



**Rezumatul tezei de doctorat**

## **Aplicații SERS- de la molecule la microorganisme**

**Student doctorand: Nicoleta Elena Mircescu**

**Conducător științific: Prof. Dr. Vasile Chiș**

**Facultatea de Fizică, Universitatea Babeş-Bolyai**

**Cluj-Napoca**

**2013**

## CUPRINS

Introducere .....	3
Analiza teoretică și vibrațională a compușilor cu conținut ridicat de azot.....	4
Sinteza de noi substraturi SERS-active .....	9
Prepararea in situ a unui substrat de Ag și detecția SERS în urma separării prin cromatografie pe filme subțiri .....	9
Sinteza de nanoparticule de aur reduse cu polietilen glicol .....	11
Detecția bazată pe SERS a uropatogenilor.....	14
Concluzii .....	19
Referințe: .....	20

**Cuvinte cheie: SERS, nanoparticule, uropatogen, substrat SERS**

## Introducere

Această teză prezintă aplicații practice ale spectroscopiei vibraționale în domeniul medical și farmaceutic, folosind cu precădere metode analitice bazate pe **spectroscopia Raman amplificată la suprafață, SERS**. Rezultatele științifice prezentate în cadrul tezei sunt obținute în urma activității de cercetare realizată atât în cadrul Universității Babeș-Bolyai Cluj-Napoca, sub îndrumarea Prof. Dr. Vasile Chiș și a Conf. Dr. Nicolae Leopold, cât și în colaborare cu Universitatea Tehnică München (TUM), Catedra de Chimie Analitică, sub îndrumarea Dr. Christoph Haisch și a Dr. Natalia P. Ivleva.

În prima parte este introdus stadiul actual al cercetării privind subiectele dezvoltate. Se motivează totodată alegerea acestei ramuri a spectroscopiei aplicative și se subliniază inovativitatea și originalitatea activității de cercetare întreprinse pentru detecția la nivel de urme a compușilor moleculari selectați și la nivel celular a microorganismelor răspunzătoare de infecțiile urinare.

A doua parte descrie metodologia experimentală și fundamentele teoretice utilizate în sinergie pentru atingerea obiectivelor propuse. Următoarele trei capitole urmăresc descrierea detaliată a aplicațiilor bazate pe SERS și evidențierea avantajelor acestor abordări, respectiv a informației molecular-structurale cu un conținut ridicat obținute.

În capitolul trei sunt prezentate două studii teoretice și experimentale privind compuși moleculari cu un conținut ridicat de azot, **melamina** și **zidovudina**. Metodele spectroscopice utilizate sunt spectroscopia cu transformată Fourier în infraroșu, spectroscopia Raman și SERS. Din punct de vedere teoretic s-au utilizat calcule DFT la un nivel B3LYP/6-31G(d), respectiv B3LYP/6-311++G(d,p), atât în stare de gaz, cât și simulând interacțiuni cu apa ca solvent. De asemenea, s-a explicat prin calcule MEP adsorpția compușilor investigați la suprafața de Ag.

Capitolul patru este dedicat metodelor noi de sinteză a substratelor SERS-active, mai exact descrie un substrat de argint preparat prin expunere a unei plăcuțe TLC la laser și a unui substrat nou de aur, realizat prin reducerea sării de aur cu un polimer, astfel obținând nanoparticule cu o biocompatibilitate ridicată.

În ultimul capitol sunt prezentate rezultatele obținute în cadrul stagiului de șase luni la Universitatea Tehnică München, Catedra de Chimie Analitică. În acest studiu se urmărește detecția cât mai rapidă, eficientă și necostisitoare a microorganismelor ce cauzează infecțiile urinare (*E. coli* și *P. mirabilis*).

## Analiza teoretică și vibrațională a compușilor cu conținut ridicat de azot

**Melamina** este un compus molecular cu un conținut ridicat de azot utilizat pentru a frauda calitatea proteică a produselor alimentare, mai ales a laptelui praf sau a altor produse derivate din lapte. De aceea s-a impus la nivel european ca limita permisă pentru melamină în laptele praf să fie de 1 mg/kg iar în altfel de produse de maxim 2.5 mg/kg. Metodele convenționale de analiză ultrasenzitivă a melaminei sunt spectrometria de masă, cromatografia lichidă de înaltă performanță [1], cromatografia gazoasă sau lichidă cât și electroforeză capilară [2]. Acestea permit într-adevăr atingerea limitelor de detecție de ordinul părților pe milion sau chiar pe miliard. Totuși, costurile necesare sunt ridicate, iar aparatele sunt statice, nu pot ajunge în teren și totodată analiza depinde de personal foarte specializat. De aceea, în acest studiu se propune o metodă alternativă de detecție, SERS, care este la fel de sensibilă, dar cu

avantajele de a fi mult mai ieftină, versatilă și mobilă, deci ideală în activități de cercetare desfășurate în teren.

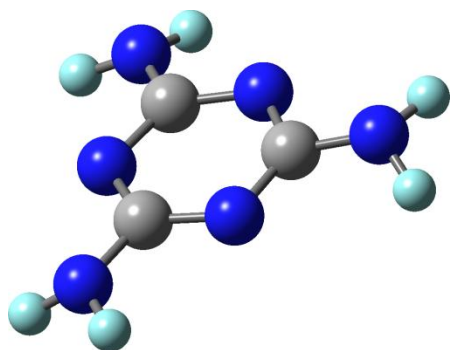


Fig.1. Structura B3LYP/6-311++G(d,p) optimizată a melaminei neutre.

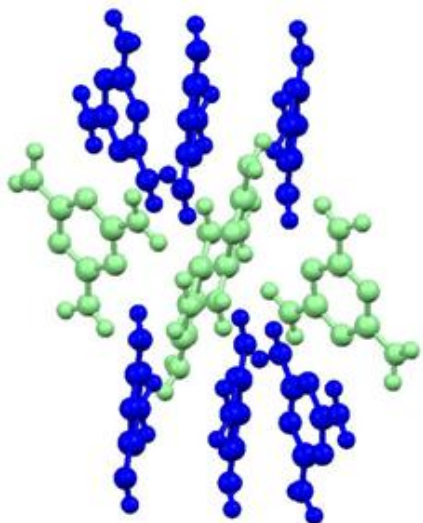


Fig.2. Structura parțial optimizată a clusterului de 10 molecule de melamină.

Structura optimizată prin calcule DFT la nivelul de teorie B3LYP/6-311++G(d,p) a melaminei în stare neutră este inclusă în Figura 1. S-a constatat că forma neutră a moleculei este neplanară datorită unor mici deviații ale atomilor de carbon și azot din inelul de triazină. Considerăm această structură ca fiind cea reală, chiar dacă alte studii teoretice indică o planaritate a formei neutre a melaminei [3]. Geometria de start a calculelor noastre a fost structura determinată experimental prin difracție de raze X, publicată de Varghese [4]. Pentru o reproducere acurată a spectrelor vibraționale a melaminei, s-a conceput un cluster format din 10 molecule, unele fixe, altele având posibilitatea de a vibra, care să reprezinte celula elementară a structurii cristaline a melaminei. Figura 2 prezintă structura parțial optimizată prin calcule B3LYP/6-31G(d) a clusterului descris.

Spectrele înregistrate experimental SERS și Raman ale melaminei, alături de spectrul Raman calculat pentru clusterul de molecule de melamină sunt expuse în Figura 3. Utilizarea modelului de cluster în calcularea DFT a frecvențelor Raman s-a dovedit o soluție bună în precizarea acurată a numerelor de undă regăsite în spectrul

experimental.

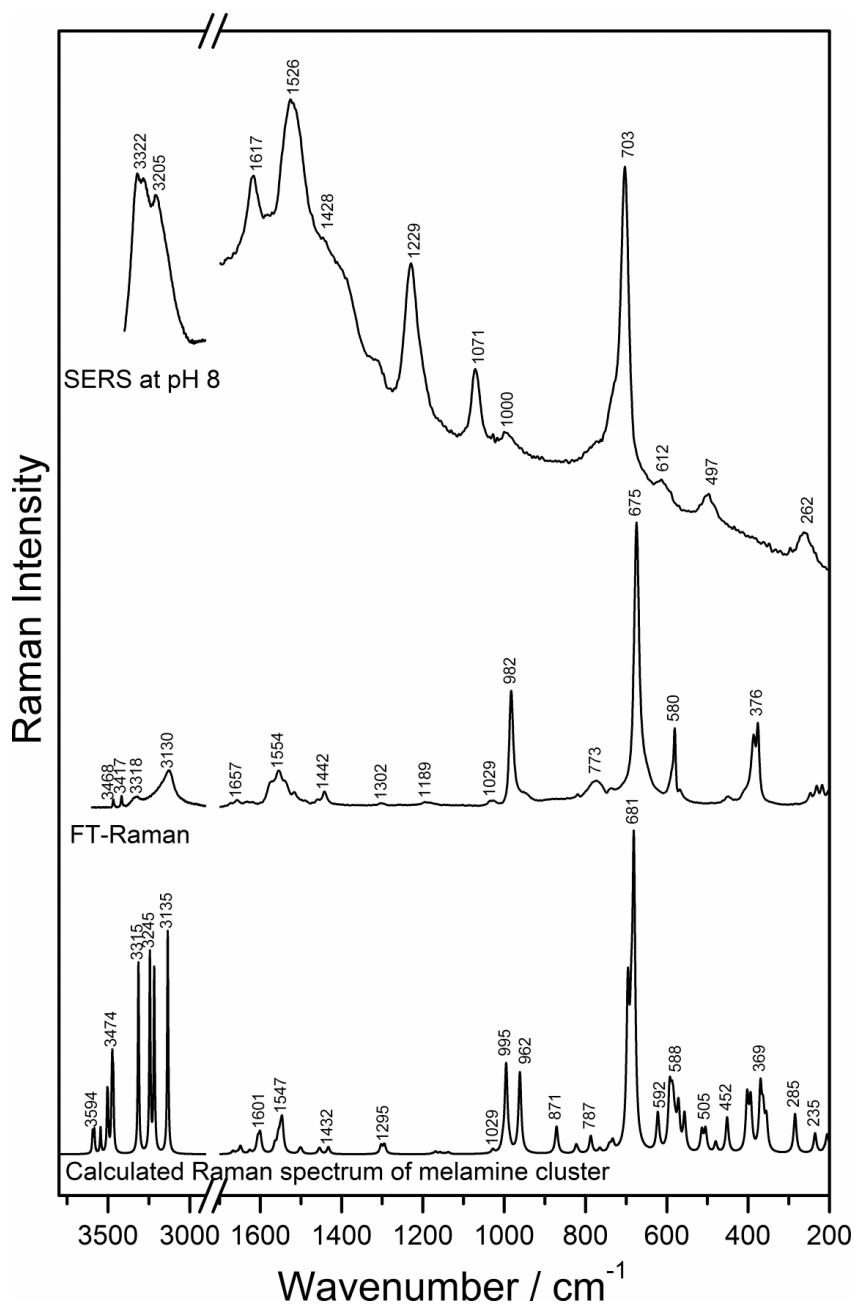


Fig.3. Spectrul Raman al clusterului, spectrul FT-Raman al melamine pulbere și spectrul SERS la pH 8 al melaminei.

Deoarece la valori pH acide s-a dovedit prin calcule  $pK_a$  prezența predominantă a speciei protonată a melaminei, am investigat atât SERS cât și cu ajutorul calculelor DFT această zonă de pH a soluției apoase de melamină. Figura 4 prezintă spectrul SERS înregistrat la pH 4 al soluției,

iar Figura 5 arată monitorizarea răspunsului SERS al soluției la diferite valori ale pH-ului (laserul utilizat:532 nm).

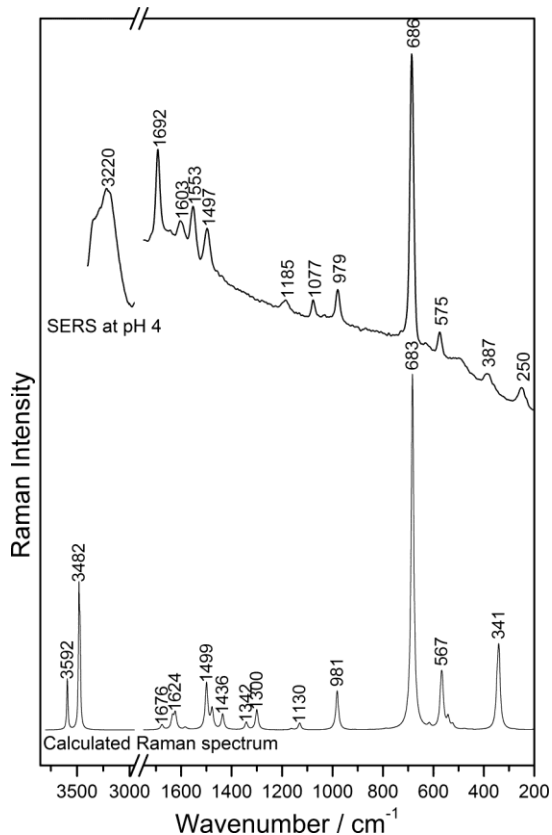


Fig.4. Spectrul SERS la pH 4 și spectrul Raman calculat al melaminei protonate.

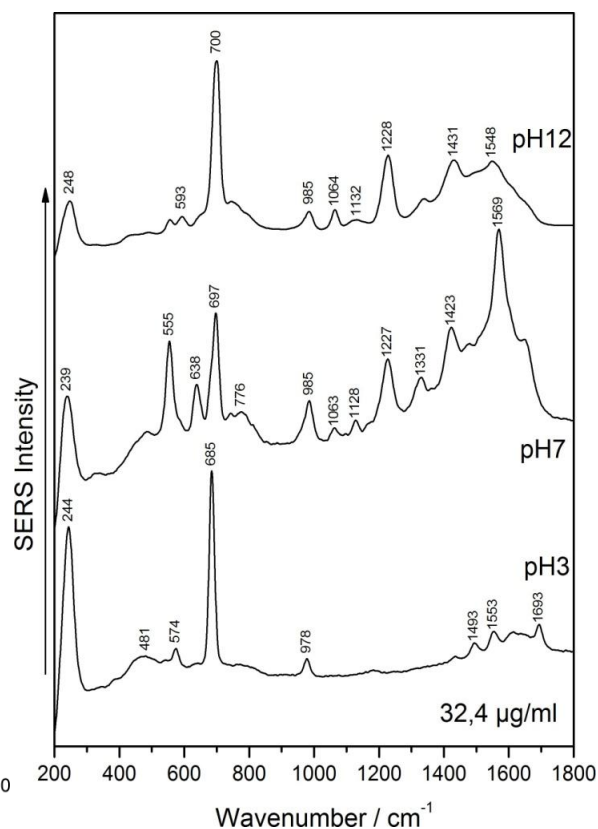


Fig.5. Spectrele SERS ale melaminei la diferite valori ale pH-ului.

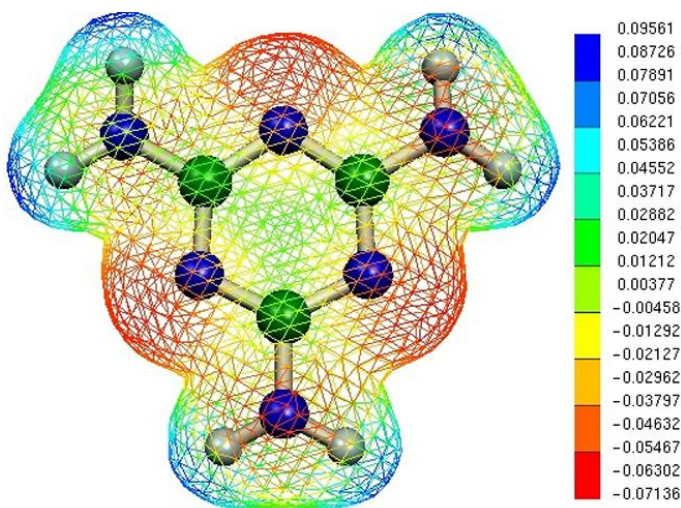


Fig.6. Potențialul electrostatic 3D al melaminei calculat la nivelul B3LYP/6-311++G(d) de teorie.

Pentru a determina modul de adsorbție al melaminei la suprafața de Ag, s-a realizat o „mapare” 3D a potențialului electrostatic al moleculei (MEP) prin calcule DFT la nivelul B3LYP/6-311++G(d,p) de teorie (vezi Figura 6). Orientarea moleculei de melamină s-a constatat că este cu inelul aromatic perpendicular la suprafață, iar adsorbția are loc prin atomii de azot ai inelului.

Astfel, o caracterizare fizico-chimică a speciilor neutră și protonată ale

melaminei s-a realizat cu succes prin metode spectroscopice și calcule teoretice DFT. Limita de detecție obținută pentru melamină în soluție apoasă este 32.4 μg/ml.

**Zidovudina** este o moleculă cu relevanță farmaceutică, fiind membru al clasei de inhibitori ai transcriptazei inverse, utilizați în tratarea SIDA (Sindromul Imunodeficienței Dobândite). Totodată, zidovudina este folosită și în radio terapia cancerului, fiind capabilă să oprească înmulțirea celulelor canceroase [5]. Structura moleculară a zidovudinei neutre optimizată la nivelul B3LYP/6-31G(d) de teorie este prezentată în Figura 7.

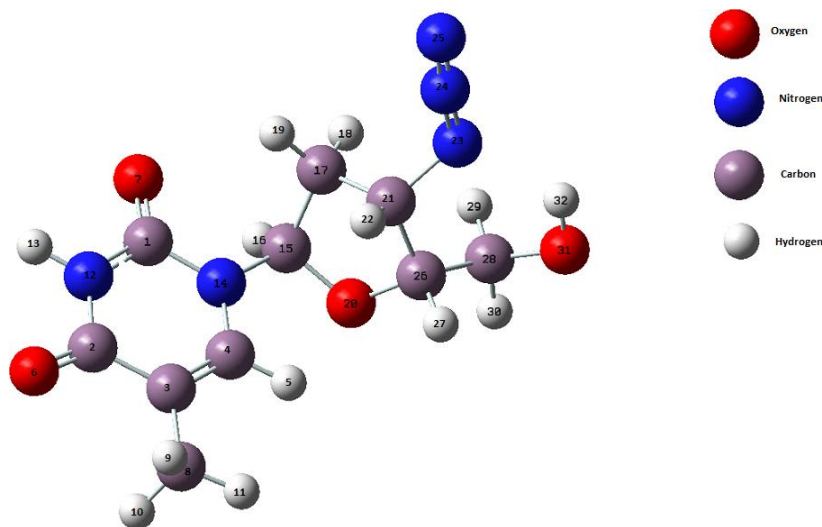


Fig.7. Structura moleculară optimizată la nivelul B3LYP/6-31G(d) de teorie a zidovudinei în forma neutră, în gaz.

Pentru a optimiza condițiile SERS experimentale în detecția zidovudinei, s-a realizat un studiu fizico-chimic complex, pe baza calculelor  $pK_a$  și a calculelor DFT de optimizare și determinare a frecvențelor de vibrație. Calculele teoretice au fost realizate la nivel de teorie B3LYP/6-31G(d). S-au identificat două forme ale zidovudinei, cea neutră (prezentă predominant la pH cuprins între 5-9) și cea

deprotonată (la pH mai mare sau egal cu 12).

Privind detecția SERS a zidovudinei s-a obținut o limită de detecție de  $10^{-5}M$  (vezi Figura 8) la excitarea cu laserul 532 nm. Spectrele SERS înregistrate pentru cele două specii moleculare sunt ilustrate în Figura 9. Cele mai intense benzi vibraționale în SERS sunt caracteristice grupului carbonil, prezente între  $1640-1660\text{ cm}^{-1}$  și ale grupului azidă de la  $2111\text{ cm}^{-1}$ . Amplificarea la suprafață SERS poate fi observată și în cazul vibrației de „respirație” a inelului aromatic ( $789-793\text{ cm}^{-1}$ ). Aceste observații spectroscopice cuplate cu calculul MEP (vezi Figura 10) au dus la o înțelegere completă a modului de adsorbție la suprafața de Ag a zidovudinei. Zidovudina interacționează cu suprafața de Ag prin atomii de oxigen ai inelului timină. Astfel, acest inel adoptă o poziție apropiată de cea perpendiculară la suprafață, concluzie susținută și de regulile de selecție SERS.

Un aspect important legat de zonele reactive ale moleculei de zidovudină (evidențiate prin „maparea” potențialului electrostatic- studiul MEP) este faptul că prin interacțiuni cu



metale ionice sau cu suprafețe cu sarcină, activitatea biologică a zidovudinei poate fi îmbunătățită [6].

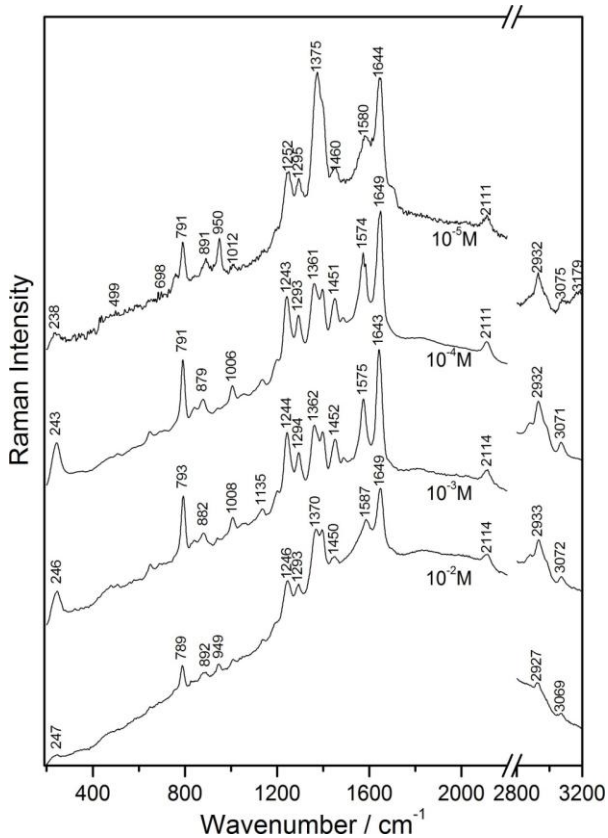


Fig.8. Spectrele SERS ale zidovudinei la diferite concentrații.

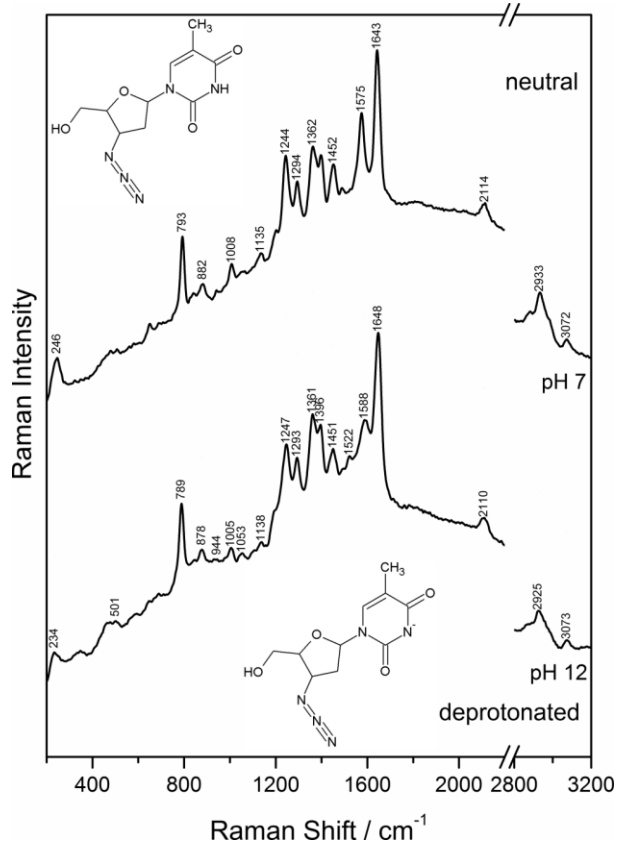


Fig.9. Spectrele SERS ale zidovudinei la concentrația  $10^{-4}$  M pentru cele două specii moleculare.

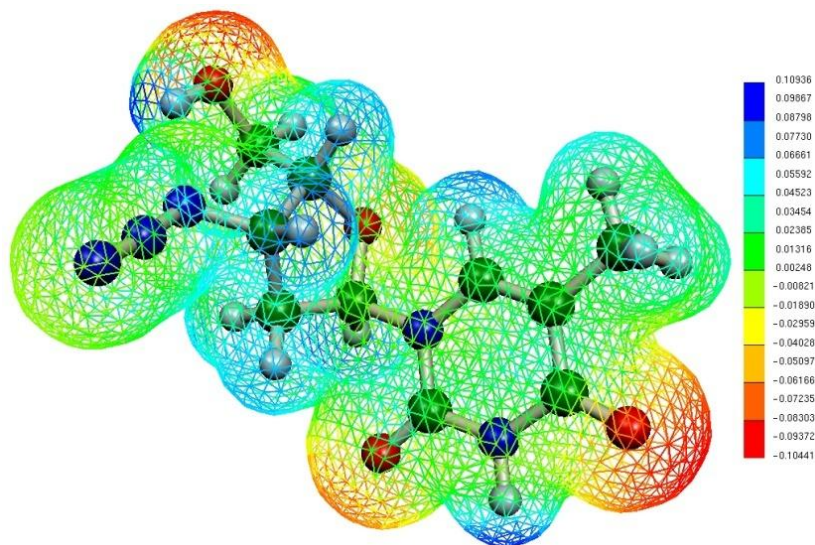


Fig.10. Potențialul electrostatic 3D al zidovudinei calculat la nivelul B3LYP/6-311++G(d) de teorie.



## Sinteza de noi substrate SERS-active

### Prepararea in situ a unui substrat de Ag și detecția SERS în urma separării prin cromatografie pe filme subțiri

Dezvoltarea de abordări inovative în domeniul senzorilor SERS reprezintă un obiectiv urmărit de cercetarea actuală datorită potențialului ridicat al SERS în ceea ce privește specificitatea și ultra sensibilitatea caracteristice metodei. În general se urmărește sintetizarea de noi substraturi SERS-active sub forma nanoparticulelor (NP) sau a filmelor subțiri [7-13] care să fie caracterizate printr-o rugozitate cât mai ridicată.

În cadrul acestui studiu propunem dezvoltarea unui sistem simplu, care cupleşă SERS cu metoda de separare cromatografică pe filme subțiri (TLC). Ca molecule de test s-au ales cromofori cu semnal SERS cunoscut și des utilizate în detecția SERS la nivel molecular [14-16]. Sinergia dintre aceste două metode a mai fost utilizată cu succes [17-19], însă noutatea sistemului propus în acest studiu constă în simplificarea metodologiei o dată cu exploatarea sensibilității SERS la maxim. Plăcuțele utilizate pentru separarea de mixturi binare de cromofori au fost tratate în prealabil cu o soluție de azotat de Ag pentru a obține rapid și eficient prin

iradierea cu laser substraturi SERS-active in situ, de mici dimensiuni (<1 mm) și localizate preferențială în punctele de separare a cromoforilor. Protocolul de preparare a probelor a fost optimizat în urma monitorizării a diferitelor metode de creare a substratului in situ (prin aplicarea soluției de azotat de Ag doar local, prin utilizarea a timpilor de iradiere diferiți, a cromofori diferiți precum și în concentrații diferite). Cea mai rapidă și eficientă procedură și cea propusă de noi în acest studiu este pretratarea plăcuțelor TLC cu azotat de Ag ( $10^{-2}$  M), separarea cromoforilor prin introducerea verticală a plăcuței într-o soluție de apă cu etanol (2:3) și iradierea laser exact pe punctele de separare a celor doi cromofori timp de circa 15 s.

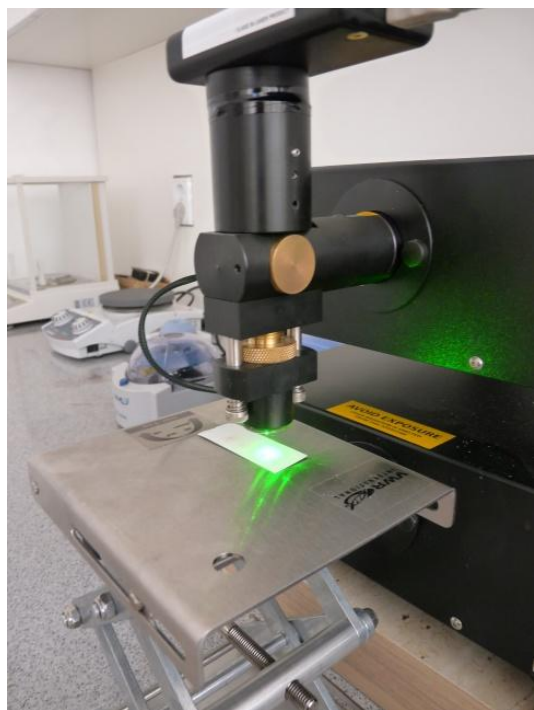


Fig.11. Imagine cu sistemul de detecție folosit pentru identificarea cromoforilor separați din mixturi binare.

Figura 11 prezintă sistemul de detecție utilizat pentru identificarea SERS a cromoforilor separați prin TLC din mixturi binare (laserul utilizat: 532 nm). Figurile 12 și 13 prezintă spectrele SERS înregistrate de la 2 mixturi

conținând complexul metalic Cu(II) al 4-(2-pyridylazo)resorcinol-ului [Cu(PAR)<sub>2</sub>] în concentrație 10<sup>-5</sup>M și bixina (5x10<sup>-4</sup>M), respectiv cresil violet (10<sup>-5</sup>M). Identificarea cromoforilor s-a făcut cu mare precizie pe baza răspunsului spectroscopic, prin consultarea totodată a altor studii SERS pe acești compuși.

Sistemul de detecție propus poate fi utilizat cu succes într-o arie largă de aplicații biomedicale – pentru detecția de medicamente, substanțe poluante, aditivi alimentari, etc.

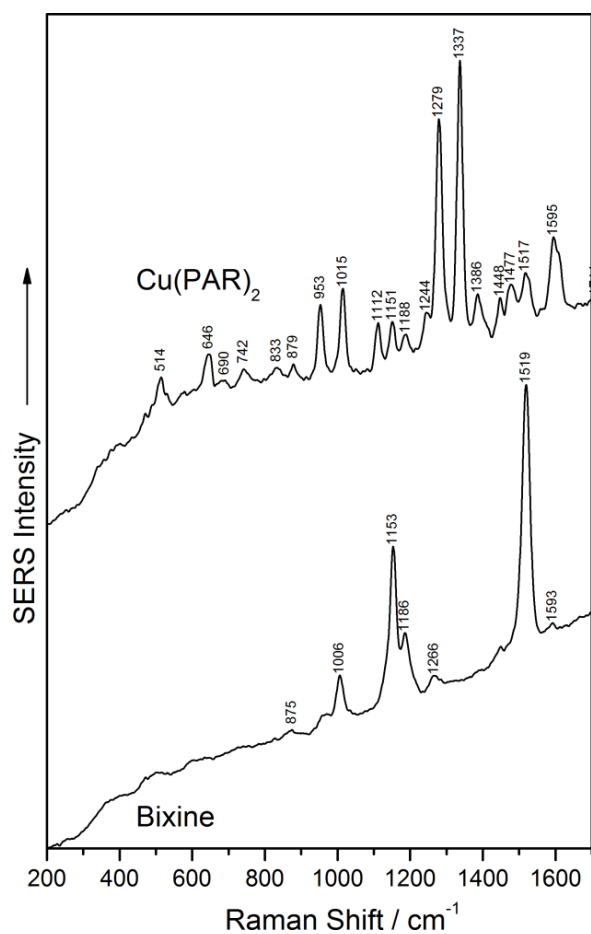


Fig.12. Spectrele SERS ale Cu(PAR)<sub>2</sub> și bixină înregistrate după separarea TLC a mixturii lor.

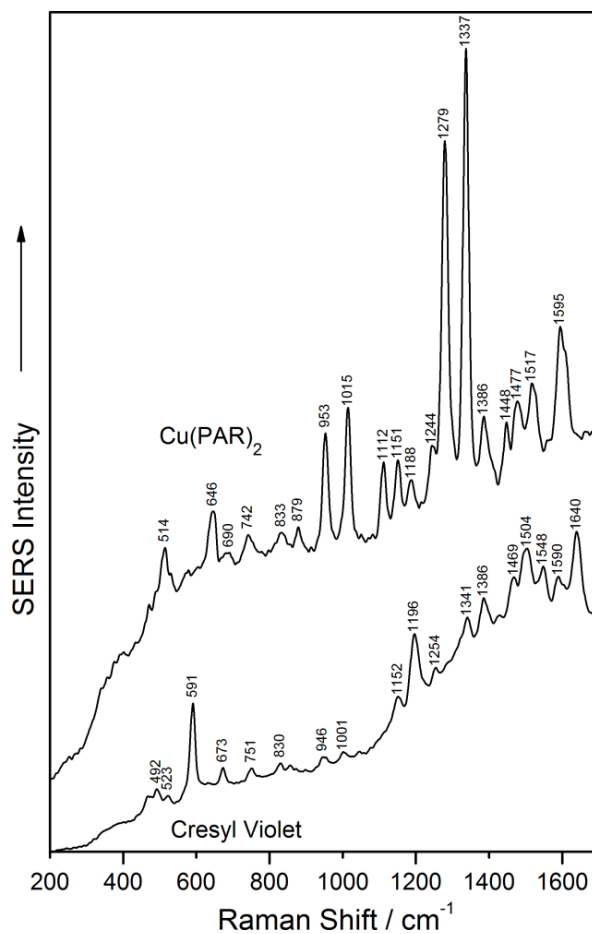


Fig.13. Spectrele SERS ale Cu(PAR)<sub>2</sub> și cresil violet înregistrate după separarea TLC a mixturii lor.

## Sinteza de nanoparticule de aur reduse cu polietilen glicol

Nanoparticulele (NP) au diverse aplicații ce depind de dimensiunea, distribuția și stabilitatea lor [20-21]. Dimensiunea NP poate fi controlată prin adăugarea a diferite cantități, respectiv în diferite concentrații de săruri metalice la sinteza lor. Suspensiile coloidale sunt influențate de temperatură, agregare, iradierea cu lumină, dar și de ionii de Cl [22] sau valoarea pH-ului [23]. Pe lângă stabilitatea lor, în anumite aplicații biomedicale, este important ca NP să dețină un grad redus de toxicitate, respectiv să fie cât mai biocompatibile.

De regulă, metodele convenționale de sinteză a NP necesită pe lângă sarea metalică pentru a avea loc reacția de reducere și anumiți stabilizatori sau agenți de agregare (NaOH, NaCl, etc.). Ceea ce propunem în acest studiu este o sinteză de NP de Au cât mai simplă, rapidă și lipsită de agenți stabilizatori sau de agregare, astfel încât biocompatibilitatea obținută să fie maximă. Astfel, s-a dezvoltat sinteza NP de Au prin reducerea cu polietilen glicol (PEG), fără a fi necesară tiolarea polimerului sau adăugarea de alți agenți la sinteză. Soluția coloidală se obține prin aducerea la temperatura de fierbere a soluției de sare de Au și prin adăugarea fie rapidă, fie lentă a agentului reducător, PEG. Astfel, folosind PEG cu lanț de diferite dimensiuni și totodată modificând viteza de adăugare a PEG-ului, s-au sintetizat NP de Au de diferite dimensiuni. S-a observat că la o adăugare lentă a PEG-ului, NP tind prin nucleare să aibă dimensiuni mai mari (aprox. 60 nm), iar la adăugarea rapidă se obțin NP de dimensiuni mici (7-20 nm). În funcție de aplicația în care se folosesc NP biocompatibile sintetizate, se alege un

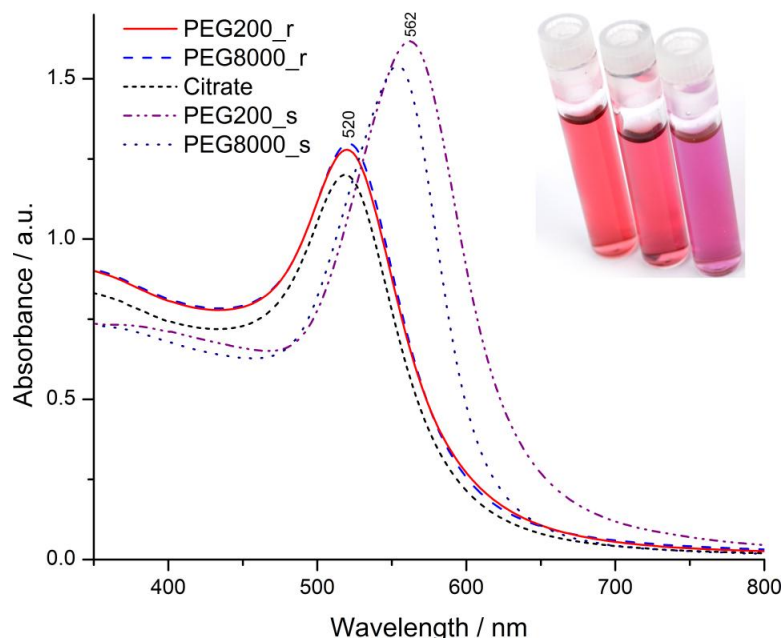


Fig.14. Spectrele de absorbție UV-Vis pentru coloizi sintetizați cu PEG de diferite dimensiuni și cu citrat, comparativ (r- metoda rapidă, s- metoda lentă).

diametru optim (de ex. pentru a asigura internalizarea în celule, există anumite limite dimensionale impuse).

NP sintetizate au fost investigate prin spectroscopie UV-Vis, comparativ cu cele sintetizate prin metoda clasică de reducere cu citrat de sodiu. Figura 14 prezintă spectrele de absorbție UV-Vis înregistrate pentru coloizii sintetizați. Dimensiunea NP a fost determinată prin evaluarea maximului de absorbție în raport cu absorbția la 450 nm conform

procedurii raportate de Haiss et al. [24]. Prin investigarea NP sintetizate prin microscopie electronică în transmisie-TEM (vezi Figura 15) s-au putut confirma rezultatele obținute privind diametrul NP.

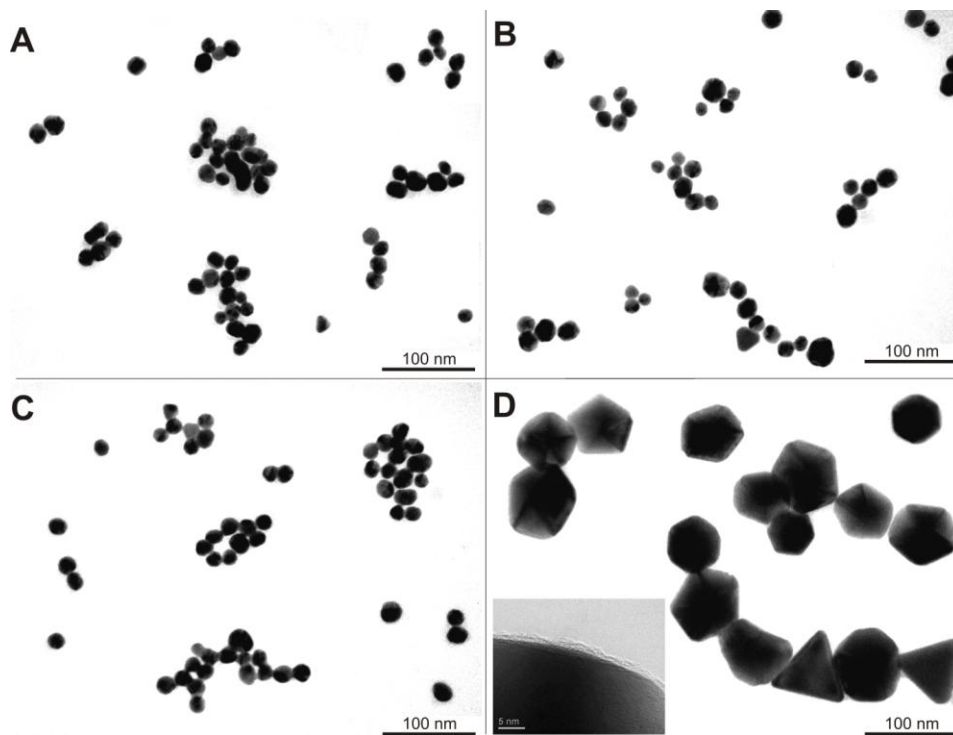


Fig.15. Imagini TEM ale NP de Au sintetizate prin reducerea cu PEG 200 metoda rapidă (A), cu PEG 8000 metoda rapidă (B), cu citrat de sodiu (C) și cu PEG 200 metoda lentă (D).

Distribuția diametrului NP pentru sinteza cu PEG 200 rapidă (r), respectiv lentă (s) este prezentată în Figura 16, în urma măsurărilor de împrăștiere dinamică a luminii.

Activitatea SERS a coloizilor preparați a fost testată cu ajutorul analiților comuni în astfel de experimente (cristal violet, rodamină, albastru de metil, etc. ) după cum este ilustrat în Figura 17. Factorul de amplificare SERS obținut a fost comparabil cu cel al coloizilor preparați prin reducerea cu citrat de sodiu, precum se poate observa în Figura 18. Avantajul folosirii coloizilor reduși cu PEG, mai ales în aplicații biomedicale constă în toxicitatea considerabil redusă față de cea a coloizilor pe bază de citrat. Mai mult, funcționalizarea NP PEG-ilate se poate face foarte ușor cu o gamă largă de medicamente sau markeri.

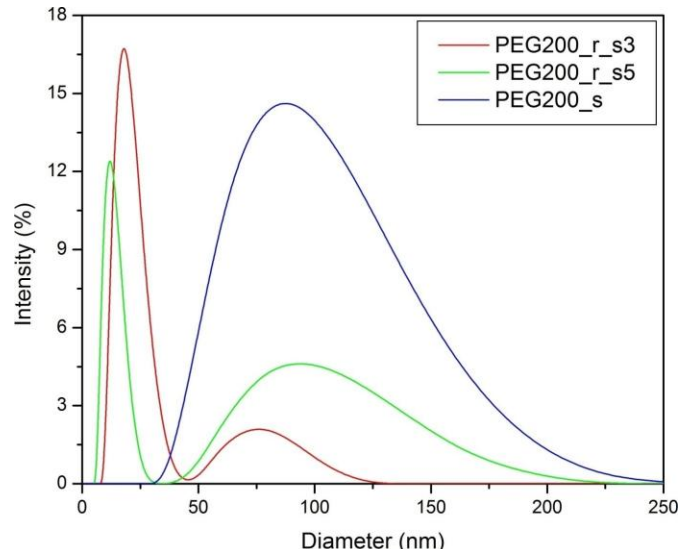


Fig.16. Distribuția diametrului NP sintetizate prin reducerea cu PEG 200, metoda rapidă (r) și respectiv lentă (s).

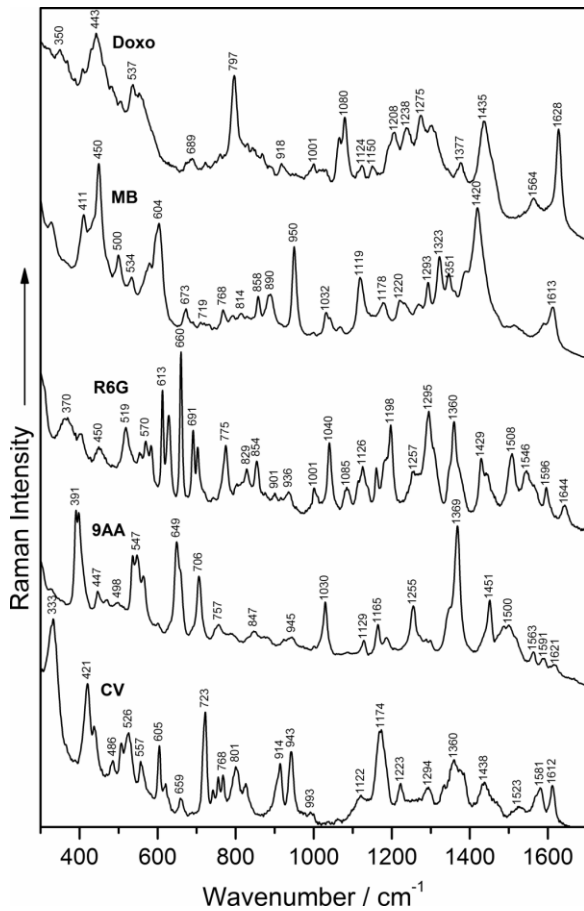


Fig.17. Spectre SERS înregistrate utilizând coloid redus cu PEG 80000, metoda rapidă (laserul excitator:785 nm).

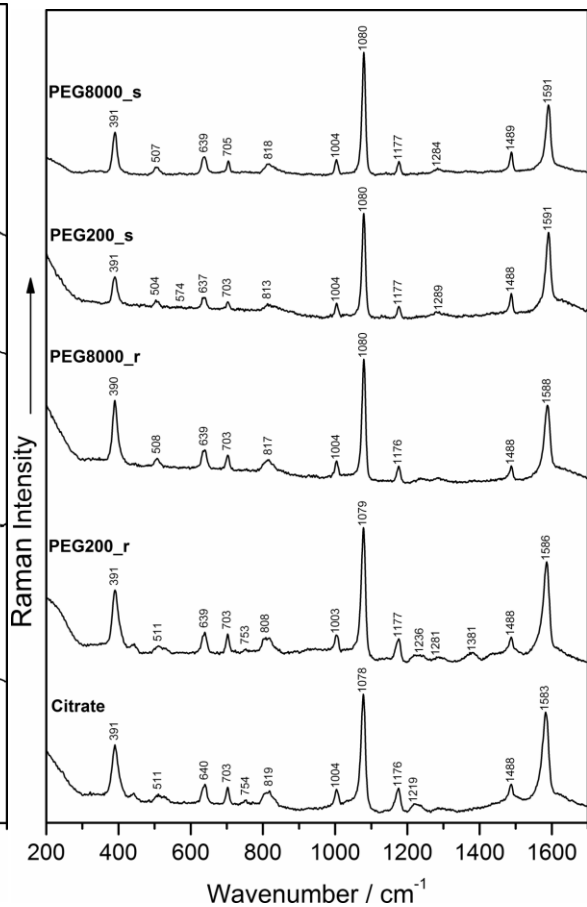


Fig.18. Spectre SERS înregistrate pentru 4-aminotiofenol cu diferiți coloizi, comparativ (laserul excitator:785 nm).

## Detecția bazată pe SERS a uropatogenilor

Detecția și identificarea precoce a germenilor uropatogeni este o necesitate stringentă având în vedere consecințele generate de acestea asupra organismelor infectate. Detecția precoce împiedică instalarea unor modificări patologice reno-urinare care pot avea consecințe ireversibile.

Metodele bacteriologice uzuale prezintă impedimentul că identificarea se face pe medii de cultură care necesită minim 24 de ore pentru identificarea germenilor uropatogeni. Teza de față prezintă un studiu la Universitatea Tehnică din München și prezintă o metodă inovativă pentru identificarea la nivel unicelular a microorganismelor ce cauzează infecțiile bacteriene într-o perioadă de câteva minute prin metoda spectroscopică Raman. Astfel clinicianul poate diagnostica rapid afecțiunea și aplica o terapie adecvată.

**Infecțiile tractului urinar (ITU)** reprezintă prezența microorganismelor patogene în tractul urinar al pacientului. Testarea prezenței diferitelor microorganisme în probe de urină pentru a diagnostica ITU reprezintă o analiză de rutină deoarece ITU sunt cele mai comune infecții întâlnite la pacienți. Mai exact, peste 50% din femei și 13% din bărbați se confruntă cel puțin o dată în viață cu un episod de infecții ale tractului urinar [25]. Cel mai întâlnit uropatogen rămâne *Escherichia coli*, alături de enterococi, *Pseudomonas aeruginosa* și *Proteus mirabilis*. ITU pot cauza sarcini premature sau chiar decesul fătului pentru pacientele însărcinate, dar totodată o serie de boli renale, mai ales la copii. În majoritatea cazurilor, persoanele susceptibile la ITU sunt cele în vârstă, femeile (mai ales în perioada sarcinii) și copiii. Datorită implicațiilor importante de ordin medical și financiar, diagnosticarea ITU cât mai eficientă și mai rapidă conduce imediat la o îmbunătățire a calității vieții subpopulațiilor predispuse acestor infecții.

Diagnosticarea ITU reprezintă un proces cu mai mulți pași: determinarea concentrației uropatogenilor prezenți, identificarea tipului de uropatogen (de regulă un singur tip cauzează infecția, nu mai multe tipuri de microorganisme simultan), precum și susceptibilitatea uropatogenului la diferite antibiotice (așa numita antibiogramă) în vederea tratării infecției. Astfel de investigații necesită în mod convențional cultivarea repetată a microorganismelor colectate din proba de urină, ce poate dura până la 48 de ore pentru ca acele colonii să crească, să fie cuantificate și mai apoi expuse antibioticelor pentru antibiogramă. Dat fiind că pacientul nu poate să rămână fără un tratament provizoriu în toată această perioadă, de regulă medicul îi prescrie antibiotice de spectru larg înainte de a putea consulta rezultatele antibiogramei. Această practică are multe efecte nedorite, atât pe termen scurt cât și pe termen lung: tratarea ineficientă ce duce la revenirea infecției sau agravarea acesteia, creșterea rezistenței la antibiotice a unui număr tot mai mare de tulpini de uropatogeni, precum și costuri medicale

ridicate [26-27]. De aceea este imperios necesară o metodă rapidă și precisă de diagnosticare a ITU și de verificare a susceptibilității uropatogenilor la antibiotice. Găsirea unei soluții îmbunătățite față de cea actuală ar asigura beneficii semnificative în domeniul serviciilor de sănătate, dar și în calitatea vieții persoanelor cu o sensibilitate ridicată la aceste infecții.

Metodele tradiționale utilizate în detecția rapidă și senzitivă a bacteriilor sunt bazate pe reacția de polimerizare în lanț (PCR). Acestea necesită o varietate de tulpini pentru calibrare în prealabil (specii care pot sau nu fi disponibile) și prezintă probleme privind contaminarea, interpretarea complexă a rezultatelor, precum și costuri extrem de ridicate. Spectrometria de masă este o alternativă propusă în detecția bacteriilor fără a fi necesară cultivarea lor [28]. Totuși, la fel ca și abordarea PCR, spectrometria de masă depinde de cunoașterea inițială a patogenului studiat, presupune o analiză complexă și costuri ridicate.

În ultimii ani s-au dezvoltat noi metodologii care includ aplicații promițătoare ale spectroscopiei Raman pentru diagnosticarea ITU [29]. **Spectroscopia vibrațională**, precum **Raman sau SERS** (efectul Raman amplificat la suprafață) au fost testate cu succes în detecția bacteriilor cu o pregătire minimală a probei [30-32]. Clasificarea bacteriilor la nivel de tulpină este posibilă cu mare precizie și cu un timp de analiză semnificativ redus folosind SERS [33-35]. Recent, până și susceptibilitatea bacteriilor la anumite antibiotice a fost realizată cu ajutorul spectroscopiilor Raman și SERS [29, 36]. Practic, o analiză bazată pe SERS presupune expunerea unui volum foarte redus de probă (circa 10  $\mu$ l) pe o sticlă de microscop tratată chimic astfel încât să asigure fixarea microorganismelor prin forțe electrostatice, iar mai apoi, înregistrarea de spectre SERS cu ajutorul unui laser cu lungimea de undă 633 nm. Procesarea datelor spectrale obținute este minimă: se reduce la îndepărtarea zgomotului de fundal și la o normalizare pentru compararea eficientă a rezultatelor. Dezvoltarea metodologiei de detecție SERS a uropatogenilor pentru o scanare și monitorizare rapidă a probelor de urină și o diagnosticare precisă a infecțiilor tractului urinar este de real interes în clinici, care se confruntă zilnic cu mii de probe de investigat și cu tot mai multe complicații induse de actuala practică medicală.

Procedura standard de diagnosticare presupune o serie de procedee ce pot dura de la 24 ore până la câteva zile. Mai întâi are loc cultivarea microorganismelor prelevate din probe de urină în scopul estimării concentrației patogenilor prezenți în urină. Apoi se recurge la monitorizarea în timpul tratării cu diferite antibiotice pentru a obține așa-numita **antibiogramă**. Luând în vedere acest parcurs îndelung până la găsirea unui tratament potrivit infecției de la caz la caz, este evident că există un interes real de a dezvolta o tehnică rapidă, eficientă și de încredere care să ofere soluții în termen de maxim câteva ore. Astfel, costurile materiale dar și cele legate de personalul pregătit medical să realizeze aceste procedee anevoioase ar fi considerabil reduse, iar creșterea rezistivității patogenilor la antibiotice nu ar mai fi încurajată.



Până în acest moment nu s-a dezvoltat un procedeu alternativ de diagnosticare a ITU deși detecția și identificarea microorganismelor Gram-negative și Gram-pozitive a fost optimizată în decursul ultimilor ani, ajungându-se până la precizia speciei și reușindu-se înregistrarea spectrelor vibraționale la nivel de singură celulă bacteriană. Ceea ce se propune în cadrul acestui proiect este combinarea sensibilității spectroscopiei SERS cu analiza PCA în scopul diagnosticării precise și imparțiale a ITU.

Spectroscopia SERS este utilizată cu succes în ultimii ani de mai multe grupuri de cercetare cu experiență în domeniu în vederea obținerii de informații cât mai precise și mai complexe legate de microorganisme unicelulare, mai ales a celor patogene [37-44]. De ce este SERS o tehnică ideală de investigare a probelor biologice complexe? Printre avantajele acestei metode spectroscopice se numără ultrasensitivitatea, permițând detecția la nivel de o singură moleculă [14, 16, 32].

În Figura 19 este ilustrat modul de fixare a probei biologice pe sticla de microscop și volumul minim necesar pentru investigare (circa 10  $\mu$ l). Pentru a explica pe scurt procedura, sticla de microscop este tratată chimic în prealabil, obținându-se o protonare a grupărilor terminale disponibile prin silanizarea inițială a sticlei. Prin protonare, se obține o sarcină electropozitivă

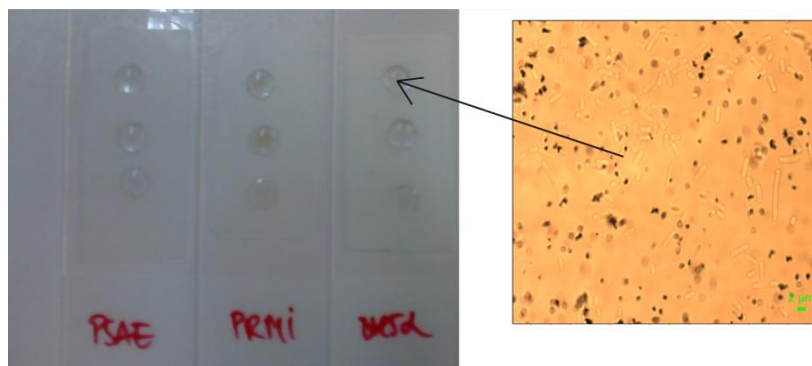


Fig.19. Probe biologice aplicate pe sticla de microscop sub formă de picături cu volum de circa 10  $\mu$ l și inserție cu imaginea microscopică (obținută cu obiectiv de 100x) a unei probe. Se pot distinge cu ușurință microorganismele *E. coli* sub formă alungită și translucide, prezente în proba investigată.

permanentă care este utilizată pentru a atrage electrostatic bacteriile conținute în proba de interes. Suprafața bacteriilor este negativă și de aceea fixarea lor pe suprafața sticlei are loc în doar câteva minute, foarte eficient. În urma fixării, se adaugă coloidul peste probă iar apoi se înregistrează spectre SERS de la microorganisme individuale, deci la nivel unicelular. Exemple de spectre SERS ale

unei singure bacterii Gram-negative sunt ilustrate în Figura 20.

Elementul inovator al acestei proceduri experimentale este lipsa unui receptor la suprafața sticlei de microscop care să asigure fixarea microorganismelor prin legături covalente sau țintire specifică tipului de patogen prin utilizarea anticorpilor. Spre deosebire de procedeele propuse în literatură până în prezent, detecția uropatogenilor are loc în acest caz fără a fi necesară utilizarea acestor receptori specifici [38, 43-45]. Mai mult, prin imobilizarea NP de Ag folosite ca

substrat SERS doar pe baza interacțiunilor electrostatice, reproductibilitatea rezultatelor înregistrate va fi îmbunătățită. Acest fapt se datorează controlului câștigat prin imobilizare asupra distanței dintre NP. Acest factor a fost deja investigat și s-a dovedit hotărâtor în ceea ce privește efectul SERS ca și concept fundamental [46-47].

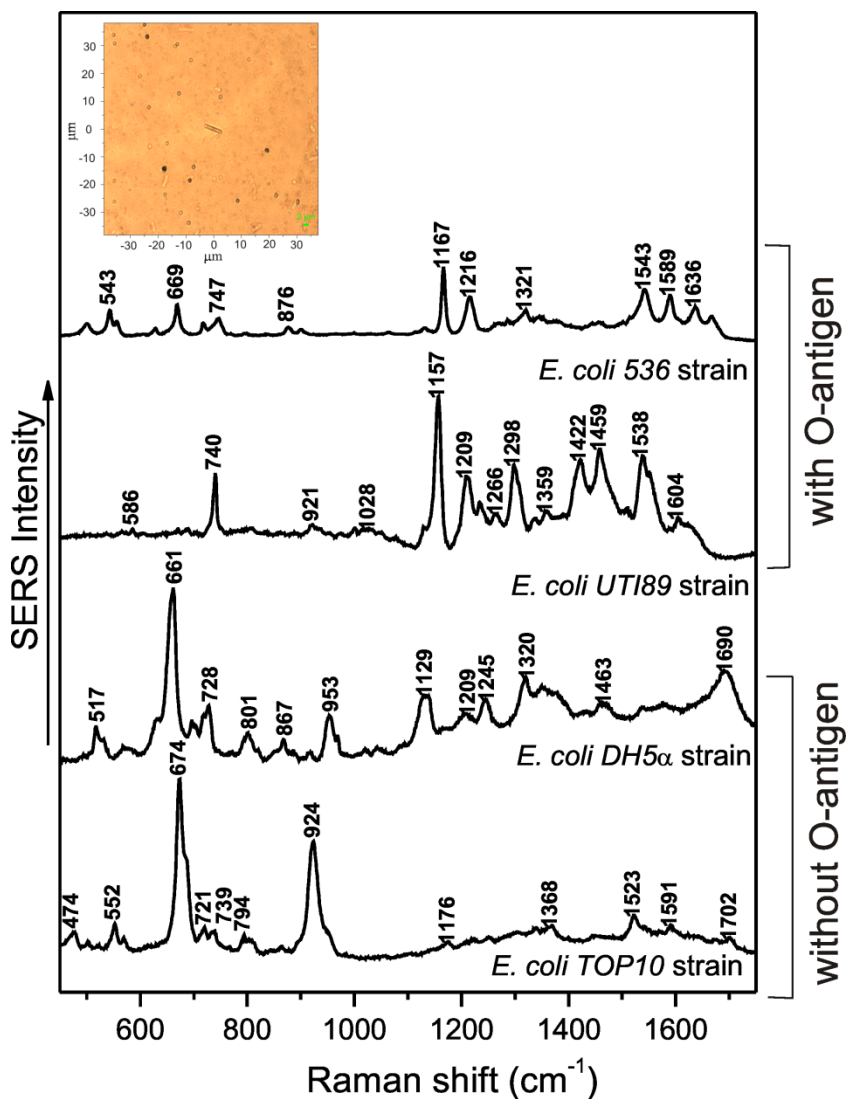


Fig.20. Spectre SERS înregistrate pe câte o singură celulă bacteriană pentru 4 specii diferite.

PCA este o tehnică statistică utilizată pentru simplificarea seturilor de date complexe și determinarea variabilelor cheie dintr-un set de date multidimensional care explică cel mai bine diferențele în observațiile experimentale. Spectrele obținute au fost introduse în aplicația soft Unscrambler 9.1 (CAMO, Norvegia) pentru analiza PCA. Mai întâi, analiza PCA s-a realizat pe spectrele neprocesate. Apoi, s-a aplicat analiza PCA pe spectrele de primă și cea de-a doua derivată; din experiența noastră aceste spectre pot oferi rezultate mai precise, contribuind la

eliminarea efectelor de împrăștiere, precum semnalul de fundal datorat fluorescenței sau cel datorat SERS [48].

Pe baza analizei SERS-PCA a spectrelor obținute de la uropatogeni s-a realizat identificarea precisă la nivel de specie a microorganismelor (vezi Figura 21). Intervalul spectral de interes este cel cuprins între  $500-1800\text{ cm}^{-1}$ , zonă în care se poate diferenția amprenta spectrală a fiecărui uropatogen. Astfel, folosind diferiți algoritmi de analiză multivariată, s-a dezvoltat un model statistic de identificare precisă a uropatogenilor *E. coli* și *P. mirabilis* cu precizie de 60%.

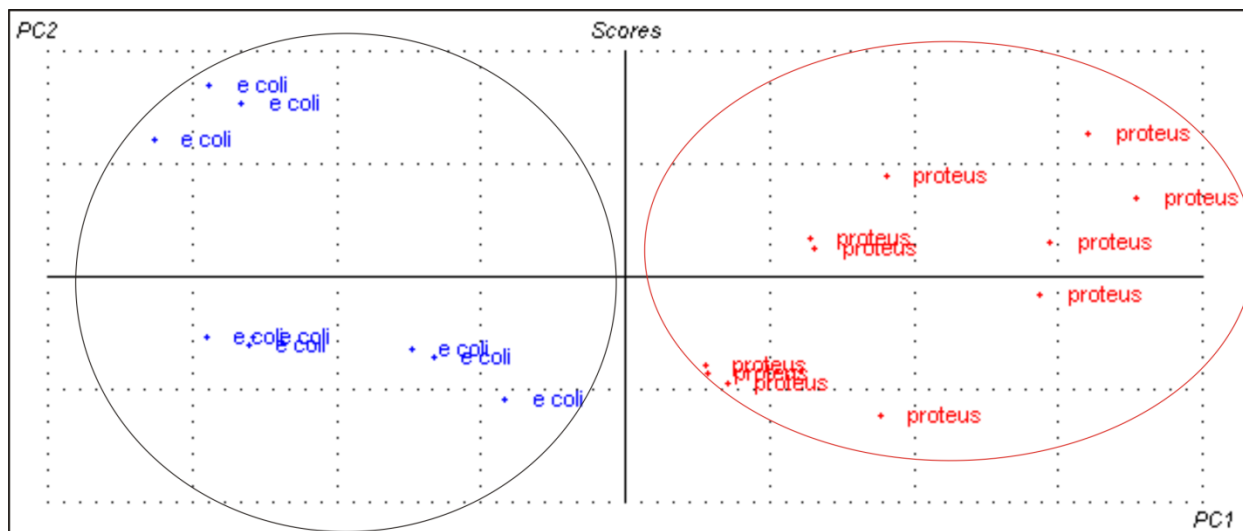


Fig.21. Rezultatele analizei PCA pentru două specii de uropatogeni (*E. coli* și *P. mirabilis*). Cele două grupuri corespunzătoare fiecărui tip de uropatogen au fost complet separate, diferențierea pe baza spectrelor SERS fiind realizată cu o precizie de 60%.

## Concluzii

Obiectivul acestei teze de doctorat de a utiliza cu succes metode teoretice de calcul DFT și spectroscopice pentru a dezvolta aplicații biomedicale bazate în special pe SERS a fost atins după cum ilustrează rezultatele sumarizate mai jos.

Un studiu teoretic și vibrațional al compușilor cu un conținut ridicat de azot (melamina și zidovudina) a fost realizat în prima parte a tezei. Investigarea complexă a proprietăților structurale, vibraționale și a mecanismului de adsorbție al acestora a dus la o înțelegere completă a comportamentului acestora și la detecția lor SERS la nivel de urme.

În cea de-a doua parte a tezei s-a dezvoltat posibilitatea de a prepara substrate SERS-active prin două metode inovative. SERS a fost cuplată cu TLC în scopul detecției ultra senzitive a unor cromofori uzuali și a optimizării unui sistem simplu și eficient de analiză a amesturilor binare după separarea pe plăcuța TLC. O metodă de sinteză nouă a NP de Au prin reducerea cu PEG de diferite dimensiuni a fost dezvoltată urmărind o biocompatibilitate cât mai ridicată, potrivită aplicațiilor biomedicale. Metoda propusă permite prin simpla modificare a cantității, respectiv a lungimii lanțului de PEG ales, prepararea de NP de diferite dimensiuni în funcție de scopul aplicativ urmărit.

În ultima parte a tezei este descrisă metoda de detecție optimizată în stagiul de mobilitate de la TUM pentru identificarea uropatogenilor comuni la nivel unicelular. Prin cuplarea conținutului ridicat de informație structurală al spectrelor SERS obținute pe diferite specii de uropatogeni cu analiza multivariată PCA, s-a dezvoltat un model statistic de identificare și discriminare a microorganismelor cu o precizie de 60%.

## Referințe:

1. Lin, M., et al., *Detection of Melamine in Gluten, Chicken Feed, and Processed Foods Using Surface Enhanced Raman Spectroscopy and HPLC*. Journal of Food Science (2008) **73**:8, T129-T134.
2. Jin, Y., et al., *Highly sensitive detection of melamine and its derivatives by capillary electrophoresis coupled with online preconcentration techniques*. Electrophoresis (2010) **31**:23-24, 3913-3920.
3. Drozd, M. and M.K. Marchewka, *The structure, vibrational spectra and non-linear optical properties of neutral melamine and singly, doubly and triply protonated melaminium cations-theoretical studies*. Journal of Molecular Structure-Theochem (2005) **716** 175-192.
4. Varghese, J.N., A.M. O'Connell, and E.N. Maslen, *The X-ray and Neutron Crystal Structure of 2,4,6-Triamino-1,3,5-triazine (Melamine)*. Acta Crystallographica Section B-Structural Science (1977) **33** 2102-2108.
5. Zhou, F.X., et al., *Radiosensitization effect of zidovudine on human malignant glioma cells*. Biochemical and Biophysical Research Communications (2007) **354**:2, 351-356.
6. Rivas, L., S. Sanchez-Cortes, and J.V. García-Ramos, *Conformational study of AZT in aqueous solution and adsorbed on a silver surface by means of Raman spectroscopy*. Journal of Raman Spectroscopy (2002) **33**:1, 6-9.
7. Wang, C.H., D.C. Sun, and X.H. Xia, *One-step formation of nanostructured gold layers via a galvanic exchange reaction for surface enhancement Raman scattering*. Nanotechnology (2006) **17**:3, 651.
8. Yoon, I., et al., *Single Nanowire on a Film as an Efficient SERS-Active Platform*. Journal of the American Chemical Society (2008) **131**:2, 758-762.
9. Shen, C., et al., *Monodisperse Noble-Metal Nanoparticles and Their Surface Enhanced Raman Scattering Properties*. Chemistry of Materials (2008) **20**:22, 6939-6944.
10. Dick, L.A., et al., *Metal Film over Nanosphere (MFON) Electrodes for Surface-Enhanced Raman Spectroscopy (SERS): Improvements in Surface Nanostructure Stability and Suppression of Irreversible Loss*. The Journal of Physical Chemistry B (2001) **106**:4, 853-860.
11. Zhang, L., P. Zhang, and Y. Fang, *An investigation of the surface-enhanced Raman scattering effect from new substrates of several kinds of nanowire arrays*. Journal of Colloid and Interface Science (2007) **311**:2, 502-506.
12. Zong, R.L., et al., *Synthesis and Optical Properties of Silver Nanowire Arrays Embedded in Anodic Alumina Membrane*. The Journal of Physical Chemistry B (2004) **108**:43, 16713-16716.
13. Zhou, Q., et al., *Rapid detection of 2, 3, 3', 4, 4'-pentachlorinated biphenyls by silver nanorods-enhanced Raman spectroscopy*. Physica E: Low-dimensional Systems and Nanostructures (2010) **42**:5, 1717-1720.
14. Kneipp, J., H. Kneipp, and K. Kneipp, *SERS-a single-molecule and nanoscale tool for bioanalytics*. Chemical Society Reviews (2008) **37**:5, 1052-1060.

15. Kneipp, K., et al., *Surface-enhanced Raman scattering (SERS)—a new tool for single molecule detection and identification*. *Bioimaging* (1998) **6**:2, 104-110.
16. Kneipp, K., et al., *Single Molecule Detection Using Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS)*. *Physical Review Letters* (1997) **78**:9, 1667-1670.
17. He, L., M.J. Natan, and C.D. Keating, *Surface-Enhanced Raman Scattering: A Structure-Specific Detection Method for Capillary Electrophoresis*. *Analytical Chemistry* (2000) **72**:21, 5348-5355.
18. Seifar, R.M., et al., *Applicability of surface-enhanced resonance Raman scattering for the direct discrimination of ballpoint pen inks*. *Analyst* (2001) **126**:8, 1418-1422.
19. Soper, S.A., K.L. Ratzlaff, and T. Kuwana, *Surface-enhanced resonance Raman spectroscopy of liquid chromatographic analytes on thin-layer chromatographic plates*. *Analytical Chemistry* (1990) **62**:14, 1438-1444.
20. Frens, G., *Particle size and sol stability in metal colloids*. *Kolloid Z.u Z. Polymere* (1972) **250** 736-741.
21. Frens, G., *Controlled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in Monodisperse Gold Suspension*. *Nature Physical Science* (1973) **241**:1, 20-22.
22. Koglin, E., B.J. Kip, and R.J. Meier, *Adsorption and Displacement of Melamine at the Ag/Electrolyte Interface Probed by Surface-Enhanced Raman Microprobe Spectroscopy*. *The Journal of Physical Chemistry* (1996) **100**:12, 5078-5089.
23. House, P.G. and C.S. Schnitzer, *SERRS and visible extinction spectroscopy of copper chlorophyllin on silver colloids as a function of pH*. *Journal of Colloid and Interface Science* (2008) **318**:2, 145-151.
24. Haiss, W., et al., *Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV-Vis spectra*. *Analytical Chemistry* (2007) **79**:11, 4215-4221.
25. Foxman, B., *Epidemiology of urinary tract infections: Incidence, morbidity, and economic costs*. *Disease-a-Month* (2003) **49**:2, 53-70.
26. Grüneberg, R.N., *Changes in urinary pathogens and their antibiotic sensitivities, 1971–1992*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (1994) **33**:suppl A, 1-8.
27. Carmeli, Y., et al., *Health and economic outcomes of antibiotic resistance in pseudomonas aeruginosa*. *Archives of Internal Medicine* (1999) **159**:10, 1127-1132.
28. Chen, W.-J., P.-J. Tsai, and Y.-C. Chen, *Functional Nanoparticle-Based Proteomic Strategies for Characterization of Pathogenic Bacteria*. *Analytical Chemistry* (2008) **80**:24, 9612-9621.
29. Kastanos, E.K., et al., *A novel method for urinary tract infection diagnosis and antibiogram using Raman spectroscopy*. *Journal of Raman Spectroscopy* (2010) **41**:9, 958-963.
30. Maquelin, K., et al., *Raman Spectroscopic Method for Identification of Clinically Relevant Microorganisms Growing on Solid Culture Medium*. *Analytical Chemistry* (1999) **72**:1, 12-19.
31. Schuster, K.C., et al., *Multidimensional Information on the Chemical Composition of Single Bacterial Cells by Confocal Raman Microspectroscopy*. *Analytical Chemistry* (2000) **72**:22, 5529-5534.

32. Schuster, K.C., E. Urlaub, and J.R. Gapes, *Single-cell analysis of bacteria by Raman microscopy: spectral information on the chemical composition of cells and on the heterogeneity in a culture*. Journal of Microbiological Methods (2000) **42**:1, 29-38.
33. Kneipp, K., M. Moskovits, and H. Kneipp, *Physics and Applications Topics in Applied Physics*. Vol. 103. 2006.
34. Hutsebaut, D., et al., *Effect of Culture Conditions on the Achievable Taxonomic Resolution of Raman Spectroscopy Disclosed by Three Bacillus Species*. Analytical Chemistry (2004) **76**:21, 6274-6281.
35. Xie, C., et al., *Identification of Single Bacterial Cells in Aqueous Solution Using Confocal Laser Tweezers Raman Spectroscopy*. Analytical Chemistry (2005) **77**:14, 4390-4397.
36. Liu, T.T., et al., *A High Speed Detection Platform Based on Surface-Enhanced Raman Scattering for Monitoring Antibiotic-Induced Chemical Changes in Bacteria Cell Wall*. PLoS ONE (2009) **4**:5.
37. Efrima, S. and B.V. Bronk, *Silver Colloids Impregnating or Coating Bacteria*. Journal of Physical Chemistry B (1998) **102**:31, 5947-5950.
38. Efrima, S. and L. Zeiri, *Understanding SERS of bacteria*. Journal of Raman Spectroscopy (2009) **40**:3, 277-288.
39. Jarvis, R.M., et al., *Towards quantitatively reproducible substrates for SERS*. Analyst (2008) **133**:10, 1449-1452.
40. Kahraman, M., K. Keseroğlu, and M. Çulha, *On Sample Preparation for Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) of Bacteria and the Source of Spectral Features of the Spectra*. Applied Spectroscopy (2011) **65**:5, 500-506.
41. Kahraman, M., et al., *Reproducible Surface-Enhanced Raman Scattering Spectra of Bacteria on Aggregated Silver Nanoparticles*. Applied Spectroscopy (2007) **61**:5, 479-485.
42. Kahraman, M., et al., *Convective Assembly of Bacteria for Surface-Enhanced Raman Scattering*. Langmuir (2008) **24**:3, 894-901.
43. Knauer, M., et al., *A flow-through microarray cell for the online SERS detection of antibody-captured E. coli bacteria*. Analytical and Bioanalytical Chemistry (2012) **402**:8, 2663-2667.
44. Knauer, M., et al., *Surface-Enhanced Raman Scattering-Based Label-Free Microarray Readout for the Detection of Microorganisms*. Analytical Chemistry (2010) **82**:7, 2766-2772.
45. Rahaie, M. and S.S. Kazemi, *Lectin-based Biosensors: As Powerful Tools in Bioanalytical Applications*. Biotechnology (2010) **9**:428-443.
46. Baia, M., et al., *Multilayer Structures of Self-Assembled Gold Nanoparticles as a Unique SERS and SEIRA Substrate*. ChemPhysChem (2009) **10**:7, 1106-1111.
47. Li, J.F., et al., *Shell-isolated nanoparticle-enhanced Raman spectroscopy*. Nature Letters (2010) **464** 392-395.
48. Leopold, L.F., et al., *Prediction of Total Antioxidant Capacity of Fruit Juices Using FTIR Spectroscopy and PLS Regression*. Food Analytical Methods (2012) **5**:3, 405-407.