

**Universitatea Babeș-Bolyai
Facultatea de Fizică**



Rezumatul tezei de doctorat

**Caracterizarea, detecția și monitorizarea unor substanțe
nocive în produse alimentare, utilizând tehnici
spectroscopice Raman**

MÜLLER Csilla

**Coordonator științific
Prof. Dr. Leontin DAVID**

**CLUJ-NAPOCA
2013**

Cuvinte cheie: *aditivi alimentari, tiabendazol, fructe citrice și banana, toxine marine, acid domoic, țesut de pește, Raman, SERS.*

CUPRINS

INTRODUCERE.....	4
CAPITOLUL I. Importanța cercetării și stadiul actual în domeniul detecției, monitorizării și caracterizării unor substanțe toxice, nocive în controlul alimentelor	5
I.1. Controlul calității alimentelor și probleme actuale din domeniu	5
I.2. Tehnici actuale in controlul calității alimentelor.....	6
I.2.1. Spectroscopia Raman	6
I.2.2. Spectroscopia SERS (Surface Enhanced Raman Spectroscopy).....	7
I.2.3 Rolul metodelor teoretice în domeniu. Principiile de bază ale metodelor DFT.....	8
CAPITOLUL II. Tehnici vibraționale aplicate în controlul și monitorizarea calității fructelor.....	9
II.1 Aditivi alimentari – De ce sunt necesari?	9
II.2. Studiul de caz: Tiabendazolul (E 233).....	9
II.2.1. Spectrul Raman al tiabendazolului.....	10
II.2.2. Spectrul SERS al tiabendazolului adsorbit pe nanoparticulele coloidale de argint.....	11
II.2.2.1. Dependența de concentrație a spectrului SERS	12
II.2.2.2. Dependența de pH a spectrului SERS	13
II.2.3. Detecția SERS al tiabendazolului în coaja citricelor și bananelor ..	14
II.3. Concluzii.....	16
CAPITOLUL III. Caracterizarea vibrațională și monitorizarea unor biotoxine din produse de aquacultură	18
III.1. Biotoxine marine.....	18
III.2. Acidul domoic.....	19
III. 2.1 Spectrul Raman și SERS al apei de mare	19
III. 2.2. Spectrul Raman și SERS al apei din aquacultură	20
III.2.3 Spectrul FT-Raman al acidului domoic	21
III.2.4 Spectrul SERS al acidului domoic	22
III.2.4.1 Spectrul SERS de dependența de concentrație al acidului domoic în apă pură și în apă de mare.....	23
III.2.4.2 Spectrul SERS al acidului domoic pe nanoparticulele amino-funcționalizate de argint.....	24
III.2.4.3 Detectare SERS al acidului domoic pe țesutul de pește	26
II.3. Concluzii	28
REFERINȚE	
PUBLICAȚII	

INTRODUCERE

Teza este structurată pe trei capitole. În primul capitol este descrisă importanța cercetării în domeniul găsirii unor tehnici pentru detecția, monitorizarea și caracterizarea unor substanțe toxice, nocive în controlul alimentelor și sunt descrise pe scurt metodele experimentale (FT-Raman, SERS) și teoretice (DFT) folosite pentru determinarea structurilor investigate în partea experimentală a acestei teze.

Capitolul al doilea are ca temă caracterizarea fizico-chimică a moleculei de tiabenedazol. Acest aditiv alimentar a fost investigat în stare solidă și sub formă de soluție prin metodele spectroscopice Raman și SERS. Folosind metodele DFT s-a obținut optimizarea geometriei moleculare și calculul frecvențelor de vibrație. Cunoscut ca și E233 în Europa, tiabendazolul este folosit pe scară largă ca și conservant în industria alimentară, pentru fructe și legume. Este arătată că TBZ se poate fi detectat rapid prin spectroscopia Raman (la nivel de concentrație milimolara) și SERS (de la micro -la nivel de picomol) utilizând nanoparticule coloidale de Ag, și un, spectrometru portabil compact, mini - Raman. Datele vibraționale au fost folosite pentru a detecta TBZ din citrice și banane tratate.

Capitolul al treilea conține rezultate originale obținute prin studiul unor biotoxine ce apar în zone de aquacultură și care pot ajunge în pește și alte produse marine. Studiile detaliate sunt concentrate asupra moleculei de acid domoic. Acest studiu reprezintă o îmbinare a rezultatelor experimentale obținute cu ajutorul metodelor spectroscopice vibraționale cu rezultatele din literatură. Această neurotoxină naturală a fost caracterizată și detectată prin metoda SERS, atât în apă pură cât și în apă de mare. Trei scheme diferite de detectare de acid domoic în apă de mare a fost descris, prin dizolvarea în apă de mare a acidului cristalin, prin diluarea soluției de apă pură cu apă de mare sau prin utilizarea unor nanoparticule funcționalizate (animo-AgNPs). Specificitatea dependenței de semnal a metodei utilizate a fost discutată în toate cazurile. Acest capitol a demonstrat orientarea și legarea acidului domoic pe suprafața metalică, și detectarea acestei toxine marine în apă de mare, respectiv în țesut de pește, utilizând tehnica SERS, la concentrații mai mici decât metodele actuale utilizate.

CAPITOLUL I. Importanța cercetării și stadiul actual în domeniul detecției, monitorizării și caracterizării unor substanțe toxice, nocive în controlul alimentelor

1.1. Controlul calității alimentelor și probleme actuale din domeniu

În toate țările industria alimentară are responsabilitatea de a îndeplini condițiile privind calitatea produselor alimentare și cerințele de reglementare privind siguranța. Lanțurile alimentare pot fi la fel de scurte ca de la grădină până la masa familiei, sau lungime de mii de kilometri, cu mulți intermediari. Sistemele de conservare, prelucrare și ambalare a produselor alimentare pot fi minime sau foarte sofisticate, dar asigurarea calității și siguranței alimentare în toate situațiile trebuie să fie constant. Industria trebuie să joace rolul său în asigurarea calității și siguranței alimentare prin aplicarea de asigurare a calității și a sistemelor de siguranță alimentară bazată pe risc, utilizând cunoștințele științifice actuale. Punerea în aplicare a unor astfel de controale în întreaga producție, manipulare, prelucrare și comercializare conduce la îmbunătățirea calității și siguranța alimentelor, creșterea competitivității, și reducerea costurilor de producție și a risipei. [1]

Analiza rapidă a compoziției chimice este de importanță majoră. Tehnicile principale utilizate de organismele acreditate să controleze și să monitorizeze produsele alimentare sunt: Cromatografia de lichide (LC), [2-4] cromatografia de gaze cuplata cu spectrometria de masă (GC-MS), la care se adaugă analize micro-biologice și fizico-chimice clasice (densitate, pH, culoare, concentrații) și organo-leptice. Aceste tehnologii acoperă domenii largi de analize, dar sunt de asemenea tehnici costisitoare, necesită timp semnificativ de preparare a probelor și analiză relativ lungă, fiind legate de laborator.

Spectroscopia Raman a luat un real avânt în zilele noastre în fața altor metode pentru monitorizarea a reacțiilor chimice, analize alimentare, farmaceutice și chimice și de asemenea pentru diverse alte aplicații de zi cu zi. Spectroscopia Raman oferă informații detaliate asupra vibrațiilor moleculare. Întrucât aceste vibrații depind de tăria și tipul legăturilor chimice, spectroscopia Raman e utilă nu doar în identificarea moleculelor ci și în studiul interacțiunilor

intra- și intermoleculare. Spectroscopia vibrațională servește la elucidarea structurilor și a proprietăților fizico-chimice ale compușilor investigați.

Preocupările (mai ales din ultimii ani) privind analiza produselor alimentare, necesită elaborarea unor metode rapide și exacte de determinare a aditivilor alimentari și a substanțelor toxice, iar una dintre aceste metode o poate constitui spectroscopia vibrațională în special prin ramura ei Spectroscopie Raman Ultrasenzitivă - SERS.

I.2. Technici vibraționale în controlul calității alimentelor

I.2.1. Spectroscopia Raman

Spectroscopia Raman este bazată pe fenomenul împrăstierii a luminii în domeniul UV-VIS și IR apropiat. Spectroscopia Raman este o tehnică nedistructivă, ce putem aplica pe substanțe solide, lichide sau pe gaze, dar este un process “slab”, secțiunea eficace de împrăștiere este $10^{-31} - 10^{-26} \text{ cm}^2/\text{moleculă}$.

Dacă asupra moleculei cade o undă electromagnetică, dimensiunea moleculei fiind mică, în comparație cu lungimea de undă a radiației, câmpul electric al undei acționează asupra electronilor moleculei, deplasându-i din poziția de echilibru. Ia naștere un moment de dipol indus μ , care într-o primă aproximație este dat de relația:

$$\vec{\mu} = \alpha \vec{E}$$

,în care α este tenzorul polarizabilității, depinde de structura și natura legăturilor molecular, E este intensitatea câmpului electric al undei incidente.

$$\mu_i = E_i^0 \left\{ \alpha_i^0 \cos 2\pi\nu_0 t + \sum_{k=1}^{3N-6} \left(\frac{\partial \alpha_i}{\partial q_k} \right)_0 q_k^0 \left[\frac{1}{2} \cos 2\pi(\nu_0 + \nu_k) t + \frac{1}{2} \cos 2\pi(\nu_0 - \nu_k) t \right] \right\}$$

Se observă că momentul de dipol variază în timp, ceea ce duce la emisie de radiație, cu frecvența ν_0 - Difuzia Rayleigh și cu frecvențe $(\nu_0 + \nu_k)$ - difuzia Raman anti-Stokes și $(\nu_0 - \nu_k)$ - difuzia Raman Stokes. [5-12]

1.2.2. Spectroscopia SERS (Surface Enhanced Raman Spectroscopy)

Spectroscopia SERS datorită amplificării semnalului Raman, în raport cu cel obișnuit, de $10^4 - 10^6$ ori, a devenit una dintre tehnicile cele mai utilizate în studiul moleculelor adsorbite. Suportul pentru obținerea fenomenului SERS este metalic, cele mai utilizate metale fiind argintul, aurul și cuprul.

Intensitatea difuziei Raman obișnuite, pentru o moleculă liberă, este determinată de momentul de dipol indus al tranziției, μ , care depinde de intensitatea câmpului electric E și de polarizabilitatea tranziției α ($\mu = \alpha E$). SERS-ul poate fi determinat fie de creșterea câmpului electric, fie de creșterea polarizabilității, și de aici devine două teorii distincte pentru explicarea mecanismului de amplificare:

- teoria electromagnetică, care presupune creșterea câmpului electric în locul în care este adsorbită molecula
- teoria chimică, care implică creșterea polarizabilității datorită formării unui complex moleculă-metal, care va prezenta o nouă bandă de absorbție, față de molecula neadsorbită, în domeniul de frecvențe al radiației excitatoare, adică se va induce un fenomen Raman rezonant în urma adsorbției.

În cazul SERS-lui moleculele adsorbite se află atât în influența câmpului electric al radiației excitatoare cât și sub cea a câmpului plasmonic. De asemenea liniile Raman Stokes ale moleculei fiind și ele la frecvențe apropiate de cea a radiației excitatoare vor fi și ele în rezonanță cu plasmonul de suprafață. Pentru intensitatea semnalului SERS putem scrie:

$$I_{SERS} = N' I(\nu_L) |A(\nu_L)|^2 |A(\nu_S)|^2 \sigma_{SERS}^R$$

în care N' – numărul moleculelor adsorbite, $I(\nu_L)$ - Intensitatea radiației laser excitatoare, de frecvență ν_L , $|A(\nu_L)|^2$ intensitatea câmpului plasmonic excitat de radiația excitatoare, $|A(\nu_S)|^2$ intensitatea câmpului plasmonic excitat de radiația Stokes, de frecvență ν_S , σ_{SERS}^R secțiunea de împrăsiere SERS, care este mai mare decât cea a difuziei Raman normale. [11-20]

1.2.3. Rolul metodelor teoretice în domeniu. Principiile de bază ale metodelor DFT

Pentru o înțelegere corectă a spectrelor Raman este esențială o atribuire sigură a tuturor benzilor din spectrele experimentale. În acest scop, metodele mecanicii cuantice moleculare oferă date complementare celor obținute pe cale experimentală. Corelarea rezultatelor teoretice cu cele obținute prin metode spectroscopice experimentale are ca scop determinarea exactă a structurilor moleculare, a proprietăților moleculare și o analiză corectă a spectrelor vibraționale. O foarte bună corelare între modurile normale de vibrație experimentale și calculate ne oferă siguranța unei atribuirii corecte a frecvențelor de vibrație.

În cadrul metodelor DFT, se folosesc în mod obișnuit diferite combinații de funcționale de schimb și corelare. Printre acestea, combinația B3LYP este folosită cel mai mult deoarece și-a dovedit abilitățile în reproducerea mai multor proprietăți moleculare, inclusiv spectrele vibraționale. S-a arătat că folosirea combinată a funcționalei B3LYP cu setul de bază standard 6-31G(d) reprezintă un compromis excelent între acuratețea și eficiența computațională în calculul spectrelor vibraționale pentru molecule mari și medii. [21-24]

Capitolul II. Technici vibraționale aplicate în controlul și monitorizarea calității fructelor

II.1. Aditivi alimentari – De ce sunt necesari?

Prin aditiv alimentari „se înțelege orice substanță care în mod obișnuit nu este consumată ca aliment în sine și care în mod obișnuit nu este folosită ca ingredient caracteristic al alimentației, indiferent dacă are sau nu valoare nutritivă, a cărei adăugare intenționată în alimente în scop tehnologic în procesul de fabricare, prelucrare, preparare, tratare, ambalare, transport sau depozitare a acestor alimente are drept rezultat sau este de așteptat să aibă drept rezultat transformarea directă sau indirectă a acestuia sau a produselor sale secundare într-o componentă a produselor alimentare respective.” Aditivii alimentari sunt autorizate la nivelul UE pentru toate cele cincisprezece state membre, precum și pentru Norvegia și Islanda.

În Uniunea Europeană sunt stabilizate cantitățile maxime de anume aditivi alimentari, ce poate să folosească un producător pentru a conserva, a depozita, pentru a îmbunătăți calitățile ale unui produs alimentar etc. Însă EU a decis că fiecare aditiv autorizat să fie semnalat pe etichete, sau ambalaje, prin codul binecunoscut: E număr. Decizia a fost luată în ideea de a avea o legislație și o reglementare foarte precise a aditivilor și pentru a facilita informarea consumatorilor. [25-27]

II.2. Studiul de caz: Tiabendazolul (E233)

Tiabendazol are formula chimică $C_{10}H_7N_3S$ ([2-(4-thiazolyl)benzimidazole]), masa moleculară 201,25 g/mol, și prezintă sub formă de pulbere albă cristalină, este o substanță chimică, un fungicid special și un antiparazitar, utilizată pe scară lungă în tratamentul legumelor și fructelor, pentru a preveni mucegai, mană, putregai, petele cauzate de diferite ciuperci și alte boli pentru transport și depozit. [28]

TBZ este, de asemenea, utilizat ca și un **aditiv alimentar**, un conservant cu numărul E233 (cu număr de INS 233). De exemplu, acesta se aplică în mare măsură la banane pentru a asigura prospețimea, și este un ingredient comun în ceară, aplicate pentru pieile de fructe citrice. Se poate folosi numai pe suprafața fructelor..

În regulamentul Uniunii Europene nivelul maxim de TBZ este 6 mg/kg, în cazul citricelor (portocale, lamâie, grapefruit, mandarine etc.), și 3 mg/kg, în cazul de banane. [29]

II.2.1. Spectrul Raman al Tiabendazolului

Spectrul Raman al TBZ policristalin solid este prezentat în comparație cu spectrul teoretic în regiunea numerelor de undă mari *Fig.1*, și în regiunea numerelor de undă mici, respectiv la *Fig.2*. O foarte bună corelare între modurile normale de vibrație experimentale și cele calculate ne oferă siguranța unei atribuirii corecte a frecvențelor de vibrație.

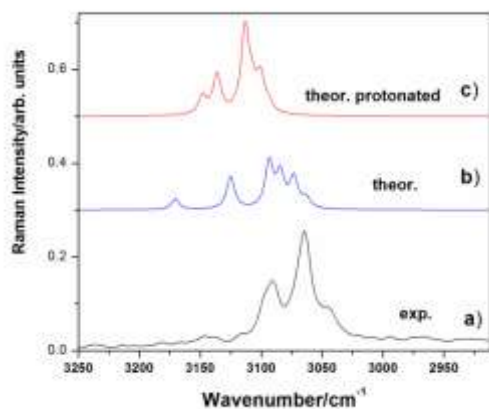


Fig.1. Spectre Raman al TBZ (a) experimental și (b) theoretical, (c) al unei forme protonată calculată teoretic în regiunea lungimilor de unde mari. Excitare (a): 1064 nm, 350 mW.

Fig.3. prezintă o serie de spectre Raman ale tiabendazolului în soluția apoasă la două concentrații diferite (10^{-3} mol l⁻¹ și 10^{-2} mol l⁻¹) și la diferite valori ale pH-ului.

Spectrul Raman al tiabendazolului în soluția apoasă la pH 7 prezintă aceeași poziție a benzilor (în limita efectul solventului 2-3 cm⁻¹) ca și în spectrul

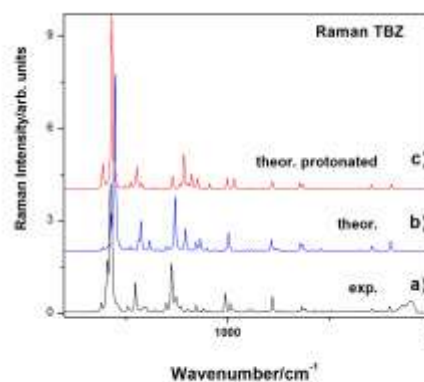


Fig.2. Spectre Raman al TBZ (a) experimental și (b) theoretical, (c) al unei forme protonată calculată teoretic în regiunea lungimilor de unde mici. Excitare (a): 1064 nm, 350 mW.

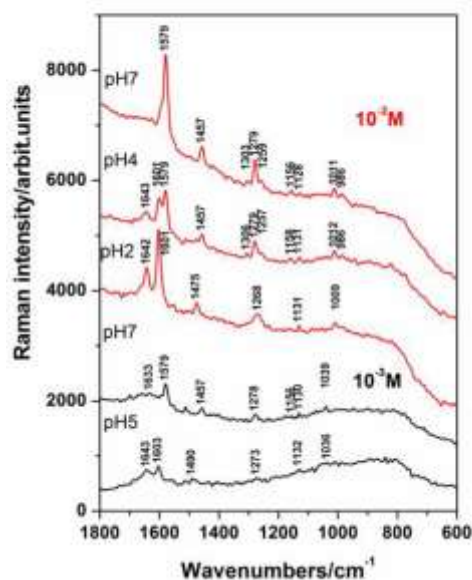


Fig.3- Spectrele Raman ale TBZ în soluție apoasă la diferite valori ale pH-ului, la două concentrații diferite: 10⁻² mol l⁻¹ (roșu) și 10⁻³ mol l⁻¹ (negru)

Raman solid, în timp ce spectrul la pH 4 și la pH 2 este diferit. Banda la 1579 cm^{-1} (pH7) scade la pH4 și dispare la pH2. În schimb o bandă nouă se observă la 1601 cm^{-1} , a cărei intensitate crește cu scăderea pH-ului.

Presupunem că probabil o protonare a atomului N din inelul 2 este responsabilă pentru apariția bandei noi la 1601 cm^{-1} . Cu scăderea pH-ului se observă o nouă bandă crescătoare la 1634 cm^{-1} , deci putem face aceeași presupunere cu atomul N, atribuit modului de vibrație bending $\delta(\text{N-H})$, după protonare. Susține această teorie deplasarea benzii la 1279 cm^{-1} , în spectrul Raman a TBZ-ului neutru, la 1268 cm^{-1} în condiții acide ale pH-ului

În concluzie spectrul Raman în soluția apoasă revelă forma protonată a moleculei. S-a arătat că înregistrarea spectrelor Raman în soluție apoasă folosind un instrument Raman portabil, permite diferențierea a două specii distincte în soluție apoasă al TBZ la $10^{-2}\text{ mol l}^{-1}$, forma neutră și respectiv protonată. Comportamentul protonării, așa cum arată în spectrul Raman, este aceeași la $10^{-3}\text{ mol l}^{-1}$ concentrație, cu toate că semnalul Raman obișnuit este foarte slab. Însă, acest interval de concentrații este nesatisfăcător pentru aplicații de detecții sensibile. De aceea, am utilizat SERS pentru a stabili algoritmul optim de detectare a urmelor de TBZ.

II.2.2. Spectrul SERS al tiabendazolului pe nanoparticulele coloidale de argint

Spectrul SERS în comparație cu spectrul Raman al soluției de TBZ, la pH7 este prezentată la Fig.4.

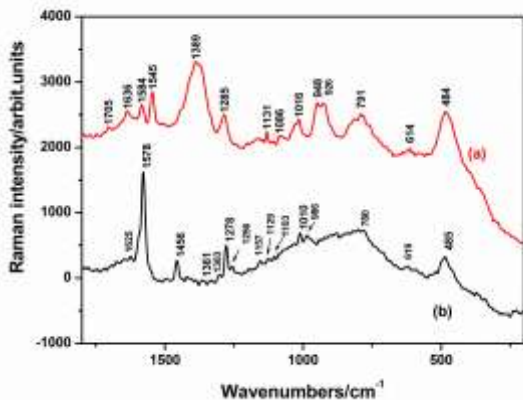


Fig.4. Spectrul Raman (b) comparat cu spectrul SERS (a) al soluției TBZ Excitare 532 nm, 40 mW

Semnalul SERS al TBZ în soluție apoasă la concentrația $1,96 \cdot 10^{-5}\text{ mol l}^{-1}$, la pH 7, arată diferențe semnificative în poziția și intensitățile relative ale benzilor, comparând cu spectrul Raman, la concentrația $10^{-2}\text{ mol l}^{-1}$, sugerând un proces de chemisorbție. Teoretic TBZ ar putea adsorbi prin electronii de la N sau S atomi (sau ambele), rezultând astfel o

orientare verticală (stand-up) pe suprafața nanoparticulelor de argint, sau prin electronii a inelului π , rezultând o orientare planară pe suprafața coloidului de argint.

În spectrul SERS al soluției de TBZ se observă o lărgire a benzilor și o deplasare spre roșu (energii mai mici) a poziției acestora, în comparație cu spectrul Raman, sugerând o orientare înclinată spre paralel a scheletului molecular, fata de suprafața de argint, caz în care sistemul de electroni π ai inelului 3 este susceptibil pentru interacția cu suprafața de metal.

II.2.2.1. Dependența de concentrație a spectrului SERS

Limita de detecție SERS a TBZ în soluție apoasă a fost determinată la 10^{-11} mol l⁻¹, folosind un spectrometru mini-Raman.

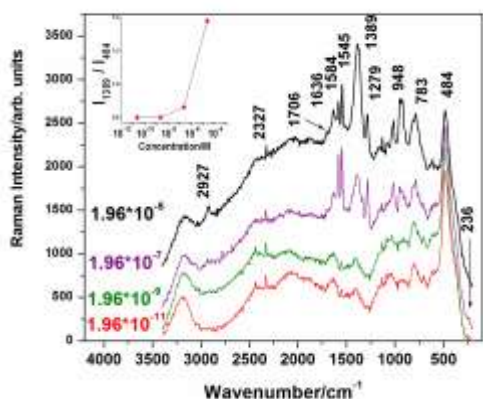


Fig.5. Spectrul SERS al TBZ la diferite concentrații, de la $1.96 \cdot 10^{-5}$ la $1.96 \cdot 10^{-11}$

O detecție la concentrații chiar mai mici cu trei ordine de mărime s-a obținut în cazul soluțiilor de TBZ dizolvată în etanol, așa cum este arătat în Fig.5, domeniul de concentrație pentru limita de detecție fiind până la 0.06 pM.

Semnalul SERS proeminent a fost încă obținut la $6.65 \cdot 10^{-14}$ mol l⁻¹, și proba a fost încă SERS activa chiar și după 24 de ore de la preparare (Fig.6). Concentrații mai mari ($6.67 \mu\text{mol l}^{-1}$) activează puternic agregarea nanoparticulelor, rezultând macro-agregate vizibile în partea de jos a cuvei cu proba, și în consecință, diminuarea a intensității absolute SERS în timp (A fost utilizată și linia laser 1064 nm pentru măsurători FT-SERS, (Fig.7)). Benzi

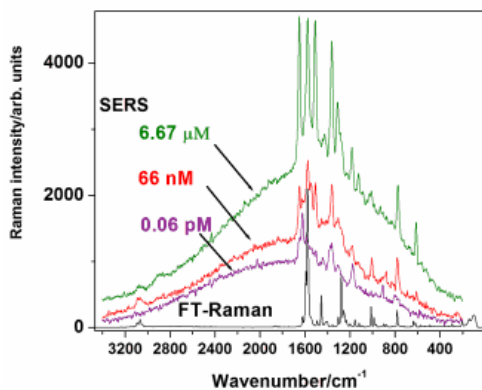
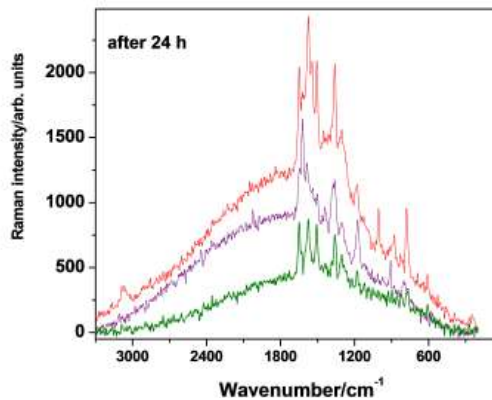


Fig.6. Spectrul SERS al soluției TBZ-etanol la diferite concentrații, precum este indicat în fiecare spectru (stânga).



Excitare: 532 nm, 40 mW.

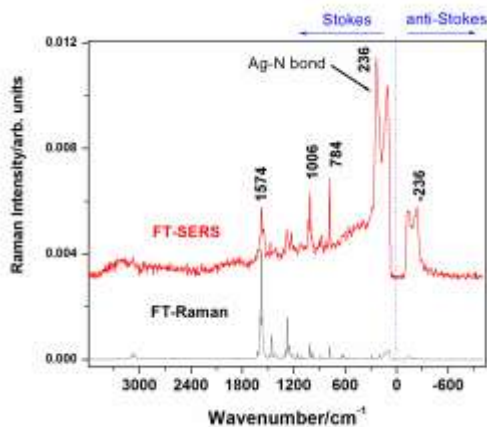


Fig.7. Spectrul FT-SERS al soluției TBZ- etanol la concentrația $6.67 \cdot 10^{-6}$ mol l⁻¹ în comparație cu spectrul FT-Raman.
Excitare: 1064 nm, 350 mW

O altă bandă distinctă se observă la 784 cm^{-1} , care a fost greu de observat în spectrul SERS al soluție apoasă al TBZ, sugerează puternic că atomul S este implicat în adsorbție în cazul soluției de etanol al TBZ.

Semnalul SERS al soluției de TBZ - etanol (Figura.2.14), precum și experimentul FT-SERS (Figura.2.15) confirmă chemisorpția de TBZ dizolvat în etanol atât prin atomul N cât și prin S, rezultând o orientare verticală al scheletului molecular de TBZ pe suprafața de nanoparticule de Ag.

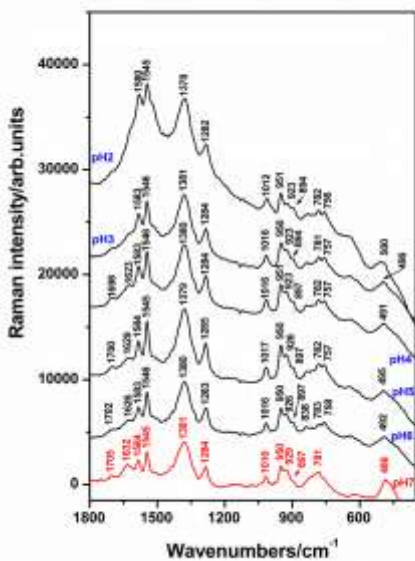


Fig.8. Spectrul SERS al TBZ la diferite valori ale pH-ului
Excitare: 532 nm, 40 mW

SERS foarte bine rezolvate se observă la concentrația $6.67 \cdot 10^{-6}$ mol l⁻¹.

Conform regulilor de selecție SERS [79], modurile vibraționale cu componenta polarizabilitatii perpendiculare pe suprafața, vor fi amplificate în SERS. Din cauza sensibilității mult mai mare a echipamentului FT-Raman, în intervalul de numere de unde mici, se observă o bandă puternică SERS la 236 cm^{-1} de asemenea vizibilă și în regiunea anti-Stokes și este atribuită cu modul stretching al legăturii de Ag-N a TBZ chemisorbed prin atomul de N.

II.2.2.2. Dependența de pH a spectrului SERS

Fig.8. prezintă spectrul SERS al moleculei TBZ la diferite valori ale pH-ului.

În regiunea bazică a pH-ului se modifica spectrul, probabil datorită interacțiunii cu ioni de citrat din soluția argint coloidal. Intensitatea absolută a benziiilor în mediul pH bazic este mult mai mare decât în mediul pH

acid.

Banda SERS cea mai intensă în mediul pH acid este mult mai bine rezolvată în mediul pH bazic. (Fig.8). Intensitățile relative ale benzilor la 1584 cm^{-1} și la 1545 cm^{-1} se schimbă cu decréșterea pH-ului. La pH 2 benzile cele mai intense sunt observate la 1545 cm^{-1} și 1580 cm^{-1} lungimi de undă, care este probabil legată la modul de stretching al ringului complex, după protonare și adsorbția la suprafața de argint. Banda SERS la 1378 cm^{-1} , la pH 2, este mai slabă decât banda la 1545 cm^{-1} dacă comparăm cu intensitățile relative ale acestorala pH 7. Presupunem că această bandă corespunde cu banda largă de la 1381 cm^{-1} , în condiții neutru-bazic, și este atribuită cu modul stretching și bending al complexului C-N și C-C, al ringurilor.

În plus, specii protonate presupuse din spectrele Raman al soluției apoase de TBZ, confirmate prin spectrul calculat teoretic relevă o bandă nouă N-H după protonare la 1643 cm^{-1} , care este observată și în spectrul SERS ca un peak intens la pH 2, în timp ce la valori pH peste 4, apare o deplasare slabă în regiunea 1705 cm^{-1} - 1698 cm^{-1} .

II.2.3. Detecția SERS a tiabendazolului în coaja fructelor

Probele de fructe (portocale, lămâi, lămâi bio, grapefruits și banane) au fost selectate aleatoriu din magazinele din România. Toate probele au fost spălate clasic, sub jet de apă, apoi preparate pentru măsurători SERS prin imersarea unei bucăți cântărite de coaja fiecărei specii în 100 ml de apă distilată. 10 μl din soluția astfel obținută a fost utilizată apoi pentru măsurătorile SERS (Fig.9).

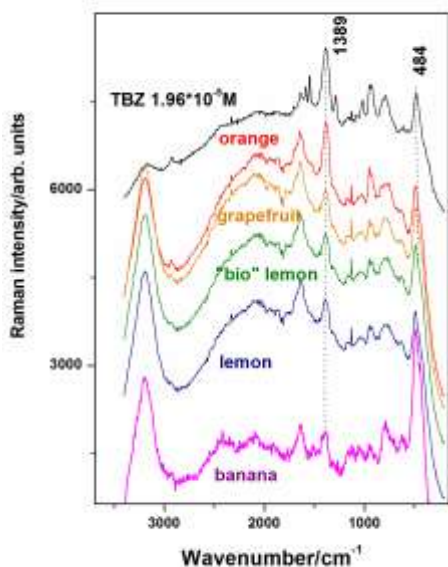


Fig.9. Spectrul SERS al probelor de apă colectată după imersarea probelor de fruct în comparație cu spectrul SERS al TBZ-lui.

Excitare: 532 nm, 40 mW

Semnalul SERS specific al TBZ a fost identificat cu succes la pH 7 din probele de apă, în care au fost imersate probele de coajă de fructe. Studiul a fost extins și asupra unor probe de lămâie „bio” achiziționat de la un magazin de specialitate de tip „bio

Semnalul SERS, obținut la aceste cinci probe, a dezvăluit aceleași benzi SERS ca și în spectrul SERS al TBZ în formă neutră, precum și unele alte contribuții

mici din eşantionul complexului din intervalul numerelor de undă 1600 cm^{-1} - 1700 cm^{-1} .

O dependență de timp a eliberării tiabendazolului din coaja fructului a fost de asemenea studiată, prin studierea soluției rezultate după imersarea probei timp de 15 minute, 30 de minute, 1 oră și 24 de ore. Dependența semnalului SERS de timpul de imersare este prezentată în (Fig.10)

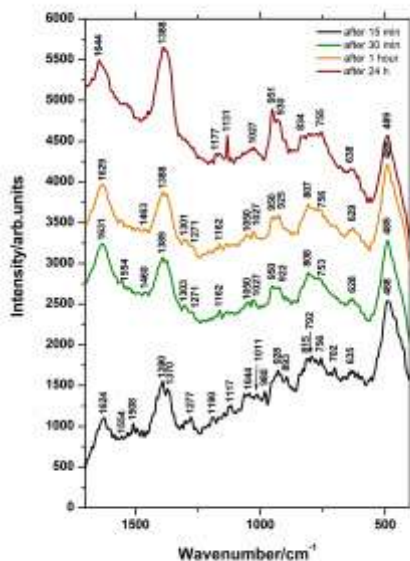


Fig.10. Spectrul SERS al probei de apă colectată după imersarea fructelor după 15 min. (negru), după 30 min. (verde), după 1 oră (portocaliu), după 24 de ore (marou).
Excitare: 532 nm, 40 mW

Numai în cazul bananelor a fost $r < 1$, ceea ce arată o concentrație mult mai mică (foarte probabil $1,96 \cdot 10^{-9}\text{ mol l}^{-1}$) de TBZ extras din banană. Printre citrice, portocalele arată nivelul cel mai mare de TBZ în coajă.

Spectrul SERS obținut din proba de imersarea a cojii de fructe în apă distilată arată aceleași benzi SERS la fel ca și în spectrul TBZ-lui în forma neutră, deși au fost observate și alte contribuții mici de semnale de la proba între 1545 cm^{-1} - 1640 cm^{-1} . În afară de acestea a fost observat un background intens Raman, probabil datorită altor impurități sau specii fluorescente din coajă (de exemplu beta-caroten) de la fructe. Însă TBZ a fost detectat în mod clar în doar 8 secunde măsurătoare în toate cazurile studiate. Luând în considerare greutatea moleculară a TBZ-lui ($201,249\text{ g/mol}$), și cantitatea probei SERS de $10\text{ }\mu\text{l}$, se poate estima ușor cantitatea de

După imersarea de 15 minute TBZ a fost detectabil foarte ușor din soluția astfel obținută. Imersarea mai lungă a rezultat într-un semnal SERS mai intens. Luând în considerare specificitatea dependenței de concentrație a semnalului SERS, semnalul SERS tipic al TBZ neutral la concentrația $10^{-3}\text{ mol l}^{-1}$ a fost identificată și în cazul soluției obținută după 24 de ore imersare. Aceste rezultate sunt suportate prin calcularea raportului intensității relative, $r = I_{1389}/I_{484}$, a benzilor observate la 1389 cm^{-1} și 484 cm^{-1} . Acest raport este mai mare decât unu ($r > 1$) numai la concentrația SERS de $10^{-5}\text{ mol l}^{-1}$, în timp ce la concentrații mai mici, r este mai

mic decât unu ($r < 1$). Acest rezultat arată clar că spălarea fructelor cu apă curentă nu elimină complet TBZ din coaja fructelor, pentru că o concentrație mai mare de TBZ a fost obținută din probă la imersare pe timp mai lung.

Numai în cazul bananelor a fost $r < 1$, ceea ce arată o

tiabendazol din coaja respectivă extrasă în 100 ml de apă distilată. Rezultatul arată că este vorba de 0,394 mg TBZ obținute din o bucată de coajă de aproximativ 5 g. Aastă cantitate colectată de la o bucată de coajă de fruct este mai mare, în mod evident, decât cantitatea permisă de către Uniunea Europeană de 6 mg/kg, în cazul citricelor (portocale, lămâie, pomelo, grapefruit, mandarin etc) și 2 mg/kg în cazul bananelor. În experimentul nostru noi am folosit numai o bucată din coaja fructelor, de aproximativ 5 g, care a furnizat 78 mg/kg de TBZ.

II.3. Concluzii

A fost raportată pentru prima dată o caracterizare vibrațională Raman completă teoretic și experimental pentru molecula de TBZ, într-un interval larg de concentrații și valori ale pH-ului. Am arătat că TBZ poate fi detectată rapid în soluție apoasă cu ajutorul spectroscopiei Raman la nivel de milimolar și respectiv SERS de la micro -la nivel picomolar, utilizând nanoparticule coloidale de Ag, și un spectrometru portabil compact, de tip mini – Raman.

Am propus de asemenea, un mecanism de adsorbție a moleculei TBZ pe suprafața nanoparticulelor de Ag. Pentru TBZ dizolvat în etanol s-a concluzionat un comportament SERS diferit, comparativ cu cel al dizolvării în apă. În cazul etanolului limita de detecție a fost de trei ordine de mărime mai mare, până la nivel de picomol. TBZ adsoarbe pe nanoparticule de Ag prin atomii de S și N al inelelor 1 și 2, rezultând o orientare verticală, când etanolul este folosit ca solvent și o orientare înclinată, spre paralelă cu suprafața de argint, în cazul dizolvării în apă distilată. Speciile protonate presupuse din spectrele Raman de soluție apoasă au arătat benzi noi de N-H la 1643 cm^{-1} și o schimbare mică în vibrațiile. În concluzie spectrul Raman în soluția apoasă relevă forma protonată a moleculei. S-a arătat că înregistrarea spectrelor Raman în soluție apoasă, folosind un instrument Raman portabil, permite diferențierea a două specii distincte în soluție apoasă al TBZ la $10^{-2}\text{ mol l}^{-1}$, forma neutră și respectiv protonată. Datele vibraționale au fost folosite pentru a detecta TBZ din coaja citricelor și bananelor tratate, folosind un algoritm simplu, prin imersarea fructului în apă și analiza SERS a soluției astfel obținute. Semnalul SERS obținut a permis evaluarea cantității de TBZ existent în coajă și implicit a nivelului de TBZ exprimat în mg/kg aplicat. Pe baza intensității benziilor specifice SERS, $r=I_{1389}/I_{484}$ în funcție de concentrație am detectat rapid nivelul TBZ-lui în fructe

O cantitate totală de 0,394 mg TBZ a fost calculată dintr-o proba de 5 g coajă de citrice ceea ce duce la o valoare estimată de 78 mg/kg de TBZ, de 13 ori mai mare decât nivelul maxim

permisă de norme în vigoare. Pe baza semnalului SERS, cel mai ridicat nivel de TBZ a fost dedus în portocale, în timp ce în grapefruit, în lamâie și în lamâie „bio” a fost găsit același nivel. Numai pentru banane raportul SERS a fost $r < 1$ sugerând cel mai scăzut nivel, între limitele permise. Rezultatele au fost publicate în Food Chemistry și respectiv în Spectroscopy Europe, un jurnal larg mediatizat în domeniul spectroscopiei. Ca urmare, impactul asupra publicului și mass-mediei a fost pe măsură, cu emfaza pe importanța rezultatelor pentru informarea publicului larg. (<http://www.tvrplus.ro/editie-telejurnal-150122>, http://adevarul.ro/news/eveniment/fructele-bio-o-pacaleala-toxica-1_527a8c32c7b855ff56c5907b/index.html)

Capitolul III: Caracterizarea vibrațională și monitorizarea unor biotoxine din produse de aquacultură

III.1. Biotoxine marine

Una dintre toxine dăunătoare este acidul domoic (DA), care provoacă boli grave, de DA este toxina responsabilă pentru sindromul otrăvire amnesică crustacee (Amnesic shellfish poisoning, ASP). ASP este o boală nouă descoperită, intrată în lexiconul de sănătate publică în 1987. [31] Simptomele ASP includ vărsături, greață, diaree și crampe abdominale în termen de 24 de ore de la contactarea bolii. În cazurile mai severe, simptomele neurologice dezvoltă în 48 de ore și includ dureri de cap, amețeli, confuzie, dezorientare, și pierderea de memorie scurtă,

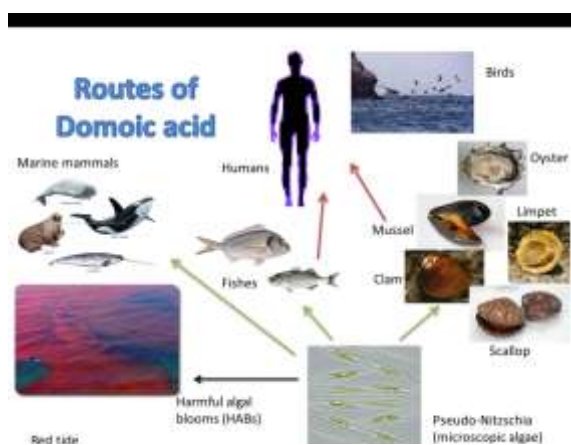


Fig.11. Ruta acidului domoic de la alge la om.

slăbiciune musculară, convulșii, secreții, aritmii cardiace, comă și eventual moarte.

Toate crustacee și peștii pot acumula această toxină fără efecte negative parente. În crustacee toxinele acumulează în principal în glandele digestive, la pește se acumulează în țesuturi. DA produce, de asemenea, moartea de sute de păsări marine, mamifere și pești în diferite părți ale lumii (Fig.11). În Uniunea Europeană a stabilit un nivel permis de 20 mg DA / kg la

crustacee și în pește. [32]

Există o serie de metode de a detecta DA în alge și în produsele alimentare. Dar aceste metode sunt foarte sensibile, costisitoare și au nevoie de mult timp pentru a realiza, necesită prepararea unei probă complexă, sau necesită sacrificiu de animale sau utilizarea de reactivi costisitoare. Timpul este foarte important în detectarea acidului domoic, deoarece acesta poate fi găsită în alimente perisabile.

III.2. Acidul domoic

Acidul domoic (DA), $C_{15}H_{21}NO_6$, (greutate moleculară 311,3303 g/mol) este o neurotoxină cu rol excitator, este un amino-acid produs în mod natural de alge microscopice, mai exact de diatomee Pseudo – nitzschia (fig.1). Această algă a fost identificată pentru prima dată din alge marine roșii “Chondria Armata” (“domoi” în japoneză) și a fost denumită astfel de către Takemoto și Daigo, la sfârșitul anilor 1950. [33, 34]

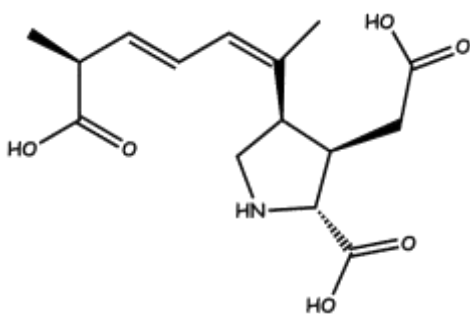


Fig.12. Structura moleculară a DA

Takemoto și Daigo [33, 34] elucidat structura moleculară a acidului domoic: este un aminoacid tribazic, legat structural pentru acidul glutamic și conținând un inel de prolină. Structura moleculară este prezentată în Fig.12

III.2.1. Spectrul Raman și SERS al apei de mare

Spectrul Raman al apei de mare (Fig. 13) prezintă trei benzi principale. Două dintre acestea sunt datorate vibrațiilor bending H-O-H (1641 cm^{-1}) și stretching O-H ($3000\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$)

ale apei. Singura componentă chimică ce se distinge în spectrul Raman este sulfatul, prin prezența unei benzi stretching S-O (981 cm^{-1}) a ionului SO_4^{2-} . Se observă o bună corelare între valorile experimentale obținute prin măsurarea spectrelor Raman ale apei de mare din zonele studiate și cele din literatură.

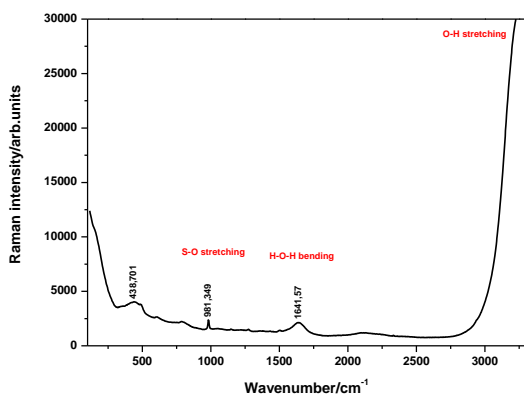


Fig.13. Spectrul Raman al apei de mare

Excitare: 532 nm; 20 spectre, 15 sec, slit 100

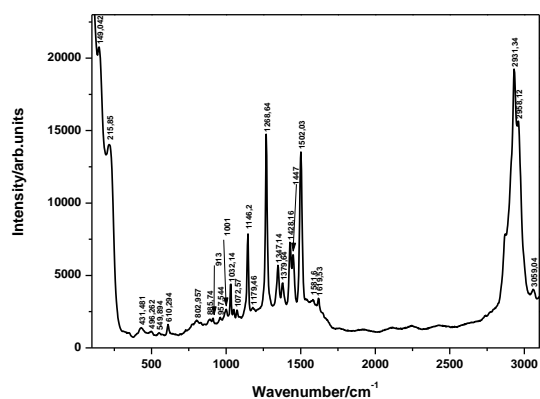


Fig.14. Spectrul SERS al apei de mare
Excitare: 532 nm; 10 spectre, 3 sec, slit 50

Semnalul SERS al apei de mare (Fig.14) furnizează informații complexe și bogate într-o manieră simultană, privind prezența unor componente anorganice (fosfați, nitrați, nitriți, amonia, carbonați, sulfați, etc) precum și specii organice și microorganisme

Măsurătorile relevă benzi SERS foarte bine rezolvate, înguste și exacte, pentru apa de mare colectată din zona „sălbatică” precum și pentru apa din aquacultură, fără nici o pregătire chimică al probelor de apă, folosind ca substrat metalic un coloid de argint, și o achiziție Raman de 3 secunde.

Semnalul SERS arată informații simultane despre prezența nitraților, sulfaților, ionului amoniu, carbonaților și fosfaților precum și despre salinitate. Cele mai semnificative benzi SERS se observă la: 2958 cm^{-1} , 2931 cm^{-1} , 1502 cm^{-1} , 1269 cm^{-1} , 1146 cm^{-1} , 216 cm^{-1} . Prezența cloridelor în sistemul SERS este dovedită prin observarea benzii intense la 216 cm^{-1} , datorită legăturii noi formate în sistemul SERS (Ag-Cl). Semnalul SERS al apei de mare arată diferențe semnificative în poziția și în intensitățile relative ale benzilor, comparând cu spectrul Raman, sugerând un proces puternic de chemisorbție. Teoretic, din apa de mare ar putea adsorbi pe suprafața metalică o mulțime de componente atât organice cât și anorganice, într-un mecanism concurențial.

III.2.2. Spectrul Raman și SERS al apei din aquacultură

Fig.15. prezintă spectrul Raman al apei de mare în comparație cu spectrul Raman al apei din aquacultură., în timp ce Fig.16 prezintă spectrele SERS al celei două ape.

Banda la 438 cm^{-1} din spectrul Raman al apei de mare este deplasată la numere de unde mari, la 453 cm^{-1} , în timp ce banda de la 1641 cm^{-1} este deplasat la numere de unde mai mici la 1635 cm^{-1} , în spectrul Raman al apei din aquacultură. Apare o bandă nouă, în cazul apei din aquacultură, la 1099 cm^{-1} , care nu are corespondent în spectrul Raman al apei de mare. Comparând cele două spectre Raman acestea nu evidențiază diferențe semnificative pentru scopuri analitice.

În cazul spectrelor SERS al celor două ape, se remarcă diferențe semnificative (Fig.16). Acest experiment demonstrează clar modificările de compoziție chimică ale apei din zonă de aquacultură. Cele mai intense benzi au fost observate la 1363 cm^{-1} , 1508 cm^{-1} , și 610 cm^{-1} , benzi SERS caracteristice excesului de nitrat în apă de mare, precum și unei modificări în ce privește tipul și concentrația de micro-organisme.

În scopul detectării unor posibile biotoxine în apă de mare, aceste spectre SERS vor fi utilizate ca spectre de referință.

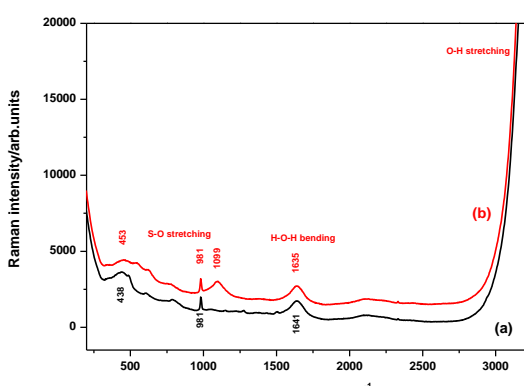


Fig.15. Spectrul Raman al (a) apei de mare în comparație cu al (b) apei din aquacultură

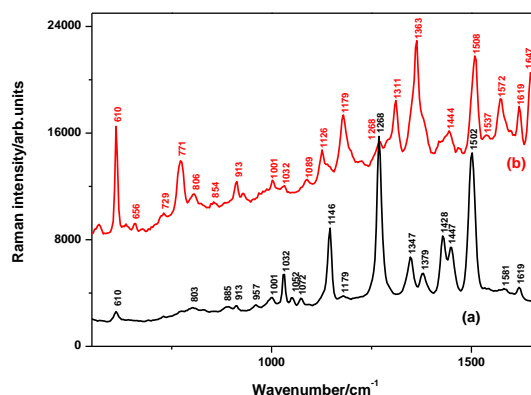


Fig.16. Spectrul SERS al (a) apei de mare în comparație cu al (b) apei din aquacultură

I

II.2.3. Spectrul FT-Raman al acidului domoic

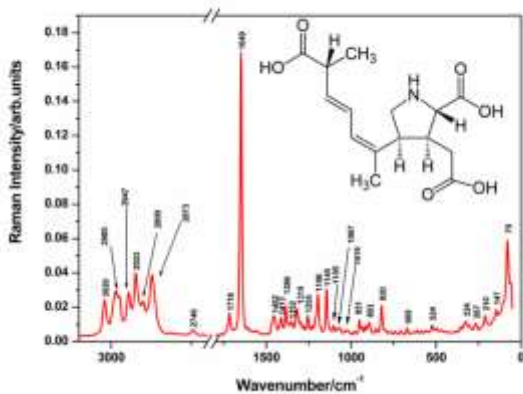


Figura.17. Spectrul FT-Raman al acidului domoic
Excitare: 1064 nm, putere 1 W, rezoluția spectrală 2 cm^{-1} , 100 scanări.

Fig.17 prezintă spectrul FT - Raman al acidului domoic solid. Banda Raman cea mai intensă este atribuită vibrației de stretching a legăturii duble C=C de la 1649 cm^{-1} (1650 cm^{-1} în literatura de specialitate) [33], care este banda marker Raman (*fingerprint*) a acidului domoic (DA).

III.2.4. Spectrul SERS al acidului domoic

Spectrul SERS al soluției apoasă DA, la concentrația $3,3 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$, este prezentată în Fig.18.

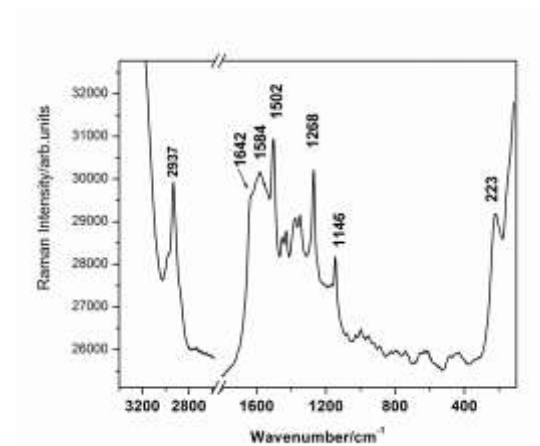


Fig.18. Spectrul SERS al acidului domoic în soluție apoasă

Semnalul SERS al soluției apoase DA, la $3,3 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ concentrație și la pH 5.5, arată diferențe în pozițiile benzilor și în intensitățile relative, în comparație cu spectrul FT - Raman al DA solid, sugerând un proces puternic de chemisorbție al DA pe nanoparticulele de argint.

Prezența benzii SERS la 223 cm^{-1} , indică formarea legăturii Ag - O care nu apare în spectrul Raman normal. Acest fapt demonstrează apropierea grupării de carbonil la suprafața de argint. Valori similare sunt raportate în literatură de

specialitate [34] pentru numerele de undă atribuite a vibrației SERS $\nu(\text{Ag} - \text{O})$.

Comparativ cu spectrul FT-Raman normal cea mai prominentă bandă SERS a fost observată la 1584 cm^{-1} și atribuită vibrației de stretching a legăturii duble $\text{C} = \text{C}$. Lărgirea benzii fingerprint din spectrul SERS este datorată probabil, din cauza unui set divers de orientări moleculare pe suprafața de argint, care este posibil deoarece DA are o dublă legătură conjugată în ringul scheletal al structurii moleculare, cu trei grupări carboxilice distincte (COOH) la periferia moleculei, și are, de asemenea, un grup imino (NH); prin fiecare se poate lega la suprafața metalului [35-39].

Prin urmare, teoretic există patru posibilități, pe care molecula poate interacționa cu suprafața metalului. Conform Falk și colab.[40], DA există în cinci stări protonate distincte, a căror proporție este puternic dependentă de pH, unde grupul imino $> \text{NH}$ sau cele trei grupuri carboxilice sunt sensibile în soluții apoase. Având în vedere că soluția de DA are o valoare de pH 5.5, unde este prezent un singur anion $-\text{COO}^-$ [41], forma adsorbită cea mai probabilă ar fi prin intermediul acestui grup funcțional. În consecință ne-am așteptat la o nouă bandă SERS corespunzătoare conjugatei DA - Ag la aproximativ $216 - 222 \text{ cm}^{-1}$. Într-adevăr, în Figura.18, se observă o bandă la 223 cm^{-1} , ce confirmă presupunerea noastră de adsorbție.

III.2.4.1. Spectrul SERS de dependența de concentrație al acidului domoic în apă pură și în apă de mare

Spectrul SERS al DA în soluție apoasă a fost înregistrat pentru diferite concentrații, de la 10^{-3} mol l^{-1} la 10^{-6} mol l^{-1} în cazul soluției cu apă pură (Figura.III.15), iar în cazul soluției cu apă de mare a fost realizat cu un ordin de mărime mai mic până la $3,3 \cdot 10^{-8}$ mol l^{-1} (Fig.19). Cu scăderea concentrației se observă diferențe în intensitatea relativă a benzilor, în ambele cazuri, sugerează o reorientare pe suprafața de nanoparticulelelor de argint.

Două benzi distincte se observă, de asemenea

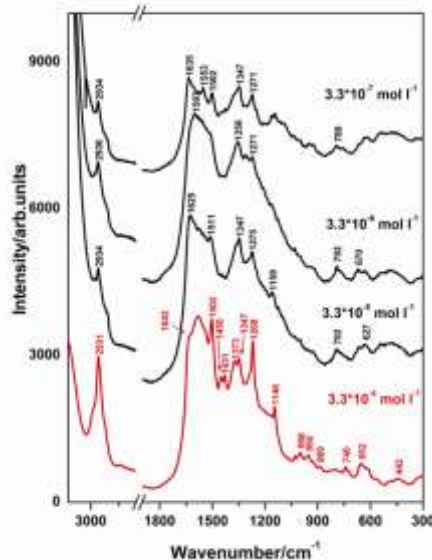


Fig.19. Spectrul SERS al acidului domoic în apă pură la diferite concentrații.

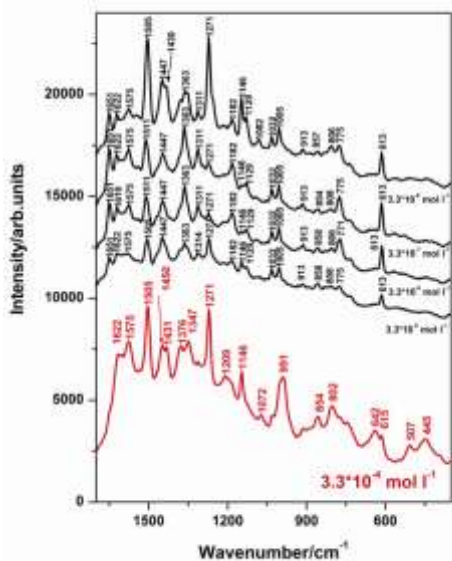


Fig.20. Spectrul SERS al acidului domoic în apă de mare la diferite concentrații.

în spectrul SERS cu

apă de mare, la 1651 cm^{-1} și 1622 cm^{-1} la concentrații mai mici de $3,3 \cdot 10^{-5}$ mol l^{-1} la 10^{-8} mol l^{-1} , în timp ce benzile de la 1505 cm^{-1} și 1271 cm^{-1} sunt crescute dramatic, sugerând o interacțiunea a acidului domoic cu unele componente al apei de mare sau o modificare structurală a moleculei din cauza diferitei pH de apă de mare (7.5).

În spectrul SERS al DA în soluția cu apă de mare (Fig.20) în intervalul numerelor de unde mari este dominat complet semnalul SERS de la apă de mare (3600 cm^{-1} - 1800 cm^{-1}).

Un studiu anterior privind semnalul SERS pe DA [41], în soluție apoasă arată că toxina a fost detectabilă la concentrația de $2.5 \cdot 10^{-5}$ mol l^{-1} (7.8 $\mu g/ml$). Cu metoda SERS actuală am demonstrat posibilitatea de a detecta DA în soluție de apă

pură la $3.3 \cdot 10^{-7}$ mol l⁻¹ (0.1 µg/ml), și în soluție de apă de mare la $3.3 \cdot 10^{-8}$ mol l⁻¹ (0.01 µg/ml). Am ajuns la o limită de detecție de 78 ori mai mare decât raportul SERS precedent, și chiar mai mare (780 de ori), atunci când apa de mare a fost utilizată ca solvent.

III.2.4.2. Spectrul SERS al acidului domoic pe nanoparticulele amino-funcționalizate de argint

Prin interacțiunea cu receptorii din amino-acizi, DA își exercită efectul neuroexcitatoriu la nivelul organismelor în care este incubat. [42], de aceea, ne-am propus să studiem posibilitatea de a detecta DA, prin metoda SERS, bazată pe afinitatea sa față de gruparea funcțională amino. Este cunoscut în general faptul că un marker SERS conține un substrat SERS (de obicei nanoparticulele unui metal nobil) și un reporter Raman adsorbit (o specie moleculară Raman cu secțiune de împrăștiere ridicată) [43]. Pentru a testa capacitatea de a capta DA la markerul SERS, am folosit 4-aminothiophenol (4-ATP) chemisorbit pe suprafața de Ag, drept „SERS tag” (ținta SERS). Este bine cunoscut faptul că 4-ATP interacționează puternic cu suprafețele de argint sau aur și conjugatele Ag-ATP, prezintă semnale SERS foarte puternice [43-46] ale ATP chemisorbit prin atomul S, confirmat prin banda nouă SERS la aproximativ 212 cm⁻¹ și atribuită modului vibrațional Ag-S. [46]

Studii foarte recente au arătat că interacțiunea p-ATP cu fotonii laserului incident [47]

poate să genereze un proces fotochimic cu apariția unor specii chimice noi, cum ar fi p,p'-dimercaptoazobenzene, care prezintă un semnal SERS total diferit. Modulile noi "b2" la 1142 cm⁻¹, 1388 cm⁻¹ și 1432 cm⁻¹ observate în spectrul SERS al ATP-ului, atribuite cu p,p'-dimercaptoazobenzene, atunci când puterea laserului aplicată a fost mare (cca 10 mW). [47]

Ținând seama de condițiile specifice de mediu pentru a obține un semnal SERS reproductibil de la 4-ATP pe Ag, am înregistrat spectre SERS în cazul

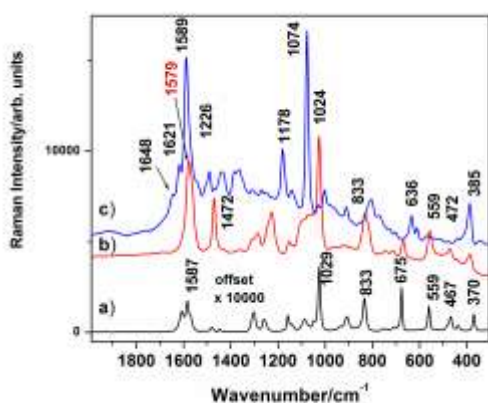


Figura.21. Spectrul FT-Raman al 4-ATP pură (a), SERS al 4-ATP (b) și SERS DA pe amino-AgNPs marker (c). Excitație: 1064 nm a); 532 nm b) și c).

soluției DA adăugată pe complexul conjugat Ag-ATP. Într-adevăr, după măsurători SERS intermediare ale sistemului ATP-Ag s-a concluzionat că sistemul SERS obținut este un complex de tip amino-AgNPs, adică particule de Ag funcționalizate cu gruparea amino. Obținerea semnalului SERS (ceea ce înseamnă expunere sub laser) demonstrează că este posibilă păstrarea identității markerului și prevenirea proceselor fotochimice dacă se utilizează puteri laser scăzute (1-5 mW). Doar în acest caz, după adăugarea DA, markerul SERS își păstrează disponibilitatea pentru interacțiune cu DA. În cazul adsorbției ATP pe NPs la puteri laser mari, în urma proceselor fotochimice induse de laser, moleculele adiacente de ATP se angajează în legături intermoleculare cu formarea p,p'-dimercaptoazobenzenului, specie care nu mai are grupări amino disponibile pentru captarea acidului domoic. În cazul complexului SERS (AgNPs-ATP) proaspăt preparat, fără expunere laser și deci fără colectarea semnalului SERS intermediar al markerului, la adăugarea soluției de DA, rezultă un semnal SERS specific al DA captat pe markerul SERS (Fig. 21)

Interacțiunea dintre orice grupări carboxilat cu amino-NPs (markeri SERS) este clar evidențiată ca o modificare drastică în regiunea spectrală SERS de 1600 cm^{-1} - 1700 cm^{-1} , unde deformarea grupării amino (de la ATP) și grupurile carboxilat prezintă benzi specifice. În spectrul SERS al 4-ATP absorbită pe suprafața de Ag, s-a observat câteva benzi foarte intense și medii la 1079 cm^{-1} , 1176 cm^{-1} , 1597 cm^{-1} , ce depind în mod semnificativ de condițiile experimentale (putere laser mare, generând reacție fotochimică în comparație cu putere de laser mică). Domeniul spectral între 1600 cm^{-1} - 1700 cm^{-1} este liber de benzi.

Pentru a realiza rapoarte molare de 1:1 pentru ATP : DA, am pregătit o probă SERS de 4-ATP din 100 μl de Ag coloidal și 10 μl de 4-ATP ($4,5 \cdot 10^{-3}\text{ mol l}^{-1}$), iar în final am adăugat 50 μl de soluție apoasă de DA (respectiv cu soluție cu apă de mare), la concentrația $10^{-3}\text{ mol l}^{-1}$. Raportul molar final de SERS a fost CDA/C4-ATP=0,99.

Am înregistrat spectrul FT - Raman al 4-ATP-lui pur și am comparat cu semnalul SERS corespunzător pe nanoparticule de Ag, pentru a

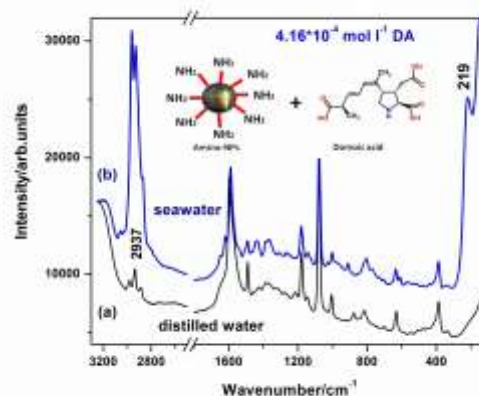


Fig.22. Spectrul SERS al DA pe AgNPs cu DA dizolvată în apă distilată (a) și în apă de mare (b).

verifica identitatea speciilor de 4-ATP absorbite (marker SERS). După adăugarea acidului domoic, spectrul SERS al markerului a relevat diferențe semnificative în regiunea 1580 - 1700 cm^{-1} . (Fig.III.19) . Banda de la 1579 cm^{-1} se extinde și se observă în jurul 1648 cm^{-1} un umăr prominent. Diferențele observate detaliate sugerează că DA legat pe grupe funcționale de 4-ATP ar trebui să interacționeze cu markerul SERS.

În cazul apei de mare (Fig .22), su-a observat diferențe semnificative. Apariția unor noi benzi la 1645 cm^{-1} și 1617 cm^{-1} , precum și în domeniul numerelor de unde mici la 219 cm^{-1} și 149 cm^{-1} , a demonstrat posibilitatea de a identifica biotoxina, exploatând specificitatea SERS a nanoparticulelor de argint amino- functionalizate. Specificitatea semnalului este observată nu numai în regiunile spectrale ce definesc marginile domeniul spectral de achiziție Raman, care nu este, de obicei, foarte potrivit pentru echipamente portabile, ci și în regiunea de fingerprint, utilizată în mod obișnuit pentru monitorizări Raman cu echipamente compacte.

III.2.4.3. Detectare SERS al acidului domoic pe țesutul de pește

Probele pentru măsurători SERS au fost preparate prin înghețarea probei de pește la -20 °C, și pusă apoi în nitrogen lichid câteva minute. Pentru mapping prin microscopie Raman, aceste probe înghețate au fost tăiate imediat la 40 μm în secțiuni subțiri cu un *microtome* (Cryostat Frigocut 2800E, at -25 °C, și depuse apoi pe o lama de de CaF_2 pentru microscopie Raman (pentru a evita fluorescența), și măsurate imediat

Spectrul Raman al probei de pește este arătată pe Fig. 23. Pentru interpretarea spectrului Raman, am apelat la comparația cu un spectru de referință, al colagenului, o proteină abundentă în toate

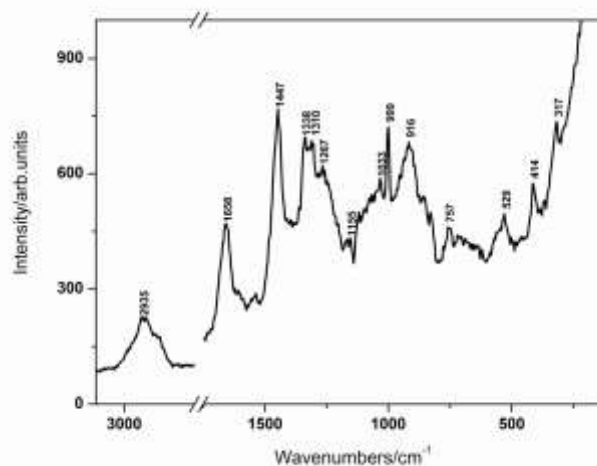


Fig.23. Spectrul SERS al țesutului de pește

țesuturile animale (și umane).

Se observă că benzile specifice ale proteinelor, amidă I (1658 cm^{-1}) și amidă III (1267 cm^{-1}), respectiv vibrațiile specifice grupărilor $-\text{CH}_2$, $-\text{CH}_3$, de la 1447 cm^{-1} , 2987 cm^{-1} și 2935 cm^{-1} atât din proteine cât și lipide sunt observate fără ambiguitate (ca și în cazul proteinelor, în cazul de față, collagen). O altă bandă caracteristică este observată la 1001 cm^{-1} și în general atribuită în literatură vibrației stretching a ringului phenyl din phenylalanina. Banda de la 317 cm^{-1} este datorată suportului de CaF_2 . Benzile complexe din regiunea $1300\text{-}1400\text{ cm}^{-1}$ sunt contraversat atribuite în literatură, după unii autori acizilor nucleici, după alți autori grupărilor heme din proteine hemice.

Pe țesutul de pește am adăugat câteva picături de acid domoic dizolvată în apă pură, și după câteva minute am făcut măsurăturile pe diferite adâncimi. Spectrul mediat este arătat în

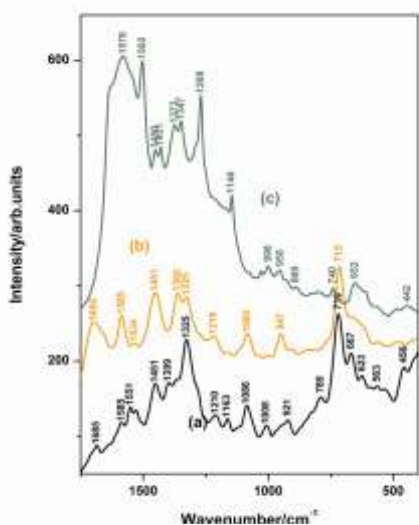


Fig.24. Spectrul SERS al țesutului de pește (a), spectrul SERS al țesutului de pește intoxicat cu DA (b), spectrul SERS al DA dizolvat în apă pură (c),

Spectrul SERS al țesutului prezintă diferențe drastice față de semnalul Raman, ceea ce sugerează o puternică incubare a nanoparticulelor în țesut și respectă un proces de chemisorptie al unor molecule specifice din structura tisulară. Se observa că domină benzile de la 1328 cm^{-1} și 719 cm^{-1} , de obicei atribuite în literatură SERS bazelor purinice (în special adeninei) din acizii nucleici. Spectrul SERS al țesutului cu DA prezintă o amprentă spectrală distinctă.

Sunt observate fără ambiguitate benzile SERS caracteristice ale acidului domoic (Fig. 24), ceea ce ne permite să concluzionăm că tehnica SERS este capabilă să detecteze și să diferențieze această biotoxină în țesutul de pește. Aceste rezultate deschid noi perspective

în dezvoltarea tehnicii pentru aplicații curente, în care evident, vor fi necesare baze de date SERS specifice pentru țesuturile sănătoase. De aceea ideile dezvoltate în această teză deschid noi direcții de cercetare aplicată, de interes curent.

III.2.3 Concluzii

Am obținut și am caracterizat în premieră, semnalul SERS al acidului domoic, atât în apă pură cât și apă de mare și am atins limita de detecție la concentrație de 0,33 nmol l⁻¹ (0,33 ppb) în apă distilată și respectiv 0,033 nmol l⁻¹ (0,033 ppb) în apă de mare, concentrații mult mai mici decât nivelul acceptat de reglementările actuale. Trei scheme diferite de detectare a acidului domoic (DA) în apă de mare au fost descrise, prin dizolvarea în apă de mare a probei cristaline, prin diluarea soluției de apă pură cu apă de mare sau prin utilizarea unor markeri SERS de tip amino-AgNPs (așa cum este rezumat grafic în figura de mai jos)

Specificitatea dependenței de semnal a metodei utilizate a fost discutată în toate cazurile. Pentru a proba tehnica SERS și a obține semnal de înaltă calitate am folosit nanoparticule atât pure cât și amino - funcționalizate. Dependența de concentrație a spectrelor SERS a relevat diferențe semnificative în semnalul acidului domoic adsorbit, dependent puternic de condițiile de mediu. DA a fost detectat la concentrație de 4,16*10⁻⁴ mol l⁻¹ în cazul utilizării nanoparticulelor funcționalizate, o limită de detecție cu 5 ordine de mărime mai mică decât în cazul nanoparticulelor pure de Ag.

Utilizarea metodei SERS pentru a detecta biotoxinei demonstrează posibilitatea de a oferi modalități alternative de a înlocui metodele actuale costisitoare și consumatoare de timp în analizele cu scop de monitorizarea permanentă. Acest lucru a demonstrat orientarea și legarea acidului domoic pe suprafața metalică, și detectarea acestei toxine marine în apă de mare, utilizând SERS la concentrații mai mici decât metodele actuale utilizate.

Specificitatea detecției DA pe amino-AgNPs este semnificativă și neambiguă, nu numai la marginea domeniul spectral, ci și de asemenea și în intervalul spectral așa-numit „fingerprint”, care de obicei este foarte potrivit pentru orice echipament Raman portabil. Prin urmare, rezultatele au furnizat informații valoroase pentru punerea în aplicare a metodei ca o variantă ușoară de implementat *in situ*, rapidă și ieftină pentru programele marine de monitorizate, folosind aparate portabile și nanoparticule de Ag coloidale.

Concluzii generale

- ✓ Teza aduce in premiera rezultate originale in sprijinul implementarii tehnicilor spectroscopice vibrationale, in particular SERS, in controlul calitatii alimentelor.
- ✓ S-a detectat in premiera prezenta tiabendazolului in coaja citricelor si bananelor utilizand tehnica SERS, iar studiul a fost extins chiar si pentru probe de citrice achizitionale din asa numitele magazine „bio”. S-a aratat ca nivelul TBZ detectat a depasit de 13 ori valorile maxime admise de reglementarile in vigoare. Acest lucru a fost posibil numai pe baza unei caracterizari riguroase a meloculei in cauza, atat din punct de vedere teoretic cat si experimental.
- ✓ Astfel de studii pot fi cu certitudine implementate in aplicatii curente daca exista o baza de date de spectre vibrationale corespunzatoare precum si expertiza (*know how*) pentru monitorizari curente.
- ✓ In ce priveste translatarea spectroscopiei vibrationale catre aplicatii curente in programele de monitorizare din aquacultura, studiile noastre demonstreaza posibilitatea detectiei si monitorizarii unor biotoxine atat in apa de mare cat si in produsele de aquacultura (*seafood*) si deschid noi perspective in domeniu.

Referințe (selecție)

1. http://www.fao.org/trade/docs/ldc-foodqual_en.htm
2. **A. Pinte**, **C. Bele**, **S. Andrei**, **C. Socaciu**, *HPLC analysis of carotenoids in four varieties of *Calendula officinalis* L. flowers*, Acta Biologica Szegediensis 47, 37-40, (2003).
3. **T. Hodisana**, **C. Socaciu**, **I. Ropanb**, **G. Neamtu**, *Carotenoid composition of *Rosa canin* a fruits determined by thin-layer chromatography and high-performance liquid chromatography*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 16, 521–528, (1997).
4. **A. Bunea**, **M. Andjelkovicb**, **C. Socaciu**, **O. Bobisa**, **M. Neacsu**, **R. Verhéc**, **J. Van Camp**, *Total and individual carotenoids and phenolic acids content in fresh, refrigerated and processed spinach (*Spinacia oleracea*.)*, Food Chemistry 108, 649–656, (2008).
5. **T. Iliescu**, **S. Cîntă Pînzaru**, **D. Maniu**, **R. Grecu S. Aștilean**, *Aplicații ale Spectroscopiei vibraționale*, Casa cărții de știință, (2002), Cluj Napoca.
6. **S. Aștilean**, *Metode și tehnici moderne de spectroscopie optică, Spectroscopia IR și Raman*, Editura Casa Cărții de Știință, (2002), Cluj-Napoca.
7. **T. Iliescu**, **S. Cîntă Pînzaru**, *Specroscopia Raman și SERS cu aplicații în biologie și medicină*, Casa Cărții de Știință, (2011) Cluj-Napoca.
8. **W.E. Smith and G. Dent**, *Modern Raman Spectroscopy – A Practical Approach*, John Wiley&Sons, (2005).
9. **D. Bârcă-Gălățeanu**, **M. Giurgia**, **I. Iova**, **V. Sahini**, **A. Truția**, **R. Țițeica**, *Introducere în spectroscopia experimentală*, Editura Tehnică, (1966), București.
10. **Chalmers JM, Griffiths PR**. *Handbook of Vibrational Spectroscopy*, Wiley J&Sons, Chichester Baffins Lane, (2002), UK.
11. **J.A. Creighton**, *Spectroscopy of Surface*, R.J.H. Clark, R.E. Hester (Eds.), Wiley, (1988), New York.
12. **M. Moskovits, J.S. Suh**, *Surface selection rules for surface-enhanced Raman spectroscopy: calculations and application to the surface-enhanced Raman spectrum of phthalazine on silver*, Journal of Physical Chemistry. 88, 5526-5530, (1984).
13. **J.A. Creighton**, *Surface raman electromagnetic enhancement factors for molecules at the surface of small isolated metal spheres: The determination of adsorbate orientation from sers relative intensities*, Surface Science 124, 209-219, (1983).
14. **K. Kneipp**, *Surface-Enhanced Raman Scattering*, Physics Today 60, 40-47, (2007).
15. **A. Campion, P. Kambhampat**, *Surface-enhanced Raman scattering*, Chemical Society Reviews 27, 241-250, (1998).
16. **L. David, O. Cozar, C. Cristea, L. Gaina**, *Identificare structurii moleculare prin metode spectrosocopice*, Presa Universitară Clujeană, (2004), Cluj Napoca.
17. **T. Iliescu**, *Elemente de fizica laserilor și spectroscopie laser*, Casa Cărții de Știință, (2002), Cluj-Napoca.
18. **S. Cîntă-Pînzaru, A. Fălămaș, C. Dehelean, N. Leopold, C. Lehene, V. Chiș**, *Anti-tumoral betulin detection by surface enhanced Raman scattering*, Studia UBB Physica, 2, 25-33, (2010).

19. **A. Tao, F. Kim, C. Hess, J. Goldberger, R. He, Y. Sun, Y. Xia, P. Yang**, *Langmuir-blodgett silver nanowire monolayers for molecular sensing using surface-enhanced raman spectroscopy*, *Nano Letters* 3 1229-1233 (2003).
20. **T.Vo-Dinh**, *Surface-enhanced Raman spectroscopy using metallic nanostructures*, *Trends in analytical chemistry* 17(8-9), 557-582, (1998).
21. **A. Pîrnău**, Ph.D. Thesis, 18-19 (2007)
22. **P. Politzer, J. Murray**, *The fundamental nature and the role of the electrostatic potential in atoms and molecules*, *Theoretical Chemistry Accounts* 108, 134-142, (2002)
23. J.J. Roothaan, *New developments in molecular orbital theory*, *Reviews of modern physics*, 23, 63-68, (1951).
24. **F. Jensen**, *Introduction to Computational Chemistry*, John Wiley and Sons, (2001), New York.
25. **M. Saltmarsh**, *Essential Guide to Food Additives*, Leatherhead Food RA Publishing, (2000); 1-322.
26. **E. Oranescu**, *Aditivii alimentari, necesitate și risc*, Editura A.G.I.R., (2008), Bucuresti.
27. **C. Banu**, *Aditivi și ingrediente pentru industria alimentară*, Editura Tehnica, (2000) Bucuresti.
28. **M.S. Kim, M.K. Kim, C.J. Lee, Y.M. Jung**, *Bulletin of the Korean Chemical Society* 30, 1851-1854, (2009).
29. **Directiva 98/72/CE de modificare a Directivei 95/2/CE** privind aditivii alimentari alții decât coloranții și îndulcitorii, *Jurnalul oficial ale comunităților Europene*, 0 4.11.1998, L295/18, 13/vol.27, pagina 117;
30. **E.C. Le Ru, S.A. Meyer, C. Artur, P.G. Etchegoin, J. Grand, P. Lang, F. Maurel**, *Experimental demonstration of surface selection rules for SERS on flat metallic surfaces*. *Chemical Communications* 47, 3903-3905, (2011).
31. **S.S. Bates, C.J. Boyd, R.K. Boyd, A.S.W. Freitas, M.Falk, R.A. Foxall, L.A.Hanic, W.D. Jamieson, A.W. McCulloch, P. Odense**: *Investigation on the source of domoic acid responsible for the outbreak of Amnesic shellfish poisoning (ASP) in eastern Prince Edward Island*. Atlantic Research Laboratory Technical Report 57, National Research Council, Canada, (1988)
32. **Regulation of the European Parliament and of the Council on the hygiene of foodstuffs**. Amended proposal for a regulation of the European Parliament and the Council laying down specific hygiene rules for food of animal origin (presented by the Commission pursuant to article 250(2) of the EC Treaty), Commission of the European Communities, Brussels, 27.1.2003
33. **Y. Djaoued, S. Balaji, S. Priya**, *Non-resonance micro-Raman spectroscopic studies on crystalline domoic acid and its aqueous solutions*, *Spectrochimica Acta Part A*, 67, 1362-1369, (2007).
34. **T. Takemoto, K. Daigo**, *On the constituents of Chondria armata and their pharmacological effect*, *Archive for Pharmacy* 293, 627-633, (1960)
35. **Q.Wu, W.H. Nelson, J.M. Treubing Jr., P.R. Brown, P. Hargraves, M. Kirs, M. Feld, R.Desari, R. Manoharan, E.B.Hanlon**, *UV Resonance Raman detection and quantitation of Domoic Acid in phytoplankton*, *Analytical Chemistry*, 72, 1666-1671, (2000).
36. **Y. Yao, W. H. Nelson, P. Hargraves, J. Zhang**, *UV Resonance Raman study of domoic Acid, a marine neurotoxic amino acid*, *Applied spectroscopy* 51, 785-791, (1997).

37. **Y. Djaoued, S. Balaji, S. Priya**, *Non-resonance micro-Raman spectroscopic studies on crystalline domoic acid and its aqueous solutions*, Spectrochimica Acta Part A, 67, 1362-1369, (2007).
38. **T. Takemoto, K. Daigo, Y. Kondo, K. Kondo**, *Studies on the constituents of Chondria armata. VIII. On the structure of domoic acid* 86, Journal of pharmacological Society, 874-877, (1966).
39. **Y.F. Huang, D.Y. Wu, H.P. Zhu, L.B. Zhao, G.K. Liu**, *Surface-enhanced Raman spectroscopic study of p-aminothiophenol*, Physical Chemistry Chemical Physics 14, 8485-8497, (2012)
40. **M. Falk, J.A. Walter, P.W. Wiseman**, *Ultraviolet spectrum of domoic acid*, Canadian Journal of Chemistry 67, 1421-1425, (1989).
41. **T.Y. Olson, A.M. Schwartzberg, J.L. Liu, J.Z. Zhang**, *Raman and Surface Enhanced Raman Detection of Domoic Acid and Saxitoxin*, Applied Spectroscopy 65, 159-164, (2011).
42. **A. Doble**, *Pharmacology of Domoic Acid*, CRC Press, (2000).
43. **Y. Wang, S. Schlucker**, *Rational design and synthesis of SERS labels*, Analyst 138, 2224-2238, (2013).
44. **.Y. Wu, L.B. Zhao, X.M. Liu, R. Huang, Y.F. Huang, B. Ran, Z.Q. Tian**, *Clean and modified substrates for direct detection of living cells by surface-enhanced Raman spectroscopy*, Chemical Communications. 47, 2520-2522, (2011).
45. **H. Chena, Y. Wanga, S. Donga, W. Wanga**, Spectrochimica Acta, Part A: Molecular and biomolecular Spectroscopy 64, 343-348, (2006).
46. **L. Skantarova, A. Orinak, R. Orinakova, F. Lofaj**, *4-Aminothiophenol Strong SERS Signal Enhancement at Electrodeposited Silver Surface*, Nano-Micro Letters 4, 184-188, (2012).
47. **E. Tan, P. Yin, T. You, L. Guo**, *Direct evidence for conversion of p-aminothiophenol to p,p'-dimercaptoazobenzene by in situ reduplicative surface-enhanced Raman scattering measurements*, Journal of Raman Spectroscopy 44, 1200-1203, (2013).

Articole publicate in reviste cotate ISI:

1. **Csilla Müller**, Leontin David, Vasile Chiș, Simona Cîntă Pînzaru, *Detection of thiabendazole applied on citrus fruits and bananas using surface enhanced Raman scattering*, Food Chemistry 145 (2014), 814-820.
2. **Csilla Müller**, Leontin David, Simona Cîntă Pînzaru, *Detection of thiabendazole applied to organic fruit by near infrared surface-enhanced Raman spectroscopy*, Spectroscopy Europe 25(4) (2013), 6-11
3. **Csilla Müller**, Karina Weber, Iva Pozniak, Jürgen Popp, Branko Glamuzina, Simona Cîntă Pînzaru, *SERS detection of domoic acid in seawater using pure or amino-functionalized Ag nanoparticles*, Spectrochimica Acta Part A: Molecular and biomolecular spectroscopy, **a fost trimisă la publicare la date de 23.07.2013**
4. S. Cîntă Pînzaru, Iva Pozniak, M. Venter, **Csilla Müller**, Branko Glamuzina, *Assessing the new SERS-based sensing scheme for specific aquaculture environment monitoring of South-Eastern Croatian Coast, Fish and Fisheries*, (Wiley journal, impact factor 5.85) under review.

Conferință internațională în domeniu:

Cs. Müller, L. David, M. Oltean, S. Cîntă Pînzaru,

Chemicals detection in fruit conservation treatment using surface-enhanced Raman scattering, Book of Abstract, XXXI European Congress on Molecular Spectroscopy (EUCMOS), Cluj-Napoca, 2012, p212; **prezentare poster**

Csilla Müller, Karina Weber, Dana Cialla, Jürgen Popp, Iva Pozniak, Branko Glamuzina, Simona Cîntă Pînzaru

Domoic acid biotoxin from seawater environment: Raman and SERS characterization and detection, Book of Abstract, 3rd World Conference on Physico-Chemical Methods in Drug Discovery and Development, Dubrovnik, Croatia, 2013 P. 58, 2013, **prezentare poster**

MULȚUMIRI

Aș dori să vă aduc mulțumiri întregului colectiv al catedrei de Fizică Biomedicală, al Facultății de Fizică al Universității Babeș-Bolyai, pentru sprijinul acordat în realizarea acestei teze.

Recunoștința mea specială se adresează domnului Prof. Dr. Leontin David, conducătorul meu de doctorat, pentru sprijinul, încurajarea și încrederea acordată dar și pentru privilegiul și onorarea de a realiza această lucrare de doctorat sub conducerea lor.

Îi mulțumesc în mod cu totul special doamnei Conf. Dr. Simona Cîntă Pânzaru, cine mi-a ghidat constant pașii de cercetare, pentru că mi-a cedat din experiența sa și mi-a dezvăluit tainele unui domeniu atât de frumos al cercetării, spectroscopia vibrațională.

De asemenea, doresc să-i adresez mulțumiri alese și recunoștință domnului Prof. Dr. Vasile Chiș pentru importante sugestii, îndrumări și completări științifice și totodată pentru promptitudinea și profunzimea sfaturilor acordate.

Aș dori să vă aduc mulțumiri întregului colectiv al Universității Friedrich-Schiller, IPHT, Jena, Germania, și în mod special pentru domnului Prof. Dr. Jürgen Popp, pentru sprijinul profesional și financiar acordat în realizarea acestei teză.

Nu din ultimul rând, doresc să mulțumesc celor mai importante persoane din viața mea, soțului meu Ferencz, părinții mei și sorei mele, care mi-au fost alături necondiționat cu sprijinul și dragostea lor.

Această lucrare a fost posibilă prin sprijinul financiar oferit prin Programul Operațional Sectorial Dezvoltarea Resurselor Umane 2007-2013, cofinanțat prin Fondul Social European, în cadrul proiectului POSDRU/107/1.5/S/76841, cu titlul „Studii doctorale moderne: internaționalizare și interdisciplinaritate”.