

Raport Științific de Fază Unică - Decembrie 2015
PN-II-RU-TE-2014-4-2269

Perioada raportată: Octombrie – Decembrie 2015

Obiective:

Ob.1. Sinteza și caracterizarea nanoparticulelor de magnetită funcționalizate cu diferiți compuși naturali (eugenol, eucaliptol, carvona, limonen, B-pinen);

*Ob.2. Evaluarea efectului nanoparticulelor obținute asupra profilurilor de virulență a tulpinilor de laborator și clinice de *P. aeruginosa* la nivel fenotipic și molecular;*

Ob.3. Managementul proiectului și diseminarea rezultatelor.

Introducere

Nanomedicina este un domeniu în continuă dezvoltare, care încearcă să ofere soluții pentru diferitele probleme cu care se confruntă medicina tradițională, cum ar fi multi-rezistența, rezistența extinsă sau chiar pan-rezistența la antibiotice.

Nanoparticulele magnetice (MNPs) de tip Fe_3O_4 (magnetită) au fost intens exploatate în acest sens, datorită dimensiunii lor comparabilă cu cea a majorității moleculelor biologice și proprietăților fizice deosebite. Magnetita este cunoscută de mult timp, în special în forma naturală, de minereu, în timp ce pe cale artificială a fost obținută pentru prima oară prin metoda Massart [1], sub forma unui ferrofluid (lichid coloidal format din nanoparticule fero/ferimagnetice suspendate în apă/ solvent organic). Din punct de vedere structural, Fe_3O_4 cristalizează în sistem cubic cu fețe centrate. Proprietățile magnetice ale acestui material se datorează existenței a 4 electroni neparticipanți în stratul 3d al ionului Fe^{2+} , respectiv datorită existenței a 5 electroni neparticipanți în stratul 3d al ionului Fe^{3+} .

Datorită acestor proprietăți magnetita a fost exploatată în vederea unor aplicații, precum imagistica medicală, hipertermie, eliberarea controlată de medicamente sau alte molecule bioactive etc., ce au fost abordate în nenumărate studii din ultima perioadă. Deși, în general, sistemele propuse au avut rezultate satisfăcătoare din punct de vedere al biocompatibilității și al funcționalității, standardizarea acestora a fost destul de greu de realizat, existând sisteme comerciale doar pentru imagistică medicală, respectiv pentru tratamentul cancerului prin hipertermie magnetică.

Rezultate și discuții

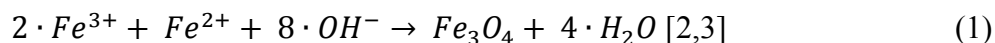
Ob.1. Scopul principal al acestui studiu a fost *obținerea nanoparticulelor de tip Fe₃O₄ functionalizate cu agenți terapeutici naturali pentru utilizarea în terapia anti-infecțioasă.*

Pentru majoritatea aplicațiilor, alegerea unei metode de obținere potrivită pentru nanomaterialele pe bază de Fe₃O₄, reprezintă un pas foarte important, determinant pentru dimensiunea particulelor și forma acestora, distribuția dimensiunilor, chimia suprafeței particulelor, precum și proprietățile magnetice.

În cadrul acestui studiu **sinteza nanoparticulelor de magnetită dispersabile în apă** s-a realizat folosind o **metodă adaptată de co-precipitare**.

Metoda de obținere a nanoparticulelor de Fe₃O₄ prin co-precipitare este intens abordată în studiile de specialitate din ultima perioadă, reprezentând o metodă sigură, cu rezultate foarte bune în ceea ce privește reproductibilitatea, oferind un control bun al dimensiunii particulelor. Prima dată a fost pusă în aplicare de colectivul Massart în 1981, ce a elaborat metoda cu același nume, constând în amestecarea clorurii de Fe (II) cu clorura de Fe (III) în prezență de hidroxid de sodiu [1].

Principiul de la care se pornește presupune utilizarea sărurilor ferice și a celor feroase în raport molar 2:1 [2] (convențional), dar este întâlnit și 1,5:1 [3], ca precursori pentru ionul feros, respectiv cel feric, determinând formarea fazei cristaline Fe₃O₄ în soluție de amoniac [2], respectiv hidroxid de sodiu [3]. Mecanismul se produce conform reacției:



În procesul de co-precipitare, sunt implicate două mecanisme: (1) procesul de nucleație; (2) creșterea nucleilor; [4]. S-a demonstrat faptul ca valoarea pH influențează puternic mecanismul reacției de formare a Fe₃O₄. Procesul este favorizat de menținerea valorii pH la 11, în cazul utilizării soluției de amoniu ca și solvent [2, 5], putând avea loc la valori mai scăzute în cazul utilizării soluției de hidroxid de sodiu [6], dar fără a depăși intervalul de valori pH=9-14 [7].

Metoda de co-precipitare are ca avantaj principal faptul că se poate utiliza pentru sintetizarea unor cantități mari de nanoparticule de magnetită [4], însă, pentru a obține o distribuție restrânsă a valorilor diametrelor acestor particule, trebuie urmăriti cu strictețe anumiți parametri de reacție. Printre factorii care influențează dimensiunea nanoparticulelor de

magnetită obținute prin co-precipitare, se află: (1) raportul $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$; (2) valoarea pH-ului; (3) temperatura de cristalizare; (4) concentrația sărurilor ferice; (5) temperatura de reacție; [8].

Obținerea sistemelor magnetice hibride bionanostructurate și caracterizarea fizico-chimică a acestora s-a realizat prin tehnicile TEM (Microscopie Electronică prin Transmisie), SAED (Difracție de Electroni pe Arie Selectată) și DRX (Difracție de raze X).

Materialle necesare: (1) sulfat feros hidratat cu 7 molecule de apă ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$); (2) clorură ferică (FeCl_3); (3) soluție amoniacală 25% (NH_3); (4) beta-pinen (BPIN); (5) eugenol (EUG); (6) limonen (LIM); (7) carvona (CAR); (8) eucaliptol (EUC). Toate materialele au fost furnizate de firma Sigma-Aldrich; substanțele au avut puritate analitică și nu au necesitat purificare ulterioară.

În vederea obținerii nanoparticulelor $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SAN}$ (nanoparticule de tip Fe_3O_4 funcționalizate cu substanțele antimicrobiene naturale (SAN) - BPIN, EUG, LIM, CAR, EUC), au fost parcurse următoarele etape:

E1: Dozarea materiilor prime: (1) 2 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; (2) 1,2 g FeCl_3 ; (3) 800 mL apă deionizată (400 mL, respectiv 400 mL plasați în câte un pahar Berzelius de 1000 mL); (4) 8 mL soluție 25% NH_3 ; (5) 500 μL agent terapeutic natural (BPIN, EUG, LIM, CAR, EUC);

E2: Dizolvarea celor 2 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ și a celor 1,2 g FeCl_3 în 400 mL apă deionizată prin agitare energetică folosind o baghetă din sticlă, pentru a rezulta soluția precursor;

E3: Plasarea celor 8 mL de soluție 25% NH_3 în cei 800 mL apă deionizată;

E4: Adăugarea a câte 500 μL SAN (BPIN, EUG, LIM, CAR, EUC) în soluția NH_3 rezultată;

E5: Picurarea sub agitare magnetică a soluției precursor în soluția NH_3 -SAN;

E6: Spălarea repetată a nanoparticulelor obținute cu câte 200 mL apă deionizată;

E7: Uscarea la temperatura ambientală și stocarea la 5°C până în momentul demarării procedurilor de caracterizare și testare *in vitro*.

Analiza de difracție cu raze X a pulberilor s-a realizat cu un difractometru Panalytical Empyrean (marimea pasilor 0.02, timp per pas 1 s) la temperatura camerei. Pentru toate analizele realizate s-au folosit radiații Cu Ka cu $\lambda = 1.541874 \text{ \AA}$. Probele au fost scanate în unghi Bragg 2θ între 20–80.

Rezultatul difracției de raze X efectuată pentru probele de Fe_3O_4 funcționalizate cu substanțe antimicrobiene naturale demonstrează corespondența cu interferențele de difracție caracteristice ale magnetitei. *Pattern*-ul are peak-uri caracteristice la 30.33° (220), 35.51° (311), 43.16° (440), 53.61° (422), 57.17° (511), 62.82° (440). Toate interferențele pot fi indexate folosind fișa JCPDS numărul 19-0629 corespunzătoare magnetitei [9].

Din analiza comparativă a *pattern*-urilor rezultate în urma analizei de difracție de raze X efectuată pentru probele de magnetită nefuncționalizată și magnetită funcționalizată (figura 1) se poate observa faptul că prezența substanțelor cu efect anti-microbian nu au afectat structura cristalină specifică magnetitei. Datorită cantității mici de agent terapeutic atașată la suprafața nanoparticulelor obținute, nu s-a observat o diminuare considerabilă a intensității peak-urilor de difracție.

Pentru efectuarea analizei de ***microscopie electronică prin transmisie***, s-a utilizat un echipament de tip Tecnai TM G2 F30 S-TWIN HR-TEM (FEI Company, Hillsboro, OR, USA) echipat cu SEAD (*selected area electron diffraction*). Pregătirea probelor a constat în dispersarea pulberilor în etanol, urmată de sonicare, timp de 15 minute, după care s-au realizat diluții successive ale suspensiilor pentru obținerea unei concentrații mici din probele de analizat. Următorul pas a constat în plasarea suspensiilor pe o grilă de carbon-cupru, ce a fost răcită, în vederea efectuării analizei. Microscopul a fost setat în modul transmisie la 300 kV, cu punct de rezoluție de 2Å și rezoluția liniei de 1Å.

Analiza SAED confirmă caracterul policristalin al probelor obținute, spectrele rezultate permițând identificarea planelor cristaline pentru magnetită [10]. Conform măsurătorilor SAED, probele analizate sunt policristaline, unica fază minerală cristalină identificată fiind magnetita (Fe_3O_4). De asemenea, au fost identificate pe baza măsurătorilor SAED planele de cristalinitate caracteristice nanoparticulelor studiate (figura 2).

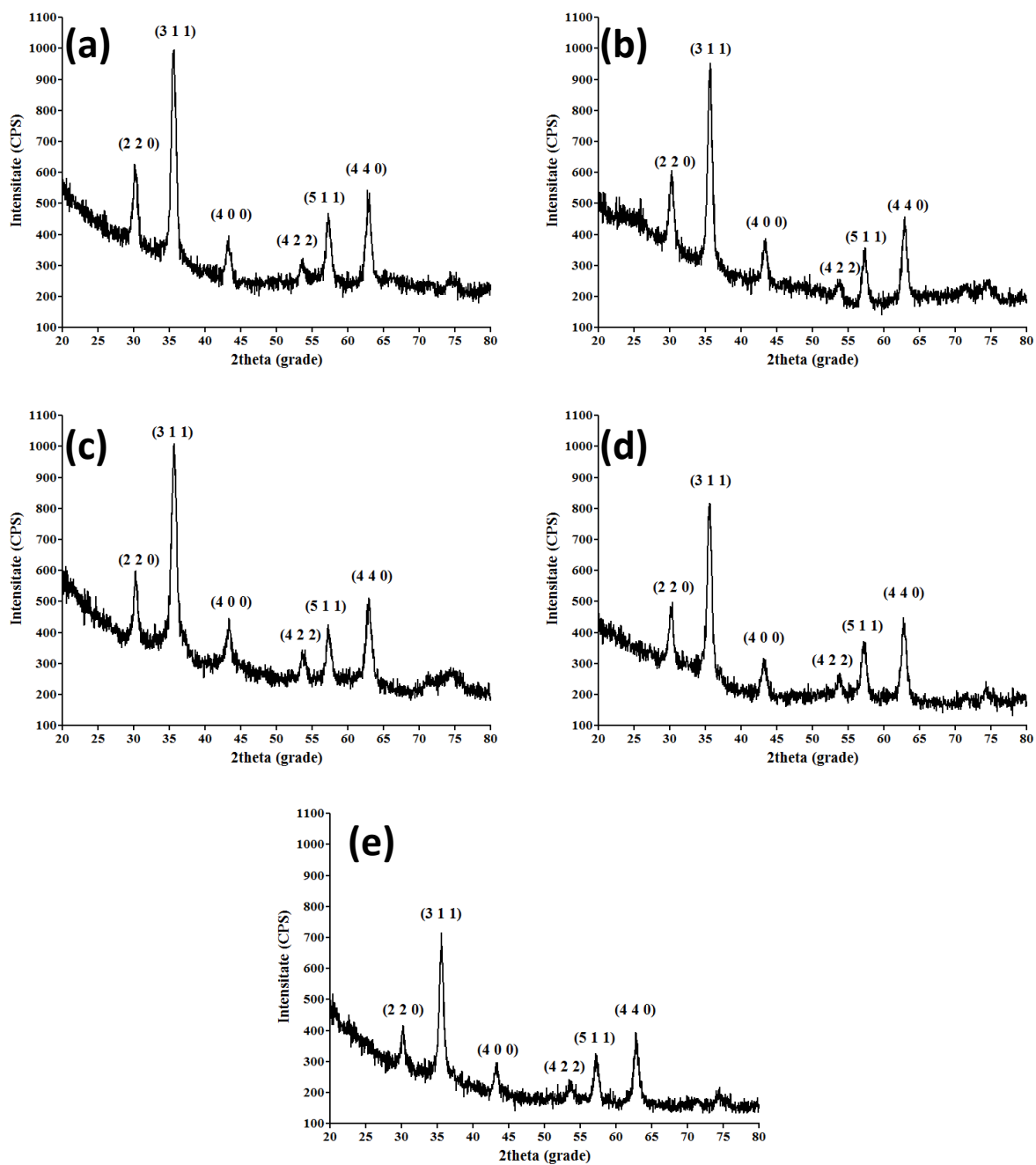


Figura 1. Difractogramele de raze X înregistrate pentru (a) Fe₃O₄@BPIN; (b) Fe₃O₄@CAR; (c) Fe₃O₄@EUC; (d) Fe₃O₄@EUG; (e) Fe₃O₄@LIM;

Valorile identificate prin analiza SAED corespund, confirma și completează analizele DRX. Analizând figura 2 se poate afirma că nanoparticulele prezintă intensități diferite ale inelelor de difracție, ceea ce corespunde unui grad diferit de cristalinitate. Astfel, nanostructurile

de magnetită funcționalizate cu beta-pinen prezintă o cristalinitate mai redusă comparativ cu celelalte probe studiate, unde inele de difracție confirmă un grad ridicat de cristalinitate.

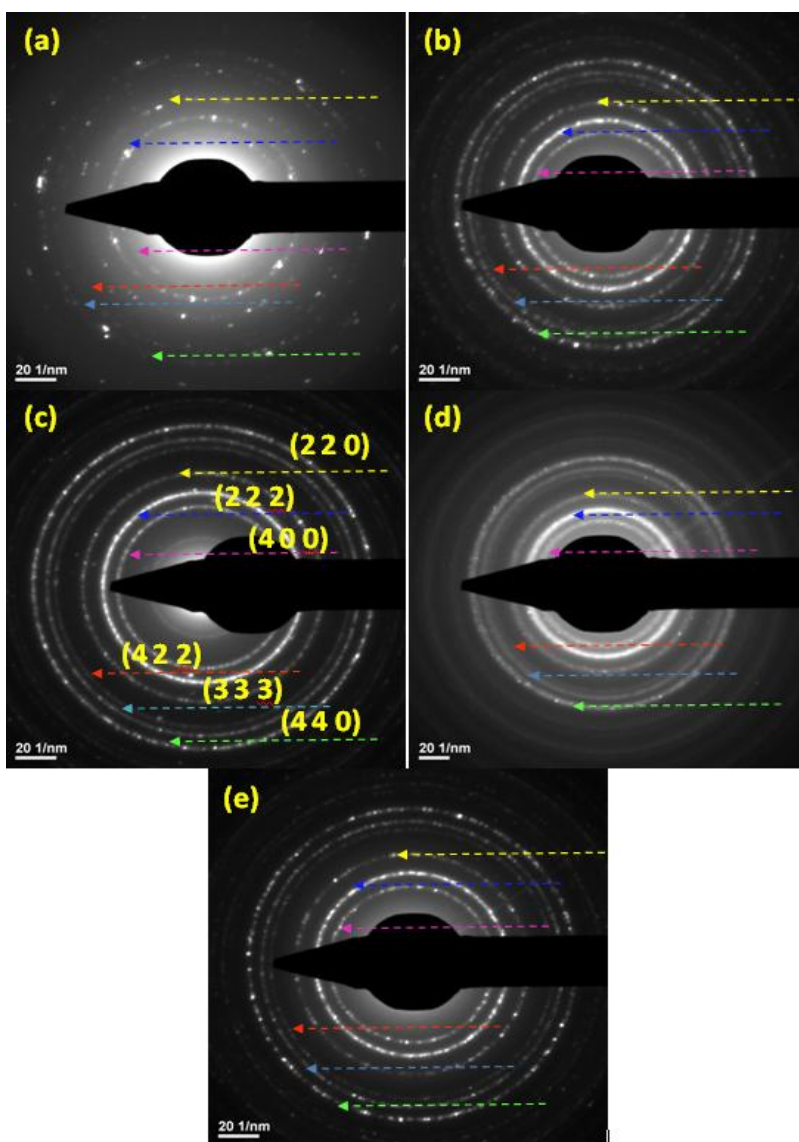


Figura 2. Spectre de difracție de electroni pe arie selectată (SAED) pentru probele de (a) $\text{Fe}_3\text{O}_4@BPIN$; (b) $\text{Fe}_3\text{O}_4@CAR$; (c) $\text{Fe}_3\text{O}_4@EUC$; (d) $\text{Fe}_3\text{O}_4@EUG$; (e) $\text{Fe}_3\text{O}_4@LIM$;

Din punct de vedere structural, în urma analizei imaginilor de microscopie electronică prin transmisie, putem deduce dimensiunea particulelor obținute și gradul mare de cristalinitate al probelor de tip $\text{Fe}_3\text{O}_4@ATM$ (BPIN, EUG, LIM, CAR, EUC) (figura 3).

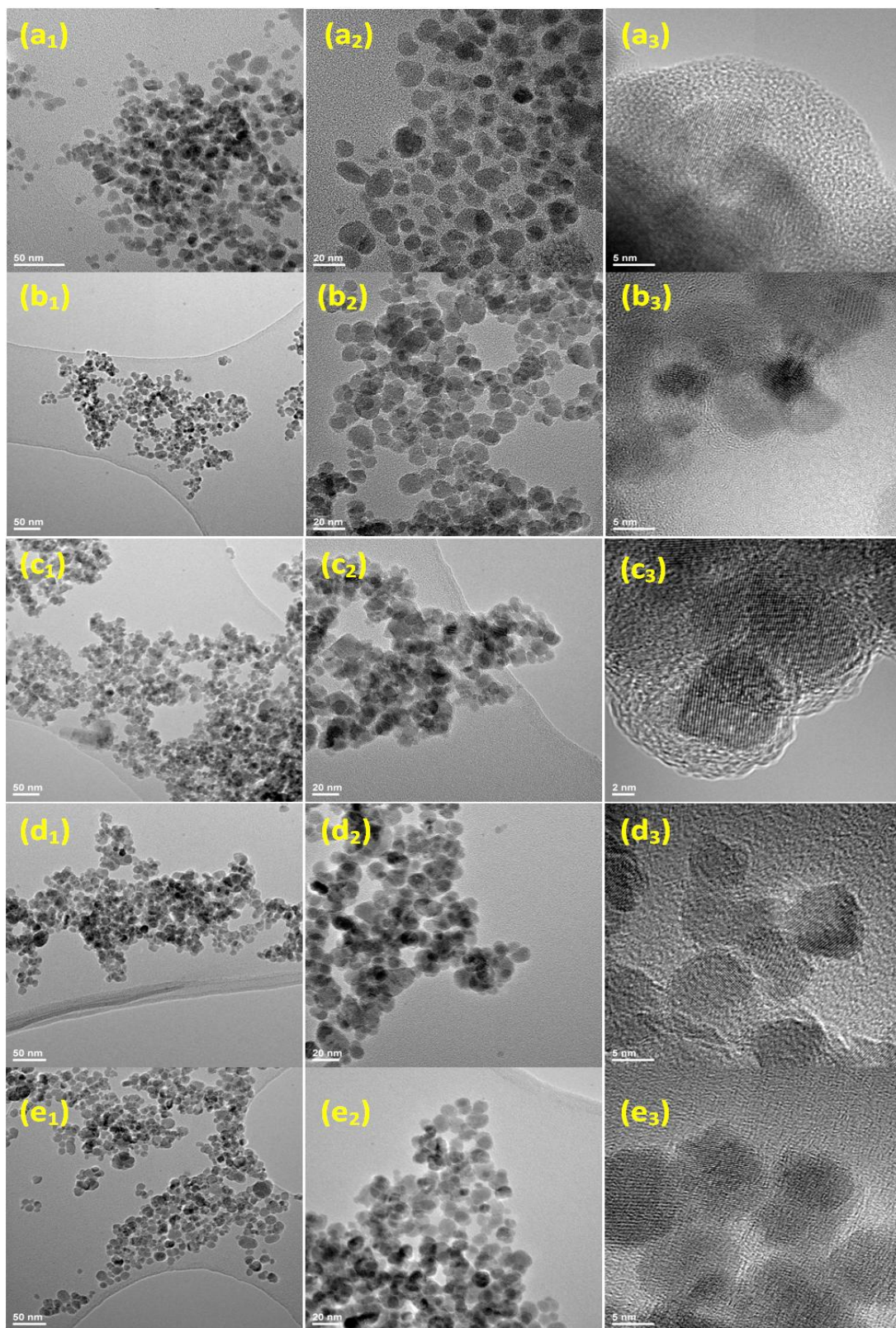


Figura 3. Micrografiile TEM (1,2) și HR-TEM (3) înregistrate pentru (a) $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{BPIN}$; (b) $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CAR}$; (c) $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{EUC}$; (d) $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{EUG}$; (e) $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{LIM}$.

Analizând morfologia probelor obținute, pentru magnetita funcționalizată cu agenți terapeutici naturali se observă un grad redus de aglomerare, particulele de magnetită fiind dispersate într-o matrice organică, de cristalinitate redusă (conform imaginilor HR-TEM). Particulele prezintă dimensiuni ce nu depășesc 10 nm.

Ob.2. Selecția tulpinilor microbiene

În această etapă s-a realizat și prima activitate a obiectivului **O2**, și anume selectarea tulpinilor de *P. aeruginosa* pentru studiile ulterioare.

Au fost selectate 10 tulpini de *P. aeruginosa* (9 tulpini din colecția Laboratorului de Microbiologie al Facultății de Biologie, Universitatea din București, izolate recent de la pacienți spitalizați în cadrul Institutului de boli cardiovasculare CC Iliescu, București, precum și o tulpina cunoscută de laborator ce va fi utilizată ca și control). Codurile de laborator ale tulpinilor selectate precum și detaliile privitoare la sursele de izolare ale acestora sunt redată în tabelul 1.

Tabelul 1. Detaliile de identificare și scurtă caracterizare a tulpinilor microbiene selectate.

Denumirea inițială a tulpinii	Cod de laborator	Sursa de izolare	Detalii
<i>P. aeruginosa</i> 48	P.a 1	Secreție plagă	Rezistentă, virulență moderată
<i>P. aeruginosa</i> 52	P.a 2	Secreție plagă	Rezistentă, virulență moderată
<i>P. aeruginosa</i> 56	P.a 3	Hemocultură	Sensibilă, virulență crescută
<i>P. aeruginosa</i> 1134	P.a 4	Secreție traheo-bronsică	Rezistentă, virulență crescută
<i>P. aeruginosa</i> 1164	P.a 5	Hemocultură	Rezistentă, virulență crescută
<i>P. aeruginosa</i> 1348	P.a 6	Secreție traheo-bronsică	Rezistentă, virulență crescută
<i>P. aeruginosa</i> 1348	P.a 7	Secreție plagă	Rezistentă, virulență crescută
<i>P. aeruginosa</i> 2697	P.a 8	Hemocultură	Rezistentă, virulență crescută
<i>P. aeruginosa</i> 2853	P.a 9	Secreție traheo-bronsică	Rezistentă, virulență crescută
PAO1 _ Lausanne	PAO1	Tulpină de laborator	Tulpină de laborator, control

Ob. 3. Pentru aceasta etapă s-au realizat activitățile de *documentare, planificare, întocmirea rapoartelor științifice și financiare pentru finanțator, precum și dezvoltarea unui site web al proiectului*. Pagina web a proiectului poate fi accesată la: http://alina.amgtranscend.org/?page_id=44

Concluzii

În această etapă au fost sintetizate materialele nanostructurate bioactive pe bază de compuși naturali de origine vegetală cu efect antimicrobian și au fost selectate tulpinile de *P. aeruginosa* ce urmează a fi utilizate pentru testele *in vitro*. Protocoalele de lucru, precum și rezultatele obținute au fost discutate într-o sesiune cu toți membrii proiectului. Așadar, obiectivele și activitățile prevăzute în planul de realizare a proiectului pentru perioada Octombrie-Decembrie 2015 au fost atinse, activitatea de management de proiect desfășurându-se în mod constant. Informații semnificative despre desfășurarea proiectului vor putea fi accesate pe pagina web dedicată acestuia.

Bibliografie

-
- ¹ R. Massart, Preparation of aqueous magnetic liquids in alkaline and acidic media, IEEE transactions on magnetism, 17, 2, 1981. 1247-1248.
 - ² A.P.A. Fayas, E.M. Vinod, J. Joseph, R. Ganesan, R.K. Pandey, Dependence of pH and surfactant effect in the synthesis of magneite (Fe₃O₄) nanoparticles and its properties, Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 2010, 322, 4, 400-404.
 - ³ S. Wu, A. Sun, F. Zhai, W. Xu, Q. Yhang, A. Volinsky, Fe₃O₄ magnetic nanoparticles synthesis from tailings by ultrasonic chemical co-precipitation, Materials Letters, 2011, 65, 12, 1882-1884.
 - ⁴ J. Lodhia, G. Mandarano, N.J. Ferris, P. Eu, S.F. Cowell, Development and use of iron oxide nanoparticles (Part 1): Synthesis of iron oxide nanoparticles for MRI, Biomed Imaging Interv J 2010, 6, 2, e12.
 - ⁵ M. Mauricio, H. Ribeiro de Barros, M.R. Guilherme, E. Radovanovic, A. Rubira, G. De Carvalho, Synthesis of highly hydrophilic magnetic nanoparticles of Fe₃O₄ for potential use in biologic systems, Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2013, 417, 224-229.
 - ⁶ C.C. Lin, J.M. Ho, H.L. Hsieh, Feasibility of using a rotating packed bed in preparing Fe₃O₄ nanoparticles, Chemical Engineering Journal, 2012, 203, 88-94.
 - ⁷ A. K. Gupta, M. Gupta, Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications, Biomaterials, 2005, 26, 18, 3995-4021.
 - ⁸ H. Meng, Z. Zhang, F. Zhao, T. Qiu, J. Yang, Orthogonal optimization design for preparation of Fe₃O₄ nanoparticles via chemical coprecipitation, Applied Surface Science, 2013, 280, 697-685.
 - ⁹ Y. Todaka, M. Nakamura, S. Hattori, K. Tsuchiya, M. Umemoto, Synthesis of Ferrite Nanoparticles by Mechanochemical Processing Using a Ball Mill, Materials Transactions, 2002, 44, 277-284.
 - ¹⁰ G. Wang, Y. Chang, L. Wang, Z. Wei, J. Kang, L. Sang, X. Dong, G. Chen, H. Wang, M. Qi, Preparation and characterization of PVPI-coated Fe₃O₄ nanoparticles as an MRI contrast agent, Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 2013, 340, 57-60.