

Rezumatul activității și a rezultatelor obținute în proiect perioada 2020-2023

Nanoparticule metalice biofuncționalizate – obținerea cu ajutorul cianobacteriilor și microalgelor
Cifra proiectului 20.80009.5007.05

Cercetările din cadrul proiectului au avut drept scop obținerea nanoparticulelor metalice biofuncționalizate cu utilizarea cianobacteriilor și microalgelor. Procesul de biofuncționalizare conferă nanoparticulelor metalice proprietăți utile pentru aplicare în tehnici de diagnostic. De asemenea prin procesul de biofuncționalizare se obține extinderea domeniilor de aplicații datorită noilor proprietăți achiziționate și un nivel scăzut al toxicității.

Obiectivele prioritare ale proiectului au prevăzut activități de obținere, caracterizare și apreciere a toxicității nanoparticulelor metalice fotoactive biofuncționalizate *in vivo* în cultura cianobacteriei *Arthrospira platensis* CNMN-CB-02 și în cultura microalgei *Porphyridium cruentum* CNMN-AR-01, și *in vitro* în sisteme sintetice în baza fracțiilor biologice active din biomasa cianobacteriei *A. platensis* și din biomasa microalgei *P. cruentum*.

Cercetările au fost efectuate cu utilizarea nanoparticulelor de aur și argint cu dimensiunile de 5 nm, 10 nm și 20 nm (TEM) stabilizate în polietilen glicol și stabilizate în citrat. Rezultatele științifice obținute au contribuit la acumularea cunoștințelor noi despre particularitățile de biofuncționalizare a nanoparticulelor de sinteză cu dimensiuni predeterminate în culturile cianobacteriei *Arthrospira platensis* și microalgei *Porphyridium cruentum* (ambele culturi sunt obiecte ale ficobiotehnologiei). În rezultatul cercetărilor au fost stabiliți factorii determinanți ai procesului de biofuncționalizare spontană a nanoparticulelor în culturile vii de spirulină și porfiridium care sunt: tipul nanoparticulelor, dimensiunea și concentrația nanoparticulelor și, vârstă culturii la care are loc contactul cu nanoparticulele.

În scopul biofuncționalizării nanoparticulelor în sisteme sintetice în baza fracțiilor biologice active din biomasa cianobacteriei *A. platensis* și din biomasa microalgei *P. cruentum* au fost elaborate scheme de obținere prin extragere a compușilor biologici activi de interes – componente ale sistemelor pentru biofuncționalizarea nanoparticulelor de argint și aur. Schemele au la bază principiul extragerii succesive, precum și solubilitatea compușilor biologici activi de interes în alcool etilic și hidroxid de sodiu în condiții de concentrație, pH și termice diferite. Au fost aplicate diferite tehnici de pretratare a biomasei (congelare/decongelare repetată, prelucrarea cu microunde și prelucrarea cu ultrasunet) de *A. platensis* și *P. cruentum* în scopul utilizării în calitate de materii prime pentru extragerea compușilor bioactivi de interes. Au fost identificați parametrii optimali ai tehnicilor de pretratare a biomasei care au favorizat procesul de extracție. Au fost stabilite criteriile de reactivitate a substratului biologic și elaborate tehnicile de biofuncționalizare a nanoparticulelor de aur și argint.

Nanoparticulele de aur și argint biofuncționalizate au obținut proprietăți biologice diferite de cele ale nanoparticulelor nefuncționalizate: tropismul specific direcționat (organe reproductive, creier), eliminarea completă, modificări minimale reversibile ale statutului imun, hematopoietic și oxidativ. Au fost stabiliți factorii care au determinat tropismul nanoparticulelor biofuncționalizate și gradul lor de eliminare: tipul nanoparticulelor și dimensiunea lor, compusul stabilizator și tipul substratului utilizat în biofuncționalizare.

Tehnologia de biofuncționalizare a nanoparticulelor chimice în baza biomasei și a biomoleculilor, care au la bază culturile biotehnologice *Arthrospira platensis* și *Porphyridium cruentum*, cultivarea cărora este bine pusă la punct, sporește esențial posibilitatea transferului tehnologic rapid al elaborării noi, contribuind la extinderea ariei de aplicare a nanoparticulelor.

The research project investigated the production of biofunctionalized metal nanoparticles using cyanobacteria and microalgae. The priority objectives of the project included activities to obtain, characterize and assess the toxicity of biofunctionalized photoactive metal nanoparticles in vivo in the culture of cyanobacterium *Arthrospira platensis* CNMN-CB-02 and microalga *Porphyridium cruentum* CNMN-AR-01, and in vitro in synthetic systems based on biologically active fractions from biomass of cyanobacterium *A. platensis* and red microalga *P. cruentum*.

The studies were carried out using 5, 10 and 20 nm gold and silver nanoparticles (TEM) stabilized with both polyethylene glycol and citrate. The obtained scientific results contributed to the accumulation of new knowledge about the biofunctionalization features of synthetic nanoparticles with predetermined sizes in the cultures of cyanobacterium *Arthrospira platensis* and microalga *Porphyridium cruentum* (both cultures are valuable phycobiotechnological objects). As a result of the research, the effective factors favoring the process of spontaneous biofunctionalization of nanoparticles in living cultures of spirulina and porphyridium were established, namely: the type of nanoparticles, the size and concentration of nanoparticles, and the age of culture at the moment of interaction with nanoparticles.

In order to ensure the biofunctionalization of nanoparticles in synthetic systems based on biologically active fractions derived from biomass of cyanobacterium *A. platensis* and microalga *P. cruentum*, schemes have been developed for obtaining bioactive principles of interest - components of systems for biofunctionalization of silver and gold nanoparticles. Technological schemes are based on sequential extraction methods, as well as on the solubility of biologically active compounds of interest in ethyl alcohol and sodium hydroxide at different concentrations, pH and thermal conditions. Various pretreatment methods (repeated freezing/thawing, microwave and ultrasound treatment) of cyanobacterial and microalgal biomass were applied, in order to use as raw materials for the extraction of bioactive compounds of interest. The optimal parameters of biomass pretreatment techniques that favored the extraction process were identified. The criteria for the reactivity of the biological substrate were established and the techniques for biofunctionalization of gold and silver nanoparticles were developed.

Biofunctionalized gold and silver nanoparticles exhibited biological properties other than those of non-functionalized nanoparticles: tissue tropism (reproductive organs, brain), total elimination, reversible minimal changes of immune, hematopoietic and oxidative status. Factors determining the tropism of biofunctionalized nanoparticles and the degree of their removal have been identified: type of nanoparticles and their size, stabilizing compound and type of substrate used in biofunctionalization.

Biofunctionalization of chemical nanoparticles based on biomass and biomolecules using biotechnological cultures *Arthrospira platensis* and *Porphyridium cruentum*, whose cultivation is well established, has significantly increased the possibility of rapid technology transfer of new developments, contributing to further expand the use of nanoparticles.