EDS pentru proba MNP@cys, atestând prezența atomi de clor și sulf

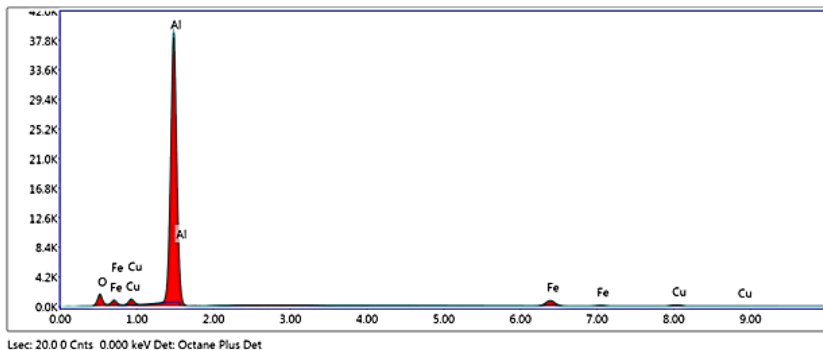


Figura 2.7 Rezultatele EDS pentru proba de magnetită neacoperită

Investigarea granularității s-a făcut prin tehnica TEM (Transmission Electron Microscopy) pe o diluție de 10^{-4} a suspensiei de nanoparticule de magnetită învelită care a fost depusă pe suportul grilei și uscată.

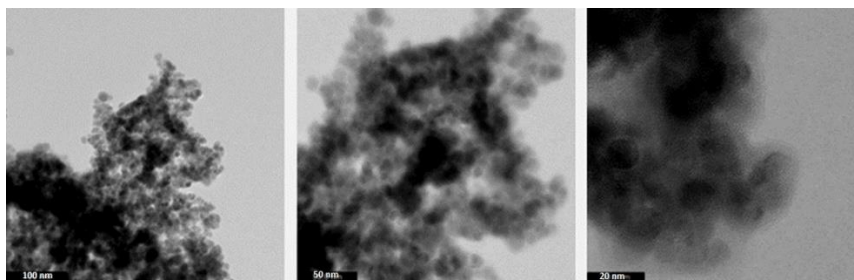


Figura 2.8 Imaginea TEM a MNP@cys, la bara de scalare de 100, 50 și respectiv 20 nm.

Structuri cristaline cvasi-sferice distincte au putut fi observate în imaginile TEM (Figura 2.8), cu diametrul mediu al particulelor de aproximativ 13 nm, analizate cu software-ul ImageJ (Figura 2.9).

Dimensiunea medie rezultată a fost similară cu cea obținută de Maleki și colab. (2017) unde dimensiunea nanoparticulelor vizualizate prin TEM variază între 20-40 nm.

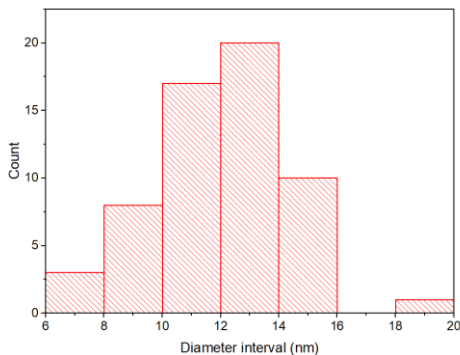


Figura 2.9 Histograma dimensiunilor nanoparticulelor magnetice învelite cu cisteamină, rezultată din investigația TEM.

Rezultatele investigației proprietăților magnetice pentru nanostructurile cys@MNP prezintă o buclă de histerezis îngustă (Figura 2.10).

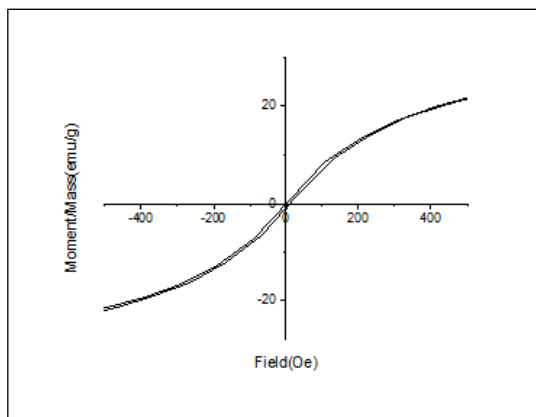


Figura 2.10 Detalii despre curba de magnetizare - bucla de histerezis pentru proba MNP@cys

Valoarea rezultată pentru câmpul coercitiv este de 6,56 Oe (0,52 kA/m), în timp ce pentru magnetizarea de saturație am obținut 42,128 emu/g.

Curba $M(H)$ este saturată pentru câmpul aplicat de 20 kOe sugerând un comportament dominant superparamagnetic care ar fi de așteptat pentru nanostructurile de magnetită relativ mici. Bucla de histerezis foarte îngustă este dată de particule mari foarte rare care prezintă un comportament ferimagnetic.

Cel mai mare diametru magnetic de aproximativ 12 nm a fost estimat din teoria lui Langevin (Gossuin et al., 2009).

2.4 Studiu experimental al nanostructurilor MNP acoperite cu acid galic

2.4.1 Metode experimentale

Sinteza nanoparticulelor magnetice s-a realizat conform protocolului Massart (Massart et al., 1981), unde co-precipitarea chimică a oxizilor de Fe^{2+} și Fe^{3+} a avut loc la temperatura de 80 °C, sinteza ferofazei fiind rezultatul reacțiilor precursorilor, care au fost clorura feroasă tetrahidrat ($FeCl_2 \times 4 H_2O$) și clorura ferică hexahidrat ($FeCl_3 \times 6 H_2O$) cu adăugarea unui agent alcalin precipitant puternic, NaOH 1,7 M (Popescu-Lipan și colab., 2022). Pentru stabilizarea nanoparticulelor magnetice, s-a folosit o soluție de acid galic cu o concentrație de 0,6 mM GA/g de magnetită (Szekeres et al., 2015) prin agitare mecanică timp de 3 ore la $T \sim 80$ °C. Ulterior au fost necesare spălări repetate cu apă ultrapură pentru a îndepărta impuritățile și precursorii nereacționați. Produsul final a fost suspensia apoasă de $Fe_3O_4@GA$.

2.4.2 Rezultate și discuții

Rezultatele investigației TEM pentru nanoparticulele de magnetită acoperite cu acid galic ($Fe_3O_4@GA$) sunt prezentate în Figura 2.11.

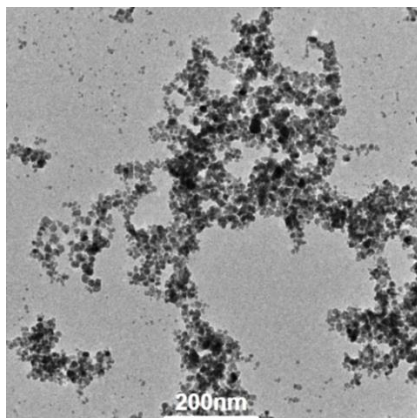


Figura 2.11 Imaginea TEM pentru $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{GA}$ scalată la 200 nm

Imaginile TEM (Figura 2.11) ale nanoparticulelor $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{GA}$ au arătat structuri geometrice regulate, de obicei cvasi-sferice. Valoarea medie a diametrului particulelor, a fost estimată cu software-ul ImageJ la valoarea de 13,23 nm (abatere standard de 3,66).

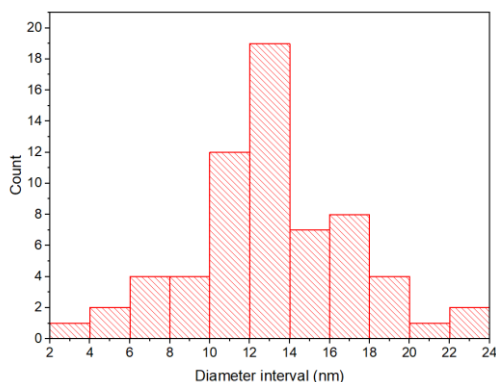


Figura 2.12 Histograma pentru distribuția dimensiunii nanoparticulelor $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{GA}$, așa cum este redată prin TEM.

În alte studii (Dorniani et al., 2014), s-a constatat că dimensiunea MNP-urilor acoperite cu acid galic este de până la 11 nm, iar alți autori (Eidi și colab., 2019) au raportat că GA-MNP-urile au fost dimensionate între 30 și 50 nm.

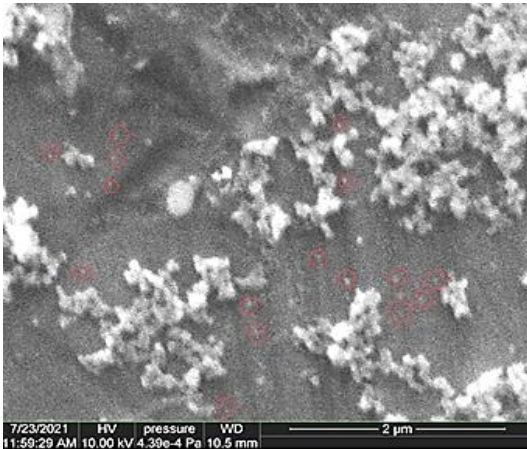


Figura 2.13
 Imagini SEM
 pentru
 nanostructurile
 $\text{Fe}_3\text{O}_4@GA$

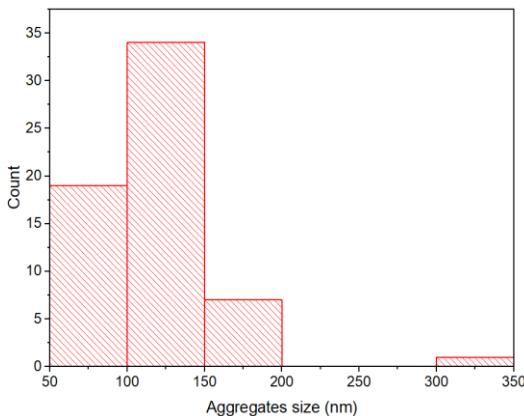


Figura 2.14
 Histograma
 distribuției
 dimensiunilor
 pentru GA@MNP, așa
 cum a rezultat prin
 analiza SEM

Imaginile SEM (Figura 2.13) au evidențiat particule rare mai mari și grupuri de particule de până la câteva sute de nanometri, precum și unele particule de zeci de nanometri, marcate în cercuri roșii. S-a constatat că diametrul mediu al particulelor evidențiate prin SEM este de aproximativ 124 nm (deviația standard de 37 nm) (Figura 2.14) și din acest motiv am luat în considerare posibilitatea ca o parte a nanomezilor magnetici să se poată aglomera în matricea de gelat de fier.

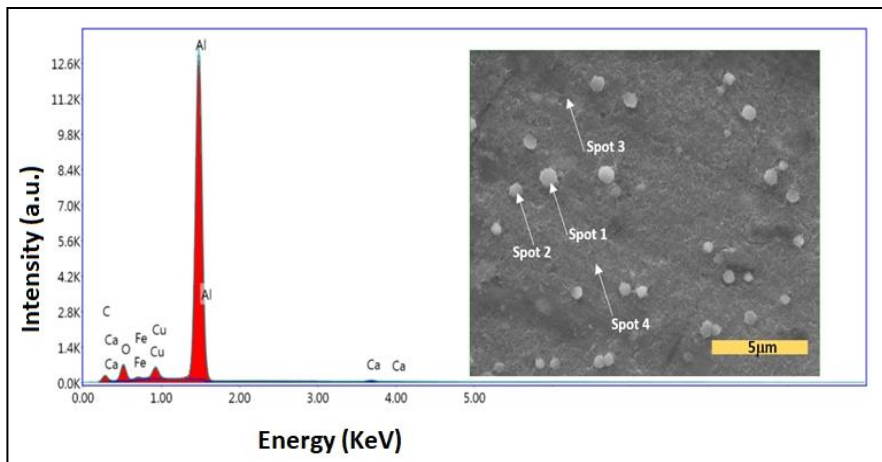


Figura 2.15 Analiza EDS pentru nanostructurile $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{GA}$

În plus, analiza elementală EDS a fost efectuată pe cele mai mari spoturi depuse din probă pe substratul de aluminiu, așa cum se poate vedea în Figura 2.15. Regiunile 1 și 2 corespund probei depuse, iar regiunile 3 și 4 aparțin substratului metalic, astfel că pe lângă aluminiul din substrat care are o pondere de 67 - 72 %, fierul are o abundență de aproximativ 1,2-1,6 % (zona „2”).

Unele urme de metal pot fi legate de probă sau de contaminanții substratului, iar procentajele de 13-15% carbon și 8-10% oxigen pot fi parțial provenite din componenta moleculară.

Rezultatele investigației XRD sunt descrise în Figura 2.16. Difractograma prezintă toate vârfurile caracteristice conform cardului ICSD pentru magnetită, nr. 98-015-8741, fără a indica impurități suplimentare.

Cel mai înalt vârf, corespunzător planului de cristalizare (311) a fost utilizat în estimarea mărimii cristalitelor prin formula Scherrer, rezultând un diametru de 15 nm.

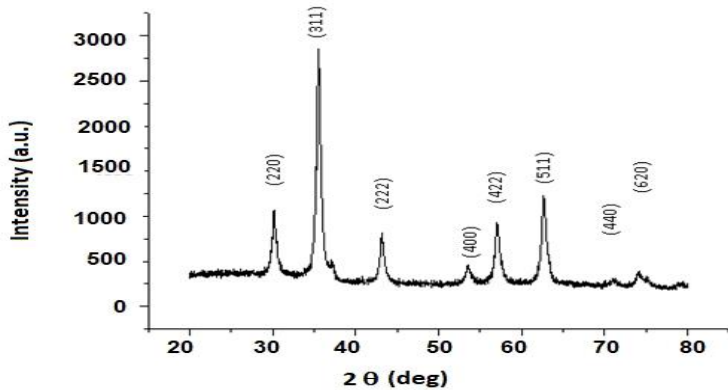


Figura 2.16 Difractograma obținută pentru nanostructurile $\text{Fe}_3\text{O}_4@GA$

Investigarea proprietăților magnetice ale suspensiei de nanoparticule magnetice preparate a condus la datele prezentate în Figura 2.17, prin intermediul curbei de magnetizare și a curbei de susceptibilitate magnetică.

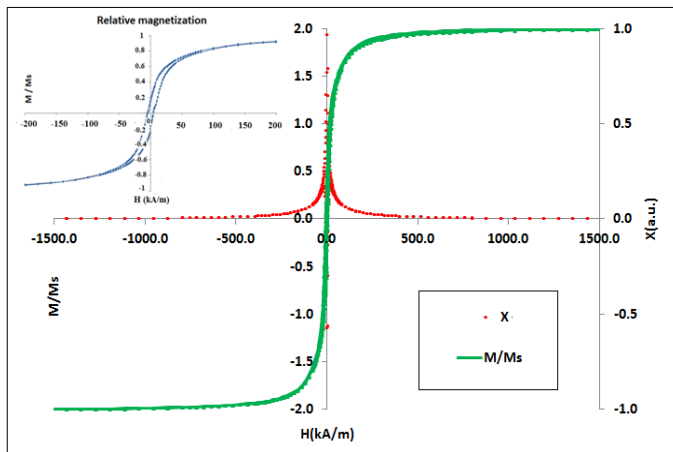


Figura 2.17 Curbele de magnetizare pentru proba $GA@MNP$

Curba de magnetizare relativă construită cu valorile lui M/M_s , (M_s fiind magnetizarea de saturație de aproximativ 16 kA/m), prezintă tendința de saturație pentru câmpul magnetic extern de 1500 kA/m și o

buclă subțire de histerzis așa cum poate fi observat în Figura 2.17. Acestea indică comportamentul superparamagnetic ca dominant în suspensia apoasă care conține MNP-urile acoperite cu acid galic, precum și anumite caracteristici feromagnetice datorită nanoparticulelor mai mari și agregatelor rare de nanoparticule. Câmpul coercitiv H_c de 4,7 kA/m și magnetizarea remanentă M_r de 2,63 kA/m au fost calculate pentru MNP acoperit cu cisteamină, precum și cea mai mare valoare D_M (diametrul magnetic) care a fost de aproximativ 11 nm.

Diametrul magnetic al particulei fiind mai mic decât valoarea medie a MNP învelite, furnizată de investigația TEM (aproximativ 13 nm), arată grosimea stratului molecular de acoperire, rezultat din legarea acidului galic cu fierul la suprafața nanoparticulelor de magnetită.

Figura 2.18 prezintă rezultatele analizei NTA: variația distribuției diametrului hidrodinamic sugerează predominanța în timp a diametrelor hidrodinamice mai mici, reprezentate de regiunile albastru închis asociate ultimei dintre cele cinci înregistrări consecutive, până la aproximativ 200 nm. În alte studii efectuate cu metodele DLS au fost găsite valorile diametrului hidrodinamic de $160,55 \pm 5,02$ nm (Nadim et al., 2015).

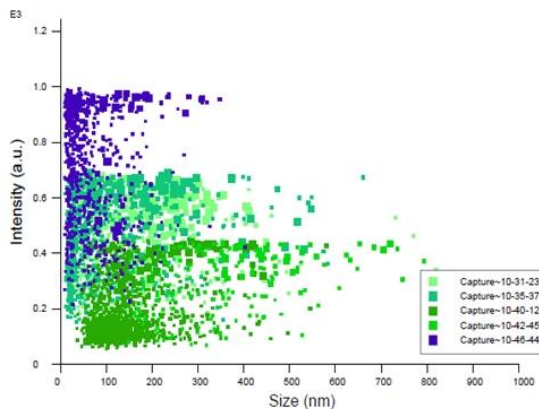


Figura 2.18 NTA arătând distribuția dimensiunilor hidrodinamice ale particulelor din suspensia magnetică

Studiul de nanotoxicitate a fost realizat (Figura 2.19) pentru a analiza conținutul de clorofilă *a*, clorofilă *b* și caroteni totali. În comparație cu

plantulele martor, efectul administrării de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{GA}$ a arătat valorile diminuate ale tuturor pigmentilor fotosintetizatori.

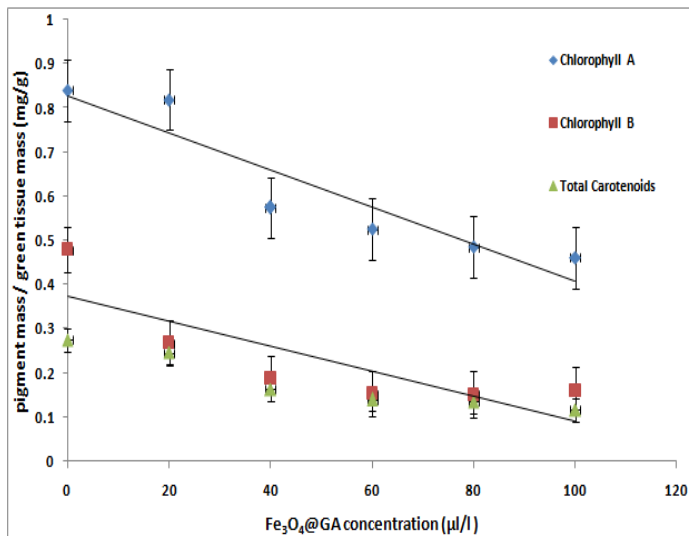


Figura 2.19 Conținutul de pigment. Clorofila *a*: $y=-0,004x+0,828$, $R^2=0,869$; Clorofila *b*: $y=-0,001x+0,261$, $R^2=0,883$; (R^2 - coeficient de corelație liniară), abaterea standard fiind de aproximativ 9,5%

Cu toate acestea, nu a putut fi evidențiată nicio influență semnificativă asupra complexului enzimatic LHC II (Light Harvesting Complex II), care guvernează procesele de fotosinteză (date neprezentate), deoarece raportul conținuturilor de clorofilă a rămas nemodificat (așa cum menționează și Racuciu și colab., 2017).

Testul de nanotoxicitate poate fi interpretat având în vedere satisfacerea necesarului de fier pentru biosinteza anumitor proteine în plantule, cum ar fi enzimele care conțin fier - citocromii și, de asemenea, pentru reacțiile redox din membranele mitocondriale. Chiar dacă potențialul catalitic al fierului asupra moleculelor de apă poate genera ROS, totuși, capacitatea de protecție a moleculei antioxidante de acid galic este dată de nanoparticulele magnetice. Creșterea eficienței aparente a fotosintezei pare să susțină ideea de dominare a efectelor pozitive ale aprovizionării

plantelor cu fier necesar sintezei enzimelor și cu acțiunea protectoare a acidului galic care ar putea compensa producția de ROS toxice.

2.5. Studiul interacțiunilor intermoleculare ale moleculei antioxidante a acidului galic în soluții binare și ternare

2.5.1. Introducere

În ultimii ani, GA a fost examinat ca potențial strat de acoperire pentru stabilizarea nanoparticulelor magnetice, vizând aplicațiile lor în științele vieții, ca urmare a îmbunătățirii biocompatibilității datorită proprietăților acidului galic (Shah și colab., 2017). Scopul nostru a fost să studiem structura și proprietățile acidului galic, cu accent pe interacțiunile sale intermoleculare cu apa și alți solvenți, pentru a descrie mai bine stabilizarea MNP în mediu apos (Les și colab., 2022).

2.5.2 Materiale și metode

Abordarea teoretică a chimiei cuantice a fost aplicată în studiul moleculei GA în stare izolată și în stare hidratată, prin utilizarea teoriei funcționale a densității, metoda B3-LYP/6-31G (Badhani și colab., 2015) sub software-ul Spartan 18 (Hassan, 2016) ce au fost descrise în capitolul anterior.

Momentul de dipol al moleculei în starea fundamentală și raza moleculei sunt utilizate în continuare pentru a estima momentul de dipol al stării excitate a moleculei.

Abordarea experimentală a fost realizată prin intermediul spectrelor electronice de absorbție a soluțiilor GA în diferiți solvenți puri (toți achiziționați de la SIGMA) și solvenți binari, care au fost înregistrate cu dispozitivul Shimadzu PharmaSpec UV 1700 în celule de cuarț de 1 cm.

2.5.3 Rezultatele investigației experimentale solvatocromice ale interacțiunilor intermoleculare ale acidului galic cu solvenți puri

Abordarea experimentală a interacțiunii intermoleculare a acidului galic cu solvenți puri (în soluții binare) a fost realizată folosind

modelul solvatocromic al influenței solventului asupra moleculei de solut propus de modelul Lippert-Mataga (Lippert, 1955), precum și de modelul lui Bakhshiev adaptat (Bakhşiev, 1962).

În acest mod, am putea analiza influența parametrilor macroscopici al solventului asupra poziției maximelor benzii de absorbție electronică a acidului galic (EAB - electronic absorption band) în domeniul UV-Vis. (ecuația 2.1)

$$\bar{\nu} = \frac{2(f_{LM}(\epsilon) - f_{LM}(n))}{4\pi\epsilon_0\bar{\mu}ca^3} (\mu_g - \mu_e)^2 + const \quad (\text{ec. 2.1})$$

unde ν este numărul de undă din maximul EAB al moleculei studiate în soluție iar termenul constant („const.”) poate fi considerat ca fiind corespunzător cu ν_0 , numărul de undă din maximul EAB pentru molecula izolată.

Notațiile μ_g și μ_e reprezintă momentele electrice de dipol ale moleculei de dizolvat în starea fundamentală și, respectiv, starea sa excitată, h fiind constanta lui Planck, c indicând viteza luminii care se propagă în spațiul liber, în timp ce a este raza moleculei de solut.

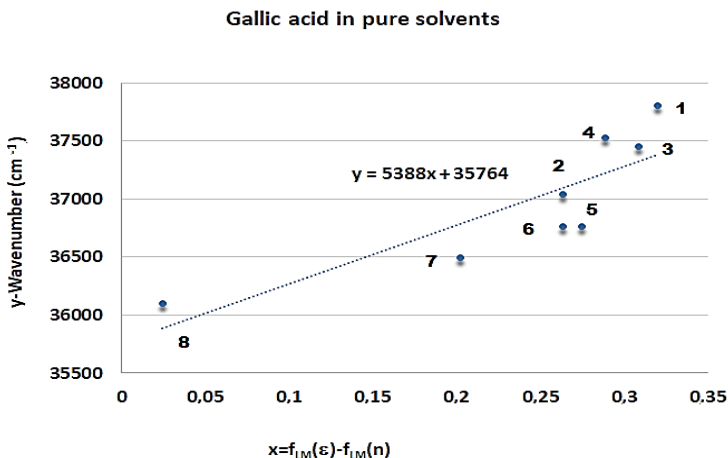


Figura 2.20 Numărul de undă al EAB obținut experimental în funcție de parametrii macroscopici ai solventilor puri

În figura 2.20, putem observa că în soluțiile diluate (10^{-4} M), numărul de undă în maximul EAB, $\bar{\nu}$, tinde să crească progresiv la creșterea funcției combinate f_{LM} (care conține ambii parametrii macroscopici electro-optici ai solventului ε - constanta dielectrică și n - indicele de refracție). Acest lucru a arătat dominanța interacțiunilor intermoleculare universale de orientare -inducție (redate de funcția $f_{LM}(\varepsilon)$), precum și a interacțiunilor universale de dispersie-polarizare solut-solvent (exprimată prin $f_{LM}(n)$).

Lucrând cu valoarea pantei drepte de aproximare liniară statistică, $\nu = F(f_{LM})$ (echivalentă cu $y = F(x)$ în Figura 2.20), precum și cu momentul de dipol al stării fundamentale și cu raza moleculei rezultate din abordarea quantum chimică, a fost dedus momentul de dipol al stării excitate μ_e .

2.5.4 Rezultatele studiului solvatocromic al interacțiunilor intermoleculare ale acidului galic în solvenți binari (în soluții apoase ternare)

În scopul investigării interacțiunilor moleculei de acid galic cu solvenții binari, am folosit o serie de soluții binare apoase, compuse din apă și etanol, care sunt solvenți miscibili, capabili să dizolve acidul galic în concentrație de aproximativ 10^{-4} M și, de asemenea, important pentru observarea benzilor acidului galic în domeniul UV, solvenții binari respectivi sunt transparenți în domeniul UV.

Solvenții binari au fost preparați în următoarele fracții volumice 0-10-20-30-40-50-60-70-80-90-100% (etanol în apă). Studiul comportamentului molecular în apă cu etanol ar putea fi destul de relevant pentru soarta GA în corpul uman. Funcțiile $f(\varepsilon_{1,2})$ și $f(n_{1,2})$ avansate de McRae (McRae, 1957) și Bakhshiev (Bakhshiev, 1972) au fost estimate pentru solvenții binari etanol-în-apă utilizând cei doi parametri macroscopici electro-optici, $n_{1,2}$ și $\varepsilon_{1,2}$, indicele 1 indicând etanolul și indicele 2 indicând apa; $\varepsilon_{1,2}$ a fost dedus din relația (2.32) (Bentley, 2004):

$$\varepsilon_{1,2} = x_1 \varepsilon_1 + x_2 \varepsilon_2 \quad (2.32)$$

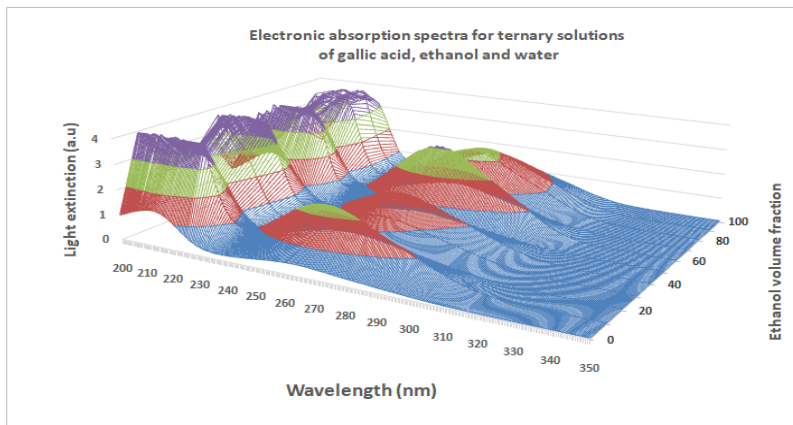


Figura 2.21 EAB pentru acidul galic dizolvat în soluții ternare (cu solvenți binari, etanol în apă)

Indicele de refracție $n_{1,2}$ a fost măsurat experimental cu un refractometru de tip Abbe (x_1 și x_2 reprezintă fracțiile procentuale volumice de etanol și apă). Dependența liniară a maximelor EAB de parametrii solvenților prin funcțiile propuse de Bakhşiev, $f(n) = (n_2 - 1)/(n_2 + 2)$ și $f(\varepsilon) = (\varepsilon - 1)/(\varepsilon + 2)$, unde $\varepsilon_{1,2}$ și $n_{1,2}$ sunt date pentru solvenții binari, a fost evidențiată în graficele următoare, evidențind astfel prezența ambelor tipuri principale de interacțiuni intermoleculare universale (orientare-inducție și dispersie -polarizare).

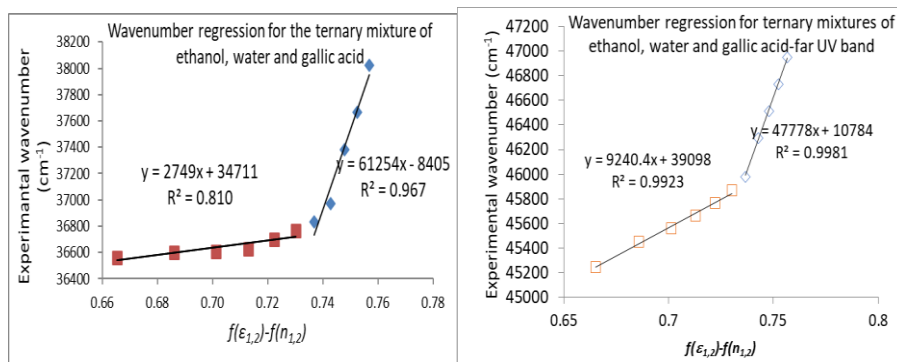


Figura 2.22 Numerele de undă ale EABs în UV (partea stângă) și UV îndepărtat (partea dreaptă) ale GA în soluții binare de etanol în apă

Au fost observate valori crescute ale pantei drepte de aproximare statistică pentru fracția volumică de etanol de peste 50%. Putem spune că în solvenții micști, binari, are loc împachetarea progresivă a moleculei de solut cu etanol în primul volum sferic din jurul acesteia, ceea ce a afectat mai mult tranziția spectrală care stă la baza EAB din domeniul UV îndepărtat.

Interesul practic în studiul soluțiilor ternare cu solvenți binari apă-etanol ar putea fi de ajutor în înțelegerea posibilei modificări a proprietăților acidului galic în cazul consumului de alcool.

CAPITOLUL 3

NANOPARTICULE DE ARGINT FITOSINTETIZATE CU EXTRACT DE PĂDUCEL CU IRADIARE UV-C

3.1. Introducere

În acest studiu ne-am propus să descriem o nouă metodă de sinteză verde, îmbunătățită prin iradiere UV-C în care un extract etanolic din *Crataegi fructus* a fost folosit pentru a obține nanoparticule de argint.

Parametrii fizici și structurali determinați pentru aceste nanostructuri au fost corelați cu testul de nanotoxicitate al acestei suspensii coloidale care a fost efectuat pe vegetație.

3.2 Materiale și tehnici

Procedură. Din 3, 4, respectiv 5 g de fructe uscate de păducel s-au preparat trei soluții de etanol (40%) de extract de fructe de păducel (genul *Crataegus*, familia Rosaceae). După filtrare, trei soluții de 50 ml AgNO₃ (1mM) fiecare, au fost amestecate cu 35 ml de extracte de păducel timp de 0,5 ore la 65°C și sinteza a continuat sub iradiere UV-C.

Dispozitive. Spectrofotometrul UV-Vis Shimadzu tip PharmaSpec 1600 prevăzut cu celulă de cuarț de 1 cm lățime și software dedicat pentru înregistrarea și analiza datelor experimentale a fost utilizat pentru investigarea spectrală în domeniul UV-Vis. Lampa bactericidă UV (Philips) cu puterea sursei de iradiere de 12 W în domeniul UV-C a fost utilizată pentru iradierea probei. Difractometrul Shimadzu LabX XRD6000 (radiație Cu-K α , $\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$) a fost utilizat pentru investigarea cristalinității. Imaginile Dark Field au fost realizate cu un microscop optic (Optika B-383DK) având puterea LED-ului de 3,6 W, prevăzut cu camera video și soft specializat pentru captarea imaginii și măsurători. Investigația DLS (Dynamic Light Scattering) a fost efectuată cu ajutorul analizorului DelsaNano C prevăzut cu un autotitrator DelsaNanoAT.

3.3. Rezultate și discuții

Spectrele de absorbție ale soluțiilor de extracte de păducel sunt prezentate în Figura 3.1, banda de extincție la $\sim 280 \text{ nm}$ fiind atribuită unor compuși flavonoizi, în concordanță cu Kurkina și colab. (2015).

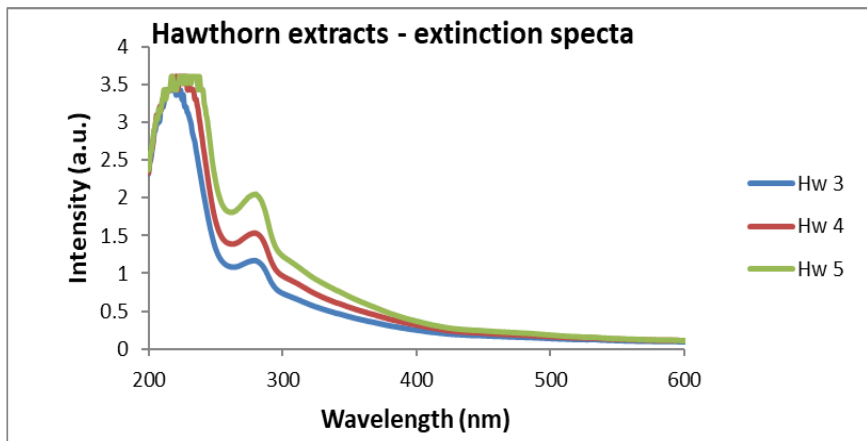


Figura 3.1 Spectre de absorbție UV-Vis care prezintă benzi caracteristice pentru extractele etanolice de păducel

În plus, spectrele pentru amestecurile dintre soluțiile de AgNO_3 și soluțiile de extract de păducel (după amestecare de 2 ore) au evidențiat că durata reacției îmbunătățește eficiența de sinteză a AgNP-urilor (Figura 3.2), cu banda plasmonică poziționată la 430 nm, în concordanță cu Mohanta și colab. (2017).

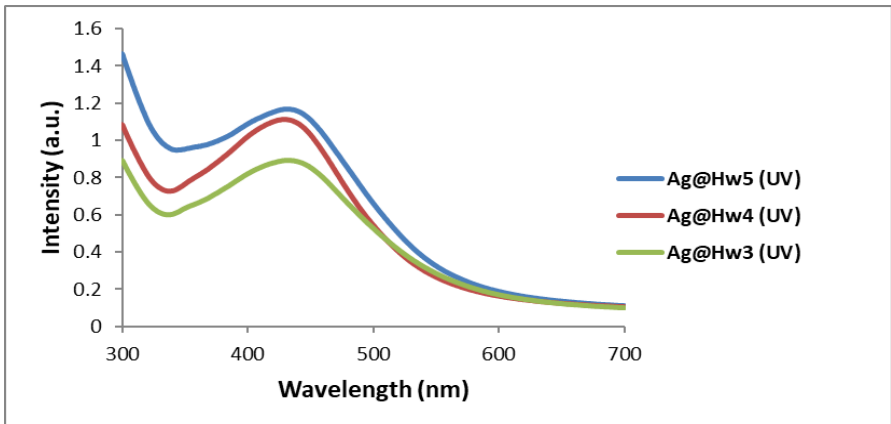


Figura 3.2 Spectrele UV-Vis ale probelor de nanoparticule de Ag, după 2 ore de expunere UV-C.

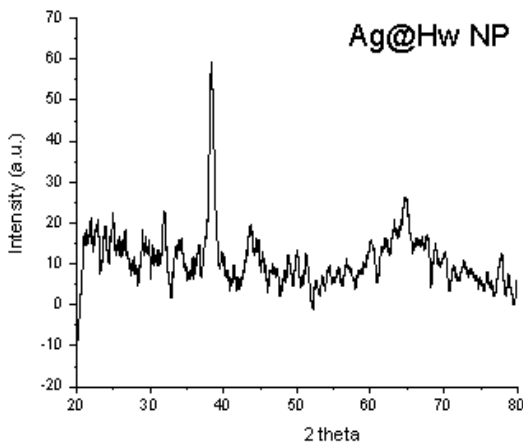


Figura 3.3 Difractograma pentru AgNPs sintetizate prin reducere cu extract de păducel.

Diagrama XRD a nanoparticulelor de argint a evidențiat, de asemenea, vârfurile caracteristice (Figura 3.3), similar cu AgNP-urile reduse cu citrat (Kamyar et al., 2012).

Nanoparticulele distribuite uniform (imagini de microscopie în câmp întunecat), cu diametrul mediu de 33 nm, arată modul în care polifenolii și flavonoizii participanți la sinteză pot acționa ca agenți de stabilizare care pot acoperi parțial suprafața nanoparticulelor și pot împiedica aglomerarea (Figura 3.4 și Figura 3.5).

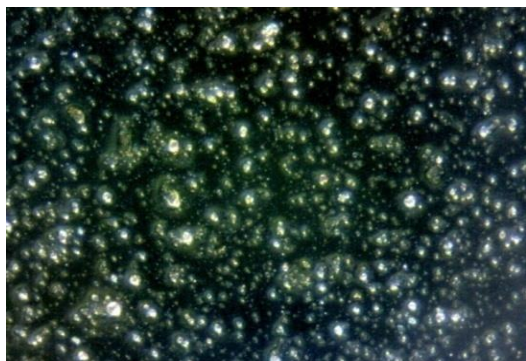


Figura 3.4 Imagine microscopică în câmp întunecat (10×) cu plasmoni generați de nanoparticule de argint reduse cu extract de păducel după expunerea la UV-C.

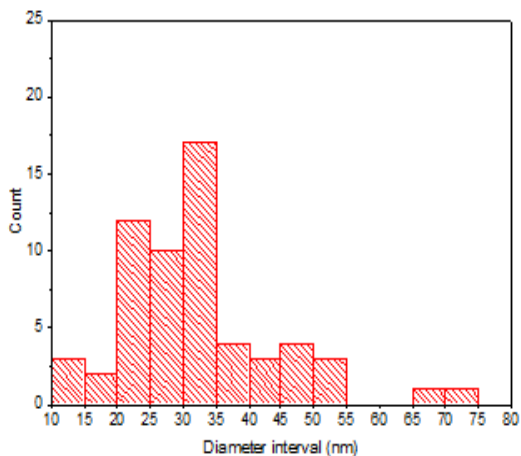


Figura 3.5 Histograma diametrelor pentru AgNP reduse cu extract de păducel.

Diametrul hidrodinamic mediu proba AgNP@Hw5 obținut prin analiza Dynamic Light Scattering (DLS) (Figura 3.6) a fost de 546,1 nm (abatere standard de 186,1 și indice de polidispersitate de 1,091).

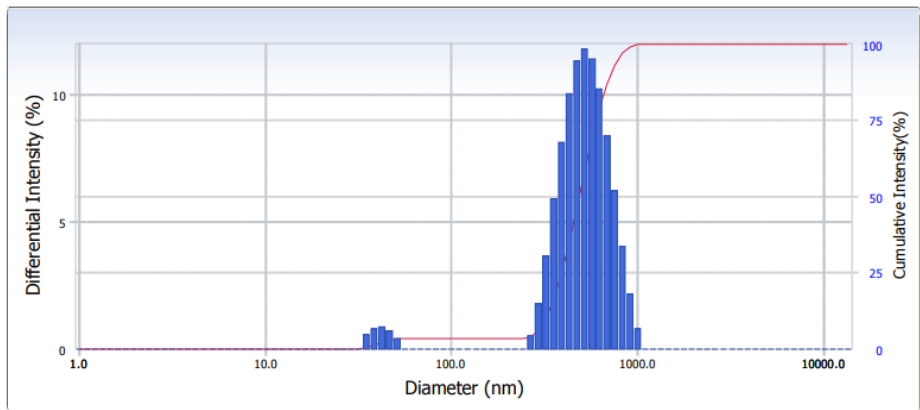


Figura 3.6 Frecvența mărimii nanoparticulelor în analiza dinamică a împrăstierii luminii

Pentru a obține sarcina electrică înregistrată la suprafața nanoparticulelor, s-a efectuat analiza potențialului Zeta (ZP), rezultând o valoare de -22,35 mV (demonstrând ca particulele sunt stabile, conform cu Clogston et al., (2011) – Figura 3.7).

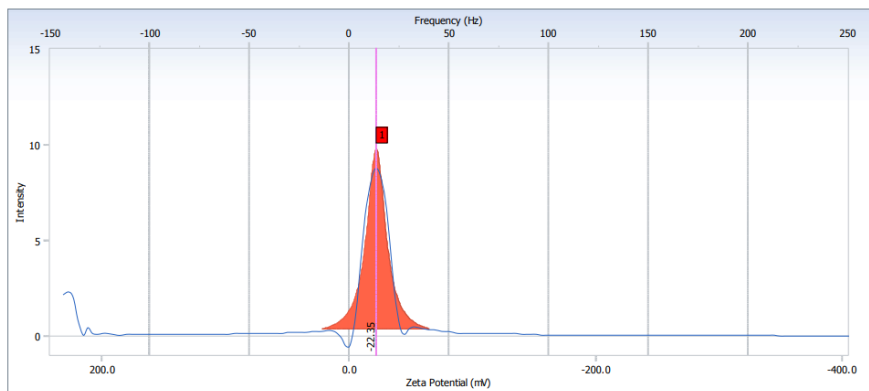


Figura 3.7 Potențial zeta pentru AgNPs (analiza DLS)

Testul de nanotoxicitate pentru AgNPs sintetizate cu extract de păducel a fost efectuat pe pepene galben (*Cucumis melo*, din familia *Cucurbitaceae*) (Figura 3.8), prin administrarea zilnică a patru diluții diferite (1:3, 1:5, 1:8 și 1:10) semințelor germinate. După 7 zile, clorofilele și carotenii au fost extrași din plantule și analizați.

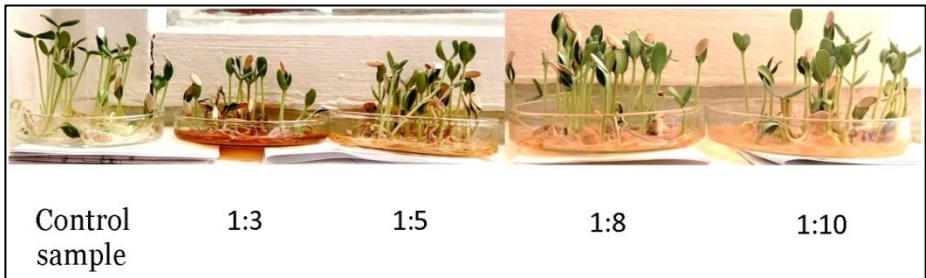


Figura 3.8 Plantulele de pepene galben crescute în timpul tratamentului cu AgNP

Parametrii fizici ai plantulelor au suferit modificări după cum rezultă din studiul morfologic, ducând la inhibarea creșterii după administrarea suspensiilor de AgNP (Figura 3.9). Astfel, lungimea plantulelor la o săptămână de tratament a scăzut cu până la 32% în comparație cu martorul.

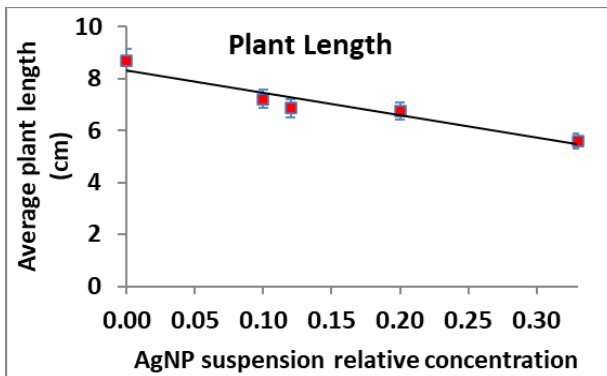


Figura 3.9 Răspunsul lungimii plantulelor la aportul de suspensie AgNP.

S-a înregistrat o scădere și pentru valoarea raportului conținuturilor de clorofile în urma administrării suspensiilor mai concentrate de AgNP, reducerea maximă fiind de până la 33 % (Figura 3.10).

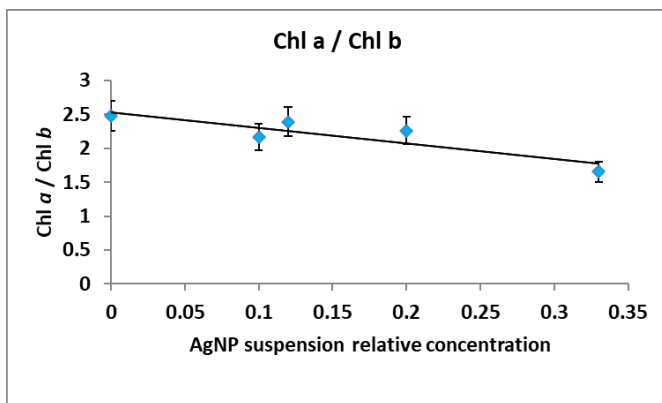


Figura 3.10
Raportul clorofilelor ca răspuns la aportul de suspensie de AgNP.

De asemenea, am constatat că conținutul total de caroteni a fost stimulat de aportul de nanoparticule de argint, până la de două ori în toate probele (datele nu sunt prezentate).

Diminuarea conținutului clorofilei *a* (datele nu sunt prezentate) poate fi atribuită răspunsului plantei la stres după aportul de AgNP. Se știe că dacă echilibrul conținutului de apă din celulă este perturbat, canalele membranare, Aquaporinele, manifestă o activitate restrânsă (Niemietz și colab., 2002). Mai mult, activitatea sistemului fotosintetizator II (PSII) poate fi perturbată și se poate remarca o reglare progresivă a clorofilei *a*. În schimb, conținutul de caroteni este crescut ca mecanism de apărare împotriva ruperii membranei cloroplastice. Ar putea fi interesant de menționat că, conform lui Falco și colab., (2013), la interacțiunea nanoparticulelor metalice plasmonice cu moleculele de clorofilă are loc un schimb de energie în favoarea particulelor plasmonice – ceea ce sugerează indirect că moleculele de clorofilă au o absorbție mai mică în domeniul radiațiilor vizibile, ceea ce ar putea fi legat de conținutul de pigment diminuat.

CONCLUZII

În această teză, am realizat studiul radiațiilor de tip fascicul de protoni și al nanoparticulelor metalice pentru aplicații în științele vieții.

Am găsit în principal modificări citogenetice remarcabile, în special aberații cromozomiale detectate prin microscopie optică, pentru dozele de radiații de zeci de Gy. Modificările cromozomiale pot fi exprimate cantitativ prin intermediul indicelui mitotic și al indicelui aberațiilor. Curba liniară doză-răspuns a fost accentuată pentru indicele aberațiilor, care a crescut de peste zece ori în comparație cu proba martor neiradiată. Eliberarea speciilor de ROS, ca urmare a radiolizei apei în celulele semințelor, ar putea dăuna biomoleculilor, în special ADN-ului, ceea ce ar putea explica aberațiile cromozomiale care în cele din urmă duc la deteriorarea biosintezei enzimatică.

Studiul unor nanoparticule metalice cu aplicații în științele vieții s-a concentrat mai întâi pe nanoparticulele magnetice biocompatibile și stabilizate sub formă de suspensie coloidală cu molecule speciale de acoperire, una radioprotectoare – cisteamina și o moleculă antioxidantă – acidul galic.

Studiul computațional efectuat cu metoda DFT a evidențiat caracterul dipolar (momente dipolare de aproximativ 2,4 D și 2,2 D) al ambelor structuri care ar putea interacționa cu suprafața nanoparticulelor de magnetită, precum și cu mediul apos din jur.

Am putea concluziona că metodele de calcul utilizate în chimia cuantică ar putea sugera legarea dintre molecula de acid galic și fierul de la suprafața nanoparticulelor magnetice, conducând astfel la un moment de dipol crescut, ceea ce evidențiază posibilă interacțiune ridicată a acestuia cu apa dipolară din jur, precum și adecvarea în aplicații biomedicale.

S-a studiat comportamentul solvatocromic al acidului galic în soluții binare și ternare și a putut fi estimat momentul de dipolul în stare excitată.

Pentru ambele tipuri de probe diametrul fizic, determinat prin investigațiile TEM, diametrul miezului magnetic rezultat în urma analizei VSM și diametrul hidrodinamic în suspensie coloidală au fost găsite în acord cu alte studii de literatură ceea ce recomandă nanoparticulele magnetice studiate aici pentru aplicații în științele vieții.

Nanotoxicitatea indusă la plantele tinere de pepene galben a fost studiată la nivelul pigmentilor fotosintetizatori relevând scăderea atât a conținutului de clorofilă *a* cât și de clorofilă *b* de aproximativ două ori, dar modificări nesemnificative ale raportului conținuturilor de clorofilă – astfel am putea spune că eficacitatea fotosintezei nu este aproape deloc perturbată.

În cele din urmă, din studiul nanoparticulelor de argint obținute prin sinteza fitochimică cu extract de fructe de păducel, mediată prin expunerea la UC-V, a rezultat că proprietățile lor fizice convenabile le recomandă pentru utilizare în aplicații în științele vieții (diametru mediu de 33 nm, potențial Zeta caracteristic pentru produsele stabile), așa cum este evidențiat în imagini optice în câmp întunecat și analize DLS. Experimentul de nanotoxicitate efectuat pe plantule de pepene galben a arătat modul cum a influențat aportul de nanoparticule pigmentii fotosintetizatori, indicând creșterea conținutului de clorofilă *b* și a conținutului total de caroteni, precum și scăderea conținutului de clorofilă *a* și a raportului conținuturilor de clorofile.

Rezultatele cercetării au fost publicate în reviste clasate ISI precum *Soft Materials*, *Plants*, *Molecular Crystals* și *Liquid Crystals* fiind comunicate și la conferințe internaționale din România și din străinătate.

LISTA PUBLICAȚIILOR

1. **Anda Les**, Larisa Popescu, Dorina Creanga, Dana-OrtansaDorohoi, and Liviu Sacarescu. "Study of gallic acid antioxidant molecule in interaction with solvents, aiming its utilization as a stabilizer of magnetic nanoparticles in suspensions." *Molecular Crystals and Liquid Crystals* **2022**, 1-12. (AIS 0.098)

2. Popescu-Lipan, Larisa, **Anda Les**, Marian Grigoras, Gabriel Ababei, Iuliana Motrescu, Georgiana Bulai, Florin Brinza, Dorina Creanga, and Maria Balasoiu. "Antioxidant molecule useful in the stabilization of nanoparticles in water suspension." *Soft Materials* **2022**, 20, S76-S90. (AIS 0.233)

3. Oprica, Lacramioara, Gabriela Vochita, Marius-Nicușor Grigore, Sergey Shvidkiy, Alexander Molokanov, Daniela Gherghel, **Anda Les**, and Dorina Creanga. "Cytogenetic and Biochemical Responses of Wheat Seeds to Proton Irradiation at the Bragg Peak." *Plants* **2023**, 12(4), 842. (AIS 0.621)

Anda Les, Dorina Creanga, Lacramioara Oprica, Gabriela Vochita, Daniela Pricop, Daniel Herea, and Elena Laura Ursu, UV-C Mediated Phytosynthesis of Silver Nanoparticles Using Hawthorn Extract – submitted at Plants-Basel (AIS 0.621)

AIS TOTAL: 1.573

PUBLICAȚII ÎN DOMENII CONEXE:

1. Andreea Fânaru, **Anda Les**, Dorina Creanga, Dana-Ortansa Dorohoi, and Liviu Sacarescu. "Magnetic nanoparticles interactions with wastewater pollutants." *Molecular Crystals and Liquid Crystals* 749, no. 1 (2022): 93-106. (AIS 0.098)

2. **Anda Les**, Helmina Ardeleanu, Marian Grigoras, Iuliana Motrescu, Dorina Creanga, and Daniela Pricop. "Quantum-Chemical and Experimental Study on the Interactions between the Magnetic Core and the Molecular Shell of Cobalt Ferrite Nanoparticles in Aqueous Suspensions". *Analytical Letters*, (2023):1-14. (AIS 0.239)

PARTICIPATION TO INTERNATIONAL SCIENTIFIC CONFERENCES:

- Larisa Popescu-Lipan, **Anda Les**, Marian Domocos, Gabriel Ababei, Florin Brinza, Dorina Creanga and Maria Bălășoiu, Antioxidant molecule useful in the stabilization of nanoparticles in water suspension, 4th International Summer School and Workshop "Complex and Magnetic Soft Matter Systems: Physico-Mechanical Properties and Structure", Timisoara, Romania, 19 - 22 Aprilie 2021, poster
- **Anda Les**, Larisa Popescu, Dorina Creanga, Dana-Ortansa Dorohoi, and Liviu Sacarescu, Study of gallic acid antioxidant molecule in interaction with solvents, aiming its utilization as stabilizer of magnetic nanoparticles in suspensions, XXV Galyna Puchkovska International School Seminar "Spectroscopy of Molecules and Crystals", Kiev, Ucraina, 21-24 septembrie 2021, poster
- Andreea Fanaru, Larisa Popescu, **Anda Les**, Dorina Creanga, Dana-Ortansa Dorohoi and Liviu Sacarescu, Magnetic nanoparticles interactions with waste water pollutants, XXV Galyna Puchkovska International School Seminar "Spectroscopy of Molecules and Crystals", Kiev, Ucraina, 21-24 septembrie 2021, poster
- Eliza Olteanu, Daniela A. Pricop, **Anda Les**, Modification of the plasmonic properties of AuNPs photoactivated and stabilized in lipid-chitosan; preliminary data, 4th Autumn School on Physics of Advanced Materials (PAMS in cadrul ICPAM), Sant Feliu de Guixols, Spain, 24-30 septembrie, 2021, poster
- **Les Anda**, Vacariu Anamaria, Motrescu Iuliana, Bulai Georgiana, Creanga Dorina and Oprica Lacramioara, Preliminary results on biological synthesis of silver nanoparticles, 13th International Conference on Physics of Advanced Materials, (PAMS in cadrul ICPAM) Sant Feliu de Guixols, Spain, 24-30 septembrie, 2021, **oral** presentation
- **Anda Les**, Alexander Molokanov, Shvidkiy Sergey and Dorina Creanga, The proton beam influence on the sensitivity of wheat

plantlets to AgNP pollution – preliminary results, inter-Academia, Gomel, Belarus, 20-22 octombrie, 2021, poster

- Helmina Ardeleanu, **Anda Les**, Nicoleta Melniciuc, Marian Grigorasand Dorina Creanga, Cobalt doped magnetite nanoparticlesandtheirpotentialtoxicity in theenvironment, TIM 20-21, Timișoara, Romania, 11-13 noiembrie, 2021, **oral**
- **Anda Les**, Helmina Ardeleanu, Nicoleta Melniciuc Puica, Iuliana Motrescu ad Dorina Creanga, Quantum-chemicaland experimental study on the interactions between the magnetic core and the molecular shell of iron oxide nanoparticles in aqueous suspensions for biomedical applications, IC-ANMBES 2022, Brasov, Romania, **oral**
- **Anda Les**, Dorina-Emilia Creangaand Iuliana Motrescu, Computationaland experimental study of cysteamine capped magnetite nanoparticles (MNP@cys) stability in aqueous suspension, ICPAM-14, Dubrovnik, Croatia, 2022

PARTICIPATION TO NATIONAL SCIENTIFFIC CONFENRENCES:

- Theoretical and Experimental Study of Gold Nanoparticles Stabilized in Cysteamine for Biomedical Applications. **Anda Leș**, Daniela Pricop, Dorina Emilia Creangă, FTEM (Physics and Modern Education Technologies), 2023 (**oral** presentation)
- Study of the metallic particle nanotoxicity in the environmental vegetation. LorenaȘandor, Daniela Pricop, Dorina Creanga, and **Anda Les**, poster presentation FTEM 2023
- Experimental study on the UV radiation effect in young plantlets. Crainiciuc Alexandra, Oprica Lacramioara, Vochita Gabriela, **Les Anda** and Creanga Dorina, poster presentation FTEM 2023

SELECȚIE DE REFERINȚE:

- Abou-Zeid, H.M.; Abdel-Latif, S.A. Effects of gamma irradiation on biochemical and antioxidant defense system in wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings. *Int. J. Adv. Res.* **2014**, *2*, 287–300
- Ahumada-Flores, S.; Briceño-Zamora, M.F.; García-Montoya, J.A.; López-Cázarez, C.; Pereo-Galvez, A.E.; Parra-Cota, F.I.; de los Santos-Villalobos, S. Gamma radiosensitivity study on wheat (*Triticum turgidum* ssp. durum). *Open Agric.* **2020**, *5*, 558–562
- Arena, C.; De Micco, V.; Aronne, G.; Pugliese, M.; Virzo De Santo, A.; De Maio, A. Response of Phaseolus vulgaris L. plants to low-let ionizing radiation: Growth and oxidative stress. *Acta Astronaut.* **2013**, *91*, 107–114
- Azzam, E.I.; Jay-Gerin, J.-P.; Pain, D. Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury. *Cancer Lett.* **2012**, *327*, 48–60
- Bettega, D.; Dubini, S.; Conti, A.M.F.; Pelucchi, T.; Tallone Lombardi, L. Chromosome aberrations induced by protons up to 31 MeV in cultured human cells. *Radiat. Environ. Biophys.* **1981**, *19*, 91–100
- Bonciu, E.; Firbas, P.; Fontanetti, C.S.; Wusheng, J.; Karaismailoglu, M.C.; Liu, D.; Menicucci, F.; Pesnya, D.S.; Popescu, A.; Romanovsky, A.V.; et al. An evaluation for the standardization of the Allium cepa test as cytotoxicity and genotoxicity assay. *Caryologia* **2018**, *71*, 191–209
- Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248–254
- Cheignon, C.; Tomas, M.; Bonnefont-Rousselot, D.; Faller, P.; Hureau, C.; Collin, F. Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer's disease. *Redox Biol.* **2018**, *14*, 450–464
- Cramer, G.R.; Urano, K.; Delrot, S.; Pezzotti, M.; Shinozaki, K. Effects of abiotic stress on plants: A systems biology perspective. *BMC Plant Biol.* **2011**, *11*, 163
- Einor, D.; Bonisoli-Alquati, A.; Costantini, D.; Mousseau, T.A.; Moller, A.P. Ionizing radiation, antioxidant response and oxidative damage: A meta-analysis. *Sci. Total Environ.* **2016**, *548–549*, 463–471
- Falco, W.F.; Botero, E.R.; Falcão, E.A.; Santiago, E.F.; Bagnato, V.S.; Caires, A.R.L. In vivo observation of chlorophyll fluorescence quenching induced by gold nanoparticles. *J. Photochem. Photobiol. A*: **2011**, *225*(1), 65–71
- Gamborg, O.L.; Wetter, L.R. Plant Tissue Culture Methods; National Research Council of Canada, Prairie Regional Laboratory: Saskatoon, SK, Canada, **1975**

Georgiou, C.D.; Zisimopoulos, D.; Kalaitzopoulou, E.; Quinn, R.C. Radiation-driven formation of reactive oxygen species in oxychlorine-containing Mars surface analogues. *Astrobiology* **2017**, *17*, 319–336

Goodhead, D.T. Mechanisms for the Biological Effectiveness of High-LET Radiations. *J. Radiat. Res.* **1999**, *40*, 546

Hall, E.J.; Giaccia, A.J. Radiobiology for the Radiologist, 6th ed.; Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, PA, USA, **2006**

Hodges, D.M.; Delong, J.M.; Forney, C.F.; Prange, R.K. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta* **1999**, *207*, 604–611

Horendeck, D.; Walsh, K.D.; Hirakawa, H.; Fujimori, A.; Kitamura, H.; Kato, T.A. High LET-Like Radiation Tracks at the Distal Side of Accelerated Proton Bragg Peak. *Front. Oncol.* **2021**, *11*, 690042

Huang, C.J.; Wei, G.; Jie, Y.C.; Xu, J.J.; Zhao, S.Y.; Wang, L.C.; Anjum, S.A. Responses of gas exchange, chlorophyll synthesis and ROS-scavenging systems to salinity stress in two ramies (*Boehmeria nivea* L.) cultivars. *Photosynthetica* **2015**, *53*, 455–463

Huang, P.; Jia, D.; Yuan, Z.; Mei, S.; Ye, Y. Physiological responses of exotic weeds *Gaura parviflora* to drought stress. *J. Northeast Agric. Univ.* **2011**, *42*, 102–106

Im, J.; Kim, W.J.; Kim, S.H.; Ha, B. (a) Effects of proton beam irradiation on seed germination and growth of soybean (*Glycine max* L. Merr.). *J. Korean Phys. Shock.* **2017**, *71*, 752–757,

Im, J.; Ko, J.; Kim, H.; Ha, B. Biochemical responses of soybean (*Glycine max* L. Merr.) to proton beam irradiation. *Plant Breed. Biotechnol.* **2017**, *5*, 97–105

International Atomic Energy Agency. Absorbed Dose Determination in External Beam Radiotherapy: International Code of Practice for Dosimetry Based on Standards of Absorbed Dose to Water; Technical Reports 398; IAEA: Vienna, Austria, **2000**; STI/DOC/010/398

Irfaq, M.; Nawab, K. A study to determine the proper dose of gamma radiation for inducing beneficial genetic variability in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Asian J. Plant Sci.* **2003**, *20*, 20

Jae-Il, L.; Gendaram, S.; Jong-Seo, C.; Jae-Hong, K.; Tae-Gun, Y.; Min-Yong, L.; Yang, D.-C.; Bae, C.-H. Effects of Proton Beam Irradiation on Germination and Growth of Tobacco and Rice Plants. *Korean J. Plant Res.* **2005**, *18*, 462–469

Katiyar, P.; Pandey, N.; Keshavkant, S. Plant Gamma radiation: A potential tool for abiotic stress mitigation and management of agroecosystem. *Plant Stress* **2022**, *5*, 100089

Kiani, D.; Borzouei, A.; Ramezanpour, S.; Soltanloo, H.; Saadati, S. Application of gamma irradiation on morphological, biochemical, and molecular aspects of wheat (*Triticum aestivum* L.) under different seed moisture contents. *Sci. Rep.* **2022**, *12*, 11082

Kim, S.K.; Choi, H.J.; Kim, K.R.; Kim, H.Y. Properties of starches in Chinese yam, *Dioscorea opposita* Thunb. irradiated with proton beam. *Korean J. Plant Res.* **2011**, *24*, 304–308

Kim, S.K.; Park, S.Y.; Kim, K.R.; Shin, J.H.; Kim, S.Y.; Kim, H.Y.; Lee, I.J. Effect of proton beam irradiation on germination, seedling growth, and pasting properties of starch in rice. *J. Crop. Sci. Biotechnol.* **2012**, *15*, 305–310

Kubancák, J.; Molokanov, A.G. Measurements of LET spectra of the JINR phasotron radiotherapy proton beam. *Issues At. Sci. Technol.* **2013**, *6*, 90–92

Kumar, V.; Vishwakarma, G.; Chauhan, A.; Shitre, A.; Das, B.K.; Nair, J. Use of proton beam as a novel tool for mutations in rice. *BarcNewslett.* **2018**, *366*, 5–9

Lee, Y.-M.; Jo, Y.D.; Lee, H.-J.; Kim, Y.-S.; Kim, D.S.; Kim, J.-B. DNA damage and oxidative stress induced by proton beam in *Cymbidium* hybrid. *Hortic. Environ. Biotechnol.* **2015**, *56*, 240–246

Leser, M.; Chapman, J.R.; Khine, M.; Pegan, J.; Law, M.; Makkaoui, M.E.; Ueberheide, B.M.; Brenowitz, M. Chemical generation of hydroxyl radical for oxidative 'Footprinting'. *Prot. Pept. Lett.* **2019**, *26*, 61–69

Lichtenthaler, H.K. Chlorophyll and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. In *Methods Enzymology*; Packer, L., Douce, R., Eds.; Academic Press: London, UK, **1987**; *Volume 641*, pp. 350–382

Marcu, D.; Damian, G.; Cosma, C.; Cristea, V. Gamma radiation effects on seed germination, growth and pigment content, and ESR study of induced free radicals in maize (*Zea mays*). *J. Biol Phys.* **2013**, *39*, 625–634

Martemucci, G.; Costagliola, C.; Mariano, M.; D'andrea, L.; Napolitano, P.; D'Alessandro, A.G. Free radical properties, source and targets, antioxidant consumption and health. *Oxygen* **2022**, *2*, 48–78

Oprica, L.; Grigore, M.-N.; Caraciuc, I.; Gherghel, D.; Mihai, C.T.; Vochita, G. Impact of proton beam irradiation on the growth and biochemical indexes of barley (*Hordeum vulgare* L.) seedlings grown under salt stress. *Plants* **2020**, *18*, 1234

Oprica, L.; Shvidkiy, S.; Molokanov, A.; Vochita, G.; Creanga, D. Some effects of proton irradiation in young seedlings of wheat. *Rom. J. Phys.* **2022**, *67*, 813

Oprica, L.; Vochita, G.; Grigore, M.-N.; Shvidkiy, S.; Molokanov, A.; Gherghel, D.; Les, A.; Creanga, D. Cytogenetic and Biochemical Responses of Wheat Seeds to Proton Irradiation at the Bragg Peak. *Plants* **2023**, *12*, 842

Pardeshi, S.; Dhodapkar, R.; Kumar, A. Quantum chemical density functional theory studies on the molecular structure and vibrational spectra of Gallic acid imprinted polymers. *Spectrochim. Acta Part A.* **2013**, *116*, 562–573

Patterson, A. The Scherrer formula for X-Ray particle size determination. *Phys. Rev.* **1939**, *56(10)*, 978–982

Pitt Quantum Repository, Cysteamine.
<http://pqr.pitt.edu/mol/UFULAYFCSOUIOV-UHFFFAOYSA-N> (Accessed 1 August 2023)

Popescu-Lipan, L.; Les, A; Grigoras, M.; Ababei, G.; Motrescu, I.; Bulai, G.; Brinza, F., Creanga, D.; BalasoIU, M. Antioxidant molecule useful in the stabilization of nanoparticles in water suspension. *Soft Mater.* **2022**, *20*, S76-S90.

Portilla, Y.; Fernández-Afonso, Y.; Pérez-Yagüe, S. *et al.* Different coatings on magnetic nanoparticles dictate their degradation kinetics in vivo for 15 months after intravenous administration in mice. *J. Nanobiotechnol.* **2022**, *20*, 543

Ouyang, Z.-W.; Chen, E.-C.; Wu, T.-M. Thermal Stability and Magnetic Properties of Polyvinylidene Fluoride/Magnetite Nanocomposites. *Materials* **2015**, *8*, 4553-4564

Racuciu, M.; Creanga, D. Magnetite/tartaric acid nanosystems for experimental study of bioeffects on *Zea mays* growth. *Rom. J. Phys.* **2017**, *62* (804): 3-4.

Racuciu, M.; Creanga, D.; Nadejde, C. Comparison among the physical properties of various suspensions of magnetite nanoparticles stabilized in water using different organic shells. *UPB Sci. Bull. Ser. A: Appl. Math. Phys.* **2013**, *75*(3), 209-216

Rosen, J.E.; Chan, L.; Shieh, D.B.; Gu, F. X. Iron oxide nanoparticles for targeted cancer imaging and diagnostics. *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* **2012**, *8*: 275-290.

Sakagami, H.; Satoh, K.; Hatano, T.; Yoshida, T.; Okuda, T. Possible role of radical intensity and oxidation potential for gallic acid-induced apoptosis. *Anticancer Res.* **1997**, *17*, 377-380

Sonnichsen, C.; Geier, S.; Hecker, N.E.; Von Plessen G.; Feldmann, J.; Ditzbacher H.; Lamprecht, B.; Krenn J.R.; Aussenegg F.R.; Chan, V.Z.H.; Spatz J.P.; Moller M., Spectroscopy of single metallic nanoparticles using total internal reflection microscopy, *Appl. Phys. Lett.* **2000**, *77*, 2949

Tien, D.C.; Tseng, K.H.; Liao, C.Y.; Huang, J.C.; Tsung, T.T. Discovery of ionic silver in silver nanoparticle suspension fabricated by arc discharge method. *J. Alloys Compd.* **2008**, *463*, 408-411

Wei, L.; Lu, J; Xu, H; Patel, A.; Chen, Z.S.; Chen, G. Silver nanoparticles: synthesis, properties, and therapeutic applications. *Drug Discov. Today* **2015**, *20*, 595-601

Zhang, Q.; Li, N.; Goebel, J.; Lu, Z.; Yin, Y. A systematic study of the synthesis of silver nanoplates: is citrate a "magic" reagent? *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 18931-18939