

privind implementarea proiectului: Citotoxicitatea si biodegradarea platformei de nanoparticule de oxid de ceriu-oxid de fier ca potential agent teranostic pentru boli cauzate de ROS

in perioada de raportare 2.05.2022 – 31.12.2022

A. Rezultate experimentale

Etapa 1 („Caracterizarea platformei CO-ION cu dimensiune si geometrie controlate si biodegradarea ei intr-un mediu mimandu-l pe cel biologic”) a fost impartita in doua acte:

- 1) Caracterizarea structurala, morfologica si compozitionala a platformei CO-ION initiale prin TEM, SEM, HRTEM, EDS, EELS;
- 2) Investigatii privind transformarile structurale, morfologice si compozitionale ale platformei CO-ION prin TEM, SEM, HRTEM, EDS, EELS la diferite perioade de timp dupa inserarea intr-un mediu acid.

Pentru determinarea caracteristicilor morfo-structurale ale platformei Oxid de ceriu – oxid de fier (CO-ION) s-au folosit diverse tehnici de microscopie electronica: a) microscopia electronica de transmisie conventionala – CTEM; b) microscopia electronica de transmisie de inalta rezolutie – HRTEM; c) difractia de electroni pe arie selectionata – SAED; d) microscopia electronica de baleaj in transmisie – STEM; e) spectroscopia de raze X cu dispersie de energie - EDS; f) spectroscopia de pierderi de energie a electronilor – EELS.

Pentru a realiza investigatiile morfo-structurale si analitice destinate proiectului a fost folosit microscopul electronic analitic prin transmisie JEM ARM200F (JEOL Ltd., Japonia) la tensiunea de accelerare de 200kV dotat cu un spectrometru pentru analiza EDS JEOL JED-2300T si un spectrometru pentru analiza EELS Gatan Quantum SE. Pentru a determina distributia spatiala si chimica a elementelor in proba prin EELS, un fascicul focalizat cu dimensiunea de 0.1nm (in modul STEM) care a baleiat zona aleasa de interes. Din fiecare punct scanat s-a cules un spectru EELS. Parametrii de achizitie au fost urmatorii: dispersia de 0.5 eV/canal, timpul de expunere pe pixel de 0.1 s, semi-unghiul de convergenta 7 .mrad, semi-unghiul de colectie 55.5 mrad

1) *Caracterizarea structurala, morfologica si compozitionala a platformei CO-ION initiale prin TEM, SEM, HRTEM, EDS, EELS*

Nanoparticulele de Fe_3O_4 au fost sintetizate prin metoda criochimica. O solutie apoasa de FeCl_3 si FeSO_4 , in care raportul molar de $\text{Fe}^{2+}:\text{Fe}^{3+}=1:2$, a fost preparata si inghetata folosind azot lichid. Solutia inghetata obtinuta a fost plasata intr-o solutie 1M de amoniu la o viteza de omogenizare constanta observandu-se formarea unui precipitat negru. Cand gheata s-a topit complet, mixtura de reactie a fost agitata pentru 20 min intr-un agitator mecanic. Nanoparticulele de Fe_3O_4 produse au fost separate folosind un magnet, spalate cu apa bidistilata de mai multe ori si apoi au fost dispersate in volumul masurat de apa bidistilata (proba 1).

Imaginiile CTEM precum cea din figura 1a arata ca nanoparticulele au o morfologie variata: sferice sau fatetate sau nanofire. Nanoparticulele sferice au diametru variind intre 3 si 15 nm in timp ce cele fatetate au dimensiuni intre 7 si 30 nm. Nanofirele au grosimea cuprinsa intre 4 si nm, iar lungimea lor poate ajunge pana la 100 nm. Diagrama de difractie de electroni SAED (figura 1b) demonstreaza ca nanoparticulele sunt cristalizate in structura cubica a magnetitei avand grupul spatial $Fd\bar{3}m$ si parametrii de retea $a=b=c=8.491(3)$ Å. Imaginea HRTEM (figura 1c) arata ca nanoparticulele sunt perfect cristalizate indiferent de morfologia lor. Spectrul EDS (figura 1d) si spectrul EELS (figura 1e) demonstreaza prezenta elementelor chimice asteptate (Fe si O din proba, precum si C si Cu din grila de microscopie), iar raportul concentratiilor atomice ale O si Fe este cel corespunzator magnetitei.

Nanoparticulele de CeO_2 au fost sintetizate prin hidroliza acetilacetatului de ceriu. Intai, acetilacetatul de ceriu hidratat a fost dispersat in etanol si un exces de solutie de amoniac a fost adaugat pentru a dezvolta hidroliza in mediu alcalin si a forma nanoparticule de CeO_2 (proba 2).

Nanoparticulele de CeO_2 sunt sferice si au diametrul variind intre 2 si 5 nm conform imaginii CTEM (figura 2a) si sunt cristalizate in structura cubica a CeO_2 avand grupul spatial $Fm\bar{3}m$ si parametrii de retea $a=b=c=5.4124(1)$ Å (figura 2b). Imaginea HRTEM (figura 2c) ilustreaza faptul ca nanoparticulele sunt perfect cristalizate. Spectrul EDS (figura 2d) si spectrul EELS (figura 2e) demonstreaza prezenta elementelor chimice asteptate (Ce si O).

A fost sintetizat un set de probe $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CeO}_2$ prin metoda de depunere „strat pe strat”. Pe scurt, nanoparticulele de Fe_3O_4 au fost functionalizate cu grupuri $-\text{OH}$ folosind o solutie de amoniac concentrat pentru 24 ore (primul pas). In continuare nanoparticulele de Fe_3O_4 functionalizate au fost centrifugate si dispersate in volumul calculat de solutie de acetilacetat de ceriu si agitat pentru 2 ore pentru a obtine primul strat de invelis CeO_2 (al doilea pas). Apoi compozitul obtinut a fost centrifugat, spalat cu etanol si apa bidistilata. Pentru a obtine 3, 5 si 7 straturi de invelis primul si al doilea pas au fost repeatate de 3, 5 si 7 ori. (probele 3, 4 si 5). Pentru proba cu invelis cu 5 straturi a fost repetata sinteza (proba 6).

Pentru a evalua efectul tratamentului de incalzire asupra morfologiei compozitelor obtinute, $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CeO}_2$ cu invelis de 5 straturi a fost incalzit la 500°C pentru 2 ore (probele 4 si 6 incalzite sunt numite 8 si 9).

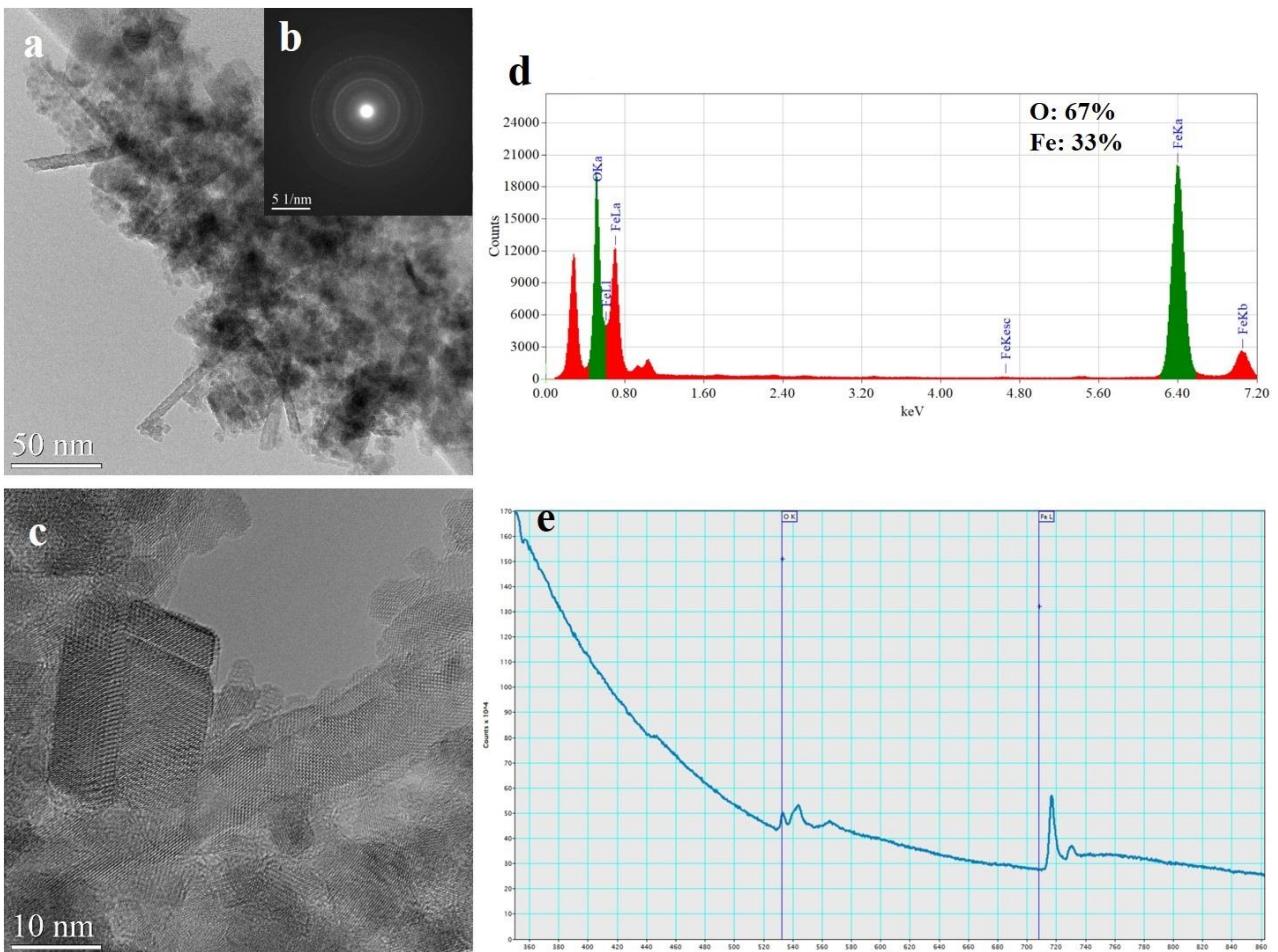


Figura 1. Caracteristicile initiale ale probei 1 studiate prin CTEM (a), HRTEM (b), SAED (c), EDS (d) si EELS (e).

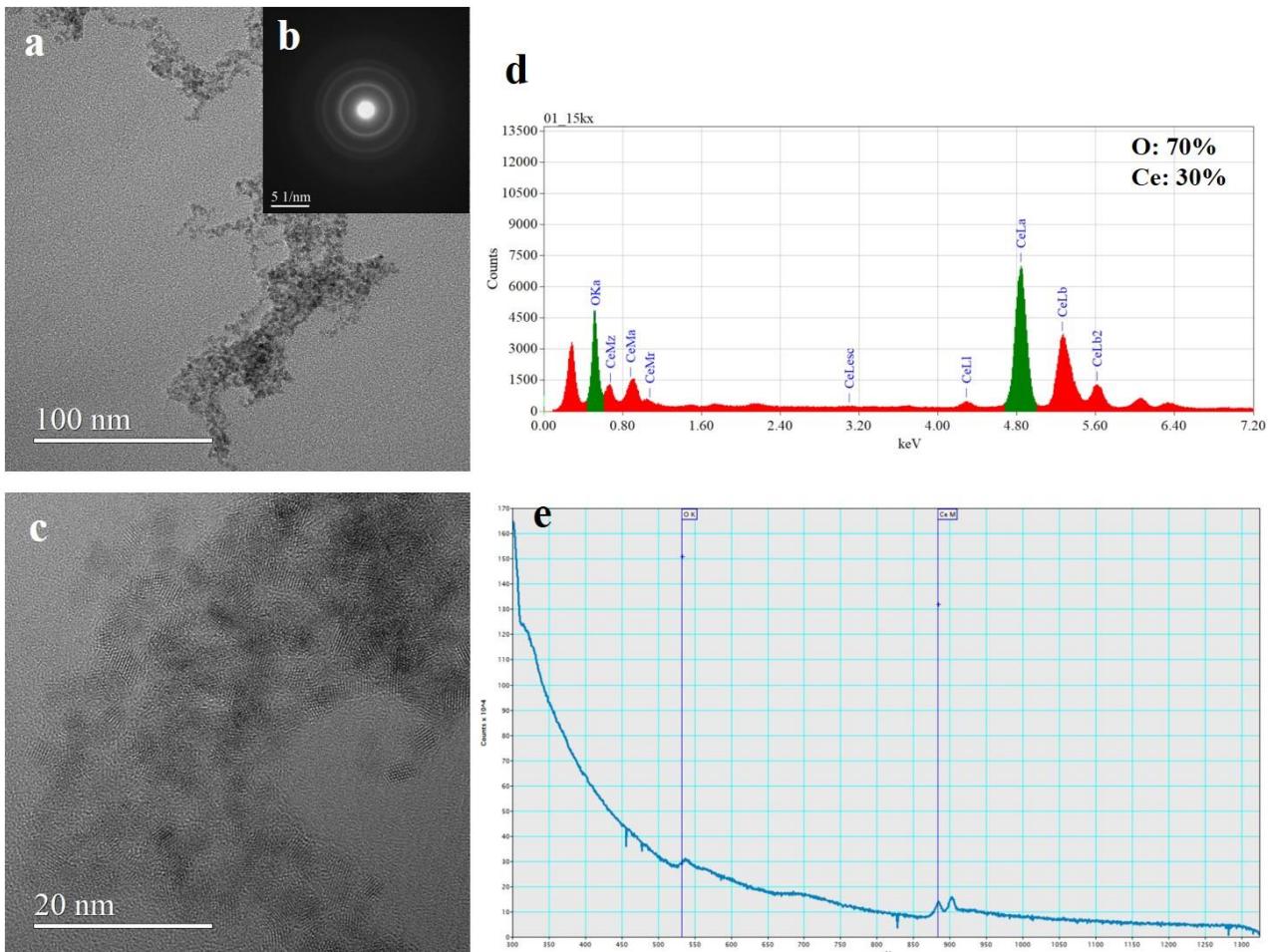


Figura 2. Caracteristicile initiale ale probei 2 studiate prin CTEM (a), HRTEM (b), SAED (c), EDS (d) si EELS (e).

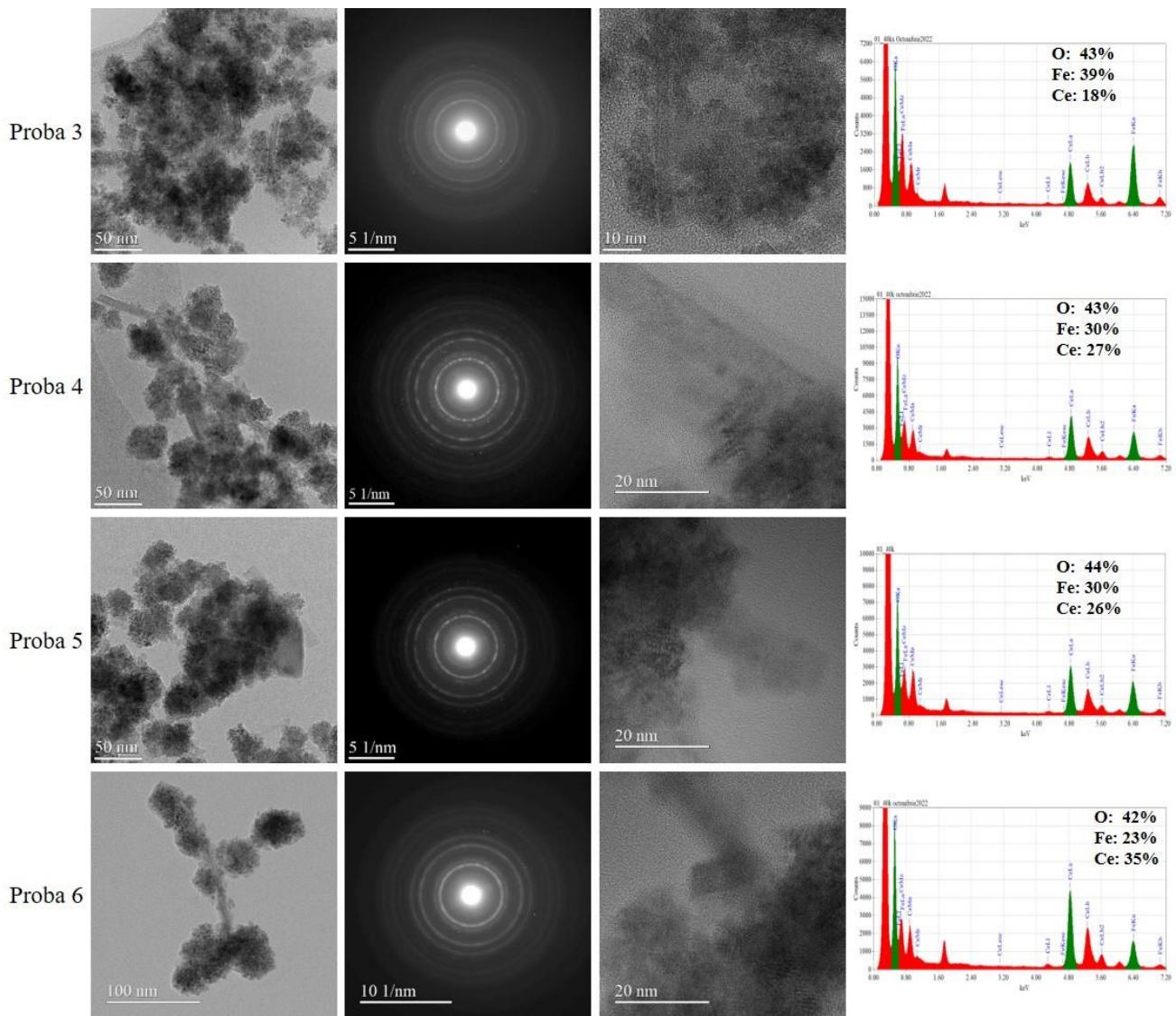


Figura 3. Caracteristicile morfo-structurale ale probelor 3, 4, 5 si 6 studiate prin CTEM, SAED, HRTEM si EDS.

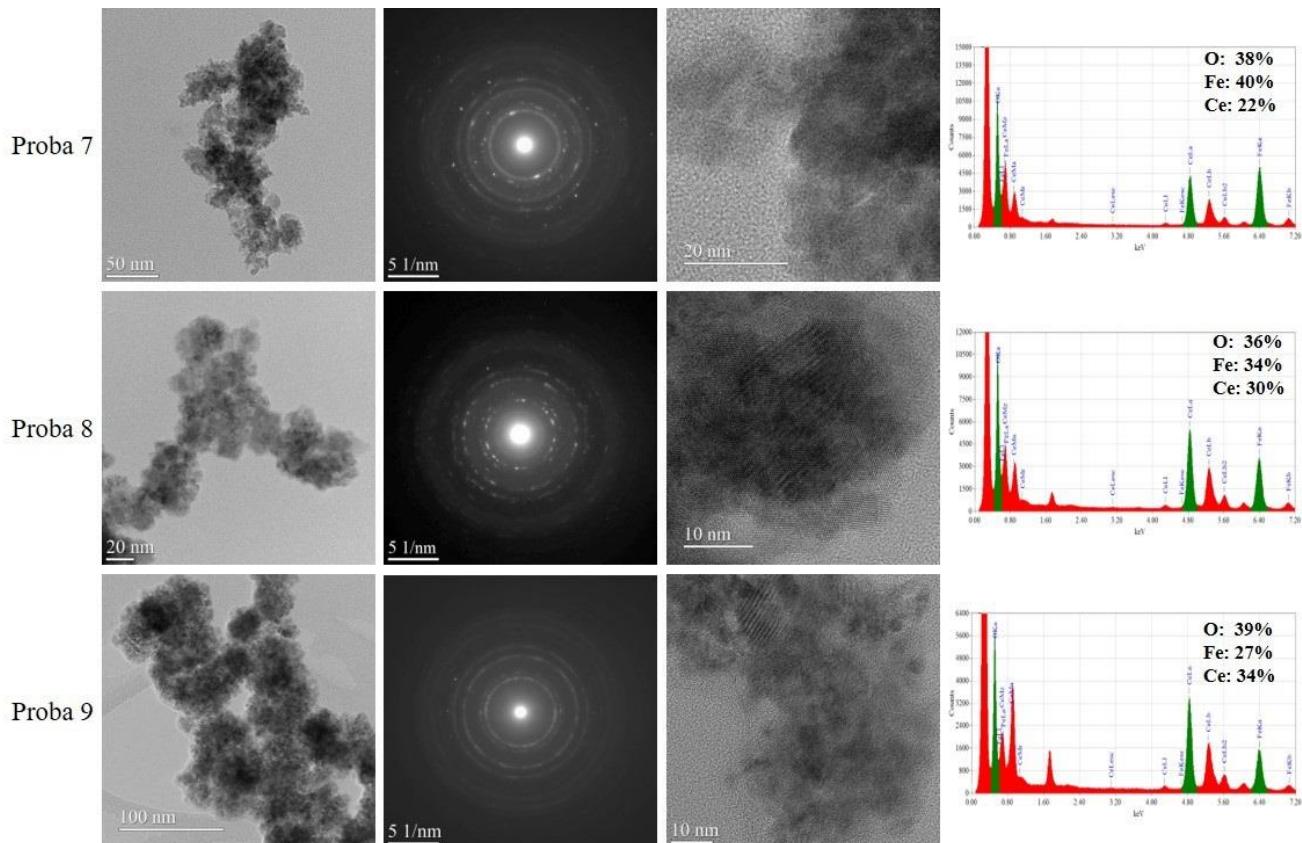


Figura 4. Caracteristicile morfo-structurale ale probelor 7, 8 si 9 studiate prin CTEM, SAED, HRTEM si EDS.

Imaginiile CTEM realizate pe nanocompozitele nefiltrate termic (figura 3) arata ca caracteristicile morfo-structurale ale nanoparticulelor de Fe_3O_4 si CeO_2 raman neschimbate. In schimb, in cazul nanocompozitelor tratate termic (figura 4), imaginile CTEM ilustreaza o modificarare a caracteristicilor morfo-structurale. Nanofirele de Fe_3O_4 dispar, iar cele fatetate sunt mult mai rare, iar dimensiunea nanoparticulelor sferice a crescut diametrul variind intre 7 si 20 nm. O crestere a dimensiunilor se remarcă și în cazul nanoparticulelor de CeO_2 într-un domeniu cuprins între 3 și 10 nm. O confirmare a cresterii dimensiunilor nanoparticulelor o regăsim și în diagramele SAED unde în locul inelelor continuu din cazul compozitelor nefiltrate (figura 3) apar inele discontinui și spoturi în cazul compozitelor tratate (figura 4). Totodată diagramele SAED confirmă că nu există o modificare a structurii cristaline. Imaginile HRTEM atât pentru compozitele nefiltrate, cât și pentru cele tratate demonstrează că nanoparticulele raman perfect cristalizate.

Hartile elementale ale Fe și Ce obținute prin EELS în modul STEM arată distribuția celor două elemente de interes în probe (figura 5). În cazul compozitelor nefiltrate (proba 3 până la proba 6), se poate observa morfologia variată a magnetitei, nanoparticule sferice sau nanofire, dar și faptul că functionalizarea cu grupuri $-\text{OH}$ a magnetitei a avut un succes limitat, doar o parte din nanoparticulele de Fe_3O_4 fiind înconjurate de nanoparticule de CeO_2 . În cazul nanocompozitelor tratate termic (probele 7, 8 și 9), distribuția celor două elemente conduce la ipoteza unei segregări complete a Fe_3O_4 de CeO_2 .

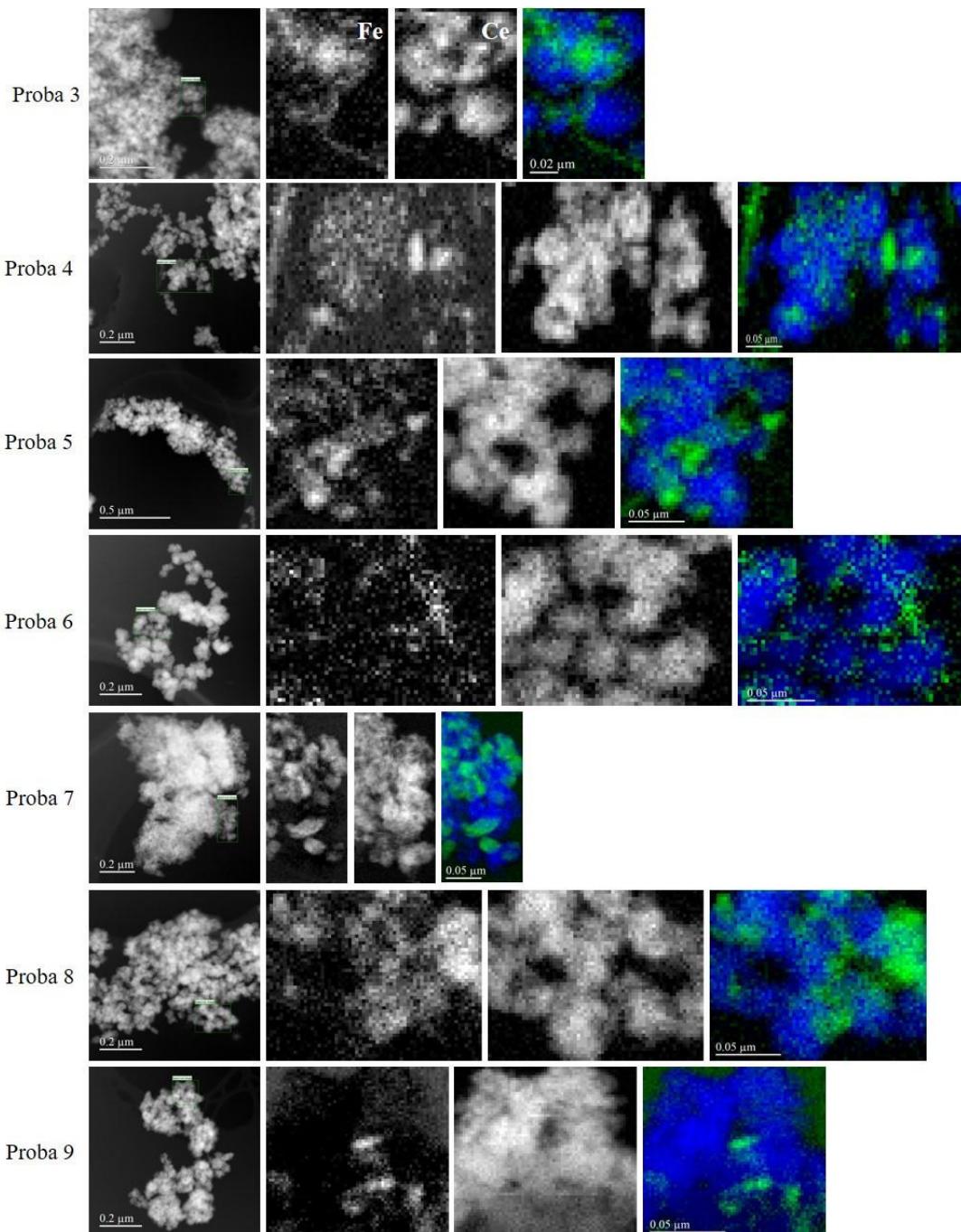


Figura 5. Distribuția elementala ale Fe și Ce folosind tehnica EELS.

2) Investigatii privind transformarile structurale, morfologice si componitionale ale platformei CO-ION prin TEM, SEM, HRTEM, EDS, EELS la diferite perioade de timp dupa inserarea intr-un mediu acid.

In al doilea act, degradarea platformei CO-ION a fost studiata folosind un mediu acid asemanator celui din lizozomi. Experimentele de biodegradare au fost efectuate in acid citric 20mM la diferite valori ale pH (2.5, 3, 4, 5 si 6). Cantitati mici din aceste suspensii au fost colectate la anumite perioade de timp (2, 7, 14 si 21 zile) dupa introducerea nanocompozitelor in mediul acid si au fost depuse pe grile de microscopie din Cu acoperite cu un film de carbon cu gauri. Pentru experimentele de biodegradare au fost alese nanocompozitele 3 si 5. Alegerea a fost facuta datorita morfoloiei variate a nanocompozitelor si a interesului de a determina daca biodegradarea este influentata de morfologie.

Imaginile CTEM ale nanocompozitului 3 inainte si la diferite perioade de timp dupa introducerea in mediul acid cu pH 2.5 (Figura 6) ilustreaza faptul ca morfologia initiala a nanocompozitului a ramas nemodificata chiar si la 3 saptamani in mediul acid. Tot in imaginile CTEM se mai remarka aparitia unor nanoparticule sferice cu dimensiuni intre 2 si 7 nm. Din datele furnizate de imaginile HRTEM si spectrele EDS si EELS, a rezultat ca aceste nanoparticule sunt de oxid de cupru. In timpul uscarii picaturilor preluate din suspensiile acide, mediul acid a erodat din grile de cupru si a condus la formarea acestor nanoparticule. Ele au fost observate la toate probele cu pH 2.5, 3 si 4. Diagramele SAED demonstreaza ca nu exista modificari ale structurii cristaline ale platformei CO-ION, iar imaginile HRTEM arata ca nanocompozitele raman perfect cristalizate si exista o amorfizare a acestora. Raportul concentratiilor atomice in spectrele EDS ramane in general neschimbat. Exceptia raportului concentratiilor atomice la ziua 14 ar putea fi explicata prin faptul ca a existat o eroare in cuantificarea efectuata de programul dedicat.

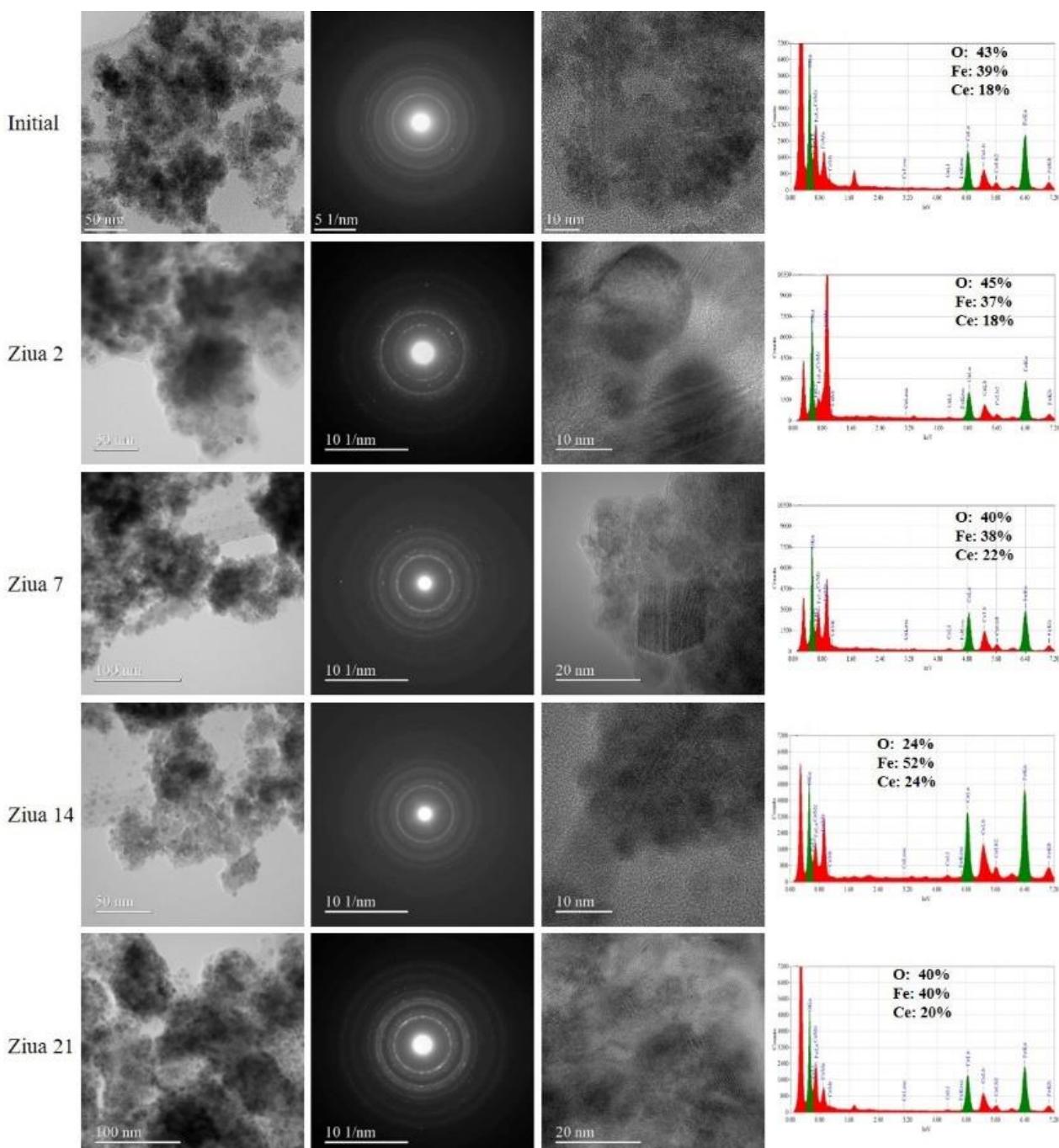


Figura 6. Characteristicile morfo-structurale ale nanocompozitelor la pH 2.5 la diverse intervale de timp studiate prin CTEM, SAED, HRTEM si EDS.

Si in cazul nanocompozitului 3 inainte si la diferite perioade de timp dupa introducerea in mediul acid cu pH 5 (Figura 7), analizele morfo-structurale si analitice efectuate prin tehnici CTEM, SAED, HRTEM si EDS au demonstrat ca nu exista modificarile structurii cristaline a nanocompozitului.

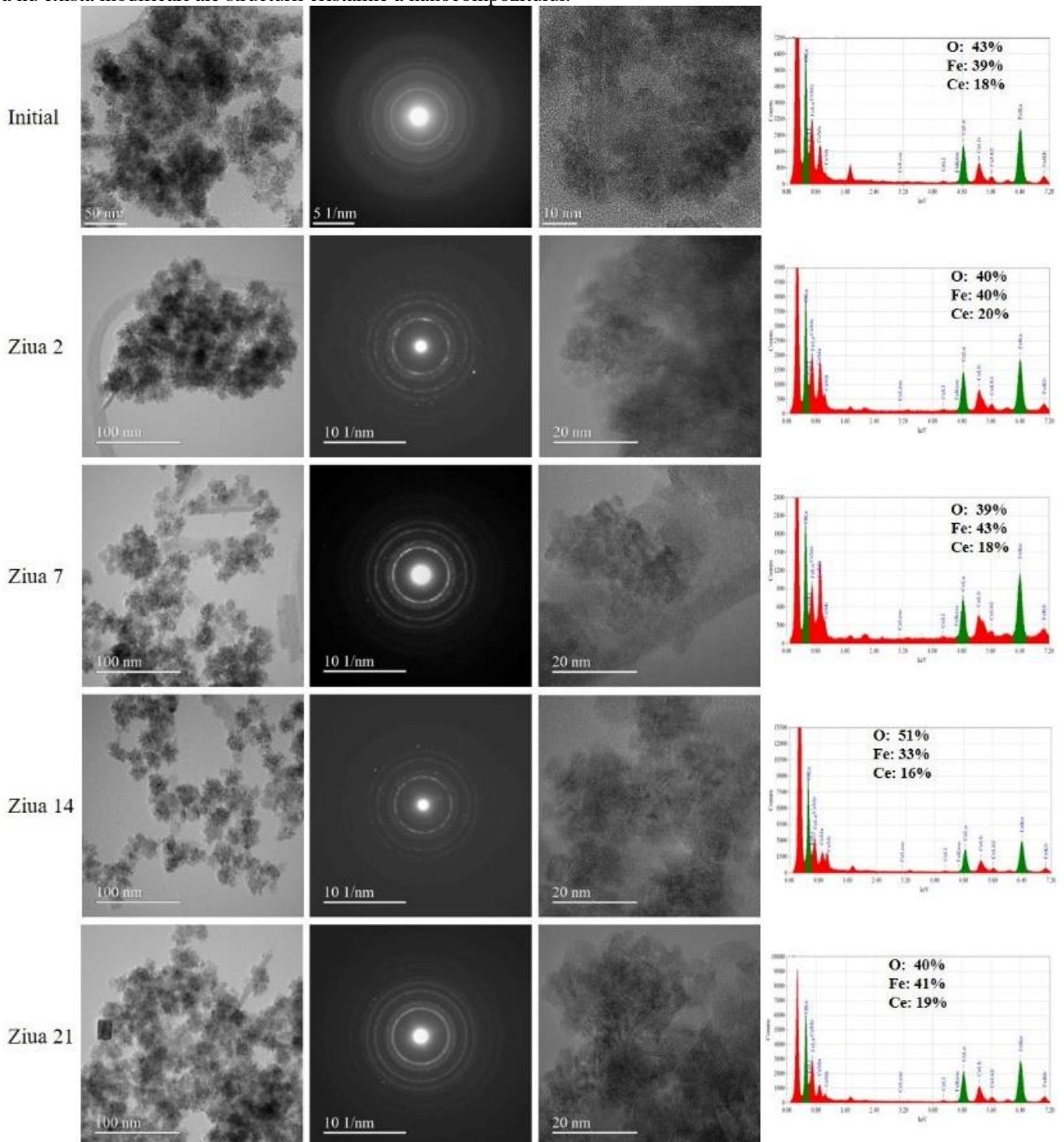


Figura 7. Caracteristicile morfo-structurale ale nanocompozitelor la pH5 la diverse intervale de timp studiate prin CTEM, SAED, HRTEM si EDS.

Folosind EELS in modul STEM au fost obtinute hartile elementale ale Fe si Ce prezintand distributia celor doua elemente de interes in probe. In figura 8, sunt prezentate hartile elementale ale Fe si Ce pentru nanocompozitul 3 inainte si la diverse intervale de timp dupa introducerea in mediul acid cu pH 2.5. Hartile Fe confirmă concluzia desprinsă din imaginile CTEM că morfologia nanoparticulelor / nanofirilor de Fe_3O_4 nu este afectată de mediul acid. Hartile Ce demonstrează că nanoparticulele de CeO_2 nu se gasesc grupate doar în jurul Fe_3O_4 asa cum ar fi trebuit să fie dacă funcționalizarea celor din urmă ar fi fost folosită și că mediul acid nu a condus la o disociere a nanoparticulelor de CeO_2 de Fe_3O_4 acolo unde funcționalizarea a avut efect.

In figura 9 sunt prezentate spectrele EELS ale nanocompozitului 3 inainte si dupa introducerea intr-un mediul acid cu pH2.5 la diverse intervale de timp. In acestea se regasesc semnalele caracteristice ale elementelor de interes (O, Fe si Ce). Analizand varfurile pentru fiecare element se constata ca nu exista o modificare majora a formei acestora ceea ce conduce la concluzia ca nu exista modificarile structurii cristaline a nanocompozitului 3 datorita mediului acid.

Analizele morfo-structurale si analitice efectuate prin tehnici CTEM, SAED, HRTEM si EDS pe nanocompozitul 5 au demonstrat deosemenea ca nu exista modificarile structurii cristaline a nanocompozitului.

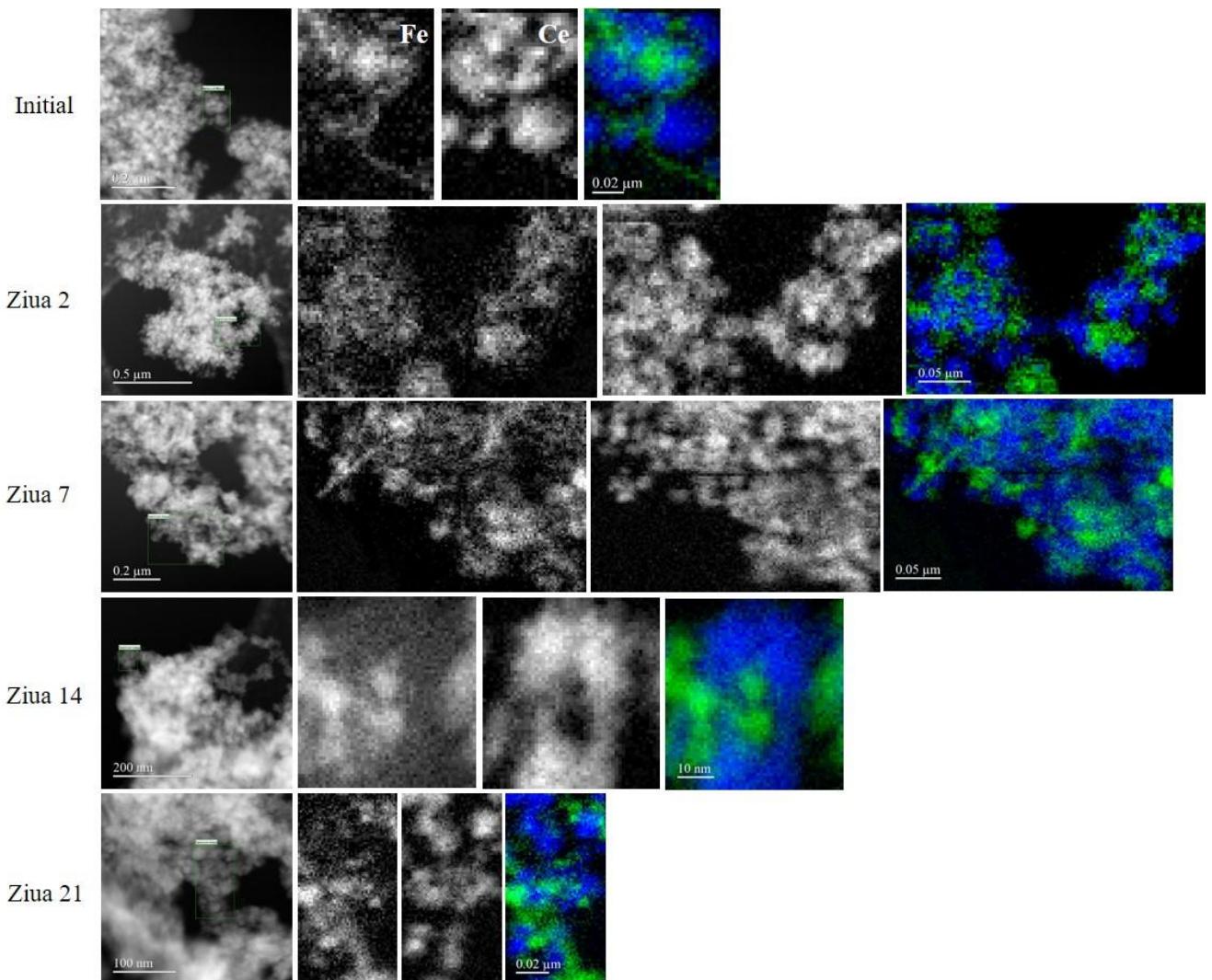


Figura 8. Distributia elementala ale Fe si Ce folosind tehnica EELS.

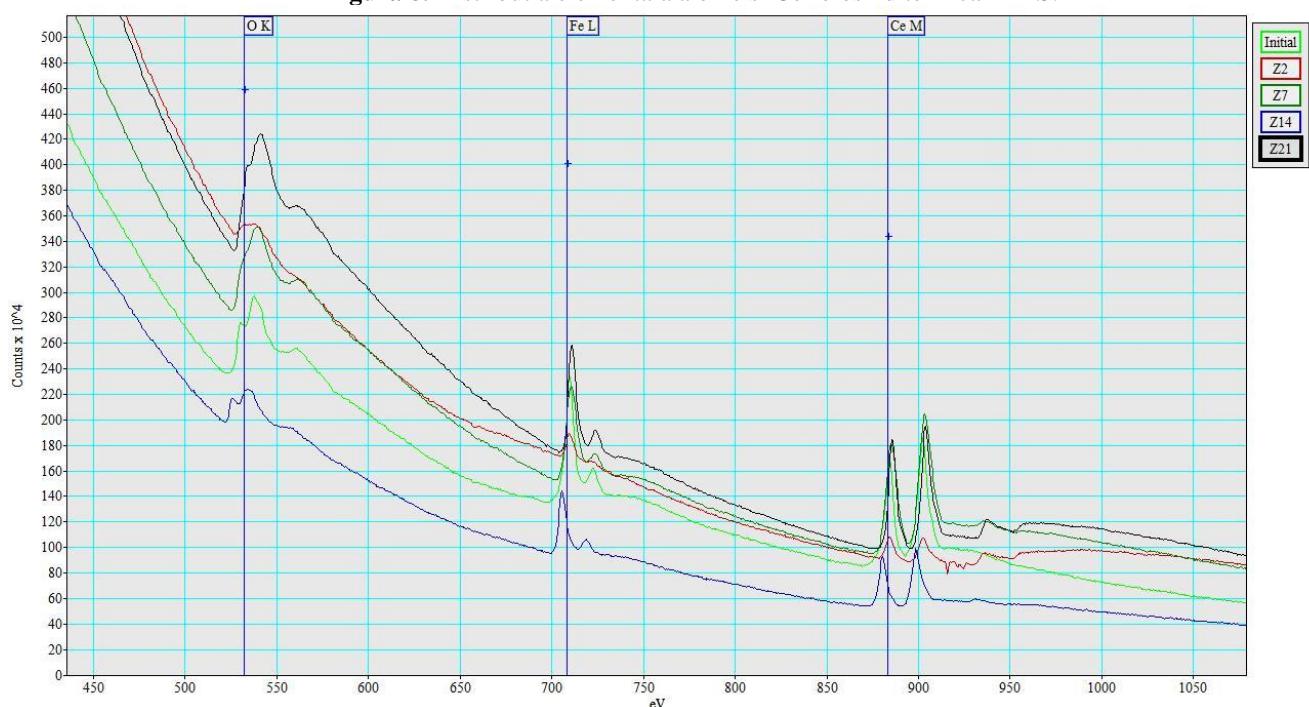


Figura 9. Spectrele EELS ale nanocompozitului 3 inainte si dupa introducerea intr-un mediu acid cu pH2.5 la diverse intervale de timp.

CONCLUZII

Pornind de la nanoparticule de Fe_3O_4 si CeO_2 cu caracteristici morfo-structurale determinate, au fost sintetizate mai multe platforme CO-ION in care a variat grosimea invelisului de CeO_2 in jurul nanoparticulelor de Fe_3O_4 . O parte din aceste platforme nanocomposite au fost tratate termic. Folosind tehnici de microscopie electronica prin transmisie (CTEM, SAED, HRTEM EDS si EELS), au fost determinate morfologia, structura cristalina si compozitia chimica a nanocompozitelor inainte si dupa tratamentul termic. S-a demonstrat ca nanocompozitele netratate termic au pastrat caracteristicile initiale ale nanoparticulelor de Fe_3O_4 si CeO_2 . In cazul nanocompozitelor tratate termic, s-au constatat modificari ale caracteristicilor morfologice ale nanoparticulelor initiale de Fe_3O_4 si CeO_2 : au disparut nanofirele de Fe_3O_4 , iar dimensiunile nanoparticulelor de Fe_3O_4 si CeO_2 au inregistrat o usoara crestere.

Degradarea platformei CO-ION alese a fost studiata folosind un mediu acid asemanator celui din lizozomi. Experimentele de biodegradare au fost efectuate in acid citric la diferite valori ale pH la anumite perioade de timp dupa introducerea nanocompozitelor in mediul acid. Investigatiile efectuate prin tehnici de microscopie CTEM, SAED, HRTEM EDS si EELS au demonstrat ca mediul acid nu a provocat modificari ale morfologiei, structurii cristaline sau compozitiei chimice ale nanocompozitelor in cursul a 3 saptamani. Experimentele de biodegradare urmeaza a fi continue pana cand vor fi evidențiate modificari morfo-structurale.

B. Diseminarea rezultatelor

A fost creata pagina web a proiectului: <https://infim.ro/project/cytobipothera/>. A fost actualizata cu rezultatele obtinute in prima etapa a proiectului.

Rezultatele obtinute in cadrul primului act al etapei intai vor fi incluse intr-un articol intitulat „ $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CeO}_2$ Nanocomposites with “Core/Shell”-Like Structure Fabricated via Precipitation Method: Physical-Chemical Properties and Bioactivity”. Manuscrisul articolului urmeaza a fi finalizat si trimis pentru publicare la un jurnal ISI din Q1.

Director proiect,

Dr. Valentin A Maraloiu



Rezumat al etapei intai a proiectului PN-III-P1-1.1-TE-2021-0981 - Contract nr: 29/2022 („Citotoxicitatea si biodegradarea platformei de nanoparticule de oxid de ceriu-oxid de fier ca potential agent teranostic pentru boli cauzate de ROS”)

Pornind de la nanoparticule de Fe_3O_4 si CeO_2 cu caracteristici morfo-structurale determinante, au fost sintetizate mai multe platforme CO-ION in care a variat grosimea invelisului de CeO_2 in jurul nanoparticulelor de Fe_3O_4 . O parte din aceste platforme nanocompozite au fost tratate termic. Folosind tehniciile de microscopie electronica prin transmisie (CTEM, SAED, HRTEM EDS si EELS), au fost determinate morfologia, structura cristalina si compozitia chimica a nanocompozitelor inainte si dupa tratamentul termic. S-a demonstrat ca nanocompozitele nefiltrate termic au pastrat caracteristicile initiale ale nanoparticulelor de Fe_3O_4 si CeO_2 . In cazul nanocompozitelor tratate termic, s-au constatat modificari ale caracteristicilor morfologice ale nanoparticulelor initiale de Fe_3O_4 si CeO_2 : au disparut nanofirile de Fe_3O_4 , iar dimensiunile nanoparticulelor de Fe_3O_4 si CeO_2 au inregistrat o usoara crestere.

Degradarea platformei CO-ION alese a fost studiata folosind un mediu acid asemanator celui din lizozomi. Experimentele de biodegradare au fost efectuate in acid citric la diferite valori ale pH la anumite perioade de timp dupa introducerea nanocompozitelor in mediul acid. Investigatiile efectuate prin tehniciile de microscopie CTEM, SAED, HRTEM EDS si EELS au demonstrat ca mediul acid nu a provocat modificari ale morfologiei, structurii cristaline sau compozitiei chimice ale nanocompozitelor in cursul a 3 saptamani.

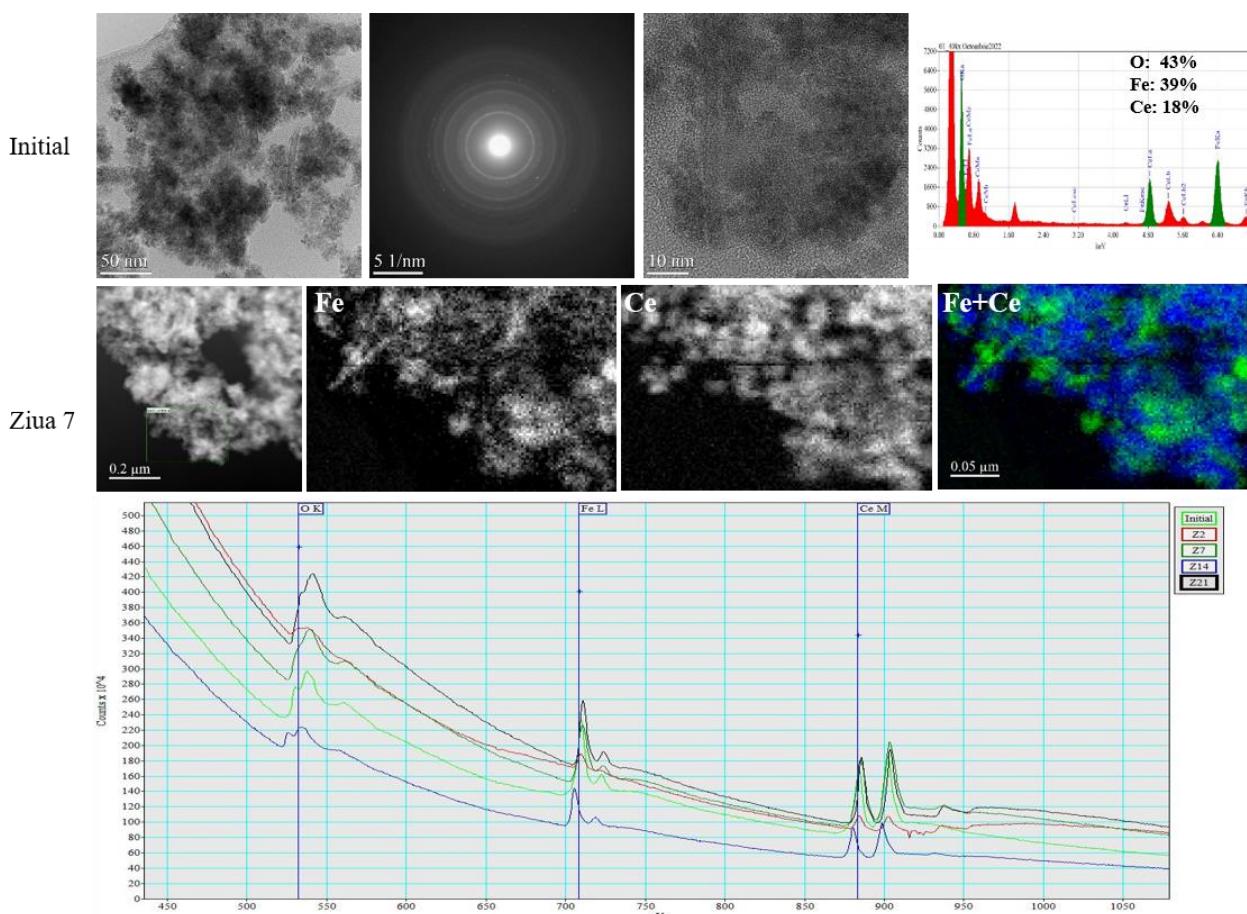


Figura. Tehnicile de microscopie electronica prin transmisie (CTEM, SAED, HRTEM EDS si EELS) folosite pentru studierea biodegradarii platformei CO-ION intr-un mediu acid similar celui biologic.