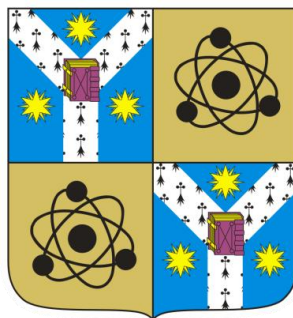


Universitatea
“Alexandru
Ioan Cuza”
Facultatea de
Fizică



STUDIAREA EFECTULUI
NANOPARTICULELOR MAGNETICE ASUPRA
APELOR ÎNCĂRCATE CU COLORANȚI

COORDONATOR ȘTIINȚIFIC

Prof. Dr. Abil Dorina - Emilia CREANGĂ

STUDENT DOCTORAND

Drd. Andreea - Roxana FÂNARU (căs. Balint)

IAȘI

2024

CUPRINS

MOTIVAREA ALEGERII STUDIULUI	5
INTRODUCERE	5
CAPITOLUL 1. NANOPARTICULELE MAGNETICE ȘI COLORANTUL POLUANT - RODAMINA B	7
1.1. STUDIAREA SINTEZEI ȘI PROPRIETĂȚILOR NANOPARTICULELOR MAGNETICE	7
1.1.1. Sintetizarea nanoparticulelor de magnetită	7
1.1.2. Caracterizarea microstructurală și magnetică a pulberii de magnetită	9
1.2. STUDIAREA MOLECULEI DE RODAMINĂ B12 1.2.1. Rezultatele modelării quantum-chimice a Rodaminei B	12
1.3. CONCLUZII	15
CAPITOLUL 2. STUDIAREA INTERACȚIUNII NANOPARTICULELOR MAGNETICE CU MODELUL DE APĂ UZATĂ DE RODAMINA B ÎN CONCENTRAȚII DIFERITE	16
2.1. STUDIAREA INTERACȚIUNII NANOPARTICULELOR MAGNETICE CU RODAMINA B ÎN CONCENTRAȚIE DE 5 μM	16
2.1.1. Modelul experimental de apă încărcată cu Rodamina B	16
2.1.2. Analiza spectrală a Rodaminei B 5 μM tratată cu nanoparticule magnetice	17
2.2. REZULTATELE INTERACȚIUNII NANOPARTICULELOR MAGNETICE CU RODAMINA B ÎN CONCENTRAȚIE DE 5 μM	18
2.2.1. Interacțiunea Rodaminei B 5 μM cu nanoparticulelor magnetice, în lipsa iradierii UV și a apei oxigenate	18
2.2.2. Interacțiunea Rodaminei B cu nanoparticulele magnetice, în prezența iradierii UV și a apei oxigenate	20
2.2.2.1 Influenta radiațiilor ultraviolete asupra interacțiunii nanoparticulelor magnetice cu Rodamina B 5 μM	20

2.3. STUDIAREA INTERACȚIUNII NANOPARTICULELOR MAGNETICE CU RODAMINA B ÎN CONCENTRAȚIE DE 10 μM ..	24
2.3.1 Studierea interacțiunilor Rodaminei B în concentrație de 10 μM cu nanoparticulele magnetice	24
2.3.2. Rezultatele tratării Rodaminei B în concentrație de 10 μM cu nanoparticule magnetice, apă oxigenată și radiații UV-C	26
2.3.2.1. Influența radiațiilor ultraviolete asupra interacțiunii nanoparticulelor magnetice cu Rodamina B 10 μM	26
2.4. CONCLUZII	30
CAPITOLUL 3. STUDIAREA UNOR BIOEFECTE ALE RODAMINEI B ȘI RODAMINEI B DEGRADATE	31
3.1.1. Modelarea reactivității chimice a acidului benzoic	33
3.1.2. Modelarea reactivității chimice a benziloxiaminei	35
3.2. TESTAREA CITOTOXICITĂȚII PE CULTURI DE CELULE	37
3.2.1 Materiale și metode	37
3.2.2. Rezultate și discuții	38
3.3. STUDIUL MORFOLOGIEI CELULARE	42
3.3.1 Materiale și metode	42
3.3.2 Rezultate și discuții	42
3.3.3. Concluzii	47
CONCLUZII GENERALE	48
Lista articolelor și comunicărilor științifice	49
Referințe bibliografice	51

MOTIVAREA ALEGERII STUDIULUI

Poluarea mediului este o problemă globală majoră, care este în continuă căutare de soluții și rezolvări și care afectează solul, apa și aerul, având un impact negativ asupra calității vieții oamenilor, a biodiversității și a ecosistemelor. Un aspect important, care mi-a atras atenția și care reprezintă subiectul principal al acestei teze, este poluarea apei potabile cu coloranți chimici și toxici. Coloranții sunt substanțe chimice utilizate pe scară largă în industriile textile, de vopsele, hârtie, piele și alimentară. În urma proceselor specifice fiecărei industrii în parte, rezultă ape uzate, care de cele mai multe ori conțin și acești coloranți și care ulterior sunt revărsate în rețelele de ape terane și supraterrane, fără vreun tratament, în prealabil aplicat.

Coloranții au un impact important asupra apelor, afectând, în primul rând, calitatea acestora, schimbând proprietățile fizico-chimice, inclusiv pH-ul, conținutul de oxigen și turbiditatea. Biodiversitatea are și ea de suferit întrucât substanțele nocive ce ajung în apă dăunează florei și faunei. Se cunoaște că anumiți coloranți pot fi cancerigeni, deci o dată ajunși în apa potabilă duc la probleme grave de sănătate pentru populația care consumă această apă. De-a lungul timpului, din nevoia de a găsi noi metode de soluționare a problemei relatate anterior, oamenii de știință au venit cu o soluție inovatoare și eficientă, mai exact utilizarea nanoparticulelor magnetice.

Datorită faptului că studiile au arătat că prezintă o eficiență ridicată în captarea contaminanților, că sunt versatile și că necesită costuri de exploatare reduse, am decis ca în această teză, nanoparticulele magnetice să reprezinte obiectul de studiu și pe care să le folosesc în tratarea apelor încărcate cu coloranți toxici.

INTRODUCERE

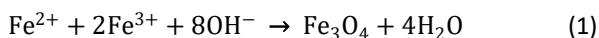
Știința la nivel nano reprezintă una dintre cele mai importante direcții ale cercetării moderne, de aceea de-a lungul timpului, atenția cercetătorilor a fost îndreptată și spre nanoparticule, ale căror proprietăți oferă posibilitatea utilizării acestora în diferite departamente, precum: biomedicină, biotehnologie, inginerie termică și energetică, ingineria materialelor, tehnologia de înregistrare, dezvoltarea vopselelor și pigmentilor, tehnologia

mediului, imprimarea cu jet de cerneală etc. (Wang et al., 2015) Odată ce s-a descoperit multitudinea de proprietăți fizice, chimice, optice și magnetice pe care le posedă nanoparticulele s-au dezvoltat și aplicațiile acestora (Hyeon, 2003). Dintre aceste nanoparticule, cele mai remarcabile și folosite sunt nanoparticulele magnetice, cunoscute sub acronimul NPM, datorită aplicațiilor lor foarte diverse și a proprietăților lor unice și versatile (Colombo et al., 2012). Nanoparticulele magnetice reprezintă o categorie de nanoparticule, care, în prezența unui câmp magnetic extern, pot fi ușor urmărite, direcționate sau manipulate. O dată ce acest câmp magnetic este îndepărtat, NPM își pierde magnetizarea, riscul de agregare reducându-se considerabil, ceea ce reprezintă un avantaj față de utilizarea unui alt tip de nanoparticule (Beveridge et al., 2011). Nanoparticulele magnetice sunt compuse în principiu din elemente precum fier, cobalt, nichel și oxizi ai acestora. De-a lungul timpului, din toate tipurile de NPM, cele ce prezintă în componența lor oxizi ai fierului au câștigat atenția majorității cercetătorilor.

Magnetita – dintre toate tipurile de oxizi ai fierului, magnetita prezintă cele mai interesante proprietăți datorate prezenței cationilor de fier în stări de valență II și III (Fe^{2+} și Fe^{3+}), în structură de spinel invers. Cristalele cu structură de spinel cubic ce caracterizează magnetita Fe_3O_4 ($\text{FeO} \cdot \text{Fe}_2\text{O}_3$) îi conferă proprietăți ferrimagnetice la temperaturi sub 858 K. (Gubin, 2009).

Fe_2O_3 – reprezintă două faze magnetice, denumite hematita, romboedrică ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$) și maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), cu configurații tetra și octaedrice. Oxidul $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ este antiferromagnetic la temperaturi sub 950 K, iar la valori imediat peste 260 K prezintă așa-numitul ferromagnetism slab în timp ce maghemita este ferrimagnetică la temperaturi sub 620 °C. (Gubin, 2009). Hematita, cea mai stabilă fază cristalografică a oxidului de fier, este un material foarte atractiv datorită nontoxicității sale și a multitudinii de aplicații. Printre cele mai întâlnite metode chimice de sintetizare a nanoparticulelor magnetice se regăsesc:

- Co-precipitarea chimică: Este o tehnică convenabilă și foarte folosită în sintetizarea de nanoparticule magnetice (oxizi metalici) în soluții apoase ale sărurilor precursorare prin adăugarea unei baze în atmosferă preferabil inertă, la temperatura camerei sau temperaturi ridicate. Reacția chimică care are loc la formarea nanoparticulelor de oxid de fier se poate scrie astfel: (Faraji, 2010)



- Metoda sol – gel: Această tehnică este utilizată la scară largă într-o varietate de tehnologii. Metoda în sine presupune hidroliza și

condensarea unor oxizi metalici sau precursori, având ca și rezultat dispersia particulelor de oxid într-un sol, care ulterior va fi uscat și gelificat prin îndepărtarea solventului sau prin reacții chimice.

- Descompunerea termică: Descompunerea termică a compușilor organometalici (precursori nemagnetici) în solvenți organici în fierbere este o altă modalitate promițătoare pentru prepararea nanoparticulelor magnetice, iar particulele rezultate prezintă o distribuție de dimensiuni foarte restrânsă. (Biehl, 2018) Precursorii cel mai des întâlniți sunt carbonați de fier sau acetilacetonă de fier, iar acidul oleic, acizii grași sau hexadecilamina sunt printre cei mai utilizați surfactanți.

Curățarea apelor uzate este o preocupare majoră la nivel global, având în vedere impactul semnificativ asupra sănătății umane și a mediului. Nanoparticulele magnetice (NPM) reprezintă o soluție inovatoare și eficientă în acest domeniu datorită proprietăților lor unice, precum raport suprafață - volum mare, comparabile ca dimensiuni cu cei mai mulți dintre analiții de interes și ușurința cu care sunt dispersate în soluții (Lu, 2007).

În această teză, ne-am stabilit ca și obiectiv să propunem și noi o metodă de decontaminare a apelor încărcate cu coloranți, mai exact cu Rodamină B. Rodamina B este un colorant sintetic, exploatat în mod semnificativ în deosebi în industria textilă, dar nu numai, datorită caracteristicii sale fluorescente chiar și în concentrații foarte mici. Încă din 1967 s-a pus problema toxicității colorantului Rodamina B, prin studiul realizat de Panciera, M., alăturându-se și studii mai actuale, precum cele ale lui Rowiński, P.M. și Chrzanowski, M.M. (2011), Maryanti, S.A. et al. (2014), Baldev, E. et al. (2013) și Sharma, J. et al. (2022).

CAPITOLUL 1. NANOPARTICULELE MAGNETICE ȘI COLORANTUL POLUANT - RODAMINA B

1.1. STUDIAREA SINTEZEI ȘI PROPRIETĂȚILOR NANOPARTICULELOR MAGNETICE

1.1.1. Sintetizarea nanoparticulelor de magnetită

Sinteza magnetitei nanometrice s-a efectuat prin metoda coprecipitării chimice (Massart, 1981). Au fost realizate soluții apoase de clorură ferică, $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ (3,622 g în 50 mL apă distilată) și clorură feroasă $\text{FeCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ (1,332 g în 50 mL apă distilată) care s-au amestecat sub agitare magnetică (800 rpm) la temperatura de circa 65 °C. Apoi a fost adăugată soluția de hidroxid de sodiu 25% (50 mL), încălzită în prealabil la circa 80 °C și picurată încet dintr-o pâlnie de separare. Formarea ferofazei s-a constatat vizual odată cu apariția unei colorații brun închis care, în final s-a răspândit în tot volumul mediului de reacție. S-a continuat agitarea magnetică pe plita de încălzire timp de încă 30 minute.

În continuare, s-a lăsat să se răcească mediul de reacție până la temperatura camerei și ulterior, s-a așezat pe un magnet de laborator pentru sedimentarea ferofazei din suspensie.

Principalele reacții, care au loc, se pot scrie astfel:

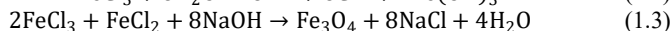
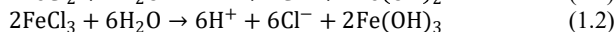
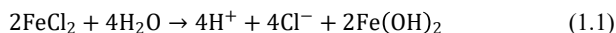


Figura 1.1.1. Sintetizarea nanoparticulelor magnetice: a) soluția rezultată din amestecul de clorură ferică și clorură feroasă în apă distilată ; b) formarea ferofazei (după adăugarea hidroxidului de sodiu).

După scurgerea fazei lichide de deasupra ferofazei, separată la fundul vasului, s-a procedat la trei spălări succesive cu câte 100 mL de apă distilată fierbinte pentru înlăturarea oricăror impurități, respectiv mici cantități de

produși de reacție intermediari (hidroxizi), de eventuali reactanți nereacționați, precum și a clorurii de sodiu rezultată.

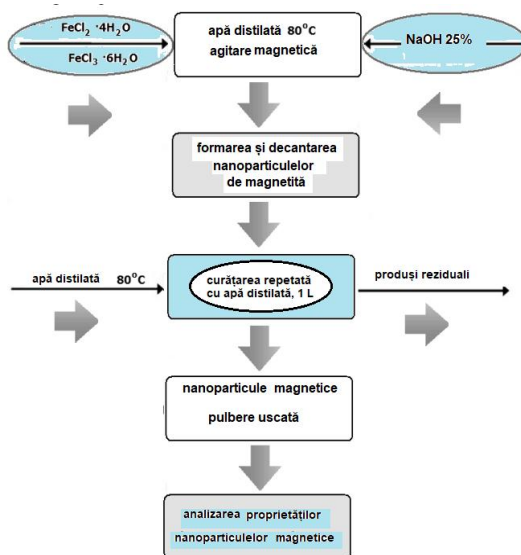


Figura 1.1.2. Reprezentarea schematică a sintetizării nanoparticulelor magnetice.

S-a măsurat pH-ul ultimei ape de spălare a ferofazei și s-a găsit valoarea de 7,5. Apoi pulberea umedă colectată ca produs final s-a uscat la cuptorul de vid la 95 °C și a fost analizată prin metode adecvate.

1.1.2. Caracterizarea microstructurală și magnetică a pulberii de magnetită

Nanoparticulele sintetizate au fost analizate cu ajutorul microscopiei electronice de transmisie (TEM). În urma analizei imaginilor captate, s-a constatat faptul că acestea prezintă diametre de la 9 până la 14 nm (Figura 1.1.3).

În Figura 1.1.4 este prezentată diagrama de difracție a probei analizate, investigată cu ajutorul difractometriei cu radiații X (XRD). Din punct de vedere calitativ rezultatul analizei evidențiază prezența tuturor maximelor de

difracție, caracteristice planelor de cristalizare ale magnetitei (111), (220), (311), (400), (511), (440), (620), (533) (Card No, ICSD 98-015-8505), fără fază amorfă sau impurități.

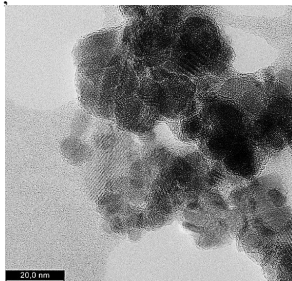


Figura 1.1.3 Rezultatul analizei TEM a pulberii de magnetită (reperul de scală de 20 nm).

Din punct de vedere cantitativ se poate calcula dimensiunea cristalitelor cu ajutorul formulei lui Scherrer (Patterson, 1939) :

$$D_{hkl} = \frac{k\lambda}{\beta \cos\theta_{hkl}} \quad (1.4)$$

unde D reprezintă dimensiunea medie a cristalitelor; K – factor de forma, adimensional, apropiat de unitate (0,9); λ – lungimea de undă a radiațiilor X folosite; β – este semilărgimea (lărgimea la jumătate din înălțime a vârfului aferent unghiului 2θ), exprimată în radiani; θ – unghiul de difracție Bragg, exprimat în radiani.

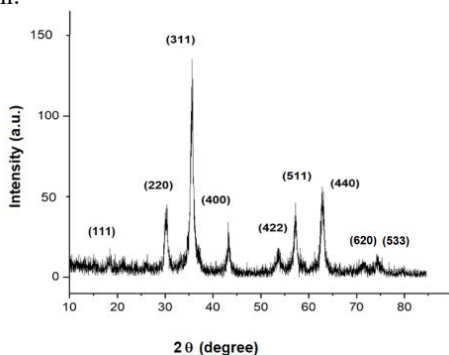


Figura 1.1.4. Rezultatul analizei XRD efectuată pe pulberea de magnetită

Caracteristicile magnetice ale probei de magnetită, analizate prin intermediul magnetometrului cu probă vibrantă, sunt prezentate în Figura 1.1.5.

Valoarea magnetizației de saturație a probei (momentul magnetic total maxim al probei) a ajuns la 68 emu/g pentru aproximativ 20000 Oe, cu o bandă îngustă de câmp coercitiv (82,47 Oe), care caracterizează comportamentul particulelor ca fiind unul superparamagnetic (în concordanță cu Pușcașu et al., 2016).

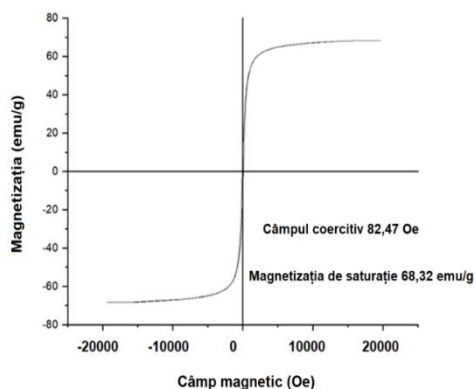


Figura 1.1.5. Curba de magnetizare obținută pentru nanoparticulele de magnetită

Analiza spectrală a magnetitei (Figura 1.1.6), prin tehnica FTIR, surprinde vibrații ce corespund cristalelor de spinel de oxid de fier, între numerele de undă 400 cm^{-1} și 900 cm^{-1} .

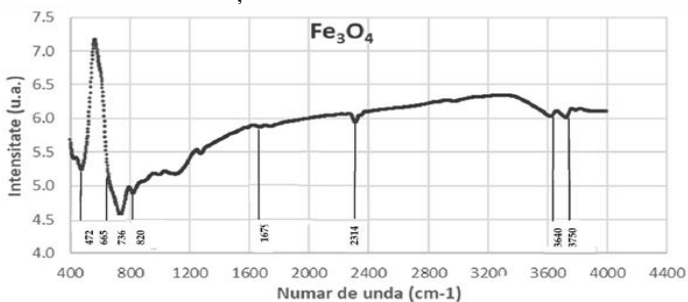


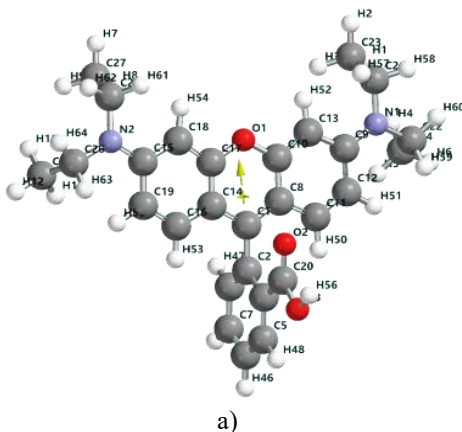
Figura 1.1.6. Spectrul de vibrație (FTIR) pentru magnetită

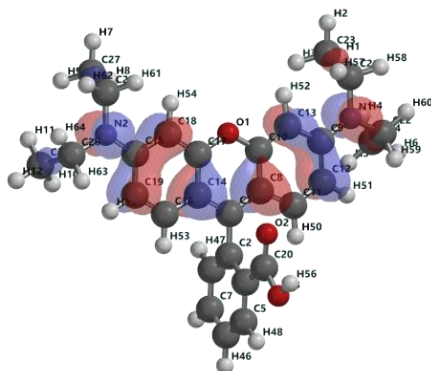
Urmele de CO₂ și H₂O₂ generează vibrațiile de la 1679 cm⁻¹(deformații ale OH), 3640 cm⁻¹ și 3750 cm⁻¹ (vibrații de întindere ale OH) și la 2314 cm⁻¹ (vibrații ale legăturii C-O) în concordanță cu Chaki et al., 2015, Ristic, et al, 2007, confirmând natura tipică a magnetitei,

1.2. STUDIAREA MOLECULEI DE RODAMINĂ B

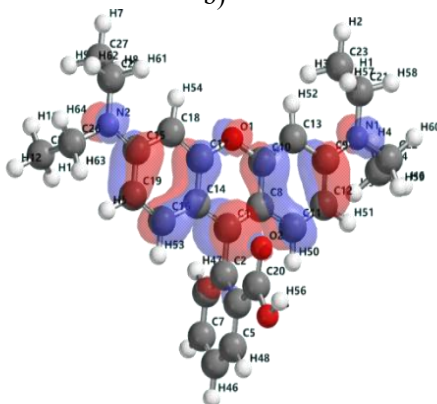
1.2.1. Rezultatele modelării cuantum-chimice a Rodaminei B

Molecula a fost modelată atât în stare izolată cât și hidratată (cu programul Spartan 18), rezultând volume de 475,91 Å³ (stare izolată), respectiv 476,03 Å³ (stare hidratată), cu un moment dipolar relativ mic (Figura 1.2.1a și 1.2.2a), de 0,3 D în stare izolată și respectiv 0,9 D în stare hidratată (comparativ cu apa - 1,9 D).





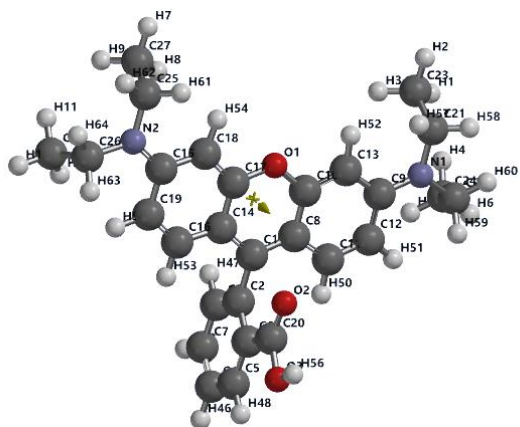
b)



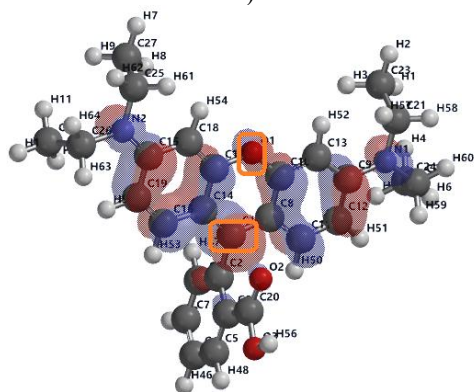
c)

Figura 1.2.1. Structura optimizată a Rodaminei B: a) geometria și momentul dipolar electric; b) orbitalul de frontieră HOMO (Highest Occupied Molecular Orbital - Cel mai înalt orbital molecular ocupat) și c) orbitalul de frontieră LUMO (Lowest Unoccupied Molecular Orbital - cel mai de jos orbital molecular neocupat). Atomi de Carbon - cenușiu închis, atomi de Oxigen - cenușiu deschis.

Aceste structuri s-au evidențiat a fi stabile datorită potențialului de ionizare (PI) mare (Energia celui mai mare orbital molecular ocupat, E_{HOMO} , fiind de 7,97 eV pentru Rodamina B și respectiv 5,46 eV pentru molecula hidratată).



a)



b)

CAPITOLUL 2. STUDIEREA INTERACȚIUNII NANOPARTICULELOR MAGNETICE CU MODELUL DE APĂ UZATĂ DE RODAMINA B ÎN CONCENTRAȚII DIFERITE

2.1. STUDIEREA INTERACȚIUNII NANOPARTICULELOR MAGNETICE CU RODAMINA B ÎN CONCENTRAȚIE DE 5 μM

2.1.1. Modelul experimental de apă încărcată cu Rodamina B

Studiile experimentale s-au efectuat pe modelul de apă uzată, încărcată cu Rodamina B în concentrație de 5 μM (Figura 2.1.1) din care s-a lucrat cu un volum de 10 mL.

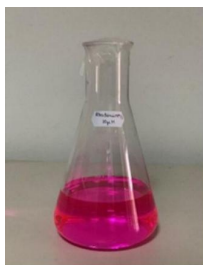


Figura 2.1.1. Soluție de Rodamina B studiată ca model de apă uzată

Înregistrarea spectrului în domeniul UV-Vis a evidențiat o bandă îngustă și bine definită, în vizibil, cu maximum la lungimea de undă de 554 nm (Figura. 2.1.2) precum și un “umăr” în ultravioletul apropiat, la lungimea de undă de 353 nm, în acord cu (Zaidan, & Yasin, 2016).

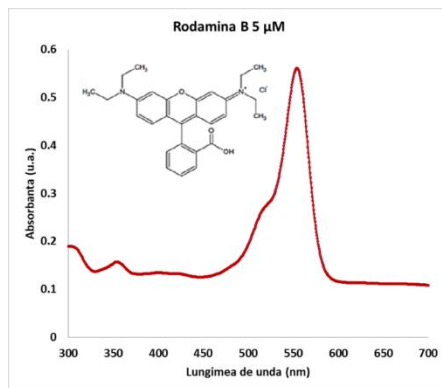


Figura 2.1.2. Spectrul electronic de absorbție al Rodaminei B, 5 μM.
Absorbanța maximă este de 0,55.

Măsurătorile s-au efectuat pe maximul benzii electronice de absorbție de la 554 nm. Modelul protocolului de lucru este o adaptare după cel descris de Phoemphoonthanyakit, et al., (2009) pentru Rodamina 6G. Cantitățile de nanoparticule magnetice testate pentru capacitatea de epurare au fost de 4 g/L și 8 g/L.

2.1.2. Analiza spectrală a Rodaminei B 5 μM tratată cu nanoparticule magnetice

Pentru înregistrarea spectrelor electronice de absorbție ale soluțiilor de Rodamină B a fost utilizat dispozitivul Shimadzu PharmaSpec, ce dispune de eprubete din cuarț cu diametru de 1 cm, și un soft specializat de achiziție și procesare a datelor.

Rata de degradare a soluției probă de Rodamină B a fost calculată folosind următoarea formulă de calcul (Ec. 2.1):

$$\text{Rata de degradare (\%)} = 100 \frac{(A_0 - A(t))}{A_0} \quad (2.1)$$

unde $A(t)$ reprezintă absorbanta la lungimea de undă de 554 nm pentru soluția de Rodamină B, la momentul t , după un tratament cu nanoparticule magnetice, UV-C și/sau apă oxigenată (H_2O_2), iar A_0 reprezintă absorbanta la momentul inițial, t_0 .

2.2. REZULTATELE INTERACȚIUNII NANOPARTICULELOR MAGNETICE CU RODAMINA B ÎN CONCENTRAȚIE DE 5 μ M

S-au analizat efectele nanoparticulelor magnetice care au fost administrate în concentrațiile de 4 g/L și apoi de 8 g/L, urmărindu-se spectrele electronice de absorbție precum și rata scăderii concentrației colorantului.

2.2.1. Interacțiunea Rodaminei B 5 μ M cu nanoparticulelor magnetice, în lipsa iradierii UV și a apei oxigenate

Au fost înregistrate spectrele electronice de absorbție în domeniul UV-Vis, pentru cele două concentrații de nanoparticule magnetice (Fe_3O_4), pentru durate de timp de 0-30-60-120 minute. S-a lucrat la temperatura camerei pe un volum de soluție de 10 mL cu agitare mecanică. La timp de observare mai mari de 120 min, nu s-au evidențiat schimbări semnificative, ceea ce este valabil și pentru celelalte experimente.

Conform cu Figura 2.2.1, spectrele Rodaminei B au scăzut în intensitate fără alte schimbări în forma spectrului electronic de absorbție (normalizare relativ la valoarea maximă a intensității benzii la momentul inițial). Se evidențiază o scădere la circa 60% a intensității benzii studiate pentru 4 g/L nanoparticule magnetice și 120 minute timp de interacțiune.

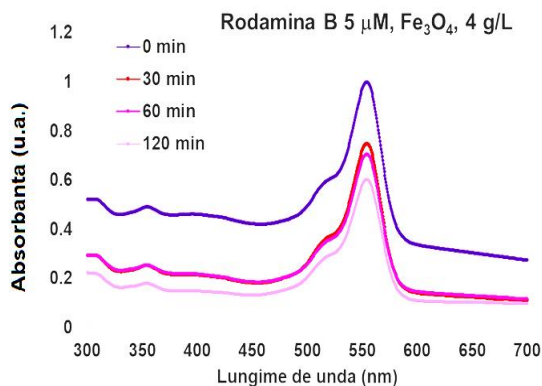


Figura 2.2.1. Spectrele normalizate ale Rodaminei B 5 μ M după interacțiunea cu nanoparticulele magnetice în concentrație de 4 g/L

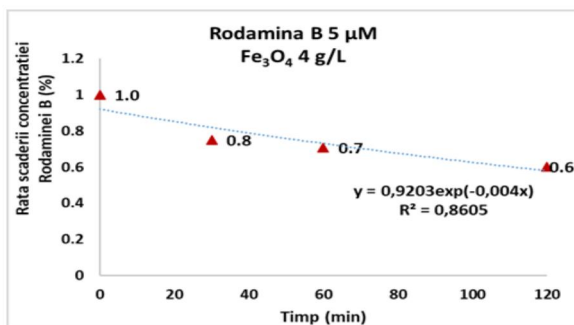


Figura 2.2.2. Scăderea exponențială în timp a absorbantei în maximum de la 554 nm pentru 4 g/L MNP; y-absorbanța, t-timpul

Se poate presupune că avem: (i) fie o cinetică de proces de tip pseudo-ordin întâi, dacă domină procesul fizic de adsorbție a Rodaminei B la nanoparticulele magnetice; (ii) fie o cinetică de reacție de ordinul întâi dacă domină reacțiile de degradare chimică. Creșterea concentrației de nanoparticule magnetice la 8 g/L a condus la o comportare foarte asemănătoare a sistemului Fe_3O_4 -Rodamina B ca și în cazul precedent, (Figura 2.2.3), constând tot în scăderea exponențială a intensității în maximum de la lungimea de undă de 554 nm, la aproximativ 58%, diferența fiind mai vizibilă în Figura 2.2.4 unde, coeficientul de corelație exponențială ($y = 0,6566e^{-0,004x}$) este R^2 , egal cu 0,862.

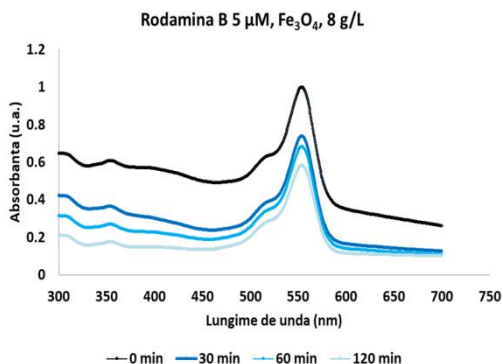


Figura 2.2.3. Spectrele normalizate ale Rodaminei B după interacțiunea cu nanoparticulele magnetice în concentrație de 8 g/L

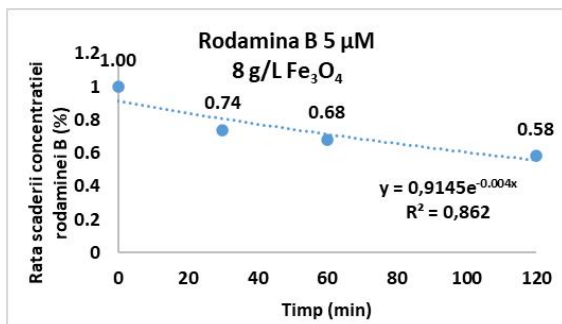


Figura 2.2.4. Scăderea exponențială în timp a absorbantei în maximum de la 554 nm lungime de undă pentru 8 g/L MNP; y-absorbanța, t-timpul.

2.2.2. Interacțiunea Rodaminei B cu nanoparticulele magnetice, în prezența iradierii UV și a apei oxigenate

Experimentele prezentate în continuare au urmărit testarea efectului combinat al NPM, radiațiilor UV-C (tub Philips, 12 W, 10,5 - 42,2 J pentru 30 min-120 min) și H_2O_2 (10 și 20 mM) având în vedere că în toate aceste situații se generează radicali oxidril (OH) ce pot reacționa cu Rodamina B.

2.2.2.1 Influența radiațiilor ultraviolete asupra interacțiunii nanoparticulelor magnetice cu Rodamina B 5 μ M

. În Figura 2.2.5 se prezintă rezultatele privind rata de scădere a concentrației de Rodamina B 5 μ M sub acțiunea simultană a radiațiilor UV-C și a nanoparticulelor magnetice. Valorile ratei de scădere a concentrației Rodaminei B 5 μ M nu depășesc 30%, corespunzător la 4 g/L NPM (și aproximativ 28 % pentru 8 g/L NPM) ceea ce pare surprinzător la prima vedere, deoarece se știe că sub acțiunea radiațiilor ultraviolete se produce fotoliza apei:



și astfel se eliberează radicali oxidril ($OH\bullet$), care sunt foarte reactivi și pot degrada moleculele organice din proba iradiată (electronul neparticipant • având tendința de a forma o pereche cu alt electron al altui sistem atomic/molecular).

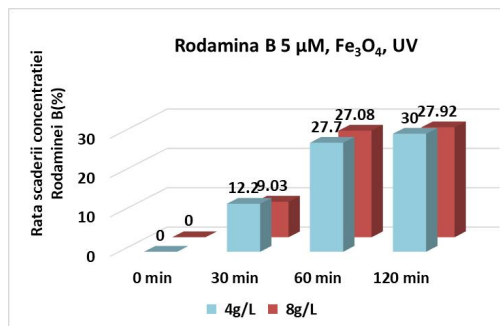


Figura 2.2.5. Influența nanoparticulelor magnetice (4 g/L și 8 g/L) și radiațiilor ultraviolete asupra Rodaminei B, 5 μ M.

În acest context, însă, avem în vedere că, ionii de fier de la suprafața nanoparticulelor pot avea efect catalitic declanșând reacții de tip Fenton, în prezența apei și a oxigenului dizolvat în aceasta, cu eliberare de radicali oxidril, care pot reacționa cu Rodamina B

2.2.2.2. Influența apei oxigenate asupra interacțiunii Rodaminei B 5 μ M cu nanoparticulele magnetice și radiațiile ultraviolete

Prin utilizarea a 4 g/L nanoparticule magnetice și 10 milimoli de apă oxigenată (30%), sub acțiunea radiațiilor UV-C, intensitatea din maximul benzii de absorbție a Rodaminei B 5 μ M a scăzut în timp, după cum se vede din Figura 2.2.6.

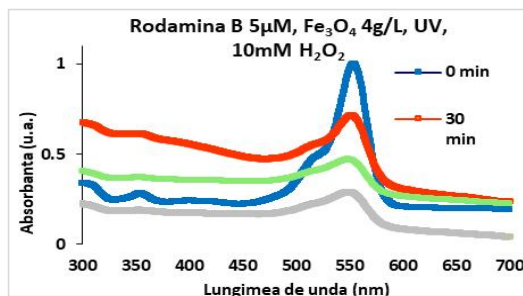


Figura 2.2.6. Influența nanoparticulelor magnetice (4 g/L), a apei oxigenate (10 mM) și a radiațiilor ultraviolete asupra Rodaminei B, 5 μ M.

Spectrele de absorbție au fost normalizate relativ la valoarea maximă din proba inițială, netratată. Intensitatea în maximul benzii de la 554 nm a scăzut la circa 28% după 120 minute de interacțiune cu 4 g/L NPM (Figura 2.2.6). După cum se poate observa în Figura 2.2.7, dublarea cantității de NPM (8 g/L) la același volum de H_2O_2 (10 mM) a condus la scăderea intensității spectrului de absorbție la doar 0,67.

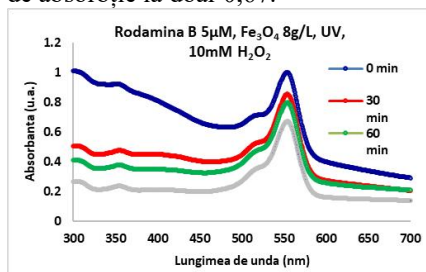


Figura 2.2.7. Influența nanoparticulelor magnetice (8 g/L), a apei oxigenate (10 mM) și a radiațiilor ultraviolete asupra Rodaminei B, 5 μM .

Faptul că dublarea cantității de Fe_3O_4 la aceeași cantitate de apă oxigenată, duce la un efect mai slab de scădere a concentrației Rodaminei B, sugerează că radicalii OH sunt mai mult atrași în interacțiuni cu NPM, astfel că rămân mai puțini radicali pentru interacțiunea cu moleculele de colorant. Un volum dublu de apă oxigenată (20 mM) precum și adăugarea a 4 g/L de nanoparticule magnetice a dus la o scădere remarcabilă a colorației soluției de Rodamina B, intensitatea de la 554 nm scăzând la aproximativ 0,18 (Figura 2.2.8). Dublând și cantitatea de nanoparticule magnetice (8 g/L) se obține o scădere mai mică a absorbanței în maximul de la 554 nm (La circa 0,49, Figura 2.2.9), ceea ce reprezintă o evoluție similară cu cea din experimentul precedent și corespunde la o concentrație de 2,3 μM .

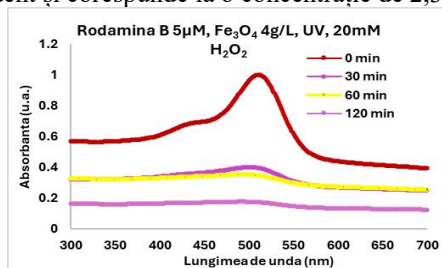


Figura 2.2.8. Influența nanoparticulelor magnetice (4 g/L), a apei oxigenate (20 mM) și a radiațiilor ultraviolete asupra Rodaminei B, 5 μM .

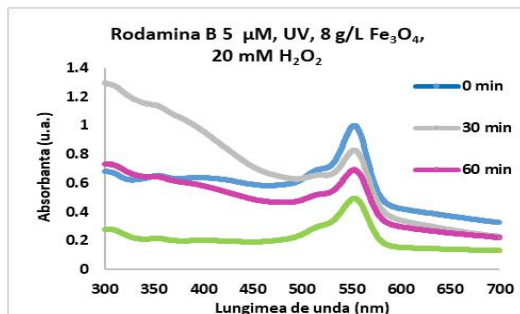


Figura 2.2.9. Influența nanoparticulelor magnetice (8 g/L), a apei oxigenate (20 mM) și a radiațiilor ultraviolete asupra Rodaminei B, 5 μM

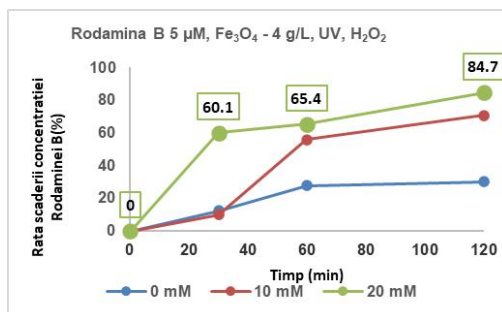


Figura 2.2.10. Rezultatele tratării Rodaminei B (5 μM) cu nanoparticule magnetice (4 g/L), apă oxigenată (10 mM și 20 mM) și radiații ultraviolete.

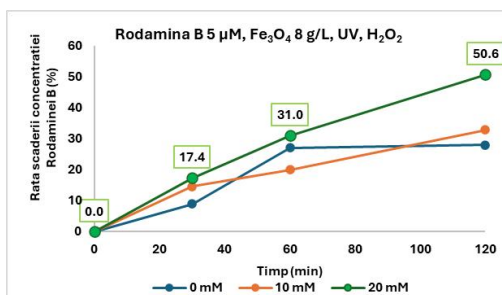


Figura 2.2.11. Rezultatele tratării Rodaminei B (5 μM) cu nanoparticule magnetice (8 g/L), apă oxigenată (10 mM și 20 mM) și radiații ultraviolete.

În Figura 2.2.10 sunt grupate rezultatele pentru cazul tratării Rodaminei B cu 4 g/L nanoparticule magnetice. Rata scăderii concentrației Rodaminei B este amplificată cel mai mult când se administrează 20 mM apă oxigenată, depășind 60% pentru toți timpii de interacțiune considerați și ajungând la 84% pentru timpul cel mai lung de interacțiune, de 120 de minute.

Pentru 8 g/L nanoparticule magnetice (Figura 2.2.11) eficiența decolorării Rodaminei B este de maxim de 50% pentru 120 de minute de interacțiune în prezența a 20 mM apă oxigenată.

2.3. STUDIAREA INTERACȚIUNII NANOPARTICULELOR MAGNETICE CU RODAMINA B ÎN CONCENTRAȚIE DE 10 μ M

Am urmărit răspunsurile unei soluții de Rodamina B 10 μ M la tratarea cu nanoparticule magnetice atât în absența cât și în prezența apei oxigenate și a expunerii la radiații ultraviolete.

Au fost testate aceleași două concentrații de nanoparticule de magnetită (Fe_3O_4), de 4 g/L și de 8 g/L. Timpii de interacțiune au fost, ca și în subcapitolul anterior, de maxim 120 de minute.

Au fost menținute și condițiile experimentale legate de iradierea cu radiații ultraviolete și administrarea de apă oxigenată.

2.3.1 Studiarea interacțiunilor Rodaminei B în concentrație de 10 μ M cu nanoparticulele magnetice

După cum se prezintă în Figura 2.3.1 a, b, am înregistrat spectrele de absorbție pentru aceleași intervale de timp pentru a urmări comparativ evoluția intensității în maximul benzii de la 554 nm pentru concentrația de Rodamina B de 10 μ M, pentru 4 g/L și 8 g/L nanoparticule.

În ambele cazuri decolorarea se produce relativ puternic, până aproape de zero și, în plus, după 120 de minute de interacțiune, maximul benzii se deplasează semnificativ către 475 nm.

Din Figura 2.3.2. se constată că în ambele cazuri se ajunge la peste 90% valoare a ratei de scădere a concentrației Rodaminei B.

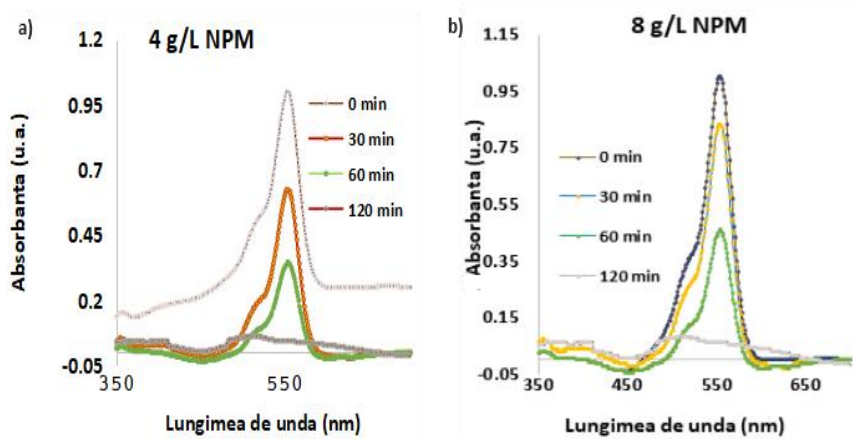


Figura 2.3.1. Influența nanoparticulelor magnetice (NPM) asupra spectrului de absorbție al Rodaminei B 10 μM. a) 4 g/L nanoparticule magnetice b) 8 g/L nanoparticule magnetice. Normalizare la valoarea absorbanței maxime la momentul inițial.

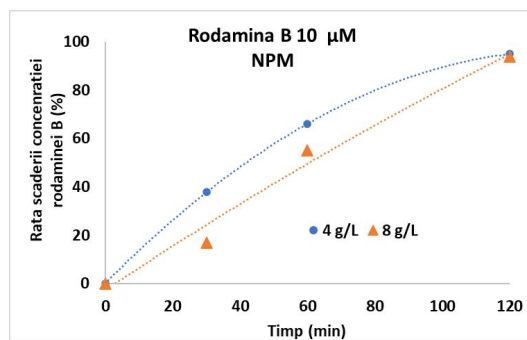


Figura 2.3.2. Eficiența tratării cu nanoparticule magnetice a soluției de Rodamina B 10 μM.

Pentru a obține noi date privind natura proceselor de interacțiune, am analizat comportarea sistemului Rodamina B 10 μM-NPM-apă oxigenată-radiații UV-C.

2.3.2. Rezultatele tratării Rodaminei B în concentrație de 10 μM cu nanoparticule magnetice, apă oxigenată și radiații UV-C

Am studiat mai întâi răspunsul spectral al Rodaminei B 10 μM la acțiunea nanoparticulelor magnetice și a radiațiilor ultraviolete, apoi procedând și la adăugarea de apă oxigenată, în aceleași cantități ca în seria de experimente prezentate mai sus pentru Rodamina B 5 μM .

2.3.2.1. Influența radiațiilor ultraviolete asupra interacțiunii nanoparticulelor magnetice cu Rodamina B 10 μM

Pentru soluția de Rodamina B 10 μM iradiată cu radiații ultraviolete și tratată cu 4 g/L NPM, scăderea intensității benzii de la 554 nm se observă ca fiind aproximativ aceeași după timpii de interacțiune de 30, 60 și 120 de minute (Figura 2.3.3) spre deosebire de cazul tratării cu 8 g/L NPM, unde scăderea este progresivă de la 30 la 60 de minute pentru ca, apoi, până la 120 de minute să rămână aproximativ neschimbată (Figura 2.3.4).

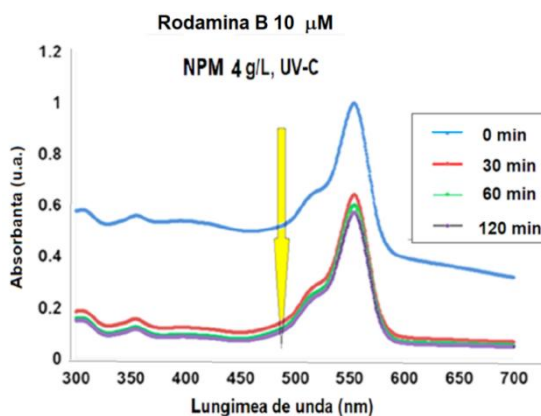


Figura 2.3.3. Scăderea intensității absorbției la 554 nm lungime de undă pentru soluția de Rodamină B 10 μM iradiată cu radiații ultraviolete și tratată cu 4 g/L NPM.

Scăderea intensității din maximum de la 554 nm ajunge la circa 57% (pentru 4 g/L NPM) și respectiv 52% (pentru 8 g/L).

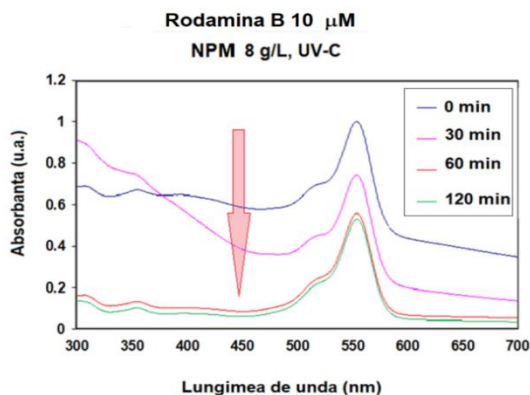


Figura 2.3.4. Scăderea intensității absorbției la 554 nm lungime de undă pentru soluția de Rodamină B 10 μM iradiată cu radiații ultraviolete și tratată cu 8 g/L NPM.

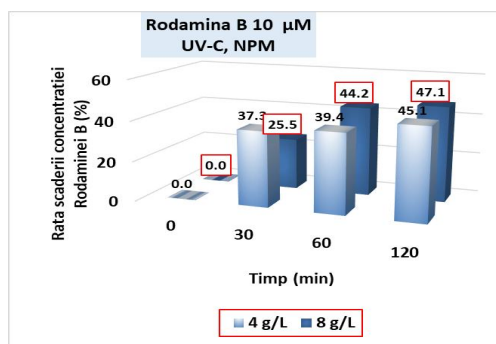


Figura 2.3.5. Rata decolorării Rodaminei B 10 μM , tratată cu nanoparticule magnetice (4g/L și 8 g/L) și cu UV-C.

Eficiența tratamentului ajunge la 45% și respectiv 57% (Figura 2.3.5).

2.3.2.2. Influența apei oxigenate asupra interacțiunii nanoparticulelor magnetice cu Rodamină B 10 μM sub iradiere cu radiații ultraviolete

Rezultatele obținute sunt redată, întâi pentru tratarea cu nanoparticule magnetice (4 g/L și 8 g/L), sub acțiunea ultravioletelor, cu suplimentare de 10 mM de apă oxigenată și apoi cu suplimentare de 20 mM de apă oxigenată. Din graficul prezentat în Figura 2.3.6 se vede că adăugarea apei oxigenate a

schimbat foarte puțin, cu 2-4%, evoluția concentrației colorantului studiat de noi față de cazul anterior – corespunzător tratării cu 4 g/L nanoparticule magnetice (Figura 2.3.3). Pentru Rodamina B 10 μM tratată cu 8 g/L nanoparticule magnetice, suplimentarea cu 10 mM apă oxigenată a adus aproape la fel de puține schimbări cantitative (4-8%) la nivelul intensității benzii de la 554 nm (Figura 2.3.7).

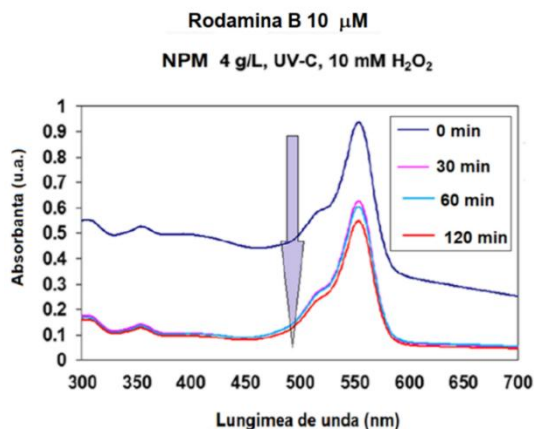


Figura 2.3.6. Scăderea intensității de absorbție a Rodaminei B 10 μM tratată cu 4 g/L nanoparticule magnetice, UV-C și 10 mM apă oxigenată.

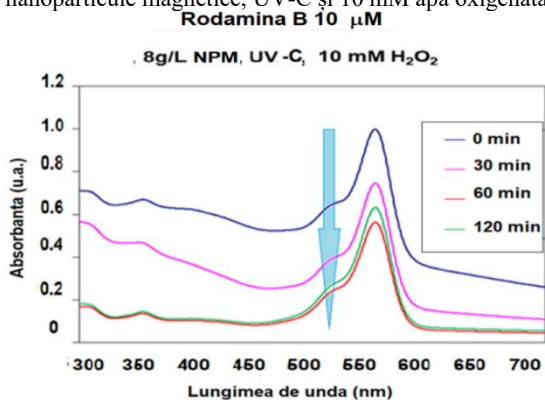


Figura 2.3.7. Scăderea intensității de absorbție a Rodaminei B 10 μM tratată cu 8 g/L nanoparticule magnetice, UV-C și 10 mM apă oxigenată.

În graficele următoare se prezintă rezultatele studiului interacțiunii Rodaminei B 10 μM cu NPM, la adăugarea unei cantități duble - 20 mM, de apă oxigenată și sub acțiunea radiațiilor ultraviolete.

Conform cu cele prezentate în Figura 2.3.8, intensitatea benzii spectrale de la 554 nm lungime de undă scade până la aproximativ 0,39 pentru 120 de minute de interacțiune cu 4 g/L NPM și 20 mM apă oxigenată în timp ce, pentru 8 g/L scăderea este mai mică, până la circa 0,48 (Figura 2.3.9).

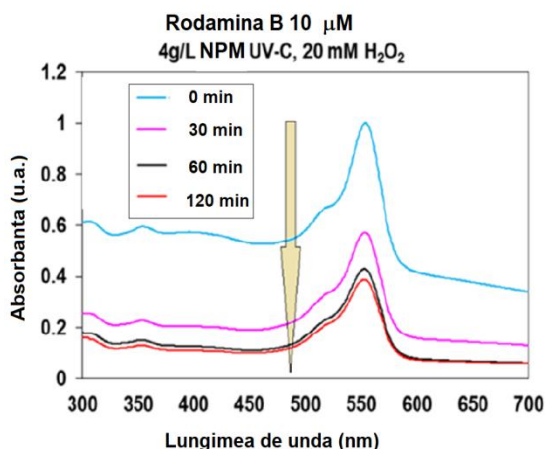


Figura 2.3.8. Scăderea intensității de absorbție a Rodaminei B 10 μM tratată cu 4 g/L nanoparticule magnetice, UV-C și 20 mM de apă oxigenată.

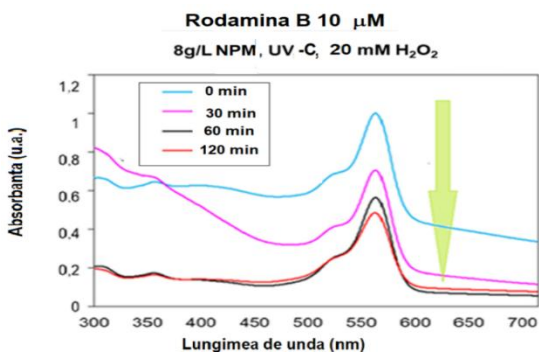


Figura 2.3.9. Scăderea intensității de absorbție a Rodaminei B 10 μM tratată cu 8 g/L nanoparticule magnetice, UV-C și 20 mM de apă oxigenată.

Un rezultat similar s-a văzut și pentru Rodamina B 5 μM unde diferența între răspunsul probei tratată cu 4 g/L NPM și al celei tratate cu 8 g/L NPM era și mai mare – fapt atribuit capacității mai mari (a probei tratate cu o cantitate mai mare de NPM) de atragere a radicalilor oxidril proveniți din descompunerea apei oxigenate.

Absorbția luminii în domeniul lungimilor de undă mai mici decât cea din maximul caracteristic colorantului studiat a înregistrat unele creșteri pentru timpul de interacțiune de 30 de minute – sugerând prezența unor produși de degradare intermediari care nu mai persistă după 60 de minute de interacțiune. În privința unor astfel de transformări menționăm cele raportate în literatura de specialitate.

Eficiența decolorării, este cea mai mare pentru 4 g/L NPM și 10 mM H_2O_2 , de circa 61 %, în timp ce pentru 8 g/L NPM este de 51 % - pentru timpul cel mai lung de interacțiune de 120 min.

Rezultate similare au raportat Khan et al., (2021), care au tratat Rodamina B 10 μM cu nanoparticule de magnetită dopată cu cupru și cu apă oxigenată 10 mM și 100 mM; autorii menționați au evidențiat rolul de catalizator al NPM prin procesele de tip Fenton de degradare a Rodaminei.

2.4. CONCLUZII

Nanoparticulele de magnetită utilizate pentru tratarea soluțiilor de Rodamina B luate ca modele de apă uzată industrială, au condus la rezultate diferite, în funcție de concentrațiile lor (4 și 8 g/L) ca și în funcție de asocierea acestui tratament cu suplimentarea cu apă oxigenată și de expunerea probelor la radiații ultraviolete.

Pentru Rodamina B 5 μM , interacțiunea doar cu nanoparticulele magnetice pe durata a 120 de minute rezultă într-o eficiență a decolorării de circa 40% pentru 4 g/L NPM și de circa 42% pentru 8 g/L NPM.

În prezența apei oxigenate și sub acțiunea radiațiilor ultraviolete s-a obținut o scădere a concentrației de colorant de 84% pentru 4 g/L NPM și 20 mM apă oxigenată și respectiv de 50% pentru 8 g/L NPM și 20 mM apă oxigenată (120 de minute sub acțiunea radiațiilor UV-C).

Pentru Rodamina B 10 μM eficiența obținută cu 4 g/L NPM este de 94% similar cu cazul a 8 g/L NPM (95%). Faptul că, prin adăugare de apă oxigenată (20 mM H_2O_2) și sub acțiunea radiațiilor UV-C, se obține 61% (pentru 4 g/L) sau 51% (pentru 8 g/L), conduce la ipoteza că radicalii oxidril

nu doar că degradează unele molecule de colorant dar și intră în competiție cu moleculele nedegradate (și eventual unii dintre produșii de degradare) pentru ocuparea situsurilor de adsorbție pe suprafața NPM. Această competiție pare să fie mai accentuată când concentrația inițială de colorant este mai mare.

Studiile pot fi continuate și în direcția reutilizării nanoparticulelor magnetice extrase din apele încărcate cu Rodamină B.

În continuare prezentăm rezultatele analizării citotoxicității Rodaminei B și a Rodaminei B degradate prin tratare cu nanoparticule magnetice asupra unor culturi de celule *in vitro*.

CAPITOLUL 3. STUDIAREA UNOR BIOEFECTE ALE RODAMINEI B ȘI RODAMINEI B DEGRADATE

Cunoscută ca o structură deosebit de stabilă, molecula de Rodamină B, cu multiplele sale utilizări în industria textilă, în cosmetice, imprimărie, și mai recent ca marker în biotehnologiile moleculare, devine subiect de interes pentru cercetările de ecobiologie care se axează pe diferite aspecte ale toxicității sale. Se profilează îngrijorarea că impactul acestui colorant asupra apelor din mediu se poate răsfrânge asupra multor viețuitoare inclusiv asupra oamenilor, cu atât mai mult cu cât, încă din 1987, Rodamina B a fost inclusă pe lista potențialilor carcinogeni de către International Agency for Research on Cancer (Cao et al., 2022).

Studii experimentale pe culturi celulare *in vitro* (Kaji et al., 1991) arată că Rodamina B în concentrații de ordinul zecilor de micrograme per mililitru induce încetinirea proliferării în culturi celulare după 48 de ore de incubare. S-a constatat că unele celule sunt afectate, prezentând formă neregulată, cu nuclee modificate în sensul degenerării lor.

Tratarea apelor încărcate cu Rodamina B poate reduce nivelul concentrației de colorant prin înlăturarea sau descompunerea lui în produșii mai simpli.

În acest capitol prezentăm întâi o descriere a reactivității chimice teoretice a produșilor de descompunere a Rodaminei B prin de-etilare și clivarea cromoforului molecular pentru ca, în partea a doua, să prezentăm rezultatele unui test de citotoxicitate efectuat pe culturi de celule.

3.1. STUDIUL CUANTUM CHIMIC AL PRODUȘILOR DE DEGRADARE A RODAMINEI B

Studiile raportate de Liang et al., (2020), axate pe degradarea Rodaminei B prin procese Fenton, propun cele două căi de modificare: prin de-etilare și prin ruperea cromoforului, cu mențiunea că, ruperea cromoforului este calea principală de fragmentare a Rodaminei B în compuși mai simpli, cu câte un singur inel aromatic, ce se pot descompune apoi până la metan, amoniac, dioxid de carbon și apă.

Conform schemei ilustrative (Figura 3.1.1) și produșii intermediari rezultați prin de-etilare suferă ulterior degradarea prin această cale.

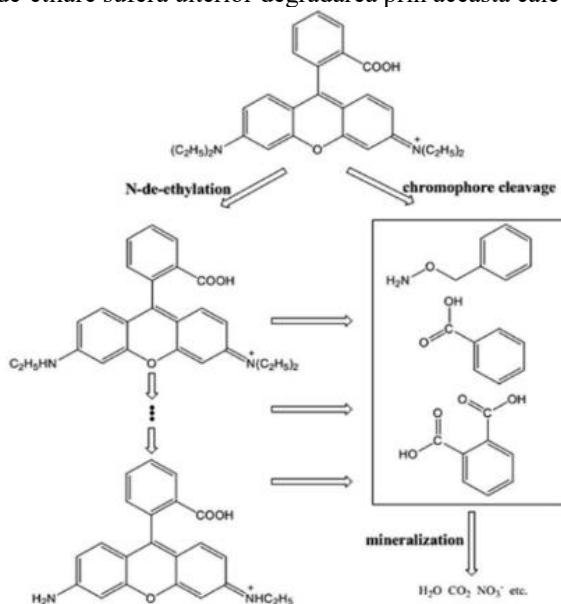


Figura 3.1.1. Schema degradării Rodaminei B prin acțiunea radicalilor oxidril rezultați în procesele de tip Fenton (Liang et al, 2020).

Prin tratarea Rodaminei B cu nanoparticule magnetice, datorită oxigenului din apă și a ionilor de fier de la suprafața cristalelor de magnetită se inițiază procese de tip Fenton prin care se eliberează radicali de oxidril ce reacționează cu moleculele de colorant.

Analiza cromatografică, efectuată de către cercetătorii menționați aici, a compoziției unei astfel de soluții a permis identificarea acidului benzoic, a benziloxiaminei și a acidului ftalic (Figura 3.1.2).

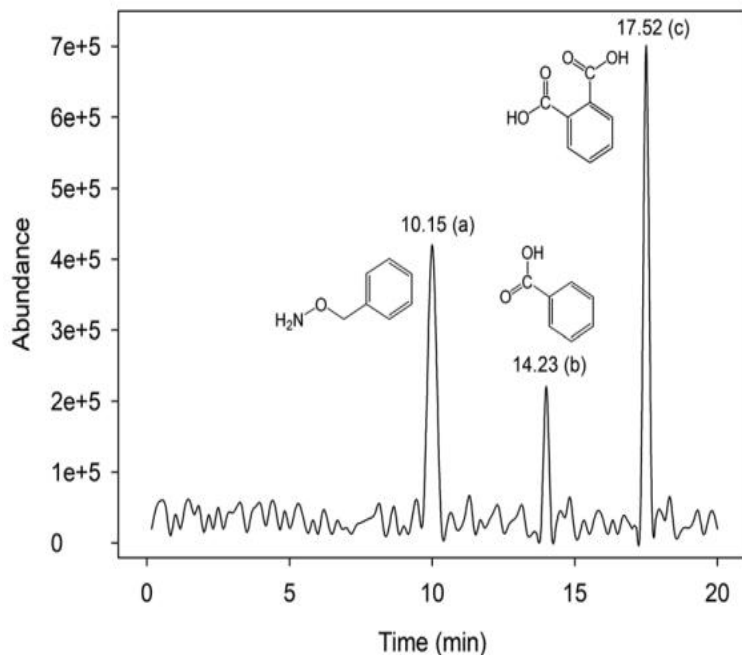


Figura 3.1.2. Producții de degradare a Rodaminei B identificați prin cromatografie (Liang et al., 2020).

3.1.1. Modelarea reactivității chimice a acidului benzoic

Au fost generate distribuțiile de densitate electronică în stare fundamentală și excitată precum și hărțile potențialului electrostatic și a celui de ionizare.

Electronii moleculari de cea mai mare importanță pentru reactivitatea chimică sunt cunoscuți ca HOMO și LUMO.

În Figura 3.1.3 se poate vedea că densitatea electronică este concentrată la nivelul inelului aromatic din structura acidului benzoic aflat în stare

fundamentală, stabilă (orbitalul HOMO) dar, prin excitare energetică, trecerea în starea mai puțin stabilă, are loc o redistribuire și către gruparea laterală de atomi a acidului benzoic (orbitalul molecular LUMO).

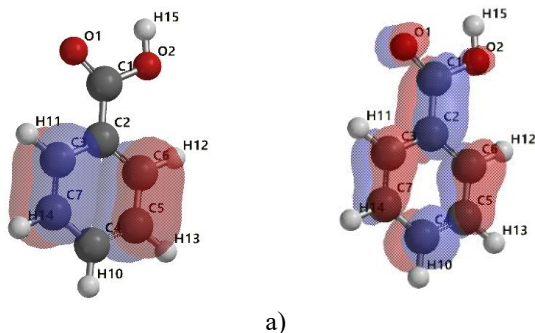


Figura 3.1.3. Orbitalii electronici moleculari de frontieră: a) HOMO; b) LUMO pentru acidul benzoic.

Potențialul de ionizare, PI, al unei molecule, reprezentând energia necesară extragerii electronului cel mai periferic, poate fi aproximat ca energia absolută E_{HOMO} ($\text{PI} = -E_{\text{HOMO}}$) în timp ce afinitatea pentru electroni (AE) a moleculei, respectiv energia necesară atragerii unui electron, poate fi corelată cu energia nivelului LUMO ($\text{AE} = -E_{\text{LUMO}}$) (Kaya, S. și Kaya, C., 2015).

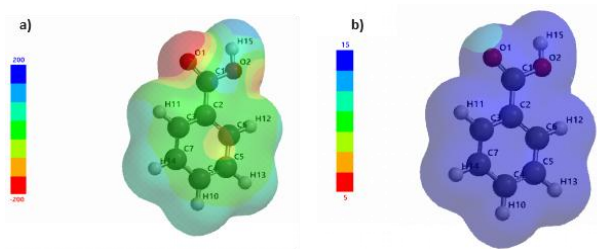


Figura 3.1.4. Distribuția spațială a: a) potențialului electrostatic b) a potențialului de ionizare pentru acidul benzoic.

Estimarea computațională a energiei orbitalilor de frontieră a condus la -10,13 eV pentru E_{HOMO} și -0,53 eV pentru E_{LUMO} , iar momentul electric de dipol calculat a fost de 2,25 D.

3.1.2. Modelarea reactivității chimice a benziloxiaminei

În reprezentările următoare se pot vedea orbitalii de frontieră și hărțile potențialului electrostatic și a celui de ionizare obținute prin modelare cuantică pentru benziloxiamină.

În stare fundamentală, distribuția spațială a densității electronice (HOMO) cuprinde atât inelul aromatic cât și gruparea de atomi laterală a benziloxiaminei - gruparea amidă, CONH_2 (Figura 3.1.5a), în timp ce în stare excitată această distribuție (LUMO) este concentrată mai ales pe inelul aromatic (Figura 3.1.5b).

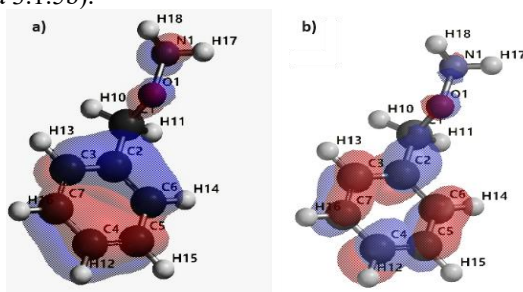


Figura 3.1.5. Orbitalii electronici moleculari de frontieră: a)HOMO; b)LUMO pentru benziloxiamină.

În proximitatea atomului de oxigen din gruparea laterală amidă (CONH_2), valoarea potențialului electrostatic atinge un vârf de negativitate, (colorație roșiatică, Figura 3.1.6a), în timp ce distribuția potențialului de ionizare (Figura 3.1.6b) arată, în mod uniform, valori pozitive de peste 10 eV (E_{HOMO} fiind de -10,66 eV iar PI se poate asimila cu $-E_{\text{HOMO}}$).

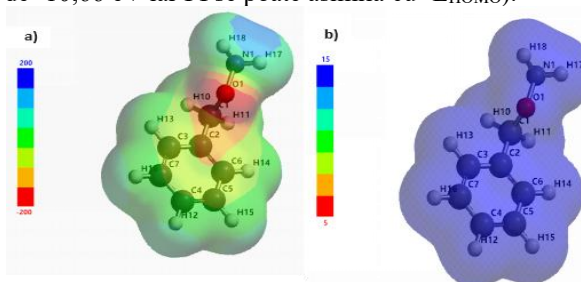


Figura 3.1.6. Distribuția spațială a: a) potențialului electrostatic; b) a potențialului de ionizare la benziloxiamină.

3.1.3. Modelarea reactivității chimice a acidului ftalic

Modelarea quantum chimică a moleculei de acid ftalic arată, în general, o complexitate mai mare decât la compușii prezentați mai sus, atât în ceea ce privește orbitalii de frontieră cât și hărțile de distribuție ale potențialului electrostatic și de ionizare.

Redistribuirea densității norului electronic între starea fundamentală (figura 3.1.7a) și cea excitată (figura 3.1.7b) este remarcabilă, aceasta fiind concentrată aproape exclusiv pe inelul aromatic în starea fundamentală, dar migrând în mare parte către cei doi substituenți carboxil, COOH, (de la atomii de carbon C2 și C6) în stare excitată.

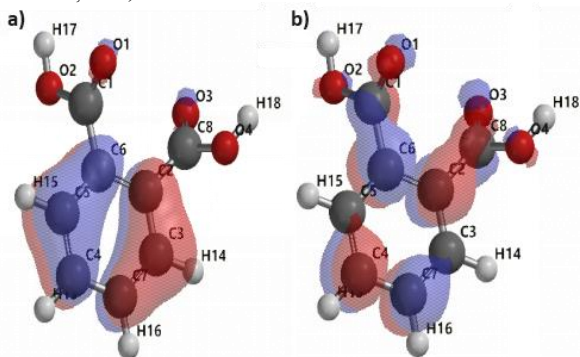


Figura 3.1.7. Orbitalii electronici moleculari de frontieră: a) HOMO (cel mai înalt orbital electronic ocupat); b) LUMO (cel mai de jos orbital electronic neocupat) pentru acidul ftalic

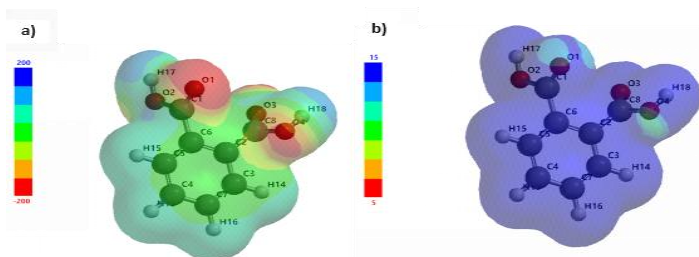


Figura 3.1.8. Distribuția spațială a: a) potențialului electrostatic; b) a potențialului de ionizare la acidul ftalic.

Potențialul electrostatic prezintă valori negative la nivelul oxigenilor O1, O2 și O3 (Figura 3.1.8a, zone marcate cu roșu) ceea ce indică disponibilitatea pentru interacțiuni de tip legături de hidrogen cu componente ale mediului proximal cu caracteristici de posibili donori de electroni.

Distribuția potențialului de ionizare (Figura 3.1.8b) arată valori relativ mari, corespunzător valorii de circa -10 eV a energiei orbitalului HOMO cu excepția situsurilor corespunzătoare atomilor de oxigen (colorație albastră mai puțin intensă).

3.2. TESTAREA CITOTOXICITĂȚII PE CULTURI DE CELULE

3.2.1 Materiale și metode

Au fost studiate efectele Rodaminei B 10 μM și 5 μM precum și a Rodaminei B 10 μM degradată și a Rodaminei B 5 μM degradate.

Soluțiile de Rodamină B 10 μM și 5 μM degradate au rezultat prin tratarea cu 8 g/L nanoparticule de magnetită și 20 mM apă oxigenată sub iradiere UV-C timp de 120 de minute, (similar cu cazul prezentat în Liang et al., (2020)), pentru care absorbanta luminii la 554 nm a scăzut la circa 48% și respectiv 0,49% față de momentul inițial. Raportând la absorbanta soluțiilor inițiale, de 1,1 și respectiv 0,55 avem absorbanțele de 0,539 pentru Rodamina B 10 μM degradată și respectiv 0,269 pentru Rodamina B 5 μM degradată.

Rezultatele studiului de degradare moleculară au fost discutate în capitolul anterior.

Materialul biologic folosit în experimentele in vitro, pentru evaluarea efectelor compușilor menționați asupra proceselor celulare, a fost reprezentat de culturi de celule sănătoase, respectiv fibroblaști pulmonari, linia V79-4 (ATCC CCL-93) de hamster chinezesc *Cricetulus griseus* (cu eficiență de răspuns relativ mare și timp de regenerare scurt (12-14 ore)).

Celulele au fost cultivate în mediu DMEM (Dulbecco's Modified Growth Medium, PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Germania) suplimentat cu ser fetal bovin 10% (Euroclone S.p.A., Milan, Italia) și soluție de antibiotic (penicilină 100 $\mu\text{g/ml}$ și streptomycină 100 UI/ml - Capricorn Scientific GmbH, Ebsdorfergrund, Germania), cultivate în incubator (Binder GmbH, Tuttlingen, Germania) la temperatura de 37 °C, în atmosferă umedă, cu 5% CO₂ (Freshney, 2006).

Evaluarea impactului asupra viabilității celulare s-a efectuat prin metoda colorimetrică cu bromură de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium (MTT), adaptată după Mosmann (1983), Laville et al., (2004), van Meerloo et al., (2011), metodă bazată pe capacitatea dehidrogenazelor mitocondriale din celulele vii de a transforma substratul hidrosolubil galben (MTT) în formazan, de culoare albastru închis, insolubil în apă.

Cantitatea de formazan rezultată este direct proporțională cu numărul de celule vii (Stockert et al., 2012). Celulele V79-4 au fost detașate cu tripsină/EDTA, apoi numărate și resuspendate în microplăci cu 96 de godeuri ($6,5 \times 10^3$ celule/godeu) și menținute în aceleași condiții de temperatură și umiditate.

După formarea monostratului (24 ore), celulele au fost expuse timp de 24 și 48 de ore la variantele de Rodamină B studiate, soluțiile fiind adăugate în mediul de cultură în următoarele volume: 10, 20, 40, 80 μ l/ml.

După finalizarea tratamentului, celulele au fost prelucrate conform testului MTT iar absorbanta a fost măsurată la 570 nm, cu ajutorul cititorului automat de microplăci Biochrom EZ Read 400 (Biochrom Ltd. Cambridge, UK). Viabilitatea celulelor a fost calculată după formula:

$$\text{Viabilitatea celulară (\%)} = E_{\text{probă}}/E_{\text{martor}} \times 100 \quad (3.1)$$

unde $E_{\text{probă}}$ este extincția (absorbanta) probei și E_{martor} este extincția matorului netratat.

Analiza statistică. Toate variantele au fost analizate în triplicat, iar rezultatele sunt prezentate ca valoare medie $\pm$ deviația standard (DevSt).

Diferența dintre valorile medii a fost exprimată folosind testul t Student (Cann, 2003).

3.2.2. Rezultate și discuții

Prezentăm viabilitatea celulară după 24 de ore și după 48 de ore de la administrarea soluțiilor studiate.

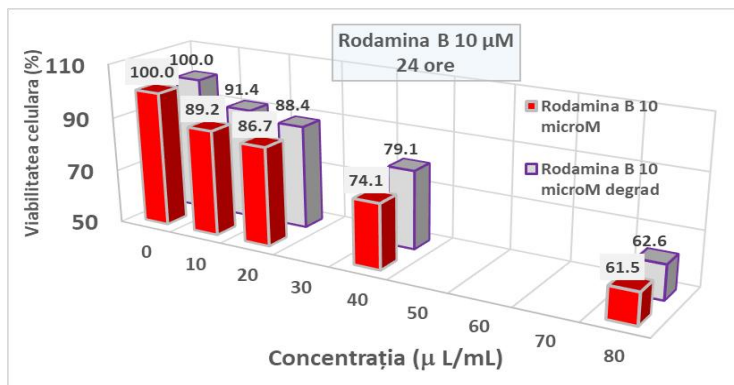


Figura 3.2.1. Influența Rodaminei B 10 μM și 10 μM degradată asupra viabilității celulare la 24 de ore. Trendul variației este unul exponențial (R^2 de 0,993 și de 0,976 respectiv).

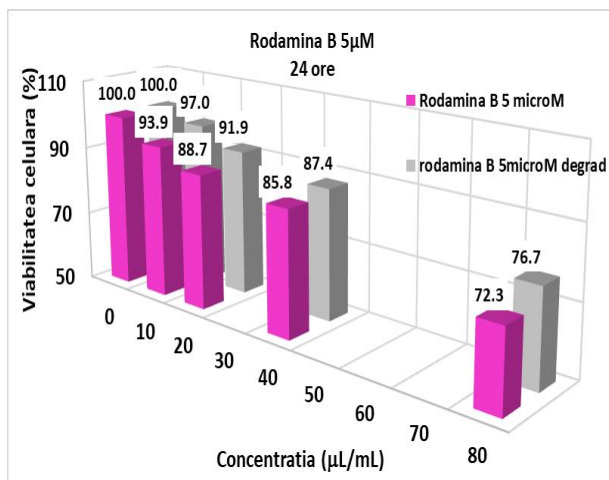


Figura 3.2.2. Influența Rodaminei B 5 μM și 5 μM degradată asupra viabilității celulare la 24 de ore. Trendul variației este unul exponențial (R^2 de 0,974 și de 0,993 respectiv).

Se poate face presupunerea că în soluțiile cu Rodamina B degradată au fost prezenți produșii finali formați prin de-etilare și clivarea cromoforului sub acțiunea radicalilor OH. Acești produși finali nu mai contribuie la colorația soluției nemaivând cromoforul Rodaminei B.

Reactivitatea lor, mai redusă față de Rodamina B, (tăria chimică fiind mai mare) este de așteptat să contribuie mai puțin la impactul soluțiilor degradate asupra culturilor de celule testate. Din graficele din figura 3.2.1 se poate vedea că, la 24 de ore, toxicitatea față de linia celulară studiată, duce la scăderea viabilității față de martorul netratat până la circa 61 % în cazul Rodaminei B 10 μ M.

Pentru Rodamina B 5 μ M (Figura 3.2.2) scăderea viabilității este redusă până la circa 72%, dar nu proporțional cu diminuarea concentrației de Rodamina B (de două ori) – sugerând că sensibilitatea celulelor studiate nu se concretizează într-un răspuns liniar doză-efect.

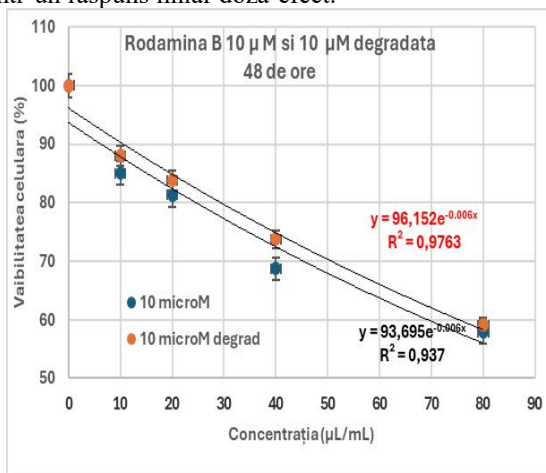


Figura 3.2.3. Influența Rodaminei B 10 μ M și 10 μ M degradată asupra viabilității celulare la 48 de ore.

Este evident că la creșterea concentrației de soluție administrată în mediul de cultură celular efectul toxic se amplifică – viabilitatea scade de la cca 89%, pentru 20 μ L/mL până la cca 61% pentru 80 μ L/mL (în cazul Rodaminei B 10 μ M) și de la 94% (pentru 20 μ L/mL) la 72% (pentru 80 μ L/mL) în cazul Rodaminei B 5 μ M.

Similar și în cazul soluțiilor care au fost supuse degradării, viabilitatea scade la 91 % pentru 20 $\mu\text{L/mL}$ Rodamina B 10 μM degradată la 62% pentru 80 $\mu\text{L/mL}$ (Fig. 3.2.1) în timp ce, pentru Rodamina B 5 μM degradată, scăderea înregistrată pentru viabilitatea celulară este de la 97% pentru 20 $\mu\text{L/mL}$ la 77 % pentru 80 $\mu\text{L/mL}$ (Fig. 3.2.2).

Ipoteza care poate explica acest răspuns se bazează pe faptul că în urma degradării au putut rezulta compuși care, nu contribuie la colorație, dar păstrează potențial toxic.

La 48 de ore au fost obținute rezultatele prezentate în figurile 3.2.3 și 3.2.4. Scăderea viabilității ajunge la 47% și respectiv la 49% pentru Rodamina B 10 μM și respectiv Rodamina B 10 μM degradată.

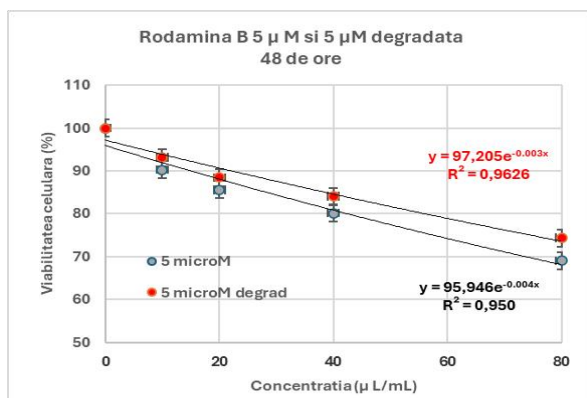


Figura 3.2.4. Influența Rodaminei B 10 μM și 10 μM M degradată asupra viabilității celulare la 48 de ore.

În ambele cazuri avem un efect citotoxic mai puțin pronunțat în culturile celulare cărora li s-a administrat Rodamina B degradată.

Aceasta este în concordanță cu rezultatele modelării computaționale asupra produșilor de degradare, ce coexistă în soluțiile supuse degradării cu moleculele de Rodamina B neafectate, și ai căror parametri de reactivitate chimică indică o stabilitate mai mare (reactivitate mai mică) decât pentru Rodamina B.

Astfel, influența lor asupra celulelor vii este mai puțin dăunătoare.

3.3. STUDIUL MORFOLOGIEI CELULARE

3.3.1 Materiale și metode

Acțiunea unor concentrații diferite de Rodamină B ($10 \mu\text{M}$ și $5 \mu\text{M}$) precum și a formelor degradate ale acestora a fost evaluată prin identificarea alterărilor la nivel citomorfologic (la fibroblaștii pulmonari, de hamster, linia V79-4) după 24 și 48 de ore de tratament), folosind un microscop inversat Nikon Eclipse TS 100 echipat cu o cameră digitală MshOt MS60.

3.3.2 Rezultate și discuții

După cum se observă în Figura 3.3.1, tratamentul cu Rodamină B $10 \mu\text{M}$ timp de 24 de ore a indus, în general, scăderea numărului de celule aderente de suprafața plăcii de cultură într-o manieră dependentă de doză. În plus, la concentrațiile relativ mari testate (40 și $80 \mu\text{L/ml}$) se constată acumularea unui număr mai mare de incluziuni roșiatice, atât sub forma unor particule individualizate de mici dimensiuni (si), cât și formațiuni sferoidale cu aspect granular (ga). La nivel celular se pot identifica alterări ale morfologiei normale, pierderea conexiunii intercelulare, iar pseudopodele, care asigură joncțiunea dintre celule, au, uneori, aspectul unor filamente foarte subțiri (ps). De asemenea, acțiunea citotoxică a Rodaminei B $10 \mu\text{M}$ s-a materializat prin distrugerea membranei celulare conducând la extravazarea conținutului celular (ex). În cazul Rodaminei B $10 \mu\text{M}$ degradate, modificările identificate la microscop sunt de mai mică amplitudine, în fotografiile selectate observându-se prezența unui număr mai mare de granulări colorate. Prelungirea tratamentului până la 48 de ore a avut ca efect intensificarea efectelor citotoxice induse de Rodamina B $10 \mu\text{M}$, fenomenele fiind vizibile și în cazul Rodaminei $10 \mu\text{M}$ degradate. Acest răspuns poate fi datorat imposibilității celulelor de a neutraliza acțiunea acestui colorant prin mecanisme fiziologice specifice. Totuși, în cazul Rodaminei B $10 \mu\text{M}$ (la 48 ore), comparativ cu Rodamina B $10 \mu\text{M}$ degradată (48 ore), se observă diminuarea incluziunilor colorate, atât a celor individuale cât și a formelor aglomerate (Figura 3.3.2).

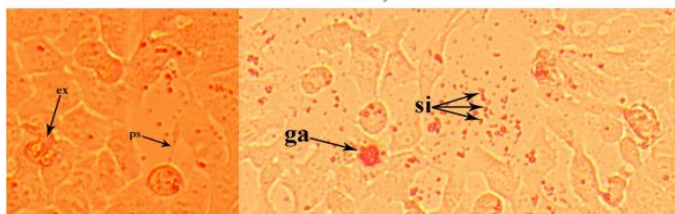
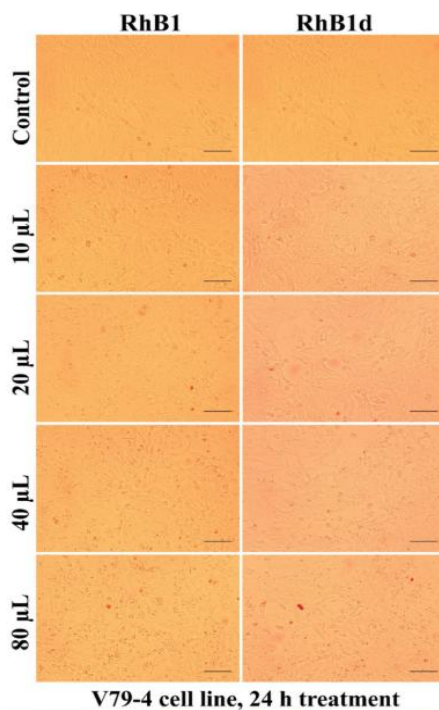
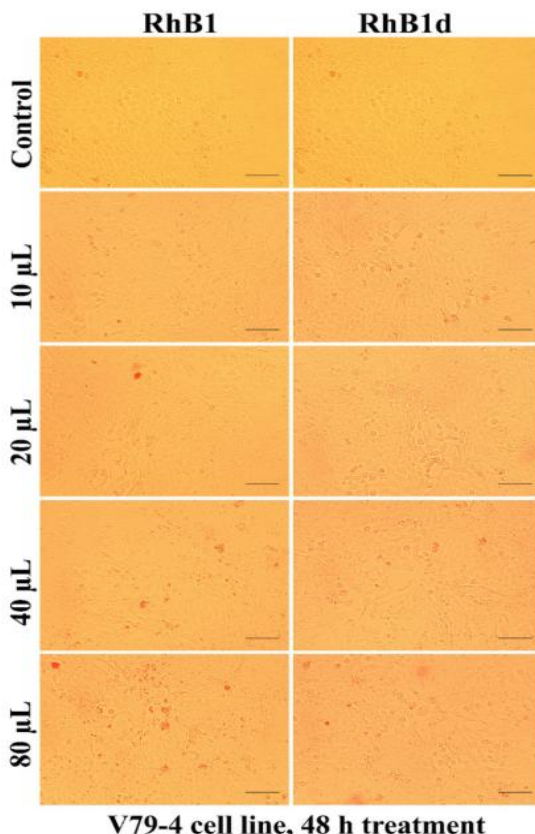


Figura 3.3.1. Aspecte morfologice ale fibroblastelor V79-4, tratate cu Rodamina B 10 μ M (RhB1) și Rodamina B 10 μ M degradată (RhB 1 d) timp de 24 de ore, evaluate prin microscopie fotonică (obiectiv 10 $\times$, riglă 100 μ m). Detaliu. ex – material celular expulzat; ps – pseudopod filamentos; ga – aglomerări granulare; si – incluziuni singulare.



V79-4 cell line, 48 h treatment

Figura 3.3.2. Aspecte morfologice ale fibroblastelor V79-4, tratate cu Rodamina B10 μM (RhB1) și Rodamina B10 μM degradată (RhB 1d) timp de 48 de ore, evaluate prin microscopie fotonică (obiectiv 10 $\times$, riglă 100 μm).

Răspunsul celulelor la tratamentul cu Rodamină B 5 μM și Rodamină B 5 μM degradată, atât după 24 cât și după 48 de ore de tratament, a fost evidențiat de modificări citomorfologice de mai mică amploare, determinate de folosirea unei concentrații mai mici de Rodamină B (Figura 3.3.3 și 3.3.4).

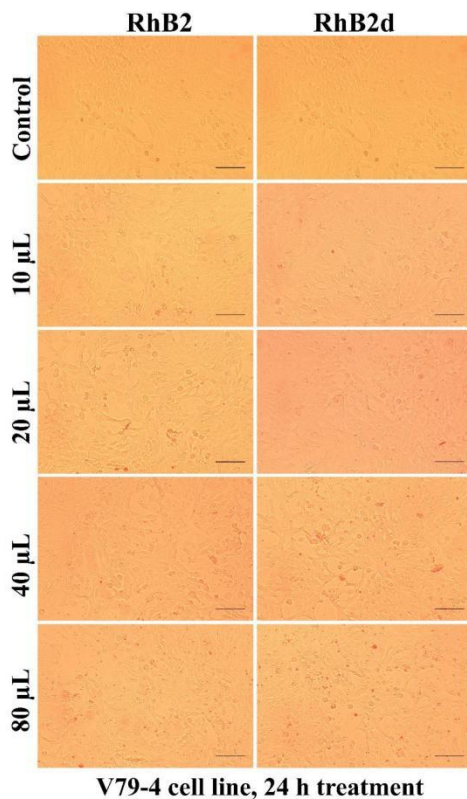


Figura 3.3.3. Aspecte morfologice ale fibroblastelor V79-4, tratate cu Rodamina B 5 μ M (RhB 2) și Rodamina B 5 μ M degradată (RhB 2d) timp de 24 de ore, evaluate prin microscopie fonică (obiectiv 10 $\times$, riglă 100 μ m).

Rezultatele reliefate de analizele la microscop sunt în concordanță cu cele obținute în cazul testului MTT, gradul de citotoxicitate exercitat de Rodamina B crescând cu doza aplicată și cu prelungirea duratei de tratament.

Din literatura de specialitate am extras câteva exemple de studii de acest fel. O serie de teste efectuate pe culturi de fibroblaști umani izolați de la nivelul buzelor (celule KD) au demonstrat efectul citotoxic al Rodaminei B aplicată în doză de 25 și 50 μ g/mL, concretizat prin scăderea proliferării celulare, detașarea celulelor de substrat, inhibarea sintezei de collagen și glicozaminoglican (Kaji et al., 1991a; Kaji et al.,1992a) ceea ce a indus

perturbarea vindecării rănilor de la nivelul buzelor și întârzierea reparării țesutului lezat.

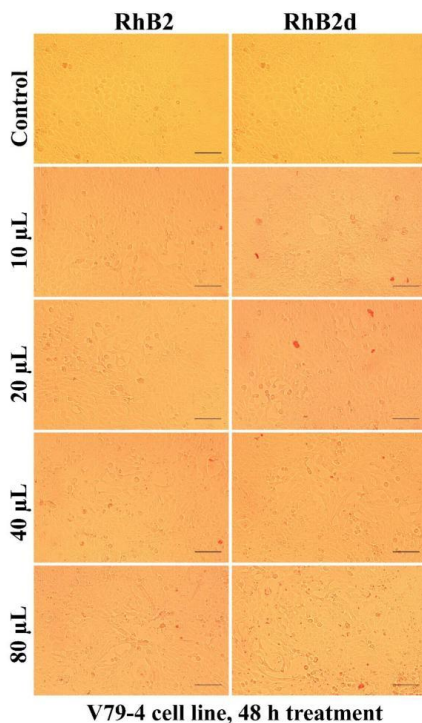


Figura 3.3.4. Aspecte morfologice ale fibroblastelor V79-4, tratate cu Rodamina B 5 μ M (RhB 2) și Rodamina B 5 μ M degradată (RhB 2d) timp de 48 de ore, evaluate prin microscopie fonică (obiectiv 10 $\times$, riglă 100 μ m).

Studiul a fost realizat în contextul folosirii acestui colorant în cosmetică, prin includerea sa în produse cu aplicabilitate la nivelul buzelor. În același context, s-a demonstrat că Rodamina B a dus la scăderea atât a numărului de celule endoteliale vasculare din aorta bovină (BAEC) cât și al celulelor musculare netede vasculare din aorta murină (A10) după aplicarea unui tratament de 72 de ore (Kaji et al., 1991b; Kaji et al., 1992b).

Discutând despre produșii de degradare ai Rodaminei B o atenție deosebită poate fi acordată acidului benzoic, un compus natural din clasa

fenolilor, care se produce și pe cale sintetică pentru utilizări diverse în industria alimentară și în cosmetică.

Toxicitatea acidului benzoic s-a evidențiat pe celule fibroblaste epidermale umane ca și pe limfocite umane, tot prin testul de viabilitate MTT (Akbaba et al., 2021). În contextul în care s-a arătat că are efect antimicrobian și antifungic și s-a evidențiat și capacitatea sa de a scădea viabilitatea în unele culturi de celule canceroase (Kabakas et al., 2024), este de așteptat să poată induce unele bioefecte și în celulele sănătoase – cum a fost și în studiul nostru.

Acidul ftalic prezintă toxicitate semnificativă (după cum arată studiile in vitro și in vivo) la nivelul activității reproductive și poate fi un factor de mutagenезă și chiar poate fi luat ca biomarker de toxicitate (Bang et al., 2011) pentru cei care lucrează în medii în care sunt expuși la acid ftalic și la esterii săi (industria cosmeticelor, a parfumurilor, a ambalajelor pentru produse alimentare, jucăriilor, și chiar a unor ustensile medicale). De exemplu s-a arătat că administrarea repetată de acid ftalic în hrana șoarecilor și iepurilor are efecte nedorite la nivelul sângelui.

3.3.3. Concluzii

Efectele toxice ale Rodaminei B au fost evidențiate în primul rând prin testul de viabilitate asupra culturilor de celule in vitro din care au rezultat scăderi ale numărului de celule viabile până la circa 60% pentru Rodamina B 10 μM și la circa 70% pentru Rodamina B 5 μM .

Pentru Rodamina B 10 μM degradată și 5 μM degradată scăderea viabilității a fost cu 2-4% mai puțin pronunțată decât la soluțiile inițiale, nedegradate. Se vede că răspunsul citotoxic nu este proporțional cu concentrația inițială de colorant iar în soluțiile degradate există încă toxicitate semnificativă.

Studiul morfologiei celulelor din culturile tratate cu soluții de colorant a evidențiat modificări care, în general, au fost mai pronunțate la Rodamina B 10 μM față de Rodamina B 5 μM : (i) acumularea unor incluziuni roșiatice, (particule individualizate și formațiuni sferoidale cu aspect granular), mai puțin pentru concentrația de 5 μM față de 10 μM); (ii) subțierea filamentelor de legătură dintre celule și distrugerea membranei celulare; (iii) inițierea apoptozei (moartea celulară programată) în celule de dimensiuni mai reduse, cu condensarea cromatinei nucleare, prin formare de corpi apoptotici în vezicule individualizate și delimitate de membrana celulară.

Aceste efecte citotoxice asupra caracteristicilor morfologice sunt mai puțin pronunțate la soluțiile de colorant supuse degradării prin tratament cu nanoparticule magnetice, apă oxigenată și radiațiile ultraviolete.

CONCLUZII GENERALE

- Nanoparticulele de magnetită pentru tratarea modelelor de apă uzată de Rodamină B au fost sintetizate în laborator iar, în urma caracterizării fizico-chimice, au prezentat proprietăți microstructurale și magnetice comparabile cu cele raportate în literatura de specialitate axată pe aplicațiile lor în științele vieții.
- Valoarea remarcabilă a magnetizației de saturație (68 emu/g) precum și valoarea foarte mică a câmpului magnetic coercitiv (82 Oe) confirmă magnetizabilitatea reversibilă la variații pozitive și negative ale câmpului magnetic extern.
- Studiarea reactivității chimice a Rodaminei B, realizată prin modelare cuantum-chimică computațională, a evidențiat proprietățile de structură moleculară stabilă, ceea ce confirmă faptul că este un poluant persistent în apele uzate deversate în mediu de unități industriale de producție de textile, vopseluri, cosmetice și altele.
- Studiarea experimentală a efectelor tratării cu nanoparticule magnetice a apelor încărcate cu Rodamină B a evidențiat rezultate diferite în funcție de concentrațiile lor (4 și 8 g/L) dar nu în directă dependență de acestea.
- Efectele toxice ale Rodaminei B asupra culturilor de celule in vitro au constat în scăderi ale viabilității celulare până la circa 60% pentru Rodamina B 10 μM și la circa 70% pentru Rodamina B 5 μM .
- Tratarea acestor culturi de celule cu Rodamina B 10 μM degradată și 5 μM degradată a evidențiat scăderea viabilității cu 2-4% față de soluțiile inițiale, nedegradate. Se vede că răspunsul citotoxic nu este proporțional cu concentrația inițială de colorant iar în soluțiile degradate există încă toxicitate semnificativă.
- Tratarea cu soluțiile degradate de Rodamină B a condus la mai puține astfel de modificări dar se constată că toxicitatea celulară nu scade pe măsura decolorării ca dovadă că produșii de degradare nu scad în mod substanțial toxicitatea soluțiilor de colorant, după cum au sugerat și rezultatele modelării computaționale a reactivității lor chimice.

- Studiile vor fi continuate pentru optimizarea parametrilor de reacție în scopul eficientizării decolorării soluțiilor de Rodamină B cu costuri cât mai reduse și cu efecte toxice cât mai diminuate.

Lista articolelor și comunicărilor științifice

Comunicări științifice

1. L. Popescu-Lipan, **Fânaru** Andreea, A. Leș, D. Creangă, Cobalt Ferrite Nanoparticles For Cleaning Phenol Loaded Wastewater, December 3rd, 2020 – ONLINE Abstract book of The Scientific Symposium Biology and Sustainable Development – Bacau, Romania, p.53
2. Andreea-Roxana **Fânaru**, M. Grigoras, G. Ababei, A. Leș, D. Creangă, Dye loaded wastewater cleaned with magnetic nanoparticles and ultraviolet radiation, comunicare poster, FTEM 24, Iași, Abstract book, pag.12
3. Andreea-Roxana **Fânaru**, L. Popescu Lipan, D. Creangă, Nanoparticule magnetice pentru epurarea apelor poluate cu coloranți, comunicare poster la conferința FarPhys 2021, Iași
4. Andreea **Fânaru**, Larisa Popescu, Anda Les, Dorina Creanga, Dana-Ortansa Dorohoi, Liviu Sacarescu, Magnetic nanoparticles interactions with wastewater pollutants, prezentare poster la ISSSMC, XXV Galyna Puchkovska International School-Seminar “Spectroscopy of Molecules and Crystals” (XXV ISSSMC) September 21-24, 2021 Kyiv, Ukraine <https://issmc.org.ua/en/archive/2021-xxv/scientific-program-xxv>
5. Andreea Roxana **Fânaru** Balint, M. Grigoras, G. Ababei, A. Les Agavriiloaei, D. Creanga, Wastewater cleaning with magnetic nanoparticles – the case of Rhodamine B, International Conference of the Doctoral Schools, mai, 2024, Iași, comunicare orală, Abstract book, p. 81
6. Andreea Roxana **Fânaru** Balint, G. Vochita, D. Gherghel, A. Agavriiloaei, D. Creanga, Study on the toxic effect of Rhodamine B on cell cultures, Conferința Națională de Biofizică, 2024, Iași, comunicare orală (rezumat acceptat), <http://uaiasi.ro/cnb2024/>

Articole publicate în reviste cu factor de impact

7. Andreea **Fânaru**, A. Les, D. Creanga, D. Dorohoi, L. Sacarescu (2022) Magnetic nanoparticles interactions with wastewater pollutants, Molecular

Crystals and Liquid Crystals, 749:1, 93-106, DOI: 10.1080/15421406.2022.2068476 Impact factor 0,7 AIS 0,098

8. A. R. **Fanaru**, M. Grigoras, G. Ababei, L. Oprica, D. Creanga, A study on the impact of magnetic nanoparticles on dye loaded wastewater -the case of Rhodamine B, Romanian Journal of Physics, 2024, acceptat Impact factor 1,2 AIS 0,162

9. G. Vochita, A. R. **Fanaru**-Balint, D. Gherghel, A. Agavriiloaei, D. Creanga, Rhodamine B toxicity in mammalian cell cultures - theoretical and experimental approach, trimisă la Water, Air, and Soil Pollution Impact factor 3,8 AIS 0,616

Articole publicate în reviste științifice fără factor de impact

10. Andreea **FANARU**, L. Popescu, D. Creangă, Water cleaning with magnetic nanoparticles, Rev. Fiz. Med., Volumul 7, Numarul 2, pp. 13-19, 2019, <https://sites.google.com/a/medicalphysics.ro/rfm/articole/2019>

11. C. Moroșanu, Andreea Roxana **Fanaru**, D. Creangă, Theoretical simulation of some molecules for the stabilization of magnetic nanoparticles in biocompatible suspensions for biomedical applications, Rev. Fiz. Med., Vol. 8, No. 3, pag.17-20, 2020, <https://sites.google.com/a/medicalphysics.ro/rfm/articole/2020>

12. **Fânaru** Andreea-Roxana, L. Popescu, L. Oprică, D. Creangă, Synthesis of Silver Suspensions for Various Applications -Laboratory Lessons for Master Students in Multidisciplinary Master Program, Rev. Șt. „V. Adamachi”, vol. XXVII, nr. 1-4, 2018, [file:///D:/Downloads/Synthesis-of-Silver-Suspensions-for-Variouss-Laboratory-Lessons-for-Master-Students-in-Multidisciplinary-Master-Programs%20\(1\).pdf](file:///D:/Downloads/Synthesis-of-Silver-Suspensions-for-Variouss-Laboratory-Lessons-for-Master-Students-in-Multidisciplinary-Master-Programs%20(1).pdf)

Membru în echipele unor proiecte științifice internaționale

13. A. **Fanaru**, membru, Proiect bilateral, JINR-Ro, nr. 04-4-1121/2020 item 34, title Combined study of the structure and properties of molecules for optimal interaction with magnetic nanocore surface for various applications of resulted nanoparticles: structural characterization and theoretical quantum mechanical analysis (Lucian Blaga University in Sibiu in partnership with Alexandru Ioan Cuza University in Iasi, Romania) responsible UAIC, D. Creanga

Articole în volume de conferință indexate Scopus, fără factor de impact

14. Morosanu C, Popescu-Lipan L, Sacarescu L, **Fanaru AR**, Creanga D. Theoretical modeling and experimental study of sodium oleate properties for wastewater cleaning with magnetic nanoparticles stabilized with oleate. In E3S Web of Conferences, International Conference on Efficient Production and Processing (ICEPP-2021), St. Petersburg, Russia, (Vol. 247, p. 01025, 4pp). EDP Sciences.
https://www.e3s-conferences.org/articles/e3sconf/abs/2021/23/e3sconf_icepp21_01025/e3sconf_icepp21_01025.html

Referințe bibliografice

- Abdullah, F. H., Rauf, M. A., & Ashraf, S. S., Dyes pigm., 72(3), 2007, 349-352.
Ajiboye, T. O., Oyewo, O. A., Onwudiwe, D. C., FlatChem, 29, 2021, 100277.
Akbaba, G. B., Akbaba, U., & Öztürkkan, F. E., Fuller. Nanotub. Car. N, 29(11), 2021, 937-943.
Al-Kahtani, A. A., J. Biomater. Nanobiotechnol., 8, 2016, 66 – 82.
Andrade, A. L., Souza, D. M., Pereira, M. C., Fabris, J. D., & Domingues, R. Z... Ceramica, 2009, 420 - 424.
Avasthi, A., Caro, C., Pozo - Torres, E., Leal, M. P., Garcia - Martin, M. L., Top. Curr. Chem., 2020, 378:40.
Bahrizal, F. A., & Kurniawati, D., Int. Conf. Biol. Sci. Educ. (ICoBioSE), 10, 2019, 273-2276.
Baldev, E., MubarakAli, D., Ilavarasi, A., Pandiaraj, D., Sheik Syed Ishack, K. A., Thajuddin, N., Colloids Surf. B Biointerfaces, 105, 2013, 207 - 214.
Bang, D. Y., Lee, I. K., & Lee, B. M., Toxicol. Res., 27, 2011, 191-203.
Beveridge, J. S., Stephens, J. R., Williams, M. E., Ann. Rev. Anal. Chem., 2011, 4, 251–273.
Bhavani, M., Rajababu, C. H., Arif, M. D., Venkata Subba Reddy, I., & Ramamanohar Reddy, N., J. Magn. Magn. Mater., 2017, 459 - 466.
Biehl, P., Von der Luhe, M., Dutz, S., & Schacher, F. H. Polymers, 10 (1) 2018, 91.
Cann, A. J. Maths from Scratch for Biologists, 2003, John Wiley & Sons, Chichester, 83-146.
Cao, H. L., Yang, C., Qian, H. L., & Yan, X. P., J. Chromatog. A, 1673, 2022, 463133.
Chaki, S. H., Malek, T. J., Chaudhary, M. D., Tailor, J. P., & Deshpande, M. P., Adv. Nat. Sci., Nanosci. Nanotechnol., 6, 2015, 035009.

Colombo, M., Carregal - Romero, S., Casula, M. F., Gutierrez, L., Morales, M. P., Bohm, I. B., Heverhagen, J. T., Prosperi, D. & Parak, W. J., *Chem. Soc. Rev.*, 2012, 41, 4306 - 4334.

Cui, H., Ren, W., Lin, P., & Liu, Y., *J. Exp. Nanosci.*, 8, 2013, 869–875.

Deveci, İ., & Mercimek, B., *Ultrason. Sonochem.*, 51, 2019, 197-205.

Faraji, M., Yamini, Y., & Rezaee, M., *J. Ir. Chem. Soc.*, 2010, 1 - 37.

Flores, A., Nesprias, K., Vitale, P., Tasca, J., Lavat, A., Eyler, N. & Canizo, A., *Aust. J. Chem.*, 67(4), 2013, 609 – 614.

Freshney, R. I. In: *Culture of Cells for Tissue Engineering*; Vunjak-Novakovic, G., Freshney, R. I., Eds.; John Wiley & Sons: Hoboken, NJ, USA, 2006, 3–22.

Frey, N. A., Peng, S., Cheng, K., Sun, S., *Chem. Soc. Rev.*, 2009, 2532 - 2542.

Fried, T., Shemer, G., & Markovich, G., *Adv. Mater.*, 2001, 1158 - 1161.

Gazeau, F., Baravian, C., Bacri, J. C.; Perzynski, R., Shliomis, M. I., *Phys. Rev. E*, 56, 1997, 614-617.

Gehrke, I., Geiser, A., & Somborn-Schulz, A., *Nanotechnol., Sci. Appl.*, 2015, 1-17.

Ghasemi, A., Es'haghi, Z., & Jamali, M. R., *Water Environ. J.*, 32 (4), 2018, 630-636.

Ghosh, M. K., Poinern, G. E. J., Issa, T. B., & Singh, P., *Korean J. Chem. Eng.*, 29, 2012, 95–102.

Gu, J., Luo, C., Zhou, W., Tong, Z., Zhang, H., Zhang P., & Ren, X., *Ultrason. Sonochem.*, 68, 2020, 105181.

Gubin, S. P., Koksharov, Y. A., Khomutov, G. B., & Yurkov, G. Y., *Russ. Chem. Rev.*, 2005, 489-520.

Gubin, S. P., *Magnetic Nanoparticles*. Moscow: Wiley-VCH, 2009.

Hasan, S. G. A., Gupta, A. V., & Reddi, B. V., *Mater. Today: Proceedings*, 47, 2021, 4137-4141.

He, H., Chai, K., Wu, T., Qiu, Z., Wang, S., Hong, J., *Materials*. 15, 2022, 4058.

Hilger, I., Hiergeist, R., Hergt, R., Winnefeld, K., Schubert, H., Kaiser, W. A., *Invest. Radiol.*, 2002, 580 - 586.

Hyeon, T., *RSC Chem. Commun.*, 8, 2003, 927-934.

Issa, B. & Obaidat, I. M., *Top. Curr. Chem.* 40, 2020, 378.

Jadhav, S. A., Garud, H. B., Patil, A. H., Patil, G. D., Patil, C. R., Dongale, T. D., & Patil, P. S., *Colloids Interface Sci. Commun.*, 30, 2019, 100181.

Jakimińska, A., Pawlicki, M., & Macyk, W., *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, 433, 2022, 114176.

JCPDS card No. 19-0629.

Jiang, S., Eltoukhy, A.A.; Love, K.T.; Langer, R.; Anderson, D.G. *Nano Lett.* 2013, 13, 1059–1064.

Kabakaş, H. Ö., Kürkçü, M. S., & Taşdelen, K. A. O., & Çöl, B. *Eskişehir Techn. Univ. J. Sci. Technol. A-Appl. Sci. Eng.*, 25(1), 2024, 66-77.

Kaji, T., Kawashima, T., Sakamoto, M., Kurashige, Y., & Koizumi, F, *Toxicology*, 68(1) 1991b, 11–20.

Kaji, T., Kawashima, T., Yamamoto, C., & Sakamoto, M., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 11, 1991a, 82-89.

Kaji, T., Kawashima, T., Yamamoto, C., & Sakamoto, M., *Toxicol. Lett.*, 61, 1992, 81-87.

Kaji, T., Kawashima, T., Yamamoto, C., Sakamoto, M., Kurashige, Y., & Koizumi, F., *Toxicol. Lett.*, 60, 1992b, 69-74.

Karthickraja, D., Karthi, S., Kumar, G. A., Sardar, D. K., Dannangoda, G. C., Martirosyanf K. S., & Girij, E. K., *New J. Chem.*, 43, 2019, 13584.

Kaur, R., Hasan, A., Iqbal, N., Alam, S., Saini, M. K. & Raza, S. K., *J. Sep. Sci.*, 2014, 37, 1805–1825.

Kaya, S., & Kaya, C., *Comput. Theor. Chem.*, 1060, 2015, 66–70.

Kennaz, H., Harat, A., Guellati, O., Momodu, D. Y., Barzegar, F., Dangbegnon, J. K., Manyala, N., Guerioune, M., *J. Solid State Electrochem.*, 2017, 22, 835 - 847.

Khan, A., Valicsek Z., & Horváth, O., *Hung. J. Ind. Chem.*, 49(1), 2021, 9-16.

Laville, N.; Ait-Aïssa, S.; Gomez, E.; Casellas, C.; Porcher, J., *Toxicology*, 196, 2004, 41–55.

Lawal, O., Dussert, B., Howarth, C., Platzer, K., Sasges, M., Muller, J., Whitby, E., Stowe, R., Adam, V., Witham, D., Engel, S. Posy, P., & van de Pol. A., *IUVA News* 10(1), 2008,14–17.

Liang, L., Cheng, L., Zhang, Y., Wang, Q., Wu, Q., Xue, Y., & Meng, X., *R. S. C. Adv.*, 10(48), 2020, 28509-28515.

Lopez Maldonado, K. L., De La Presa, P., De La Rubia, M. A., Crespo, P., De Frutos, J., Hernando, A., ... & Elizalde Galindo, J. T., *J. Nanopart. Res.*, 16, 2014, 1-12.

Lu, A.-H., Salabas, E., & Schuth, F., *Angev. Chem. Int.*, 2007, 1222 - 1244.

Luo, X., Zhang, F., Li, Q., Xia, Q., Li, Z., Li, X., Ye, W., Li, S., Ge, C., *J. Phys.: Condensed Matter.*, 2020, 32(33), 334001.

Maity, S., Kale, S. N., Kaul - Ghanekar, R., Xue, J. M., & Ding, J., *J. Magn. Magn. Mater.*, 2009, 3093 - 3098.

Maryanti, S. A., Suciati, S., Wahyuni, E. S., Santoso, S., Wiyasa, W. A., , Cukurova *Med. J.*, 39 (3), 2014, 451 - 457.

Massart, R., *IEEE Trans. Magn.*, 17, 1981, 1247-1248.

Mehrdad, A., Massoumi, B., & Hashemzade, R., *Chem. Eng. J.*, 168(3), 2011, 1073 -1078. Phomphoonthanyakit, S., Secharaj, P., Damrongsak P., & Locharoenrat, K., *J. Spectrosc.*, 2019, 2853989.

Mody, V. V., Cox, A., Shah, S., Singh, A., Bevins, W., Parihar, H., *Appl. Nanosci.*, 2014, 4, 385 – 392.

Mosmann, T. J. *Immunol. Methods*, 1983, 65, 55–63.

Music, S., Mössbauer, J. *Mol. Struct.*, 834–836, 2007, 445–453.

Narayani, H., Jose, M., Sriram, K., & Shukla, S., *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 25(21), 2017, 20304–20319.

Palanisamy, S., Wang, Y.-M., *Dalton Trans.*, 2019, 48, 9490–9515.

Panciera, M., *Natl. Shellfries Assoc. Proc.*, 58, 1967, 7–8.

Panneerselvam, P., Morad, N., Tan, K. A. & Mathiyarasi R., *Sep. Sci. Technol.*, 47, 2012, 742 - 752.

Patil, S. P., Sanadi, K. R., & Helavi, V., *Mater. Res.*, 20(6), 2017, 1445-1453.

Patterson, A., The Scherrer, *Phys. Rev.*, 56 (10), 1938, 972.

Peng, L., Qin, P., Lei, M., Zeng, Q., Song, H., Yang, J., Shao, J., Liao, B., Gu, J., *J. Hazardous Mater.*, 209 - 210, 2012, 193 - 198.

Peres, E. C., Slaviero, J. C., Cunha, A. M., Hosseini-Bandegharaci, A., & Dotto, G. L., *J. Environ. Chem. Eng.*, 6(1), 2018, 649–659.

Pérez, P., Domingo, L. R., Aizman, A., & Contreras, R., *Theor. Comput. Chem.*, 19, 2007, 139-201.

Prasad, P. S. R., Prasad, K. S., Chaitanya, V. K., Babu, E. V. S. S. K., Sreedhar, B., & Murthy, S. R. J., *J. Asian Earth Sci.*, 27, 2006, 503–511.

Puşcaşu, E., Sacarescu, L., Lupu, N., Grigoraş, M., Oancă, G., Balasoiu, M., & Creanga, D., *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, 79, 2016, 457-465.

Ristic, M., De Grave, E., Music, S., Popovic, S., & Orehovec, Z. *J. Mol. Struct.*, 454, 2007, 834–836.

Rowiński, P. M., Chrzanowski, M. M., *Acta Geophys.* 59, 2011, 91–109.

Roy, R. K., *J. Phys. Chem. A*, 108(22), 4934-4939, 2004, 1939978–982.

Rumenapp, C., Gleich, B., Haase, A., *Pharm. Res.*, 2012, 1165 - 1179.

Safi, R., Ghasemi, A., Shoja-Razavi, R., & Tavousi, M., *J. Magn. Magn. Mater.*, 2015, 396, 288–294.

Safitri, Y. A., Indrawa, I. W. A., & Winarsih, S., *Toxicol. Rep.*, 2, 2015, 1434-1436.

Schwertmann, U., & Murad, E., *Clay Clay Miner.*, 1983, 277 - 284.

Shao, Y., Molnar, L. F., Jung, Y., Kussmann, J., Ochsenfeld, C., Brown, S. T., ... & Head-Gordon, M., *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 8(27), 2006, 3172-3191.

Sharma, J., Sharma, S., Bhatt, U. & Soni, V., *J. Hazardous Mater. Lett.*, 3, 2022.

Sisay, W. A., *Int. Res. J. Eng. Technol.*, 2019, 349 - 355.

Stewart, J. J. P., *Method. J. Comput. Chem.*, 10 (2), 1989, 209–220.

Stockert, J. C. Blázquez-Castro, A. Cañete, M. Horobin, R.W.; Villanueva, Á. *Acta Histochem.*, 2012, 114, 785–796.

Sulistina, D. R., & Martini, S., *J. Public Health Res.*, 92, 2020, 1812, 101-104.

Teja, A. S., & Koh, P. Y., *Prog. Cryst Growth Charact. Mater.*, 2008, 22 - 45.

Thiesen, B., Jordan, A., *Int. J. Hyperthermia*, 2009, 467 – 474.

van Meerloo, J. Kaspers, G.J.L. Cloos, *Methods Mol. Biol.*, 731, 2011, 237–245.

Wang, L., Zhang, Y., & Qian, J., *Chem. Eng. J. Adv.*, 8, 2021, 100171.

Wang, Y., Nkurikiyimfura, I., & Pan, Z., *Chem. Eng. Commun.*, 2015, 616-621.

Wei, Y., Han, B., Hu, X., Lin, Y., Wang, X., & Deng, X., *Procedia Eng.*, 2012, 632 - 637.

Włodarczyk, A., Gorgon, S., Radon, A., Bajdak - Rusinek, K., *Nanomater.*, 2022, 12, 1807.

Xiao, Y., Deng, Y., Huan, W., Li, J., Zhang, J., & Xing, M., *Mater. Today, Chem.*, 11, 2019, 86–93.

Zaidan, A. H., & Yasin, M., *J. Optoelect. Adv. Mater.* 18(11-12), 2016, 988-992.