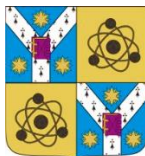


Universitatea "Alexandru Ioan Cuza", Iași
Departamentul Fizică



Rezumat teză de doctorat

**NANOPARTICULE ÎN SUSPENSII COLOIDALE CU IMPACT
ASUPRA UNOR MEDII BIOLOGICE**

Drd. Maria ANDRIEȘ

COORDONATOR ȘTIINȚIFIC
Prof. Dr. Felicia IACOMI

IAȘI 2018

Universitatea "ALEXANDRU IOAN CUZA", Iași
Școala Doctorală a Facultății de Fizică

La data de 03.09.2018, ora 10:00, în sala L1, dna. ANDRIES Maria va susține, în sesiune publică, teza de doctorat cu titlul NANOPARTICULE ÎN SUSPENSII COLOIDALE CU IMPACT ASUPRA UNOR MEDII BIOLOGICE, în vederea obținerii titlului științific de doctor în domeniul FIZICĂ.

Comisia de doctorat are următoarea componență:

Președinte:

Prof. univ. Dr. Diana Mihaela Mardare, Universitatea Alexandru Ioan Cuza din Iași

Conducător științific:

Prof. Univ. Dr. Felicia Iacomi, Universitatea Alexandru Ioan Cuza, Iași

Referenți:

Prof. Univ. Dr. Viorica Simon, Facultatea de Fizică, Universitatea Babeș-Bolyai, Cluj-Napoca

Cercet. Princ. Gr. II., Fiz. Dr. Daniel Timpu, Institutul de Chimie Macromoleculare Petru Poni, Iași

Prof. Univ. Dr. Emilia Dorina Creangă, Facultatea de Fizică, Universitatea Alexandru Ioan Cuza, Iași

CUPRINS

INTRODUCERE	4
I SINTEZA, CARACTERIZAREA ȘI APLICAȚIILE BIOMEDICALE ALE NANOPARTICULELOR	
1.1 Metode de sinteză a nanoparticulelor	6
1.2 Metode de caracterizare a nanomaterialelor	7
1.3 Concluzii	8
II STUDIUL UNOR NANOPARTICULE MAGNETICE ȘI EFECTULUI LOR ASUPRA MICROORGANISMELOR	
2.1. Sinteza și caracterizarea structurală a nanoparticulelor de ferită de cobalt	9
2.2. Studiul influenței nanoparticulelor de ferită de cobalt asupra unor microorganisme	11
2.3. Concluzii	13
III STUDIUL NANOPARTICULELOR DE AUR ȘI EFECTULUI LOR ASUPRA MICROORGANISMELOR	
3.1. Sinteza și caracterizarea suspensiilor de aur cu nucleație incompletă. Studiul efectului iradierii cu lumină de diferite lungimi de undă	14
3.2. Sinteza și caracterizarea suspensiilor de aur cu nucleație completă. Studiul efectului expunerii la lumină de diferite lungimi de undă	19
3.3. Studiul influenței iradierii AuNPs cu nucleație incompletă asupra fungilor celulolici	25
3.4. Concluzii	26
IV STUDIUL NANOPARTICULELOR DE ARGINT ȘI EFECTULUI LOR ASUPRA MICROORGANISMELOR	
4.1. Sinteza și caracterizarea nanoparticulelor de argint	27
4.2. Evaluarea efectelor nanoparticulelor de argint în dezvoltarea fungilor celulolici	28
4.3. Concluzii	30
CONCLUZII GENERALE	31
ACTIVITATE ȘTIINȚIFICĂ	32

INTRODUCERE

Nanotehnologie și nanoparticule

La momentul actual, nanotehnologia este într-o continuă dezvoltare, fiind constant diversificată datorită eforturilor susținute a numeroase echipe de cercetători din întreaga lume.

Dimensiunea redusă a nanoparticulelor, sub 100 nm, le face să se comporte în mod semnificativ diferit față de materialele de dimensiuni mari, ca urmare a efectelor de suprafață și efectelor cuantice. Acești factori afectează reactivitatea chimică a materialelor, precum și proprietățile lor mecanice, optice, electrice și magnetice.

Importanța studiului nanoparticulelor de ferită de cobalt

Feritele de cobalt au proprietăți specifice, care le fac interesante pentru aplicații medicale. Principalul motiv, pentru care acestea sunt utilizate pentru izolarea acidului deoxiribonucleic, creșterea sensibilității în MRI, în hipertermie, ca agent de încălzire pentru transportul activat magnetic de medicamente și dezvoltarea de biosenzori, constă în anizotropia magneto-cristalină ridicată, datorată cuplajului spin-orbită [1].

Importanța studiului nanoparticulelor de aur

Nanoparticulele de aur (AuNPs) sunt utilizate în biomedicină pentru terapii fototermice și fotodinamice, livrare țintită de medicamente, ADN și antigene, vizualizarea optică de țesuturi și celule și alte aplicații. Performanța fotocatalitică a AuNPs poate fi ajustată prin schimbarea dimensiunii, a formei și de asemenea a proprietăților de suprafață. [2].

Importanța studiului nanoparticulelor de argint

Nanoparticulele de argint (AgNPs) au captat un interes deosebit deoarece dețin o serie de proprietăți (proprietățile optice și electrice depind de mărime și formă) care sunt importante în diferite aplicații, precum biosenzori, componente electronice, fibre compozite, materiale criogenice superconductoare, produse farmaceutice și cosmetice [3].

Obiectivele cercetării științifice

Principalul scop al acestui studiu este acela de a dezvolta/optimiza tehnici de obținere a unor materiale metalice și oxidice nanostructurate (nanoparticule

magnetice, nanoparticule de aur și argint), care să asigure controlul distribuției dimensionale și care să permită o abordare ecologică pentru stabilizarea și biocompatibilizarea nanoparticulelor în soluție apoasă, pentru aplicații în biotehnologia, farmacologia și medicină, și de a investiga impactul acestora la interacțiunea cu mediul biologic, cu accent pe citotoxicitate.

Ne-am propus un studiu experimental privind stresul oxidativ indus de nanoparticulele de aur (AuNPs) neiradiate și iradiate în celulele unor fungi din mediu, *Phanerochaete chrysosporium*, având în vedere:

-efectele dăunătoare ale nanoparticulelor metalice eliberate în ape și soluri (după diverse utilizări pentru care au fost sintetizate)

-posibilitatea de a stimula culturi fungice celulolitice administrându-le AuNPs pentru a obține enzime benefice.

Structura prezentului studiu

Teza este structurată pe patru capitole, fiind precedată de o introducere și urmată de concluzii.

Primul capitol prezintă o scurtă trecere în revistă a literaturii științifice cu privire la sinteza, caracterizarea și aplicațiile biomedicale ale nanoparticulelor metalice. În Capitolul 2 sunt discutate rezultatele originale legate de sinteza, caracterizarea structurală și interacțiunea cu microorganismele a nanoparticulelor magnetice de ferită de cobalt. Capitolul al treilea prezintă rezultatele originale legate de sinteza, iradierea cu diferite lungimi de undă, caracterizarea și efectul asupra fungilor celulolitici a nanoparticulelor de aur. Capitolul al patrulea prezintă sinteza nanoparticulelor de argint, caracterizarea și investigarea bioefectelor induse de AgNPs, în dezvoltarea fungilor celulolitici.

La finalul tezei sunt prezentate concluziile, axate pe rezultatele originale ale studiilor efectuate și cu activitatea științifică desfășurată pe perioada doctoratului.

Bibliografie selectivă

[1] I. Sharifi, H. Shokrollahi, M.M. Doroodmand, R. Safi, J. Magn. Mater. 324 (2012) 1854–1861.

[2] H. Y. Zhu, X. B. Ke, X. Z. Yang, S. Sarina, H. W. Liu, Angew. Chem. 122 (2010) 9851-9855.

[3] J.S Kim., E. Kuk, K. N. Yu, J. H. Kim, S. J. Park, H. J. Lee, S. H. Kim, Y.K. Park, Y. H. Park, C.Y. Hwang, Y. K. Kim, Y. S. Lee, D. H. Jeong, M. H. Cho, Nanomedicine. ISSN 3(1) (2007) 95–101.

Capitolul 1

SINTEZA, CARACTERIZAREA ȘI APLICAȚIILE BIOMEDICALE ALE NANOPARTICULELOR

1.1. Metode de sinteză a nanoparticulelor

1.1.1 Generalități

Nanoparticulele pot fi obținute apelând la metode de sinteză ce includ metode chimice, cum ar fi precipitarea chimică, microemulsia, sinteza electrochimică, descompunerea termică sau metode fizice bazate pe microunde, ablația laser, reducerea sonochimică, etc. Metodele de sinteză determină, în mare măsură, mărimea și forma nanoparticulelor, intervalul de distribuție a mărimii particulelor, chimia suprafeței și în consecință, proprietățile și aplicațiile acestora

1.1.2 Sinteza nanoparticulelor de ferită de cobalt prin metoda precipitării chimice

Pulberi nano-cristaline de ferită de cobalt se pot sintetiza prin metoda precipitării chimice, folosind săruri de cobalt și fier, precum sulfați, azotați sau acetati și un agent de precipitare (NaOH) la 80 °C în apă. În comparație cu alte metode, sinteza prin precipitare chimică s-a dovedit ca fiind accesibilă, versatilă și necostisitoare [1].

1.1.3 Sinteza nanoparticulelor de aur

O metodă simplă de sinteză a nanoparticulelor de aur, AuNPs, este metoda Turkevich, care presupune tratarea HAuCl_4 cu acid citric în apă fierbinte, citratul având rolul de agent reducător [2]. Pentru a împiedica agregarea AuNPs s-au dezvoltat diferite metode ce presupun utilizarea de surfactanți. În scopul obținerii de nanoparticule cu o distribuție îngustă a dimensiunii, tehnicile de sinteză necesită controlul mai precis al concentrației de reacție și al pH-ului.

1.1.3 Sinteza nanoparticulelor de argint

Cea mai simplă metodă de sinteză a AgNPs constă în reducerea chimică de către agenți organici sau anorganici. Prezența surfactanților, care împiedică creșterea, aglomerarea și sedimentarea nanoparticulelor din suspensiile coloidale este deosebit de importantă [3].

1.2. Metode de caracterizare a nanomaterialelor

1.2.1. Microscopia electronică de transmisie și microscopia electronică de scanare

Tehnicile TEM și SEM permit colectarea informațiilor despre dimensiunea, forma și cristalinitatea particulelor, precum și informații legate de straturile de suprafață., respectiv compoziția elementală, dacă există un detector pentru radiația X caracteristică (EDX). Principala diferență dintre cele două tehnici constă în faptul că prin SEM nu se poate vizualiza structura internă a probei.

1.2.2. Difractia de radiație X

Difracția de radiație X, XRD, permite determinarea structurii cristaline, a parametrilor celulei elementare, dimensiunilor cristalitelor și a prezenței diferitelor faze cristaline. Difractograma înregistrată prin metoda difrctometrică este ca o amprentă pentru pentru fiecare structură cristalină.

1.2.3. Microscopia optică în câmp întunecat

Investigațiile în câmp întunecat, DF, evidențiază rezonanța plasmonică de suprafață localizată (LSPR), fiind aplicate pentru investigarea nanoparticulelor metalice care prezintă acestt fenomen. Nanoparticulele apar sub forma unor pete de culoare, distribuția dimensiunii nanoparticulelor putând fi determinată din imaginile de microscopie DF prin măsurarea lărgimii picului spectrului plasmonic la jumătatea înălțimii.

1.2.4. Spectroscopia UV-Vis, potențialul Zeta

Metoda UV-Vis este importantă pentru identificarea și caracterizarea nanoparticulelor în suspensies, spectrele UV-Vis fiind influențate de morfologia și indicele de refracție al mediului din apropierea suprafeței nanoparticulelor. Se poate determina dimesiunea nanoparticulelor din poziția maxiului benzii de absorbție.

Stabilitatea suspensiilor coloidale poate fi analizată prin măsurători de potențial Zeta, care se calculează din mobilitatea electroforetică a coloidului.

1.2.5. Studiul proprietăților magnetice cu ajutorul magnetometrului cu probă vibrantă

Magnetometrul cu probă vibrantă permite măsurarea momentului magnetic al unei probe ce vibrează într-un câmp magnetic, după o direcție

perpendiculară pe câmpul magnetic static, măsurând tensiunea indusă într-o bobină de detecție.

1.3. Aplicațiile nanoparticulelor oxidice și metalice în nanobiotehnologie și nanomedicină

1.3.1. Țintirea controlată cu medicamente

NPs pot fi sintetizate pentru a avea o afinitate mai mare pentru un anumit țesut sau tip de cellule, prin optimizarea proprietăților lor fizico-chimice [4].

1.3.2. Agenți de contrast în imagistică

Sistemele magnetice de nanoparticule folosite în imagistică permit o bună vizualizare, în timp real a evenimentelor biologice.

1.3.3. Biosenzori

NPs sunt utilizate ca senzori pentru o varietate de aplicații, incluzând evidențierea și separarea agenților patogeni, detectarea și captarea celulelor și detectarea funcțiilor moleculare și celulare.

1.3.4. Studii toxicologice

După intrarea în celule, nanoparticulele pot să se regăsească în diferite organe, prezentând toxicitate în termeni de viabilitate celulară, generare de specii de oxigen reactiv (ROS), de lactat dehidrogenază (LDH), etc.

1.3.5. Teste biochimice

Testele biochimice presupun determinarea activității superoxid dismutazei (SOD), catalazei (CAT), malondialdehidei (MDA) și a proteinelor solubile. Aceste teste permit evidențierea adaptării sau neadaptării celulelor la stresul provocat de prezența nanoparticulelor.

Bibliografie selectivă

- [1] S.Amiri., H. Shokrollahi, Mat. Sci. Eng. C 33 (2013) 1–8.
- [2] J. Turkevich, P.C. Stevenson, J. Hillier, Discuss Faraday Soc. 11 (1951) 55-75.
- [3] T. Klaus-Joerger, R Joerger, E Olsson, C Granqvist, Trends Biotechnol. 19(1) (2001) 15-20.
- [4] H. Maeda, J. Wu, T. Sawa, Y. Matsumura, K. Hori, J Control Release 65 (2000) 271–284.

Capitolul 2

STUDIUL UNOR NANOPARTICULE MAGNETICE ȘI A EFECTULUI LOR ASUPRA MICROORGANISMELOR

2.1. Sinteza și caracterizarea structurală a nanoparticulelor de ferită de cobalt

2.1.1. Sinteza nanoparticulelor de ferită de cobalt, Co-MNPs

S-a urmărit obținerea de sisteme de oxizi metalici nanometrici, de tip miez/inveliș (core/shell), cu proprietăți magnetice, folosind o metodă de coprecipitare chimică adaptată, conducând la MNPs adecvate studierii influenței lor asupra creșterii organismelor vii din mediul înconjurător [1].

Nanoparticulele de ferită de cobalt, Co-MNPs, au fost obținute dintr-un amestec de săruri metalice, în raport molar stoichiometric 2:1, sărurile fiind dizolvate, fiecare în 300 ml de apă deionizată [2]. Precipitarea feritei de cobalt s-a realizat prin agitarea continuă a celor două soluții stoc, la temperatura de 75 °C, cu ajutorul unui agitator magnetic; după care s-a adăugat reactivul de precipitare, 2M NaOH (150 mL), cu un debit constant de 1- 2 ml pe secundă. Pentru a asigura dispersia uniformă a particulelor în apa deionizată, s-au adăugat 12 ml acid percloric (25%)- cu agitare continuă la 75 °C, suspensia menținându-se în aceste condiții 30 min. Adăusul de acid percloric are ca rol modificarea suprafeței Co-MNPs, pentru a preveni aglomerarea. S-a ajustat pH-ul suspensiei la 5,5 prin spălări repetate cu apă, la temperatura camerei. Suspensia coloidală astfel obținută s-a păstrat la temperatura camerei.

2.1.2. Studiul morfologiei Co-MNPs

Imaginile SEM au evidențiat particule cvasi-uniforme cu aspect sferic, sau cu început de fațetare cristalină care, atunci când sunt depuse pe suportul de analiză al dispozitivului SEM, tind să formeze asociații, după evaporarea lichidului de dispersie. Dimensiunea medie a diametrului fizic, estimată din imaginile SEM, este de 40 nm (Fig.2.1).

2.1.3. Studiul structurii cristaline a Co-MNPs

Difractograma înregistrată în urma investigării XRD a nanoparticulelor Co-MNPs (Fig.2.2) redă aspectul nanocristalin, evidențiind picurile XRD tipice structurii cubice de tip spinel. Dimensiunea medie a cristalitelor, rezultate din analizarea lărgimii picurilor XRD (Tab.2.1) este de 11,3 nm. Având în vedere că

dimensiunile nanoparticulelor măsurate cu ajutorul tehnicii SEM sunt de 40 nm, putem spune că particulele sintetizate sunt policristaline.

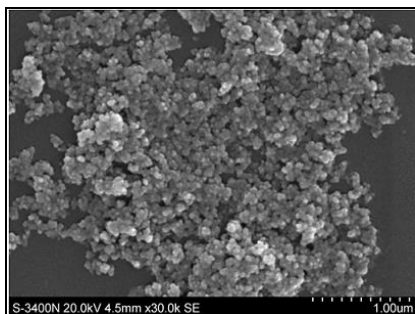


Fig. 2.1 Imaginea SEM a Co-MNPs [2].

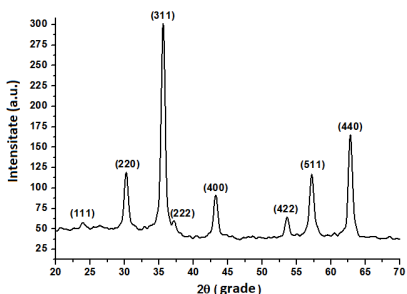


Fig. 2.2 Analiza XRD a Co-MNPs [2].

În Tab.2.1 sunt trecute, alături de valorile dimensiunilor cristalitelor, D_{hkl} , determinate pentru fiecare pic XRD, valorile 2θ , intensitățile și lărgimile la jumătatea înălțimii, β , ale picurilor XRD, precum și valorile parametrului și volumului celei elementare, a , V . Valorile obținute pentru parametrii celei elementare indică o structură stoichiometrică lipsită de defecte.

Tabel 2.1 Valorile dimensiunii cristalitelor și a parametrilor celei elementare [2]

Indicii Miller	2θ (°)	Intensitatea (u.a)	β (rad)	D_{hkl} (nm)	a (Å)	V (Å ³)
(111)	23,9	57,6	0,0170	8,2	8,351	582,26
(220)	30,2	118,8	0,0129	11,0		
(311)	35,6	301,1	0,0122	11,8		
(400)	43,2	91,3	0,0118	12,4		
(422)	53,6	64,3	0,0118	12,9		
(511)	57,2	116,7	0,0132	11,7		
(440)	62,8	165,1	0,0125	12,7		

2.1.3. Studiul proprietăților magnetice a Co-MNPs

Curba de histerezis, tipică feritei de cobalt, este prezentată în Fig.2.3. Se poate spune că proprietățile magnetice ale Co-MNPs sunt corespunzătoare scopului pentru care le-am sintetizat, valorile magnetizației specifice de saturație, $M_S=58 \text{ Am}^2/\text{kg}$, ale câmpului coercitiv $H_c = 239 \text{ kA/m}$ și ale

magnetizației remanente $M_r = 38 \text{ Am}^2/\text{kg}$, $M_r/M_s = 0.66$, fiind comparabile cu cele ale nanoparticulelor sintetizate în literatură și tratate termic la temperaturi ridicate [3]. Valoarea mare a magnetizării remanente presupune o anizotropie magnetică ridicată.

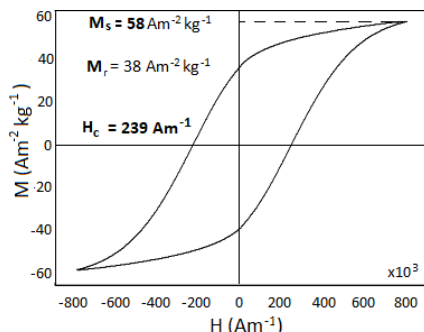


Fig. 2.3 Curba de magnetizație pentru Co-MNPs [2]

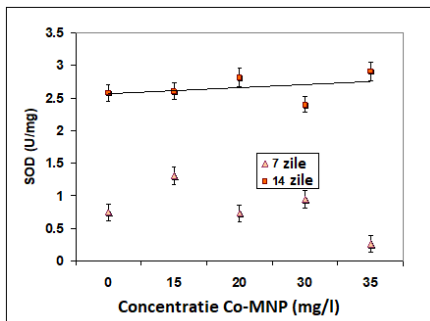


Fig. 2.4 Dependența activității SOD de concentrația Co-MNPs [2].

2.2. Studiul influenței nanoparticulelor de ferită de cobalt asupra unor microorganisme

2.2.1. Materialul biologic

Fungul *Phanerochaete chrysosporium* utilizat în acest experiment (în colaborare cu Facultatea de Biologie din cadrul Universității "Alexandru Ioan Cuza" Iași, România) a fost achiziționat de la Institute Scientific de Santé Publique din Belgia (HEM 5772). Această specie este unul dintre microorganismele cu rol important în descompunerea deșeurilor de celuloză din mediul înconjurător. Fungul a fost cultivat pe mediu Sabouraud agarizat (peptonă 10 g / l, glucoză 35 g / l, agar 2 g / l, apă distilată până la 1,0 l la 28 °C [4]. În mediul de cultură a fungilor a fost administrată o suspensie de Co-MNPs cu diferite concentrații: 0-15-25-30-35 mg/l, care corespund la concentrații de ioni metalici de 0-10,2-15,3-20,3-25,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

2.2.2. Determinări biochimice

Analiza indicatorilor biochimici ai stresului oxidativ a fost efectuată spectrofotometric din determinările nivelului SOD, CAT și MDA. Rezultatele au fost exprimate relativ la conținutul de proteine [5], dependențele parametrilor

biochimici de concentrația de Co-MNPs fiind reprezentate în Fig. 2.4, Fig.2.5 și Fig.2.6. S-au luat în considerare valorile medii și deviațiile standard rezultate din cinci măsurători repetate, iar semnificația statistică a fost estimată prin testul t-Student, pentru pragul $p = 0,05$.

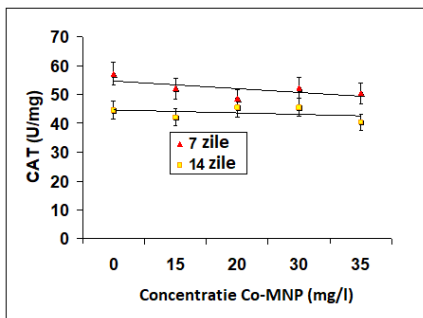


Fig. 2.5 Dependența activității CAT de concentrația Co-MNPs [2]

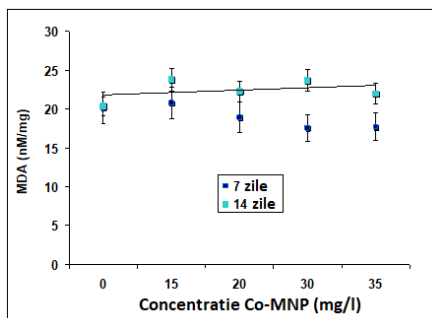


Fig. 2.7 MDA, în funcție de concentrația Co-MNPs [2].

Dependența de concentrația de nanoparticule devine mai clară la 14 zile de la inoculare. Astfel, se observă o creștere cu până la 15% la 14 zile, pentru probele cu nanoparticule în comparație cu proba martor ($p < 0,05$).

S-au observat creșteri relativ mici ale SOD concomitent cu scăderi ale CAT și, în final, creșterea MDA ce indică peroxidarea lipidelor din celule. Admitem posibilitatea că ambele tipuri de ioni metalici, din MNPs administrate fungilor, contribuie la generarea speciilor reactive de oxigen, ROS. principalul mecanism celular care stă la baza toxicității presupuse a ionilor de fier [6].

Se presupune că peroxidul de hidrogen obținut prin acțiunea SOD este supus unor mecanisme concurente, care îl descompun:

(i) acțiunea catalazei de descompunere apei oxigenate (peroxidului de hidrogen):



(ii) reacțiile Fenton favorizate de ionii fierului:



unde H_2O_2 este transformat în radicali hidroxil (OH^\bullet) sau superoxid ($\text{O}_2\text{H}^\bullet$) care sunt puternic reactivi.

Deoarece capacitatea de adaptare a celulelor include stimularea sintezei CAT în prezența unui nivel crescut de peroxid de hidrogen, rezultatele noastre

indică diminuarea ei cu până la 10% ($p < 0,05$). Se poate presupune că la impactul celulelor vii cu Co-MNPs au loc procese concurente, care pe de o parte stimulează sinteza CAT, iar pe de altă parte o inactivează, cel de-al doilea fenomen putând fi predominant.

2.3. Concluzii

Nanoparticulele de ferită de cobalt prezintă o structură stoichiometrică, policristalină de tip spinel inversat, cu dimensiuni de circa 40 nm, ceea ce le conferă o magnetizație specifică de saturație relativ mare și un câmp coercitiv mare. Rezultatele obținute sunt foarte bune, având în vedere faptul că nu au fost aplicate tratamente post sinteză.

Bioefectele cauzate de introducerea Co-MNPs în culturile de fungi celulolitici prezenți în biosferă, au constat în modificarea unor indicatori de stres oxidativ. Mecanismele responsabile de toxicitate sunt datorate endocitării și eliberării de ioni metalici, care sunt cunoscuți pentru declanșarea producerii de specii reactive de oxigen.

Activitatea crescută a SOD a fost atribuită speciilor ROS formate și care au condus la formarea peroxidului de hidrogen. Efectul peroxidării lipidice a fost susținut de creșterea nivelului de MDA în miceliul fungilor.

Activitatea CAT a fost diminuată, datorită prezenței nanoparticulelor ca sursă de ioni metalici, care se pot lega de moleculele CAT blocându-le activitatea. Toate aceste rezultate sugerează că poluarea mediului cu Co-MNP eliberate din nanotehnologiile specifice, poate împiedica dezvoltarea metabolismului celulolitic al funghiilor și rolul lor ecologic de descompunere a deșeurilor lemnoase.

Bibliografie selectivă

- [1] R. Massart, IEEE Trans Magn, MAG-17(2) (1981) 1247-1248.
- [2] L. Oprica, C. Nadejde, M. Andries, E. Puscasu, D. Creanga, M. Balasoiu, Environ Eng Manag J, 14 (3) (2015) 581-586.
- [3] A. C. Lima, M. A. Morales, H. Araújo, M. Soares, D. M. A. Melo, A. S. Carriço, Ceram Int 41(9)B (2015) 11804-11809.
- [4] A. Manoliu., M. Balan, L. Oprica, P Gradinaru., Scientific Annals of Alexandru Ioan Cuza University, Iași, Genetics and Molecular Biology, 6 (2010) 47-52.
- [5] M.M. Bradford, Anal Biochem 72 (1976) 248-254.
- [6] M., Strlič, J. Kolar, V.S. Šelih, D. Kočar, B. Pihlar, Acta. Chim. Slovaca., 50 (2003) 619-632.

Capitolul 3

STUDIUL NANOPARTICULELOR DE AUR ȘI EFECTULUI LOR ASUPRA MICROORGANISMELOR

3.1. Sinteza și caracterizarea suspensiilor de aur cu nucleație incompletă. Studiul efectului iradierii cu lumină de diferite lungimi de undă

3.1.1. Sinteza și iradierea suspensiilor nanoparticulelor de aur cu nucleație incompletă

Pentru sinteza nanoparticulelor de aur, AuNPs, s-au amestecat într-un vas de sticlă 5 ml 1 mM $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ și 1,75 ml de 20 mM NaOH, s-a completat cu apă deionizată până la 50 ml și s-a încălzit la 85 °C. Când s-a atins temperatura de 85 °C, s-au adăugat 2,5 ml de citrat de sodiu (50 mg/ml), soluția menținându-se sub agitare magnetică, la această temperatură, timp de 15 de minute. Culoarea soluției a devenit roz/mov, reflectând o nucleație incompletă a nanoparticulelor. S-a investigat pH-ul soluției astfel obținute și s-a constatat că este 6,8 [1,2].

S-au pregătit cinci probe de câte 10 ml de substanță din soluția stoc. Cu excepția unei probe martor P1, celelalte suspensii au fost expuse în lumină vizibilă, la diferite lungimi de undă, produsă de o lampă de halogen de 50W aflată la înălțimea de 24,5 cm, folosind diferite filtre: lumină albă-P2, filtru albastru-P3, filtru verde P4, filtru galben P5 (Tab.3.1).

Tabel 3.1 Condițiile de iradiere a probelor de suspensii apoase ce conțin AuNPs și caracteristicile acestora [2].

Proba	λ (nm)	Iluminare (w/m^2)	Doza de energie (KJ/m^2)	Maxim bandă SPR (nm)	D_{DF} (nm)	D_{aTEM} (nm)
P1 Martor	-			522	15,3	30
P2	Lumină albă	1,951	0,911	527	20,0	50
P3 albastru	500	4,073	1,226	526	19,6	40
P4 verde	520	2,405	0,722	526	19,6	41
P5 galben	550	3,529	1,588	523	16,8	31

3.1.2. Studiul dimensiunii, formei și stabilității AuNPs cu nucleație incompletă

Studii UV-Vis

Probele sintetizate și supuse procesului de iradiere au fost analizate, după patru zile, cu ajutorul spectroscopiei UV-Vis, folosind spectrofotometrul Shimadzu UV-Vis.

Prin analiza comparativă a spectrelor UV-Vis se poate constata că intensitatea benzii de absorbție (SPR) a crescut ușor pentru toate probele iradiate, sugerând continuarea procesului de creștere după absorbția luminii, iar în cazul luminii albe formarea de asocieri de 2-3 particule.

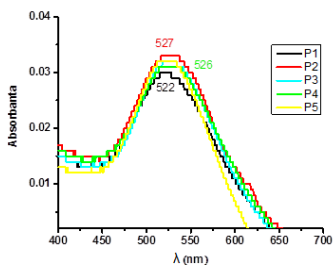


Fig.3.1 Spectrele UV-Vis ale AuNPs nesupuse și supuse iradierii, la 4 zile.

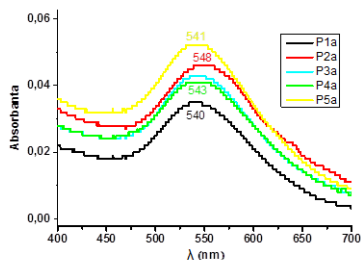


Fig.3.2 Spectrele UV-Vis ale AuNPs nesupuse și supuse iradierii, la 1 an [2].

Suspensiile AuNPs îmbătrânite, notate cu P1a-P5a, cu vechime de 1 an au rămas colorate. Spectrele UV-Vis evidențiază, pentru toate probele, o deplasare a maximumului de absorbție spre lungimi de undă cuprinse între 540 – 548 nm. Deplasarea cea mai mare s-a observat pentru proba iradiată cu lumina albă (Fig.3.2).

Modificări vizibile au apărut și în intensitatea maximumului de absorbție, intensitatea maximă observându-se pentru proba iradiată cu lumină galbenă. Aceste modificări ale spectrului UV-Vis indică o creștere diferită a AuNPs, creșterea fiind mai pronunțată pentru AuNPs iradiate cu lumina albă.

Studii DF

Vizualizarea AuNPs din suspensii cu o vechime de 4 zile, respectiv a plasmonilor asociați, s-a efectuat cu ajutorul microscopiei optice în câmp întunecat (Dark Field-DF) folosind microscopul Nikon Ti-Eclipse. Pentru

investigarea în DF s-au pus picături de suspensie pe plăcuțe de sticlă, investigarea efectuându-se imediat după uscare.

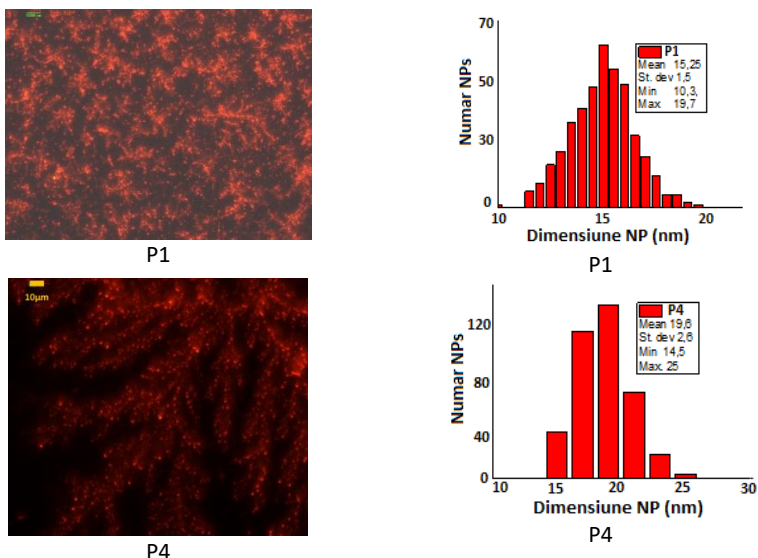


Fig.3.3. Imagini DF și distribuția după dimensiune a AuNPs neiradiate-P1 și iradiate-P4.

Imaginile obținute în DF (Fig. 3.3.) confirmă prezența AuNPs cu forme și dimensiuni similare, cei mai mulți plasmoni înregistrați prezentând culori similare, în acord cu distribuția dimensională îngustă. Se observă o distribuție diferită a AuNPs pe suportul de sticlă: este uniformă pentru AuNPs neiradiate și cu aspect dendritic, cu spații neocupate de particule, pentru probele iradiate (P4 cu lumina verde, P5 cu lumina galbenă), sugerând modificări ale hidrofobicității suspensiilor (devin mai hidrofile prin iradiere, iar sticla este hidrofobă). Studiul distribuției nanoparticulelor după dimensiune a evidențiat creșteri în dimensiunea nanoparticulelor, de la 15,3 nm pentru proba neiradiată, P1, la 20 nm pentru proba iradiată cu lumina albă (Tab.3.1). Rezultate sunt în acord cu deplasările picurilor plasmonice din Fig.3.1. Aceste creșteri pot fi datorate tendinței de asociere a nanoparticulelor iradiate ca urmare a modificării coordinării cu grupări citrat.

Investigarea DF a suspensiilor îmbătrânite a evidențiat o creștere a dimensiunii plasmonilor, respectiv a dimensiunii AuNPs, atingând pentru

suspensia P4a 41,7 nm, de două ori mai mare față de dimensiunea avută la sinteză (Fig.3.4).

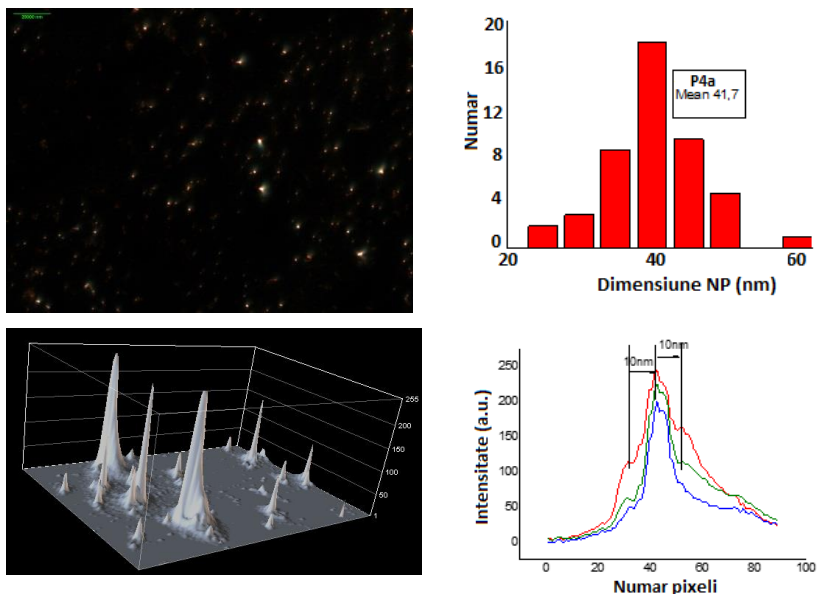


Fig. 3.4. a) Imaginea în câmp întunecat a AuNPs iradiate cu lumina verde, îmbătrânite, P4a; b) Analiza distribuției dimensiunii; c) Imagine 3D a plasmonilor; d) Profilul intensității plasmonilor [2]

Vizualizarea tridimensională a profilurilor plasmonului evidențiază mai multe maxime (Fig. 3.4.c), cele mai mici corespunzând noilor nanoparticule, mai mici, ce s-au legat după expunerea la lumina verde, pe suprafața particulelor deja formate inițial. Profilul de intensitate a plasmonilor AuNPs este caracterizat printr-un pic mai înalt, însoțit de picuri mai mici laterale, la o distanță de 5-10 nm față de axa centrală a picului (Fig 3.4.c).

Studii TEM

Analiza prin microscopia electronică de transmisie (TEM) s-a efectuat cu ajutorul unui microscop Philips CM100. Analiza dimensiunilor AuNPs din imaginile TEM a fost efectuată utilizând un software de cercetare specializat, NIS Elements (NIS-BR).

Imaginile TEM ale AuNPs, sintetizate în prezența NaOH (P1) cu nucleație incompletă, au arătat că acestea sunt predominant sferice, cele mai frecvente având diametrul de 15 nm (Fig. 3.4). Imaginea obținută în DF (Fig. 3.3) a condus la rezultate apropiate, confirmând prezența AuNPs cu forme și dimensiuni similare. Dimensiunile nanoparticulelor îmbătrânite timp de un an, D_{aTEM} , determinate din TEM variază între 30 nm și 50 nm. Cea mai mare dimensiune s-a observat pentru proba iradiată cu lumina albă.

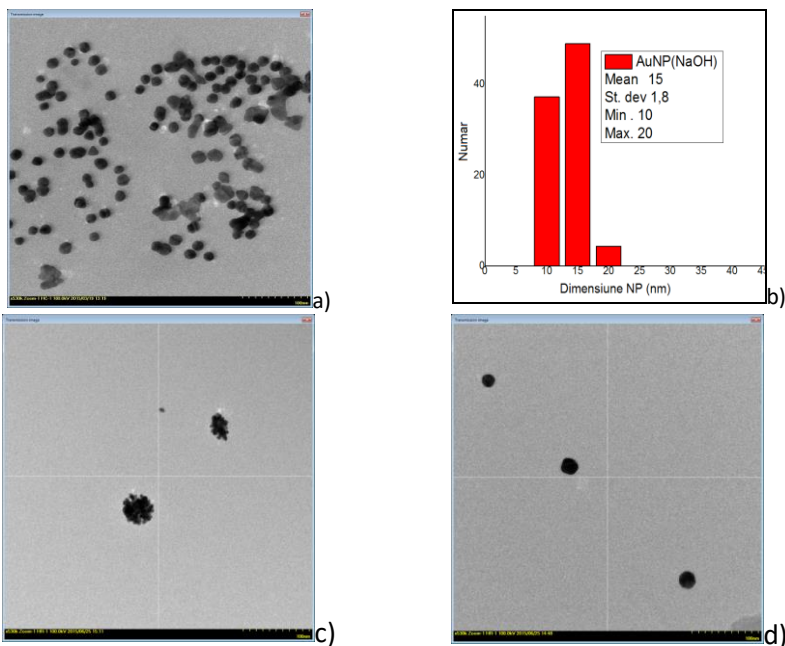


Fig.3.5. Imagini TEM ale AuNP: a) P1 la 4 zile; b) distribuția după dimensiune pentru P1; c) P4a îmbătrânită 1 an; d) P5a îmbătrânită 1 an.

Investigarea TEM a suspensiilor îmbătrânite un an, neiradiate și cele iradiate, a evidențiat morfologii și dimensiuni diferite. Spre deosebire de AuNPs iradiate cu lumina albă, albastră sau galbenă, care au rămas predominant sferice, AuNPs iradiate cu lumina verde (P4, P4a) au un aspect ramificat, de arici. Această formă are o suprafață mare în comparație cu cele de forma sferică putând prezenta proprietăți catalitice interesante. Imaginea TEM

a nanoparticulelor din suspensia iradiată cu lumină verde susține imaginea obținută în DF și diametrul mediu obținut din distribuția după dimensiune.

S-ar putea spune că, prin expunerea la anumite lungimi de undă, energia absorbită poate slăbi interacțiunile dintre ionii de aur de suprafață și unele grupări citrat cu legături slabe, care ar putea fi chiar eliberate, astfel încât în acele locuri să se poată atașa particule de aur noi; sinteza nanostructurilor de aur putând fi astfel foto-stimulată.

Studii XRD

Difractogramele înregistrate cu ajutorul difractometrului Shimadzu LabX XRD-6000, cu radiația Cu-K α , $\lambda=1,54 \text{ \AA}$ au evidențiat pentru toate suspensiile formarea particulelor de aur metallic, prin prezența picului de difracție corespunzător planului cristalin al aurului metallic (111) (simetrie cubică, Fm3m (225), $a= 4,0786\text{ \AA}$).

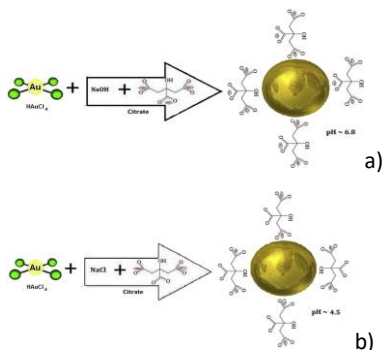
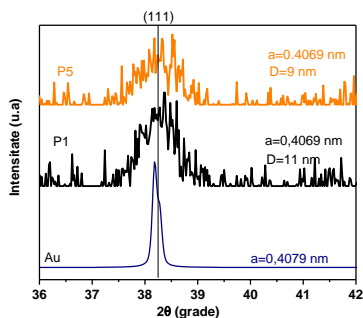


Fig.3.6 Difractogramele ANPs P1, P5 și a unei probe standard (PDF 4-784).

Fig.3.7. Sinteza AuNPs a) în prezență NaOH;b) în prezență de NaCl [3].

Nu s-au observat diferențe în pozițiile picurilor, dar s-au observat mici diferențe în valorile lărgimii picurilor XRD, care au condus la valori ale dimensiunilor cristalitelor $D_{111}=11 \text{ nm}$, pentru proba martor P1 și $D_{111}=9 \text{ nm}$, pentru proba iradiată cu lumină galbenă P5. Aceste valori indică aspectul policristalin al nanoparticulelor sintetizate în condiții de nucleație incompletă, cristalitele AuNPs iradiate cu lumină galbenă având dimensiuni ceva mai mici, sugerând că după iradiere creșterea particulelor continuă în mod diferit ca

urmare a formării de grupări citrat diferite, care inhibă sau accelerează creșterea AuNPs.

3.2. Sinteza și caracterizarea suspensiilor de aur cu nucleație completă. Studiul efectului iradierii cu lumină de diferite lungimi de undă

3.2.1 Sinteza și iradierea suspensiilor nanoparticulelor de aur cu nucleație completă

Pentru realizarea suspensiilor cu nanoparticule de aur complet nucleate s-au stabilit două condiții de sinteză, ce presupun utilizarea ca agent reducător și stabilizator citratul de sodiu, iar ca agenți modificatori de pH, NaOH sau NaCl (Fig.3.7).

Sinteza de AuNPs în prezența NaOH - G(NaOH)

Pentru această sinteză s-au amestecat 5 ml $\text{HAuCl}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$ (soluție 1 mM) cu 0,5 ml soluție de NaOH (20 mM) și apoi a fost adăugată apă deionizată până la 50 ml într-un vas de sticlă adecvat. Vasul a fost imersat într-o baie de apă preîncălzită la 110 °C. După ce temperatura a atins 85 °C, s-au adăugat 3 ml citrat de sodiu dihidrat (50 mg/ml). Amestecul a rămas pe sursa termostată, sub agitare magnetică, timp de aproximativ 30 de minute la 85 °C pentru a obține o nucleație completă, pH-ul final al suspensiei fiind 6,8.

Sinteza de AuNPs în prezența NaCl – G(NaCl)

În vederea sintetizării de nanoparticule de aur în condiții de pH acid s-au amestecat 5 ml $\text{HAuCl}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$ (soluție 1 mM) cu 1 ml de soluție de NaCl (20 mM) și apă deionizată, până la 50 ml, într-un vas de reacție. Ca și în prima variantă, vasul a fost lăsat pe plita electrică preîncălzită la 110 °C până când temperatura a scăzut la 85 °C, apoi s-a adăugat 1,5 ml citrat de sodiu dihidrat (50 mg/ml). Nanoparticulele coloidale G(NaCl) complet nucleate s-au obținut după 30 de minute; pH-ul final fiind 4,5.

Pentru a opri reacția, în ambele condiții de sinteză, vasul de sinteză se îndepărtează de pe baia de căldură și se pune în baie de apă la -4°C.

Iradieria suspensiilor cu lumină albă și verde

Procedura de iradiere a fost similară cu cea de la suspensiile cu nucleație incompletă, timpul total de expunere fiind de 90 de minute pentru fiecare caz - cu excepția probelor martor.

S-a ales iradierea cu lumină albă și verde ca urmare a rezultatelor interesante obținute pentru suspensiile cu nucleație incompletă. Lumina albă (ce conține și lumină verde), a fost aleasă și din considerente practice, deoarece

stabilitatea legăturilor citrat/aur are importanță practică pentru depozitarea și utilizarea probelor obținute în lumina ambientală [3].

Tabelul 3.2 Parametrii iradierii suspensiilor coloidale AuNPs

Proba	λ (nm)	I (W/m ²)	E (KJ/m ²)	t (min)	Maxim bandă SPR (nm)	D _{aDF} (nm)	D _{aTEM} (nm)
G(NaOH)C	-	-	-	-	538	28	29
G(NaCl)C					528	18	17
G(NaOH)WL	Lumină albă	20,08	8,22	5 × 18	538	27	29
G(NaCl)WL					528	18	17
G(NaOH)GF	520	20,60	3,22	5 × 18	538	28	30
G(NaCl)GF					528	19	18

3.2.2. Studiul dimensiunii, formei și stabilității AuNPs cu nucleație completă

Studii UV-Vis

Sprectrele UV-Vis ale suspensiilor sintetizate în prezență de NaOH (Fig.3.8) și iradiate cu lumină albă sau verde evidențiază o ușoară micșorare a intensității benzii plasmonice, fără a fi însoțită de deplasare. Prin comparație cu probele sintetizate cu nucleație incompletă, maximul benzilor plasmonice apare deplasat spre roșu, la 538 nm, sugerând AuNPs cu dimensiuni mai mari.

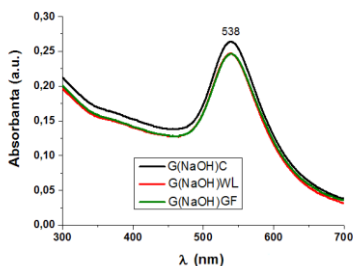


Fig 3.8 Spectrele UV-Vis la 4 zile: G(NaOH)C, G(NaOH)WL, G(NaOH)GF [3].

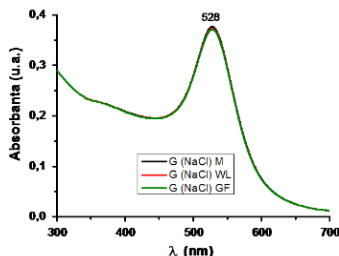


Fig 3.9 Spectrele UV-Vis la 4 zile: G(NaCl)C, G(NaCl)WL, G(NaCl)GF [3].

Micile diferențe de intensitate a plasmonului pot fi cauzate de trei posibile fenomene: (i) existența unui anumit procent de citrat nereacționat ce poate

conduce la formarea de complecși citrat-citrat prin legături intermoleculare de hidrogen; (ii) desprinderea de pe suprafața AuNPS a unor grupări citrat favorizând atracțiile dintre AuNPs (iii) complecșii citrat-citrat se pot atașa la aglomerările de AuNPs și se pot depune, rezultând scăderea intensității benzii SPR după expunerea la lumină.

Fenomenul nu este prezent în cazul suspensiilor sintetizate în prezență de NaCl, G(NaCl) (Fig 3.9) probabil datorită prezenței clorului din NaCl [4].

Rezultatele experimentale arată că suspensiile obținute în prezență de NaOH sau NaCl au culori asemănătoare, dar aspectul benzilor plasmonice este diferit. Se observă că poziția maximului plasmonic corespunzător suspensiilor sintetizate în prezența NaCl sunt localizate la lungimi de undă mai mici în comparație cu cele sintetizate în prezență de NaOH, benzile de absorbție fiind mai înguste și mai intense, sugerând particule mult mai mici. Suspensiile astfel preparate s-au păstrat timp de un an într-un mediu controlat, modificările suferite fiind analizate prin UV-Vis (Fig. 3.10, Fig 3.11).

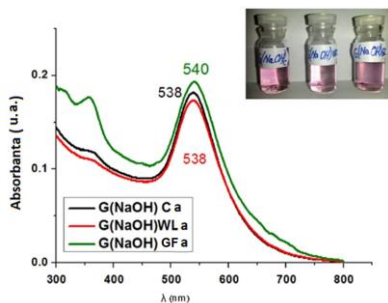


Fig 3.10 Spectrele UV-Vis la 1 an: G(NaOH)Ca, G(NaOH)WLa, G(NaOH)GFa [3].

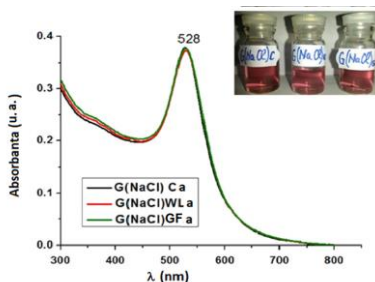


Fig 3.11 Spectrele UV-Vis la 1 an: G(NaCl)Ca, G(NaCl)WLa, G(NaCl)GFa [3].

Studii DF

Imaginile DF sugerează că nanoparticulele obținute în prezența NaCl (Fig.3.13) sunt mai luminoase decât nanoparticulele obținute în prezența NaOH (Fig. 3.12), în conformitate cu profilul de intensitate plasmonică furnizat de software-ul Nis-Element. Creșterea intensității LSPR ar putea fi atribuită adsorbției crescute a grupărilor organice pe suprafața nanoparticulelor, dezvoltând interacțiuni mai puternice cu aurul [5].

Imaginile DF, înregistrate pentru straturile de AuNPs uscate pe sticlă, sugerează că suspensiile coloidale sintetizate în prezență de NaOH sunt mai

hidrofile în comparație cu cele sintetizate în prezență de NaCl, depunerea AuNPS în cazul al doilea fiind mai uniformă, cu mai puține spații neacoperite.

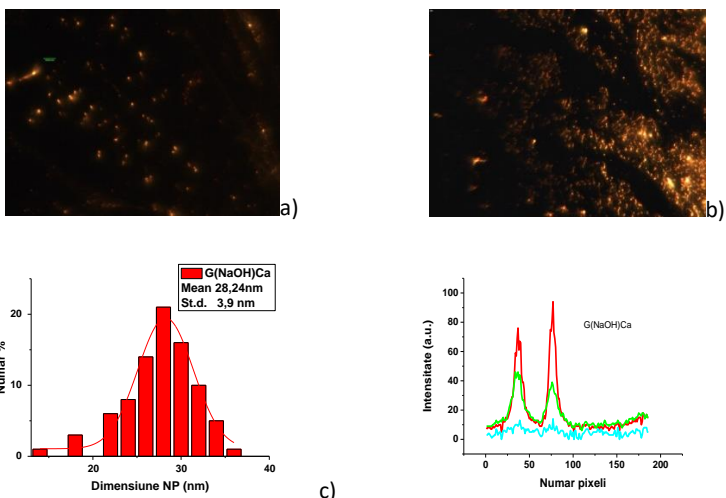


Fig.3.12 Investigații DF ale suspensiilor coloidale martor G(NaOH)a, sintetizate în prezență de NaOH, la 1 an a) imagine DH pe picătură umedă; b) imagine DF pe strat uscat; c) histogramă dimensională G(NaCl)a; d) profilul intensității plasmonilor [3].

Histogramele dimensionale au arătat stabilitatea nanoparticulelor în timp (valoarea medie fiind de aproximativ 28 nm pentru G(NaOH)Ca și aproximativ 18 nm pentru G(NaCl)Ca).

Imaginile DF ale suspensiilor sintetizate în prezență de NaOH iradiate cu lumină albă sau verde și îmbătrânite au evidențiat plasmoni mai intensi în proba iradiată cu lumină verde, susținând rezultatele obținute prin UV-Vis, iar distribuția după dimensiune a nanoparticulelor arată valori comparabile, ușor mai ridicate pentru soluția coloidală iradiată cu lumină verde (27,2nm; 28,4 nm).

Studii TEM

Dimensiunea medie a nanoparticulelor evidențiate prin tehnica TEM, ce par a avea o formă sferică sau cvasi-sferică (Fig.3.13), este de 29,4 nm pentru G(NaOH)Ca și 17,3 nm pentru G(NaCl)Ca. Dacă comparăm aceste rezultate cu cele obținute din imaginile DF constatăm că sunt apropiate și că într-adevăr dimensiunile AuNPS sintetizate în prezență de NaOH sunt mult mai mari decât cele sintetizate în prezență de NaCl.

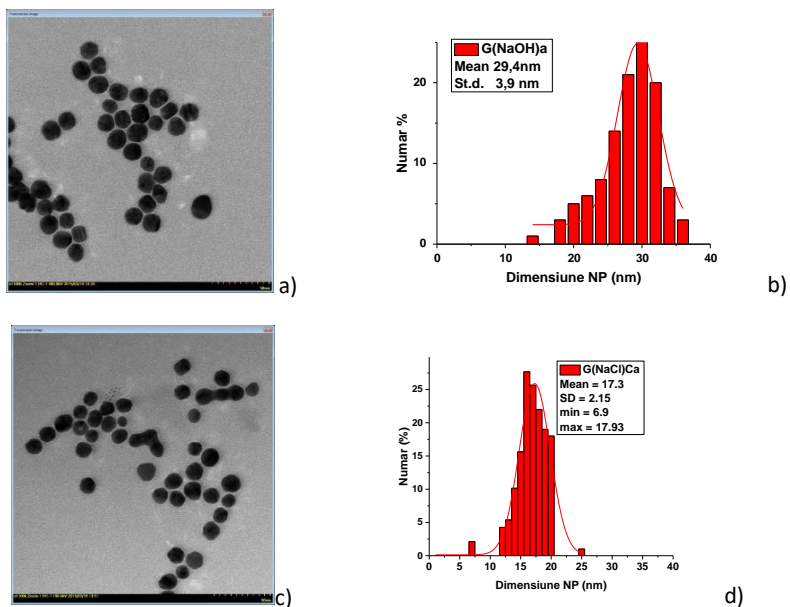


Fig 3.13 Investigarea TEM a soluțiilor la 1 an: a) imagine TEM a G(NaOH)Ca; b) distribuția după dimensiune a G(NaOH)Ca; c) imagine TEM a G(NaCl)Ca; d) distribuția după dimensiune a G(NaCl)Ca [3]

Se poate afirma că prezența NaOH în mediul de reacție favorizează creșterea AuNPs, în timp ce prezența NaCl limitează dezvoltarea acestora.

Studii XRD

În Fig.3.14 și Fig. 3.15 sunt redată difractogramele suspensiilor sintetizate în prezență de NaCl sau NaOH, la o săptămână de la sinteză.

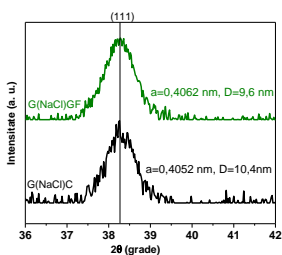


Fig.3.14. XRD G(NaCl)C, G(NaCl)GF.

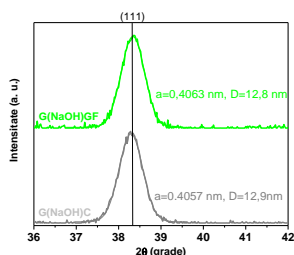


Fig.3.15. XRD G(NaOH)Ca, G(NaOH)GF.

S-a observat pentru toate probele picul caracteristic corespunzător planului cristalin (111) al aurului metallic și mici diferențe în valorile parametrilor celei elementare: G(NaCl)C, $a=4,052 \text{ \AA}$; G(NaOH)C; $a=4,057 \text{ \AA}$; G(NaCl)GF, $a=4,062$; respectiv G(NaOH)GF, $a=4,063 \text{ \AA}$. S-au observat unele diferențe și pentru valorile dimensiunilor cristalitelor: G(NaCl)C, $D_{111}=10,4 \text{ nm}$; G(NaOH)C, $D_{111}=12,9 \text{ nm}$; G(NaCl)GF, $D_{111}=9,6 \text{ nm}$ și G(NaOH)GF, $D_{111}=12,8 \text{ nm}$.

3.3. Studiul influenței iradierii AuNPs cu nucleație incompletă asupra fungilor celololici

3.3.1. Materialul biologic

Microorganismul celololitic, *P. chrysosporium*, a fost achiziționat de la Institute Scientifique de Santé Publique, Belgium (HEM no. 5772).

3.3.2. Testul microbiologic

Pentru testul biologic s-au utilizat suspensiile AuNPs proaspăt sintetizate.

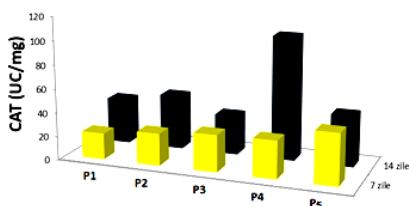


Fig. 3.16 Activitatea CAT: P1-martor, P2-lumină albă, P3-lumină albastră, P4-lumină verde, P5-lumină galbenă [2]

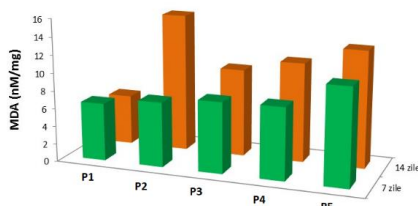


Fig. 3.17 Activitatea MDA: P1-martor, P2-lumină albă, P3-lumină albastră, P4-lumină verde, P5-lumină galbenă [2].

Investigațiile efectuate la 14 zile de la incubare au evidențiat că iradierea cu lumină verde (P4) are ca efect stimularea intensă a sintezei CAT (Fig.3.16). Creșterea activității CAT este de 3 ori mai mare decât cea observată pentru proba martor (P1). Investigarea stimulării SOD a condus la rezultate asemănătoare celor obținute pentru CAT. Acest lucru ar putea să sugereze că ambele sisteme antioxidante enzimatic se adaptează aproape simultan la ROS generate de factorii de stress. Probele iradiate cu lumina galbenă (P5) determină o creștere a SOD la 7 zile urmată de inhibarea activității SOD la 14 zile.

Nivelul crescut al MDA arată efectul peroxidării lipidelor în membranele celulare, care sunt degradate în acest fel sub acțiunea ROS (Fig. 3.17). Dacă pentru activitățile SOD și CAT, la 14 zile de incubare, s-au observat creșteri semnificative pentru proba iradiată cu lumină verde, P4, nivelul MDA are valori maxime pentru proba iluminată cu lumină albă, P2, indicând faptul că efectul de peroxidare lipidică este de aproximativ trei ori mai mare comparativ cu martorul.

3.4 Concluzii

S-au sintetizat nanoparticule de aur în condiții de sinteză diferite; în prezență de NaOH cu nucleație incompletă, în prezență de NaOH cu nucleație completă și în prezență de NaCl cu nucleație completă și s-a urmărit efectul acestor condiții și al iradierii cu lumină din domeniul vizibil asupra morfologiei, coordonării, stabilității și activității catalitice a nanoparticulelor.

În cazul nucleației incomplete, prin expunerea la lumină verde morfologia AuNPs capătă un aspect ramificat, cu o activitate catalitică ridicată, ceea ce nu se observă la probele cu nucleație completă. Studiile efectuate pe nanoparticulele cu nucleație completă au arătat că, G(NaCl) au o dimensiune mai mică decât a G(NaOH), fiind foarte stabile, ca urmare a faptului că grupările laterale de citrat sunt adsorbite mai puternic la suprafața acestora.

Testul microbiologic a evidențiat că activitățile CAT și SOD cresc aproximativ trei ori la expunerea AuNPs la lumină verde, sugerând că celulele fungice s-au adaptat la creșterea stresului oxidativ prin sintetizarea unor cantități mai mari de enzime antioxidante. Activitatea MDA este stimulată în special când AuNPs sunt expuse la lumina albă.

Bibliografie selectivă

- [1]] X. Ji, X. Song, L. Jun, Y. Bai, W. Yang, X. Peng, J. Am. Chem. Soc. 129 (2007) 13939-13948.
- [2] M. Andries, D. Pricop, L. Oprica, D.E. Creanga, F. Iacomi, Int. J. Pharmaceut. 505 (2016) 255–261.
- [3] R.V. Lupusoru, D. A. Pricop, M. Andries, D. Creanga J. Mol. Struct. 1126 (2016) 192-199.
- [4] X. Zou, E. Ying, S. Dong, Nanotechnology 17 (2006) 4758-4764.
- [5] J.P. Sylvestre, S. Poulin, A.V. Kabashin, E. Sacher, M. Meunier, J.H.T. Luong, J. Phys. Chem.B 108 (2004) 16864-16869.

Capitolul 4

STUDIUL NANOPARTICULELOR DE ARGINT ȘI EFECTULUI LOR ASUPRA MICROORGANISMELOR

4.1 Sinteza și caracterizarea nanoparticulelor de argint

4.1.1. Metoda de sinteză a nanoparticulelor de argint, AgNPs

Nanoparticulele de argint au fost preparate prin metoda reducerii chimice [1]. Astfel, într-un balon Erlenmeyer o soluție 1mM AgNO₃ cu volumul de 50 ml a fost încălzită sub agitare până aproape de temperatura de fierbere, după care s-au adăugat, picătură cu picătură, 5 ml de citrat trisodic 1%. În timpul întregului proces, agitarea magnetică a fost constantă. Soluția a fost încălzită până când s-a putut observa schimbarea culorii în galben pal, ceea ce sugerează formarea de nanoparticule de argint. La acest moment, soluția a fost îndepărtată de pe plita fierbinte până când s-a răcit la temperatura camerei, urmând să fie depozitată la o temperatură scăzută (4 °C) în condiții de întuneric.

4.1.2 Caracterizarea nanoparticulelor de argint

Studii UV-Vis

Spectrul UV-Vis al coloidului AgNPs, înregistrat imediat după sinteză, arată formarea unei benzi de absorbție, la 414 nm, datorate rezonanței plasmonice de suprafață a nanoparticulelor de argint (Fig.4.1) [2,3].

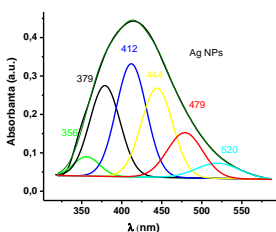


Fig 4.1 Spectrul UV-VIS al AgNPs proaspăt sintetizate, descompus în benzile de absorbție componente

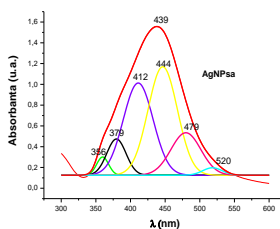


Fig 4.2 Spectrul UV-Vis al nanoparticulelor de argint, păstrate timp de un an, descompus în benzile de absorbție componente.

Spectrul UV-Vis al coloidului îmbătrânit timp de un an, prezintă o bandă de absorbție deplasată spre roșu, la 439 nm (Fig.4.2).

Ambele spectre sunt largi sugerând o distribuție largă a dimensiunilor particulelor. Descompunerea spectrelor UV-Vis în benzile componente (sugerate de analiza SEM, prezentată mai jos), evidențiază pentru probele proaspete ca predominantă banda poziționată la 412 nm, iar pentru cele înmătrânite banda de absorbție poziționată la 444 nm. Creșterea în intensitate a benzii de la 444 nm sugerează un process de agregare a nanoparticulelor și creștere a dimensiunii lor de la 20-30 nm la 50-60 nm.

Studii SEM, EDX

Morfologia și compoziția chimică elementală a coloidului AgNPs s-au analizat cu ajutorul microscopului electronic de scanare VEGA\TESCAN prevăzut cu detector pentru EDX.

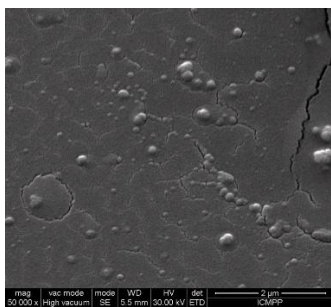


Fig 4.3 Imaginea SEM a probei de AgNPs

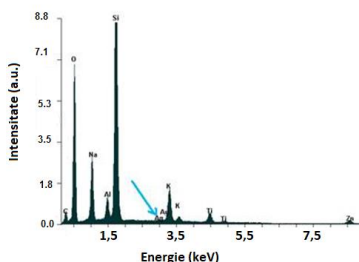


Fig 4.4 Investigația EDX a AgNPs

Analiza SEM (Fig. 4.3) confirmă rezultatele obținute cu ajutorul analizei UV-Vis, și anume coexistența nanoparticulelor mici, având forma sferică împreună cu cele mai mari și aglomerări a două și chiar trei particule. Analiza EDX a evidențiat formarea nanoparticulelor de argint.

4.2 Evaluarea efectelor nanoparticulelor de argint în dezvoltarea fungilor celulolitici

4.2.1 Testul biologic

Importanța fungilor celulolitici *P. chrysosporium*, care au continuat să fie materialul biologic de testare [4,5] a bioefectelor AgNPs, este datorată enzimelor eliberate de aceștia, ce au rolul de a descompune deșeurile lemnoase acumulate în mediu din surse naturale și industriale.

Mediile de cultură s-au preparat în vase Petri folosind un mediu agarizat și discuri de 0,8 cm dintr-o cultură stoc cu o vechime de 7 zile, de *Phanerochaete*

chrysosporium. Fungii au crescut în prezența suspensiilor AgNPs proaspăt sintetizate, în diferite concentrații: 20-40-60-80-100 $\mu\text{l/l}$ (notate V1, V2, V3, V4, V5), fiind analizați la 7 și 14 zile în comparație cu o probă martor M.

4.2.2 Investigații biochimice

S-au determinat spectrofotometric activitățile enzimatice ale unor enzime importante ale ciclului Krebs (Fig.4.5-Fig.4.8) [5].

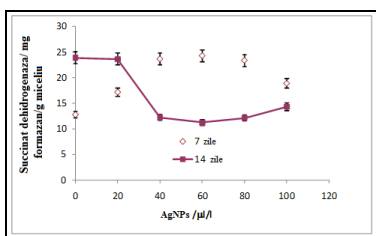


Fig 4.5 Dependența activității succinat dehidrogenazei de concentrația AgNPs [6].

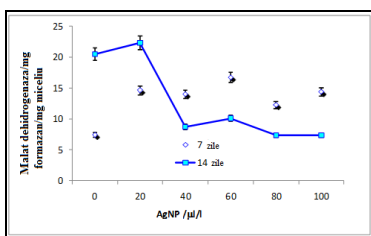


Fig 4.6 Dependența malat dehidrogenazei de concentrația AgNPs [6].

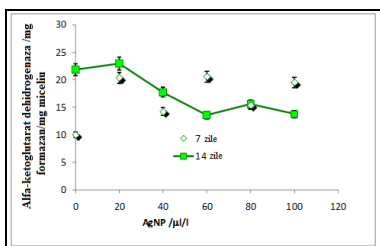


Fig 4.7 Dependența activității alfa-ketoglutarat dehidrogenazei de concentrația AgNPs [6].

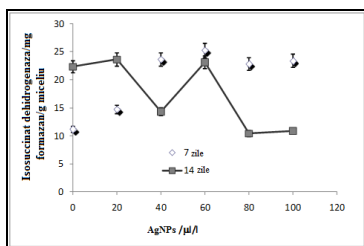


Fig 4.8 Dependența activității isosuccinat dehidrogenazei de concentrația AgNPs [6].

Dacă la o perioadă de 7 zile este înregistrată o creștere relativă a activității enzimatice, la 14 zile, se observă scăderea activității de la aproximativ 24 unități (mg de formazan pe gram de miceliu) la numai 11 unități.

Analiza activității succinat dehidrogenazei (Fig.4.5) evidențiază că, la 7 zile, sinteza totală de proteine a fost stimulată, în timp ce după 14 zile a fost afectată de administrarea suspensiei de AgNPs. Pentru probele microbiologice analizate,

după 14 zile, activitatea enzimatică a scăzut evident de la 20 de unități până la mai puțin de 8. Din Fig. 4.6 se poate observa comportamentul similar al malat dehidrogenazei. Acțiunea celulolitică a fungului studiat în prezența AgNPs s-a evidențiat și prin rezultatele ce prezintă diminuarea activității enzimei alfa-ketoglutarat dehidrogenazei (Fig. 4.8).

În urma acestor experimente se poate spune că AgNPs intră în celulele fungilor prin endocitoză sau că atomii de argint din apropierea peretelui celular sunt capabili să aibă un efect măsurabil ce apare ca urmare a interacțiunii cu ciclul Krebs al enzimelor. Rezultatele indicate de suspensiile pastrate timp de un an indică faptul că reacțiile de reducere pot continua și că pot apărea cantități mai mari de nanoparticule, respectiv că în suspensie pot coexista atomi sau ioni de argint alături de nanoparticulele acoperite cu grupări citrat.

4.3 Concluzii

Nanoparticulele de argint acoperite cu grupări citrat, din suspensia coloidală sintetizată prin protocolul chimic descris, par a fi însoțite de un număr considerabil de atomi de argint liberi și/sau ioni care sunt în continuare disponibili pentru continuarea nucleării.

S-a constatat că dehidrogenazele ciclului Krebs au o activitate diminuată cu creșterea conținutului de AgNPs în mediul de cultură. Interpretarea rezultatelor s-a bazat pe acțiunea complexă a argintului în celulele microorganismelor și pe baza abilității de adaptare ale acestor celule în condițiile de stres moderat.

Bibliografie selectivă

- [1] A. Šileikaitė, I. Prosyčevs, P. Judita, J. Algimantas, G. Asta, *Mater. Sci.* 12 (2006), 287–291.
- [2] M.M. Bradford., *Anal. Biochem.* 72(1976) 248–254.
- [3] D.M. Hodges, J.M. Delong, C.F. Forney, R.K. Prange, *Planta.* 207, (1999)604–611.
- [4] V. Arteni, E. Tanase, *Editura Univ Al. I Cuza.* 34 (1981) 233- 239.
- [5] Gh. Zarnea, *Tratat de microbiologie generala*, Ed. Acad. Rom., Bucuresti, 1994, 875 pp
- [6] M. Andries, L. Oprica, L. Sacarescu, D. Creanga, *Chem. Pap. Investigation of biological responses induced by silver nanoparticles-* trimisă spre publicare.

CONCLUZII GENERALE

Scopul lucrării prezente, de a dezvolta/optimiza tehnici de obținere a unor materiale metalice și oxidice nanostructurate pentru aplicații biomedicale, s-a concretizat în sinteza de suspensii coloidale cu nanoparticule de ferită de cobalt, aur și argint și în testele biochimice care s-au efectuat pe culturile de fungi *Phanerochaete chrysosporium*.

S-au adaptat metode de sinteză, pornind de la metode chimice clasice, care au asigurat un control asupra distribuției dimensionale și a formei nanoparticulelor fabricate.

Rezultatele obținute pot constitui contribuții originale la înțelegerea fenomenelor care au loc în condiții de sinteză diferite (nucleație incompletă, nucleație completă, prezența NaOH sau NaCl), precum și celor care sunt determinate ca urmare a interacțiunii luminii cu suspensiile coloidale, sau de îmbătrânire.

În toate experimentele abordarea a fost una ecologică, atât pentru stabilizarea cât și biocompatibilizarea nanoparticulelor în soluție apoasă.

Bioefectele cauzate de introducerea Co-MNPs în culturile de fungi celololitici prezenți în biosferă, au constat în modificarea unor indicatori de stres oxidativ. Mecanismele responsabile de toxicitate sunt datorate endocitării și eliberării de ioni metalici, care sunt cunoscuți pentru declanșarea producerii de specii reactive de oxigen.

Studiul efectului iradierii suspensiei coloidale cu AuNPs cu lumină de diferite lungimi de undă a evidențiat că absorbția luminii provoacă unele modificări ale interacțiunii de suprafață a grupărilor citrat cu ionii de aur, având ca rezultat principal asocierea particulelor, floclularea parțială, și precipitarea.

Rezultatele obținute sugerează că nanoparticulele de aur pot fi utilizate ca stresori controlați pentru a monitoriza culturile de fungi celololitici, în scopul ca aceste culturi să sintetizeze enzime de interes farmaceutic cum ar fi lignin-peroxidaza. Expunerea la lumină ar putea fi o unealtă versatilă pentru a regla activitatea catalitică a AuNPs înainte de a le administra și a stimula culturile de celule fungice.

Studiul suspensiilor AgNPs sintetizate, prezintă un număr considerabil de atomi de argint liberi și/sau ioni, care determină continuarea nucleației. În studiul biologic, s-au găsit dehidrogenaze cu o activitate diminuată la creșterea concentrației de suspensie de AgNPs. Interpretarea rezultatelor s-a bazat pe acțiunea complexă a argintului în celulele fungului și de capacitatea de adaptare în condiții de stres moderat a celulelor acestuia.

ACTIVITATEA STIINTIFICĂ

Articole ISI

1. **Maria Andries**, Daniela Pricop, Lacramioara Oprica, Dorina Creanga, Felicia Iacomî, The effect of visible light on gold nanoparticles and some bioeffects on environmental fungi, International Journal of Pharmaceutics, 2016 - **Impact Factor: 3.99, AIS: 0.797.**
2. Daniela Pricop, Raoul-Vasile Lupusoru, **Maria Andries**, Dorina Creanga, Light wavelength influence on surface plasmon resonance in citrate-gold nanosystems, Journal of Molecular Structure, 2015 - **Impact Factor: 1.602, AIS: 0.295.**
3. **Maria Andries**, Daniela Pricop, Marian Grigoras, Nicoleta Lupu, Liviu Sacarescu, Dorina Creanga, Felicia Iacomî, Comparative study on the uptake and bioimpact of metal nanoparticles released into environment, AIP Conference Proceedings. 2015
4. Claudia Nadejde, **Maria Andries**, Emil Puscasu, Dorina Creanga, Maria Balasoiu, Magnetic contamination of environment – laboratory simulation of mixed iron oxides impact on microorganism cells, Environmental Engineering and Management Journal, 2015 - **Impact Factor: 1.065, AIS: 0.074.**

Articole non-ISI

1. Lacramioara Oprica, **Maria Andries**, Claudia Nadejde, Florin Brinza, Dorina Creanga, $\text{Co}_{0.5}\text{Fe}_{2.5}\text{O}_4$ Nanoparticle Biological Impact-Comparative Study on Environmental Cellulolytic Fungi, Technical Proceedings of the 2015 TechConnect World.
2. Dana Pricop, **Maria Andries**, Endocytosis and exocytosis of gold nanoparticles, Romanian J Biophys., 2015.
3. Emil Puscasu, **Maria Andries**, Claudia Nadejde, Dorina Creanga, Synthesis of magnetic nanoparticles in stable suspension for biomedical application, The scientific journal V. Adamachi, 2014;
4. **Maria Andries**, Emil Puscasu, Claudia Nadejde, Lacramioara Oprica, Dorina Creanga, Cobalt ferrite nanoparticles effect on cellulolytic fungus phanerochaete chrysosporium, Romanian Jurnal of Biophysics, 2014;
5. Carmen Popescu, **Maria Andries**, Utilizarea microscopului inversat la studiul nanoparticulelor metalice in tesuturi, Volumul conferinței naționale de bioinginerie medicala pentru studenti si tineri cercetatori, Editia a XVII-a, Iasi 2014, Editura „Gr. T. Popa”, U. M. F. Iași;

6. Maria Andries, Emil Puscasu, Claudia Nadejde, Marius Enache, Dorina Creanga, Studiul complexelor clortetraciclina/ciclodextrina pentru atasare la nanoparticule magnetice utilizabile ca vectori in eliberarea controlata de molecule bioactive, Volumul conferinței naționale de bioinginerie medicala pentru studenti si tineri cercetatori, Ediția a XVI-a, Iasi 2013, Editura „Gr. T. Popa”, U. M. F. Iași;

7. Enache Marius, Aparaschivei Alina, Vrcianu Diana, **Andries Maria**, Condrea Anisoara, Airinei Anton, Nadejde Claudia, Creanga Dorina, NMR investigation of molecular interactions between cyclodextrin and tetracycline -applicative lesson for the master students, Adamachi, 2012.

Conferinte Internaționale

Prezentări orale

1. Lacramioara Oprica, Claudia Nadejde, **Maria Andries**, Emil Puscasu, Dorina Creanga, Maria Balasoiu, Magnetic contamination of environment-laboratory simulation based on mixed iron oxides influence on microorganism cells, Conferinta Internationala Physics of Materials PM-4, Noiembrie 2014, București, Romania;

2. Lacramioara Oprica, Claudia Nadejde, **Maria Andries**, Emil Puscasu, Dorina Creanga, Maria Balasoiu, Experimental study on the impact of engineered particles on environmental microflora, 2nd International Conference on Chemical Engineering, 2014, Iasi, Romania;

3. Claudia Nadejde, **Maria Andries**, Emil Puscasu, Gabriel Oanca, Laura Ursu, Nanostructured materials with magnetic properties in stable colloidal form, Twelfth Young Researchers Conference-Materials Science and Engineering, 2013, Belgrade Serbia.

Prezentări Poster

1. Raoul Lupusoru, Daniela A Pricop, **Maria Andries**, Marius Dobromir, Mihaela Avadanei, Felicia Iacomi, The influence of light exposure on photobiocatalytic properties of various sized gold nanoparticles, 11th International Conference on Physics of Advanced Materials (ICPAM-11), 8-12, 2016, Cluj Napoca, Romania;

2. Maria Andries, Daniela Pricop, Marian Grigoras, Nicoleta Lupu, Liviu Sacarescu, Dorina Creanga, Felicia Iacomi, Comparative study on the uptake and bioimpact of metal nanoparticles released into environment, 10th Biennial International Conference on Processes in Isotopes and Molecules (PIM 2015), 2015, Cluj-Napoca, Romania;

- 3. Maria Andries**, Daniela Pricop, Raul Lupusoru, Emil Puscasu, Felicia Iacomi, Dorina Creanga, Light wavelength influence on surface plasmon resonance in citrate-gold nanosystems, XIIIth International conference on molecular spectroscopy - From molecules to molecular materials, molecular biological systems and nanostructures, 2015, Wrocław, Polonia;
- 4. Emil Puscasu, Maria Andries**, Mihaela Racuciu, Felicia Iacomi, Dorina Creanga, Experimental Study on the Core-Shell Interactions in the Case of Magnetic Grains Coated with Organic Molecules, XIIIth International conference on molecular spectroscopy-From molecules to molecular materials, molecular biological systems and nanostructures, 2015, Wrocław, Polonia;
- 5. Maria Andries**, Daniela A. Pricop, Lacramioara Oprica, Dorina Creanga and Felicia Iacomi, The effect of visible light on gold nanoparticles and some bioeffects on environmental fungi, The 8th international conference on advanced materials–ROCAM,2015, Bucuresti, Romania;
- 6. Lacramioara Oprica, Maria Andries**, Claudia Nadejde, Florin Brinza, Dorina Creanga, Co_{0.5}Fe_{2.5}O₄ Nanoparticle Biological Impact–Comparative Study on Environmental Cellulolytic Fungi, Nanotech Conference, 14-17, 2015, Washington DC;
- 7. Maria Andries**, Nanostructured materials with magnetic properties - impact on environmental microflora, 9th Central European Training School on neutron technique - CETS2015, 2015, Budapesta, Ungaria;
- 8. Claudia Nadejde, Maria Andries**, Emil Puscasu, Florin Brinza, Laura Ursu, Dorina Creanga, Cristina Stan, Preparation of soft magnetic materials and characterization with investigation methods for fluid samples, Conferinta Internationala Physics of Materials Pm-4, 2014 București, Romania;
- 9. Lacramioara Oprica**, Gina Balan, Carmen Popescu, Rodica Muresan, Daniela Pricop, **Maria Andries**, Augustin Muresan, Investigation of the chemical treatment effect on the environmental fungi, 2nd International Conference on Chemical Engineering, 2014, Iasi, Romania;
- 10. Emil Puscasu, Maria Andries**, Claudia Nadejde, Lacramioara Oprica, Dorina Creanga, Magnetic fluid preparation, characterization and environmental application, ICPAM 10, 2014, Iasi, Romania;
- 11. Maria Andries**, Loredana Oprica, Dorina Creanga, The influence of magnetic nanoparticles on the oxidative activity in cellulolytic fungi, PAMS 1, 2014, Iasi, Romania.

Conferințe Naționale

Prezentări orale

1. Emil Puscasu, Cosmin Mihai, Liviu Sacarescu, **Maria Andries**, Claudia Nadejde, Dorina Creanga, Gabriela Vochita, Assessment of the biological impact of some soft magnetic materials on mammalian cell line, A XLIV-a Conferință Națională Fizica și Tehnologiile Educaționale Moderne, 2015, Iasi, Romania;

2. Carmen Popescu, **Maria Andrieș**, Dorina Creangă, Utilizarea microscopului inversat la studiul nanoparticulelor metalice în țesuturi, Conferința națională de bioinginerie medicală pentru studenți și tineri cercetători, Ediția a XVII– a, 2014, Iasi, Romania.

Prezentări Poster

1. **Maria Andries**, Lacramioara Oprica, Emil Puscasu, Florin Brinza, Andrei Domocos, Claudia Nadejde, Emilia Creanga, Impact of cobalt ferrite nanoparticles on the metabolism of some cellulolytic fungi, A XLIV-a Conferință Națională Fizica și Tehnologiile Educaționale Moderne, 2015, Iasi, Romania;

2. **Maria Andries**, Emil Puscasu, Claudia Nadejde, Dorina Creanga, Steric vs electrostatic stabilization of magnetic nanoparticles in aqueous medium, Iasi IEEE Student Branch Scientific Meeting 5th edition, "A.I. Cuza" University of Iasi, December 2014, Iasi, Romania;

3. Emil Puscasu, **Maria Andries**, Claudia Nadejde, Dorina Creanga, Synthesis of magnetic nanoparticles in stable suspension for biomedical application, A XLIII-a Conferința Națională de Fizica și Tehnologii Educaționale Moderne, 2014, Iasi, Romania;

4. **Andries Maria**, Emil Puscasu, Anna Karahaliou, Georgios Vlachopoulos, Costaridou Lena, Quantitative Diffusion Weighted Breast MRI, XLII-a Conferința Națională de Fizica și Tehnologii Educaționale Moderne, 2013, Iasi, Romania;

5. **Maria Andrieș**, Emil Pușcașu, Claudia Nădejde, Marius Enache, Dorina Creangă, Studiul complexelor clortetraciclină/ciclodextrină pentru atașare la nanoparticule magnetice utilizabile ca vectori în eliberarea controlată de molecule bioactive, Ediția a XVI– a a Conferinței Naționale de Bioinginerie pentru Studenți și Tineri Cercetători, 2013, Iasi, Romania.