

UNIVERSITATEA “BABEȘ-BOLYAI” CLUJ-NAPOCA
FACULTATEA DE FIZICĂ
SPECIALIZAREA FIZICĂ MEDICALĂ

LUCRARE DE LICENȚĂ

Coordonatori științifici:

CS II dr. Monica Potara

Prof. dr. Simion Aștilean

Absolvent:

Raluca- Ioana Apetri

Cluj-Napoca

2023

UNIVERSITATEA "BABEȘ-BOLYAI" CLUJ-NAPOCA
FACULTATEA DE FIZICĂ
SPECIALIZAREA FIZICĂ MEDICALĂ

LUCRARE DE LICENȚĂ

**Detectia Colorimetrică a Proteinei C-reactive Utilizând
Nanoparticule de Argint Funcționalizate cu Aptamer**

Coordonatori științifici:

CS II dr. Monica Potara

Prof. dr. Simion Aștilean

Absolvent:

Raluca- Ioana Apetri

Cluj- Napoca

2023

Abstract

Nanoparticles are used in nanomedicine to pinpoint and address specific issues, such as diagnosis, treatment and monitoring of various diseases, including cancer, cardiovascular conditions, infections, etc. Particularly, noble-metal nanoparticles are well-suitable for such applications due to their unique plasmonic properties. The main goal of this BSc degree thesis is to exploit the optical properties of noble-metal nanoparticles for colorimetric detection of C-reactive protein (CRP). CRP is a crucial biomarker whose blood level is correlated with the presence of various diseases in the body, such as viral and bacterial infections, sepsis, autoimmune diseases, or cardiovascular conditions. The specific colorimetric detection of CRP carried out in this BSc degree thesis relies on the target-triggered aggregation of colloidal silver nanoparticles (AgNPs) conjugated with a CRP-specific aptamer. In the first step, spherical AgNPs are prepared and conjugated with aptamer. The optical and morphological properties of the nanoparticles are investigated by UV-Vis-NIR absorption spectroscopy and transmission electron microscopy (TEM). The successful conjugation of AgNPs with aptamer is demonstrated by stability tests in saline solutions. The obtained yellow colloidal suspension exhibits one localized surface plasmon resonance (LSPR) with a maximum at 399 nm. In the presence of sodium chloride, the interaction of AgNPs conjugated with aptamer with various CRP concentrations results in a color change of the colloidal solutions, thus making possible the detection of CRP even by the naked-eye. Subsequent UV-Vis measurements reveal the emergence of a new red-shifted plasmonic band, associated with aggregated NPs. For CRP quantification, a calibration curve is constructed by representing the ratio between the LSPR absorption maximum of aggregated and individual nanoparticles as a function of CRP concentration. The specificity of the prepared nanoconjugates to CRP is demonstrated by replacing CRP with other molecules usually present in the body. In conclusion, this study illustrates the viability of employing aptamer-functionalized nanoparticles in the detection of CRP and the diagnosis of cardiovascular disorders. New uses and advancements in nanotechnology for medicine may be explored through further study and development.

Cuprins

Introducere	5
Capitolul I: Nanoparticule de metal nobil	7
I.1 Plasmonii de suprafață și rezonanța plasmonică de suprafață	8
I.2. Influența dimensiunii nanoparticulelor asupra poziției și formei LSPR.....	10
I.3. Influența distribuției de dimensiuni a nanoparticulelor asupra poziției și formei LSPR ...	11
I.4. Influența formei nanoparticulelor asupra poziției și formei LSPR	12
I.5. Influența mediului dielectric din jurul nanoparticulelor asupra poziției și formei LSPR...	13
I.6. Influența interacțiunii dintre nanoparticule asupra poziției și formei LSPR	14
I.7. Aplicații biomedicale ale nanoparticulelor	15
Capitolul II: Materiale si metode.....	18
II.1. Materiale	18
II.2. Metode	18
II.2.1. Sinteza nanoparticulelor de argint (AgNPs)	18
II.2.2. Caracterizarea optică și morfologică a AgNPs	19
II.2.3. Funcționalizare cu aptamer	20
II.2.4. Testarea stabilității AgNPs în soluție salină înainte și după funcționalizarea cu aptamer	20
II.2.5. Detecția CRP pe baza AgNPs funcționalizate cu aptamer.....	20
II.2.6. Teste de specificitate în detecția colorimetrică a CRP	21
Capitolul III: Rezultate și măsurători experimentale.....	22
III.1. Caracterizarea optică și morfologică a AgNPs	22
III.2. Studiul stabilității AgNPs în prezența soluției saline	24
III.3. Funcționalizarea AgNPs cu aptamer	25
III.4. Utilizarea AgNPs funcționalizate cu aptamer pentru detecția colorimetrică a CRP	27
III.5. Teste de selectivitate	32
Concluzii și perspective.....	35
ANEXE.....	36
Bibliografie.....	37

Introducere

Nanomedicina reprezintă o ramură a nanotehnologiei care are ca scop identificarea și rezolvarea unor probleme medicale, acest lucru realizându-se prin nanoinstrumente, într-un mod rapid și nu foarte costisitor. Un exemplu de nanoinstrumente îl reprezintă nanoparticulele de metal nobil, numite și nanoparticule plasmonice (PNPs), care prezintă proprietăți chimice, electronice și optice unice, care nu apar la scară macroscopică. Spre exemplu, PNPs pot fi integrate cu ușurință în sisteme datorită dimensiunii lor reduse. De asemenea, chimia suprafeței permite modificarea cu ușurință a PNPs astfel încât să poată fi biocompatibilizate sau funcționalizate pentru țintirea specifică a tumorilor sau (bio)moleculilor de interes. Mai mult, interacțiunea NPs cu lumina și apariția rezonanțelor plasmonice de suprafață localizate (LSPR) stă la baza aplicării PNPs în diagnosticul și tratamentul diferitelor boli. Un astfel de exemplu este detecția colorimetrică (cu ochiul liber) bazată pe proprietatea suspensiilor coloidale de PNPs de a-și schimba culoarea atunci când agregă.

Lucrarea de față are ca scop detecția colorimetrică a proteinei C-reactive (CRP), un biomarker asociat cu infecțiile și bolile cardiovasculare, utilizând suspensii coloidale de nanoparticule de argint (AgNPs) funcționalizate cu un aptamer cu specificitate ridicată față de CRP. Aceste rezultate au fost obținute în cadrul Institutului de Cercetări Interdisciplinare în Bio-Nano-Științe din cadrul Universității Babeș- Bolyai. Astfel, lucrarea este împărțită în trei capitole.

Primul capitol surprinde o scurtă prezentare a nanoparticulelor de metal mobil cu accent pe proprietățile optice ale acestora și a parametrilor de care depind acestea. Este subliniată importanța plasmonilor de suprafață și a rezonanței plasmonice de suprafață și, totodată sunt ilustrate avantajele NPs și aplicațiilor biomedicale ale acestora.

Cea de-a doua parte a lucrării cuprinde detaliile experimentale privind sinteza AgNPs, și funcționalizarea acestora cu aptamer. Tot aici, a fost explicat modul prin care s-a efectuat detecția CRP și cum au fost realizate testele de selectivitate. În plus, este prezentată tehnica de caracterizare optică, și anume spectroscopia de absorbție UV-Vis-NIR, dar și caracterizarea lor morfologică, realizată prin microscopia electronică de transmisie (TEM).

În capitolul trei sunt interpretate rezultatele experimentale obținute. A fost realizată prepararea și caracterizarea optică a AgNPs, ca mai apoi să se studieze stabilitatea acestora în prezența unei soluții saline. După acești pași, AgNPs au fost funcționalizat cu aptamer, următorul pas fiind realizarea detecției colorimetrice a CRP. Ulterior, s-au efectuat teste de selectivitate prin înlocuirea

CRP cu alte molecule pentru a verifica agregarea AgNPs în prezența acestora. Ultima parte a lucrării prezintă concluziile finale și perspective.

Capitolul I: Nanoparticule de metal nobil

Nanoștiinta este un domeniu care studiază proprietățile structurilor și moleculelor de dimensiuni nanometrice (1-100 nm), iar cuvântul „nano” provine din limba greacă și înseamnă pitic. Nanotehnologia este axată pe dezvoltarea de aplicații tehnologice pe baza cunoștințelor și rezultatelor obținute în nanoștiință. [1]

Unul dintre cele mai promițătoare produse ale nanotehnologiei îl reprezintă nanoparticulele de metal nobil, precum aur, argint, cupru. Acestea sunt bine cunoscute pentru proprietățile lor unice, care nu apar la scară macroscopică. Un astfel de exemplu este răspunsul lor optic la interacțiunea cu lumina, care stă la originea culorilor intense ale suspensiilor coloidale de nanoparticule de metal nobil. [2]

Datorită culorilor lor, nanoparticulele de metal nobil au fost folosite încă din perioada Evului Mediu ca pigmenți pentru realizarea vitraliilor vechilor catedrale și biserici. [3] De asemenea, sticla colorată cu nanoparticule metalice a fost utilizată pentru fabricarea diferitelor obiecte, Italia a fost prima țară în care au fost descoperite pahare ce erau colorate prin nanoparticule de cupru (CuNPs). În plus, mai multe mozaicuri romane au fost realizate cu ajutorul NPs metalice pentru a obține culoarea roșie. [4]

Cel mai faimos exemplu de piesă de artă realizată cu ajutorul NPs metalice este Cupa Lycurgus. [5] Sticla din care este confecționată prezintă un efect dicroic. Acest efect are la bază fabricarea sticlei prin adăugarea unor cantități mici de NPs coloidale de aur și argint, precipitate în materialul sticlei astfel încât să formeze un aliaj. [6] Cupa Lycurgus are o caracteristică destul de aparte, schimbându-și culoare după felul în care bate lumina: verde când este luminată din față și roșie când este luminată din spate. Studiile arată că are o cantitate infimă de cristale de metal foarte mici (~70 nm) ce au aur (Au) și argint (Ag). [7]

Totuși, NPs nu sunt utilizate doar pentru culorile lor. Acestea au multiple domenii de aplicabilitate, cum ar fi fabricarea medicamentelor [8], controlul alimentelor [9], biomedicină [5], secvențierea ADN-ului [5], marcarea celulelor [5], etichetarea în vivo și în imagistică [5]. Din diversitatea de NPs de metal nobil, nanoparticulele de aur (AuNPs) și cele de argint (AgNPs) sunt cele mai frecvent utilizate în detecție, acest fapt fiind datorat proprietăților sale fizice și chimice. [10] Una dintre cele mai importante proprietăți optice a structurilor metalice la nivel nanometric este rezonanța plasmonică de suprafață (SPR), fenomen ce va fi explicat în detaliu în cele ce urmează. [5]

I.1 Plasmonii de suprafață și rezonanța plasmonică de suprafață

Pentru a înțelege proprietățile plasmonice ale suspensiilor coloidale de nanoparticule metalice, considerăm nanoparticula o rețea formată din ioni pozitivi în care electronii de conducție au o mișcare aproape liberă. Atunci când particulele sunt excitate cu o sursă de lumină, câmpul electromagnetic al luminii generează o forță asupra electronilor de conducție, făcându-i să se deplaseze către suprafața NPs. În acest fel, apare o separare de sarcină între electronii liberi confinați la suprafața NP și ionii pozitivi, creându-se astfel un dipol electric. Dipolul creează un câmp electric în NPs, ce este opus față de cel creat de lumină incidentă, care va împinge electronii înapoi în poziția de echilibru. (Figura I.1.). Dacă deplasarea electronilor este foarte mare, atunci și dipolul electric va fi mare, rezultând că și forța de restabilire crește. [5]

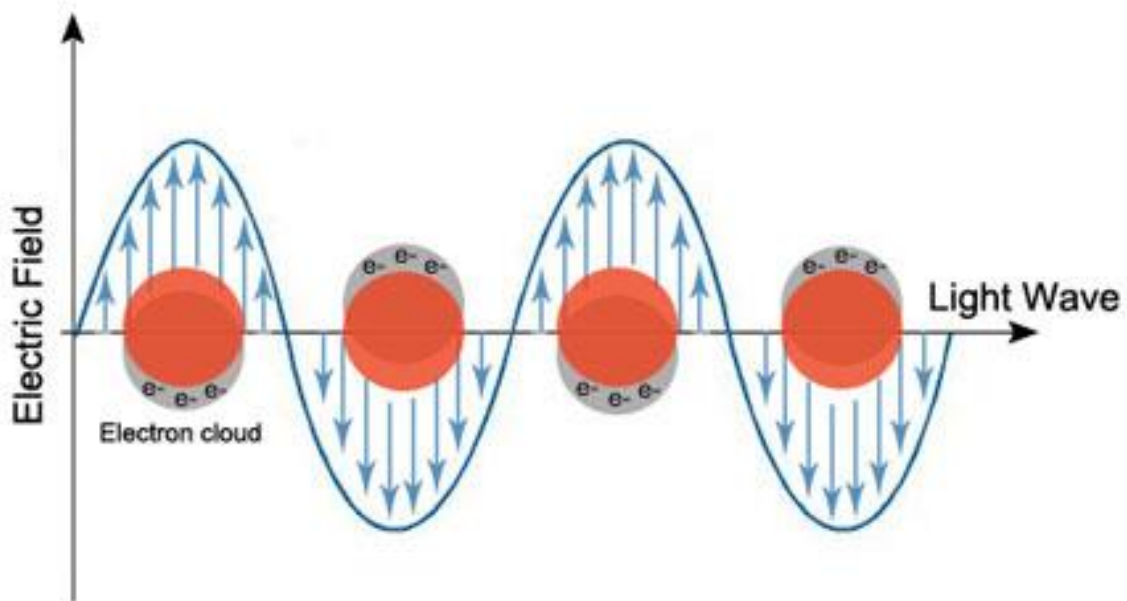


Fig. I.1. Interacțiunea dintre lumină și o NPs metalică. [11]

Dacă electronii nu mai primesc lumină, atunci ei se vor deplasa de la poziția de echilibru, oscilând cu o frecvență ce poartă numele de frecvență de rezonanță, care în cadrul suprafețelor plasmonice, preia denumirea de frecvență plasmonică. Fenomenul este asemănător cu cel al unui oscilator liniar în care forța de restabilire este proporțională cu deviația față de poziția de echilibru. [5]

În plus, câmpul electromagnetic rezonază cu oscilațiile coerente ale electronilor liberi din metale, manifestând rezonanță plasmonică de suprafață (SPR), care se află la originea culorilor din

soluțiile de metale prețioase coloidale. La NPs metalice, SPR sunt localizate la suprafața nanoparticulei și poartă denumirea de rezonanțe plasmonice de suprafață localizate (LSPR). [5]

Pentru a putea determina experimental LSPR, se măsoară spectrul de absorbție din domeniul vizibil- infraroșu apropiat al coloidului din NPs metalice. În cazul în care avem NPs agregate, se poate observa o schimbare de culoare a soluției coloidale, precum și forma și poziția LSPR. Pentru NPs dispersate în soluție, poziția și forma LSPR este dată de: dimensiune, formă, distribuția de dimensiuni, constanta dielectrică a mediului ce înconjoară NPs și constanta dielectrică a metalului din care sunt realizate NPs. [12]

O consecință a LSPR sunt culorile nanoparticulelor. Așa cum am menționat anterior, culorile lor au fost folosite ca pigmenți decorativi sau pentru a se crea diverse modele de sticlărie. [7] Aurul de exemplu (Fig. I.5.1), în cantități mari, la lumină are o culoare gălbuie, în timp ce aurul aflat în cantități mai mici, devine albastru în transmisie. Desigur, albastrul capătă, la rândul lui, niște nuanțe de portocaliu, apoi tonuri de roșu și violet, pe măsură ce particula este micșorată spre ~ 3 nm. Modificările de culori apar când sunt schimbări în SPR, care este frecvența la care electronii de conducție oscilează ca răspuns la câmpul alternativ al câmpului electromagnetic incident. [7]

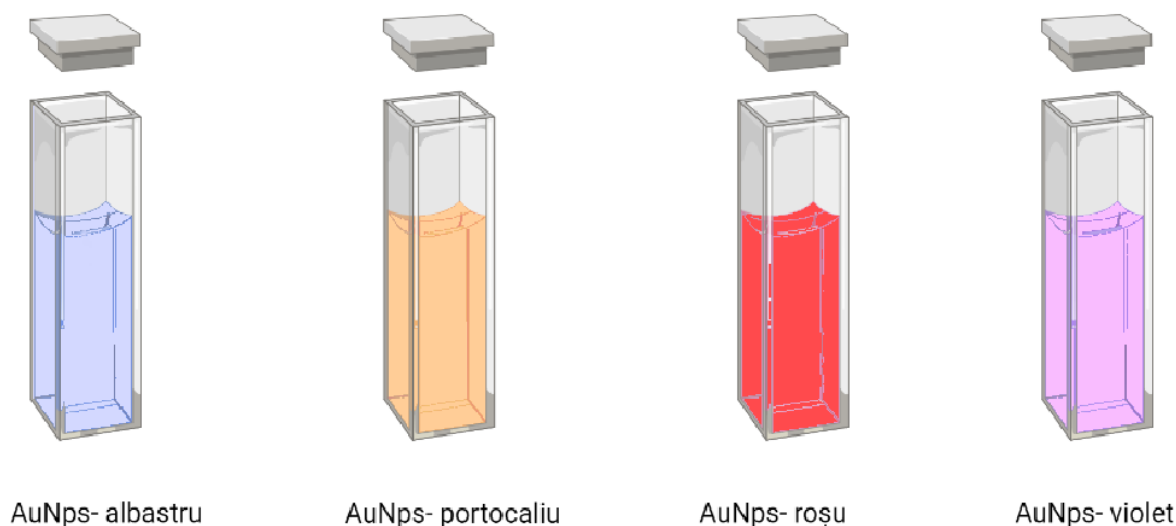


Fig. I.5.1. Diferitele culori ale aurului.

Metalele cu electroni liberi (Au, Ag, Cu și metalele alcaline) dețin în spectrul vizibil rezonanțe plasmonice, ce fac ca ele să aibă culori atât de fascinante. Totuși, mediul în care se dispersează particulele de metal este o influență în caracteristicile lor optice. Indicele de refracție și distanța medie dintre două NPs își fac simțită prezența în modificarea culorilor. În cazul în care avem NPs

agregate, se poate observa o schimbare a culorii soluției coloidale, precum și a formei și poziția LSPR. În cele ce urmează sunt discutați parametrii care influențează forma și poziția LSPR. [7]

I.2. Influența dimensiunii nanoparticulelor asupra poziției și formei LSPR

După cum am menționat mai sus, poziția și forma LSPR este influențată de dimensiunea NPs. Proprietățile SPR ce depind de mărimea NPs pot fi explicate prin mai multe metode, dar una dintre cele esențiale surprinde două categorii de NPs: cu dimensiunea mai mică de 20 nm sau cu dimensiunea între 20-80 nm.

Pentru NPs ce au o dimensiune mai mică de 20 nm, dimensiunea nanoparticulelor afectează lățimea și intensitatea LSPR, dar efectul produs asupra poziției LSPR este considerabil mai redus. În figura I.2., sunt prezentate spectrele de absorbție ale unor nanoparticule coloidale de argint (AgNPs) de diferite dimensiuni. Pe măsură ce mărimea particulei crește, crește și absorbanta, iar în timp ce se întâmplă acest procedeu, poziția maximului LSPR se deplasează ușor. [5]

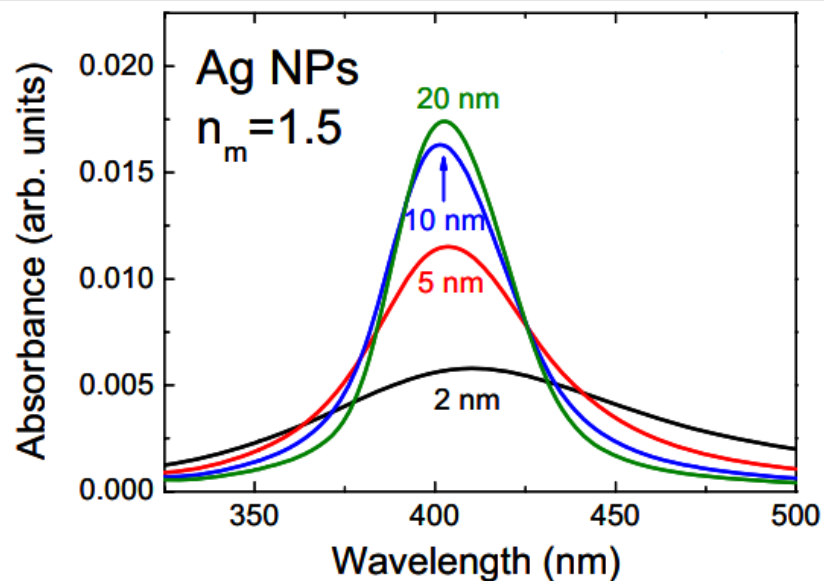


Fig. I.2. Spectrul absorbției optice pentru AgNPs de diferite mărimi. [5]

Pentru cea de-a doua categorie de NPs, dimensiunea lor este între 20-80 nm. Ele nu sunt considerate mult mai mici decât lungimea de undă a luminii. În acest caz, diametrul nanoparticulelor influențează poziția maximului LSPR. [5]

NPs mai mici decât 20 de nm pot fi descrise ca un dipol electric, în timp ce NPs cu dimensiuni mai mari nu mai sunt descrise ca un dipol, ca urmare apar și rezonanțe plasmonice multipolare.

Datorită necesității termenilor multipolari, banda de rezonanță este divizată pe multiple vârfuri: cuadrupolului i se atribuie două vârfuri, iar octopolului trei. [5]

I.3. Influența distribuției de dimensiuni a nanoparticulelor asupra poziției și formei LSPR

În ultimii ani, sinteza NPs a făcut progrese uriașe, având ca rezultat obținerea de NPs monodisperse (cu dimensiuni foarte apropiate). Spectrul de absorbție UV-VI este media ponderată a spectrelor de absorbție ale nanoparticulelor din probă. Practic, în cazul nanoparticulelor monodisperse, LSPR este îngustă, în timp ce polidispersitatea conduce la o lărgire a benzii de absorbție. În figura I.2.1., se poate observa cum cu cât este mai mare polidispersitatea (diferențe mari între dimensiunea nanoparticulelor), cu atât banda plasmonică a suspensiei coloidale este mai largă. De exemplu, pentru o conglomerare de AgNPs ce au media dimensiunii 10 nm și dispersia de $\pm 4,2$ nm, grosimea la semiînălțime (FWHM) a benzii de absorbție este de trei ori mai mică decât cea a AgNPs de 10 nm și dispersia de $\pm 8,5$ nm. Ca și concluzie, nu se poate determina dimensiunea unei NP doar din grosimea la semiînălțime, întrucât este dependentă de doi parametri: diametrul mediu și distribuția de dimensiuni. [5]

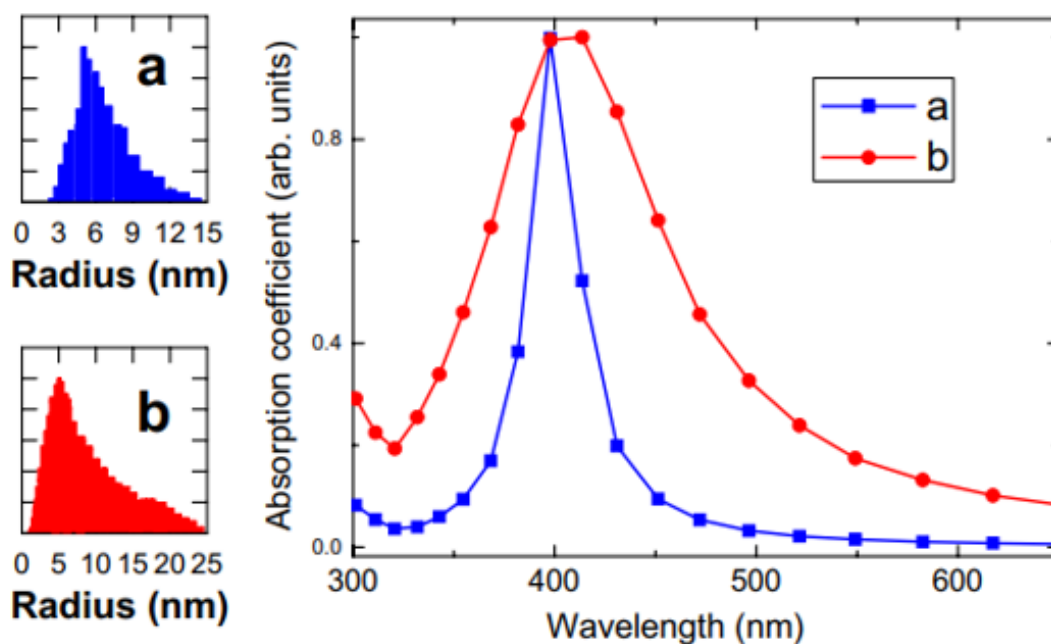


Fig. I.3. Distribuția dimensională este reprezentată în partea stângă, iar în dreapta spectrele de absorbție optică pentru AgNPs, ambele având dimensiuni de 10 nm, dar cu diferite dimensiuni de disepie. [5]

I.4. Influența formei nanoparticulelor asupra poziției și formei LSPR

NPs sunt de mai multe forme și anume: nanoroduri- ce au dimensiunea între 1-100 nm, prisme triunghiulare, nanocuburi, nanocages, sferice, plate sau în formă de stea. [5] În imaginea de mai jos (Fig. I.2.2.) se pot vedea câteva din formele pe care NPs le pot lua.

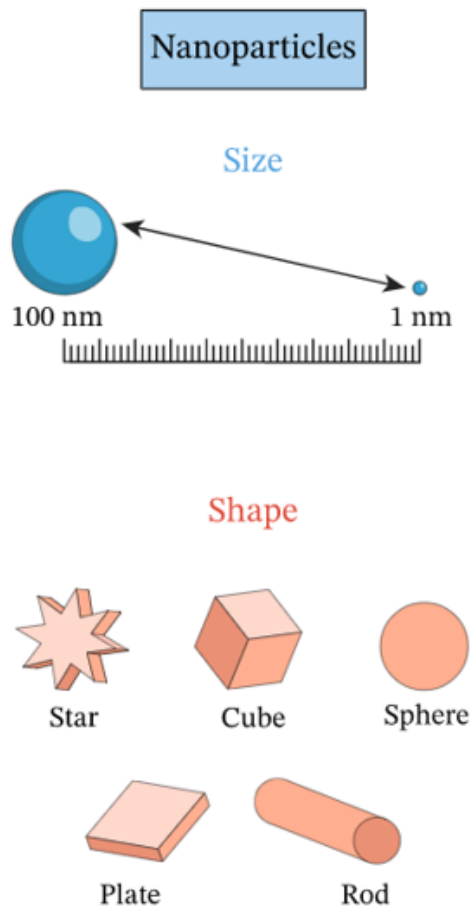


Fig. I.4.1. Câteva din formele pe care NPs le pot lua. [13]

Rezonanța plasmonică de suprafață este influențată foarte mult de forma NPs. Geometria particulelor influențează, la rândul ei, forța de restabilire ce este legată de sarcina ce se acumulează la suprafața particulei. Spre exemplu, în cazul nanoparticulelelor sub formă de bastonașe se observă două benzi LSPR (fig. I.4.2), în spectrul de absorbție corespunzătoare celor două direcții de oscilație a electronilor, longitudinală și transversală.

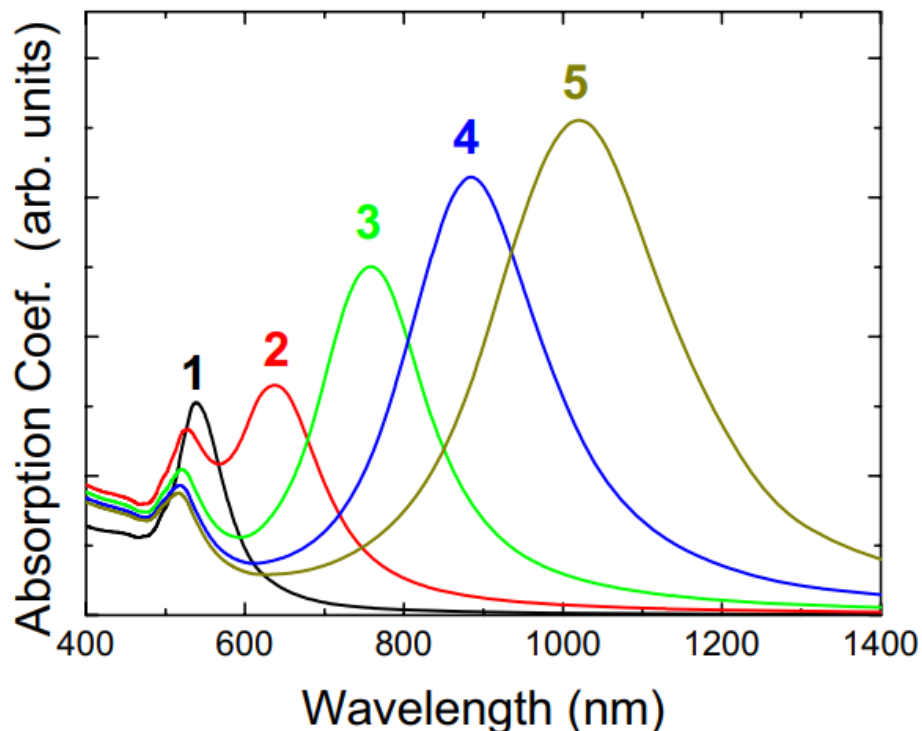


Fig. I.4.2. Spectrul de absorbție ale nanorodurilor. [5]

Aici, acumularea de sarcină este maximă atunci când există plasmoni transversali și minimă atunci când electronii se deplasează de-a lungul axei longitudinale. Din această cauză, poziția LSPR longitudinală este apropiată de poziția LSPR corespunzătoare nanoparticulelor sferice, în timp ce poziția LSPR transversală se deplasează spre roșu. Prin modificarea așa-numitului raport de aspect (raportul dintre lungimea și grosimea bastonașului) este posibilă deplasarea LSPR longitudinală pe un domeniu spectral larg, din vizibil până în infraroșu apropiat (NIR). Această deplasare a LSPR este însoțită de modificarea culorii soluției coloidale. În cazul altor geometrii, la prisme triunghiulare sau nanocuburi, efectele devin mai dificile, ceea ce demonstrează faptul că dacă ne abatem de la sfericitate, atunci rezonanța va avea lungimi de undă mai mari. [5]

I.5. Influența mediului dielectric din jurul nanoparticulelor asupra poziției și formei LSPR

LSPR este dependentă și de mediul dielectric ce se află în jurul nanoparticulelor. Cel mai important efect este însă polarizarea mediului. Când plasmonii de suprafață sunt excitați se mai creează un câmp electric, în vecinătatea NPs, datorită acumulării de sarcină, altul față de cel creat de lumina incidentă. Astfel, se produce polarizarea mediului dielectric, la marginea dintre mediul dielectric și NPs metalice, ca mai apoi să fie rezultată o acumulare de sarcină. Această acumulare de sarcină

compensează parțial acumularea de sarcină dată de mișcarea electronilor de conducție din interiorul NPs. Acest efect conduce la o deplasare a LSPR înspre lungimi de undă mai mari, odată cu creșterea indicelui de refracție al mediului din jurul nanoparticulei. Proprietatea nanoparticulelor plasmonice de a detecta modificarea indicelui de refracție al mediului din jurul lor este exploatată în detecția LSPR. [5]

I.6. Influența interacțiunii dintre nanoparticule asupra poziției și formei LSPR

Reiterând cele menționate în subcapitolul anterior, atunci când plasmonii de suprafață sunt excitați, se produce un câmp electric în vecinătatea NPs. Dacă NPs sunt apropiate una de alta, atunci câmpul ce va fi aplicat NPs o să fie cel creat de lumina incidentă adunat cu cel creat de celelalte NPs, din acest lucru rezultând faptul că se vor schimba condițiile de rezonanță. De obicei, interacțiunea dintre NPs va produce o deplasare spre roșu a benzii LSPR și va crește până la lățimea completă la jumătate din maxim (FWHM), precum este ilustrat în figura I.6. [5] Acest efect este însoțit de modificarea culorii suspensiei colidale și stă la baza detecției colorimetrice (cu ochiul liber).

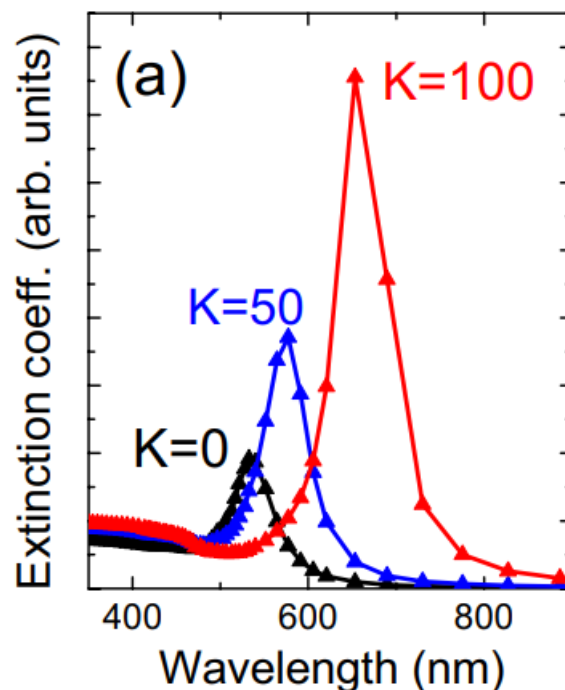


Fig. I.6. Spectrul de absorbție al nanoparticulelor de aur cu interacțiunea dintre nanoparticule. [5]

I.7. Aplicații biomedicale ale nanoparticulelor

NPs au o gamă vastă de domenii în care pot fi folosite: biomedicină, secvențierea ADN-ului, etichetarea celulelor, hipertemie, eliberarea de medicamente, detecție colorimetrică etc.

a) *Biomedicina*- e bine cunoscut faptul că NPs de metal dețin anumite proprietăți ce le fac utile pentru aplicarea lor în biomedicină, fiind și extrem de biocompatibile și ușor de funcționalizat. Cercetătorii au arătat că acestea au dimensiunea biologică comparabilă cu organismele, precum virușii, lanțurile de ADN, celulele și bacteriile. Astfel, NPs funcționalizate care prezintă o afinitate ridicată asupra celulei/țesutului target pot crește eficiența și specificitatea tratamentului. [5]

În acest domeniu, diverse NPs de metal sunt folosite pentru diagnosticarea și tratamentul diferitelor forme de cancer, cele mai cunoscute metale folosite fiind cele de Aur (Au) și argint (Ag). AgNPs mai sunt utilizate pentru a salva viețile oamenilor ce suferă de HIV, tuberculoză, luptă împotriva bacteriilor ce au devenit rezistente la diferite antibiotice care nu mai pot omorî bacteria, pentru detectarea și imagistica tumorilor, eliberarea medicamentelor și în terapia prin hipertermie împotriva tumorilor. De astfel, AgNPs au caracteristici ce s-au dovedit a fi anticancerigene, încetinesc creșterea hormonilor și combat procesul de formare a unei noi vascularizații de la vascularizația preexistentă în preajma țesuturilor tumorale. [14]

b) *Secvențierea ADN-ului* – este o metodă ce are la bază permiterea determinării secvenței nucleotidice a unei molecule de ADN. [15] Această procedură este folosită pentru a înlocui metoda bazată pe coloranți. E dovedit faptul că acești coloranți pot crea anumite probleme, precum fotodecolorarea și instabilitatea în anumite medii, marginalizând, astfel, utilitatea acestora. Prin utilizarea de NPs metalice, are loc depășirea granițelor în ceea ce privește rezoluția spațială și sensibilitatea, lucruri absolut utile pentru a genera teste. Acest depășiri de limitări sunt posibile pentru că metalele nobile sunt foarte stabile, iar detectarea unei cantități infime de NPs este permisă datorită faptului că secțiunea transversală de absorbție este asociată cu SPR. [5]

c) *Etichetarea celulelor* – pentru acest procedeu sunt utilizate NPs ce sunt funcționalizate cu biomolecule, care pot ajuta la identificarea celulelor canceroase. În funcție de ce afinitate pentru celulele canceroase au moleculele cu care sunt funcționalizate NPs, se detectează acele celule prin microscopia optică. [5]

d) *Hipertermia* – e o tehnică non-invazivă împotriva cancerului ce are loc prin încălzirea țesutului viu cu aproximativ 5-10 grade Celsius mai mult decât temperatura corpului,

Funcționalizate cu Aptamer Pentru Aplicații În Biodetecție

pentru a omorî celulele anormale. Un alt pas ar fi hipetermia selectivă, ce se ocupă cu încălzirea controlată a celulelor canceroase. Excitarea plasmonilor de suprafață asociată cu absorbția luminii produc o încălzire locală ce are efectul de hipetermie. Nanorodurile sunt funcționalizate ca mai apoi să fie legate la celulele canceroase. Dacă luminăm țesuturile cu laser NIR lungimea de undă a plasmonilor de suprafață, atunci energia pe care nanorodurile o absorb este parțial transformată în căldură, ceea ce va duce la o creștere a temperaturii cu câteva grade. Beneficiile acestei proceduri constau în economisirea țesutului normal și înlocuirea celulelor maligne cu cele sănătoase. [5]

- e) *Eliberarea de medicamente*- cu influența hipetermiei, asociată cu excitația SPR se poate realiza administrarea de medicamente. În mare parte, acest lucru are loc atunci când medicamentele care trebuie furnizate dețin o agresivitate mai mare, provocând efecte adverse nedorite în țesutul sănătos. Procedul are loc prin acoperirea medicamentului cu un înveliș pentru a nu intra în contact cu celulele non-țintă, iar atunci când medicamentul ajunge la celulele țintă, acel înveliș este dat la o parte ca să se poată realiza procesul de eliberare și pentru a acționa. În figura I.6.1. este explicat procedul prin care se învelește medicamentul cu un polimer cu AuNPs și anticorpi (1). În timp ce polimerul și anticorpii ajung la medicament, acesta primește lumină ce are lungimea de undă similară cu cea a SPR (2), ca mai apoi nanoparticulele să dezvolte o reacție prin care se încălzește și se topește învelișul, lăsând să acționeze asupra medicamentului (3). [5]

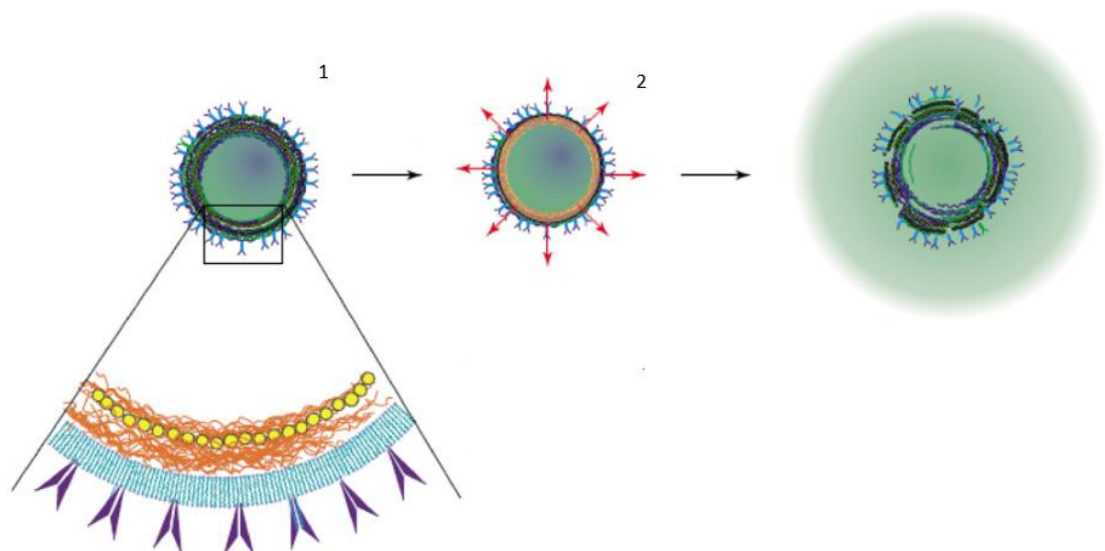


Fig. I.6.1. Metoda de eliberare a polimerului cu AuNPs și anticorpi asupra medicamentului, cu ajutorul iradierii. [5]

f) Detecția colorimetrică

Detecția colorimetrică bazată pe agregarea nanoparticulelor coloidale de metal nobil este una dintre cele mai puternice, rapide și sensibile metode pentru detecția în timp real și la fața locului a diferiților biomarkeri prin simpla observare a schimbării culorii soluției coloidale cu ochiul liber.

Principiul care stă la baza detecției colorimetrice este bazat pe agregarea nanoparticulelor coloidului ce au fost modificate în prealabil cu (bio)molecule (aptameri, anticorpi, peptide etc.), astfel încât să permită captarea specifică a moleculelor de țintă.

Este cunoscut faptul că suspensiile coloidale de nanoparticule de metal nobil au culori intense, aceste culori fiind dependente de morfologia și cuplajul electromagnetic al nanoparticulelor. Din acest fapt rezultă că atunci când NPs sunt agregate, acestea își modifică semnificativ culoarea, aceasta modificare fiind vizibilă cu ochiul liber. Totuși, schimbarea culorii nu este singura modificare ce apare în procesul de agregare, având loc și modificări spectrale, de obicei, prin apariția unei noi benzi plasmonice, ce este dată de NPs interconectate, bandă ce poate fi observată cu ajutorul spectroscopiei UV-Vis-NIR. [16]

Capitolul II: Materiale si metode

II.1. Materiale

Materialele folosite pentru realizarea lucrării au fost: acid ascorbic ($C_6H_8O_6$), azotat de argint ($AgNO_3$), citrat de sodiu, clorură de sodiu ($NaCl$), aptamer ($5'$ -CGA AGG GGA TTC GAG GGG TGA TTG CGT GCT CCA TTT GGT G- $3'$), soluție tampon de tip buffer necesară pentru dizolvarea și diluția aptamerului, proteina C-reactivă (CRP) și soluție salină tampon de tipul fosfat buffer salin (PBS) utilizată pentru diluarea CRP.

Substanțele chimice folosite nu au trecut prin nicio purificare înainte de a fi utilizate. Pentru sinteza, purificarea, diluarea și re-suspendarea nanoparticulelor coloidale s-a utilizat apă ultrapură, cu o rezistivitate de aproximativ $18 M\Omega$. Apa a fost obținută de la sistemul purificator Milli-Q (Millipore, Merck, Massachusetts, USA).

II.2. Metode

II.2.1. Sinteza nanoparticulelor de argint (AgNPs)

Pentru a sintetiza AgNPs, într-un pahar Erlemeyer s-a realizat un amestec de 47 ml de apă ultrapură (H_2O) și 500 μ l de acid ascorbic (AA) care a fost încălzit până la fierbere sub agitare magnetică. Apoi s-a adăugat un amestec de 1 ml H_2O , 0,25 ml $AgNO_3$ și 1 ml de citrat de sodiu și s-a redus încălzirea. După 30 de minute, încălzirea a fost oprită, iar soluția a fost lăsată sub agitare magnetică pentru încă 30 de minute.

În imaginea II.2.1 de mai jos, este reprezentată sinteza AgNPs în laborator, după adăugarea amestecului de soluții (1 ml H_2O , 0,25 ml $AgNO_3$ și 1 ml de citrat de sodiu). În urmă sintezei, soluția coloidală a fost purificată printr-o metodă mecanică, adică prin centrifugare. Centrifugarea s-a realizat timp de 10 minute, la o viteză de 12 000 de rotații pe minut, la temperatura de 25 de grade. După ce substanța a fost centrifugată, AgNPs s-au depus la baza eppendorfului, iar cu ajutorul unei micro-pipete au fost extrase compușii nereacționați aflați în exces (supernatant), ca mai apoi AgNPs să fie redispersate în același volum de apă ultrapură, aceeași cantitate de volum ca cea eliminată.

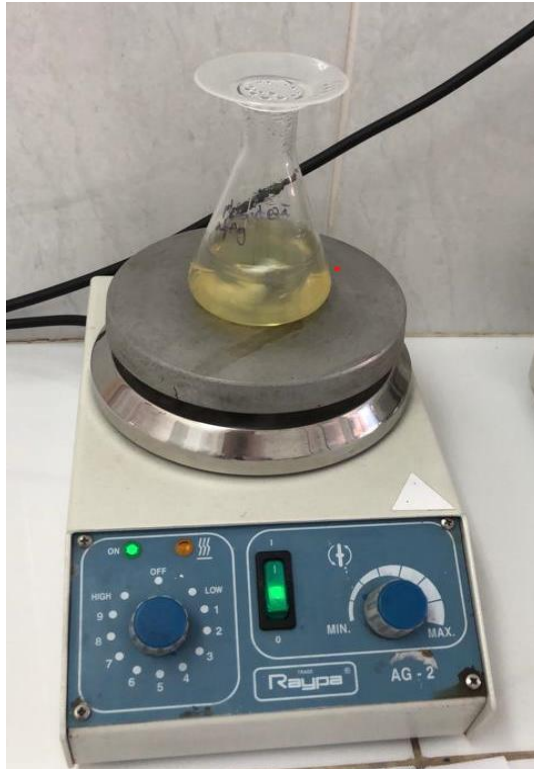


Fig II.2.1. Imagine digitală a suspensiei coloidale de nanoparticule de argint înregistrată în timpul sintezei.

II.2.2. Caracterizarea optică și morfologică a AgNPs

Măsurătorile UV-Vis-NIR s-au realizat prin intermediul unui spectro-fotometru Jasco V- 730 UV-Vis (anexa 1) de la compania Jasco International Co., Ltd (Tokyo, Japonia) ce are o rezoluție spectrală de 1 nm cu scopul de a caracteriza optic nanoparticulele de argint sintetizate. S-au efectuat măsurători cu ajutorul unor cuve de cuarț (cu drum optic de 2 mm) de la Hellma (Germania). Măsurătorile au fost realizate la temperatura camerei și spectrele au fost analizate prin programul Spectra Manager.

Microscopia electronică prin transmisie (TEM) a fost realizată pentru caracterizarea morfologică a nanoparticulelor. Imaginile TEM au fost înregistrate folosind un microscop JEOL JEM-1010 (Tokyo, Japonia).

II.2.3. Funcționalizare cu aptamer

Aptamerii reprezintă niște secvențe scurte de ADN, ARN, XNA. În cazul lucrării de față, aptamerul folosit este o oligonucleotidă sintetică, scurtă, monocatenară, cu afinitate și specificitate ridicată față de CRP. Aptamerul a fost atașat pe suprafața AgNPs cu scopul de a le conferi stabilitate în soluție salină. Pentru dizolvarea și diluarea aptamerului la concentrațiile dorite s-a utilizat o soluție tampon recomandată de producător. Protocolul de funcționalizare constă în incubarea timp de 15 minute la 25 °C a 320 μl de AgNPs centrifugate împreună cu 80 μl de aptamer.

II.2.4. Testarea stabilității AgNPs în soluție salină înainte și după funcționalizarea cu aptamer

Stabilitatea AgNPs în prezența sării a fost testată prin incubarea unui volum de 320 μl de AgNPs + 80 μl apă cu un volum de 15 μl PBS + 45 μl de NaCl 0,3M. Acest amestec a fost menținut timp de 5 minute la 25°C, după care s-a înregistrat spectrul UV-Vis-NIR. Volumul de 80 μl apă a fost utilizat pentru a simula volumul de aptamer, în timp ce volumul de 15 μl PBS a fost utilizat pentru a simula volumul de CRP (PBS fiind solventul CRP). În mod similar, s-a testat și stabilitatea AgNPs funcționalizate cu aptamer.

II.2.5. Detecția CRP pe baza AgNPs funcționalizate cu aptamer

Pentru a putea detecta CRP, au fost utilizate AgNPs funcționalizate cu aptamer, conform protocolului descris mai sus. Concret, peste un volum de 400 μl coloid AgNPs, s-a adăugat soluția de CRP, luând pe rând concentrațiile de la 1 μg/ml, până la 10 μg/ml. Soluția de CRP a fost adăugată împreună cu 45 μl NaCl de concentrație 0,3M. Amestecul a fost lăsat la 25°C timp de 5 minute. Detecția s-a realizat vizual (colorimetric) prin observarea modificării culorii soluțiilor coloidale în funcție de concentrația de CRP. Pentru cuantificarea CRP s-au colectat spectrele de extincție UV-Vis-NIR și s-a realizat o curbă de calibrare prin reprezentarea grafică a raportului dintre absorbanta nanoparticulelor agregate și cea a nanoparticulelor individuale (A467/A400), în funcție de concentrația de CRP.

II.2.6. Teste de specificitate în detecția colorimetrică a CRP

În plus, a fost realizat efectul altor molecule asupra raportului de agregare a AgNPs acestea fiind acid ascorbic (AA), hemoglobină (Hem), albumină serică de bovină (BSA) și albumină serică de bovină (BSA) care se află în lichid corporal stimulat (SBF). CRP a fost înlocuit de aceste molecule, realizându-se astfel testele de selectivitate. După ce moleculele au fost adăugate, s-au realizat spectrele de absorbție cu ajutorul spectroscopiei UV-Vis-NIR.

Capitolul III: Rezultate și măsurători experimentale

Strategia de detecție ce a fost realizată în această lucrare se bazează pe proprietatea suspensiilor coloidale de AgNPs de formă sferică de a agrega în soluții saline, fenomen ce este însoțit de modificarea culorii soluției coloidale, detecția fiind realizată cu ochiul liber (detecție colorimetrică). Întrucât agregarea suspensiilor conduce la modificarea proprietăților plasmonice prin apariția unor benzi ce sunt rezultatul nanoparticulelor agregate, determinarea CRP s-a realizat și prin colectarea spectrelor de absorbție UV-Vis. Pentru identificarea CRP, AgNPs au fost funcționalizate cu aptamer cu specificitate ridicată față de CRP. Funcționalizarea cu aptamer are rolul de a conferi AgNPs stabilitate ridicată în soluție salină, în absența CRP. Mai jos este prezentată pas cu pas realizarea experimentală a lucrării, precum și rezultate și concluzii.

III.1. Caracterizarea optică și morfologică a AgNPs

Formarea AgNPs a fost pusă în evidență vizual prin colorarea în galben a amestecului de reacție. Culoarea vizibilă este rezultatul interacțiunii rezonante a luminii cu NPs prin excitarea plasmonilor de suprafață din nanoparticulele metalice, orice modificare a culorii soluției coloidale este însoțită de o modificare a spectrului de absorbție UV-Vis al nanoparticulelor. De aceea, primul pas a fost măsurarea prin spectroscopia de absorbție UV-Vis-NIR a coloidul obținut, atât înainte, cât și după centrifugare. La măsurarea AgNPs am observat că suspensia coloidală prezintă o singură bandă plasmonică ce are maximum de absorbție la 399 nm, ceea ce reprezintă răspunsul plasmonic caracteristic nanoparticulelor de argint în formă de sferă.

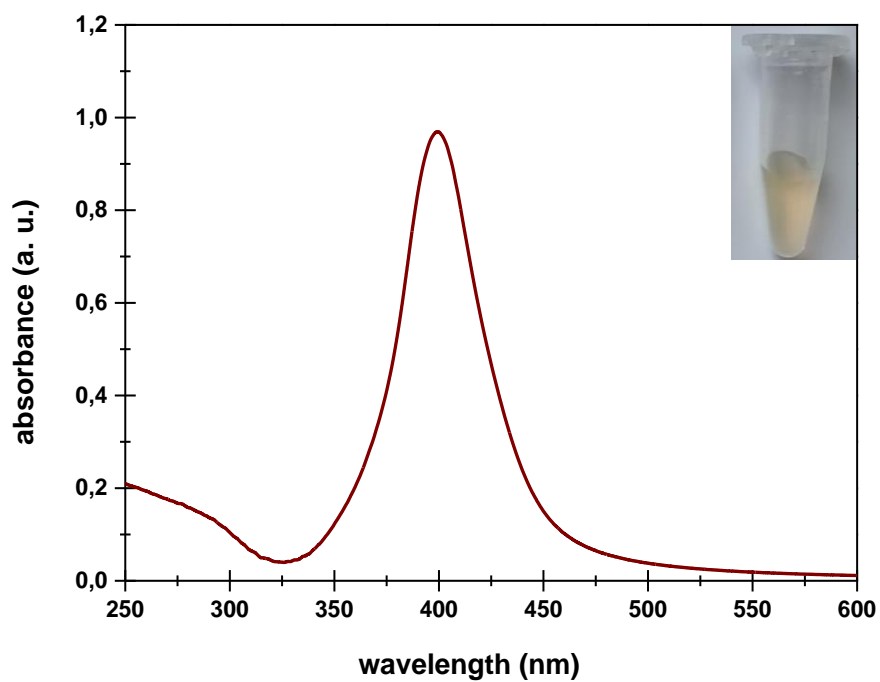


Fig. III.1.1. Spectrul de absorpție a AgNPs sferice, ce au maximul de absorpție la 399 nm.

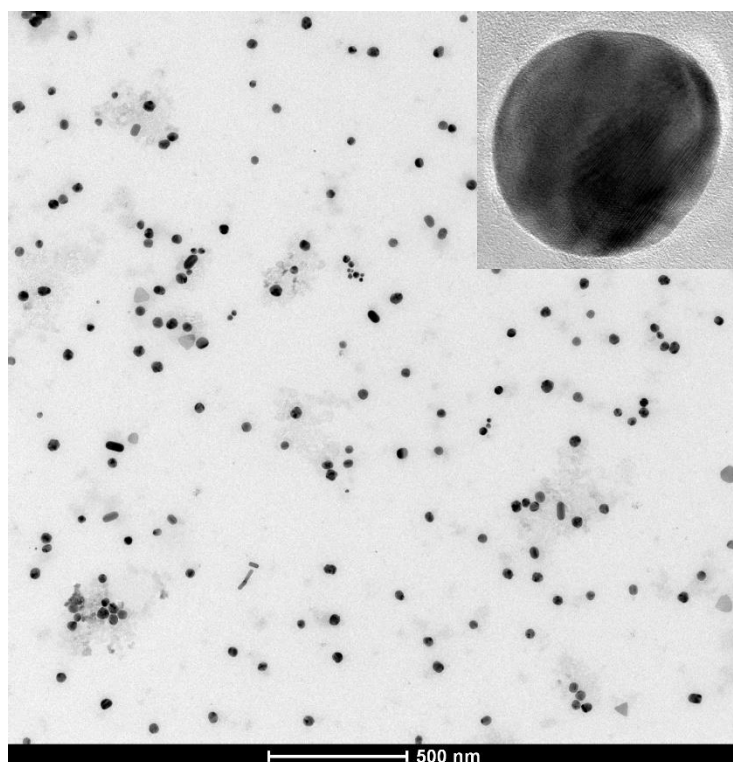


Fig. III.1.2. Imagini TEM reprezentative ale AgNPs.

În figura III.1.2. sunt prezentate două imagini reprezentative ale AgNPs realizate prin microscopie electronică de transmisie (TEM), care confirmă formarea nanoparticulelor de argint și forma lor sferică.

III.2. Studiul stabilității AgNPs în prezența soluției saline

Un pas important în realizarea lucrării a fost identificarea parametrilor optimi de detecție. Pentru început, au fost optimizate concentrația molară și volumul de NaCl necesare pentru a produce agregarea nanoparticulelor. Pentru a îndeplini scopul lucrării, soluțiile coloidale au fost supuse la diverse concentrații de NaCl. Pentru a simula CRP s-a utilizat și un volum de PBS (solventul CRP). Spre exemplu, s-a realizat un amestec de 320 μ l de AgNPs centrifugate cu 80 μ l peste care s-au adăugat într-un singur pas 15 μ l de PBS și 45 μ l NaCl de concentrație 0,3M. Acest amestec a fost menținut într-un vortex la 25°C, pentru 15 minute, fără agitare. Același procedeu s-a efectuat și pentru următoarea probă, modificând doar cantitatea și concentrația de sare, proba conținând 60 μ l de NaCl de 0,2M. Pentru control s-a preparat o probă cu volum similar de apă, apa înlocuind PBS și soluția salină. Modificarea culorii suspensiilor coloidale a fost monitorizată cu ochiul liber. Prin colectarea spectrelor de absorbție UV-Vis, s-au putut constata, pas cu pas, proprietățile plasmonice.

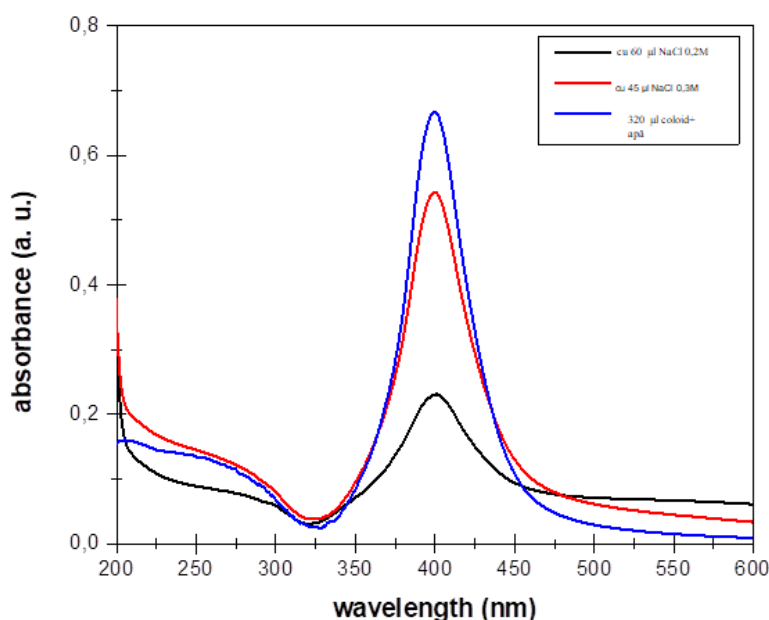


Fig III.2.1 Spectrele de absorbție ale suspensiei coloidale de AgNPs, înainte și după adăugarea de NaCl.

În figura III.2.1 se poate observa o scădere a sării, ce are ca efect agregarea AgNPs și cum la utilizarea unei concentrații mai mari, în cazul nostru 45 μ l de NaCl 0,3M, efectul de agregare este mai puternic. Mai precis, se observă o scădere mai mare a absorbției la 400 nm specifice nanoparticulelor individuale și o creștere a absorbției în domeniul spectral 450-600 nm datorată particulelor agregate. Totodată, se observă și cum o cantitate mai mare de sare, dar de concentrație mai mică (60 μ l NaCl 0,2M) afectează foarte puțin stabilitatea nanoparticulelor, având doar o ușoară agregare. Prin urmare, pentru a putea duce la bun sfârșit detecția CRP-ului am selectat volumul de NaCl 45 μ l de concentrație 0,3M.

III.3. Funcționalizarea AgNPs cu aptamer

Pentru a obține specificitate în detecția CRP, AgNPs au fost funcționalizate cu un aptamer cu afinitate ridicată față de CRP. În mod particular, am selectat aptamerul 5'-CGA AGG GGA TTC GAG GGG TGA TTG CGT GCT CCA TTT GGT G-3'. Următorul pas a constat în funcționalizarea AgNPs cu aptamer și identificarea concentrației optime de aptamer necesară pentru a conferi nanoparticulelor stabilitate în prezența soluției saline. Pentru aceasta, soluțiile coloidale de AgNPs (320 μ l) au fost incubate cu un volum de 80 μ l aptamer, ce avea diverse concentrații (8 μ M, 9 μ M, 10 μ M, 11 μ M și 12 μ M), ca mai apoi să fie menținute pentru 15 minute la 25°C, fără agitare într-un vortex cu temperatură controlată. După 15 min, au fost incubate cu un amestec de 15 μ l PBS și 45 μ l NaCl 0,3M tot la 25°C, dar timp de 5 minute. S-au realizat două probe tip control, una în care volumul de aptamer a fost înlocuit cu un volum similar de apă și altă probă, în care volumele de aptamer, NaCl și PBS au fost înlocuite cu apă, având aceși parametri.

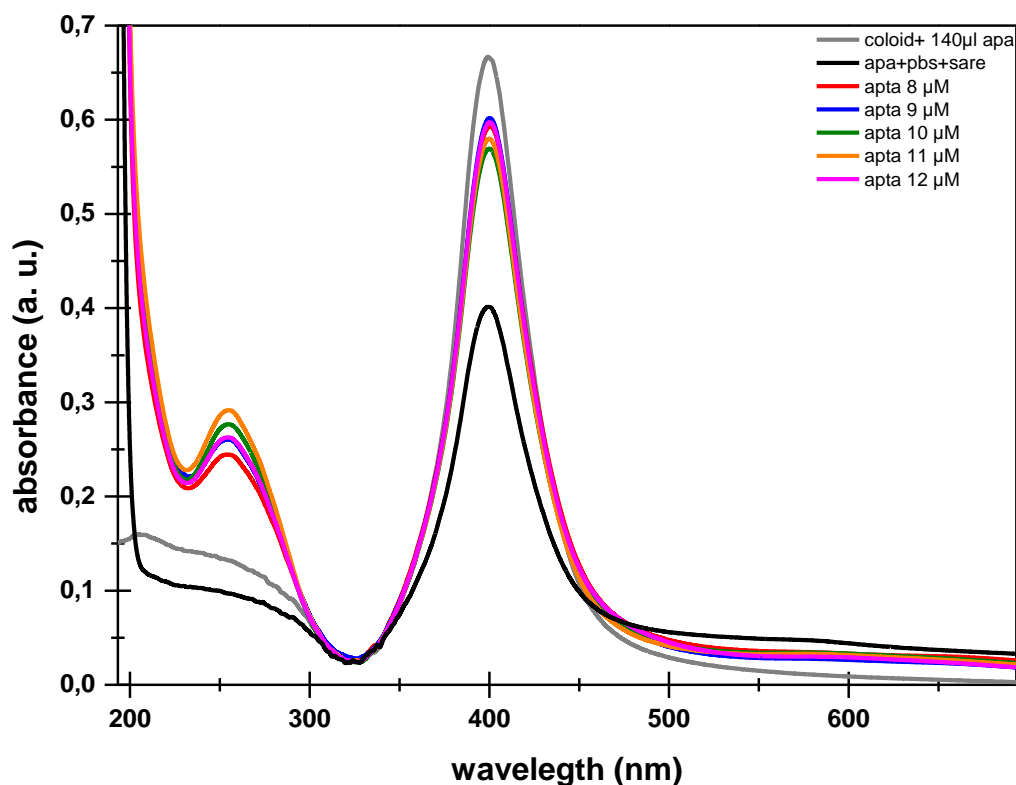


Fig. III.3.1 Spectrele de extincție ale AgNPs funcționalizate cu diferite concentrații de aptamer în prezența a 15 μ l PBS și 45 μ l NaCl 0,3M și cele două spectre control.

În figura III.3.1 se pot vedea spectrele realizate prin măsurarea UV-Vis-NIR a soluțiilor coloidale de AgNPs funcționalizate cu aptamer și expuse la diferite concentrații de NaCl. Pentru referință, sunt prezentate spectrele probelor control: (1) o probă ce nu a fost funcționalizată cu aptamer și nu a fost expusă la sare (spectrul de culoare gri); (2) altă probă ce nu a fost funcționalizată cu aptamer, dar a fost expusă la sare (spectrul de culoare neagră). În plus, pe lângă benzile plasmonice specifice nanoparticulelor, în spectrele funcționalizate cu aptamer se observă apariția unei noi benzi la 255 nm, bandă ce apare datorită absorbției aptamerului. În cazul suspensiei coloidale care nu a fost funcționalizată cu aptamer, este observabilă o scădere a absorbției nanoparticulelor individuale (399 nm) și, totodată, o ușoară lărgire a benzii, iar în domeniul spectral 450-600 nm o creștere a absorbției (spectrul gri), după adăugarea sării, în comparație cu spectrul probei fără aptamer, ce nu a fost expus la soluția salină (spectrul negru).

Aceste modificări ale spectrelor sunt asociate cu agregarea nanoparticulelor. În contrast cu proba control expusă la sare, toate probele funcționalizate cu aptamer prezintă o stabilitate mai ridicată în prezența NaCl. Totuși, spectrul de extincție al AgNPs funcționalizate cu diverse concentrații de

aptamer (8-12 μM) are un comportament diferit după ce a fost expus la concentrații similare de NaCl. În mod concret, se observă cum AgNPs funcționalizate cu aptamer de concentrații 8, 10, 11 sau 12 μM prezintă o ușoară agregare, în timp ce AgNPs funcționalizate cu aptamer de concentrație 9 μM (spectrul albastru) au o stabilitate ridicată. Așadar, concentrația de 9 μM de aptamer este cea care va fi utilizată mai departe.

III.4. Utilizarea AgNPs funcționalizate cu aptamer pentru detecția colorimetrică a CRP

Strategia de detecție dezvoltată în această lucrare este bazată pe proprietatea aptamerului folosit de a se atașa pe suprafața nanoparticulelor, pentru a le conferi stabilitate împotriva agregării în soluții saline, în absența CRP. Prezența CRP-ului în soluția salină determină o captare specifică aptamer-CRP, ce este însoțită de modificarea conformației aptamerului de pe suprafața nanoparticulelor. În urma modificării conformației aptamerului, acesta se desprinde de pe suprafața nanoparticulelor, ceea ce conduce la agregarea nanoparticulelor în soluția salină. Astfel, în figura III.4.1. se poate observa mecanismul de detecție.

Pentru a realiza detecția colorimetrică a AgNPs trebuie să înlocuim volumul de PBS la care au fost expuse nanoparticulele cu proteina C- Reactivă (CRP). Această proteină este folosită ca un bio-marker pentru bolile cardio-vasculare, fiind descoperită de cercetători ca fiind și un marker ce a fost asociat cu evoluția coronavirusului. A fost arătat faptul că dacă nivelul de CRP din organism este <5 mg/l, atunci pacientul este predispus la infarct miocardic, accident vascular cerebral și la dezvoltarea cardiopatiei ischemice. [10]

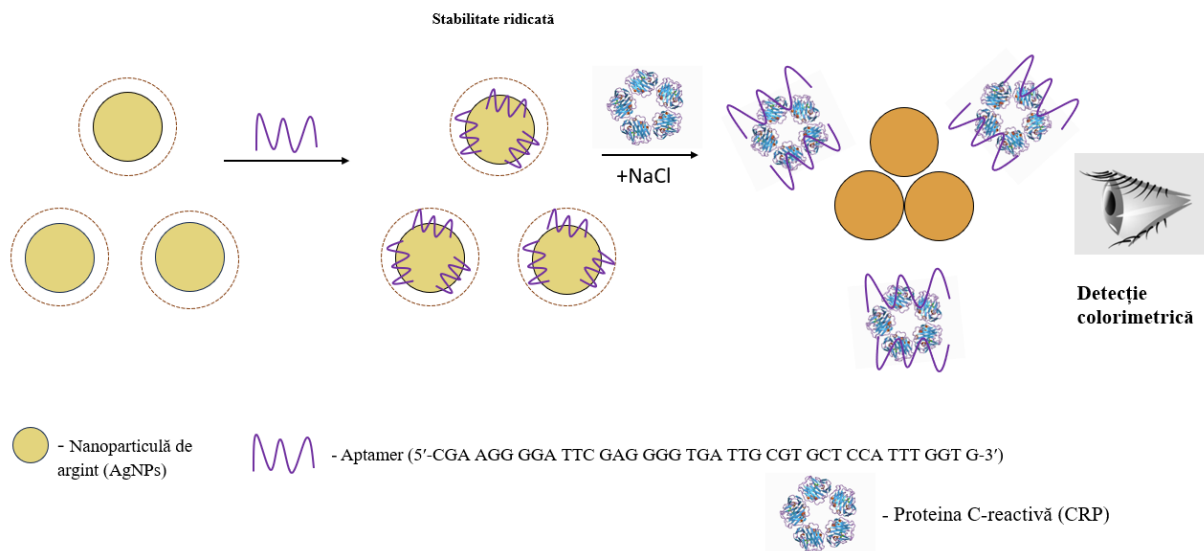


Fig. III.4.1. Procesul de detecție, prezentat sistematic.

Pentru a vedea dacă suspensia coloidală de AgNPs funcționalizate cu aptamer deține capacitatea de a detecta concentrații mici de CRP, dispersia coloidală a fost expusă la diferite concentrații de CRP (0-10 $\mu\text{g/mL}$) în prezența unei soluții saline. Expunerea AgNPs la diferite concentrații de CRP determină o evoluție a culorii suspensiei coloidale, de la galben (proba control, 0 $\mu\text{g/mL}$ CRP), la galben-portocaliu și, în final, galben-roșiatic (proba expusă la 10 $\mu\text{g/mL}$ CRP), evoluția culorii fiind dată de creșterea concentrației de CRP (Figura III.4.2.).



Fig. III. 4.2. Imagine digitală cu probele din laborator cu AgNPs+aptamer +CRP+NaCl.

În figura III.4.2. am surprins cum substanțele și-au schimbat culoarea în funcție de cantitatea de CRP adăugată. Proba numărul 1 este proba tip control ce conține 320 μ l coloid, 80 μ l aptamer 9 μ M, 5 μ l PBS și 45 μ l NaCl 0,3. Probele numerotate între 2 și 11 conțin CRP în locul PBS-ului, concentrația acestuia crescând cu câte 1 μ g/ml, proba numărul 2 având 1 μ g/ml, proba numărul 3 are 2 μ g/ml șamd. până la proba 11, care conține 10 μ g/ml CRP.

Schimbările evidențiază abilitatea nanoparticulelor de argint (AgNPs) de a funcționa ca transductori optici ultrasensibili pentru detectarea colorimetrică (vizuală) a CRP-ului. Pentru că schimbarea culorii suspensiei coloidale aduce cu ea modificări spectrale, detecția CRP a fost monitorizată nu doar vizual, ci și prin colectarea spectrelor de extincție UV-Vis-NIR, cu ajutorul spectrofotometrului UV-VIS JASCO V-730 (Figura III.4.3.). În particular, creșterea concentrației de CRP determină o scădere a absorbției ce este caracteristică pentru nanoparticulele individuale (400 nm), simultan cu o creștere a absorbției în domeniul 450-600 nm datorită nanoparticulelor interconectate (aglomerate). În figura III.4.3. am analizat efectul CRP-ului asupra AgNPs, comparația ce poate fi realizată datorită faptului că am adăugat un control, acesta fiind cu PBS în loc de CRP. După aceste măsurători, am ajuns la concluzia că este 15 μ l CRP este o cantitate mult prea mare de substanță, așa că, am luat decizia de a o scădea, următoarele probe fiind realizate cu 5 μ l de CRP. La fel ca în cazul cu 15 μ l de CRP, am comparat rezultatele cu un control, realizat de data aceasta cu 5 μ l de PBS.

După cum se poate observa în figura III.4.3., de mai jos, faptul că a fost modificat volumul CRP-ului a făcut posibilă creșterea concentrației, ajungând la maximum de 10 μ g/ml de CRP. În ceea ce privește absorbția datorată nanoparticulelor individuale, pe măsură ce concentrația de CRP crește, ea scade liniar.

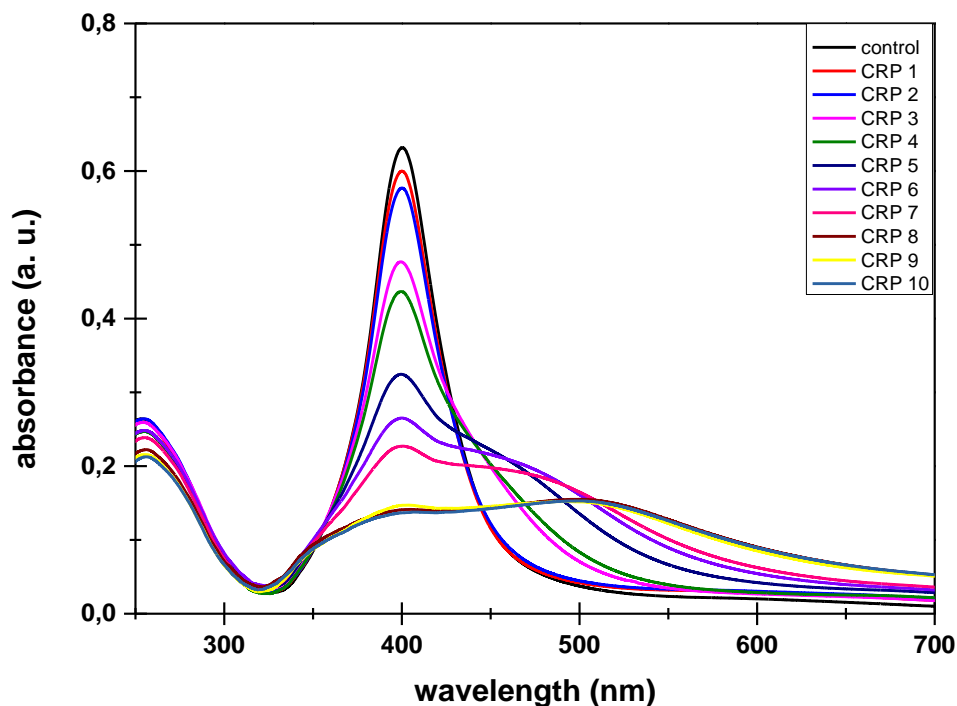


Fig. III. 4.3. Spectrele de absorbție ale substanțelor cu 5 μ l de CRP.

Pentru cuantificarea concentrației de CRP a fost realizată curba de calibrare, care a fost obținută prin reprezentarea grafică a raportului dintre absorbanta nanoparticulelor agregate (467 nm) și cea a nanoparticulelor individuale (400 nm) în funcție de concentrația de CRP. S-au realizat două seturi de măsurători (Tabelul III.4.4.), iar pentru fiecare concentrație de CRP au fost calculate valoarea medie a raportului A_{467}/A_{400} , dar și deviația standard (Tabelul III.4.5.). În Figura III.4.6. este reprezentat grafic raportul dintre absorbanta nanoparticulelor agregate (467 nm) și cea a nanoparticulelor individuale (400 nm) în funcție de concentrația de CRP. Deviația standard este reprezentată sub forma unor bare de eroare. Se poate remarca o liniaritate între raportul absorbanțelor și concentrația de CRP, fapt ce permite nu doar detecția CRP, ci și cunatificarea acesteia.

Tabelul III.4.4. Valorile absorbanțelor nanoparticulelor agregate (467 nm) și a nanoparticulelor individuale (400 nm).

	măsurătoarea 1	măsurătoarea 2	măsurătoarea 1	măsurătoarea 2
	A400	A400	A467	A467
c	0,631	0,628	0,069	0,070
1	0,600	0,602	0,070	0,074
2	0,577	0,594	0,076	0,089
3	0,476	0,484	0,143	0,145
4	0,436	0,405	0,155	0,175
5	0,324	0,295	0,197	0,188
6	0,265	0,219	0,203	0,176
7	0,227	0,199	0,191	0,164
8	0,140	0,150	0,148	0,151
9	0,146	0,133	0,148	0,138
10	0,136	0,132	0,147	0,144

Tabelul III.4.5. Valorile rapoartelor absorbanțelor, a mediilor aritmetice și deviația standard.

A467/A400 - măsurătoarea 1	A467/A400 - măsurătoarea 2	Media	Deviația standard
0,1094	0,1115	0,110	0,0015
0,1167	0,1229	0,120	0,0044
0,1317	0,1498	0,141	0,0128
0,3004	0,2996	0,300	0,0006
0,3555	0,4321	0,394	0,0542
0,6080	0,6373	0,623	0,0207
0,7660	0,8037	0,785	0,0266
0,8414	0,8241	0,833	0,0122
1,0571	1,0067	1,032	0,0357
1,0137	1,0376	1,026	0,0169
1,0809	1,0909	1,086	0,0071

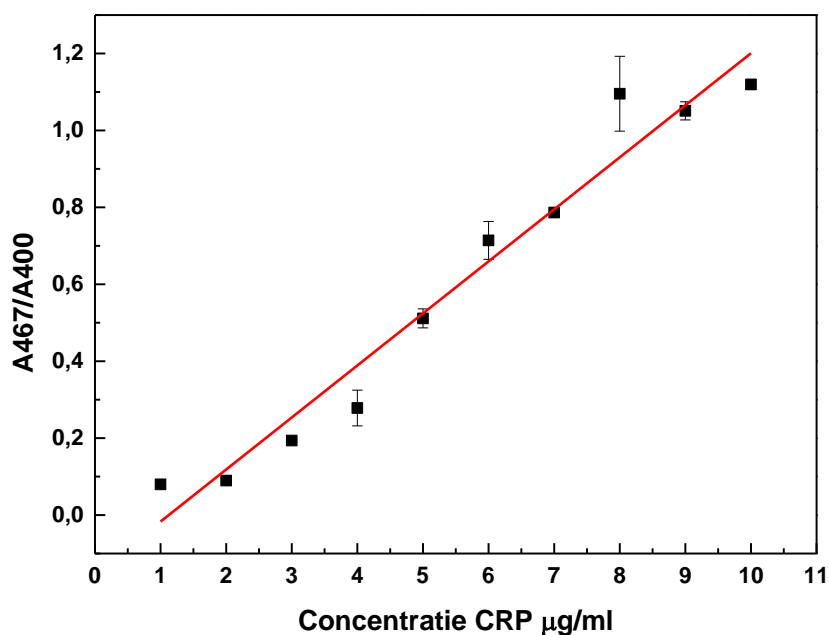


Fig. III.4.6. Raportul dintre absorbanta nanoparticulelor agregate (467 nm) și cea a nanoparticulelor individuale (400 nm) în funcție de concentrația de CRP.

III.5. Teste de selectivitate

Un aspect important vizat este capacitatea AgNPs de a detecta selectiv biomarkerul țintă, în cazul de față CRP. Selectivitatea AgNPs funcționalizate cu aptamer a fost realizată folosind molecule care se găsesc în mod obișnuit în fluidele biologice și care ar putea, astfel, interfera cu CRP în cazul detecției din probele reale. Reamintim că rolul aptamerului atașat pe suprafața nanoparticulelor este de a le conferi stabilitate în soluții saline, pentru a împiedica agregarea acestora în absența CRP. Prezența CRP în soluție salină determină o captură specifică aptamer-CRP, fiind însoțită de modificarea conformației aptamerului atașat pe suprafața nanoparticulelor și desprinderea acestuia. În acest mod, nanoparticulele vor fi expuse agregării, fenomen însoțit de modificarea culorii suspensiei coloidale și a spectrului de extincție UV-Vis-NIR. Selectivitatea AgNPs funcționalizate cu aptamer față de CRP a fost evaluată urmărind stadiul de agregare al AgNPs în prezența unei soluții saline, în urma incubării cu diferite molecule care se află în mod normal în plasmă (CRP, acid ascorbic (AA), hemoglobină (Hem)), albumină serică bovină (BSA)) sau substanțe care simulează condițiile din plasma sangvină (fluid biologic simulat (SBF) și BSA).

În Figura III.5.1. sunt prezentate spectrele de extincție ale suspensiilor coloidale de AgNPs funcționalizate cu aptamer expuse la o soluție salină, în urma incubării cu CRP, AA, BSA, Hem sau BSA+SBF, timp de 5 minute la 25°C. Remarcăm că modificarea spectrului de extincție al AgNPs în prezența PBS, AA, BSA, Hem sau BSA+ SBF este neglijabilă comparativ cu modificarea spectrală a AgNPs în prezența proteinei CRP. Concret, suspensia coloidală de AgNPs expusă la o soluție salină prezintă un stadiu avansat de agregare în prezența CRP, evidențiat prin lărgirea semnificativă a benzii plasmonice și creșterea extincției în domeniul spectral 450-600 nm.

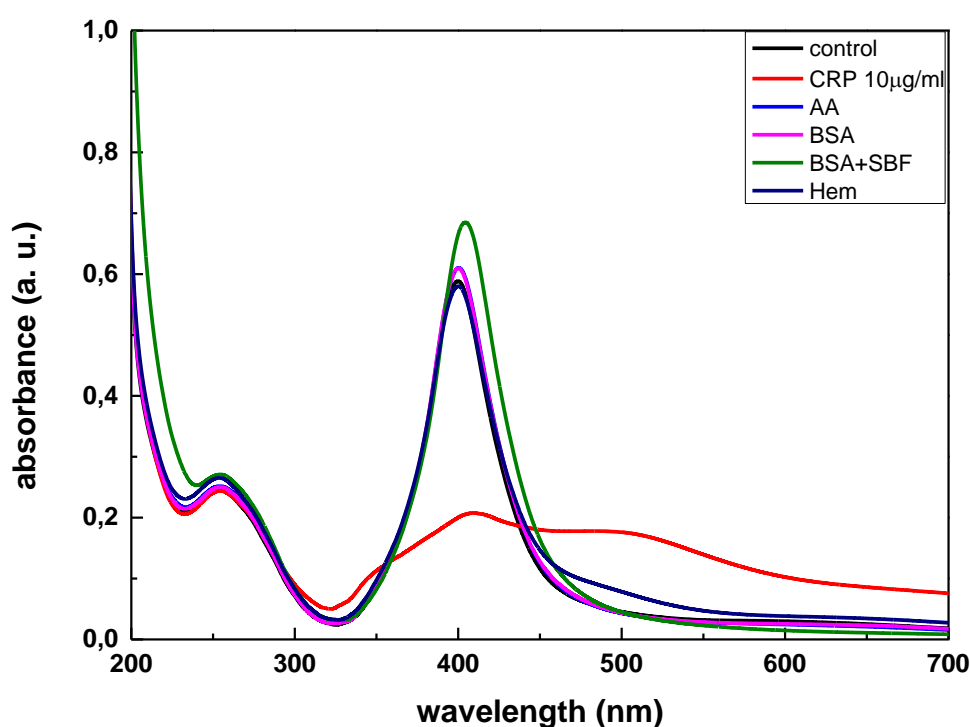


Fig. III.5.1. Spectrele de extincție ale suspensiilor coloidale de AgNPs funcționalizate cu aptamer expuse la o soluție salină, în urma incubării cu CRP, AA, BSA, Hem sau BSA+SBF.

În imaginea de mai jos, III.5.2., a fost surprins cum nu apar modificări considerabile din punct de vedere colorimetric în substanțele cu AA (3), Hem (4), BSA (5), BSA+SBF (6), acestea fiind comparate cu proba (1) care este cea de control, iar proba (2) fiind cea ce conține CRP de 10 μg/ml. Așadar, dacă experimentul ar fi fost realizat cu alte proteine decât CRP, rezultatele nu ar fi fost la fel.

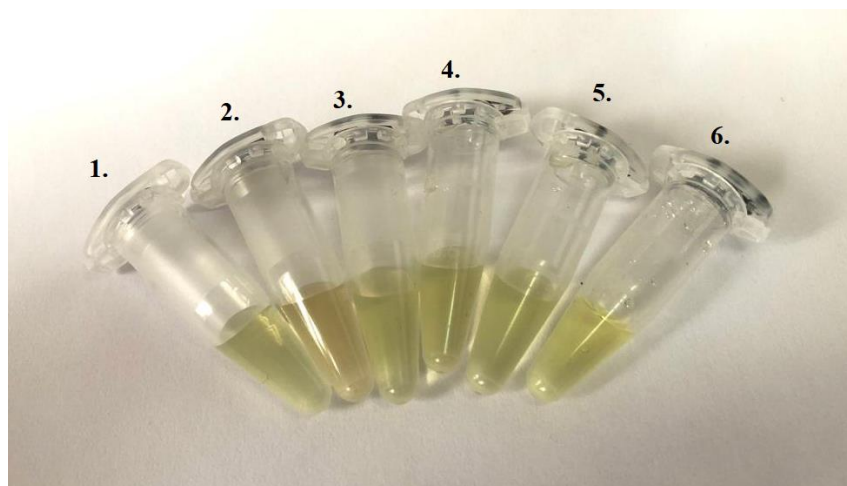


Fig. III. 5. 2. Probele ce conțin AA, Hem, BSA, BSA+SBF, o probă de control și una cu CRP de 10 $\mu\text{g/ml}$.

Nivelul de agregare al AgNPs în urma incubării cu CRP, AA, BSA, Hem sau BSA+SBF a fost cuantificat prin raportul dintre absorbanta nanoparticulelor agregate (467 nm) și cea a nanoparticulelor individuale (400 nm) (Figura III.5.3.). Se poate remarca o creștere de 10 ori a acestui raport în cazul apta-AgNPs incubate cu CRP comparativ cu dispersiile coloidale incubate cu AA, BSA, Hem sau SBF, ceea ce demonstrează selectivitatea ridicată a AgNPs funcționalizate cu aptamer.

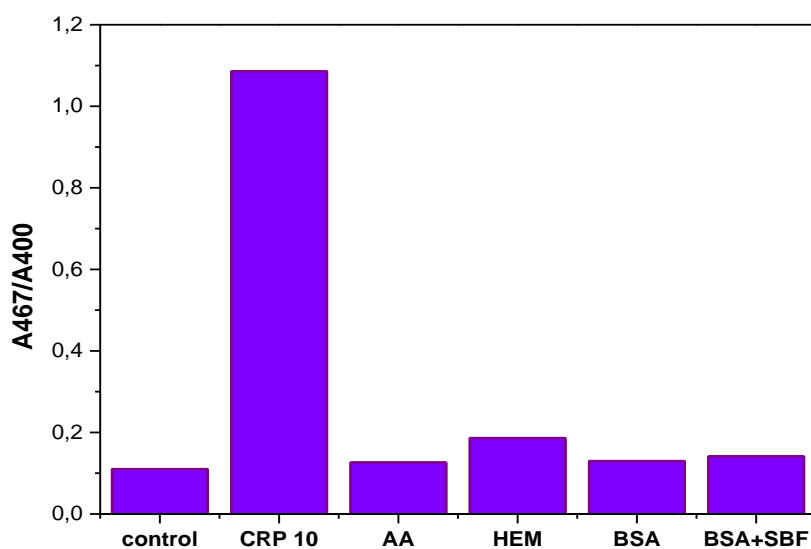


Fig. III.5.3. Rapoartele dintre absorbanta nanoparticulelor agregate (467 nm) și a nanoparticulelor individuale (400 nm).

Concluzii și perspective

În final, în lucrarea de față, am sintetizat, caracterizat optic și morfologic suspensiile coloidale de nanoparticule sferice de argint (AgNPs). Nanoparticulele sintetizate au fost funcționalizate cu un aptamer cu specificitate ridicată față de proteina C-reactivă (CRP). Funcționalizarea AgNPs cu aptamer a fost pusă în evidență prin testele de stabilitate în soluție salină. Pentru aceasta au fost măsurate spectrele de extincție UV-VIS-NIR ale suspensiilor coloidale de AgNPs și AgNPs funcționalizate cu aptamer în urma incubării cu soluție salină în comparație cu spectrul AgNPs în absența sării. AgNPs funcționalizate cu aptamer au fost utilizate cu succes pentru detecția colorimetrică a CRP, lucru demonstrat atât prin imaginile digitale ce arată schimbarea culorii, vizibilă cu ochiul liber, cât și prin intermediul spectrelor de absorbție realizate prin UV-Vis-NIR. Mai mult decât atât, a fost realizată curba de calibrare prin prezentarea grafică a raportului dintre absorbanta nanoparticulelor agregate (467 nm) și cea a nanoparticulelor individuale (400 nm), în funcție de concentrația de CRP. Prin acest grafic s-a demonstrat liniaritatea dintre raportul absorbanțelor și concentrația de CRP și, totodată, cuantificarea concentrației de CRP. De asemenea, s-a demonstrat specificitatea AgNPs funcționalizate cu aptamer față de CRP. Prin urmare, în acest studiu au fost atinse cu succes obiectivele propuse, iar ca perspective, îmi propun să aprofundez cercetarea în domeniul nanosenzoristicii, prin abordarea de noi metode de detecție.

Mulțumiri:

Această lucrare a fost susținută de un grant al Ministerului Cercetării, Inovării și Digitalizării, CNCS/CCCDI – UEFISCDI, numărul de proiect PN-III-P4-ID-PCE-2020-1592, în cadrul PNCDI III.

ANEXE*Anexa 1***Spectrofotometru Jasco V- 730 UV-Vis- NIR**

Fig. A1.1. Aparatul folosit pentru realizarea spectrelor de absorbție în această lucrare. [17]

Spectroscopia de absorbție UV-Vis-NIR este o spectroscopie electronică, ce funcționează prin interacțiunea radiațiilor electromagnetice din domeniile UV, Vis și NIR și moleculele unor substanțe chimice. Spectrul de absorbție UV-Vis este practic dependența absorbției de lungimea de undă a radiației absorbite.

Concret, în lucrarea de față, spectroscopia UV-Vis- NIR a jucat un rol important întrucât, datorită spectrelor de absorbție realizate, am reușit să optimizez concentrațiile și volumele de soluție salină, respectiv aptamer și s-a observat detecția colorimetrică a CRP, nu doar cu ochiul liber, ci și prin observarea scăderii absorbanțelor.

*Anexa 2***Microscopul electronic prin transmisie (TEM)**

Microscopul electronic de transmisie (TEM) reprezintă una dintre metodele avansate ale microscopiei, în care fasciculul de electroni este transmis printr-o probă pentru a realiza o imagine detaliată a substanțelor. Acest microscop realizează imagini cu o rezoluție mult mai mare decât microscopul clasic.

Bibliografie

- [1] S. Bayda, M. Adeel, T. Tuccinardi, M. Cordani, și F. Rizzolio, „The History of Nanoscience and Nanotechnology: From Chemical–Physical Applications to Nanomedicine”, *Molecules*, vol. 25, nr. 1, p. 112, dec. 2019, doi: 10.3390/molecules25010112.
- [2] P. Slepíčka, N. Slepíčková Kasálková, J. Siegel, Z. Kolská, și V. Švorčík, „Methods of Gold and Silver Nanoparticles Preparation”, *Materials*, vol. 13, nr. 1, p. 1, dec. 2019, doi: 10.3390/ma13010001.
- [3] S. Padovani *et al.*, „Copper in glazes of Renaissance luster pottery: Nanoparticles, ions, and local environment”, *J. Appl. Phys.*, vol. 93, nr. 12, pp. 10058–10063, iun. 2003, doi: 10.1063/1.1571965.
- [4] D. J. Barber și I. C. Freestone, „AN INVESTIGATION OF THE ORIGIN OF THE COLOUR OF THE LYCURGUS CUP BY ANALYTICAL TRANSMISSION ELECTRON MICROSCOPY”, *Archaeometry*, vol. 32, nr. 1, pp. 33–45, feb. 1990, doi: 10.1111/j.1475-4754.1990.tb01079.x.
- [5] M. A. Garcia, „Surface plasmons in metallic nanoparticles: fundamentals and applications”, *J. Phys. Appl. Phys.*, vol. 45, nr. 38, p. 389501, sep. 2012, doi: 10.1088/0022-3727/45/38/389501.
- [6] „Lycurgus Cup”, *Wikipedia*. 4 mai 2023. Data accesării: 22 iunie 2023. [Online]. Disponibil la: https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Lycurgus_Cup&oldid=1153124399
- [7] L. M. Liz-Marzán, „Nanometals: Formation and Color*”, în *Colloidal Synthesis of Plasmonic Nanometals*, L. Liz-Marzán, Ed., 1 ed Jenny Stanford Publishing, 2020, pp. 1–13. doi: 10.1201/9780429295188-1.
- [8] G. Paramasivam, N. Kayambu, A. M. Rabel, A. K. Sundramoorthy, și A. Sundaramurthy, „Anisotropic noble metal nanoparticles: Synthesis, surface functionalization and applications in biosensing, bioimaging, drug delivery and theranostics”, *Acta Biomater.*, vol. 49, pp. 45–65, feb. 2017, doi: 10.1016/j.actbio.2016.11.066.
- [9] G. Vinci și M. Rapa, „Noble Metal Nanoparticles Applications: Recent Trends in Food Control”, *Bioengineering*, vol. 6, nr. 1, p. 10, ian. 2019, doi: 10.3390/bioengineering6010010.

- [10] X. Zhao, H. Zhao, L. Yan, N. Li, J. Shi, și C. Jiang, „Recent Developments in Detection Using Noble Metal Nanoparticles”, *Crit. Rev. Anal. Chem.*, vol. 50, nr. 2, pp. 97–110, mar. 2020, doi: 10.1080/10408347.2019.1576496.
- [11] „Localized surface plasmon”, *Wikipedia*. 18 septembrie 2022. Data accesării: 22 iunie 2023. [Online]. Disponibil la:
https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Localized_surface_plasmon&oldid=1110855342
- [12] „Lucrare de laborator-curs nanofotonica-Reporterii Raman.pdf”.
- [13] Nagwa, „Lesson Explainer: Nanoparticles | Nagwa”.
<https://www.nagwa.com/en/explainers/640142370207/> (data accesării 22 iunie 2023).
- [14] M. Rai, A. P. Ingle, S. Birla, A. Yadav, și C. A. D. Santos, „Strategic role of selected noble metal nanoparticles in medicine”, *Crit. Rev. Microbiol.*, pp. 1–24, iun. 2015, doi: 10.3109/1040841X.2015.1018131.
- [15] „Secvențierea ADN”, *Wikipedia*. 19 martie 2023. Data accesării: 22 iunie 2023. [Online]. Disponibil la:
https://ro.wikipedia.org/w/index.php?title=Secven%C8%9Bierea_ADN&oldid=15591676
- [16] T. Nagy-Simon, A.-M. Hada, S. Suarasan, și M. Potara, „Recent advances on the development of plasmon-assisted biosensors for detection of C-reactive protein”, *J. Mol. Struct.*, vol. 1246, p. 131178, dec. 2021, doi: 10.1016/j.molstruc.2021.131178.
- [17] „JASCO V-730BIO - ABL&E-JASCO”, *ABL&E-JASCO ROMÂNIA*.
<https://www.jasco.ro/produse/instrumente-lifescience/jasco-v-730-bio/> (data accesării 22 iunie 2023).

DECLARAȚIE PE PROPRIE RĂSPUNDERE

Subsemnata, Apetri Raluca- Ioana, declar că Lucrarea de licență pe care o voi prezenta în cadrul examenului de finalizare a studiilor la Facultatea de fizică, din cadrul Universității Babeș-Bolyai, în sesiunea iulie 2023, sub îndrumarea prof. dr. Aștilean Simion și CS II dr. Potara Monica, reprezintă o operă personală. Menționez că nu am plagiat o altă lucrare publicată, prezentată public sau un fișier postat pe Internet. Pentru realizarea lucrării am folosit exclusiv bibliografia prezentată și nu am ascuns nici o altă sursă bibliografică sau fișier electronic pe care să le fi folosit la redactarea lucrării.

Prezenta declarație este parte a lucrării și se anexează la aceasta.

Data,

27.06.2023

Nume

Apetri Raluca- Ioana

Semnătură

