

**Nanomateriale magnetoplasmonice multifuncționale pentru  
aplicații de tip point of care  
NanoTex  
Plan de realizare, etapa 3,  
2020**

**Acțiuni etapa a 3-a:**

**Act. 3.1 Achiziționarea dispozitivelor, chimicalelor și a altor obiecte de laborator incluzând consumabile.**

**Act. 3.2 Sinteza nanolipozomilor magnetoplasmonici**

**Act. 3.3 Caracterizarea celor doua clase de nanohibridi magnetici core-shell multifuncționali (nanoparticule magnetoplasmonice si lipozomi magnetoplasmonici).**

**Act 3.4 Atașarea chimică a aptamerilor țintă Cy-3 modificat cu CD117 la suprafața exterioara a lipozomului magnetoplasmonic.**

**Act. 3.6 Evaluarea numarului de aptameri legați la suprafața metalică.**

**Act. 3.7 Diseminarea și alte activități privind vizibilitatea.**

**Act. 3.8 Achiziția serviciilor de audit**

**Act. 3.9 Raportarea**

### **Act. 3.1 Achiziționarea dispozitivelor, chimicalelor și a altor obiecte de laborator incluzând consumabile**

Pe parcursul anului 2020 – etapa 3- au fost achiziționate chimicale, obiectele de laborator precum și consumabilele necesare realizării fazei a 3-a a contractului.

A fost achiziționat un spectrometru simultan de fluorescență NIR și absorbantă/transmitanță HORIBA tip Duelta, la UMF “Iuliu Hașegan”.

### **Act. 3.2 Sinteza nanolipozomilor magnetoplasmonici**

### **Act. 3.3 Caracterizarea celor doua clase de nanohibridi magnetici core-shell multifuncționali (nanoparticule magnetoplasmonice si lipozomi magnetoplasmonici)**

În această secțiune a raportului vom prezenta în comun metodele folosite în prepararea nanolipozomilor magnetoplasmonici precum și modul în care aceste metode condiționează proprietățile nanoparticulelor magnetoplasmonice și a lipozomilor magnetoplasmonici.

Sinteza particulelor de magnetită (IOMNP) s-a realizat prin descompunerea termică prin intermediul polyolilor. Astfel s-au amestecat 0.27 g de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  și cantități variabile de NaAc ( 0 - 4.8 g), amestecul fiind dizolvat în 40 ml PEG200. Soluția astfel obținută a fost agitată folosind un sistem magnetic, la  $T = 50\text{ }^\circ\text{C}$ , timp de 30 min. Soluția a fost introdusă într-un vas din oțel inoxidabil, degazată și apoi expusă la un flux de azot timp de 5 min. Soluția aflată în vasul de reacție a fost încălzită până la  $T = 300\text{ }^\circ\text{C}$ , folosind un gradient de temperatura de  $3\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$  și apoi menținută la această temperatură timp de o oră. După racirea, la temperatura mediului ambient și eliminarea părții lichide, precipitatul a fost spalat în ethaol/ apă distilată. După 5 cicluri de separare ultrasonică/magnetică și eliminarea excesului de material nereactat, probele au fost spălate. Această operație s-a făcut cu ajutorul

unui aparat cu ultrasunete, timp de 15 min in 30 ml ethanol/apă distilată, iar nanoparticulele separate cu ajutorul unui magnet. În final probele au fost introduse într-o soluție de acid citric și apoi încălzite la 80 °C timp de 30 min pentru a grefa moleculele de acid citric pe suprafața particulelor (IOMNP). După separare, particulele au fost spălate cu apă dublu distilată și redispersate în 5 ml de apă distilată. În final, pH = 7 a amestecului, a fost obținut prin adăugarea unei soluții de HNO<sub>3</sub>.

Probele astfel obținute au o formă sferică. Particulele de formă cubică au fost de asemenea obținute în prezența hexacandiolumului în amestecul de sinteză.

Metoda de preparare menționată mai sus este descrisă în lucrările publicate în cadrul proiectului [1-3] și apreciată pe plan internațional [4]. Redăm în Fig. a1 o analiză comparativă a metodelor de preparare a particulelor de magnetită, în care printre cele 8 proceduri folosite, pe plan internațional, este expusă și metoda noastră, poziția 2, descompunere termică, referința 55 în lucrarea [4]. Prin această metodă (poz. 2) se obțin prin descompunere termică, nanoparticule de dimensiuni medii (16-25) nm folosite în studiile noastre, nanoparticulele fiind polidispersate. Totodată acestea, în funcție de compoziția amestecului de sinteză, pot avea, fie o formă sferică, fie una cubică.

Review

# Multifunctional Magnetic Oxide Nanoparticle (MNP) Core-Shell: Review of Synthesis, Structural Studies and Application for Wastewater Treatment

Ebenezer C. Nnadozie  and Peter A. Ajibade \* 

**Table 1.** Comparative analysis of preparation methods for magnetite nanoparticles.

Nos	Method	Advantages	Disadvantages	* Cost	Ref
1.	Hydrothermal	Single step synthesis; high Ms value; highly crystalline particles	Cubic particles; large particle sizes; long reaction time; polydispered size distribution; high reaction temperature	\$44.01	[54]
2.	Thermal Decomposition	Medium particle sizes; high Ms; short reaction time	Cubic-spherical shapes; polydispered size distribution	\$73.84	[55]
3.	Co-precipitation	Spherical and small particles; high Ms; low reaction temperature; one-step synthesis; monodispered size distribution	Agglomerated particles	\$39.50	[56]
4.	Sol-gel	Spherical nanoparticles; small particle sizes	Polydispered size distribution; long reaction time; multi-step reaction process	\$99.12	[57]
5.	Sonochemical	High Ms; short reaction time; one-step reaction;	Nanocubes; large particle sizes; polydispered size distribution	\$84.39	[58]
6.	Polyol	Spherical and small particles; moderate Ms; monodispered size distribution	Multi-precursors and reaction steps.	\$141.07	[59]
7.	Electrochemical	High Ms; small particle size; monodispered size distribution; room temperature synthesis	Prone to impurity; quasi-spherical particles; hydrophobic nanoparticles	\$32.55	[60]
8.	Microemulsion	Small particle size; monophased product; monodispered size distribution	Agglomerated and cubic particles; multi-precursors	\$242.72	[61]

\* Particle size: small (2–15 nm); medium (16–25 nm); large (26 nm and above); saturation magnetization (Ms): low (0–30 emug<sup>-1</sup>); moderate (31–69 emug<sup>-1</sup>); high (70 emug<sup>-1</sup> and above); total cost was calculated based on the cost of (1g or 1L) of primary precursor(s) as obtained from (MERCK South Africa) and energy cost per Kwh of electricity ([https://www.globalpetrolprices.com/data\\_electricity\\_download.php](https://www.globalpetrolprices.com/data_electricity_download.php)).

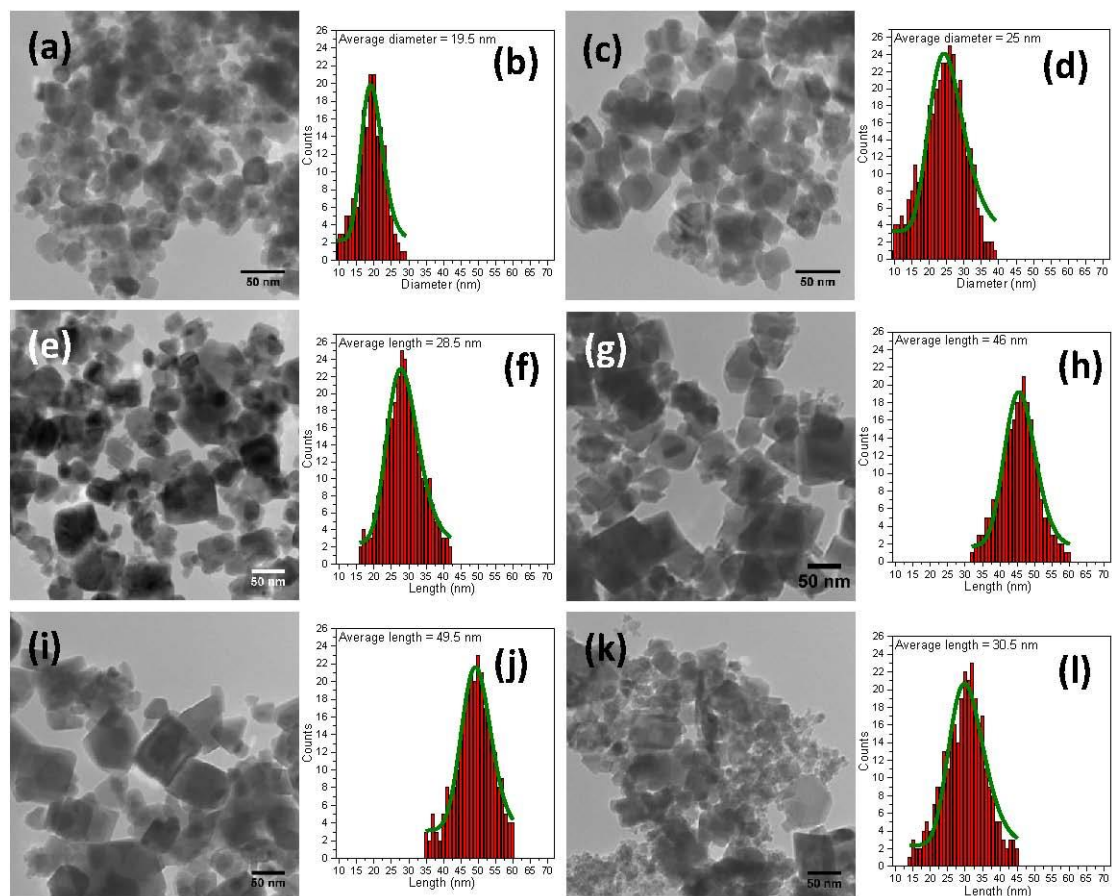
55. Dudric, R.; Souca, G.; Szatmári, Á.; Szilárd, T.; Nitica, S.; Iacovita, C.; Moldovan, A.I.; Stiufiuc, R.; Tetean, R.; Burzo, E. Magnetite Nanoparticles for Medical Applications. In Proceedings of the AIP Conference, Tamil Nadu, India, 21–22 February 2020.

**Fig. a1** Analiza comparativă a metodelor de preparare a nanoparticulelor de magnetită

## a) Nanoparticule de magnetită

Proprietățile fizice precum și biocompatibilitatea nanoparticulelor au fost studiate printr-o multitudine de metode incluzând analize structurale, morfologice, magnetice sau cytocompatibilitatea.

În Fig. a2 prezentăm distribuția dimensiunilor nanoparticulelor obținute folosind diferite concentrații de NaAc în procedeul de sinteză. În toate cazurile particulele au forme sferice,

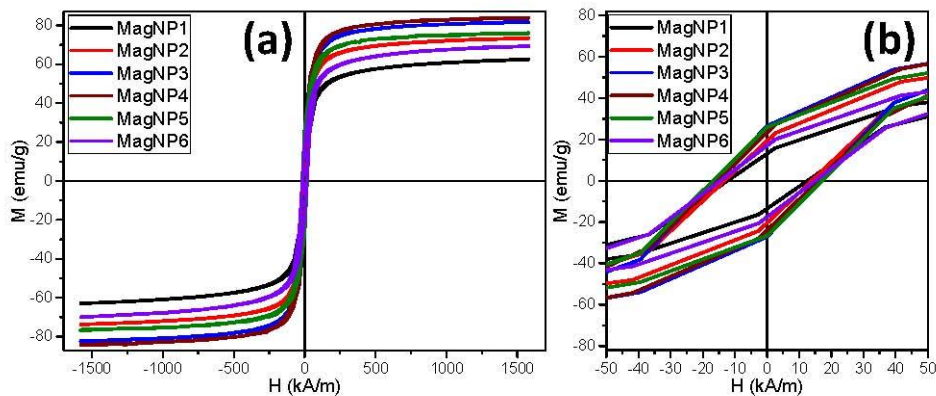


**Fig. a2** Imagini TEM și distribuția dimensiunilor nanoparticulelor obținute folosind diferite concentrații de NaAc: (a, b) 0.6g; (c,d) 0.9 g; (e,f) 1.2 g; (g, h) 2.4 g; (i, j) 3.2 g; (k, l) 4.8 g

cu excepția probei cu un conținut de 4.8 g NaAc în soluția inițială. Dimensiunea medie a acestora de la 19.5 nm pentru proba în care amestecul de plecare conținea 0.6 g NaAc, până la 30.5 nm în cazul în care conținutul de NaAc a fost de 4.8g.

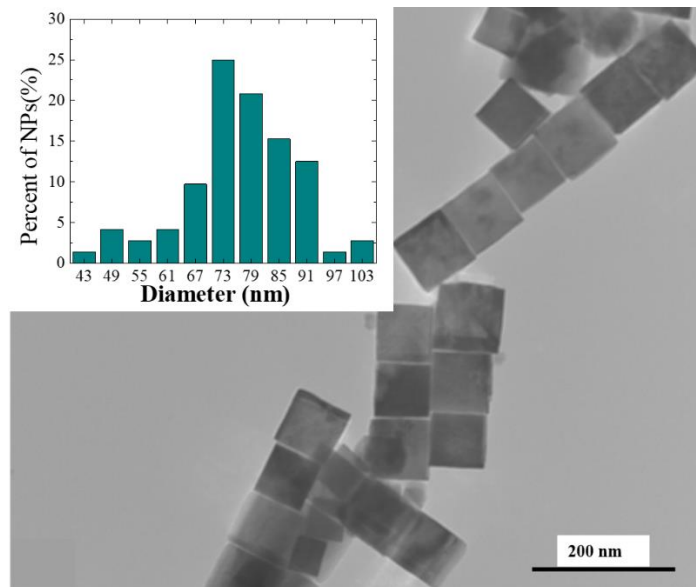
Structura cristalină a probelor, determinată prin raze X, este cubică, grupul spațial  $Fd\bar{3}m$ . Parametrul de rețea crește ușor de la 0.8371(1)nm (0.6 NaAc) până la 0.8387(9) nm (2.4 NaAc), rămânând constant pentru concentrații mai mari de NaAc.

Dependențele de câmpul magnetic al magnetizărilor precum și curbele de histereză sunt redată în Fig. a3. Magnetizările sunt saturate



**Fig. a3** Curbele de magnetizare și curbele de histereză înregistrate la  $T = 300\text{K}$

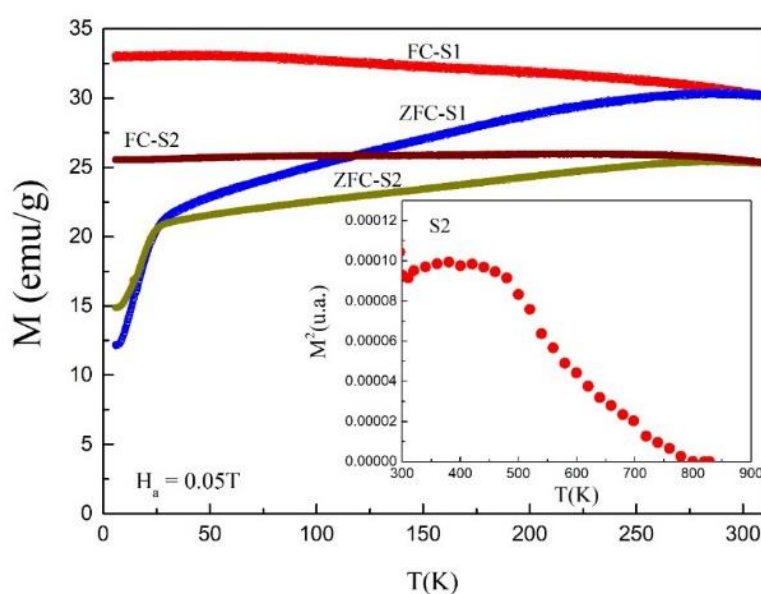
în câmpuri externe mai mici de  $500\text{ kA/m}$ . Câmpurile coercitive sunt situate între  $13$  și  $17\text{ kA/m}$ , în general acestea crescând cu conținutul de NaAc în amestecul inițial de substanțe. Raportul dintre magnetizarea remanentă,  $M_r$  și magnetizarea la saturație  $M_s$ ,  $r = M_r / M_s$  variază între  $0.21$  și  $0.34$ , evidențind prezența unor interacțiuni dipolare sau magnetice între particule. În cazul unui ansamblu de particule unidomeniale, care nu interacționează, și având orientări aleatorii, raportul  $M_r / M_s \approx 0.5$ . Nanoparticulele elaborate au o bună biocompatibilitate. Studiile de cytotoxicitate pe celulele canceroase și normale au relevat o toxicitate nesemnificativă până la valoarea de  $1000\text{ }\mu\text{g/ml}$ .



**Fig. a4** Imagine TEM a nanoparticulelor de  $\text{Fe}_{3-x}\text{Zn}_x\text{O}_4$ . Imaginea din interior reprezintă distribuția dimensiunilor de nano particule

Nanoparticulele de formă cubică s-au obținut în sistemul  $\text{Fe}_{3-x}\text{Zn}_x\text{O}_4$  prin încălzirea amestecului de plecare până la temperatura  $T = 200\text{ }^\circ\text{C}$ , folosind un gradient de temperatură de  $5\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$  – Fig a4 – în timp ce nanoparticulele obținute cu un gradient de temperatură mai mic au forme sferice. Nanoparticulele de formă cubică au o dimensiune medie de 73 nm.

Dependențele de temperatură ale magnetizărilor pentru probele răcite în câmp magnetic (FC) și respectiv în câmp magnetic nul (ZFC), evidențiază prezența unor temperaturi de blocare  $T_B$ , situate între 400K pentru o dimensiune  $d = 27\text{nm}$  și respectiv 310 K în cazul în care  $d = 73\text{nm}$  – Fig a5.



*Fig. a5* Dependențele de temperatură ale magnetizărilor pentru probele răcite în câmp magnetic (FC) și în câmp magnetic nul (ZFC)

Constantele de anizotropie au valori între  $(0.22 - 0.48) \cdot 10^4\text{ J/m}^3$ . Remarcăm o creștere substanțială a magnetizărilor pe măsura substituției ionilor de fier cu cei de zinc, până la o concentrație  $x = 0.2$ .

1. Magnetic nanoparticles for medical applications

R. Dudric, G. Souca, Á. Szatmári, T. Szilárd, S. Nitica, C. Iacovita, A. I. Moldovan, R. Stiufiuc, R. Tetean, E. Burzo, AIP Conf. Proc. 2218, 030014-1 to 5 (2020)

2. Physical properties of Zn doped  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanoparticles

G. Souca, R. Dudric, C. Iacovita, A. Moldovan, T. Frentiu, R. Stiufiuc, C. M. Lucaciu, R. Stefan, R. Tetean, E. Burzo, J. Opt. Adv. Mater. 22, 298-302 (2020)

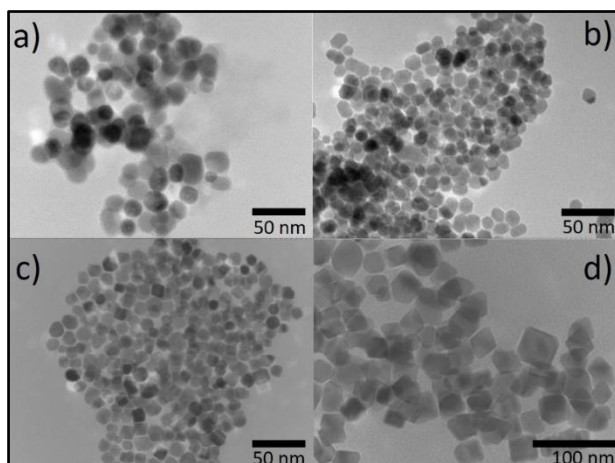
3. In vitro intracellular hyperthermia of iron oxide magnetic nanoparticles, synthesized at high temperature by a polyol process  
C. Iacovita, I. Fizesan, A. Pop, L. Scorus, R. Dudric, G. Stiufuc, N. Vedeanu, R. Tetean, F. Loghin, R. Stiufiuc, C.M. Lucaciu, *Pharmaceutics* 12, 424 (2020)
4. Multifunctional magnetic oxide nanoparticles (MNP) core-shell: review of synthesis, structural studies and application for wastewater treatment  
E. C. Nnadozie, P.A. Ajibade, *Molecules* 25, 4110 (2020)



## b. Sinteza și caracterizare de nanoparticule magneto-plasmonice de tip "core – shell"

### b.1. Hidrofilizarea nanoparticulelor magnetice. Metoda cu TMAOH. Metoda cu $\text{NaIO}_4$

Pentru început, s-au selectat 4 tipuri de nanoparticule magnetice (NPMag) care au fost sintetizate anterior în cadrul proiectului. Conform imaginilor TEM (Microscopie electronică în transmisie) prezentate în Fig. b1, aceste NPMag prezintă o formă cvasi-sferică, o polidispersivitate scăzută, având diametre medii cuprinse între 12 și 35 nm. Se constată o agregare destul de pronunțată a acestor NPMag pe grila TEM, care poate să rezulte fie din evaporarea rapidă a solventului fie dintr-o ușoară interacțiune dipolară existentă între NPMag, deși se preconizează că acestea să dețină un caracter superparamagnetic la temperatura camerei. Dat fiind faptul că aceste NPMag au fost obținute prin descompunerea termică a precursorilor magnetici în solvenți organici (adică sunt hidrofobe), prima activitate a constă în *hidrofilizarea acestora*. În acest sens am utilizat două procedee de hidrofilizare a NPMag.



**Figura b1.** Imagini TEM ale NPMag de magnetită ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) din loturile selectate: *FeO-pol-01* (a); *FeO-dtc-12* (b); *FeO-dtc-17* (c); *FeO-dtc-20* (d).

- **Metoda cu TMAOH** (hidroxid de tetrametilamoniu): în cadrul acestei metode, 1 mL suspensie NPMag se amestecă cu 2 mL soluție apoasă TMAOH (25%) și 1 mL solvent (alcool) și se ultrasonicează timp de 15 min, după care se lasă la incubat peste noapte. Deși este o metodă frecvent utilizată în literatură, conform rezultatelor și testelor noastre experimentale, potențialul metodei este modest căci doar o parte din NPMag se hidrofilizează ca entități individuale, majoritatea dintre ele regăsindu-se sub formă de clustere de diferite dimensiuni.

- **Metoda cu NaIO<sub>4</sub>** (metaperiodat de sodiu): în cadrul acestei metode, NPMag rezultate din sinteză sunt dispersate în 10 mL hexan, peste care se adaugă 10 mL amestec acetonitril/acetat de etil 1/1 (v/v) și 7.5 mL soluție apoasă de periodat de sodiu 60 mg/mL. Cele două faze se amestecă energic timp de 1 h, timp în care se observă migrarea NPMag din faza hidrofobă în cea apoasă. Această metodă de actualitate oferă rezultate remarcabile – procentul de NPMag hidrofilizate individual fiind peste 90%. Acest procent poate fi ridicat prin creșterea timpului de agitare la 2 h.

Hidrofilizarea eficientă a NPMag sferice de diferite diametre medii, ne-a permis accesarea la următoarea etapă, în cadrul acestei strategii, care consta în învelirea NPMag cu un strat de aur sau argint.

## ***b.2. Silicarea nanoparticulelor magnetice***

Literatura de specialitate este extrem de bogată în studii despre învelirea directă a unui miez magnetic cu un nano-strat de aur sau argint. Studiile efectuate de o multitudine de grupuri de cercetare au condus la concluzia că depunerea unui nano-strat de aur sau argint uniform în jurul unui miez sferic magnetic este greu de realizat - explicația științifică fiind aceea că există o mare discrepanță între parametrul de rețea al stratului de aur față de cel al miezului magnetic, știindu-se faptul că atomul de aur este ca dimensiune mult mai mare decât cel de fier sau oricare alt metal de tranziție (cobalt, mangan, zinc, cupru, etc.). Diversele metode de depunere dezvoltate au arătat faptul că aurul preferă să se constituie în mici nanoparticule (seed-uri) care aderă la suprafața miezului magnetic formând ceea ce se numește o nanostructură dumble-like sau Janus-like<sup>1 2</sup>. Prin intermediul a mai multor încercări iterative de depunere a aurului se poate obține într-un final un nano-strat de aur în jurul miezului magnetic care din păcate este extrem de neomogen și care înglobează mai multe NPMag<sup>3</sup>. În plus această soluție nu este foarte viabilă atunci când este necesară prepararea rapidă și în cantitate mare a unor nanostructuri magneto-plasmonice în vederea întrebunțării

---

<sup>1</sup> H. Zhou et al. Multifunctional Magnetoplasmonic Nanomaterials and Their Biomedical Applications. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 10, 2921–2949, 2014.

<sup>2</sup> J. Reguera et al. Janus plasmonic–magnetic gold–iron oxide nanoparticles as contrast agents for multimodal imaging. *Nanoscale*, 9, 9467–9480, 2017.

<sup>3</sup> I. Y. Goon et al. Fabrication and Dispersion of Gold-Shell-Protected Magnetite Nanoparticles: Systematic Control Using Polyethyleneimine. *Chem. Mater.* 21, 673 – 681, 2009.

acestora în diverse aplicații biomedicale. Din acest motiv, experimentat și de grupul nostru de cercetare <sup>4</sup>, s-a convenit să alegem o altă strategie prin care să realizăm obiectivul propus.

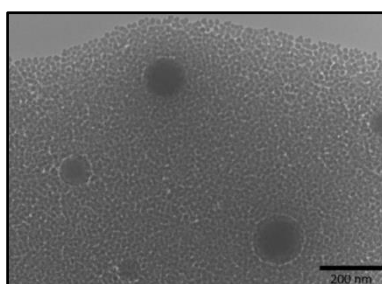
În acest context s-a decis *învelirea miezului magnetic într-un nano-strat de dioxid de siliciu* (SiO<sub>2</sub>). Prezența acestui material, în jurul NPMag, conduce la prezervarea proprietăților magnetice ale acestora, protecția împotriva oxidării, creșterea biocompatibilității acestora prin faptul că împiedică detașarea ionilor magnetici citotoxici din structură, reducerea interacțiunilor dipolare crescând astfel stabilitatea chimică și coloidală a acestora în special în mediile celulare <sup>5 6</sup>. Mai mult decât atât, nano-stratul de silice este un material extrem de versatil din punct de vedere chimic, realizând ușor legături chimice cu multe grupări funcționale, permițând astfel aurului să se coleze uniform peste el. Conform literaturii de specialitate, procesul de silicare a NPMag a fost realizat urmând două protocoale diferite:

(i) *metoda Stöber modificată* – aceste proces presupune hidroliza tetraetilortosilicatului (TEOS) într-un mediu hidro-etanolic, fiind accelerat prin adăugare de soluție apoasă de amoniac

(ii) *metoda micro-emulsiei ulei în apă (U/A) sau apă în ulei (A/U)* – această metodă, prin intermediul unor surfactanți ne-ionici, promovează hidroliza TEOS-ului la suprafața NPMag dispersate fie în faza externă (cazul variantei A/U), fie în faza internă (cazul U/A).

#### **(i) Silicarea prin metoda Stöber modificată**

În cadrul acestui procedeu am prepararea dispersii hidro-alcoolice de NPMag care conține cantități bine-definite de NPMag, tetraetilortosilicat (TEOS), opțional 3-aminopropil trietoxisilan (APTES), soluție apoasă de NH<sub>3</sub>, apă și etanol, care sunt supuse fie agitării mecanice, fie ultrasonicării.



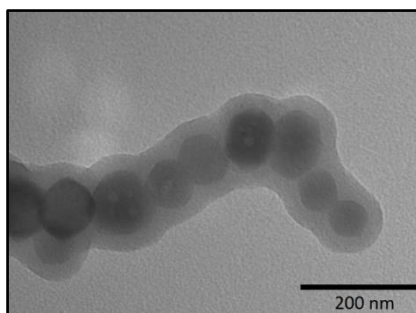
**Fig. b 2.** Imagine TEM cu NPMag@SiO<sub>2</sub> (lot FeO-dtc-SiO<sub>2</sub>-v1)

<sup>4</sup> C. Iacovita et al. Ultraviolet light assisted synthesis of magnetoplasmonic nanoparticles. Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures, 10 (4), 1209 – 1214, 2015.

<sup>5</sup> B. K. Sodipo, and A. A. Aziz. Recent advances in synthesis and surface modification of superparamagnetic iron oxide nanoparticles with silica. Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 416, 275-291, 2016.

<sup>6</sup> S. T. Selvan, T. T. Tan and Ying J. Y. Robust, Non-Cytotoxic, Silica-Coated CdSe Quantum Dots with Efficient Photoluminescence. Adv. Mater., 17, 1620 – 1625, 2005.

**A.** Prima încercare de silicare a NPMag prin intermediul procedurii Stöber modificată s-a realizat conform următoarei rețete: 1 mL dispersie NPMag în alcool etilic (cod FeO-dtc-12), 2 mL TEOS, 30 mL etanol, 4 mL H<sub>2</sub>O și 0,3 mL NH<sub>3(aq)</sub> 25% s-au amestecat într-un pahar Berzelius cu capacitatea de 50 ml. Dispersia astfel obținută a fost supusă agitării mecanice peste noapte prin intermediul unui agitator cu platformă. Conform figurilor b2 și b3, unde este prezentată o imagine TEM a NPMag silicate (cod FeO-dtc12-SiO<sub>2</sub>-v1), se observă faptul că NPMag agregă în structuri sferice de ordinul zecilor de nanometri. Aceste agregate de NPMag sunt prezente într-un covor format din seed-uri de silice. Menționăm faptul că NPMag utilizate în această încercare de silanizare au fost hidrofobe. Se pare că acest lucru conduce la formarea de agregate, împiedicând astfel învelirea acestora într-un nano-strat de silice. Așadar este de preferat utilizarea de NPMag deja hidrofilizate în cadrul acestui procedeu de silicare.



*Fig. b2. Imagine TEM cu NPMag@SiO<sub>2</sub> (lot FeO-dtc12-SiO<sub>2</sub>-v2.)*

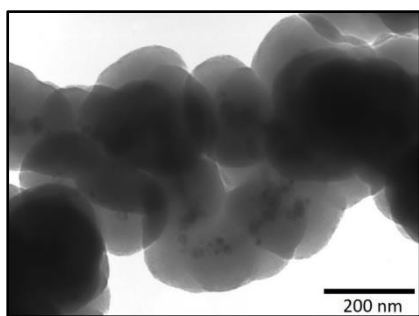
**B.** Următoarea încercare de silicare s-a realizat cu aceleași cantități de reactivi, cu mențiunea că au fost utilizate NPMag din lotul FeO-dtc12 hidrofilizate în prealabil prin procedeu cu NaIO<sub>4</sub>. O altă diferență constă în faptul că s-a înlocuit agitarea mecanică cu două reprize de ultrasonicare, fiecare cu o durată de 30 minute. După cum se poate observa în Fig. b4, rezultatele au fost cu mult mai promițătoare decât în cazul precedent. NPMag silicate (cod FeO-dtc12-SiO<sub>2</sub>-v2) sunt învelite într-un strat de silice având o grosime de aproximativ 25 nm. Dezavantajul major al acestei încercări este dat de faptul că nu se obțin NPMag individuale înconjurate de un nano-strat de silice cu o grosime dată. În schimb se observă o învelire a mai multor NPMag fie în lanț fie în clustere.

În continuarea procesului de silicare, s-a urmărit influența cantității de NH<sub>3</sub> adăugat în amestecul de reacție asupra grosimii stratului de silica care înconjoară NPMag. Într-o primă instanță, s-a dublat cantitatea de NH<sub>3</sub>, iar amestecul a fost ultrasonicat de 4 ori, de fiecare dată cu o durată de 30 minute pentru fiecare. În rest, celelalte cantități au fost identice cu cele

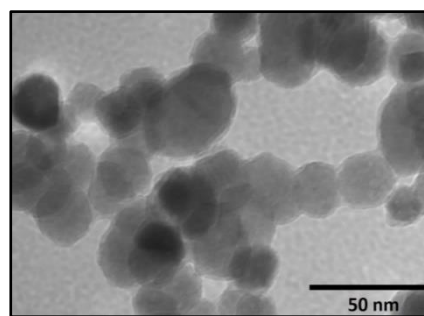
precedente. După cum se poate observa în figura b5, în jurul NPMag (cod: FeO-dtc12-SiO<sub>2</sub>-v3) s-a depus un nano-strat de silice mult mai gros, de ordinul a 100 nm. Se constată, de asemenea, faptul că silicarea nu se realizează în jurul a NPMag individuale ci mai degrabă cuprinde agregate de NPMag. Totodată, entitățile silicate, deși vizibil decernabile, prezintă un grad avansat de aglomerare.

Într-o a doua instanță, s-au înjumătățit cantitățile inițiale de NH<sub>3</sub> și TEOS. Amestecul de reacție a fost ultrasonicat doar de 2 ori câte 30 minute, celelalte cantități fiind identice cu cele precedente. În urma acestei încercări, NPMag (cod: FeO-dtc12-SiO<sub>2</sub>-v4) sunt înconjurate de un nano-strat de silice cu mult mai subțire de ordinul a câțiva nanometri, așa cum se observă în figura b5. Constatăm, însă, faptul că nano-stratul nu este prezent în mod uniform în jurul NPMag individuale, ci mai degrabă aceasta învelește mai multe NPMag. Tendința de aglomerare a NPMag este încă prezentă. Putem astfel concluziona faptul că, o cantitate de NH<sub>3(aq)</sub> adăugată la începutul reacției influențează în mod clar grosimea stratului de silice din jurul NPMag. Varianta în care se adaugă doar 0.3 mL NH<sub>3(aq)</sub> 25% este optimă din punct de vedere al grosimii nano-stratului de silice care învelește miezul magnetic.

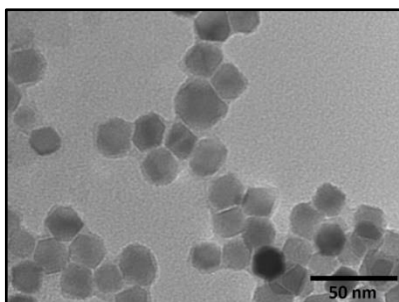
Am continuat prin a studia influența cantității de TEOS adăugate în amestecul de reacție asupra silicării. Astfel, prin înjumătățirea cantității de TEOS (de la 1 mL la 0.5 mL), păstrând restul parametrilor nemodificați față de sinteza FeO-dtc12-SiO<sub>2</sub>-v4, s-a depus un strat foarte subțire de SiO<sub>2</sub> pe suprafața NPMag (cod: FeO-dtc12-SiO<sub>2</sub>-v5), după cum se poate observa în figura b6.



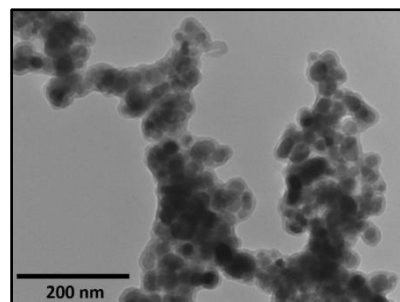
**Fig. b3.** Imagine TEM cu NPMag@SiO<sub>2</sub> din lotul FeO-dtc12-SiO<sub>2</sub>-v3.



**Fig. b4.** Imagine TEM cu NPMag@SiO<sub>2</sub> din lotul FeO-dtc12-SiO<sub>2</sub>-v4.

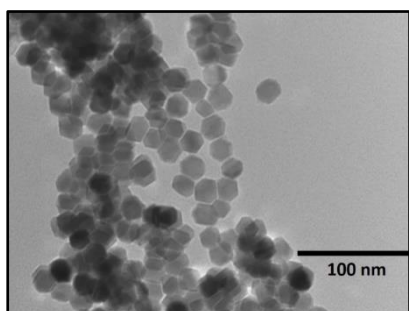


**Fig. b6.** Imagine TEM cu NPMag@SiO<sub>2</sub> din lotul FeO-dtc12-SiO<sub>2</sub>-v5.

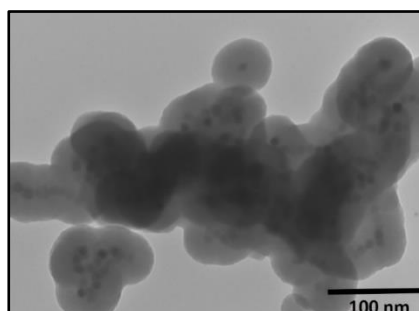


**Fig. b7.** Imagine TEM cu NPMag@SiO<sub>2</sub> din lotul FeO-dtc12-SiO<sub>2</sub>-v6.

Prin urmare, datorită cantității mai scăzute de NH<sub>3</sub>, s-a depus un strat subțire de dioxid de siliciu pe suprafața NPMag indiferent dacă am adăugat o cantitate mai mare sau mai mică de TEOS în amestecul de reacție. Următoarea încercare s-a efectuat cu înjumătățirea cantității de NPMag din amestecul de reacție și păstrarea celorlalți parametri din sinteza FeO-dtc12-SiO<sub>2</sub>-v5. NP obținute (cod: FeO-dtc12-SiO<sub>2</sub>-v6) au prezentat un strat de SiO<sub>2</sub> mai gros decât în cazurile precedente, după cum se poate observa în figura 7. Totodată, NPMag sunt înglobate în lanț în stratul de silice. În continuare, am decis să realizăm sinteza FeO-dtc12, de data aceasta utilizând o instalație de încălzire la presiune atmosferică. Întrucât amestecul de reacție a fost încălzit într-un balon, am ales următorul cod al sintezei: FeO-dtc12-B. S-au obținut NPMag de dimensiune comparabilă cu cele din lotul FeO-dtc12 având de formă poliedrică (Fig. b8).



**Fig.b8.** Imagine TEM cu NPMag@SiO<sub>2</sub> din lotul FeO-dtc12-B.

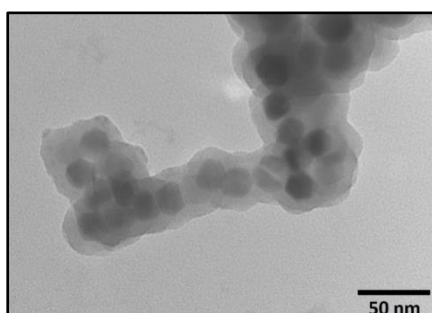


**Fig.b9.** Imagine TEM cu NPMag@SiO<sub>2</sub> din lotul FeO-dtc12-B-SiO<sub>2</sub>-v1.

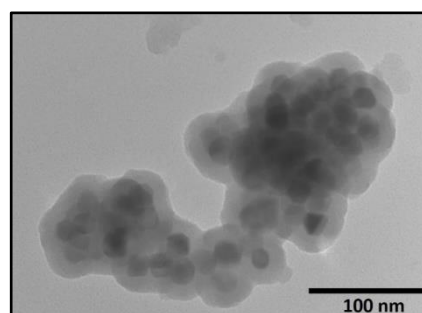
Aceste NPMag au fost hidrofilizate prin aplicarea procedurii cu NaIO<sub>4</sub> descris anterior, urmat de aplicarea unui procedeu de hidrofilizare suplimentar (prin incubarea a 1 mL dispersie NPMag cu 20 mL sol. apoasă de citrat de sodiu de concentrație 5% m/v). NPMag hidrofile astfel obținute au fost utilizate într-o serie de proceduri de silicare prin

metoda Stöber modificată. Pentru a conferi o sarcină de suprafață pozitivă NPMag silicate, s-a adăugat în amestecul de reacție 0.5 mL (3-aminopropil) trietoxisilan (APTES). Acest compus formează, în urmare hidrolizei, silice în care unele grupări -OH sunt înlocuite de grupări -NH<sub>2</sub>, care se încarcă pozitiv după captarea protonilor din mediu (devin grupări -NH<sub>3</sub><sup>+</sup>). Am urmărit introducerea acestor grupări pentru a facilita interacțiunea electrostatică a NPMag silanizate cu NP de aur, într-o etapă ulterioară. În afară de adăugarea APTES, singura modificare adusă rețetei FeO-dtc12-SiO<sub>2</sub>-v1 a fost adăugarea a 0.4 mL NH<sub>3(aq)</sub>. Noile NPMag silanizate au codul: FeO-dtc12-B-SiO<sub>2</sub>-v1. După cum se poate observa în figura b9, s-a depus un strat gros de SiO<sub>2</sub> care a înglobat mai multe NPMag. Totodată, entitățile silicate sunt sudate între ele. În continuare, s-a eliminat APTES din rețetă și am lăsat restul parametrilor identici (cod: FeO-dtc12-B-SiO<sub>2</sub>-v2), cu mențiunea că am utilizat NPMag hidrofilizate doar cu NaIO<sub>4</sub>. În Figura b10 se poate observa faptul că s-a depus un strat de dioxid de siliciu de grosime medie (raportat la sintezele efectuate) cu tendința de a îngloba NPMag în lanț.

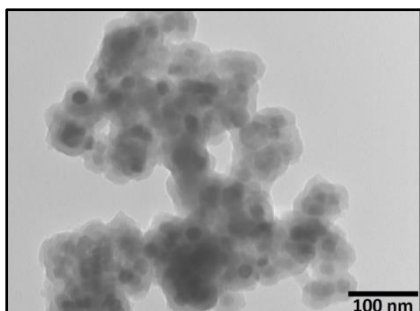
Pentru a verifica influența pre-tratamentului asupra asocierii sub formă de lanț a NPMag, am preparat aceeași rețetă, cu mențiunea că am sonicat timp de 30 min amestecul de alcool-apă-NPMag înainte de a adăuga și restul componentelor (cod: FeO-dtc12-B-SiO<sub>2</sub>-v3). După cum se poate observa în Figura b11, această etapă de pre-tratament nu a influențat procesul de silicare. Pentru a verifica dacă asocierea NPMag sub formă de lanțuri se datorează remanenței unor molecule hidrofobe (acid oleic) pe suprafața acestora, am hidrofilizat încă o dată NPMag cu NaIO<sub>4</sub>, după care am aplicat același procedeu de silanizare (cod: FeO-dtc12-B-SiO<sub>2</sub>-v4). După cum se poate observa în Figura b12, NPMag s-au asociat în continuare în lanț.



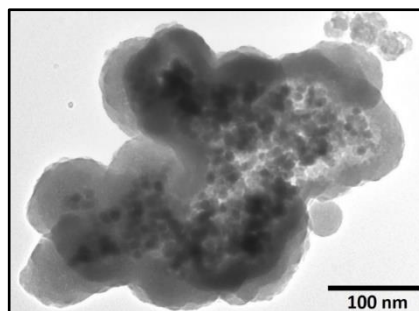
**Fig. b10.** Imagine TEM cu NPMag@SiO<sub>2</sub> din lotul FeO-dtc12-B-SiO<sub>2</sub>-v2.



**Fig. b11.** Imagine TEM cu NPMag@SiO<sub>2</sub> din lotul FeO-dtc12-B-SiO<sub>2</sub>-v3.



**Fig. b12.** Imagine TEM cu NPMag@SiO<sub>2</sub> din lotul FeO-dtc12-B-SiO<sub>2</sub>-v4.

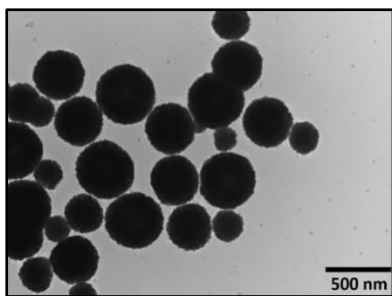


**Fig. b13.** Imagine TEM cu NPMag@SiO<sub>2</sub> din lotul FeO-dtc12-B-SiO<sub>2</sub>-v5.

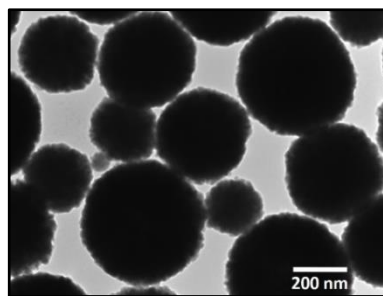
Dat fiind faptul că NPMag silanizate din lotul FeO-dtc12-B-SiO<sub>2</sub>-v1 au prezentat un strat gros de siliciu, am decis să reducem cantitatea de APTES adăugat de la 0.5 mL la 0.1 mL. Restul parametrilor au rămas nemodificați (cod: FeO-dtc12-B-SiO<sub>2</sub>-v5). După cum se poate observa în Figura b5, scăderea cantității de APTES nu a dus la diminuarea grosimii stratului de siliciu și nici nu a favorizat separarea entităților silicate. Totodată, NPMag au fost înglobate în număr mare în entitățile silicate. Având în vedere faptul că NPMag s-au asociat indiferent de condițiile utilizate și de etapele de pre-tratament (hidrofilizare, ultrasonicare), am presupus că acestea prezintă un moment magnetic permanent. Prin urmare, am decis să utilizăm și alte clase de NPMag pentru realizarea procedurii de silicare.

Sintetizarea NPMag prin metoda poliolor. S-a realizat o sinteză de NPMag prin încălzirea (și menținerea timp de 4 h la această temperatură) la 200°C cu o rampă de temperatură de 5°C/min a unui amestec obținut prin dizolvarea în 20 mL etilenglicol a 0,27 g FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0,32 g acetat de sodiu și 0,5 g PEG 1000 (Cod: FeO-pol-05). Figura b14 ilustrează NPMag obținute. Acestea se constituie sub formă de agregate sferice de NPMag de mici dimensiuni, cu dimensiuni globale cuprinse între 200-500 nm. După cum se poate observa, aceste entități sunt bine separate. Totodată, acestea sunt puternic magnetice. Aceste NPMag au fost utilizate într-un proces de silanizare (cod: FeO-pol-05-SiO<sub>2</sub>-v1) utilizând aceiași parametri ca în cazul sintezei FeO-dtc12-SiO<sub>2</sub>-v1. Dioxidul de siliciu (SiO<sub>2</sub>) s-a depus într-un strat fin pe suprafața NPMag sferice, după cum se poate observa în Figura b15.





**Fig. b14.** Imagine TEM cu NPMag din lotul FeO-pol05.

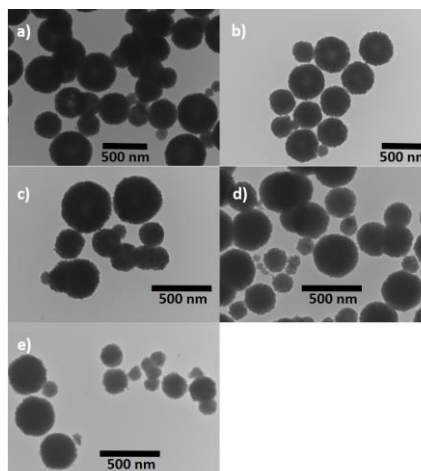


**Fig. b15.** Imagine TEM cu NPMag din lotul FeO-pol05-SiO<sub>2</sub>-v1.

Figura b15 ilustrează faptul că procedeul de silanizare prin metoda Stöber modificat nu a mai condus la înglobarea mai multor NPMag în același strat de siliciu, entitățile silanizate păstrându-și individualitatea în acest caz. În continuare, am variat parametrii metodei de sinteză a NPMag în vederea obținerii unor agregate sferice de dimensiuni mai mici. Astfel, s-au realizat următoarele variații:

- dublarea rampei de încălzire (10°C/min) (cod: FeO-pol-06)
- adăugarea a 5 g PEG 1000, în loc de 0.5 g (cod: FeO-pol-07)
- adăugarea a 5 g PEG 10000 în locul PEG 1000 (cod: FeO-pol-08)
- menținerea amestecului pt. pol-05 la 200°C timp de 2 h, în loc de 4 h (cod: FeO-pol-09)
- triplarea rampei de încălzire (15°C/min) pt. amestecul pol-05 (cod: FeO-pol-10)

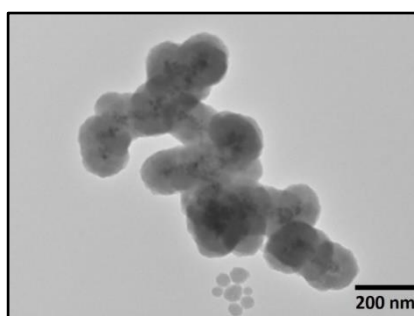
Rezultatele sunt sumarizate în Figura b16.



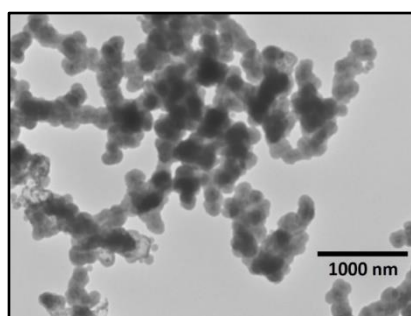
**Fig. b16.** Imagini TEM cu NPMag din lotul: a) FeO-pol06, b) FeO-pol07, c) FeO-pol08, d) FeO-pol09, e) FeO-pol10.

După cum se poate observa din Figura b15, strategiile aplicate nu au condus la modificarea semnificativă a dimensiunii agregatelor sferice de NPMag.

Altă clasă de NPMag utilizate în procedeul de silanizare a fost cele din categoria FeO-dtc5, în special datorită dimensiunii mici (cca. 10 nm) a acestora, condiție esențială pentru a avea o comportare superparamagnetică la temperatura camerei. Într-o primă fază, a fost aplicat procedeul de silanizare utilizat și în cazul dtc-12-B-SiO<sub>2</sub>-v2, utilizând NPMag nehidrofilizate, în 2 variante: ultrasonicare timp de 1 h (cod: FeO-dtc-5-SiO<sub>2</sub>-us) sau agitare mecanică timp de 3 h (cod: FeO-dtc-5-SiO<sub>2</sub>-mec). În ambele cazuri s-a depus un strat relativ gros de oxid de siliciu peste NPMag. În plus, entitățile silicate cuprind mai multe NPMag și sunt sudate între ele (Fig. b17 și b18). Am realizat variante ale procedurii Stöber în care am adăugat PEG 1000, PEG 20000 sau CTAB în scopul împiedicării sudării entităților silicate, însă rezultatele obținute nu au fost satisfăcătoare.



**Figura b17.** Imagine TEM cu NPMag@SiO<sub>2</sub> din lotul FeO-dtc5-SiO<sub>2</sub>-mec.



**Figura b18.** Imagine TEM cu NPMag@SiO<sub>2</sub> din lotul FeO-dtc5-SiO<sub>2</sub>-us.

### **(ii) Silicare prin metoda microemulsiei**

În acest caz general, au fost adoptate 2 sub-metode:

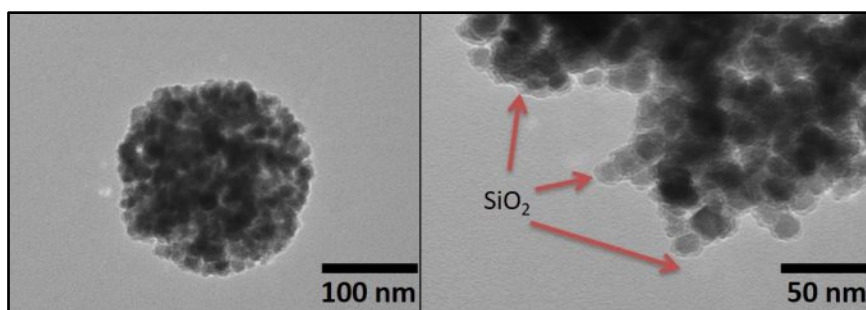
#### **a. Metoda microemulsiei U/A**

În această abordare, amestecurile de reacție au fost realizate prin emulsionarea (mediată de ultrasunete) unei dispersii de NPMag în hexan (care conține și TEOS) într-o soluție apoasă de TWEEN 80 și amoniac. Aceste amestecuri de reacție au fost fie supuse agitării mecanice, fie ultrasonicării, în vederea depunerii SiO<sub>2</sub> pe suprafața NPMag. Acest procedeu duce la formarea unor agregate sferice de NPMag, acoperite cu un strat subțire de SiO<sub>2</sub>. Prima sinteză a decurs conform următorului protocol: s-a preparat o soluție apoasă prin dizolvarea a 0,4 mL TWEEN 80 în 8 mL apă ultrapură. Această soluție a constituit faza externă (apoasă) a

emulsiei preparate. Faza internă (uleioasă) a fost preparată prin dispersarea NPMag conținute în 0,2 mL dispersie FeO-dtc5 (din care a fost îndepărtat alcoolul) în 1 mL hexan, la care s-au adăugat și 0,1 mL TEOS. Faza uleioasă astfel preparată a fost dispersată în faza apoasă prin agitare manuală, urmată de ultrasonicare (5 min). După obținerea emulsiei, s-au adăugat 0,4 mL  $\text{NH}_3(\text{aq})$  25% și amestecul a fost supus agitării mecanice peste noapte. [Cod: Feo-dtc5-SiO<sub>2</sub>-ME3 (primele 2 sinteze, ME1 și ME2, au fost efectuate conform abordării A/U)].

Izolarea NPMag@SiO<sub>2</sub> s-a făcut a doua zi, prin adăugarea a 10 mL etanol în amestecul de reacție, cu scopul *spargerii* emulsiei și prin plasarea flaconului care conținea amestecul deasupra unui magnet. După sedimentarea NPMag silicate, supernatantul a fost îndepărtat și s-au adăugat 10 mL apă. NP au fost redispersate prin ultrasonicare, după care au fost din nou separate în câmp magnetic, cu îndepărtarea ulterioară a supernatantului. Procesul a fost repetat de încă 2 ori. La final, NPMag@SiO<sub>2</sub> au fost dispersate prin ultrasonicare în 2 mL apă ultrapură.

*Observație: Un indiciu al depunerii SiO<sub>2</sub> pe suprafața conglomeratelor de NPMag este faptul că aceste structuri sunt ușor dispersabile în apă (NPMag utilizate nefiind hidrofile). După cum se poate observa în figura b19, s-au obținut agregate sferice de NPMag care prezintă un strat subțire de SiO<sub>2</sub> la suprafață.*



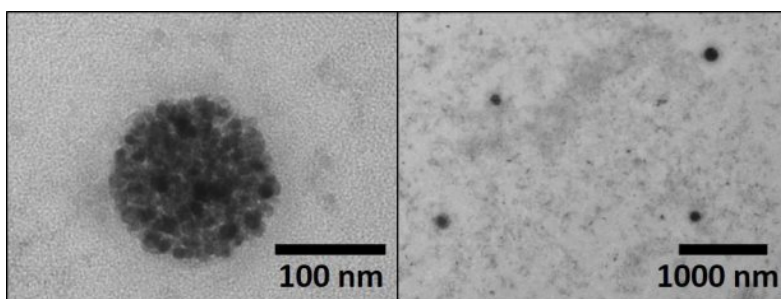
**Fig. b19.** Imagini TEM cu NPMag@SiO<sub>2</sub> din lotul FeO-dtc5-SiO<sub>2</sub>-ME3.  
Stânga: conglomerat sferic de NPMag. Dreapta: punerea în evidență a stratului de SiO<sub>2</sub> de pe suprafața conglomeratelor de NPMag.

O posibilă explicație pentru acest fenomen este următoarea: amestecul de reacție este format din mici picături (globule) de dispersie de NPMag în hexan/TEOS. Aceste picături adoptă o formă sferică din considerente termodinamice (se micșorează suprafața de separare dintre cele două faze, având cea mai mică suprafață pentru un volum dat). În plus, la interfața dintre globule și faza externă migrează moleculele de TWEEN 80 (având caracter amfifil, porțiunea hidrofobă a moleculelor de TWEEN 80 intră în interiorul globulelor, în timp ce porțiunea hidrofilă rămâne în faza apoasă) - acest fenomen este un factor important în

asigurarea stabilității emulsiei. În timpul agitării mecanice/ultrasonicării, are loc hidroliza moleculelor de TEOS la interfața dintre globule și faza externă. În timpul hidrolizei, se depune un strat de siliciu care înglobează NPMag din picătură, motiv pentru care se formează conglomerate (aproximativ) sferice. Este posibil ca hexanul din globule să difuzeze în exterior pe parcursul acestui proces sau în cadrul procesului de izolare a conglomeratelor formate în urma sintezei.

În continuare, s-a preparat amestecul de reacție în condiții identice (cu excepția faptului că am adăugat 0.2 mL TEOS în loc de 0.1 mL), supus ultrasonicării timp de 15 min (în locul etapei de agitare mecanică). Izolarea NPMag@SiO<sub>2</sub> s-a realizat în condiții identice (Cod: FeO-dtc5-SiO<sub>2</sub>-ME4).

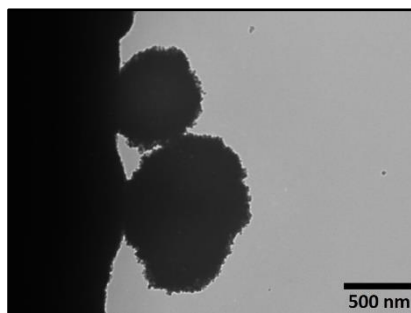
După cum se poate observa în Figura b20, s-au obținut conglomerate sferice, similar cazului anterior, cu excepția faptului că acestea au prezentat o dimensiune mai mică. Acest fenomen poate fi explicat prin faptul că ultrasonicarea prelungită a condus la scăderea dimensiunii globulelor emulsionate și, implicit, a conglomeratelor care s-au format.



**Fig. b20.** Imagini TEM cu NPMag@SiO<sub>2</sub> din lotul FeO-dtc5-SiO<sub>2</sub>-ME4.  
Stânga: conglomerat sferic de NPMag. Dreapta: imagine de ansamblu cu NPMag@SiO<sub>2</sub>.

În etapa următoare, am utilizat metoda FeO-dtc5-SiO<sub>2</sub>-ME4 modificată în ceea ce privește compoziția amestecului de reacție (în loc de TWEEN 80, am adăugat 0.1 g bromură de cetil-trimetilamoniu-CTAB). Rezultatele obținute nu au fost satisfăcătoare.

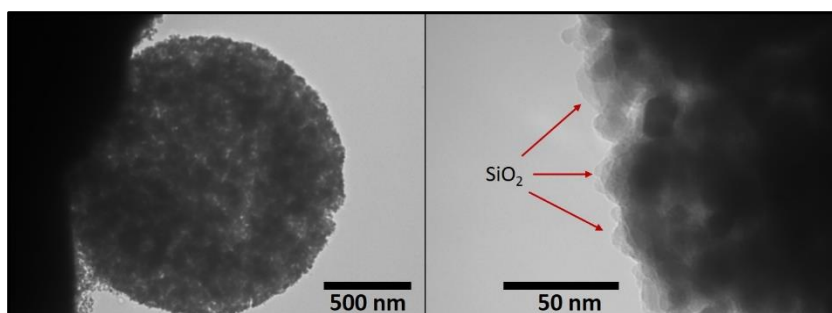
Am continuat procedurile prin dublarea cantității de TEOS (am adăugat 0.4 mL) și am aplicat aceeași procedură ca la sinteza FeO-dtc5-SiO<sub>2</sub>-ME3 (cu mențiunea că am lăsat amestecul la agitare mecanică timp de 8 ore). Rezultatele obținute nu au fost satisfăcătoare.



**Fig. b51.** Imagine TEM cu NPMag@SiO<sub>2</sub> din lotul FeO-dtc5-SiO<sub>2</sub>-ME9.

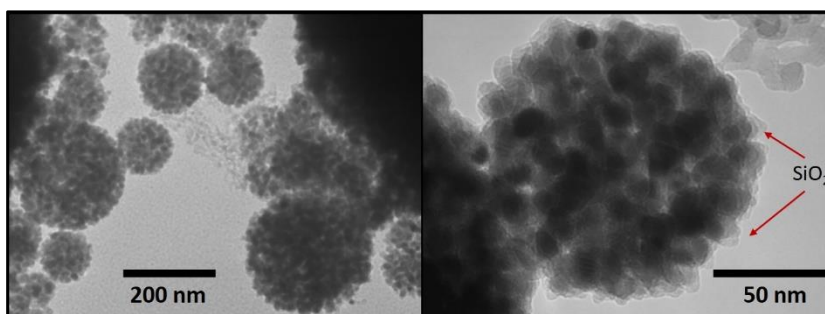
Utilizând rețeta de la FeO-dtc5-SiO<sub>2</sub>-ME4 la care am adăugat doar 0.2 mL TWEEN 80 și aplicând agitarea mecanică timp de 8 h, am obținut NPMag@SiO<sub>2</sub> (Feo-dtc5-SiO<sub>2</sub>-ME9). După cum se poate observa în figura b21, acestea au dimensiuni foarte mari (>500 nm). Acest fenomen poate fi explicat prin faptul că o cantitate mai mică de TWEEN nu a putut asigura formarea unor globule de dimensiuni mai mici.

Pentru a studia influența mediului de dispersie aferent fazei interne, s-a înlocuit hexanul cu cloroform, păstrând restul componentelor și al parametrilor nemodificați comparativ cu sinteza FeO-dtc5-SiO<sub>2</sub>-ME4. Rezultatele obținute au fost nesatisfăcătoare, întrucât NPMag nu s-au organizat similar sintezelor anterioare și nici procesul de silicare nu a decurs eficient. Astfel, am decis să dublăm cantitatea de NPMag din sistem și să supunem amestecul agitării mecanice timp de 6 h. (FeO-dtc5-SiO<sub>2</sub>-ME11). După cum se poate observa în figura b22, s-au obținut conglomerate de NPMag sub formă sferică, cu dimensiuni de ordinul μm. Acestea au prezentat un strat superficial subțire de SiO<sub>2</sub>. Am încercat și utilizarea acetatului de etil ca mediu de dispersie pentru faza internă, însă acest solvent, fiind mai polar decât hexanul și cloroformul, a permis hidroliza masivă a TEOS-ului în timpul ultrasonicării amestecului, conducând la formarea unui gel.



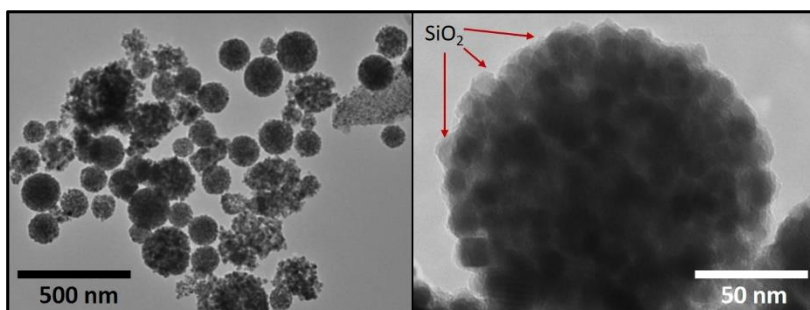
**Fig. b22.** Imagini TEM cu NPMag@SiO<sub>2</sub> din lotul FeO-dtc5-SiO<sub>2</sub>-ME11.  
Stânga: conglomerat sferic de NPMag aflat la marginea unui ochi de pe grid-ul TEM.  
Dreapta: punerea în evidență a stratului superficial de SiO<sub>2</sub>.

În etapa următoare, am preparat o emulsie identică cu cea aferentă sintezei FeO-dtc5-SiO<sub>2</sub>-ME4. Aceasta a fost supusă imediat după obținere la ultrasonicare timp de 1 h, fără a închide recipientul cu dop. Am urmărit, astfel, evaporarea integrală a hexanului din faza internă pe parcursul sintezei (FeO-dtc5-SiO<sub>2</sub>-ME12). Figura b23 ilustrează conglomeratele sferice formate. Acestea au avut, în mare parte, dimensiuni cuprinse între 100 și 200 nm și au prezentat un strat superficial subțire de SiO<sub>2</sub>.



**Fig. b23.** Imagini TEM cu NPMag@SiO<sub>2</sub> din lotul FeO-dtc5-SiO<sub>2</sub>-ME12.  
Stânga: conglomerate sferice de NPMag. Dreapta: punerea în evidență a stratului superficial de SiO<sub>2</sub>

În continuare, am refăcut sinteza anterioară, cu mențiunea că am închis flaconul. Rezultatele obținute au fost asemănătoare cu cele ale sintezei anterioare (Fig. b13). Cod: FeO-dtc5-SiO<sub>2</sub>-ME13.



**Fig. b24.** Imagini TEM cu NPMag@SiO<sub>2</sub> din lotul FeO-dtc5-SiO<sub>2</sub>-ME13.  
Stânga: conglomerate sferice de NPMag. Dreapta: punerea în evidență a stratului superficial de SiO<sub>2</sub>.

Prin adăugarea în faza internă a 10  $\mu$ L APTES și urmând metoda de sinteza anterioară (ME13), s-au obținut agregate sferice de NPMag; însă stabilitatea acestora a fost mult mai mică comparativ cu situația precedentă. Astfel, multe conglomerate s-au destrămat în momentul preparării probei pentru analiza TEM.

#### b. Metoda microemulsiei inverse (A/U)

Într-o primă instanță, am realizat sintezele utilizând TWEEN 80 și acid oleic pe post de emulgatori, însă rezultatele nu au fost satisfăcătoare. Prin urmare, am decis să preparăm microemulsia după cum urmează: în 8 mL hexan, au fost dispersate NPMag provenite din 0.2 mL dispersie alcoolică FeO-dtc5 din care s-a eliminat alcoolul, 50  $\mu$ L TEOS și 0.5 mL IGEPAL CO-520. Acest amestec a fost agitat timp de 30 min, după care i s-au adăugat 100  $\mu$ L soluție NH<sub>3(aq)</sub> 25%. Prin agitare mecanică ușoară, urmată de ultrasonicare timp de 2 min, soluția de amoniac s-a dispersat fin în faza organică, obținându-se o emulsie transparentă, de culoare cafenie. Emulsia astfel obținută a fost lăsată la agitare timp de 24 h, după care a fost destabilizată cu 10 mL etanol. După adăugarea etanolului, s-au format mici agregate sferice

vizibile cu ochiul liber, având aspect gelatinos. Aceste agregate au fost atrase cu ușurință de către un magnet de neodim. După îndepărtarea supernatantului, agregatele au fost redispersate în apă prin ultrasonicare. Dispersia obținută nu a fost stabilă, întrucât NPMag@SiO<sub>2</sub> s-au separat sub forma unui inel. După adăugare de acetonă și ultrasonicare, acestea nu s-au mai separat. (Codul sintezei: FeO-dtc5-SiO<sub>2</sub>-RME1)

În figura b25 se poate observa că NPMag au fost silicate fie individual, fie în grupuri de 2-5 particule. Stratul de SiO<sub>2</sub> este uniform pentru fiecare particulă. Se remarcă ușor că nu apare efectul de sudare observat la metoda Stöber modificată.

Pentru a conferi o sarcină de suprafață pozitivă și o stabilitate mai bună în apă, am refăcut sinteza, cu mențiunea că în faza externă am adăugat și 5 μL APTES. Pașii urmați au fost identici. La faza de redispersare a agregatelor separate magnetic, s-a observat o bună stabilitate coloidală în mediu apos a NPMag@SiO<sub>2</sub> obținute. Codul sintezei: **FeO-dtc5-SiO<sub>2</sub>-RME2**.

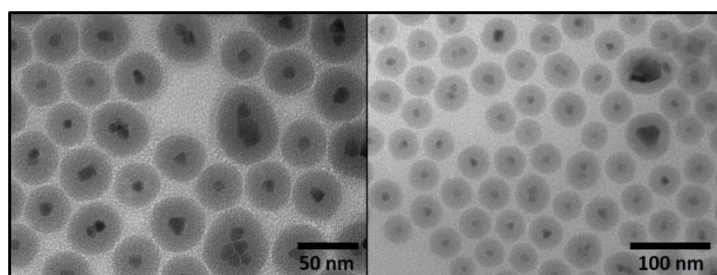


Fig. b25. Imagini TEM cu NPMag@SiO<sub>2</sub> din lotul FeO-dtc5-SiO<sub>2</sub>-RME1.

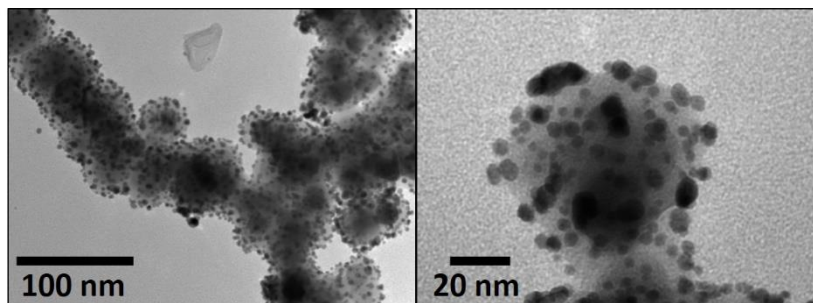
## **b2. Depunerea și extinderea stratului de aur pe nanoparticulele magnetice silicate**

### ***b2.1. Depunerea seed-urilor de Au (NP de aur de dimensiuni ~ 5 nm) pe suprafața NPMag@SiO<sub>2</sub>***

Dintre sintezele realizate prin metoda Stöber modificată, am ales să utilizăm lotul FeO-dtc12-B-SiO<sub>2</sub>-v2. În primă instanță, am adăugat 1 mL dispersie apoasă NPMag@SiO<sub>2</sub> în 30 mL etanol conținând 0.1 mL APTES. Am ultrasonicat amestecul timp de 30 min, după care am izolat, spălat și resuspendat NPMag@SiO<sub>2</sub> în 10 mL apă ultrapură.

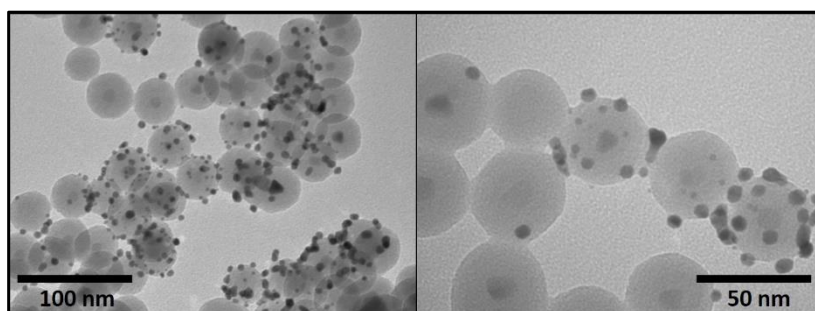
Am preparat seed-uri de aur conform următoarei rețete: în 18 mL apă ultrapură rece (4°C), am adăugat 0.5 mL soluție H[AuCl<sub>4</sub>] 10<sup>-2</sup> M și 0.5 mL soluție citrat trisodic 10<sup>-2</sup> M. După omogenizare, am adăugat, picătură cu picătură și sub agitare continuă (flaconul cu soluția fiind pe baie de gheață), 0.5 mL soluție NaBH<sub>4</sub> 0.1 M (soluția fiind preparată prin dizolvarea NaBH<sub>4</sub> în apă rece: 4°C). S-a obținut un coloid maroniu-roșiatic, transparent. Ulterior, am adăugat picătură cu picătură (sub agitare continuă pe agitatorul cu platformă) 10 mL coloid cu seed-uri de aur peste cei 10 mL dispersie apoasă NPMag@SiO<sub>2</sub> obținuți

anterior (după tratarea cu APTES). S-a obținut un coloid roșu-marونیu. Cod: FeO-dtc12-B-SiO<sub>2</sub>-v2-AuSeed1. După cum se poate observa în figura b26, seed-urile de Au s-au atașat eficient de suprafața nanoparticulelor magnetice silicate.



**Fig. b26.** Imagini TEM cu NPMag@SiO<sub>2</sub>@AuSeed din lotul FeO-dtc12-B-SiO<sub>2</sub>-v2-AuSeed1. Stânga: ansamblu de NPMag@SiO<sub>2</sub>@AuSeed. Dreapta: punerea în evidență a unei singure particule NPMag@SiO<sub>2</sub>@AuSeed.

În ceea ce privește sintezele realizate prin metoda microemulsiei, am ales să utilizăm NP din lotul FeO-dtc5-SiO<sub>2</sub>-RME2. Am aplicat aceeași procedură descrisă anterior, cu mențiunea că am utilizat direct cei 10 mL dispersie NPMag@SiO<sub>2</sub>, fără a mai face o etapă de pre-tratament cu APTES (aceste NP au fost sintetizate în prezența APTES). Codul sintezei: FeO-dtc5-SiO<sub>2</sub>-RME2-AuSeed1. Figura b27 ilustrează faptul că doar o parte din NPMag@SiO<sub>2</sub> au fost decorate cu seed-uri de aur. Prin urmare, am decis să prelevăm 10 mL din această dispersie și să îi amestecăm cu 10 mL coloid cu seed-uri de Au, folosind tehnica descrisă mai sus. NP au putut fi separate integral în câmp magnetic (supernatantul a devenit incolor și transparent).

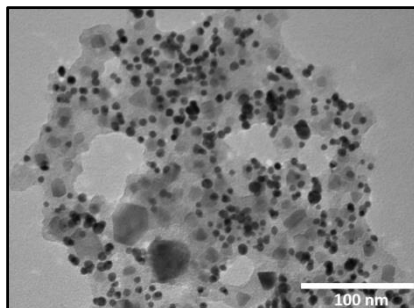


**Fig. b27.** Imagini TEM cu NPMag@SiO<sub>2</sub>@AuSeed din lotul FeO-dtc5-SiO<sub>2</sub>-RME2-AuSeed1. Stânga: ansamblu de NPMag@SiO<sub>2</sub>@AuSeed. Dreapta: punerea în evidență a câteva particule NPMag@SiO<sub>2</sub>@AuSeed.

Sedimentul a fost redispersat în 10 mL apă prin ultrasonicare, generând un coloid roșu-rubiniu. Codul sintezei: FeO-dtc5-SiO<sub>2</sub>-RME2-AuSeed2. După cum se poate observa în



figura b28, stratul de siliciu a suferit o serie de modificări, printre care dizolvarea pe alocuri și sudarea NPMag între ele prin intermediul acestui strat, similar unor situații întâlnite la procedeul Stöber modificat. Pe de altă parte, seed-urile de Au s-au dispersat mult mai uniform față de cazul anterior.



*Fig. b28. FeO-dtc5-SiO2-RME2-AuSeed2.*

Tot în această fază a proiectului s-au realizat o serie de sinteze și încercări de depunere uniformă a unui strat de seed-uri de aur pe suprafața nanoparticulelor silanizate. Odată sintezele realizate s-au efectuat măsurători UV-Vis respectiv TEM în vederea analizării calității nanostructurilor.

A. Prepararea unei soluții de seeduri de aur cu un conținut de aur de 10 ori mai mare față de rețeta inițială

S-a analizat posibilitatea ca odată crescută concentrația de seed-uri acestea se vor atașa uniform stratului de siliciu de la suprafața NPMag.

Astfel, un prim pas a fost încercarea obținerii unei soluții mai concentrate de seed-uri de 10× față de rețeta inițială în același volum final. Pentru atingerea acestui obiectiv s-au utilizat următorii reactivi: 500 μl Citrat de sodiu 0.1M, 500 μl Clorhidrat de aur H<sub>Au</sub>Cl<sub>4</sub> 0.1M, 18 ml apă ultrapură, 500 μl NaBH<sub>4</sub> 1M. Pentru început s-au pus 18 ml apă ultra-pură la răcit în congelator. S-au preparat soluțiile de aur și citrat folosind apă ultra-pură rece. Sticluța cu cei 18 ml apă ultrapură rece s-a supus agitării mecanice fără magnet la 150-300 rpm. S-au adăugat treptat soluțiile de aur și de citrat, apoi s-a pregătit soluția de NaBH<sub>4</sub> proaspătă cu apă rece. Din aceasta, s-au adăugat 500μl picătură cu picătură în soluția aflată în agitare și apoi s-a oprit agitarea. Colorația soluției a fost una închisă spre indigo și s-a observat formarea unor agregate și flocoane de culoare închisă, soluția neputând fi folosită pentru următoarele experimente.

## B. Prepararea unei noi soluții de seeduri

S-a realizat o sinteză de seed-uri de aur folosind o rețetă clasică. Pentru aceasta s-au utilizat următorii reactivi și mod de lucru: 500  $\mu$ l Citrat de sodiu  $10^{-2}$  M, 500  $\mu$ l Clorhidrat de aur  $\text{HAuCl}_4$   $10^{-2}$  M, 8 ml apă ultra-pură, 500  $\mu$ l  $\text{NaBH}_4$   $10^{-1}$  M. Pentru început s-au preparat soluțiile de aur și citrat cu apă ultrapură rece. Într-o sticlă s-au pus 18 ml apă ultrapură rece, care apoi a fost agitată mecanic la 150-300 rpm. S-au adăugat treptat soluțiile de aur și de citrat, apoi s-a pregătit soluția de  $\text{NaBH}_4$  proaspătă cu apă rece. Din aceasta, s-au adăugat 500  $\mu$ l picătură cu picătură în soluția aflată în agitare și apoi s-a oprit agitarea. Colorația soluției a fost portocaliu arămie și cei 20 ml de seeduri s-au depozitat la frigider.

## C. Funcționalizarea nanoparticulelor $\text{Fe}_3\text{O}_4@/\text{SiO}_2$ cu seeduri de aur

Pentru acest pas, s-au selectat nanoparticulele magnetice SIL4 în baza imaginilor TEM obținute, iar funcționalizarea s-a realizat în 2 etape. Ca și reactiv s-au folosit: 20 ml soluție de seed-uri, 3 ml soluție nanoparticule magnetice concentrate, 27 ml apă ultra-pură

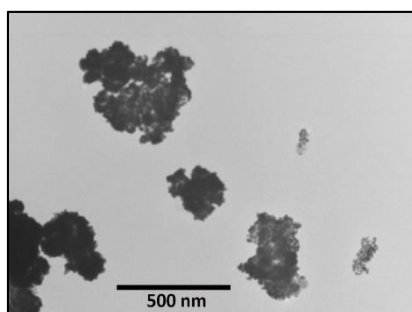
*Etapa 1:* Soluția SIL4 s-a ultrasonicat câteva minute înainte de a rămâne 3 ml în sticlă. Pentru diluare, s-au folosit 7 ml apă ultra-pură. Acest amestec s-a supus agitării mecanice ușoare la 150 rpm. S-au adăugat 10 ml seed-uri picătură cu picătură și s-a oprit agitarea. Soluția obținută s-a supus separării magnetice prin plasarea sticlei în contact direct cu un magnet. După separare, particulele au fost spălate cu 10 ml apă ultra-pură și sonicate pentru a continua adăugarea de seed-uri.

*Etapa 2:* Soluția obținută de la etapa 1 s-a supus agitării mecanice ușoare la 150 rpm și s-a adăugat picătură cu picătură 10 ml de seed-uri, apoi s-a oprit agitarea. Soluția finală a fost separată magnetic și spălată cu 10 ml apă ultra-pură. După aceea soluția se ultrasonichează și se analizează UV-VIS. Păstrarea soluției se face la frigider.

### **2.2. Extinderea stratului de Au pe toată suprafața nanostructurilor**

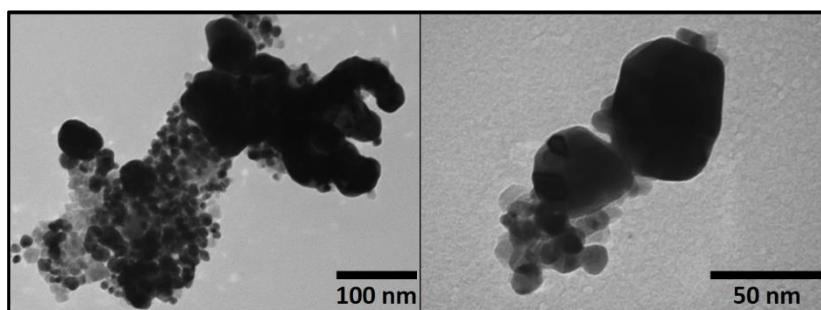
În cazul sintezei  $\text{FeO-dtc12-B-SiO}_2\text{-v2-AuSeed1}$ , am adăugat 2 mL dispersie NP din acest lot într-o soluție obținută prin amestecare a 10 mL sol.  $\text{H}[\text{AuCl}_4]$  0.3 mM și 2 mL sol. citrat trisodic 1% m/v. Peste dispersia obținută, s-au adăugat, picătură cu picătură, 0.1 mL soluție apoasă de hidroxilamină 30 mM. S-a obținut un coloid transparent, de culoare albastră. NP se separă magnetic, supernatantul rămânând foarte slab colorat. Codul sintezei:  $\text{FeO-dtc12-B-SiO}_2\text{-v2-AuSeed1-Au1}$ . După cum se observă în figura b29, s-au obținut

conglomerate de NP acoperite integral cu aur. Seed-urile au crescut și s-au sudat între ele în urma reducerii sării de aur. În cazul NPMag@SiO<sub>2</sub>@AuSeed din loturile RME, am aplicat același procedeu, cu modificarea cantităților de reactivi. Astfel, în cazul sintezei FeO-dtc5-SiO<sub>2</sub>-RME2-AuSeed1, am utilizat 2 mL dispersie NP și un amestec de 10 mL sol. H[AuCl<sub>4</sub>] 1 mM cu 2 mL sol. citrat de sodiu 1%. După amestecarea dispersiei cu soluția, s-au adăugat, picătură cu picătură și sub agitare continuă, 0.4 mL sol. hidroxilamină 30 mM. Codul sintezei: FeO-dtc5-SiO<sub>2</sub>-RME2-AuSeed1-Au1.

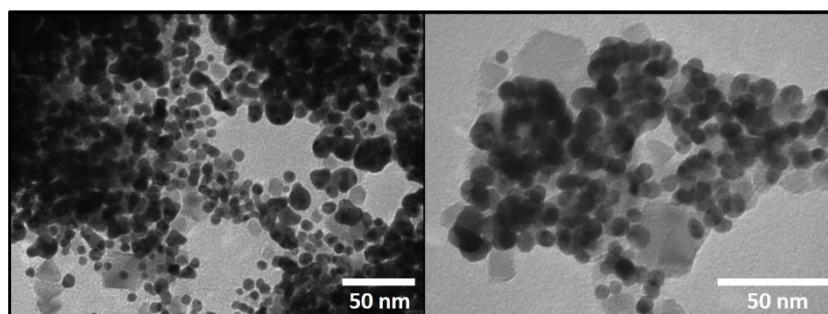


**Fig. b69.** Imagine TEM cu NPMag@SiO<sub>2</sub>@Au din lotul

În cazul sintezei FeO-dtc5-SiO<sub>2</sub>-RME2-AuSeed2, am utilizat 2 mL dispersie NP și un amestec de 10 mL sol. H[AuCl<sub>4</sub>] 0.3 mM cu 2 mL sol. citrat de sodiu 1%. După amestecarea dispersiei cu soluția, s-au adăugat, picătură cu picătură și sub agitare continuă, 0.1 mL sol. hidroxilamină 30 mM. Codul sintezei: FeO-dtc5-SiO<sub>2</sub>-RME2-AuSeed2-Au1. În ambele cazuri, s-au obținut coloizi transparenți, de culoare violetă. Figurile b30 și b31 ilustrează entitățile obținute. Se observă că seed-urile de aur au crescut și, pe alocuri, au fuzionat. Forma NP acoperite cu aur nu este bine definită, ca urmare a faptului că stratul de SiO<sub>2</sub> a suferit alterări după atașarea seed-urilor de Au pe suprafața MagNP@SiO<sub>2</sub>.



**Fig.b30.** Imagini TEM cu NPMag@SiO<sub>2</sub>@Au din lotul FeO-dtc5-SiO<sub>2</sub>-RME2-AuSeed1-Au1.



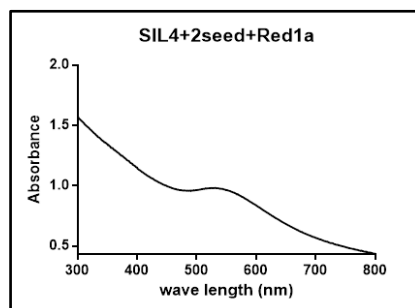
**Fig.b31.** Imagini TEM cu NPMag@SiO<sub>2</sub>@Au din lotul FeO-dtc5-SiO<sub>2</sub>-RME2-AuSeed2-Au1.

S-a continuat sinteza de seed-uri și creșterea acestora la suprafața nanostructurilor, prin adăugare de Au sub forma HAuCl<sub>4</sub> diluat în apă ultra-pură. În același timp, se adaugă citrat de sodiu pentru a ajuta la încorporarea aurului în seed-urile deja existente. Pentru reducerea HAuCl<sub>4</sub> la Au<sup>0</sup> pe suprafața seed-urilor, s-a folosit NH<sub>2</sub>-OH, un agent reducător puternic. Când seed-urile cresc, se observă o colorație roșiatică. Acest fenomen de creștere a seed-urilor se poate observa în spectrele UV-VIS prin prezența unui peak la  $\lambda=500-600$  nm, mai exact la 550 nm, acesta fiind specific nanoparticulelor de Au.

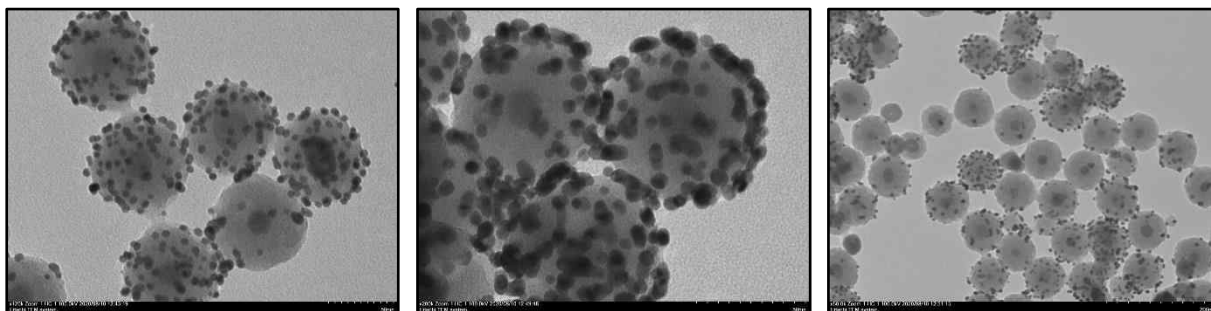
S-au folosit 2 metode.

**Metoda 1** a implicat 5 ml SIL4+2seed, 10 ml HAuCl<sub>4</sub> 0.3 mM, 10 ml citrat de sodiu 1% și 40  $\mu$ l NH<sub>2</sub>-OH 40 mM

Soluția SIL4+2seed se supune ultrasonificării. Într-o sticlă sub agitare ușoară la 150 rpm, se introduc 2 ml citrat de sodiu 1%, 10 ml HAuCl<sub>4</sub> 0.3 mM, 5 ml SIL4+2seed. Soluția finală este ultrasonificată și se continuă agitarea. Peste această soluție se adaugă picătură cu picătură 40  $\mu$ l NH<sub>2</sub>-OH 40 mM și la final se oprește agitarea. Soluția primește o colorație roșiatică la mai puțin de 1 min de la adăugare. La finalul sintezei s-a realizat separarea magnetică, s-a spălat cu 5 ml de apă ultra-pură și s-a efectuat un spectru UV-Vis (Fig. b32) și imagistică TEM.



**Fig. b32.** Spectrul UV-VIS al soluției SIL4 peste care s-a adăugat 20 ml seeduri și s-a realizat astfel o reacție de reducere a aurului.  $A_{max} = 0.982$  la  $\lambda = 531$  nm.



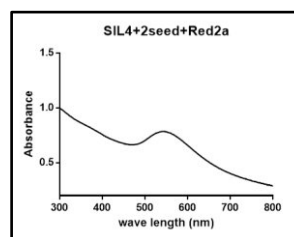
**Fig.b33.** Imagini TEM cu soluția SIL4 pe care s-au depus 20 ml seeduri și s-a realizat o reacție de reducere a aurului

Analizând imaginile TEM se poate observa ușor că în unele cazuri aurul s-a depus și s-a integrat în stratul de  $\text{SiO}_2$  de pe suprafața nanoparticulelor magnetice, iar reducerea a ajutat la creșterea seedurilor sau faptul că seedurile nu s-au depus omogen pe toate particulele, iar aurul adăugat la reacția de reducere s-a atașat la seedurile existente. Astfel, pe unele particule s-a realizat o depunere foarte omogenă, iar particulele au format clustere (aglomerări) – Fig. b33.

Folosind aceeași metodă s-a mai realizat o reducere a soluției Red 1a. Pentru aceasta se pregătesc soluțiile și se adaugă 2 ml citrat de sodiu 1%, 10 ml  $\text{HAuCl}_4$  0.3 mM și apoi cei 5 ml de nanoparticule după sonicare, totul sub agitare ușoară. Se ultrasonicează bine soluția obținută, care mai flocculează când se adaugă în amestecul de aur și citrat. Se adaugă 40  $\mu\text{l}$   $\text{NH}_2\text{-OH}$  40 mM picătură cu picătură și se oprește agitarea. Soluția obținută are o colorație roz-violet, la mai puțin de 1 min de la adăugare. Apoi, se separă magnetic (Fig. b34a) și se spală cu 5 ml apă ultrapură, după care se ultrasonicează în vederea analizei UV-VIS (Fig. b34b) realizării imaginii TEM Red 2a (Figura b34b).

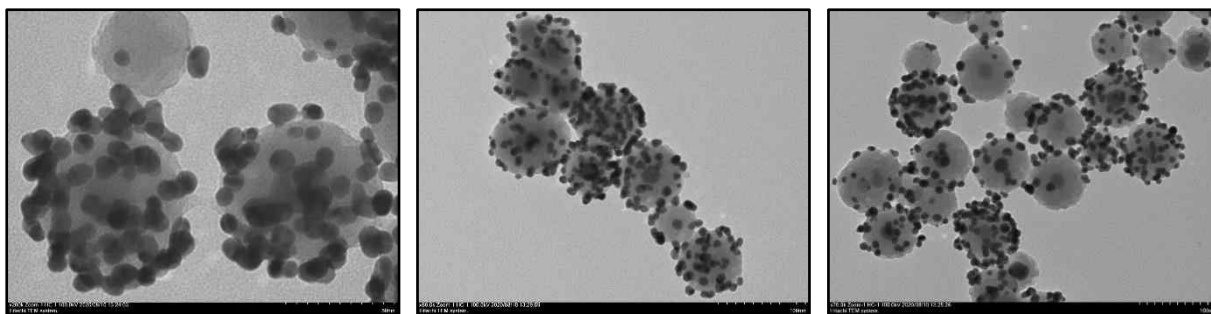


(a)



(b)

**Fig. b34.** (a) Separare magnetică pentru soluția SIL4+2seed-Red-2a. (b) Spectrul UV-VIS pentru soluția SIL4 pe care s-au depus 20 ml seeduri și s-au realizat două reacții de reducere.  $A_{max} = 0.785$  la  $\lambda = 542\text{-}545$  nm.



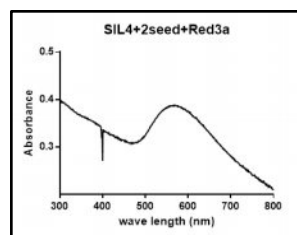
**Fig. b35.** Imagine TEM cu soluția SIL4 pe care s-au depus 20 ml seeduri și s-au realizat două reacții de reducere a aurului

Analiza TEM indică faptul că unele seeduri au crescut destul de mult după a doua reacție de reducere a aurului, însă nu au acoperit omogen toate particulele. Altele, au crescut și au acoperit particulele de aur, uneori mai abundent însă chiar și așa, particulele sunt dispuse în ciorchine sub forma unor clusteri. Ca imagine și rezultat de ansamblu se observă că seedurile au crescut considerabil, însă depunerea de aur nu s-a realizat omogen pe toate nanostructurile din soluția SIL4. Seedurile prin creștere au pătruns în exterior stratul de SiO<sub>2</sub> de la suprafața particulelor magnetice, ceea ce înseamnă ca aurul s-a depus pe o direcție radială, în exteriorul suprafeței.

S-a efectuat încă o reducere după aceeași rețetă. S-a realizat și reducerea a treia, însă la final colorația a fost albăstruie (Fig. b36a) iar la spectrul UV-VIS (Fig. b36b) nu s-a observat o îmbunătățire. Bazat pe aceste rezultate considerăm că nu mai este nevoie să parcurgem acest pas, 2 reacții fiind suficiente.



(a)



(b)

**Fig. b36.** (a) Separare magnetică la soluția SIL4+2seed-Red-3a.  
(b) Spectrul UV-VIS al soluției SIL4 pe care s-au depus 20 ml seeduri și s-a redus aurul de 3x.  $A_{max}=0.388$  la  $\lambda=566-570$  nm.

**Metoda 2:** Pentru această metodă s-au utilizat 5 ml SIL4+2seed, 10 ml HAuCl<sub>4</sub> 0.3 mM, 5 ml citrat de sodiu 2%, 100  $\mu$ l NH<sub>2</sub>-OH 40 mM. Ultrasonicăm SIL4+2seed. Într-o sticlă sub agitare ușoară la 150 rpm, se introduc 5 ml citrat de sodiu 2%, 10 ml HAuCl<sub>4</sub> 0.3 mM, 5 ml SIL4+2seed. Ultrasonicăm soluția finală și continuăm agitarea. Se adaugă picătură cu

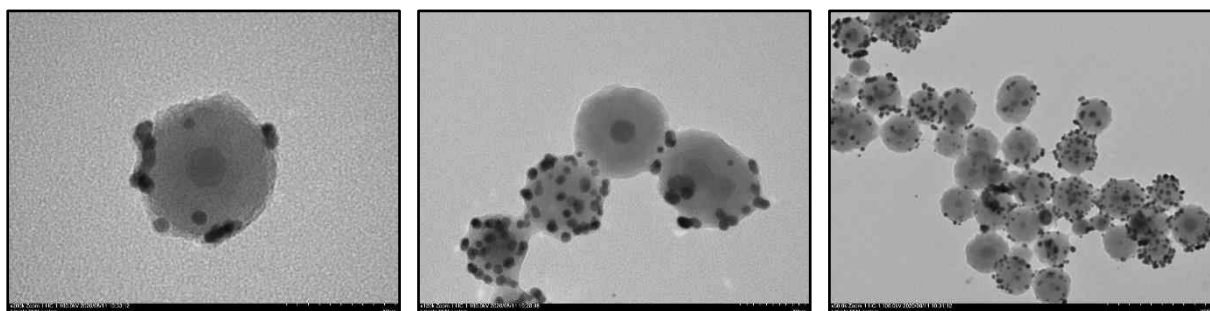
picătură 100  $\mu\text{l}$   $\text{NH}_2\text{-OH}$  40 mM și oprim agitarea. Soluția are o colorație roșiatică mai repede de 1 min de la adăugare.

Se realizează separarea magnetică și se spală cu 5 ml apă ultrapură, și se analizează apoi spectrul UV-VIS (Figura 37).

Ulterior se mai realizează o reducere după aceeași rețetă cu separare magnetică (Fig. b37a), spălare și ultrasonicare, iar apoi se analizează spectrul UV-VIS SIL4+2seed-Red-2b (Fig. 37b) și imagini TEM (Fig. b38).



**Fig. b37.** (a) Separare magnetică soluția SIL4+2seed-Red-2b. (b) Spectrul UV-VIS pentru SIL4 pe care s-au adăugat 20 ml seeduri și s-au realizat 2 reacții de reducere după metoda 2.  $A_{\max}=0.556$  la  $\lambda=533-537$ .

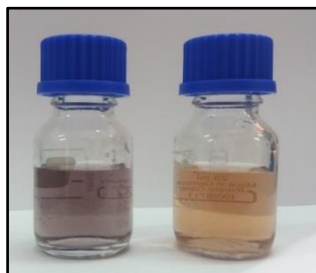


**Fig. b38.** Imagine TEM pentru SIL4+2seed-Red2b

Se observă o distribuție neomogenă a seedurilor pe suprafața nanoparticulelor magnetice și în plus are loc asamblarea acestor particule sub formă de clusteri. Seedurile aflate la suprafața stratului de  $\text{SiO}_2$  au crescut, însă la cele din interior nu se poate observa acest lucru.

Am decis să aplicăm o metodă de funcționalizare cu seeduri bazată pe prepararea unui volum mai mare de soluție de seeduri (40ml = dublu), soluție care se va adăuga tot în două etape prin picurare. Pentru prepararea a 40 ml soluție de seeduri (2 soluții de 20 ml) s-au folosit 36 ml apă ultrapură, 1 ml  $\text{HAuCl}_4$   $10^{-2}\text{M}$ , 1 ml citrat de sodiu  $10^{-2}\text{M}$ , 1 ml  $\text{NaBH}_4$  0.1 M preparat proaspăt. Toate soluțiile se prepară cu apă rece. Astfel se prepară 2 soluții de seeduri de aur în paralel: în 18 ml apă ultrapură sub agitare mecanică se adaugă 500  $\mu\text{l}$  acid

clorauric, 500  $\mu$ l citrat și 500  $\mu$ l borhidruă de sodiu picătură cu picătură, după care se oprește agitarea. In figura b38 se pot observa soluțiile de seeduri.

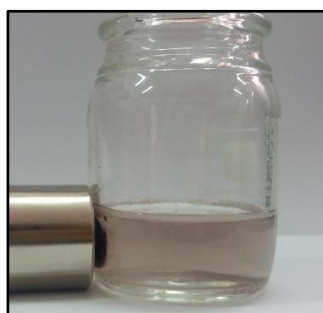


**Fig. b38.** Soluții de seeduri de aur 20 ml fiecare

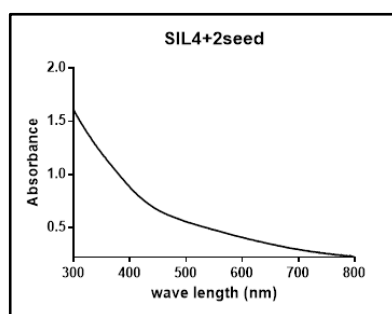
Procedurile și sintezele au continuat în mai multe etape în ideea de a funcționaliza nanoparticulele magnetice cu seed-uri de aur. În continuare prezentăm câteva dintre aceste sinteze:

#### A. Sinteza

Într-o sticlă de 50 ml se adaugă 3 ml soluție SIL4 bine ultrasonicată și 7 ml apă ultrapură. Sticla se introduce în agitatorul mecanic la 150 rpm. Soluțiile de seeduri se adaugă picătură cu picătură și se sonichează până când se observă formarea de agregate și flocoane. După fiecare etapă de adăugare a câte 20 ml se realizează separarea magnetică și spălarea cu 10 ml apă ultra pură. În figurile b39 și b40 se prezintă soluțiile de particule de magnetită după prima, respectiv a doua etapă de adăugare de seeduri. După fiecare etapă s-a studiat spectrul UV-VIS al acestora.



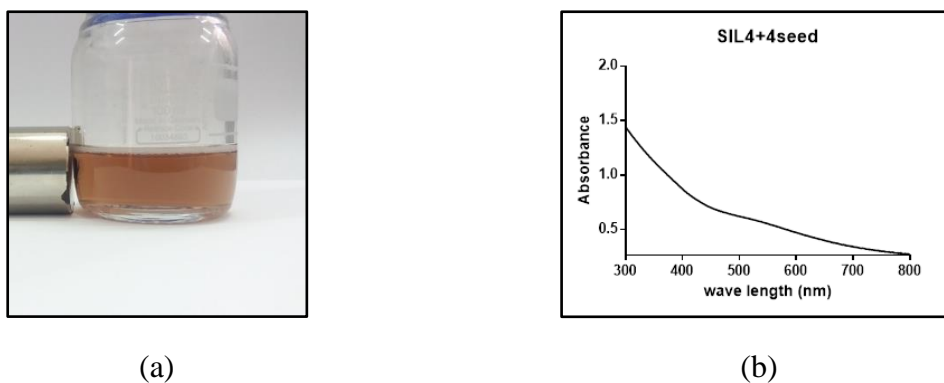
(a)



(b)

**Fig. b39.** (a) Separare magnetică după prima etapă de funcționalizare cu seeduri. (b) Spectrul UV-VIS pentru SIL4 cu 20 ml seeduri

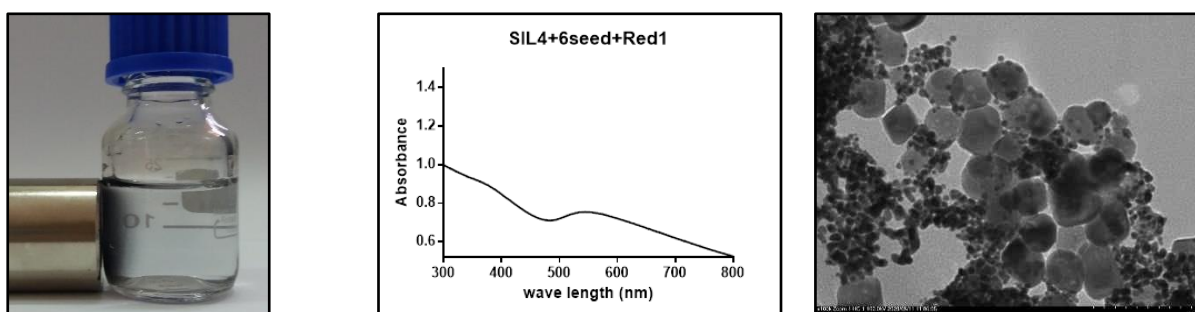




**Fig. b40.** (a) Separare magnetică după etapa 2 de adăugare de seeduri. (b) Spectrul UV-VIS pentru SIL4 cu 40 ml seeduri

### B. Creșterea seed-urilor de aur și reducerea $\text{Au}^{3+}$ prin adaos de hidroxil-amină

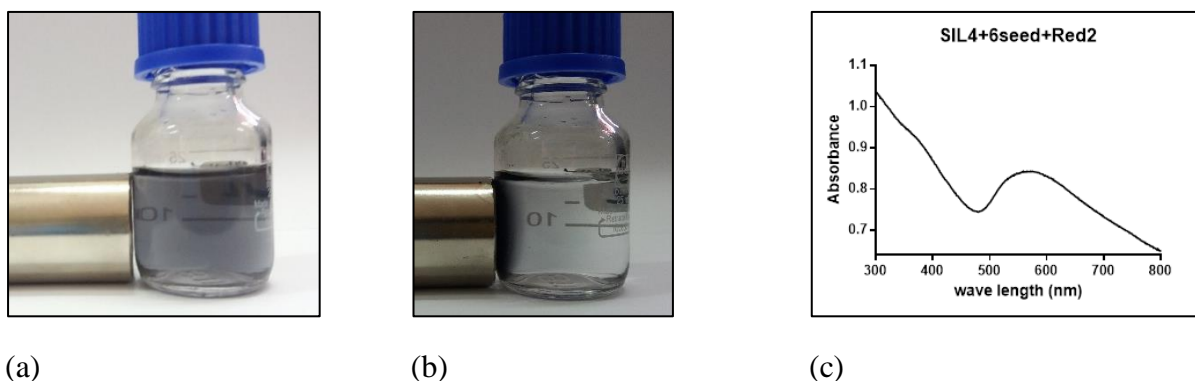
Un alt procedeu de sinteză utilizat a fost creșterea seed-urilor de aur și reducerea  $\text{Au}^{3+}$  prin adaos de hidroxil-amină. Pentru aceasta s-a folosit o concentrație mai mare de citrat de sodiu, respectiv 4%, din care s-au luat 3 ml pentru reacția de creștere. Pentru sinteză s-au utilizat, apă ultrapură, 10 ml Citrat de sodiu 4%, 10 ml  $\text{HAuCl}_4$  0.3 mM și 5 ml  $\text{NH}_2\text{-OH}$ . Soluția SIL4+6seed s-a adus la volumul de 5ml prin adaos de apă ultrapură și s-a supus agitării mecanice ușoare la 150-300 rpm. S-au adăugat cei 3 ml citrat de sodiu 4% și s-a lasat la agitat 5 min. Când s-au format flocoane, soluția s-a ultrasonicat bine și s-a continuat agitarea. După 5 minute s-a adăugat 10 ml clorhidrua de aur și s-a continuat agitarea timp de 5 minute. La acest pas nu s-au mai observat flocoane sau agregate. Se adaugă ulterior 100 ul hidroxil-amină prin picurare, soluția devenind violet deschis și se lasă la agitat 5 minute. În figura b41 se poate observa separarea magnetică a particulelor după prima reducere (a) apoi spectrul UV-VIS (b) și imagininea TEM (c). Se observă că particulele au fost atrase de un magnet.



**Fig. b41.** (a) Separare magnetică a particulelor magnetice după prima reacție de reducere. (b) Spectrul UV-VIS pentru SIL4 cu 60 ml seeduri și o reacție de reducere.  $A_{\max} = 0.755$  la  $\lambda = 544\text{-}545$  nm. (c) Imagine TEM pentru SIL4 cu 60 ml seeduri și o reacție de reducere

În spectrul UV-Vis se observă prezența unui peak la 540 - 550 nm, specific seedurilor de aur iar din imaginea TEM se observă că seedurile au crescut mult și particulele au agregat foarte puternic, din unele separându-se seed-urile de aur.

În continuare s-a mai realizat o reducere după aceeași rețetă, cu sonicare când a fost necesar. La final soluția s-a separat magnetic (Fig. b42a). După 10 minute soluția a devenit limpede (Figura b42b) și particulele au fost spălate pentru realizarea unui spectru UV-VIS (Fig. b42c).



**Fig.b42.** (a) Soluția SIL4+6seed redusă de 2 ori și supusă separării magnetice. (b) Separarea magnetică spre final pentru SIL4+6seed-Red2. (c) Spectrul UV-VIS pentru SIL4 cu 60 ml seeduri și două reacții de reducere.  $A_{max} = 0.843$  la  $\lambda = 559-575$  nm.

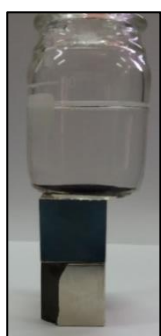
### C. Sinteză

O altă strategie s-a bazat pe pregătirea unui volum de 60 ml soluție de seeduri și depunerea acestora deodată în soluția de particule SIL4. Pentru realizarea acestui obiectiv s-au folosit 60 ml apă ultrapură rece, 1.5 ml  $\text{HAuCl}_4$   $10^{-2}$  M, 1.5 ml Citrat de sodiu  $10^{-2}$  M, 1.5 ml  $\text{NaBH}_4$  0.1M. Sinteza seedurilor s-a realizat cu ajutorul agitatorului magnetic. Astfel, soluțiile de aur, citrat și borhidură s-au adus la concentrațiile necesare cu apă ultrapură rece. Într-un recipient de sticlă de 100 ml s-au introdus 54 ml apă ultrapură și apoi acesta s-a plasat pe un agitator magnetic setat la viteza de 300 rpm. S-a adăugat soluția de aur și cea de citrat, iar soluția de borhidură a fost adăugată picătură cu picătură, apoi s-a oprit agitarea. Soluția de seeduri a prezentat o nuanță roz deschis (Fig. b43).

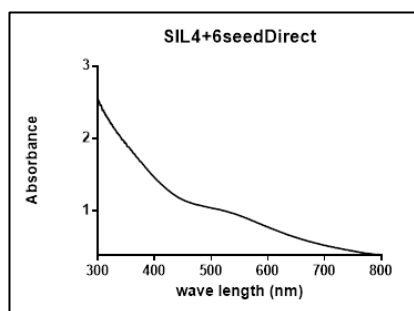


**Fig.b43.** Soluția de seeduri proaspăt sintetizate

După sinteză, 4ml din soluția SIL4 s-au transferat într-un recipient de sticlă mai mare și s-a supus agitării mecanice ușoare 150-300 rpm. Cu ajutorul unei pipete de 10 ml s-au adăugat prin picurare cei 60 ml de seeduri, după care particulele s-au separat magnetic și s-a efectuat spectrul UV-Vis (Fig. b44).



(a)



(b)

**Fig. b44.** (a) Separare magnetică a particulelor magnetice  $Fe_3O_4@SiO_2$  funcționalizate cu seeduri de aur. (b) Spectrul UV-VIS pentru SIL4 cu 60 ml seeduri adăugate direct

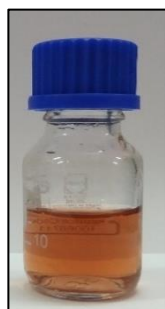
#### D. Prepararea unei soluții de seeduri concentrate de 3x în volum de 20 ml

S-au sintetizat seedurile folosind două rețete

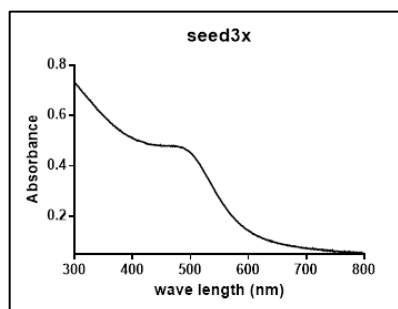
D.1. Rețeta 1. Toate soluțiile din rețeta clasică, au fost de 3x mai concentrate în apă ultrapură rece. S-a observat că nu este necesară concentrarea soluției de borhidură deoarece după adăugarea a 500  $\mu$ l din aceasta, soluția a prins o colorație violet închis, specifică nanoparticulelor mari.

D.2. Rețeta 2. A doua rețetă a constat în folosirea a 18 ml apă ultrapură, 500  $\mu$ l  $H AuCl_4$   $3 \times 10^{-2}$  M, 500  $\mu$ l citrat de sodiu  $3 \times 10^{-2}$  M și 100  $\mu$ l  $NaBH_4$  0.1 M

Soluțiile s-au preparat cu apă ultrapură rece. Sinteza seedurilor s-a realizat cu agitatorul magnetic la 150-300 rpm. După adăugarea clorhidrului de aur și a citratului de sodiu, borhidrura se adaugă picătură cu picătură, până se observă colorația portocalie, specific seedurilor (Fig. b45a).



(a)



(b)

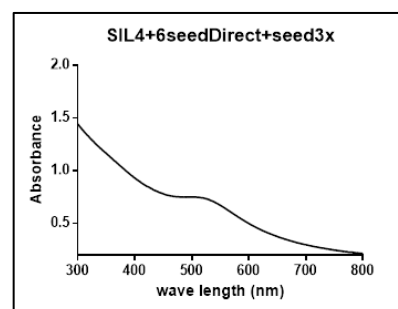
**Fig. b45.** (a) Seeduri concentrate de 3x. (b) Spectrul UV-VIS pentru soluția de seeduri de 3x concentrate

#### E. Funcționalizarea SIL4+6seed Direct cu seeduri concentrate 3×

După separarea magnetică, 10 ml de seeduri concentrate concentrate de 3 ori, s-au adăugat picurat sub agitare mecanică a soluției de particule magentice SIL4+6seed. Soluția s-a separat magnetic apoi s-a studiat spectrul UV-VIS. După 24 de ore, particulele au fost atrase de magnet, supernatantul prezentându-se transparent. Acestea s-au spălat cu apă ultrapură și colorația soluției a fost roșiatic brun închis (Fig. b46). Această soluție s-a observat că flocculează destul de repede și necesită sonicare mai deasă.

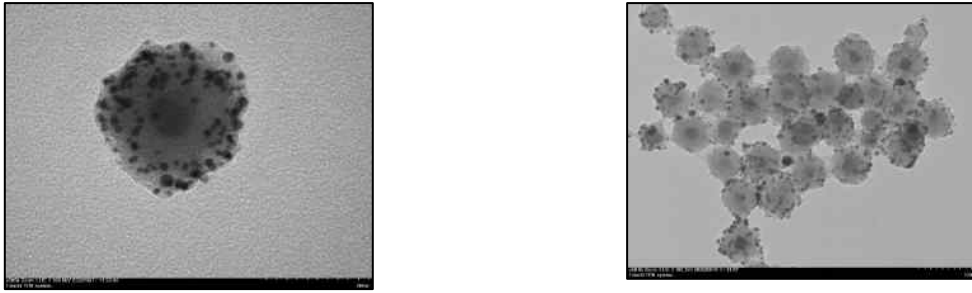


(a)



(b)

**Fig. b46.** (a) Soluția SIL4+6seed+seed3x după separarea magnetică și spălare. (b) Spectrul UV-VIS pentru SIL4 cu 60 ml seeduri și 10 ml seeduri de 3x concentrate



**Figur b47.** Imagine TEM pentru SIL4 cu 60 ml seeduri și 10 ml seeduri de 3x concentrate

Analizând imaginile TEM (Fig. b47) se observă că aceste seeduri de 3× concentrate au dimensiunile mai mici față de seedurile neconcentrate. Acest lucru ar putea să avantajeze etapele de depunere suplimentară cu aur. Totuși se observă că nanoparticulele de aur sunt dispuse în conformație de clusteri, iar depunerea aurului nu a fost uniformă.

#### F. Reducere $Au^{3+}$ și creștere seeduri

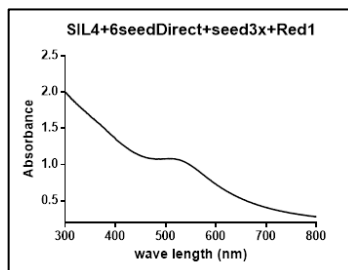
Soluția necesară s-a concentrat la 5 ml utilizând apă ultra-pură și s-a realizat reacția de reducere a  $HAuCl_4$  și creștere a seed-urilor. Într-o sticlă s-au introdus 5 ml SIL4+6seed Direct + seed3× la agitatorul mecanic. S-au adăugat apoi 3 ml citrat de sodiu 4% și s-a continuat agitarea 5 minute. S-a adăugat 10 ml  $HAuCl_4$  0.3 M și soluția s-a agitat 5 minute. Apoi, s-a adăugat 0.1 ml hidroxil-amină 40 mM și s-a continuat agitarea pentru încă 5 minute. S-au observat flocoane la unele etape și soluția s-a sonicat mai des. La final soluția de culoare, roz-roșiatic pal s-a separat magnetic și s-a spălat cu apă ultrapură. Ulterior s-a studiat spectrul UV-Vis și morfologia nanoparticulele prin TEM (Fig. b48).

Prezența peak-ului larg în spectrul UV-Vis la 500 nm indică faptul că seedurile existente au crescut. Din imaginea TEM se observă dispunerea particulelor în clustere iar acoperirea cu seeduri nu este omogenă.

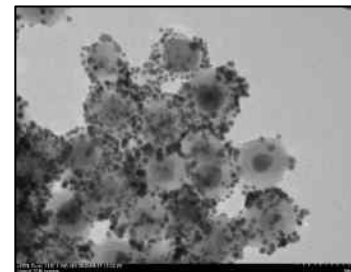
S-a încercat pregătirea unei soluții de seeduri 6x concentrate și funcționalizarea particulelor magnetice SIL6.



(a)



(b)



(c)

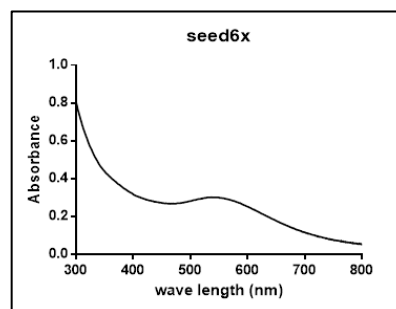
**Fig. b48.** (a) Separarea magnetică după reducere. (b) Spectrul UV-VIS pentru SIL4 cu 60 ml seeduri și 10 ml seeduri de 3x concentrate după reacția de reducere a aurului.  $A_{max}=1.08$  la  $\lambda=510$  nm. (c) Imagine TEM cu SIL4 cu 60 ml seeduri și 10 ml seeduri de 3x concentrate după reacția de reducere a aurului

### G. Pregătirea unor seeduri concentrate 6× în 20 ml

S-a încercat sinteza unei soluții de seeduri de 6 ori mai concentrată. Astfel, În 18 ml apă ultrapură rece sub agitare magnetică s-au adăugat 500 μl acid clorauric  $6 \times 10^{-2}$  M, 500 μl citrate de sodiu  $6 \times 10^{-2}$  M, iar apoi prin picurare aproximativ 15 μl borhidruură de sodiu. Soluția a căpătat o culoare roz pal (Fig. b49).



(a)



(b)

**Fig. b49.** (a) Soluție de seeduri 6x concentrate. (b) Spectrul UV-VIS pentru soluția de seeduri de 6x concentrate.  $A_{max}=0.302$  la  $\lambda=537$  nm.

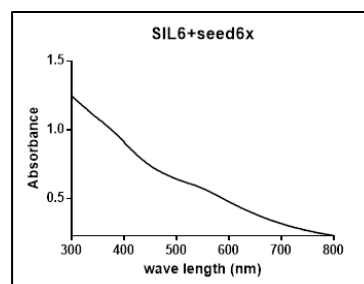
După Haiss et al. 2007, seedurile au diametrul 62 nm, însă credem că sunt aglomerate în clustere, concentrația fiind de  $2.84 \times 10^{-10}$  particule/ml.

### H. Funcționalizarea particulelor magnetice cu seeduri 6x

În această etapă s-au folosit particulele magnetice din soluția SIL6. Într-o sticlă s-au introdus 4.5 ml SIL6 pentru depunerea de aur sub agitare mecanică ușoară. Astfel, s-au adăugat 20 ml seeduri 6x picătură cu picătură și apoi s-a separat magnetic. După separare particulele s-au spălat cu 10 ml apă ultrapură și s-au sonicat. Soluția finală SIL6+seed6x a avut colorația brun închis (Fig. b50). Soluția rezultată floculează destul de repede și necesită sonicare îndelungată pentru stabilizare



(a)

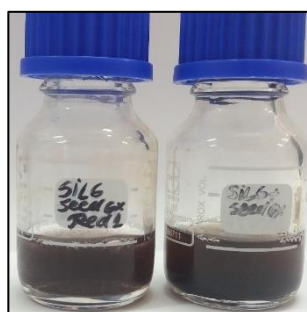


(b)

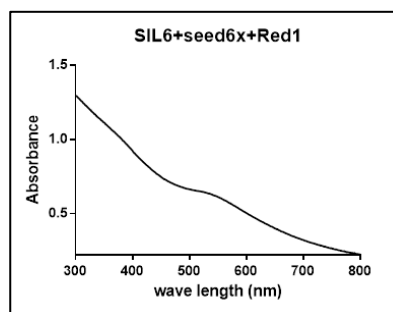
**Fig. b50.** (a) Soluția SIL6 funcționalizată cu 20 ml seeduri de 6x concentrate. (b) Spectrul UV-VIS pentru SIL6 funcționalizată cu 20 ml seeduri de 6x concentrate

## I. Reacții de creștere a seedurilor și reducere $\text{Au}^{3+}$ cu hidroxil-amină

Aceste reacții s-au realizat sub agitare mecanică ușoară, timp de 5 minute după adăugarea fiecărei soluții, cu sonicare la observarea apariției agregatelor. Într-o sticlă s-au introdus 5 ml SIL6+seed6x la agitatorul mecanic. S-au adăugat apoi 3 ml citrat de sodiu 4% și s-a continuat agitarea 5 minute. S-a adăugat 10 ml  $\text{HAuCl}_4$  0.3 M și soluția s-a agitat 5 minute. Apoi, s-a adăugat 0.1 ml hidroxil-amină 40 mM și s-a continuat agitarea pentru încă 5 minute. Soluția a prezentat o culoare maronie închisă (Fig. b51a). După separarea magnetică și spălare s-a realizat spectrul UV-VIS (Fig. b51b).



(a)



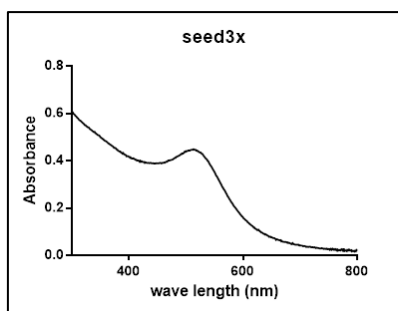
(b)

**Fig. b51.** (a) Soluția SIL6+seed6x după reacția de reducere în stânga, soluția SIL6+seed6x înainte de reducere în dreapta. (b) Spectrul UV-VIS pentru SIL6+seed6x după reacția de reducere

## J. Sinteză. Pregătirea unui volum de 40 ml seeduri de 3x concentrate

Am utilizat următorii precursori pentru sinteză: 40 ml apă ultrapură, 1 ml  $\text{HAuCl}_4$   $3 \times 10^{-2} \text{M}$ , 1 ml citrat de sodiu  $3 \times 10^{-2} \text{M}$ , 100  $\mu\text{l}$   $\text{NaBH}_4$  0.1 M.

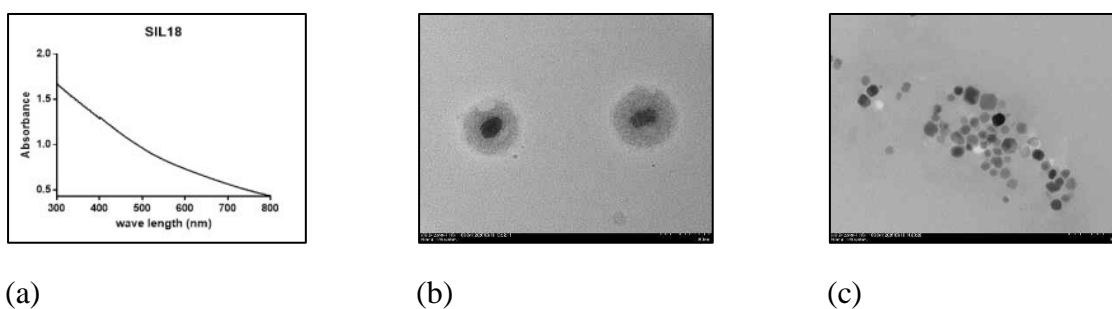
Toate soluțiile se pregătesc cu apă rece, iar sinteza seedurilor se face sub agitare magnetică. În 40 ml apă ultrapură se adaugă aurul și citratul, iar ulterior borhidrura prin picurare. În acest caz, a fost nevoie de doar 50  $\mu\text{l}$  borhidrură, pentru ca soluția să devină roșiatic aprins, foarte concentrată. În cuva spectrofotometrului, colorația a fost roz deschis. S-a efectuat spectrul UV-Vis (Fig. b52) și conform articolului Haiss et al. 2007, diametrul seedurilor este cuprins între 3-4 nm, iar concentrația este de  $6.08 \times 10^{-3}$  particule/ml într-un volum de 40 ml.



**Fig. b52.** Spectrul UV-VIS al soluției de seeduri concentrate  $3\times$ .  $A_{max} = 0.448$  la  $\lambda = 513$  nm

### K. Funcționalizare nanoparticulelor magnetice silanizate cu aur

S-au efectuat măsurători UV-Vis și TEM ale unui lot de nanoparticule silenizate (SIL18) (Fig. b53)



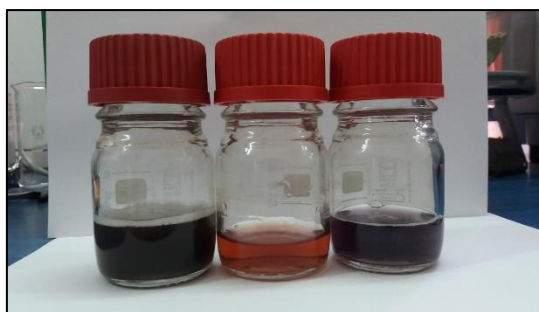
**Fig. b53.** (a) Spectrul UV-VIS al nanoparticulelor silenizate din proba SIL18. (b,c) Imagini TEM cu proba SIL18

Se poate observa că silenizarea nu a fost omogenă și foarte puține particule au fost acoperite cu stratul de  $\text{SiO}_2$ .

Ulterior pornind de la soluția SIL18 s-au obținut alte 2 soluții:

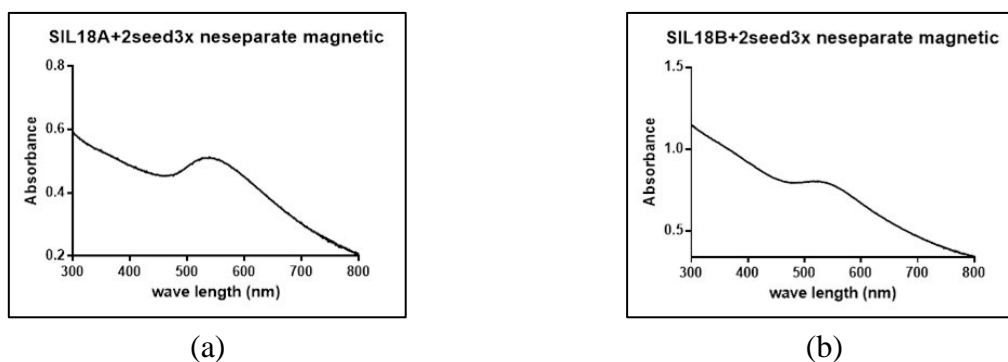
- **Prepararea SIL18A:** 3 ml din soluția SIL18 s-au diluat în 7 ml apă ultrapură pentru a ajunge la un volum de 10 ml, care s-au introdus într-o sticlă. Sub agitare mecanică ușoară, s-au adăugat 20 ml seeduri 3x proaspete picătură cu picătură, iar colorația a devenit brun violet închis
- **Preparare SIL18B:** 10 ml din soluția SIL18 s-au supus agitării mecanice ușoare, apoi s-au adăugat 20 ml seeduri 3x picătură cu picătură. Soluția a devenit brun violet închis (Fig. b54)





**Fig. b54.** Soluția SIL18 A + seed 3x, soluția de seeduri 3x, soluția SIL 18 B +seed 3x (de la stânga la dreapta)

Pentru ambele soluții s-au realizat spectre UV-VIS înainte de separarea magnetică (Fig. b55).



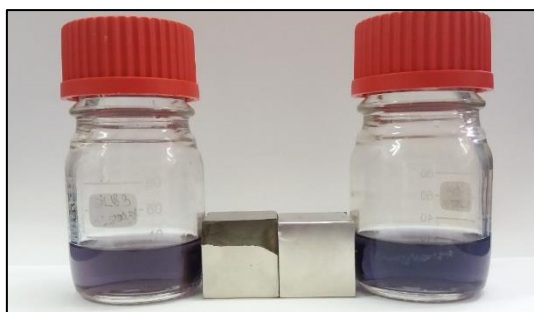
**Fig. b55.** (a) Spectrul UV-VIS al nanoparticulelor SIL18A pe care s-au deșus 20 ml seeduri de 3x concentrate.  $A_{max} = 0.513$  la  $\lambda = 539$  nm. (b) Spectrul UV-VIS al nanoparticulelor SIL18B pe care s-au deșus 20 ml seeduri de 3x concentrate.  $A_{max} = 0.805$  la  $\lambda = 517$  nm

Următorul pas a fost supunerea ambelor soluții separării magnetice (Fig. b56).



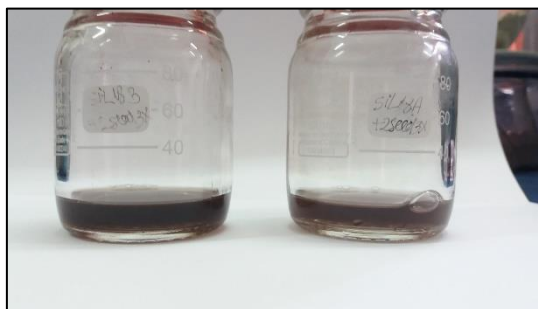
**Fig. b56.** Separare magnetică timp de 12 ore, după adăugarea seedurilor 3x

După 24h de la separarea magnetică, supernatantul s-a modificat, el fiind mai diluat, ceea ce înseamnă că particulele magnetice au migrat spre magnet, iar cele nemagnetice au rămas în soluție (Fig. b57).



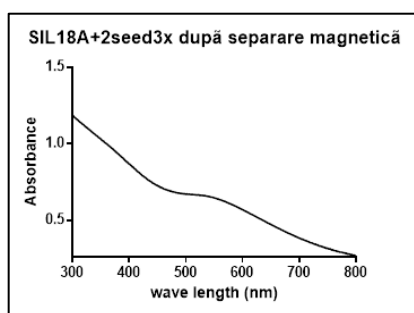
**Fig. b57.** Soluțiile A și B după separarea magnetică la 24h înainte de spălare (stânga – SIL18 B + 2seed3x, dreapta – SIL18 A + 2seed3x)

Se poate observa că supernatantul soluției A (mai diluată) este albastrui, iar supernatantul soluției B (mai concentrată) este violet. După spălare cu apă utrapură, soluțiile și-au schimbat colorația în maro (Fig. b58) iar soluția B este de un brun maroniu închis, iar soluția A este un brun roșiatic.

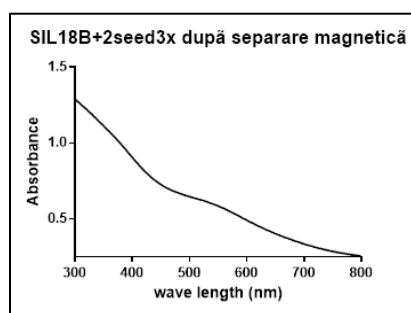


**Fig. b58.** Soluțiile A și B după spălare (stânga – SIL18 B + 2seed3x, dreapta – SIL18 A + 2seed3x)

După finalizarea acestor sinteze s-au realizat spectrele UV-VIS și imagini TEM pentru fiecare soluție (Fig. b59, b60 și b61).

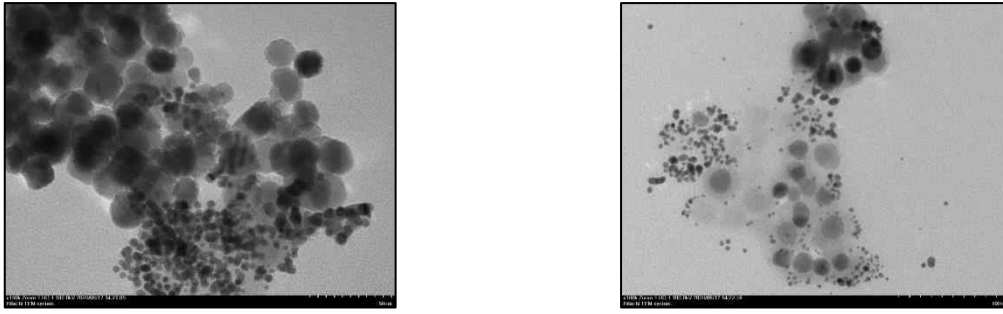


(a)



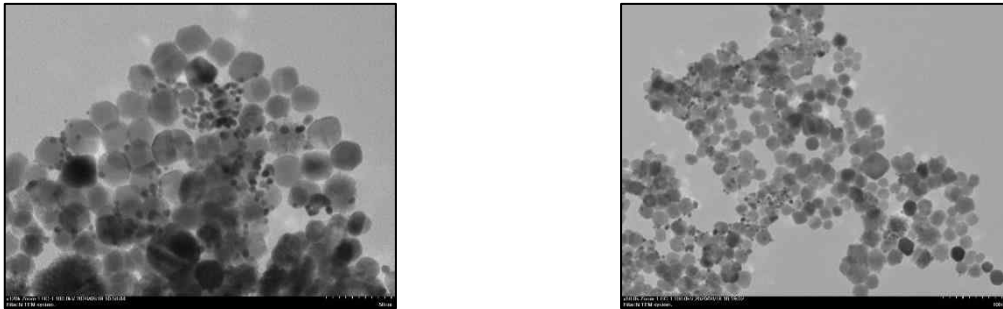
(b)

**Fig. b59** (a) Spectrul UV-VIS al nanoparticulelor SIL18A pe care s-au depus 20 ml seeduri de 3x concentrate după separarea magnetică. (b) Spectrul UV-VIS al nanoparticulelor SIL18B pe care s-au depus 20 ml seeduri de 3x concentrate după separarea magnetică



*Fig. b60. Imagini TEM cu SIL18A pe care s-au adăugat 20 ml seeduri de 3×*

Conform imaginii TEM se observă că seedurile nu s-au depus omogen pe stratul de SiO<sub>2</sub> de la suprafața nanoparticulelor magentice. Particulele se așează în clustere de tip ciorchine, la fel și seedurile de aur. Este posibil ca procesul de silanizare în acest caz să fie nereușit.



*Fig. b61. Imagini TEM cu SIL18B pe care s-au adăugat 20 ml seeduri de 3×*

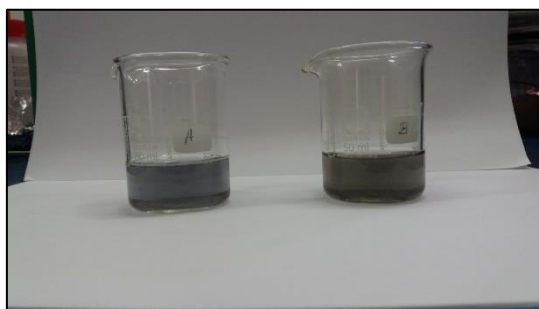
Și în cazul probei SIL18B, seedurile de aur nu s-au dispus omogen pe suprafețele SiO<sub>2</sub>.

S-au studiat reacțiile de creștere a seedurilor, depuse prin reducerea H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub>.

#### **L. Creșterea seedurilor prin reducerea Au<sup>3+</sup> la suprafață**

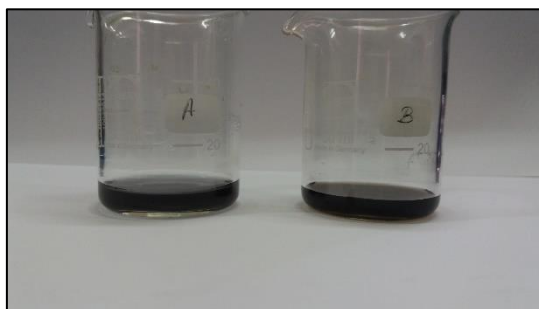
Pentru prima reacție, în vederea creșterii și reducerii Au<sup>3+</sup>, s-a folosit 5 ml SIL18 + 2seed3x, 3 ml citrat de sodiu 4%, 10 ml acid clorauric 0.3 mM, 0.1 ml hidroxil-amină 40 mM. Toți reactivii s-au adăugat treptat la distanță de 5 minute prin picurare. 5 ml din soluțiile SIL18 A + 2seed3x și SIL18 B + 2seed3x au fost introduse în 2 pahare berzelius și au fost supuse agitării mecanice ușoare la 150-300 rpm. S-a adăugat în fiecare câte 3 ml citrat de sodiu 4% și agitarea a continuat 5 minute. La observarea formării de agregate soluțiile s-au sonicat bine și s-a continuat agitarea mecanică. În fiecare soluție s-au adăugat 10 ml acid

clorauric 0.3 mM sub agitare mecanică timp de 5 minute. Apoi s-au adăugat 100  $\mu$ l hidroxilamină 40 mM picătură cu picătură. S-a observat modificarea culorii fiecărei soluții după cum urmează: soluția A a devenit albastruie, iar soluția B maro deschis și în final gri (Fig. b62).



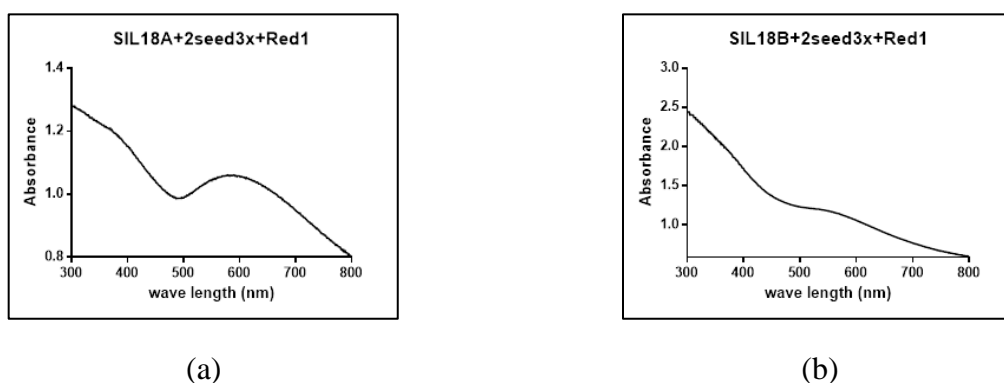
**Fig. b62.** Soluțiile A și B după prima reacție de creștere a seedurilor prin reacția de reducere

Soluțiile rezultate s-au separat magnetic și s-au spălat cu 5 ml apă ultrapură (Fig. b63).

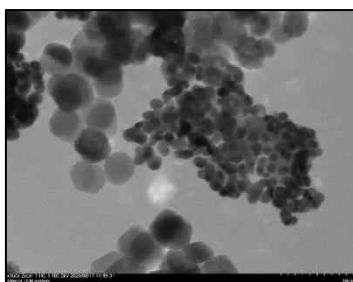


**Fig. b63.** Soluțiile A și B după separarea magnetică și spălarea cu apă ultrapură

Au fost studiate spectrele UV-VIS pentru fiecare soluție (Fig. b64). În Figura b65 se pot observa imagini TEM a probei SIL18A, în urma reacției de reducere.



**Fig. b64.** Spectrul UV-VIS al soluției SIL18 A + 2seed3x -Red 1.  $A_{max} = 1.061$  la  $\lambda = 579-590$  nm. (b) Spectrul UV-VIS al soluției SIL18 B + 2seed3x -Red 1.



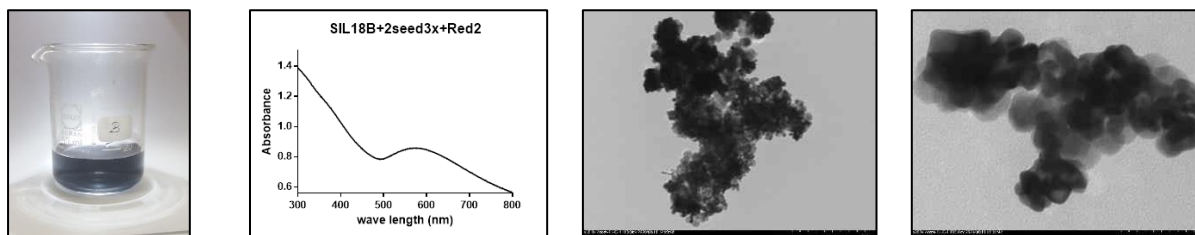
**Fig. b65.** Imagine TEM cu proba SIL18 A + 2seed3x -Red 1

Din imaginea TEM se observă creșterea seedurilor adunate în cluster și depunerea neomogenă a acestora pe particulele magnetice.

În cazul soluției B s-a mai realizat o reacție de reducere datorită spectrului UV-VIS care nu prezenta absorbanta maximă în zona 500-600 nm a lungimilor de undă.

De această dată s-a folosit următoarea rețetă: 5ml SIL18 B + 2seed3x – Red1, 3 ml citrat de sodiu 4%, 10 ml acid clorauric 0.8 mM, 0.1 ml hidroxil-amină 40 mM

Pașii de lucru au fost realizați în același mod, fiecare reactiv s-a adăugat la distanță de 5 minute sub agitare continuă și prin picurare. Soluția a prezentat o colorație albastruie, înainte de separarea magnetică (Fig. b66).



(a)

(b)

(c)

(d)

**Fig. b66.** (a) Soluția SIL18 B + 2seed3x redusă de 2x. (b) Spectrul UV-VIS al soluției SIL18B+2seed3x+Red2.  $A_{max} = 0.858$  la  $\lambda = 573-574$  nm. (c), (d) Imagini TEM cu SIL18B+2seed3x+Red2

După separarea magnetică, soluția a rămas albastru închis și s-a realizat un spectru UV-VIS. De această dată se observă prezența unui maxim larg la 500-700 nm. Se pare că în acest caz avem de-a face cu o creștere accelerată a seedurilor și acoperirea aproape integrală a clusterelor de particule magnetice.

**b. Sinteza de nanostructuri multifuncționale magneto-plasmonice hibride bazate pe un nucleu alcătuit din magneto-lipozomi cationici decorați cu nanoparticule plasmonice de aur anionice.**

În ultimii 30 de ani, comunitatea științifică a conferit lipozomilor - care reprezintă vezicule artificiale constând dintr-un bistrat fosfolipidic - o foarte mare atenție ca urmare a calității excepționale a acestora de vehicule de administrare a substanțelor medicamentoase <sup>7</sup>. Datorită contribuțiilor mai multor grupuri de cercetători, extinse pe parcursul a mai multor zeci de ani, lipozomii au devenit primii nano-transportatori care au reușit să intre pe piața farmaceutică - Doxil / Caelix fiind cel mai relevant exemplu <sup>8</sup>. Lipozomii din prima generație au fost folosiți ca simpli nano-transportatori de medicament - molecula terapeutic activă fiind încărcată în lumenul lipozomal sau cavitatea lipozomală. A doua generație de lipozomi a fost dezvoltată pentru a viza un situs terapeutic specific prin intermediul anticorpilor sau a altor biomolecule atașate de bistratul fosfolipidic. Cea de-a treia generație de lipozomi a fost proiectată pentru a îndeplini funcții mai complexe, cum ar fi descărcarea controlată în timp a veziculelor încărcate cu agent terapeutic de-a lungul diferitelor bariere biologice. Ultima generație include așa-numiții lipozomi sensibili la diferiți stimuli <sup>9</sup>, prin aceștia numărându-se magneto-lipozomii (ML) – o combinație între lipozomi și NPMag încapsulate <sup>10</sup>. Amplasarea spațială a NPMag în lipozomi definește cele două tipuri de ML. Astfel NPMag hidrofile pot fi încapsulate în lumenul apos al lipozomilor împreună cu medicamentul <sup>11</sup> sau NPMag hidrofobe pot fi încorporate în bistratul fosfolipidic, în timp ce medicamentul este încă încapsulat în interiorul lipozomilor <sup>12</sup>. Avantajul prezentat de ML în aplicații biomedicale este unul major, deoarece NPMag încapsulate joacă un triplu rol: sub un gradient de câmp magnetic extern ML pot fi direcționați spre site-ul de interes, iar sub acțiunea unui câmp magnetic alternativ extern membrana lipozomală este destabilizată permițând eliberarea medicamentelor și în același timp căldura generată prin hipertermie magnetică sensibilizează zona la acțiunea terapeutică a medicamentului.

În cadrul proiectului ne-am propus să extindem funcționalitatea acestor ML prin adăugarea unei funcții plasmonice suplimentare conferite de NP de aur. Elementul central în elaborarea noii clase de nanostructuri hibride îl constituie lipozomii cationici - prezintă o sarcină pozitivă distribuită pe suprafața externă a bistratului fosfolipidic -, pe care grupul nostru de cercetare a reușit să-i dezvolte prin utilizarea în procesul de sinteză a două clase de

---

<sup>7</sup> R. R. Sawant and V. P. Torchilin, Liposomes as 'smart' pharmaceutical nanocarriers. *Soft Matter*, 6, 4026 – 4044, 2010 .

<sup>8</sup> L. Zhang et al. Nanoparticles in medicine: therapeutic applications and developments. *Clin. Pharmacol. Ther* 83, 761 – 769, 2008.

<sup>9</sup> Yatvin, M. B. et al. Design of liposomes for enhanced local release of drugs by hyperthermia *Science* 202, 1290 – 1293, 1978.

<sup>10</sup> C. A. Monnier. Magnetoliposomes: opportunities and challenges. *Eur. J. Nanomed.* 6(4), 201 – 215, 2014.

<sup>11</sup> G. Bealle et al. Ultra Magnetic Liposomes for MR Imaging, Targeting, and Hyperthermia, *Langmuir* 28, 11834 – 11842, 2012.

<sup>12</sup> C. Bonnaud et al. Insertion of Nanoparticle Clusters into Vesicle Bilayers, *ACS Nano*, 84, 3451 – 3460, 2014.

fosfolipide: DOTAP și SPC. Mai mult decât atât, grupul nostru de cercetare deține o bogată experiență în elaborare de nanoparticule (NP) de aur cu proprietăți plasmonice net îmbunătățite. Dintre acestea amintim NP de aur acoperite cu polietilen glicol (PEG) cu diferite mase moleculare, care le conferă acestora o sarcină negativă pe suprafață<sup>13</sup>. Prin intermediul interacțiunii electrostatice dintre lipozomii cationici și NP de aur PEGylate încărcate negativ, s-a reușit formarea de structuri veziculare hibride în care NP de aur decorează suprafața exterioară sferică a lipozomilor<sup>14</sup>. După cum am prezentat mai sus, descompunerea termică a precursorilor magnetici în solvenți organici conduce la formarea de NPMag hidrofobe, caracteristică necesară pentru a le introduce în bistratul bilipidic, care prin natura sa este unul hidrofob. Prin ajustarea raportului molar între precursorul magnetic, agenții de funcționalizare (*capping*) și solventul se pot obține NPMag monodisperse cu o anumită formă și dimensiune<sup>15</sup>. Utilizând această metodă de sinteză am reușit elaborare de NPMag de oxid de fier având o formă sferică și un diametru mediu în jurul valorii de 12 nm, condiție absolut necesară în vederea înglobării ulterioare a acestora în bistratul fosfolipidic al lipozomilor.

În cadrul studiului de față, am realizat sinteza unor magnetolipozomi cationici conținând cantități variabile de NPMag și decorarea acestora cu nanoparticule de aur PEGylate.

**Sinteza magnetolipozomilor** s-a realizat conform următorului protocol: S-au preparat 4 soluții cloroformice prin dizolvarea a 14.2 mg DOTAP și 34.8 mg SPC în 30 mL cloroform. În aceste soluții s-au adăugat 10/50/250/1000 μL dispersie NPMag în hexan. Dispersia astfel obținută a fost introdusă în balonul unui rotavapor în scopul îndepărtării complete a solventului, proces care a decurs cu formarea unui film lipidic care a înglobat NPMag adăugate. În continuare, s-au adăugat 20 mL apă ultrapură în balon, pentru hidratarea stratului lipidic și s-a realizat o agitare manuală ușoară a balonului pentru favorizarea acestui proces. S-a obținut o dispersie opalescentă, care a fost supusă ultrasonificării timp de 30 min, timp în care s-a clarificat (culoarea acesteia a fost cafenie, cu intensitate proporțională cu cantitatea de NPMag din sistem). Folosind spectroscopia Raman (Fig. b67) am identificat peak-urile vibraționale atribuite lipidelor. Aceste atribuiri sunt cuprinse în Tabelul b1

---

<sup>13</sup> R. Stiuțiu et al. One step synthesis of PEGylated gold nanoparticles with tunable surface charge. *Journal of Nanomaterials*, 2013.

<sup>14</sup> R. Stiuțiu et al. A new class of pegylated plasmonic liposomes: Synthesis and characterization. *Journal of Colloid and Interface Science*, 437, 17–23, 2015.

<sup>15</sup> A. G. Roca et al. Design strategies for shape-controlled magnetic iron oxide nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 138, 68-104, 2019.

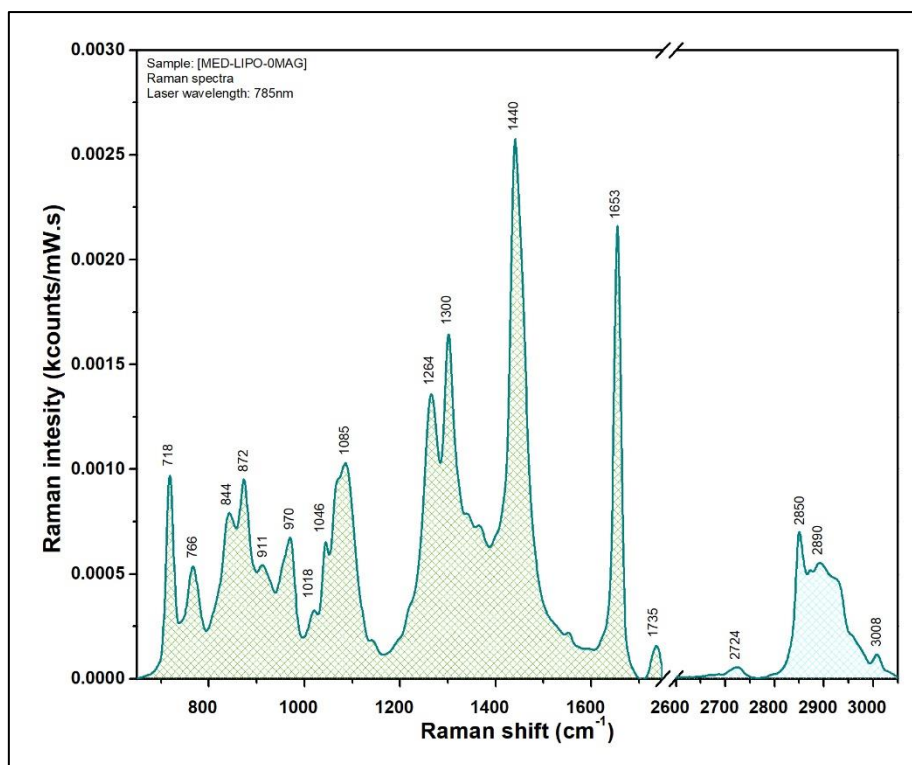


Figura b67. Spectrul Raman al lipozomilor cationici sintetizați.

**Tabel b1.** Atribuire benzi vibraționale Raman: lipozomi cationici fără conținut de nanoparticule magnetice.

**Lungimea  
de undă  
( $\text{cm}^{-1}$ )**

**Atribuiri vibraționale**

71	symmetric stretch vibration of the C-N bonds from the
8	$\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ choline group
76	stretching vibration of the quaternary ammonium group &
5	stretching vibration of the esterified P-O bonds from the phosphate groups
85	Asymmetric stretching vibration of the esterified O-P-O bonds
0	from the phosphate groups
87	asymmetric stretch vibration of the C-N bonds from the
5	$\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ choline group
97	bending vibration of the CH groups
2	
10	symmetric stretching vibration of $\text{PO}_4^{3-}$ group
44	
10	stretching vibration of C-C bond
85	
12	deformation vibration of the unsaturated =CH group

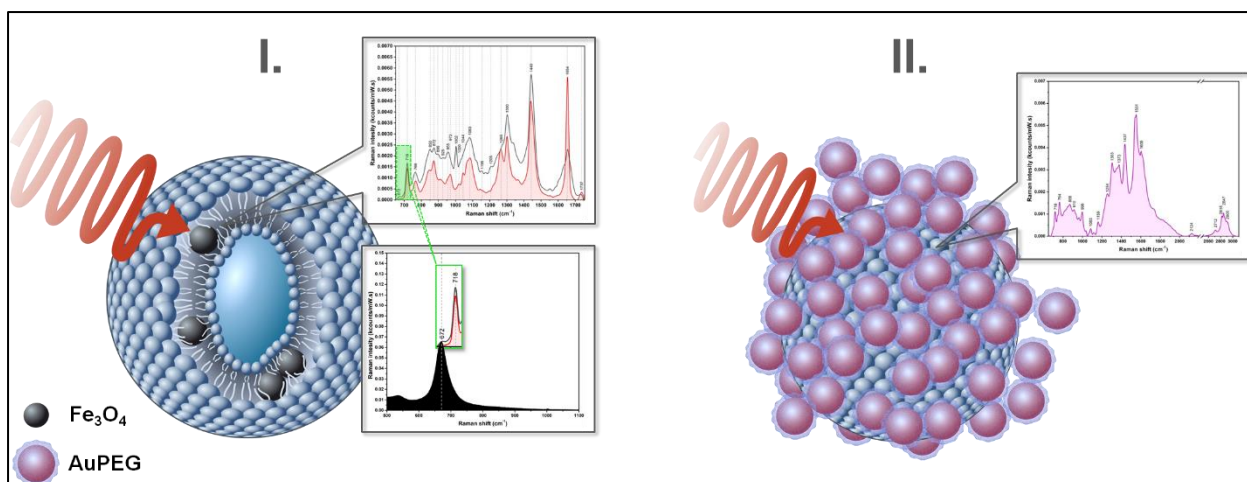


65		
02	13	twisting vibration of CH <sub>2</sub> groups
44	14	CH <sub>2</sub> /CH <sub>3</sub> scissoring vibrations
58	16	C=C bond stretching vibrations
41	17	stretching vibration of the C=O bond from the ester groups
28	27	in-plane scissoring vibrations of CH <sub>2</sub>
54	28	symmetric stretching vibration of the CH <sub>2</sub> groups (fatty acids)
95	28	asymmetric stretching vibration of the CH <sub>2</sub> groups (fatty acids)
29	29	symmetric stretching vibration of the CH <sub>3</sub> groups
10	30	stretching vibrations of unsaturated =C-H groups (fatty acids)

---

În cadrul acestui proiect, așa cum am menționat în raportul precedent am reușit pentru prima dată să utilizăm spectroscopia Raman în vederea demonstrării internalizării nanoparticulelor magnetice în interiorul bistratului lipidic. Au fost măsurate probe lipozomale pure respective conținând cantități de nanoparticule magnetice cuprinse între 10 și 1000 de μL. Această tehnică a fost capabilă să demonstreze internalizarea nanoparticulelor magnetice în bistratul lipic al lipozomilor și faptul că o concentrație prea mare a NPMag are drept consecință deteriorarea bistratului dar și a lipozomilor.

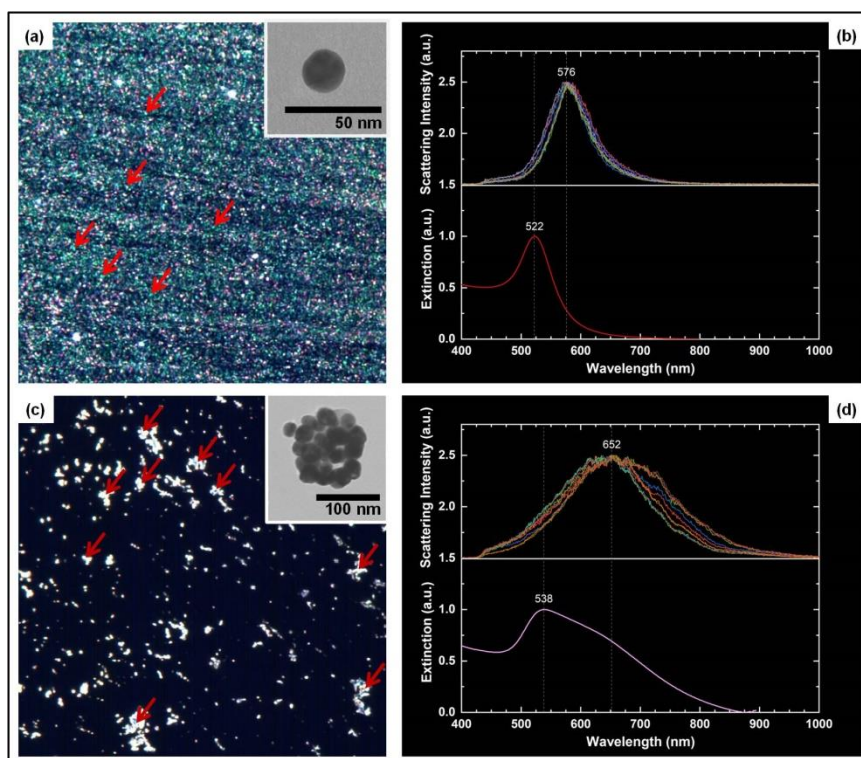
Odată sintetizați magneto-lipozomii aceștia au fost decorați cu aur și ulterior s-au făcut măsurători SERS (Fig. b68) dar au fost analizați și cu ajutorul microscopiei hiperspectrale și câmp întunecat (Fig. b69).



**Fig. b68.** Prezentare schematică a metodei de formare a nanostructurilor hibride magnetoplasmonice lipozomale

Sinteza coloidului de aur utilizat pentru decorare s-a realizat conform următorului protocol: S-a preparat o soluție apoasă prin dizolvarea a 1 g PEG1000 în 49 mL apă ultrapură. La soluția obținută, s-a adăugat 1 mL soluție NaOH 1% (m/v). Soluția astfel obținută a fost încălzită pe plita electrică la 85°C, moment în care s-au adăugat 0.55 mL soluție H[AuCl<sub>4</sub>] 128 mM (sub agitare continuă). Amestecul a fost adus la fierbere (sub agitare), moment în care au mai fost adăugați 0.5 mL soluție NaOH 1%. Culoarea amestecului a virat rapid la roșu-rubiniu, acest fenomen fiind primul indiciu al formării coloidului de aur. Figura b69 ilustrează aspectul în TEM al NP de aur, distribuția pe dimensiuni a acestora și spectrul de absorbție UV-VIS al coloidului.

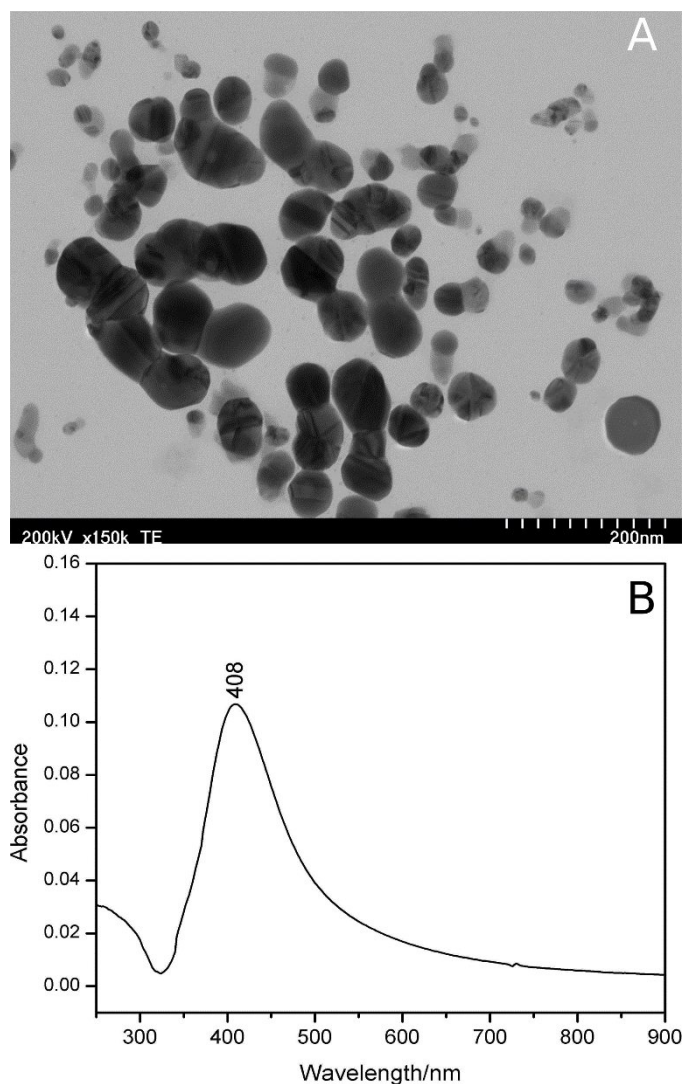
La final s-a procedat la sinteza magnetolipozomilor plasmonici, conform următorului protocol: În 990 μL coloid de aur s-au adăugat 10 μL dispersie lipozomală. S-a evidențiat o schimbare rapidă a culorii coloidului de la roșu la albastru-violet, fenomen care indică agregarea NP de aur pe suprafața lipozomală. Acest fenomen a fost pus în evidență și prin microscopie în câmp întunecat așa cum se poate vedea în imaginea de mai jos.



**Fig. b69.** Imagini obtinute prin microscopia in camp intunecat a nanoparticulelor plasmonice (a) respectiv a magnetolipozomilor decorati cu nanoparticule plasmonice de aur (c).

### c) Nanoparticule plasmonice de argint

Pentru analiza SERS a ADN-ului s-a folosit o soluție coloidală de nanoparticule de argint (AgNP) obținută prin reducerea azotatului de argint cu clorhidrat de hidroxilamină. Astfel, s-au dizolvat 17 mg de clorhidrat de hidroxilamină în 90 ml de apă ultrapură, sub agitare magnetică. În paralel, 17 mg de clorhidrat de hidroxilamină au fost dizolvate în 8.8 ml de apă dubludistilată, la care s-au adăugat 1.2 ml de NaOH 1%. S-a introdus soluția de hidroxilamină în cea de AgNO<sub>3</sub> sub agitare. Soluția coloidală obținută a fost păstrată la temperatura mediului ambiant. Nanoparticulele de argint au fost caracterizate prin microscopie electronica in transmisie (TEM) și respectiv UV-VIS. Diametrul mediu al nanoparticulelor este de 80 nm – Fig. c1. Măsurătorile de potențial Zeta a soluției coloidale au evidențiat o valoare medie a potențialului Zeta -29.0(10.6)mV. Prin împrăștierea dinamică a luminii, sa determinat un diametru mediu hidrodinamic de 84.68 (7.83) nm confirmând datele obținute prin TEM. Spectrul UV-Vis a soluției coloidale AgNP evidențiază prezența unui pic la 408 nm.

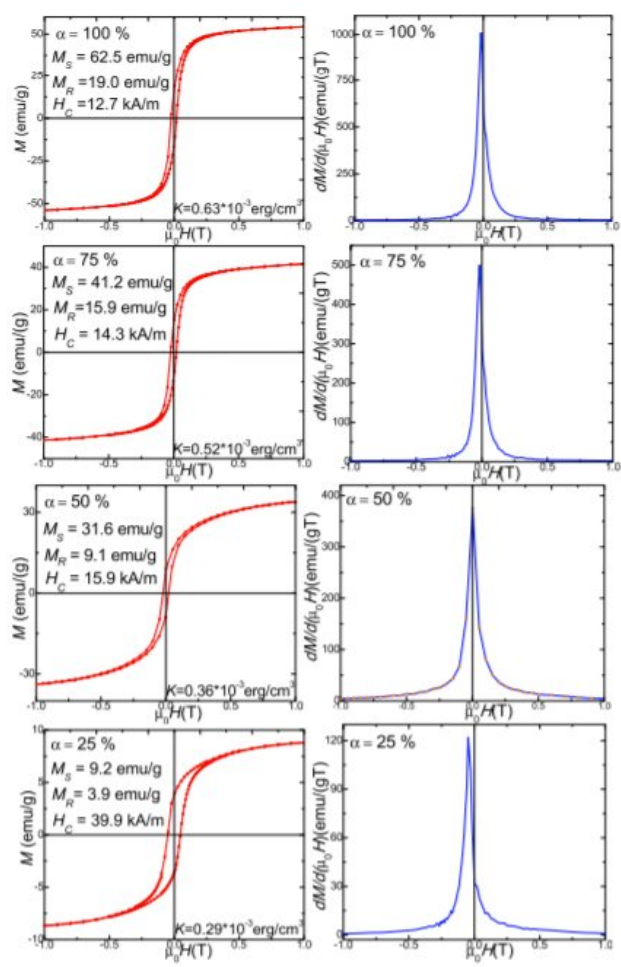


**Fig. c1** (A) Micrograție reprezentativă TEM a AgNPs. (B) Spectrul UV-Vis al soluției coloidale AgNP.

**d) Cercetări asupra feritelor de tip  $M_xCo_{1-x}Fe_2O_4$  (unde  $M = Cu^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ , și  $Zn^{2+}$ )**  
înglobate în silice

Nanocompozitele  $Cu_{0.6}Co_{0.4}Fe_2O_4/(100-\alpha)SiO_2$  ( $\alpha = 0, 25, 50, 75$  and  $100\%$ ) au fost preparate printr-o metodă sol-gel și tratate termic la temperature situate între 200 și 1200 °C. Matricea de  $SiO_2$  a fost găsită ca fiind amorfă. La un conținut redus de ferrite, ferita obținută de Cu-Co este impurificată de CoO cristalin, în timp ce la un conținut ridicat de ferită s-au obținut probe monofazice de ferită Cu-Co. Dimensiunile particulelor au crescut de la 30 la 120 nm odată cu creșterea conținutului de ferită înglobată în matricea de  $SiO_2$ , în timp ce cristalinitatea crește pentru temperaturi mari de tratament termic. Măsurătorile de AFM au

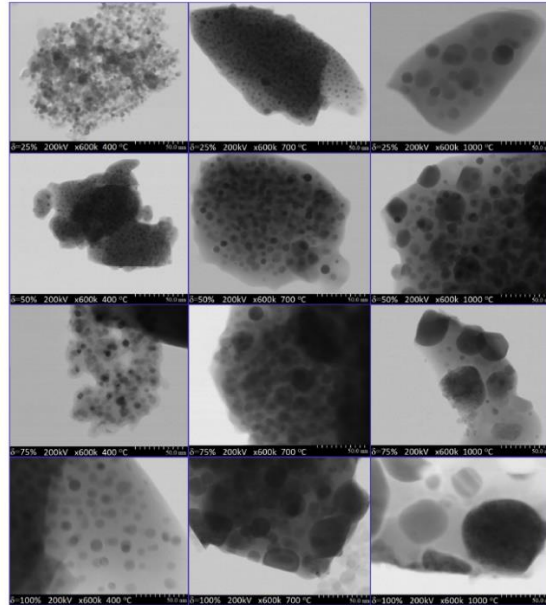
pus în evidență morfologia nanocompozitelor  $\text{Cu}_{0.6}\text{Co}_{0.4}\text{Fe}_2\text{O}_4/\text{SiO}_2$ . Pentru probele tratate la 200 și 500 de grade, aria specific a suprafețelor particulelor crește iar cristalinitatea se depreciază odată cu creșterea conținutului de  $\text{SiO}_2$ . Pentru toate probele preparate aria suprafețelor descrește cu creșterea temperaturii de tratament termic. Matricea de  $\text{SiO}_2$  este diamagnetică. Magnetizarea de saturație și remanența se îmbunătățesc, în timp ce câmpul coercitiv și anizotropia descreșc, pe măsură ce conținutul de ferită de Cu-Co se mărește în matricea de  $\text{SiO}_2$ .



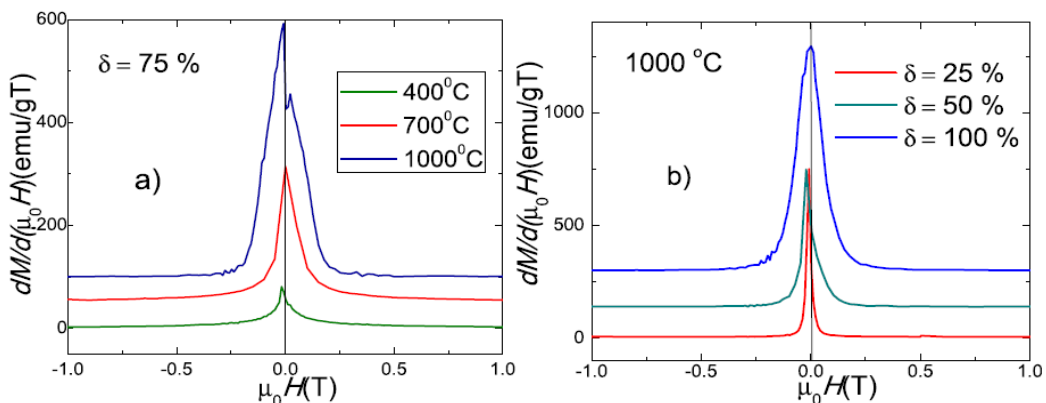
**Fig. d1.** Curbele de histerază magnetică și derivatele magnetizărilor pentru nanocompozitele tratate termic la  $1200^{\circ}\text{C}$ .

O altă latură a cercetărilor noastre a fost investigarea proprietăților magnetice ale nanocompozitelor  $\text{Zn}_{0.5}\text{Ni}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4/\text{SiO}_2$  înglobate în matrice de  $\text{SiO}_2$  și tratate termic. Rezultatele au pus în evidență creșterea dimensiunii cristalitelor (2.7-57.4 nm), a magnetizării de saturație (0.36-82.4 emu/g), a remanenței (0.06-15.4 emu/g) și descreșterea volumului

specific al porilor (0.183-0.010 cm<sup>3</sup>/g) și a ariei specific a suprafețelor particulelor (<0.5-247 m<sup>2</sup>/g) cu creșterea conținutului de Zn<sub>0.5</sub>Ni<sub>0.5</sub>Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> înglobat în matricea de SiO<sub>2</sub> și cu temperatura de tratament termic. Matricea de SiO<sub>2</sub> are comportare diamagnetică, cu o ușoară fracție feromagnetică, provenind de la impurificări accidentale. Compusul Zn<sub>0.5</sub>Ni<sub>0.5</sub>Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, înglobat în matricea de SiO<sub>2</sub> prezintă o comportare de tip superparamagnetic, în timp ce Zn<sub>0.5</sub>Ni<sub>0.5</sub>Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> ne-înglobat are comportarea unui ferrimagnet



**Fig. d2.** Imagini TEM ale nanocompozitelor  $(Zn_{0.5}Ni_{0.5}Fe_2O_4)_\delta(SiO_2)_{100-\delta}$  ( $\delta=100\%$ ) tratate termic la 400, 700 și 1000 °C.



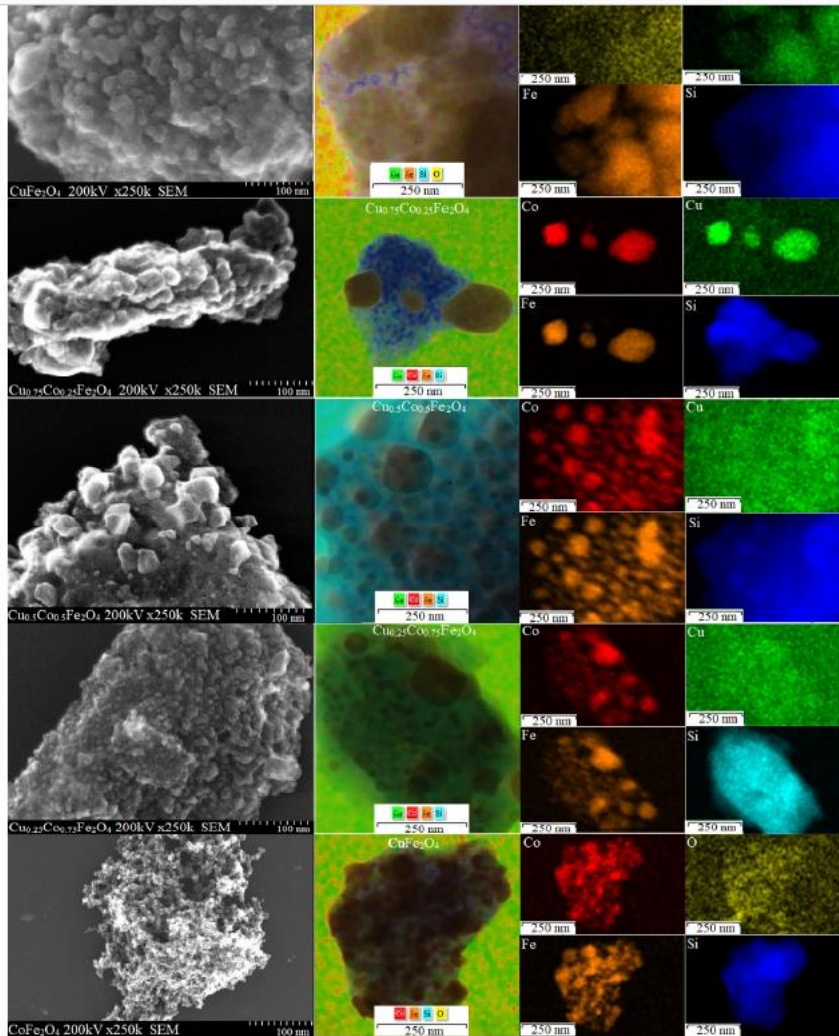
**Fig.d3** Derivatele magnetizării nanocompozitelor ( $\delta = 75\%$ ) tratate termic la 400, 700 și 1000°C (a) și pentru  $\delta = 25, 50$  și 100% (b)

Un interes deosebit a fost acordat studiului influenței substituției  $\text{Cu}^{2+}$  prin  $\text{Co}^{2+}$  în ferita  $\text{CuFe}_2\text{O}_4$  înglobată în  $\text{SiO}_2$  asupra proprietăților magnetice și morfologice. Mai multe nanocomposite  $\text{CuFe}_2\text{O}_4/\text{SiO}_2$ ,  $\text{Co}_{0.25}\text{Cu}_{0.75}\text{Fe}_2\text{O}_4/\text{SiO}_2$ ,  $\text{Co}_{0.50}\text{Cu}_{0.50}\text{Fe}_2\text{O}_4/\text{SiO}_2$ ,  $\text{Co}_{0.75}\text{Cu}_{0.25}\text{Fe}_2\text{O}_4/\text{SiO}_2$  and  $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{SiO}_2$  au fost preparate printr-o metodă sol-gel și apoi tratate termic la 500, 800 și 1100 °C. Alături de ferrite au fost prezente fracții reduse de  $\text{CuO}$ , la temperaturi joase de tratament termic respectiv la temperaturi ridicate. Dimensiunile particulelor au crescut de la 38 la 85 nm odata cu creșterea temperaturii de tratament termic și a conținutului de  $\text{Co}^{2+}$  (Tabelul 1). Magnetizarea de saturție, remanența, câmpul coercitiv și anizotropia magnetică au crescut în urma substituției  $\text{Cu}^{2+}$  cu  $\text{Co}^{2+}$  în ferita  $\text{CuFe}_2\text{O}_4$ . Nano-compozitele investigate au avut comportamente de tip superparamagnetic și feromagnetic.

**Table 1**  
Sample parameters measured with AFM, XRD and VSM.

Sample	Temperature (°C)	Height (nm)	Roughness (nm)	AFM particle size (nm)	XRD crystallite size (nm)	Anisotropy constant $K \cdot 10^3$ (erg/cm <sup>3</sup> )
$\text{CuFe}_2\text{O}_4$	500	11.0	1.23	45	43.2	0.003
	800	4.6	0.62	65	63.7	0.047
	1100	78.0	15.1	85	83.4	0.178
$\text{Co}_{0.25}\text{Cu}_{0.75}\text{Fe}_2\text{O}_4$	500	8.0	1.05	40	37.4	0.113
	800	12.0	1.85	56	55.6	0.074
	1100	4.7	0.59	70	66.8	0.271
$\text{Co}_{0.50}\text{Cu}_{0.50}\text{Fe}_2\text{O}_4$	500	4.5	0.59	35	33.8	0.020
	800	10.0	1.56	50	48.1	0.113
	1100	13.0	2.31	60	58.6	0.388
$\text{Co}_{0.75}\text{Cu}_{0.25}\text{Fe}_2\text{O}_4$	500	7.0	0.89	30	28.3	0.041
	800	7.0	0.81	45	43.4	0.163
	1100	7.0	1.12	53	52.1	0.826
$\text{CoFe}_2\text{O}_4$	500	9.0	1.13	30	27.4	0.070
	800	4.7	0.56	35	33.1	0.389
	1100	6.0	0.90	40	38.2	2.219

Tabelul d1. Parametri măsuțați pe probele preparate utilizând AFM, XRD și VSM

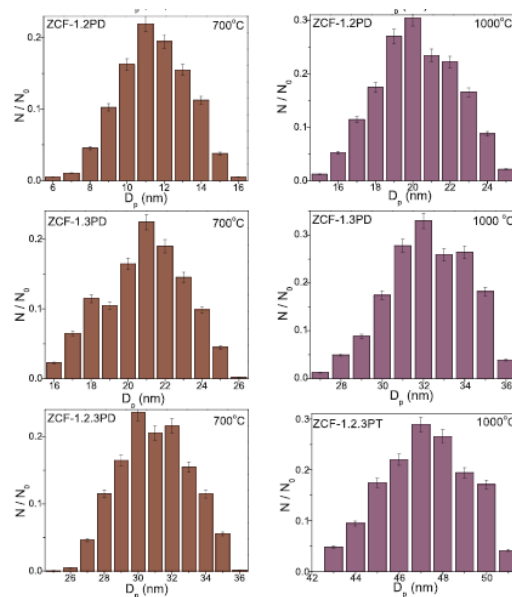


**Fig. d4.** Imagini SEM și harta distribuției elementelor în nano-compozitele  $\text{CuFe}_2\text{O}_4/\text{SiO}_2$ ,  $\text{Co}_{0.25}\text{Cu}_{0.75}\text{Fe}_2\text{O}_4/\text{SiO}_2$ ,  $\text{Co}_{0.50}\text{Cu}_{0.50}\text{Fe}_2\text{O}_4/\text{SiO}_2$ ,  $\text{Co}_{0.75}\text{Cu}_{0.25}\text{Fe}_2\text{O}_4/\text{SiO}_2$ ,  $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{SiO}_2$  tratate termic la  $1100^\circ$

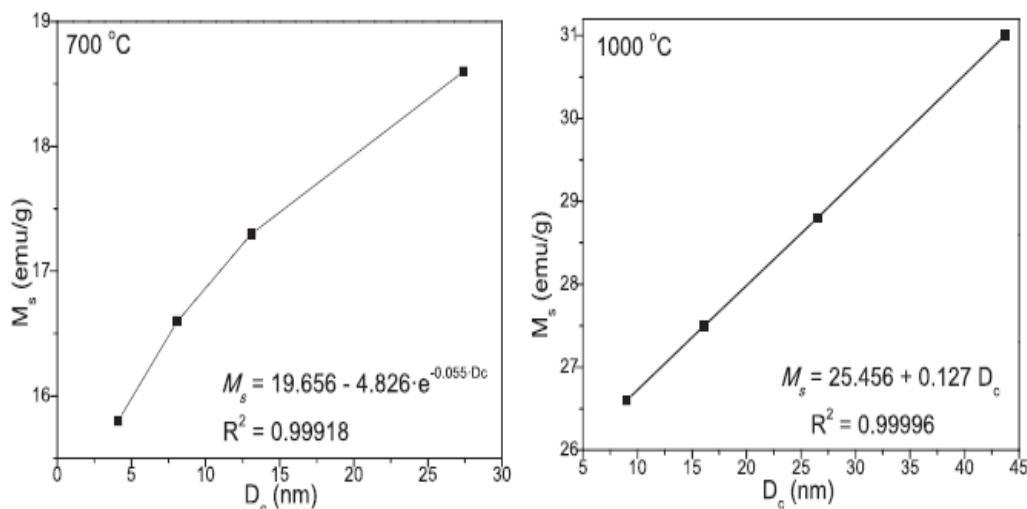
Unul dintre studiile elaborate a vizat influența poliolilor (1,2-ethanediol, 1,2-propanediol, 1,3-propanediol, 1,2,3-propanetriol) utilizați în sinteze asupra structurii și proprietăților magnetice ale nanocompozitelor  $\text{Zn}_{0.5}\text{Co}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4/\text{SiO}_2$ . Analizele prin difracție de raze X au indicat formarea compusului  $\text{Zn}_{0.5}\text{Co}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$  cu structură slab/înalt cristalină alături de alte faze cristaline ( $\text{Zn}_2\text{SiO}_4$ ,  $\text{Co}_2\text{SiO}_4$ ,  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{Co}_3\text{O}_4$ ,  $\text{ZnO}$ ), funcție de polioliul utilizați și temperatura de tratament termic. Spectrele IR, transformata Fourier, au confirmat formarea legăturilor în oxizii metalici din ferita Co-Zn și în matricea de  $\text{SiO}_2$ . Densitatea fizică crește iar cea determinată din XRD scade cu dimensiunile medii ale cristalitelor. Determinările TEM au relevat nanoparticule sferice (2-47 nm) care cresc o dată cu creșterea distanței dintre grupările hidroxil. Forma curbelor de histerezis magnetic sugerează dependența comportării magnetice de proprietățile structurale, și în consecință de structura de



polioli și de temperature de tratament termic. De asemenea, magnetizarea la saturație, remanentă, și câmpul coercitiv ale compușilor  $Zn_{0.5}Co_{0.5}Fe_2O_4$ , cresc cu lungimea lanțului polioli și cu numărul grupărilor hidroxil. Atât  $M_s$  cât și  $H_c$  cresc cu dinmiesiunile cristalitelor. Forma curbelor derivatelor magnetizării în raport cu câmpul aplicat indică prezența unei singure faze magnetice ( $Zn_{0.5}Co_{0.5}Fe_2O_4$ ) care are comportări de tip superparamagnetic sau ferromagnetic, în funcție de temperature de tratament termic.



**Fig.d5.** Distribuția dimensiunilor particulelor din probele , ZCF-1.2PD, ZCF-1.3PD și ZCF-1.2.3PT tratate termic la 700 și 1000 °C.



**Fig. d6** Magnetizarea la saturație ( $M_s$ ) în funcție de dimensiunile cristalitelor ( $D_c$ ) pentru nano-compozitele  $Zn_{0.5}Co_{0.5}Fe_2O_4/SiO_2$  tratate termic la 700 și 1000 °C.

Rezultatele obținute au permis publicarea următoarelor lucrări:

1. Dippong Thomas, Levei Erika Andrea, Cadar Oana, Deac Iosif-Grigore, Lazar Mihaela, Borodi Gheorghe, Petean Ioan, Effect of amorphous SiO<sub>2</sub> matrix on structural and magnetic properties of Cu<sub>0.6</sub>Co<sub>0.4</sub>Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub> nanocomposites, JOURNAL OF ALLOYS AND COMPOUNDS, **849** (2020) 156695 (1-10).
2. Dippong Thomas, Cadar Oana, Deac Iosif-Grigore, Lazar Mihaela, Borodi Gheorghe, Levei Erika Andrea, Influence of ferrite to silica ratio and thermal treatment on porosity, surface, microstructure and magnetic properties of Zn<sub>0.5</sub>Ni<sub>0.5</sub>Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub> nanocomposites, JOURNAL OF ALLOYS AND COMPOUNDS, **828** (2020) 154409 (1-11).
3. Dippong Thomas, Deac Iosif-Grigore, Cadar Oana, Levei Erika Andrea, Petean Ioan, Impact of Cu<sup>2+</sup> substitution by Co<sup>2+</sup> on the structural and magnetic properties of CuFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> synthesized by sol-gel route, MATERIALS CHARACTERIZATION, **163** (2020) 110248 (1-11).
4. Dippong Thomas, Cadar Oana, Levei Erika Andrea, Deac Iosif-Grigore, Microstructure, porosity and magnetic properties of Zn<sub>0.5</sub>Co<sub>0.5</sub>Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub> nanocomposites prepared by sol-gel method using different polyols JOURNAL OF MAGNETISM AND MAGNETIC MATERIALS, **489** (2020) 166168 (1-11).

Act. 3.4 **Ataşarea chimică a aptamerilor ţintă Cy-3 modificaţi cu CD117 la suprafaţa plasmonică.**

Act. 3.5 **Ataşarea chimică a aptamerilor ţintă Cy-3 modificat cu CD 117 la suprafaţa exterioară a lipozomului magnetoplasmonic.**

Act. 3.6 **Evaluarea numărului de aptameri legaţi la suprafaţa metalică**

Dat fiind strânsa corelaţie între acţiunile 3.4 – 3.6 vom prezenta în comun rezultatele obţinute în abordarea acestor tematici. Vom analiza deasemenea analiza ADN malign prin metoda SERS, folosind lipozomii de argint.

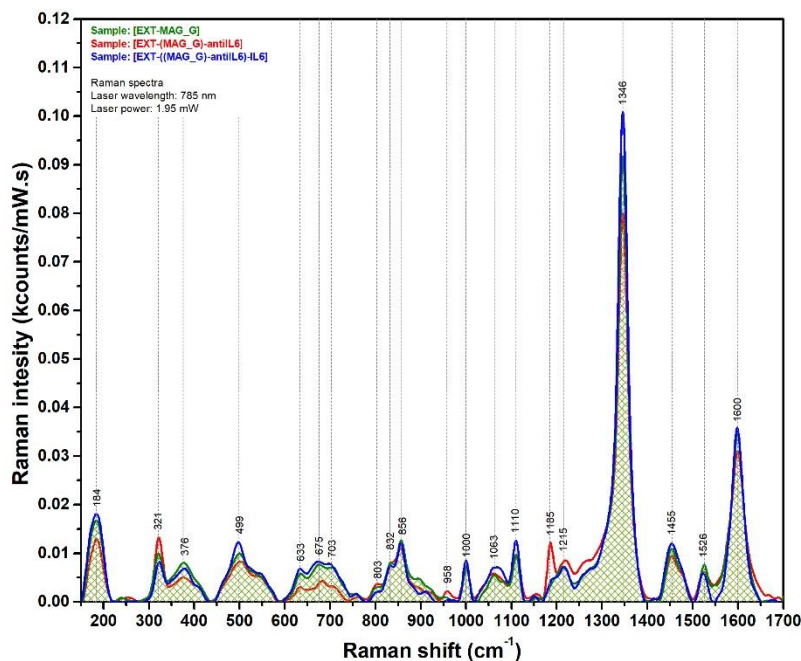
**a) Ataşarea chimică a aptamerilor ţintă Cy-3 modificat cu CD117 la suprafaţa plasmonică**

**a.1.1. Funcţionalizarea NP magnetice cu anticorpi monoclonali**

CD117 este un receptor transmembranar de suprafaţă care este supraexprimat în 74% din cazurile de AML. În cadrul acestui proiect ne-am propus să dezvoltăm două clase de nanostructuri multifuncţionale magnetoplasmonice capabile să izoleze şi să detecteze exozomii secretaţi de celulele mieloide care au supraexprimat pe suprafaţa lor receptorul CD117. Ambele nanostructuri hibride multifuncţionale conţin atât nanostructuri magnetice, capabile să permită separarea magnetică a nanohibrizilor funcţionalizaţi cu exozomii doriţi, cât şi nanostructuri plasmonice care să permită funcţionalizarea lor cu aptameri specifici şi detecţia lor ulterioară folosind spectroscopia vibraţională ultrasensibilă.

În vederea realizării acestui obiectiv am funcţionalizat într-o primă fază nanoparticule magnetice de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> cu anticorpi monoclonali capabili să detecteze specific interleukina 6 (IL6). IL6 este o polipeptidă care are o structură compusă din 185 de aminoacizi.

Funcţionalizarea s-a realizat prin incubarea soluţiilor care conţin nanoparticule magnetice cu anticorpi monoclonali anti-IL6, în condiţii specifice. După imobilizare s-au efectuat mai multe etape de spălare care să permită eliminarea anticorpilor monoclonali nelegaţi de suprafaţa magnetică.



**Figura a1.** Spectrul Raman al NP magnetice simple (spectru verde), al NP funcționalizate cu antiIL6 (spectru roșu) respectiv al NP funcționalizate cu anti IL6 și legate specific cu moleculele de IL6 (spectru albastru)

Odată realizat acest sistem am dorit să testăm capacitatea acestor nanostructuri magnetice funcționalizate cu anticorpi monoclonali anti IL6 de a se lega specific de moleculele IL6 folosind spectroscopia Raman.

Așa cum se poate vedea în Figura a1 a fost identificat un peak vibrațional specific (1185 cm<sup>-1</sup>) care poate fi utilizat pentru a pune în evidență atașarea specifică a moleculelor de IL6 de suprafața NP magnetice funcționalizate cu anticorpi monoclonali. Aceste observații au fost confirmate și prin măsurători electrochimice.

### a.1.2. Funcționalizarea NP de aur cu aptameri specifici CD117

Pentru realizarea cu succes a acestei etape a proiectului ne-am propus să îndeplinim 2 obiective majore, și anume:

- Atașarea cu succes a aptamerilor funcționalizați de suprafața celor două clase de nanohibrizi magnetici multifuncționali: nanoparticule magnetoplasmonice și magnetolipozomi plasmonici
- Evaluarea numărului de aptameri legați de suprafața plasmonică exterioară a acestor nanohibrizi

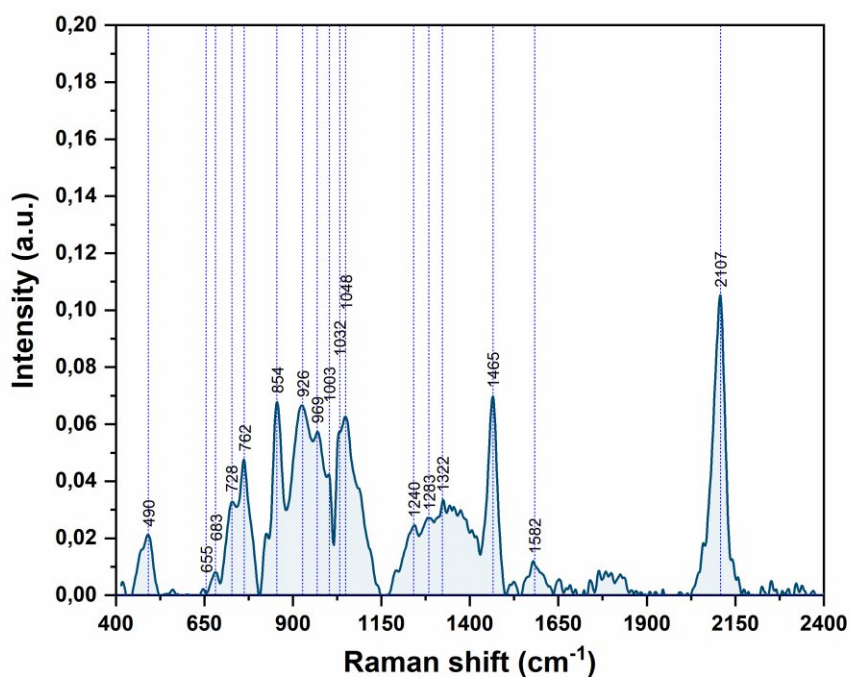
Prima activitate îndeplinită în realizarea scopului propus a fost **atașarea chimică de suprafața plasmonică a unui aptamer CD117 modificat prin țarghetare specifică cu ajutorul unei molecule fluorescente (Cy-3).**

Prin încorporarea în structura aptamerilor a unor molecule fluorescente (în cazul nostru Cy-3) s-a reușit extinderea funcționalității aptamerului în direcția identificării acestuia folosind microscopia de fluorescență. Aptamerii modificați cu Cy-3 au fost atașați de nanoparticulele plasmonice datorită prezenței grupării moleculare -SH, știindu-se faptul că atomii de sulf au afinitate mare pentru suprafața nanoparticulelor de aur. Astfel, soluția conținând nanoparticule de aur a fost amestecată cu cea care a conținut aptamerii modificați și a fost lăsată la incubare pentru o perioadă de minim 24 h la temperatura camerei. Ulterior, pentru a se separa aptamerii nelegați de ceilalți, mixtura a fost centrifugată 30 minute folosindu-se o viteză de centrifugare de 10000 rpm. Supernatantul conținând aptamerii nelegați a fost înlăturat iar pentru îndepărtarea precipitațiilor uleioși s-a folosit o soluție de spălare cu conținut de citrat de sodiu. Acest ciclu de centrifugare și spălare s-a realizat de 3 ori.

### **a.1.3. Funcționalizarea lipozomilor magnetoplasmonici cu NP de aur funcționalizate cu aptameri specifici CD117-Cy3**

A doua activitate îndeplinită în vederea realizării cu succes a obiectivelor propuse a fost atașarea chimică de suprafața exterioară a lipozomilor magnetoplasmonici a unui aptamer CD117 modificat prin țarghetare specifică folosind o moleculă fluorescentă (Cy-3). În această etapă a fost utilizată interacțiunea electrostatică dintre magnetolipozomii cationici sintetizați și caracterizați în prealabil și nanoparticulele plasmonice de aur funcționalizate cu aptameri specifici CD117 și conținând fluoroforul Cy3, având o sarcină de suprafață negativă. Metoda de funcționalizare a nanoparticulelor sferice de aur a fost similară cu cea utilizată în cazul nanoparticulelor magnetoplasmonice și prezentată anterior. Au fost utilizate exact concentrațiile utilizate pentru o decorare uniformă a lipozomilor cu nanoparticule plasmonice. Concentrațiile nanoparticulelor, măsurate după funcționalizare, au fost măsurate cu ajutorul tehnicii NTA (nanoparticle tracking analysis).

Succesul etapei de funcționare/atașare a aptamerilor specifici CD117 de suprafața exterioară a nanoparticulelor magnetoplasmonice, respectiv a magnetolipozomilor plasmonici a fost confirmat prin spectroscopie SERS.



*Figura a2. Spectrul SERS al nanoparticulelor de aur funcționalizate cu aptameri specifici CD117.*

În Figura a2 este prezentat spectrul SERS al nanoparticulelor sferice de aur decorate cu aptameri specifici CD117. Principalele benzi vibraționale observate pot fi atribuite prezenței aptamerilor pe suprafața plasmonică a nanoparticulelor de Au.

#### **a.1.4. Evaluarea numărului de aptameri CD117-Cy3 legați de suprafața exterioară a nanoparticulelor magnetoplasmonice și a magnetolipozomilor plasmonici**

În urma funcționării celor două clase de nanohibridi cu aptameri specifici CD117-Cy3 s-au obținut nanoparticule (nano-obiecte) multifuncționale care posedă concomitent 3 proprietăți extraordinare: fluorescente, magnetice și plasmonice.

Pentru a putea fi utilizate în aplicațiile biologice soluțiile coloidale conținând nanoparticule magnetoplasmonice respectiv magnetolipozomi plasmonici, au fost testate în

vederea evaluării stabilității lor. Astfel s-au adăugat soluții de NaCl în diferite concentrații până la o valoare finală a concentrației de 3 M. Numărul de aptameri de pe suprafața nanoparticulelor multifuncționale a fost evaluat folosindu-se o soluție de 2-mercaptoetanol. Această soluție are rolul de îndepărta aptamerii de la suprafața nanoparticulelor prin ruperea legăturilor chimice formate între aceștia și suprafața plasmonică. Prin calcularea concentrației de aptameri CD117 modificați cu Cy-3 îndepărtați de la suprafața nanoparticulelor și aflați în suspensie în supernatant a putut fi evaluat numărul de aptameri legați de nanoparticule. Acest lucru s-a realizat cu ajutorul microscopiei de fluorescență cunoscându-se faptul cu fluoroforul Cy3 are picul de excitație localizat la 555 nm iar cel de emisie la 569 nm. Data fiind dependența liniară a concentrației sale de intensitatea semnalului de fluorescență, a putut fi estimată concentrația aptamerilor legați de suprafața plasmonică.

Pentru limitarea erorilor de calcul, în prealabil, a fost realizată o curbă de calibrare a intensității de fluorescență în funcție de concentrația de Cy3, folosind soluții de Cy3 de diferite concentrații.

#### **b) Studiul ADN malign prin SERS folosind lipozomi de argint**

ADN-ul a fost extras din probe de țesut limfonodale încorporate în parafină, fixate cu formalină, de la pacienți cu BCL (n = 9), TCL (n = 9), pacienți diagnosticați cu metastaze ganglionare limfatice din melanom (n = 10) (Met) și subiecți martori (n = 10) (Ctr), reprezentat de pacienții cu ganglioni limfatici reactivi (datorați infecțiilor). Studiul a fost aprobat de către comisia de etică instituțională a Centrului Clinic de Cancer Ion Chiricuta, Cluj-Napoca, România. Consimțământul informat a fost obținut de la toți subiecții și toate analizele au fost efectuate în conformitate cu orientările și reglementările relevante. Toate probele extrase au fost măsurate prin SERS și incluse în analiza statistică (9 BCL, 9 TCL, 10 Met și 10 probe Ctr).

ADN-ul a fost extras din eșantioane de țesuturi limfatice încorporate în parafină, fixate cu formalină, prin procedura de coloană rotativă utilizând un kit de extracție a ADN-ului (QIAamp DNA Mini Kit, QIAGEN) așa cum a fost descris anterior (1, 2). Puritya ADN-ului a fost calculată pe baza raportului de absorbanță 260/280 nm (Tabelul b1).

**Tabelul b1.** Purity medie a ADN-ului din limfomul cu celule B (BCL), limfomul cu celule T (TCL), metastazele melanomului (Met) și probele de control (Ctr), calculate pe baza raportului de absorbantă 260/280 nm.

<b>Group</b>	<b>260/280 (range)</b>
<b>Ctr</b>	1.724 (1.59-1.83)
<b>BCL</b>	1.732 (1.51-1.83)
<b>TCL</b>	1.79 (1.71-1.86)
<b>Met</b>	1.796 (1.56-2.06)

Pentru analiza SERS a ADN-ului, am folosit o soluție coloidală de nanoparticule de argint (AgNP) sintetizată prin reducerea azotatului de argint cu clorhidrat de hidroxilamină, așa cum s-a descris anterior (3). Pe scurt, 17 mg de AgNO<sub>3</sub> s-au dizolvat în 90 ml apă ultrapură (Millipore) sub agitare magnetică. Separat, 17 mg de clorhidrat de hidroxilamină au fost dizolvate în 8.8 ml de apă ultrapură și s-au adăugat 1.2 ml de NaOH 1%. Soluția de hidroxilamină a fost adăugată la soluția de AgNO<sub>3</sub> sub agitare și soluția rezultată și-a schimbat culoarea imediat în galben închis. Soluția coloidală a fost depozitată la temperatura camerei. Toate substanțele chimice au fost achiziționate de la Sigma – Aldrich. Nanoparticulele au fost caracterizate prin spectroscopie UV-Vis (spectrometru V-630, Jasco) și microscopie electronică de transmisie, rezultând un diametru mediu de 80 nm. Măsurătorile de potențial Zeta a soluției coloidale au arătat nanoparticule cu o valoare medie a potențialului Zeta de  $-29 \text{ mV} \pm 10.6 \text{ mV}$ , în timp ce măsurătorile de împrăștiere dinamică a luminii confirmă un diametru mediu hidrodinamic de  $84.68 \pm 7.83 \text{ nm}$ .

Pentru achiziționarea spectrelor SERS de la DNA, a fost utilizat un spectrometru InVia Raman (Renishaw), echipat cu un laser cu excitare la 532 nm (laser Nd: YAG cu frecvență dublată), care a fost focalizat pe probă printr-un obiectiv cu magnificare de 5X (Leica, NA 0.12). Pentru a exclude concentrația ADN ca factor de confuzie, toate probele de ADN au fost aduse la aceeași concentrație de 14.45 ng/μL prin diluare. Pentru măsurătorile SERS pe ADN, 2 mL de AgNP coloidale au fost spălate prin centrifugare timp de 15 minute la 7300 g, supernatantul a fost îndepărtat prin pipetare și AgNP au fost resuspendate în 2 mL de apă ultrapură. 5 μL de AgNPs au fost amestecate cu 5 μL de ADN și 0.5 μL de Ca (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (concentrație finală  $5 \times 10^{-4} \text{ M}$ ). Amestecul a fost agitat timp de 30 de secunde pentru a asigura adsorbția ADN-ului pe suprafața AgNPs și 5 μL din acest amestec au fost așezate pe o



lamă de microscop acoperită cu folie de aluminiu pentru investigarea prin SERS. Toate măsurătorile SERS au fost efectuate sub formă de picătură lichidă.

Pentru fiecare eșantion, au fost mediate trei măsurători. A fost utilizat un timp de integrare de 40 s pentru fiecare spectru, puterea laserului pe probă fiind de 25 mW. Toate spectrele SERS au fost achiziționate folosind același lot de AgNPs pentru a preveni orice diferență datorată substratului SERS.

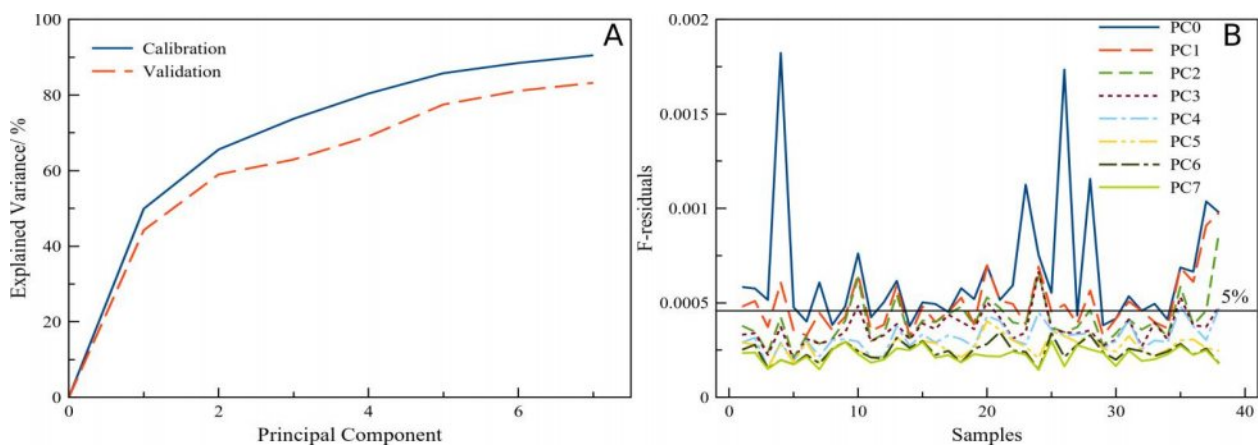
Analiza în componente principale (PCA) este o tehnică multivariată nesupravegheată, al cărei scop este de a reduce dimensionalitatea setului de date. PCA produce un set de scoruri (vizualizate ca și score plot) și vectori asociați fiecărei componente principale (loading plots). Analiza loading plot-ului permite identificarea benzilor SERS care variază semnificativ în setul de date.

Pentru a demonstra posibilitatea de a clasifica pacienții în funcție de grupul căruia îi aparțin, am efectuat analiza PCA cuplată cu analiza discriminantă pătratică (PCA-QDA), care este o metodă de clasificare supravegheată. Rezultatul PCA-QDA este un set de valori discriminante care contabilizează probabilitatea ca un eșantion dat să aparțină unui anumit grup. Predicția finală a PCA-QDA este reprezentată de grupul cu cea mai mare valoare discriminantă. Validarea a fost efectuată utilizând validarea încrucișată de tip „leave-one-out”.

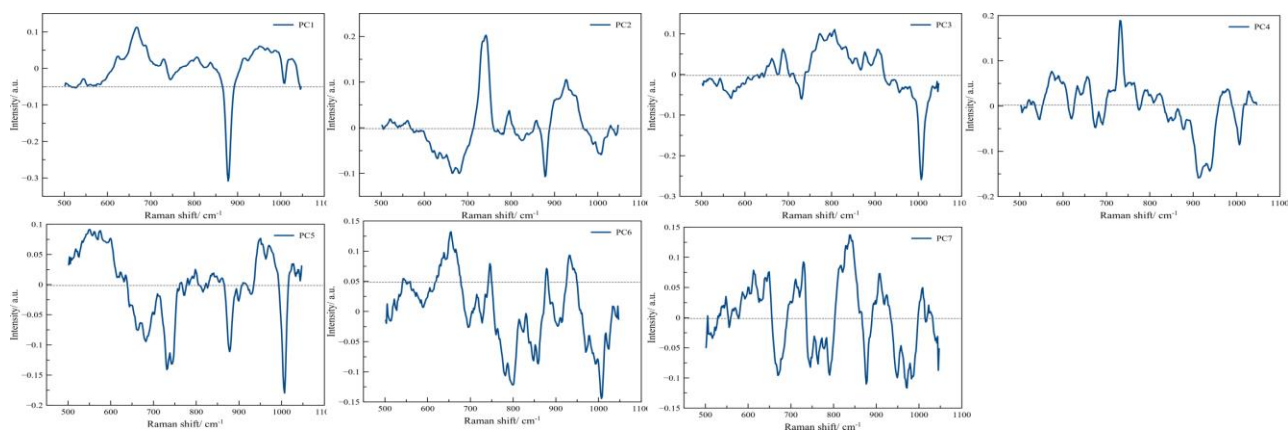
Pentru analiza statistică univariată, aria benzilor SERS de la 1005 și 730  $\text{cm}^{-1}$  a fost determinată utilizând software-ul MATLAB R2019. A fost calculată curba ROC corespunzătoare ariei benzilor SERS la 1005 și 730  $\text{cm}^{-1}$  și a raportului ariei SERS 1005/730  $\text{cm}^{-1}$ .

În cazul tuturor spectrelor, s-a aplicat o transformare liniară pentru îndepărtarea fundalului, urmată de normalizarea la unitate. Analiza statistică multivariată a fost efectuată în Unscrambler X (software Camo).

Atât pentru PCA, cât și pentru PCA-QDA, au fost utilizate primele 7 componente principale (PC), care acoperă împreună o varianță de aproximativ 80% (Figura b1). Loading plot-urile primelor 7 PC-uri au fost verificate vizual pentru a prezenta benzi SERS distincte (Figura b2). Pentru vizualizarea graficelor score plot din Figurile b1 2E, 3A, D, G și 4A rezultate din analiza PCA, componentele principale care maximizează varianța setului de date au fost alese automat de software-ul Unscrambler X.



**Figura b1.** (A) Variația explicată de primele 7 componente principale (PC-uri) ale modelului PCA și PCA-QDA. (B) Reziuurile primelor 7 calculatoare utilizate în modelul PCA și PCA-QDA. Linia dreaptă neagră indică 5% din reziuurile celor 7 PC-uri. Toate probele sunt sub intervalul rezidual de 5%, indicând faptul că primele 7 PC-uri se potrivesc bine spectrelor SERS.



**Figura b2.** Loading plot-urile primelor șapte componente principale ale PCA.

## Rezultate

Diferențele spectrale dintre ADN-ul malign și cel non-malign evidențiază hipometilarea ADN-ului malign. Figura b2A prezintă spectrul SERS mediu al ADN-ului de la subiecții martor și pacienții cu BCL, TCL și Met în intervalul 500-1050  $\text{cm}^{-1}$ , care conține cele mai relevante informații spectrale. Cele mai importante caracteristici din spectrul SERS al ADN-ului sunt banda SERS la 730  $\text{cm}^{-1}$  atribuită adeninei și banda SERS la 1005  $\text{cm}^{-1}$  atribuită vibrației  $-\text{CH}_3$  a 5-metilcitozinei, precum și banda SERS de la 660  $\text{cm}^{-1}$ , atribuită citozinei (3). Atribuirea benzilor SERS ale ADN-ului este prezentată în Tabelul b2. Banda SERS la 1005  $\text{cm}^{-1}$  este cea mai intensă în cazul grupului de control, în timp ce ADN-ul din

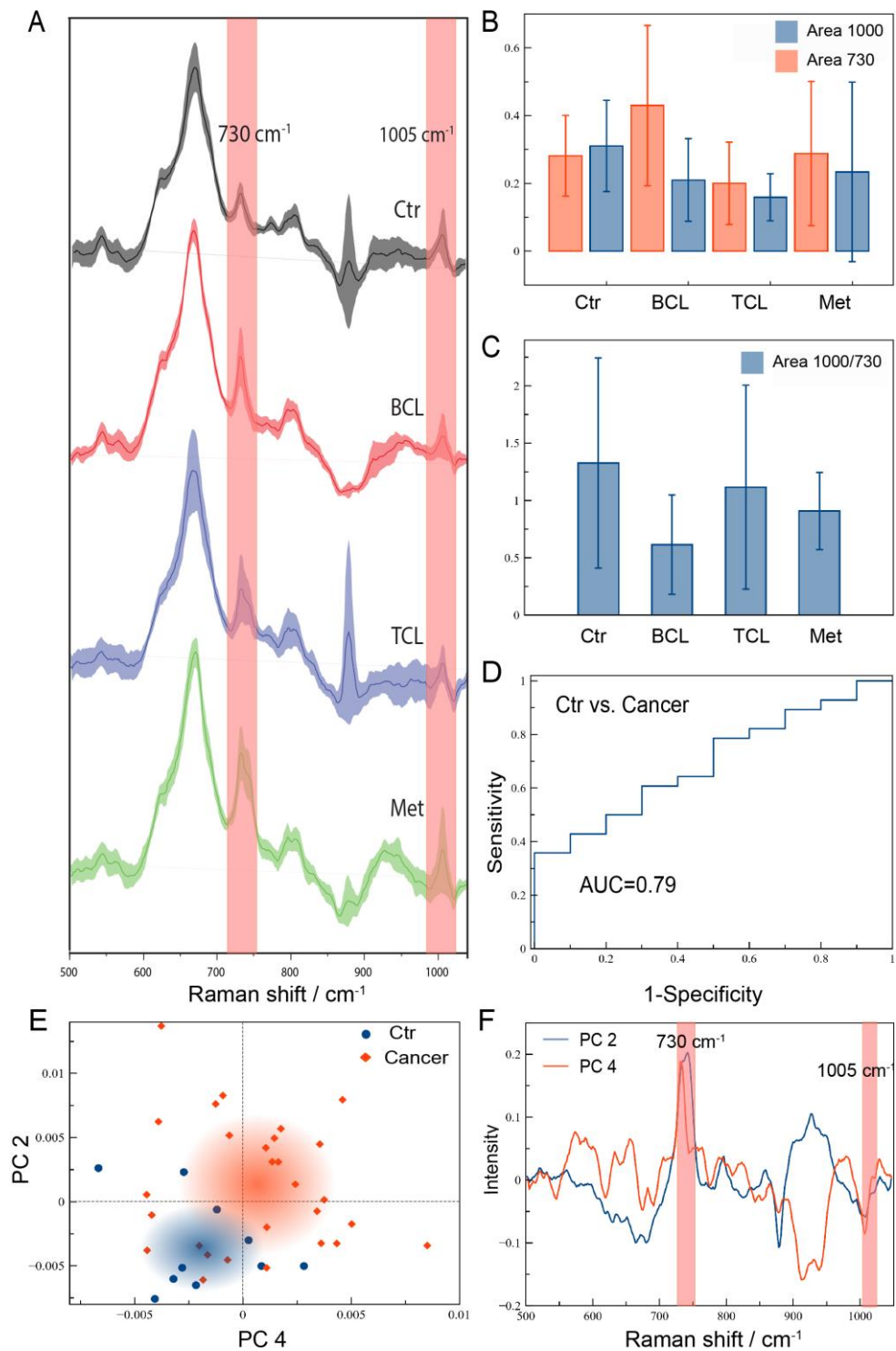
BCL și TCL prezintă intensități medii comparativ mai mici (Figura b2). Această caracteristică spectrală este în concordanță cu bine-cunoscuta hipometilare a ADN-ului malign (3, 4, 5).

**Tabelul b2.** Atribuirea provizorie a benzilor SERS ale ADN-ului. [6-11]

<b>Raman shift (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>Assignment</b>
731	Adenine, ring breathing
793	PO <sup>2-</sup>
852	
956	
1005	CH <sub>3</sub> , rocking
1236	Adenine, Cytosine or Thymine, ring stretching
1320	Adenine
1395	
1450	CH <sub>2</sub> , deformation
1501	
1546	
1570	Adenine, Guanine
1630	Thymine, Cytosine

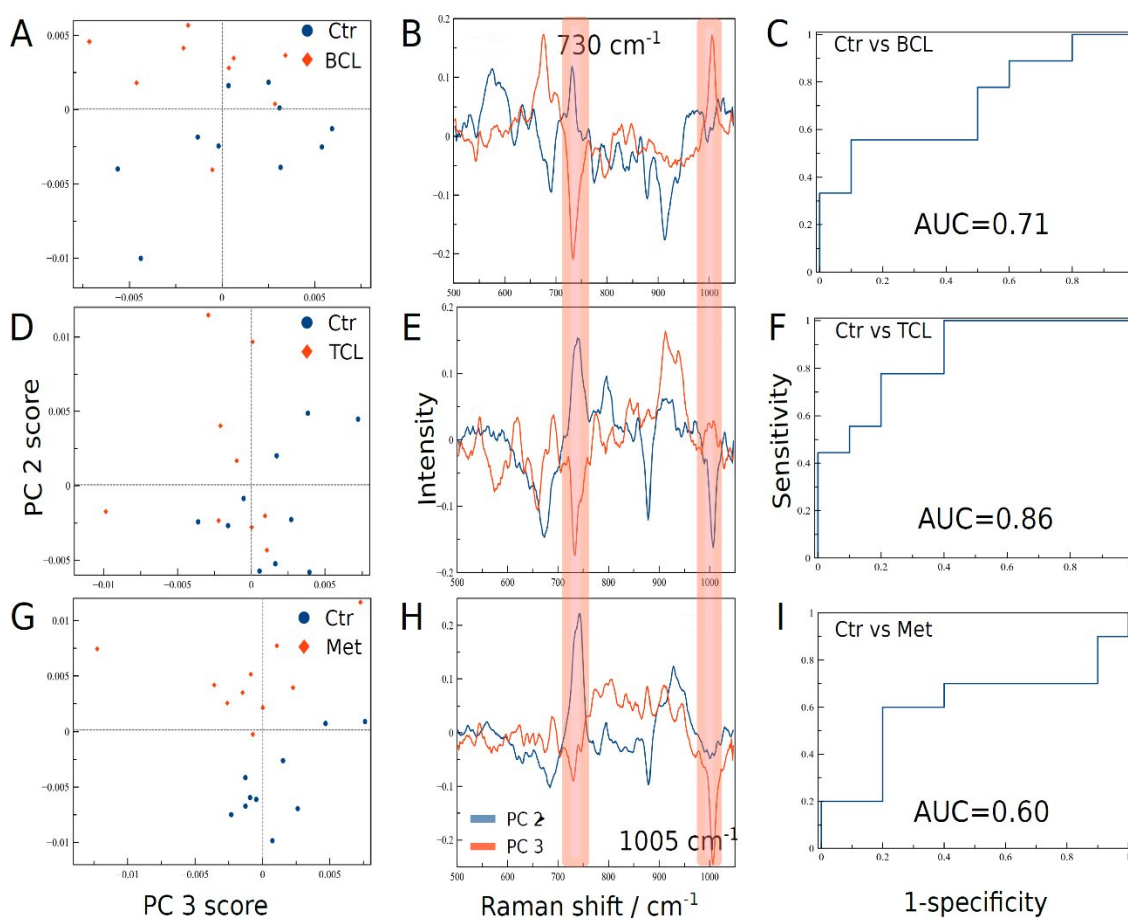
Score plot-ul rezultat din analiza PCA a spectrelor SERS pe ADN din grupurile martor și cancer este prezentat în Figura b3 E și demonstrează gruparea nesupravegheată a celor două grupuri, pe baza PC 2 și PC 4, care sunt dominate de benzi la 1005 și 730 cm<sup>-1</sup> în loading plot-urile corespunzătoare (Figura b2 F). Mai mult, PCA evidențiază și corelația inversă între banda SERS la 1005 cm<sup>-1</sup> și banda SERS la 730 cm<sup>-1</sup>.

Pentru a demonstra sensibilitatea diagnosticului metodei, adică posibilitatea de a exclude malignitatea, am comparat raportul de intensitate SERS 1005/730 cm<sup>-1</sup> între grupul control și grupul cancer (Figura b3 C) (adică BCL, TCL și Met), rezultând o arie sub curbă de 0.79 (p <0.05) (Figura b3 D). De asemenea, am evaluat acuratețea clasificării obținută doar pe baza benzilor SERS de la 1005 sau 730 cm<sup>-1</sup>, dar nu a fost atinsă nicio semnificață statistică.



**Figura b3.** (A) Spectrele SERS medii ale ADN-ului ganglionar limfatic de la  $n = 10$  subiecți martori (Ctr),  $n = 9$  pacienți cu limfom cu celule B (BCL),  $n = 9$  pacienți cu limfom cu celule T (TCL) și  $n = 10$  pacienți cu metastaze (Met). Zona umbrită reprezintă deviația standard. (B) Aria benzilor SERS la  $730\text{ cm}^{-1}$  și  $1005\text{ cm}^{-1}$ . (C) Raportul ariei SERS  $1005/730\text{ cm}^{-1}$ . (D) Curba ROC pentru raportul ariei SERS  $1005/730\text{ cm}^{-1}$  corespunzătoare discriminării dintre grupul martor și grupul cancer cuprinzând toate probele de tip cancer. (E) Score plot-ul rezultat din analiza PCA care demonstrează gruparea nesupravegheată a grupurilor control și cancer pe baza a două componente principale, PC 2 și PC 4. Zona umbrită reprezintă deviația standard a valorilor score din fiecare grup. (F) Loadings plot-urile corespunzătoare componentelor PC 2 și PC 4 cu benzile SERS evidențiate la  $1005$  și  $730\text{ cm}^{-1}$ .

Subiecții martori pot fi discriminați de fiecare tip de cancer (BCL, TCL și Met) pe baza spectrelor SERS a ADN-ului. Pentru a demonstra că, pe lângă sensibilitatea diagnosticului, analiza SERS a ADN-ului este, de asemenea, specifică pentru fiecare tip de malignitate, am efectuat trei comparații independente între spectrele SERS ale ADN-ului de la controale și de la pacienții cu BCL, TCL și Met. Rezultatele sunt prezentate în Figura b4, demonstrând gruparea nesupravegheată a grupurilor. Cea mai bună separare între grupul de control și grupurile BCL, TCL și Met luate separat (Figura b4 A, D, G, respectiv) a fost realizată pe baza PC 2 și PC 3. Loadings plot-urile corespunzătoare componentelor PC 2 și PC 3 sunt dominate din nou de benzile SERS de la 1005 și 730  $\text{cm}^{-1}$  (Figurile b4 B, E, H).

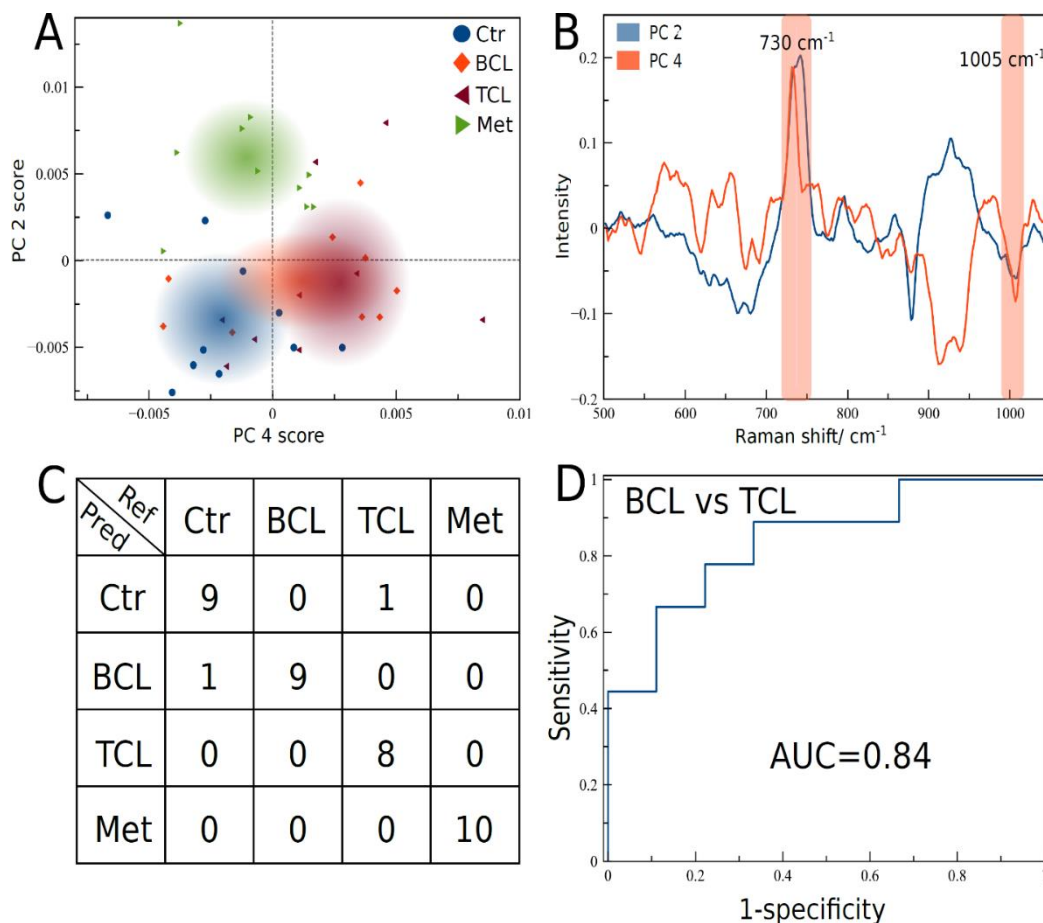


**Figura b5.** Analiza PCA a spectrelor SERS ale ADN-ului ganglionar de la  $n = 10$  subiecți martori și  $n = 9$  pacienți cu limfom cu celule B (BCL),  $n = 9$  pacienți cu limfom cu celule T (TCL) și  $n = 10$  pacienți cu metastaze ale ganglionilor (Met) și ROC corespunzător benzii SERS de la 1005  $\text{cm}^{-1}$ . (A, D, G) Score plot-ul rezultat din componentele PC 2 și PC 3 evidențiază tendința de separare a grupului de control de grupurile BCL, TCL și respectiv Met. (B, E, H) Loadings plot corespunzătoare componentelor PC 2 și PC 3 pentru grupurile BCL, TCL și Met evidențiază corelația inversă între benzile SERS la 1005  $\text{cm}^{-1}$  și 730  $\text{cm}^{-1}$ . (C, F, I) Curba ROC obținută de banda SERS la 1005  $\text{cm}^{-1}$  pentru discriminarea între grupul de control și respectiv grupurile BCL, TCL și Met.

Curbele ROC corespunzătoare discriminării dintre grupul de control și grupurile BCL, TCL și Met pe baza ariei de sub banda SERS de la  $1005\text{ cm}^{-1}$  sunt prezentate în Figura b4 C, F, I, producând o arie sub curbă de 0.71 ( $p < 0.05$ ) pentru BCL și 0.86 ( $p < 0.05$ ) pentru TCL. Pentru grupul Met, aria de sub curbă a fost 0.60, dar nu a fost atinsă nicio semnificație statistică. De asemenea, am evaluat acuratețea clasificării între controale și fiecare dintre cele trei grupuri de cancer, pe baza benzii SERS de la  $730\text{ cm}^{-1}$  sau raportul ariei  $1005/730\text{ cm}^{-1}$ , dar nu a fost atinsă nicio semnificație statistică.

**Analiza SERS a ADN-ului conduce la un diagnostic diferențial între tipurile de cancer, inclusiv între BCL și TCL.** Pentru a investiga posibilitatea de a realiza un diagnostic diferențial între grupurile BCL, TCL și Met, am efectuat analiza PCA, care a evidențiat tendința către o grupare nesupravegheată a grupurilor, pe baza componentelor principale PC 2 și PC 4 (Figura b5 A). Loadings plot-ul corespunzător componentelor principale PC 2 și PC 4 prezintă benzile SERS la  $1005$  și  $730\text{ cm}^{-1}$  (Figura b5 B). Deși grupurile se suprapun în score plot-ul rezultat din analiza PCA, analiza PCA-QDA demonstrează că fiecare grup poate fi clasificat cu o precizie excelentă, în ciuda numărului redus de probe din fiecare grup (Figura b5 C). PCA-QDA a obținut o precizie generală de 94.44% în diagnosticul diferențial între grupurile BCL, TCL și Met.

Matricea de confuzie multidimensională obținută de PCA-QDA (Figura b5 C) corespunde unei precizii de clasificare de 90% pentru grupul de control, 100% pentru BCL, 89% pentru TCL și 100% pentru Met. Curba ROC obținută de aria de sub banda SERS de la  $730\text{ cm}^{-1}$  pentru diagnosticul diferențial între BCL și TCL este prezentată în Figura b5 D, și corespunde unei arii sub curbă de 0.84 ( $p < 0.05$ ). De asemenea, am evaluat acuratețea clasificării obținută doar de banda SERS la  $1005\text{ cm}^{-1}$  sau raportul ariei SERS  $1005/730\text{ cm}^{-1}$ , dar nu a fost atinsă nicio semnificație statistică.



**Figura b5.** Rezultatele PCA și QDA pentru diagnosticul diferențial între grupurile de control (Ctr), limfomul cu celule B (BCL), limfomul cu celule T (TCL) și pacienții cu metastaze ale ganglionilor limfatici (Met). (A) Score plot-ul corespunzător componentelor principale PC 2 și PC 4. Regiunile umbrite reprezintă deviația standard în valorile scorului fiecărei clase. (B) Loadings plot-ul corespunzător componentelor PC 2 și PC 4, dominate de benzile SERS de la 1005 și 730  $\text{cm}^{-1}$ . (C) Matricea de confuzie multidimensională produsă de PCA-QDA. (D) ROC obținut de banda SERS la 730  $\text{cm}^{-1}$  pentru diagnosticul diferențial între BCL și TCL.

## Discuție

Metilarea ADN-ului este unul dintre cele mai bine înțelese mecanisme epigenetice, care reglează expresia genelor fără a modifica secvența de ADN (12). Reglarea epigenetică bazată pe metilarea ADN-ului este unul dintre cele mai importante substraturi moleculare ale diferențierii celulare, clasic descris de Waddington drept „pereți” între diferite căi de diferențiere (13).

Recent, am arătat că ADN-ul extras din sângele periferic al pacienților cu leucemie mieloidă acută prezintă intensități mai scăzute ale benzii de 1005  $\text{cm}^{-1}$  atribuite metilcitozinei, în conformitate cu hipometilarea bine descrisă a ADN-ului malign (3). Continuând cercetările anterioare, în experimentele și rezultatele descrise în prezent, am analizat ADN-ul extras din probe de țesut din ganglioni limfatici încorporate în parafină și fixate cu formalină de la

pacienți cu ganglioni limfatici reactivi (subiecți martori) și pacienți cu BCL, TCL și Met. Rezultatele demonstrează că SERS poate capta modificările ADN-ului extras din ganglionii limfatici care însoțesc apariția limfomului. Astfel, banda SERS de la  $1005\text{ cm}^{-1}$ , atribuită metilcitozinei, prezintă intensități mai mici la pacienții cu cancer comparativ cu subiecții martor, în conformitate cu raportul nostru anterior privind leucemia mieloidă acută (Figura b1 A, B). Aria de sub curba ROC corespunzătoare raportului ariei  $1005/730\text{ cm}^{-1}$  SERS de la pacienții cu cancer și martori a fost de 0.79 ( $p < 0.05$ ) (Figura b5 D). A fost de asemenea evaluată posibilitatea de a obține un diagnostic între subiecții martor și BCL, TCL și Met, obținându-se o arie sub curbă semnificativ statistică de 0.71 pentru BCL și 0.86 pentru TCL pe baza zonei sub banda SERS la  $730\text{ cm}^{-1}$  (Figura b4).

În afară de posibilitatea discriminării între ADN de la ganglionii limfatici reactivi și cancer, s-a demonstrat și diagnosticul diferențial între tipurile de cancer. Pe baza PCA-QDA, grupurile control, BCL, TCL și Met au fost discriminate între ele cu o precizie generală de 94.44% (Figura 3 C). În mod similar, ROC corespunzător benzii SERS de la  $730\text{ cm}^{-1}$  a dat o arie sub curbă de 0.84 în discriminarea între grupurile BCL și TCL (Figura b5 D).

Comparativ cu alte metode de analiză a metilării ADN-ului, cum ar fi ELISA sau secvențierea ADN-ului, SERS este mult mai rapid, având un timp de rotație de aproximativ 5 minute. Acest lucru face ca SERS să fie ideal pentru analize de tip point-of-care, care ar putea ghida medicii până când se așteaptă rezultatele definitive ale patologiei moleculare.

## Referințe

1. Jurj A, Pop L, Petrushev B, Pasca S, Dima D, Frinc I, et al. Exosome-carried microRNA-based signature as a cellular trigger for the evolution of chronic lymphocytic leukemia into Richter syndrome. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*. 2018;55(7):501-15.
2. Fuentes-Mattei E, Bayraktar R, Manshour T, Silva AM, Ivan C, Gulei D, et al. miR-543 regulates the epigenetic landscape of myelofibrosis by targeting TET1 and TET2. *JCI insight*. 2020;5(1).
3. Moisoiu V, Stefancu A, Iancu SD, Moisoiu T, Loga L, Dican L, et al. SERS assessment of the cancer-specific methylation pattern of genomic DNA: towards the



detection of acute myeloid leukemia in patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2019;411(29):7907-13.

4. Leopold N, Stefancu A, Herman K, Todor IS, Iancu SD, Moisoiu V, et al. The role of adatoms in chloride-activated colloidal silver nanoparticles for surface-enhanced Raman scattering enhancement. *Beilstein J Nanotechnol*. 2018;9:2236-47.
5. Sina AA, Carrascosa LG, Liang Z, Grewal YS, Wardiana A, Shiddiky MJA, et al. Epigenetically reprogrammed methylation landscape drives the DNA self-assembly and serves as a universal cancer biomarker. *Nature communications*. 2018;9(1):4915.
6. Shankland KR, Armitage JO, Hancock BW. Non-Hodgkin lymphoma. *Lancet (London, England)*. 2012;380(9844):848-57.
7. Roman E, Smith AG. Epidemiology of lymphomas. *Histopathology*. 2011;58(1):4-14.
8. Choi SM, O'Malley DP. Diagnostically relevant updates to the 2017 WHO classification of lymphoid neoplasms. *Annals of diagnostic pathology*. 2018;37:67-74.
9. Willemze R, Cerroni L, Kempf W, Berti E, Facchetti F, Swerdlow SH, et al. The 2018 update of the WHO-EORTC classification for primary cutaneous lymphomas. *Blood*. 2019;133(16):1703-1
10. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood*. 2016;127(20):2375-90.
11. Brown NA, Elenitoba-Johnson KS. Update from the 4th Edition of the World Health Organization Classification of Head and Neck Tumours: Hematolymphoid Tumours. *Head and neck pathology*. 2017;11(1):96-109.
12. Chen Z, Li S, Subramaniam S, Shyy JYJ, Chien S. Epigenetic Regulation: A New Frontier for Biomedical Engineers. *Annual Review of Biomedical Engineering*. 2017;19(1):195-219.
13. Tronick E, Hunter RG. Waddington, Dynamic Systems, and Epigenetics. *Front Behav Neurosci*. 2016;10:107-.

### Act. 3.7 Diseminarea și alte activități privind vizibilitatea

Rezultatele științifice obținute în tematica proiectului, au fost publicate în reviste ISI citate internațional , Clarivate, WEB of Science:

1. C. Iacovita, I. Fizeșan, A. Pop, L. Scorus, R. Dudric, G. Stiufiuc, N. Vedeanu, R. Tetean, F. Loghin, R. Stiufiuc, C. M. Lucaciu, In Vitro Intracellular Hyperthermia of Iron Oxide Magnetic Nanoparticles, Synthesized at High Temperature by a Polyol Process, *Pharmaceutics*, 12, 424 (2020) 41, 845. - 1 citare, FI = 4.421

2. P. Teodorescu, S. Pasca, A. Jurj, G. Gafencu, J. P. Joelsson, S. Selicean, C. Moldovan, R. Munteanu, A. Onaciu, A. B.Tigu, M. Buse, A. A. Zimta, R. Stiufiuc, B. Petrushev, M. Desmirean, D. Dima, C. Vlad, J. T. Bergthorsson, C. Berce, S. Ciurea, G. Ghiaur, C. Tomuleasa, Transforming growth factor  $\beta$ -mediated micromechanics modulates disease progression in primary myelofibrosis, *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 24, 19 (2020). - FI = 4.486

3. G. F. Știufiuc, V. Toma, M. Buse, R. Mărginean, G. Morar-Bolba, B. Culic, R. Tetean, N. Leopold, I. Pavel, C. M. Lucaciu, R. I. Știufiuc, Solid Plasmonic Substrates for Breast Cancer Detection by Means of SERS Analysis of Blood Plasma, *Nanomaterials* (2020). - FI = 4.324

4. C. Iacovita, G. F. Stiufiuc, R. Dudric, N. Vedeanu, R. Tetean, R. I. Stiufiuc, C. M. Lucaciu, Saturation of Specific Absorption Rate for Soft and Hard Spinel Ferrite Nanoparticles Synthesized by Polyol Process, *Magnetochemistry* (2020). – 1 citare, FI = 1.947

5. R. Dudric, G. Souca, Á. Szatmári, T. Szilárd, S. Nitica, C. Iacovita, A. I. Moldovan, R. Stiufiuc, R.Tetean, E. Burzo, Magnetite nanoparticles for medical applications, *AIP Conference* (2020). - 1 citare

6. G. Souca, R. Dudric, C. Iacovita, A. Moldovan, T. Frentiu, R. Stiufiuc, C. M. Lucaciu, R. Stefan, E. Burzo, Physical properties of Zn doped  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanoparticles, *J. Opt. Adv. Mater.* 22, 298 – 302 (2020). – FI = 0.631

7. L. Avram, S.D. Iancu, A. Stefancu, V. Moisoiu, A. Colnita, D. Marconi, V. Donca, E. Buzdugan, R. Craciun, N. Leopold, N. Crisan, I. Coman, D. Crisna, SERS – Based Liquid Biopsy of Gastrointestinal Tumors Using a Portable Raman Device Operating in a Clinical Environment, *Journal of Clinical Medicine*, 9 (2020) 212. – FI = 3.303

8. V. Moisoiu, M. Badarinza, A. Stefancu, S.D. Iancu, O. Serban, N. Leopold, D. Fodor, Combining surface-enhanced Raman scattering (SERS) of saliva and two-dimensional shear wave elastography (2D-SWE) of the parotid glands in the diagnosis of Sjögren's syndrome, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 235 (2020) 118267. – 2 citari, FI = 3.232
9. A. Stefancu, S.D. Iancu, L.F. Leopold, N. Leopold, Contribution of chemical interface damping to the shift of surface plasmon resonance energy of gold nanoparticles, *Romanian Reports in Physics*, 72 (2020) 402. - FI = 2.147
10. C. Turcas, V. Moisoiu, A. Stefancu, A. Jurj, S.D. Iancu, P. Teodorescu, S. Pasca, A. Bojan, A. Trifa, S. Iluta, A.-A. Zimta, B. Petrushev, M. Zdrenghea, H. Bumbea, D. Coriu, D. Dima, N. Leopold, C. Tomuleasa, SERS-Based Assessment of MRD in Acute Promyelocytic Leukemia?, *Frontiers in Oncology*, 10 (2020). – FI = 4.848
11. L. Avram, Stefancu, A., Crisan, D., Leopold, N., Donca, V., Buzdugan, E., Craciun, R., Andras, D., Coman, I."Recent advances in surface enhanced Raman spectroscopy based liquid biopsy for colorectal cancer (Review)". *Experimental and Therapeutic Medicine* 20.6 (2020): 213. - FI = 1.785
12. Dippong Thomas, Levei Erika Andrea, Cadar Oana, Deac Iosif-Grigore, Lazar Mihaela, Borodi Gheorghe, Petean Ioan, Effect of amorphous SiO<sub>2</sub> matrix on structural and magnetic properties of Cu<sub>0.6</sub>Co<sub>0.4</sub>Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub> nanocomposites, *Journal of alloys and compounds*, 849 (2020) 156695 (1-10). - FI = 4.65
13. Dippong Thomas, Cadar Oana, Deac Iosif-Grigore, Lazar Mihaela, Borodi Gheorghe, Levei Erika Andrea, Influence of ferrite to silica ratio and thermal treatment on porosity, surface, microstructure and magnetic properties of Zn<sub>0.5</sub>Ni<sub>0.5</sub>Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub> nanocomposites, *Journal of alloys and compounds*, 828 (2020) 154409 (1-11). - 2 citări, FI = 4.65
14. Dippong Thomas, Deac Iosif-Grigore, Cadar Oana, Levei Erika Andrea, Petean Ioan, Impact of Cu<sup>2+</sup> substitution by Co<sup>2+</sup> on the structural and magnetic properties of CuFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> synthesized by sol-gel route, *Materials characterization*, 163 (2020) 110248 (1-11). – FI = 3.562
15. Dippong Thomas, Cadar Oana, Levei Erika Andrea, Deac Iosif-Grigore, Microstructure, porosity and magnetic properties of Zn<sub>0.5</sub>Co<sub>0.5</sub>Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub> nanocomposites prepared by sol-gel method using different polyols *Journal of magnetism and magnetic materials*, 489 (2020) 166168 (1-11) -7 citări, FI = 2.717

Un număr de 14 reviste se află în categoria 1 și 2 în clasificarea făcută de ANSTI. Factorul de impact total al revistelor de mai sus este de 47.31, cu o medie de 3.4 pe revistă.

Dat fiind importanța rezultatelor științifice și vizibilitatea acestora, lucrările publicate în cadrul proiectului, în perioada 2018 – 2020, au fost citate în peste 200 de lucrări științifice, iar cele apărute în acest an, în 14 lucrări, publicate pe plan internațional.

Metoda de elaborare a nanoparticulelor dezvoltată în cadrul proiectului și relatată în AIP Conf. Proc. este evaluată atât din punct de vedere științific precum și economic în revista *Molecules*, aflându-se printre cele 8 metode cunoscute pe plan internațional – Fig. a1



Review

## Multifunctional Magnetic Oxide Nanoparticle (MNP) Core-Shell: Review of Synthesis, Structural Studies and Application for Wastewater Treatment

Ebenezer C. Nnadozie and Peter A. Ajibade

Table 1. Comparative analysis of preparation methods for magnetite nanoparticles.

Nos	Method	Advantages	Disadvantages	* Cost	Ref
1.	Hydrothermal	Single step synthesis; high Ms value; highly crystalline particles	Cubic particles; large particle sizes; long reaction time; polydispersed size distribution; high reaction temperature	\$44.01	[54]
2.	Thermal Decomposition	Medium particle sizes; high Ms; short reaction time	Cubic-spherical shapes; polydispersed size distribution	\$73.84	[55]
3.	Co-precipitation	Spherical and small particles; high Ms; low reaction temperature; one-step synthesis; monodispersed size distribution	Agglomerated particles	\$39.50	[56]
4.	Sol-gel	Spherical nanoparticles; small particle sizes	Polydispersed size distribution; long reaction time; multi-step reaction process	\$99.12	[57]
5.	Sonochemical	High Ms; short reaction time; one-step reaction;	Nanocubes; large particle sizes; polydispersed size distribution	\$84.39	[58]
6.	Polyol	Spherical and small particles; moderate Ms; monodispersed size distribution	Multi-precursors and reaction steps.	\$141.07	[59]
7.	Electrochemical	High Ms; small particle size; monodispersed size distribution; room temperature synthesis	Prone to impurity; quasi-spherical particles; hydrophobic nanoparticles	\$32.55	[60]
8.	Microemulsion	Small particle size; monophased product; monodispersed size distribution	Agglomerated and cubic particles; multi-precursors	\$242.72	[61]

\* Particle size: small (2–15 nm); medium (16–25 nm); large (26 nm and above); saturation magnetization (Ms): low (0–30 emug<sup>-1</sup>); moderate (31–69 emug<sup>-1</sup>); high (70 emug<sup>-1</sup> and above); total cost was calculated based on the cost of (1g or 1L) of primary precursor(s) as obtained from (MERCK South Africa) and energy cost per Kwh of electricity ([https://www.globalpetrolprices.com/data\\_electricity\\_download.php](https://www.globalpetrolprices.com/data_electricity_download.php)).

55. Dudric, R.; Souca, G.; Szatmári, Á.; Szilárd, T.; Nitica, S.; Iacovita, C.; Moldovan, A.I.; Stiuftuc, R.; Tetean, R.; Burzo, E. Magnetite Nanoparticles for Medical Applications. In Proceedings of the AIP Conference, Tamil Nadu, India, 21–22 February 2020.

Fig. a1 Analiza comparativă a metodelor de preparare a nanoparticulelor de magnetită

Rezultatele științifice obținute în cadrul proiectului au fost prezentate la doua conferințe științifice:

1. Nicolae Leopold, SERS Liquid Biopsy by Analysis of Metabolites, Proteins and DNA, National Online Conference of Biophysics, Brasov, 14<sup>th</sup> – 16<sup>th</sup> June, 2020, oral presentation - Contributed talk O24, Book of Abstracts p.48, Ed. Monica Florescu, Transilvania University Press, 2020

2. S.D. Iancu, A. Stefancu, V. Moisoiu, C. Tomuleasa, N. Leopold, Ca<sup>2+</sup> and Cl<sup>-</sup> Adion Mediated DNA Adsorption to Silver Nanoparticles for SERS Detection of Cancer Specific Methylation Pattern, National Online Conference of Biophysics, Brașov, 14<sup>th</sup> – 16<sup>th</sup> June, 2020, poster presentation T4P6, Book of Abstracts p. 84, Ed. Monica Florescu, Transilvania University Press, 2020.