

## Raport științific

### Rezumatul Execuției Etapei 1

Durata Etapei: Aprilie 2024 – Iulie 2024

Titlul Etapei: *Managementul proiectului și Sinteza și caracterizarea nanoparticulelor de argint și aur.*

În cadrul primei etape, s-au realizat cu succes activități cuprinse în pachetul de lucru corespunzător managementului proiectului, precum și primele 3 activități aferente pachetului de lucru 1 intitulat *Fabricarea senzorului plasmonic flexibil hibrid*. Dintre cele mai importante rezultate științifice și manageriale obținute menționăm aici:

- i) *Conceperea unei strategii experimentale pentru implementarea cu succes a proiectului propus;*
- ii) *Menținerea unui contact constant cu AOȘR prin prezentarea rezultatelor preliminarilor aferente etapei 1 în cadrul Sesiunii științifice a tinerilor cercetători din competiția AOSR-TEAMS ediția 2023-2024 și ediția 2024-2025;*
- iii) *Sintetiza și caracterizarea cu succes a soluțiilor coloidale de nanoparticule de aur și de argint;*
- iv) *Realizarea unui studiu aprofundat al literaturii de specialitate în vederea redactării unui manuscris de tip review;*

**WP. 0 Managementul proiectului.** În mod specific, acest pachet de lucru se desfășoară pe întreaga durată a proiectului și are ca obiective principale: **O1.** Managementul resurselor și a bugetului într-o manieră eficientă pentru implementarea cu succes a propunerii de proiect; **O2.** Organizarea de întâlniri regulate cu membrii echipei pentru evaluarea progresului în activitatea de cercetare, identificarea riscurilor și stabilirea strategiilor de remediere a acestora; **O3.** Menținerea unui contact constant cu AOȘR pentru comunicări și rapoarte periodice. Astfel, pentru implementarea cu succes a proiectului propus, s-au organizat întâlniri cu membrii proiectului pentru a dezvolta o strategie de abordare a activității de cercetare propuse. Pentru a îndeplini obiectivele principale ale proiectului, activitatea de cercetare a fost împărțită în 5 etape de implementare, după cum urmează:

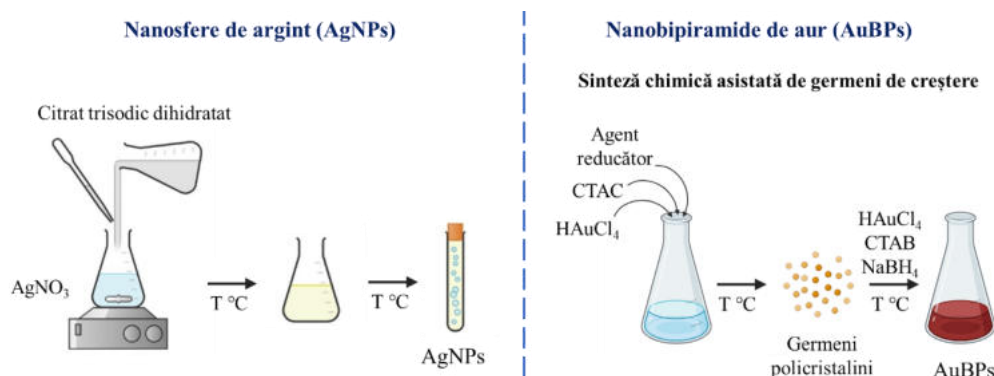
- i) Sinteza și caracterizarea nanoparticulelor de argint și aur; ii) Fabricarea și caracterizarea

hidrogelului; iii) Fabricarea senzorului plasmonic hibrid final; iv) Funcționalizarea cu biomolecule de recunoaștere specifică și determinarea capacității de detecție a cortizolului și v) Validarea senzorului plasmonic hibrid final. Toate aceste etape de implementare au ca scop final valorificarea rezultatelor obținute prin diseminarea acestora.

**WP. 1 Fabricarea senzorului plasmonic flexibil hibrid.** Primul pachet de lucru are ca obiective principale: **O1.** Sinteza controlată de nanoparticule de Ag și Au având diferite forme și rapoarte de aspect; **O2.** Fabricarea hidrogelului polimeric și **O3.** Obținerea senzorului plasmonic hibrid prin integrarea nanoparticulelor metalice în matricea hidrogelului. Dintre acestea, în această etapă de raportare, s-au atins cu succes primele două obiective propuse. Rezultatele experimentale obținute sunt reținute în vederea depunerii unei potențiale cereri de brevet, datorită gradului de noutate ridicat prezentat. În cadrul acestei etape, s-au realizat cu succes primele 3 activități de cercetare, după cum urmează:

**Activitatea 1.1. Sinteza controlată de nanoparticule de aur și argint în soluție coloidală.** În cadrul acestei activități s-au sintetizat prin metode chimice nanobipiramide de aur (AuBPs) și nanosfere de argint (AgNPs) în soluție apoasă (**Schema 1**). Aceste abordări de fabricare a nanoparticulelor metalice au fost dezvoltate anterior de către membrii proiectului (*Anal. Chem.* **2018**, *90(14)*, 8567–8575; *Analysis. Materials.* **2023**, *16(15)*, 5244). Concret, AuBPs s-au obținut în doi pași: i) pregătirea germenilor, care presupune reducerea ionilor de aur în prezența clorurii de cetiltrimetilamoniu (CTAC), acid nitric, borohidruură de sodiu și acid citric și tratarea termică a soluției finale la 85 °C timp de 80-90 minute; și ii) creșterea nanoparticulelor bipiramidale pe baza acestora în prezența bromurii de cetiltrimetilamoniu (CTAB), clorură aurică, ioni de argint și hidroxichinolină (HQL). Ulterior, soluția finală de creștere a fost tratată la 45 °C timp de 50 de minute. Pentru a modula controlat raportul de aspect al AuBPs, s-a variat volumul de germeni adăugat în soluția de creștere. Totodată, AgNPs au fost sintetizate chimic utilizând metoda reducerii chimice, o metodă ce prezintă avantajele de a fi ușor de utilizat și de a oferi un randament crescut de reacție. În mod specific, Ag NPs au fost sintetizate în soluție apoasă prin dizolvarea AgNO<sub>3</sub> în apă distilată și adăugarea prin picurare a unei soluții de citrat trisodic dihidratat (TSC) peste soluția precursoră de AgNO<sub>3</sub> în vederea formării nanoparticulelor de argint. Soluția finală a

fost supusă agitării până ce culoarea s-a schimbat, indicând realizarea reacției chimice și, implicit, obținerea AgNPs, care au fost păstrate ulterior la temperatura camerei.



**Schema 1.** Ilustrații schematice ale sintezelor chimice implementate pentru obținerea nanoparticulelor de argint și, respectiv, aur.

### *Activitatea 1.2. Caracterizarea optică și morfologică a soluțiilor coloidale în soluție apoasă.*

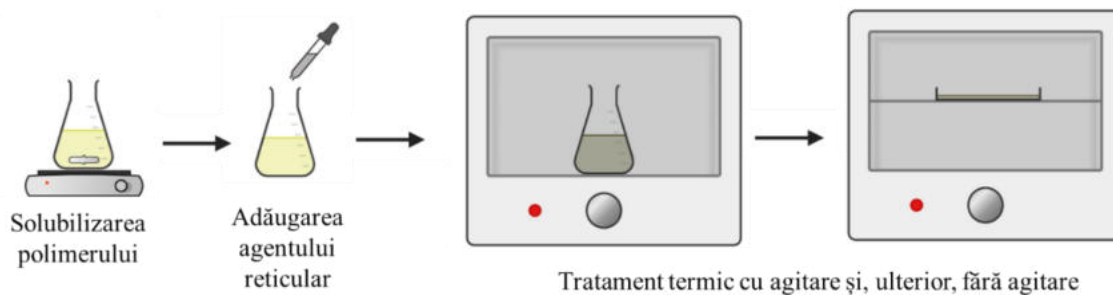
Următorul pas după sintetizarea cu succes a nanoparticulelor metalice, a fost ca acestea să fie caracterizate din punct de vedere optic – proprietatea de rezonanță plasmonică de suprafață localizată (LSPR), și morfologic. În acest sens, s-au înregistrat spectrele de extincție ale nanoparticulelor în soluție apoasă utilizând un spectrofotometru UV-Vis-NIR Spectrum 210 de la Jena Analytics. Spectrele de extincție obținute prezintă benzile LSPR caracteristice: i) AgNPs – o bandă plasmonică localizată la 454 nm; și ii) AuBPs – două benzi LSPR caracteristice oscilațiilor de-a lungul axelor transversală și longitudinală localizate la 513 nm și, respectiv, la 671, 705 și 759 nm. Astfel, s-a demonstrat obținerea soluțiilor coloidale de AgNPs și AuBPs în soluție apoasă cu răspuns optic controlabil și reproductibilitate crescută.

Mai departe, morfologia nanoparticulelor metalice sintetizate a fost confirmată folosind microscopul electronic de baleiaj și transmisie Hitachi HD-2700, dotat cu anexa EDX cu doi detectori, Aztec, Oxford Instruments. Probele suspendate în alcool etilic, au fost depuse cu ajutorul unei pipete automate, pe o grilă electrolică acoperită cu o peliculă de carbon. S-a absorbit supernatantul iar fragmente de probă au rămas atașate pe pelicula de carbon a grilei. Proba a fost curățată cu ajutorul unei unități de decontaminare probe cu ajutorul ozonului Hitachi ZONE TEM. După decontaminare, proba a fost introdusă în microscopul electronic și s-au efectuat imagini la

diferite mărimi, atât în modul de scanare cât și transmisie. Imaginile microscopice TEM au fost ulterior analizate folosind software-ul disponibil ImageJ. Din analiza a mai mult de 100 de particule, s-a demonstrat omogeneitatea crescută în ceea ce privește forma și dimensiunea nanoparticulelor obținute prin procesele chimice utilizate.

### ***Activitatea 1.3. Fabricarea hidrogelului polimeric utilizat ca matrice pentru senzorul portabil.***

În cadrul acestei activități a fost realizată sinteza chimică a hidrogelului polimeric folosit ca matrice pentru integrarea AgNPs și AuBPs. În mod specific, hidrogelul propus în cadrul proiectului a fost realizat din agar și poli(etilenglicol) (PEG) în vederea utilizării unui polimer natural, anume agarul și a unui polimer sintetic, anume PEG-ul care va crește rezistența mecanică a hidrogelului final. Agarul, un polizaharid natural, va crește biocompatibilitatea gelului final transformându-l într-o matrice pretabilă pentru aplicații biomedicale. În vederea analizării efectelor temperaturii și ale concentrației chimice utilizate, hidrogelul a fost realizat printr-o sinteză chimică, utilizând temperaturi de reacție diferite și concentrații diferite de agar (**Schema 2**). Polimerul PEG a fost utilizat în concentrație în toate probele. Sinteza chimică a fost realizată pornind de la pudra de agar, care a fost dizolvată în apă distilată. Temperatura de dizolvare a fost setată diferit, parametru ce ne va oferi informații asupra variației porozității gelului în funcție de temperatură. Odată dizolvate, în fiecare probă a fost adăugat PEG. De asemenea, pentru a avea o viziune cât mai clară asupra efectelor parametrilor de reacție și pentru a obține o rezistență mecanică cât mai bună, setul de probe a fost împărțit în două moduri: probe reticulate și probe nereticulate. Agentul de reticulare ales a fost glutaraldehida și a fost adăugat în fiecare probă pentru care s-a păstrat ca și control și probă nereticulată. Hidrogelurile au fost turnate în vase Petri și au fost lăsate să se usuce peste noapte.



**Schema 2.** Ilustrare schematică a protocolului propus de fabricare a hidrogelului polimeric.

## **Rezumatul Execuției Etapei 2**

Durata Etapei: August 2024 – Decembrie 2024

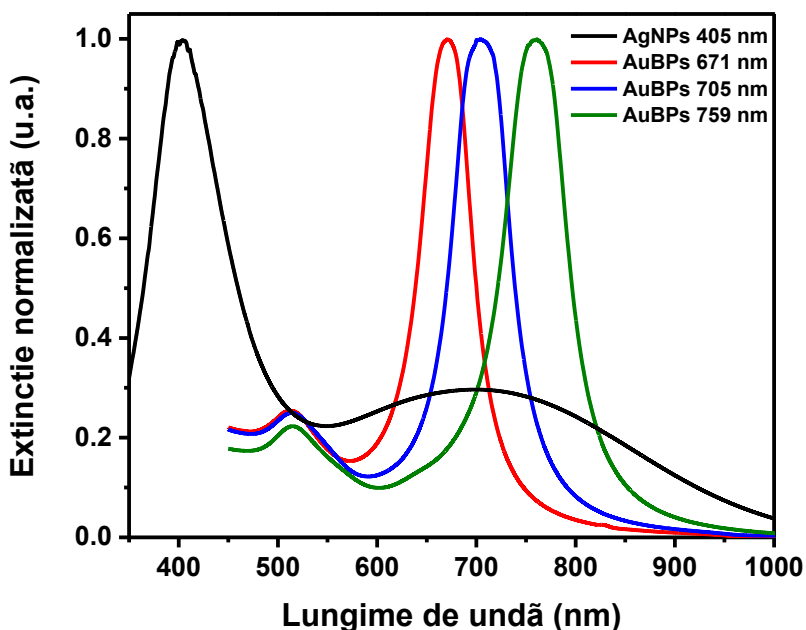
Titlul Etapei: *Fabricarea senzorului plasmonic hibrid.*

În cadrul celei de-a doua etape, s-au realizat cu succes ultimele activități aferente pachetului de lucru 1 intitulat *Fabricarea senzorului plasmonic flexibil hibrid*. Dintre cele mai importante rezultate științifice și manageriale obținute menționăm aici:

- i) *Optimizarea strategiei experimentale propuse;*
- ii) *Menținerea unui contact constant cu AOȘR prin prezentarea rezultatelor preliminarilor aferente etapei 1 în cadrul Sesiunii științifice a tinerilor cercetători din competiția AOSR-TEAMS ediția 2023-2024 și ediția 2024-2025;*
- iii) *Determinarea sensibilității de detecție LSPR a particulelor;*
- iv) *Integrarea cu succes a nanoparticulelor plasmonice sintetizate în matricea polimerică a hidrogelului;*
- v) *Redactarea manuscrisul de tip review.*

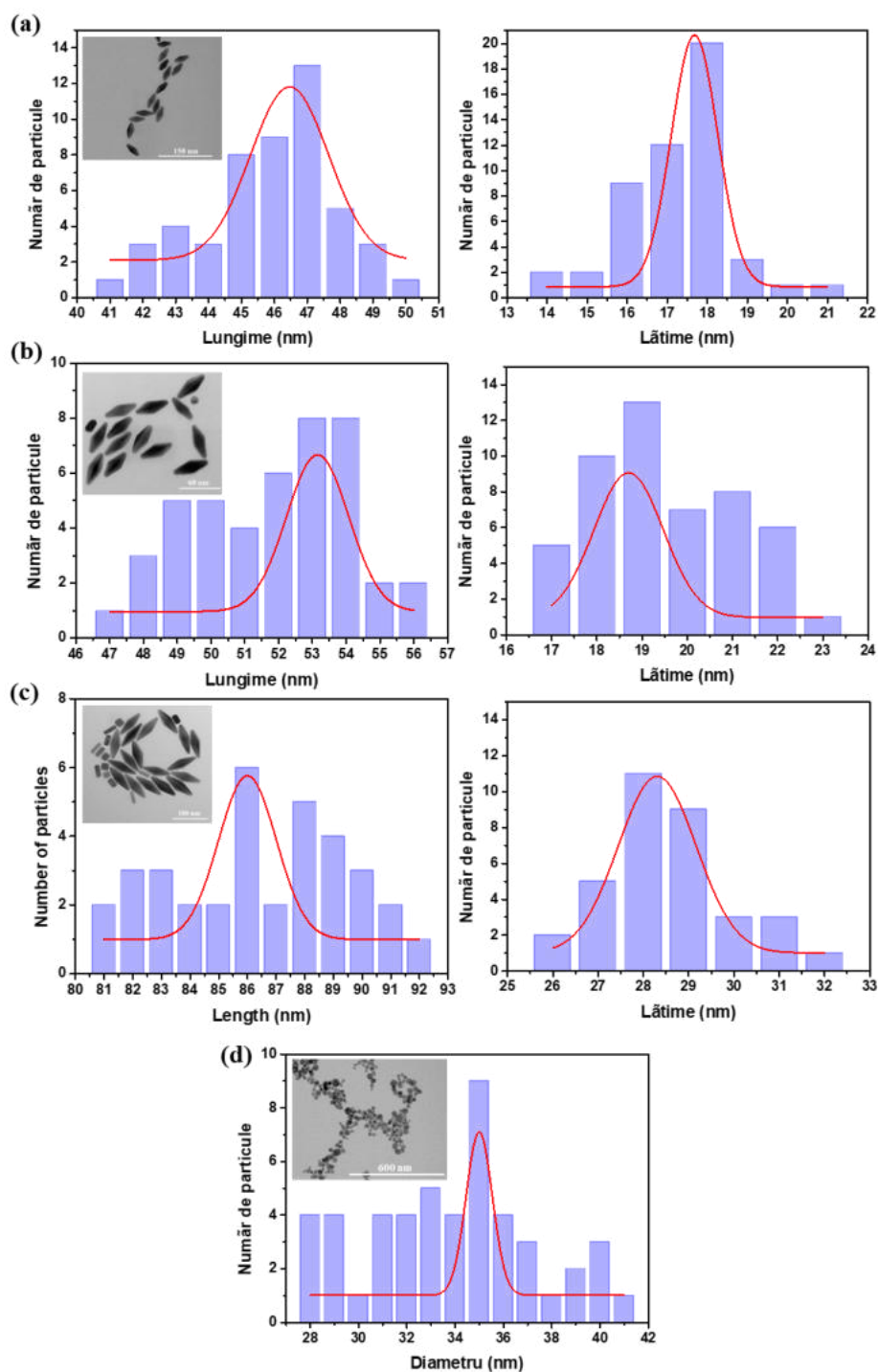
### ***Activitatea 1.2. Caracterizarea optică și morfologică a soluțiilor coloidale în soluție apoasă – partea a II-a.***

În cadrul celei de-a doua etape de execuție a proiectului, s-a optimizat procesul de sinteză a nanoparticulelor de argint (AgNPs), întrucât soluția coloidală a prezentat stabilitate mai redusă. În acest sens, s-a îmbunătățit procesul de reducere a ionilor de argint prin adăugarea unui agent reducător mai puternic, și anume borohidrat de sodiu. Astfel, s-a revenit de asemenea și asupra caracterizării nanoparticulelor obținute. Spectrele de extincție normalizate ale nanoparticulelor sunt prezentate în **Figura 1**. AgNPs nou sintetizate prezintă o bandă LSPR localizată la 405 nm și încă o bandă care se întinde pe întreg platoul de la 550 la 1000 nm apărută cel mai probabil datorită prezenței unor nanopaticule autoasamblate.



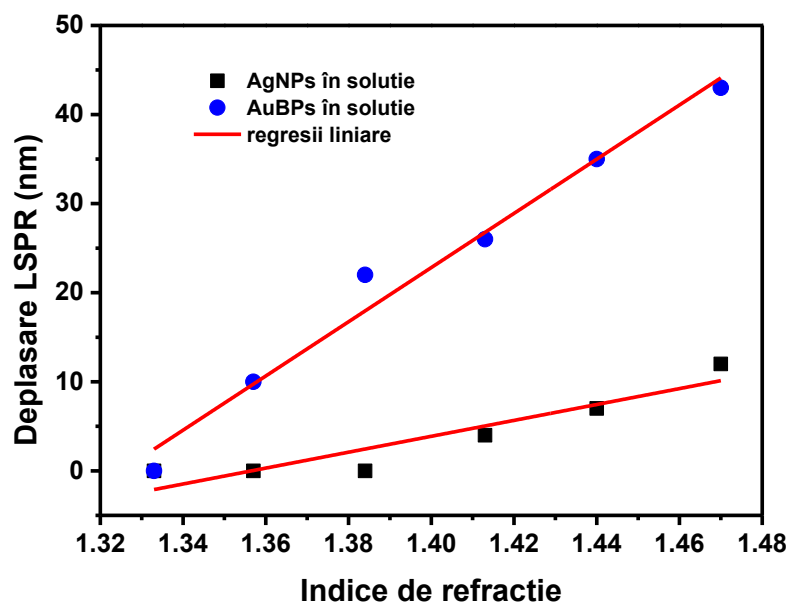
**Figura 1.** Spectrele normalizate de extincție ale nanoparticulelor sintetizate prin metode chimice de reducere a ionilor metalici.

Următorul pas a fost de a analiza mai amănunțit morfologia nanoparticulelor în raport cu răspunsul lor plasmonic. Astfel, pe baza analizei imaginilor TEM obținute în cadrul etapei anterioare s-au realizat studii statistice ale dimensiunilor nanoparticulelor prin crearea de histogramme de distribuție a dimensiunilor nanoparticulelor (**Figura 2**): în cazul nanobipiramidelor s-a urmărit atât evoluția lungimii cât și a lățimii nanostructurilor, în timp ce pentru AgNPs s-a studiat diametrul acestora. În mod specific, s-au determinat dimensiuni lungime  $\times$  lățime de  $46 \pm 2 \text{ nm} \times 18 \pm 1 \text{ nm}$  pentru AuBPs cu răspuns plasmonic la 690 nm,  $53 \pm 4 \text{ nm} \times 20 \pm 2 \text{ nm}$  pentru AuBPs cu LSPR la 720 nm și  $86 \pm 3 \text{ nm} \times 29 \pm 1 \text{ nm}$  pentru AuBPs cu bandă de extincție localizată la 760 nm. Pentru AgNPs, s-a determinat un diametru mediu de  $34 \pm 3 \text{ nm}$ . Se observă pentru nanoparticulele bipiramidale ca odată cu translatarea răspunsului LSPR spre lungimi de undă mai mari dimensiunea acestora crește atât în lungime cât și în lățime.



**Figura 2.** Histograme de distribuție a dimensiunilor AuBPs cu LSPR la 690 (a), 720 (b), 760 nm (c) și diametrului AgNPs (d).

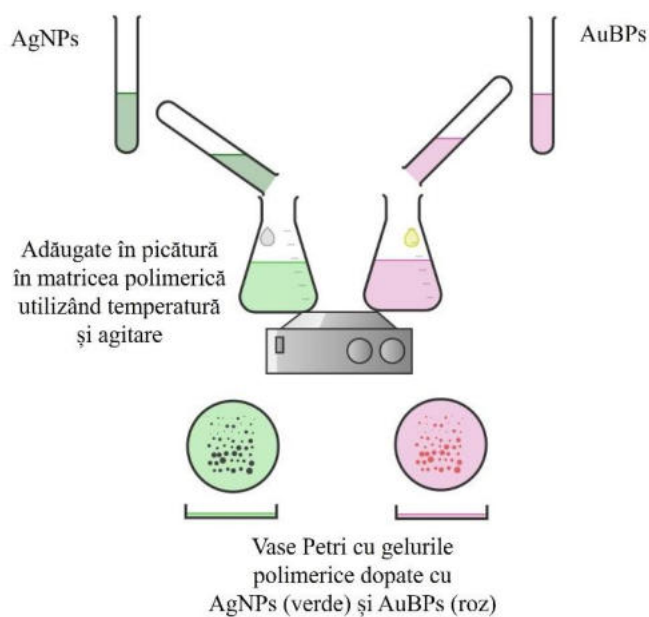
Următorul pas a fost de a studia sensibilitatea nanoparticulelor la modificarea mediului înconjurător în apropiata vecinătate a nanoparticulelor. Concret, mediul dielectric al nanoparticulelor aflate până acum în soluție apoasă a fost schimbat cu soluții de glicerol de diferite concentrații (0, 20, 40, 60, 80 și 100% glicerol). Modificarea mediului dielectric se realizează prin modificarea indicelui de refracție al mediului în care se află nanoparticulele. Astfel, indicele de refracție a fost modificat de la 1.333 corespunzător apei la 1.47 corespunzător concentrației de 100 % glicerol. S-a monitorizat răspunsul LSPR pentru fiecare concentrație de glicerol și, ulterior, deplasarea benzii plasmonice a fost reprezentată grafic ca funcție de indicele de refracție (**Figura 3**). Din regresiile lineare obținute, s-a extras valoarea sensibilității pentru AuBPs cu răspuns LSPR la 760 nm și pentru AgNPs, acestea fiind 304 nm/RIU și, respectiv, 89 nm/RIU. Nanobipiramidele de aur dovedindu-se a fi mult mai sensibile la modificări ale mediului dielectric decât AgNPs.



**Figura 3.** Reprezentarea grafică a deplasării benzii LSPR ca urmare a modificării indicelui de refracție a mediului din apropiata vecinătate a nanoparticulelor și regresiile liniare corespunzătoare.

**Activitatea 1.4. Integrarea nanoparticulelor plasmonice în matricea de hidrogel.** În cadrul acestei activități, AgNPs și AuBPs au fost integrate în matricea de hidrogel prin metoda chimică a picăturii, conform **Schemei 3**. Astfel, conform caracterizării anterioare ale suspensiilor de nanoparticule, au fost identificate cele două probe optime pentru doparea hidrogelului polimeric: AgNPs (LSPR 405 nm – culoare verde a

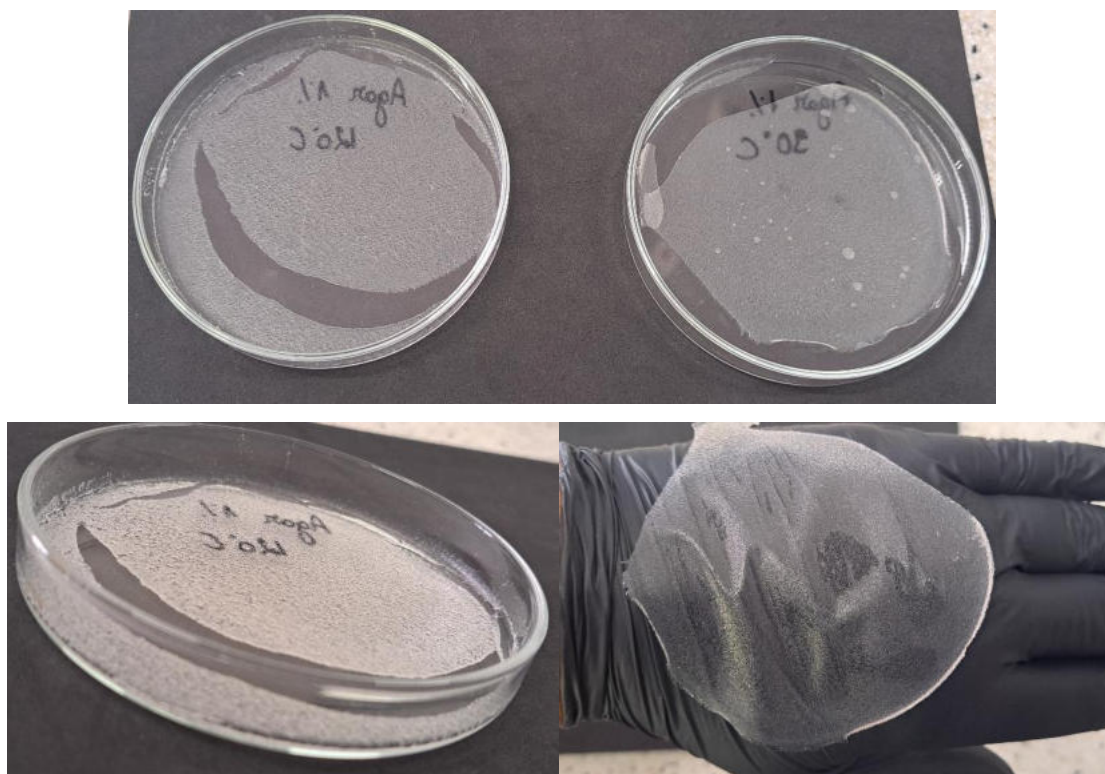
soluției coloidale) și AuBPs (LSPR 760 nm – culoare maro-roșiatic a soluției coloidale). Cele două tipuri de nanoparticule, AgNPs și AuBPs, au fost adăugate în picătură în soluția de polimer supusă unei temperaturi ridicate în vederea formării porozității necesare internalizării nanoparticulelor. De asemenea, au fost utilizate două pH diferite în doparea nanoparticulelor, factor ce se regăsește în literatura de specialitate drept variabilă în sinteză în vederea îmbunătățirii stabilității gelului. Soluțiile control, cât și cele dopate cu nanoparticulele plasmonice, au fost agitate utilizând temperaturi ridicate timp de 30 de minute, observându-se schimbarea culorii soluției drept confirmare; rozalii în cazul AuBPs și verde în cazul AgNPs. Pentru un set de probe au fost realizate hidrogelurile cu nanoparticule la pH 7, iar pentru celălalt set de probe a fost ajustat pH la 12 cu ajutorul NaOH 1M. Soluțiile polimerice de control, cât și cele dopate cu nanoparticule, au fost turnate în vase Petri și au fost lăsate la uscat peste noapte.



**Schema 3.** Ilustrare schematică a protocolului de integrare a nanoparticulelor plasmonice în matricea polimerică.

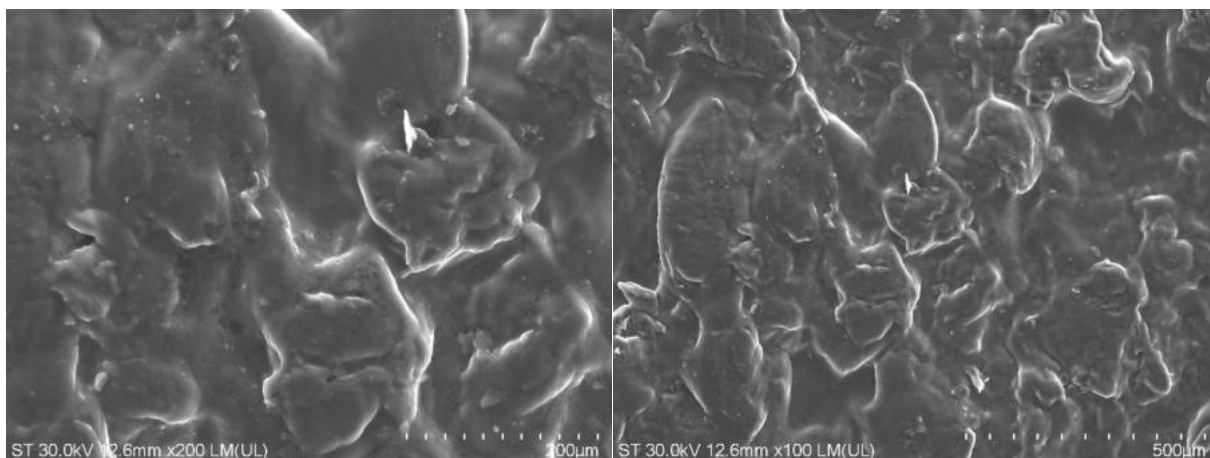
**Act. 1.5. Studiul proprietăților senzorului plasmonic hibrid final.** În cadrul acestei activități, fiecare tip de hidrogel a fost evaluat și caracterizat în vederea utilizării ulterioare pentru detecția cortizolului. Astfel, în primă fază s-au urmărit proprietățile morfologice, structurale și mecanice precum și stabilitatea acestuia. În cadrul acestei activități a fost caracterizat din punct de vedere morfo-structural hidrogelul polimeric propus. Pe parcursul activității, sinteza hidrogelului a fost îmbunătățită prin ajustarea pH-ului și a metodei de uscare. Astfel, prima sinteză a hidrogelului pe

bază de agar și PEG a dus la fabricarea unei matrice ce poate fi manipulată fără a se rupe și ce prezintă un aspect optim, precum se poate vedea în **Figura 4**.



**Figura 4.** Hidrogeluri polimerice pe bază de agar și PEG sintetizate la 90°C și 120°C– sinteza inițială.

În vederea identificării structurii interne, cât și a proprietăților de suprafață, hidrogelurile au fost suspuse unei analize SEM. De asemenea, prin microscopie SEM influența temperaturii asupra porozității și a suprafeței pot fi identificate. Rezultatele sunt prezentate în cadrul acestei activități, conform **Figurii 5**. Deși hidrogelul prezintă o manevrabilitate bună și o rezistență mecanică acceptabilă, rezultatelor microscopiei SEM au pus în evidență o structură internă prea apoasă a hidrogelului, neputându-se identifica porozitatea sa în vederea încapsulării nanoparticulelor. Acest rezultat poate fi cauzat de metoda prea lentă de uscare a hidrogelului, care a fost îmbunătățită în sinteza următoare realizată la pH diferite și descrisă în cadrul activității anterioare.



**Figura 5.** Imagini microscopice SEM reprezentative a hidrogelului polimeric pe bază de agar și PEG sintetizat la 90°C-sinteza inițială.

În urma analizei imaginilor de microscopie SEM, am optimizat procesul de sinteză al hidrogelului în timpul dopării acestuia cu nanoparticule prin ajustarea pH-ului și prin utilizarea unei modalități de uscare mai rapidă, la temperatură. În cazul hidrogelurilor polimerice îmbunătățite pe bază de agar și PEG cu/fără AuBPs/AgNPs, sintetizate ulterior primei încercări, au fost identificate câteva observații post-sinteza. A doua zi a fost observat un aspect neomogen, hidrogelurile ne prezentând structura compactă așteptată, precum se poate observa în **Figura 6** și **Figura 7**.

**Hidrogel control –pH 7 stânga, pH 12 dreapta**   **Hidrogel-AuBPs –pH 7 stânga, pH 12 dreapta**   **Hidrogel-AgNPs –pH 7 stânga, pH 12 dreapta**



**Figura 6.** Hidrogelurile polimerice dopate cu AuBPs și AgNPs la pH 7 și pH 12.



**Figura 7.** Hidrogelurile polimerice dopate cu AuBPs și AgNPs la pH 7 (Control - stânga, Hidrogel-AuBPs - centru, Hidrogel-AgNPs - dreapta).

Analiza vizuală realizată a pus în evidență diferențe între hidrogelurile obținute. În primul rând, se identifică culori diferite ale acestora, asociate cu absența sau prezența nanoparticulele plasmonice folosite. Hidrogelul control are un aspect albicios, tipic agarului, cel dopat cu AuBPs menține culoarea roz, în timp ce hidrogelul dopat cu AgNPs prezintă o culoare verde, asociată cu cea obținută la sinteza de nanoparticule. Al doilea aspect identificat este cel legat de rezistența lor, influențată de pH-ul reacției de dopare și de nanoparticula aleasă. În cazul hidrogelului control, nu se observă o diferență între cele două pH-uri, acesta fiind destul de fragmentat și instabil în urma ambelor sinteze. Hidrogelul dopat cu AuBPs prezintă o stabilitate mai bună la pH bazic, pe când hidrogelul dopat cu AgNPs are o stabilitate mai bună la pH neutru. Ele prezintă o manevrabilitate mai bună și un aspect mai compact și mai dens. Așadar, influența pozitivă a particulelor este demonstrată, acestea având abilitatea de a oferi un suport mai bun în cazul senzorului. A treia observație realizată, este cea legată de efectul antibacterian al particulelor plasmonice folosite. Impactul lor pozitiv a fost stabilit vizual prin observarea absenței coloniilor bacteriene în hidrogel, demonstrând stabilitate stabilitate pe termen lung. Post-sinteză, hidrogelurile au fost lăsate atât la frigider, cât și la temperatura camerei. În cazul hidrogelului control s-a identificat contaminarea sa cu bacterii din aer, pe când în cazul celorlalte hidrogeluri dopate cu nanoparticulele metalice, coloniile bacteriene sunt absente. Astfel, pe lângă stabilitatea oferită, AuBPs și AgNPs acționează drept agenți antibacterieni în structura internă a gelului.

Totuși, pentru a avea o viziune mai largă asupra parametrilor utilizați, probele au fost trimise la microscopie electronică de baleiaj (SEM) în vederea analizării structurii interne. Concomitent, s-au început teste de gonflare și evaluare a proprietăților mecanice.

### **Rezumatul Execuției Etapei 3**

Durata Etapei: Ianuarie 2025 – Iunie 2025

Titlul Etapei: *Fabricarea senzorului plasmonic hibrid și Funcționalizarea cu biomolecule de recunoaștere specifice și determinarea capacității de detecție a cortizolului.*

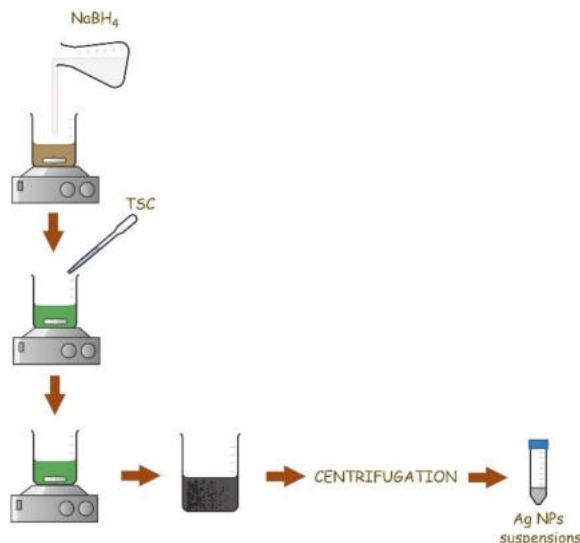
În cadrul celei de-a treia etape, s-a revenit pentru optimizarea parametrilor de sinteză a nanoparticulelor pentru o detecție cât mai precisă, și s-a început realizarea activităților propuse în pachetul de lucru 2 intitulat *Detecția cortizolului folosind senzorul plasmonic hibrid dezvoltat în condiții de laborator*. Dintre cele mai importante rezultate științifice și manageriale obținute menționăm aici:

- i) *Obținerea de AgNPs stabile;*
- ii) *Studiul capacității de detecție LSPR-SERS a nanoparticulelor sintetizate;*
- iii) *Studiul activității antibacteriene a nanoparticulelor sintetizate;*
- iv) *Menținerea unui contact constant cu AOȘR prin prezentarea rezultatelor preliminarilor aferente etapei 3 în cadrul Sesiunii științifice a tinerilor cercetători din competiția AOSR-TEAMS ediția 2023-2024 și ediția 2024-2025;*
- v) *Redactarea manuscrisului de tip review;*
- vi) *Redactarea unui manuscris de tip article.*

#### ***Activitatea 1.1. Sinteza controlată de nanoparticule de aur și argint în soluție coloidală – partea a II-a.***

În vederea obținerii unei suspensii stabile de AgNPs, sinteza chimică a fost îmbunătățită prin adăugarea unui agent de reducere nou. În mod specific, AgNPs au fost sintetizate chimic utilizând metoda reducerii chimice, o metodă ce prezintă avantajele de a fi ușor de utilizat și de a oferi un randament crescut de reacție. În mod specific, AgNPs au fost sintetizate în soluție apoasă prin dizolvarea  $\text{AgNO}_3$  în apă distilată și adăugarea prin picurare a unei soluții de borohidru de sodiu ( $\text{NaBH}_4$ ) și citrat trisodic dihidratat (TSC) peste soluția precursoră de  $\text{AgNO}_3$  în vederea formării nanoparticulelor de argint. Soluția finală a fost supusă agitării până ce culoarea s-a schimbat, indicând formarea nanoparticulelor. Etapa de centrifugare a dus la eliminarea surplusului de reactivi chimici. Probele au fost menținute la întuneric, la rece. Pașii următori în cadrul sintezei

chimice a AgNPs utilizând  $\text{NaBH}_4$  drept agent reducător și TSC drept agent stabilizator sunt prezentați în **Figura 8**.



**Figura 8.** Descriere schematică a procesului de obținere AgNPs.

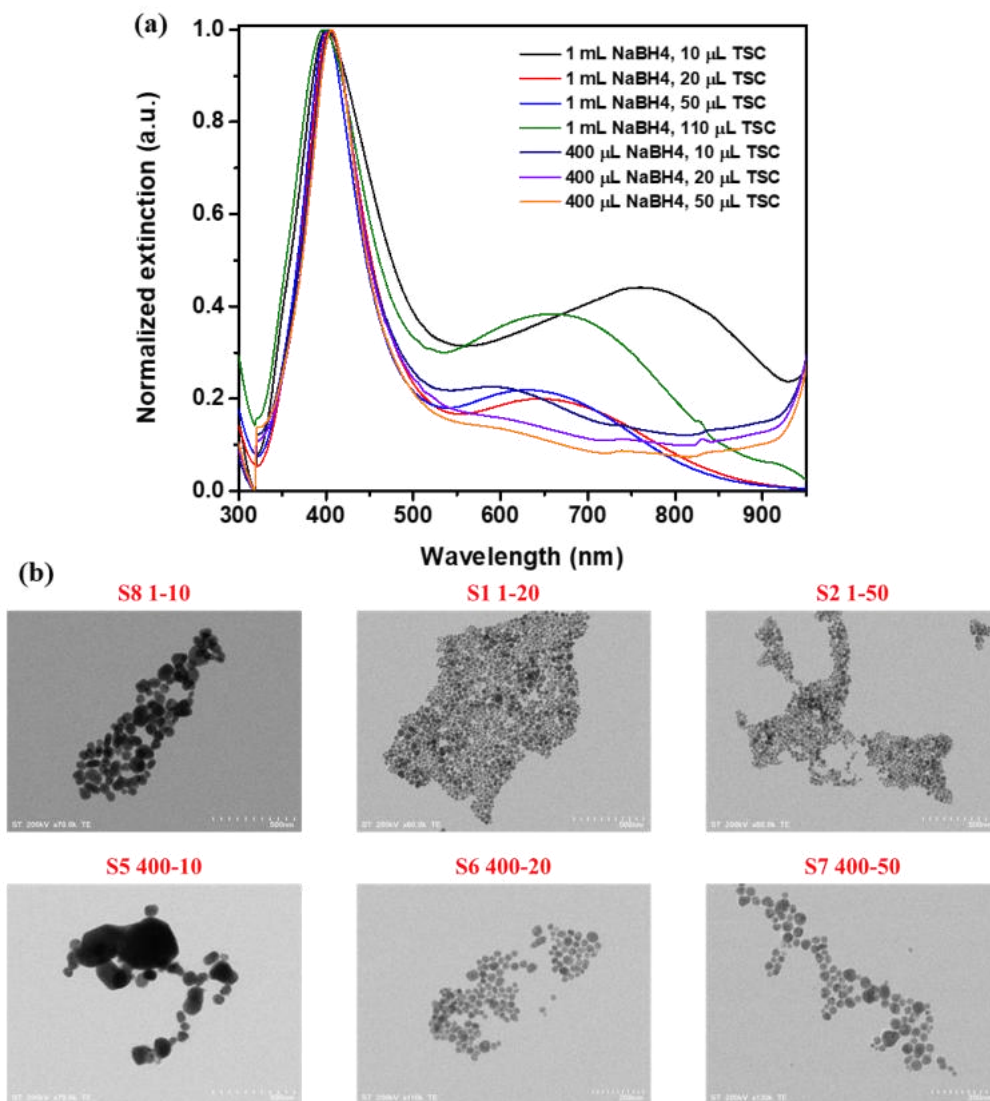
În vederea stabilirii parametrilor optimi de reacție,  $\text{NaBH}_4$  și TSC au fost utilizate în concentrații și rapoarte diferite (**Tabelul 1**).

**Tabel 1.** Nomenclatură și compoziție chimică probe Ag NPs

Sinteza	$\text{AgNO}_3$ 3 mM	$\text{NaBH}_4$ 30 mM	TSC 1%
S1	20 mL	1 mL	20 $\mu\text{L}$
S2	20 mL	1 mL	50 $\mu\text{L}$
S3	20 mL	1 mL	110 $\mu\text{L}$
S5	20 mL	400 $\mu\text{L}$	10 $\mu\text{L}$
S6	20 mL	400 $\mu\text{L}$	20 $\mu\text{L}$
S7	20 mL	400 $\mu\text{L}$	50 $\mu\text{L}$
S8	20 mL	1 mL	10 $\mu\text{L}$

***Activitatea 1.2. Caracterizarea optică și morfologică a soluțiilor coloidale în soluție apoasă – partea a III-a.***

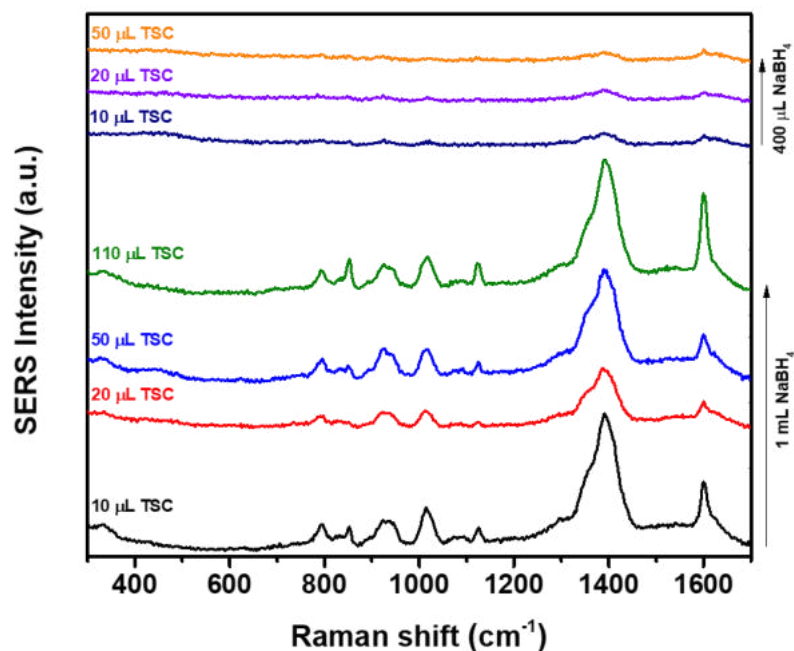
Sintezele de nanoparticule de argint optimizate au fost ulterior caracterizate din punct de vedere optic și morfologic. Concret, s-au înregistrat spectrele de extincție (**Figura 9a**) ale AgNPs sintetizate, acestea prezentând banda specifică de extincție a AgNPs cu maxime de extincție localizate la lungimi de undă între 398 și 407 nm. Se remarcă faptul că la lungimi de undă mai mari, în cazul sintezelor în care s-a utilizat o concentrație mai mică de TSC apare o bandă asociată cu formarea de agregate sau structuri mai mari. Se observă că odată ce concentrația agentului stabilizator este crescută, această bandă dispare, indicând formarea de nanoparticule individuale. Însă dacă aceasta este prea mult, reducerea ionilor de argint este inhibată. Analiza TEM a soluțiilor coloidale confirmă determinările optice. Se poate observa că în cazul TSC 20 și 50  $\mu\text{L}$ , indiferent de concentrația de  $\text{NaBH}_4$ , se obțin AgNPs bine definite și omogene din punct de vedere al formei și dimensiunii. Imaginile TEM au fost analizate cu programul ImageJ, iar din histogramele distribuției de dimensiune s-au determinat diametre de  $27 \pm 3$  nm pentru sinteza S1,  $25 \pm 3$  nm pentru S2,  $24 \pm 3$  nm pentru sinteza S6 și  $21 \pm 3$  nm pentru sinteza S7.



**Figura 9. (a)** Spectrele normalizate de extincție și **(b)** imagini reprezentative TEM ale AgNPs optimizate.

Mai departe, s-a investigat răspunsul SERS al nanoparticulelor de Ag prin spectroscopia Raman. În acest sens, AgNPs coloidale au fost expuse unui laser cu lungime de undă excitatoare de 532 nm, setat la o putere de 100 mW și cu un timp de integrare de 5 secunde. Din spectrele SERS înregistrate pentru fiecare AgNPs sintetizate (**Figura 10**), se observă că AgNPs obținute folosind 400 μL de NaBH<sub>4</sub> au un răspuns SERS slab, în concordanță cu literatura de specialitate. În timp ce pentru o concentrație mai mare de agent reducător, apar în spectrul SERS benzi caracteristice TSC, indicând la suprafața nanoparticulelor o cantitate mare de agent stabilizator, ceea ce duce la o reactivitate chimică scăzută a suprafeței metalice. Pentru studiile de activitate antibacteriană și de sensibilitate a detecției LSPR -SERS, s-au utilizat sintezele S1 și S6, pentru a identifica efectul pe

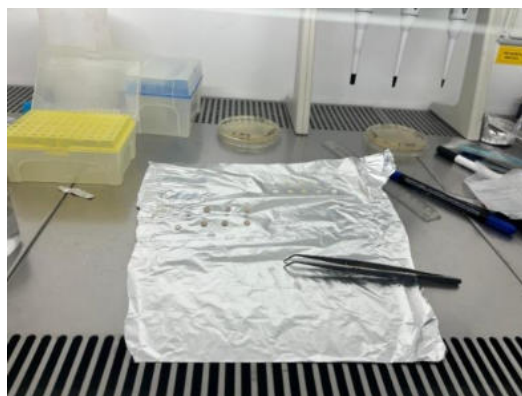
care agentul stabilizator îl are asupra funcționalizării AgNPs cu alte molecule respectiv a efectului antibacterian.



**Figura 10.** Spectrele SERS înregistrate ale tuturor soluțiilor coloidale de AgNPs optimizate.

De asemenea, în cadrul acestei etape, s-a realizat un studiu aferent activității 1.2 pentru a determina activitatea antibacteriană a nanoparticulelor sintetizate. În mod specific, Pentru a testa activitatea antibacteriană a AgNPs a fost aleasă metoda difuziei pe disc folosind două tipuri de bacterii: *Escherichia coli* (Gram-negativă) și *Staphylococcus aureus* (Gram-pozitivă), astfel realizându-se o evaluare mai precisă.

Cele două tulpini au fost păstrate în flacoane la  $-80^{\circ}\text{C}$ . Pe plăci cu mediu agar de 90 mm s-au cultivat bacteriile. Metoda presupune plasarea unor discuri impregnate cu probă pe plăcile însămânțate anterior. Pe fiecare disc s-au aplicat câte 10  $\mu\text{L}$  din fiecare probă pentru fiecare tulpină bacteriană, discurile impregnate fiind lăsate să se usuce timp de 20 minute înainte de a fi introduse pe placă. Plăcile pregătite au fost incubate la  $37^{\circ}\text{C}$  pentru 24 de ore.



**Figura 11.** Impregnare discuri cu soluțiile de S1, S6, TSC și NaBH<sub>4</sub>.



**Figura 12.** Însămânțarea plăcilor bacteriene cu cele două tulpini folosite:

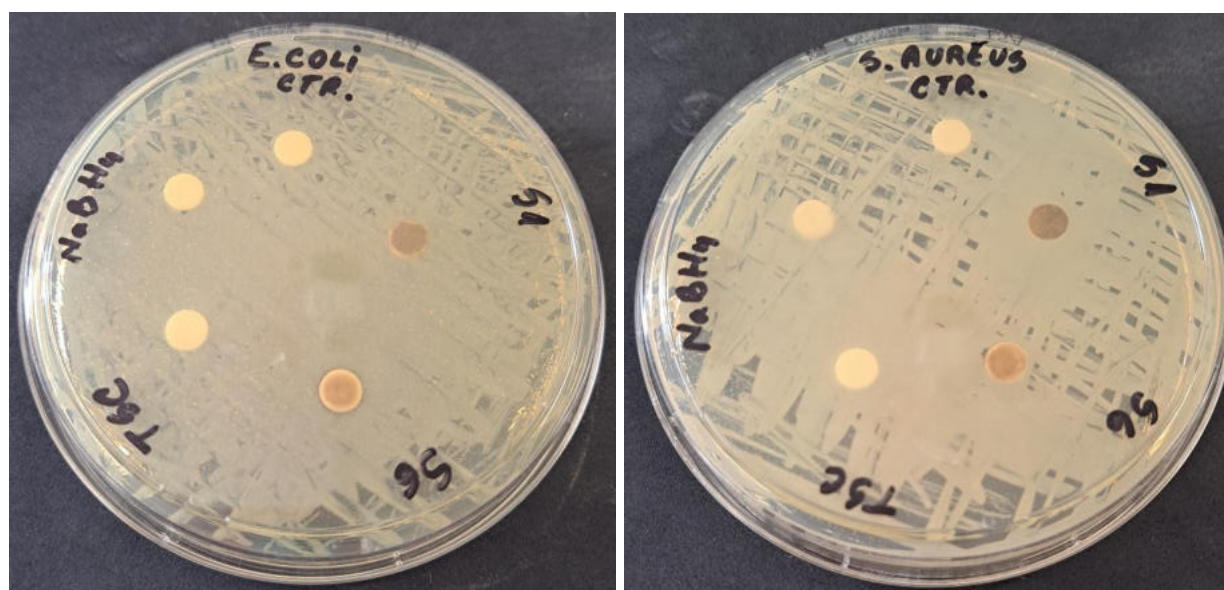
*Escherichia coli* și *Staphylococcus aureus*.

Testele au fost efectuate pentru probele S1, S6 și pentru probele de control, pentru a confirma faptul că efectul antibacterian este atribuit exclusiv AgNPs și nu solvenților utilizați în sinteze. După incubare, zona de inhibiție din jurul fiecărui disc a fost măsurată, iar pe baza diametrului acestei zone s-a evaluat eficacitatea bactericidă a fiecărei probe. Testul indică faptul că o zonă de inhibiție mare este atribuită unui efect antibacterian mai crescut.

În urma testului de difuzie pe disc, s-a observat formarea unei zone de inhibiție în jurul discurilor impregnate cu proba S6, indicând o activitate antibacteriană împotriva tulpinilor studiate. În cazul probei S1 efectul bacterian este foarte puțin vizibil, proba S6 arătând o inhibiție

mai puternică. În ambele cazuri, controlul a fost negativ, inhibiția nu a apărut în cazul TSC și al  $\text{NaBH}_4$ , acești solvenți neavând vreo implicare în inhibiția bacteriană. Rezultatul obținut este validat de controlul reacției (CTR), disc care este amplasat pe placă fără a fi impregnat cu substanță.

Proba S6 prezintă un efect antibacterian mai crescut pentru *Escherichia coli*, rezultatul sugerând o sensibilitate a acestor AgNPs pentru bacteriile Gram-negativ. Diametrul de inhibiție de 2 mm identificat pentru *Escherichia coli*, comparativ cu cel de 1 mm identificat pentru *Staphylococcus aureus*, arată efecte diferite ale nanoparticulelor în funcție de structura internă a bacteriilor.



**Figura 13.** Test antibacterian pentru S1 și S6.

Inhibiția este indicată în cantitate redusă, rezultat ce poate fi asociat cu utilizarea unei concentrații scăzute de  $\text{AgNO}_3$  în sinteză sau cu utilizarea unui număr prea mic de particule la impregnarea pe disc. În vederea îmbunătățirii acestui rezultat, concentrarea particulelor din suspensiile obținute este o abordare ce va fi testată în continuare în cadrul proiectului.

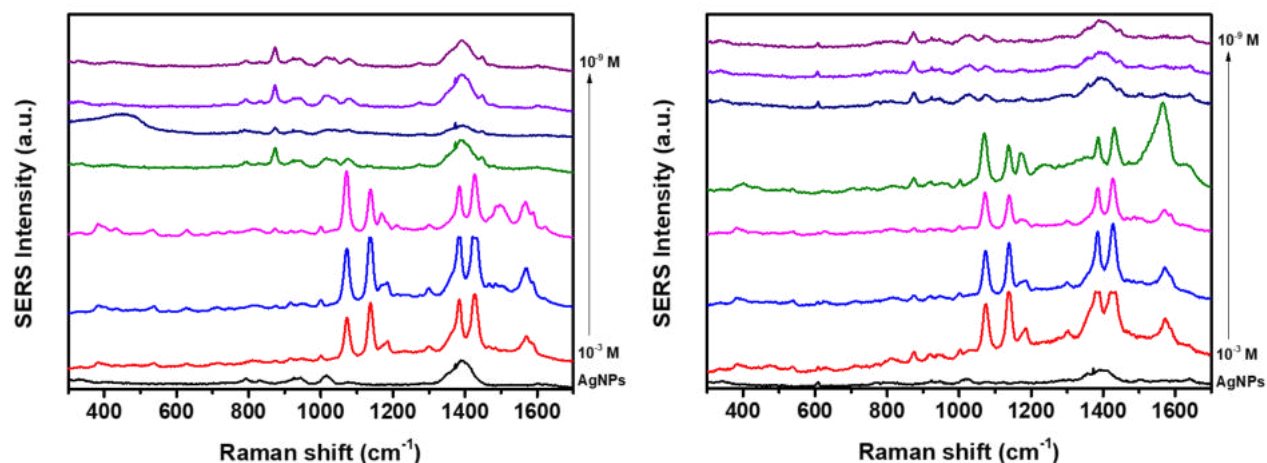
### ***Activitatea 2.1. Funcționalizare cu molecule de bio-recunoaștere specifică a cortizolului.***

Această activitate presupune funcționalizarea nanoparticulelor cu elemente de recunoaștere specifică a cortizolului. Pentru a studia reactivitatea suprafeței nanoparticulelor, acestea au fost funcționalizate p-aminothiophenol (p-ATP), care se leagă covalent de suprafața metalică prin gruparea funcțională activă tiol (-SH). Astfel, peste soluția coloidală s-a adăugat p-ATP obținându-se o concentrație finală de p-ATP de  $10^{-3}$  M. Pentru a testa sensibilitatea de detecție, concentrația de p-ATP a fost variată până la o concentrație de  $10^{-9}$  M.

Mai departe, s-a început optimizarea procesului de funcționalizare a nanoparticulelor cu agenții de recunoaștere bio-moleculară specifică a cortizolului. În acest sens, se urmează o strategie simplă după cum urmează: pe suprafața nanoparticulelor se va lega glutaldehydă, un bine-cunoscut linker pentru proteine, care să asigure legarea anticorpului CORTISOL EA, specific pentru captarea ulterioară a cortizolului.

### ***Activitatea 2.2. Studiul capacității de detecție a nanoparticulelor funcționalizate în soluții coloidale.***

În cadrul acestei activități, s-a realizat un studiu premergător detecției cortizolului pentru a determina capacitățile de detecție și identificare a moleculelor de interes prin două metode analitice complementare, respectiv LSPR și SERS. În mod concret, nanoparticulele sintetizate au fost funcționalizate cu p-aminothiophenol (p-ATP), care se leagă covalent de suprafața metalică prin gruparea funcțională activă tiol (-SH) și este un bine-cunoscut reporter Raman. Din spectrele UV-Vis-NIR se observă că legarea cu p-ATP induce o modificare în spectrul de extincție al nanoparticulelor. Până la o concentrație de  $10^{-6}$  M p-ATP, banda LSPR este translatată spre lungimi de undă mai mari confirmând modificarea indicelui de refracție în imediata apropiere a AgNPs. La concentrații mai mici, p-ATP nu poate fi detectat prin LSPR de niciuna dintre cele două sinteze testate. În ceea ce privește analiza SERS, S6 este capabil să detecteze concentrații mai mici de p-ATP, benzile caracteristice fiind identificate până la concentrația de  $10^{-6}$  M. Limitele de detecție fiind mari, am continuat pentru a optimiza procesul de funcționalizare.



**Figura 14.** Spectrele SERS înregistrate pentru S1 (stânga) și S6 (dreapta) la concentrații ale p-ATP de la 0 la  $10^{-9}$  M.

Menționăm că în vederea îndeplinirii *activităților de diseminare* s-a realizat un studiu profundat al literaturii de specialitate care va fi valorificat printr-o publicație de tip *Review*, manuscrisul fiind în curs de finalizare. Rezultatele experimentale obținute până în această etapă fac obiectul unei publicații de tip *Article*, aflată în curs de pregătire. Mai mult decât atât, studiile experimentale vor fi prezentate la conferința internațională META 2025, organizată în Malaga, Spania, în perioada 21-15 Iulie 2025. De asemenea, rezultatele preliminare obținute până în prezent au fost prezentate în cadrul *Sesiunii științifice a tinerilor cercetători din competiția AOSR-TEAMS ediția 2023-2024 și ediția 2024-2025*.