

**Universitatea Babeș-Bolyai
Facultatea de Fizica**

Rezumatul Tezei Doctorale

**Obținerea de noi nanoparticule plasmonice
invelite în chitosan pentru detecție
biomoleculară și activitate antibacteriană**

Monica Potara

**Coordonator Științific
Prof. Dr. Simion Astilean**

**CLUJ-NAPOCA
2012**

Cuprins

Introducere

Capitolul 1: Sinteza Bibliografica

1.1. Nanoparticulele de metal nobil si proprietatile acestora.....	- 3 -
1.1.1. Absorbția si imprastierea plasmonica a nanoparticulelor de metal nobil.....	- 3 -
1.2. Aplicatiile biomedicale ale nanoparticulelor de metal nobil	- 3 -
1.2.1. Biodetectia bazata pe agregarea coloidala.....	- 3 -
1.2.2. Biodetectia bazata pe deplasarea LSPR.....	- 3 -
1.2.3. Biodetectia bazata pe imprastierea Raman amplificata de suprafata	- 4 -
1.2.4. Activitatea antibacteriana a nanoparticulelor de argint	- 4 -
1.3. Biopolimerul chitosan: proprietati si aplicatii biomedicale	- 5 -

Capitolul 2: Nanocompozite de Aur-Chitosan: Sinteza si Caracterizare

2.1. Formarea nanoparticulelor de aur in solutia de chitosan.....	- 6 -
2.2. Studiul formarii nanoparticulelor de aur in solutia de chitosan la diferite temperaturi de reactie.....	- 7 -
2.3. Studiul stabilitatii nanocompozitelor de aur-chitosan preparate	- 9 -

Capitolul 3: Sinteza Nanoparticulelor Anizotrope de Argint Mediata de Chitosan

3.1. Cresterea nanoparticulelor triunghiulare	- 10 -
3.1.1. Primul pas: Prepararea solutiei de germeni de crestere.....	- 10 -
3.1.2. Al doilea pas: Cresterea nanoparticulelor triunghiulare de argint	- 10 -
3.1.3. Analiza morfologica prin TEM.....	- 10 -
3.2. Ajustarea dimensiunii si morfologiei nanoparticulelor de argint.....	- 12 -
3.2.1. Efectul citratului de sodium asupra dimensiunii si morfologiei nanoparticulelor	- 12 -
3.2.2. Efectul concentratiei de chitosan asupra dimensiunii si morfologiei nanoparticulelor	- 14 -
3.3. Stabilitatea nanocompozitelor de chitosan-argint sintetizate	- 14 -
3.3.1. Caracterizarea FT-IR	- 14 -
3.3.2. Studiul stabilitatii nanoparticulelor de chitosan-argint in diferite conditii de mediu.....	- 15 -

Capitolul 4: Nanoparticulele Anizotrope de Argint Invelite in Chitosan ca Senzori Plasmonici Duali LSPR-SERS

4.1. Nanoparticulele anizotrope de argint invelite in chitosan ca senzori plasmonici duali LSPR-SERS in solutie.....	- 17 -
4.1.1. Sensibilitatea LSPR de indice de refractie (RI) efectiv (bulk)	- 17 -
4.1.2. Sensibilitatea LSPR de suprafata	- 18 -
4.1.3. Sensibilitatea SERS	- 19 -
4.2. Nanoparticulele anizotrope de argint invelite in chitosan pentru detectia SERS la nivel unimolecular	- 20 -
4.2.1. Caracterizarea morfologica si optica a substratelor SERS.....	- 21 -
4.2.2. Detectia SERS a ansamblului de molecule de adenina.....	- 22 -
4.2.3. Detectia SERS unimoleculara a adeninei.....	- 25 -

Capitolul 5: Activitatea Antibacteriana Sinergistica a Nanocompozitelor de Chitosan-Argint asupra *Staphylococcus Aureus*

5.1. Determinarea valorilor MIC si MBC.....	- 27 -
5.2. Imagistica AFM a efectelor antibacteriene ale nanoparticulelor de argint asupra <i>S. aureus</i>	- 28 -
5.3. Masuratorile SERS	- 29 -
Concluzii	- 30 -
Referinte	- 31 -

Introducere

Scopul major al tezei de fata este de a obtine nanocompozite anizotrope de chitosan si metal nobil cu rezonante plasmonice ajustabile, care pot servi ca biosenzori plasmonici multifunctionali si agenti antibacterieni eficienti.

Teza este structurata in sase capitole. **Capitolul 1** prezinta o scurta trecere in revista a literaturii stiintifice cu privire la aplicatiile biomedicale ale nanoparticulelor de metal nobil. Este introdusa o scurta discutie despre proprietatile optice ale nanoparticulelor metalice. Sunt subliniate neajunsurile particulelor sferice, si apoi sunt introduse nanoparticulele anizotrope.

In **Capitolul 2** este prezentata o metoda ecologica de sinteza a unei game largi de nanoparticule de aur, folosind ca agent reductor si stabilizator chitosanul, un polimer natural, biocompatibil si biodegradabil. Formarea nanocompozitelor de aur-chitosan este caracterizata prin spectroscopia de absorbtie UV-vis, microscopia electronica de transmisie (TEM), difractia de raze X (XRD), spectroscopia Raman si spectroscopia in infrarosu cu transformata Fourier (FT-IR).

In **Capitolul 3** este introdusa o metoda noua, in doua etape, de obtinere a nanoparticulelor anizotrope de argint invelite intr-un strat biopolimeric de chitosan. Morfologia si proprietatile optice ale bionanocompozitelor preparate sunt caracterizate prin spectroscopia de extinctie UV-VIS-NIR, TEM, XRD, difractia de electroni (ED), Raman si FT-IR. Prin efectuarea unei serii de experimente bine definite se demonstreaza ca rezonantele plasmonice ale nanoparticulelor sintetizate sunt ajustabile pe tot domeniul spectral vizibil, pana in domeniul infrarosu apropiat (NIR).

Capitolul 4 este divizat in doua parti. In prima parte, tinand cont de avantajul stabilitatii ridicate a nanoparticulelor de argint invelite in chitosan, in combinatie cu raspunsul lor optic ajustabil, este integrata pe nanoparticulele plasmonice suspendate in solutie detectia bazata pe rezonantele plasmonice de suprafata localizate (LSPR) cu detectia prin spectroscopia Raman amplificata de suprafata (SERS). In partea a doua a acestui capitol se demonstreaza ca ansamblurile mici de nanoparticule anizotrope de argint inglobate in filme subtiri de chitosan permit detectia unimoleculara prin SERS.

In **Capitolul 5** este investigata posibilitatea combinarii sinergistice a chitosanului cu nanoparticulele de argint cu scopul de a identifica un material nou, biocompatibil cu proprietati antibacteriene superioare. Sunt efectuate studii comparative pentru a evalua impactul nanoparticulelor, al compozitelor de chitosan-argint si al biopolimerului chitosan asupra a doua tulpini reprezentative de *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) rezistent la metilina.

In **Capitolul 6** sunt prezentate concluziile si perspectivele studiilor mele.

Cuvinte cheie: nanoparticule de metal nobil, chitosan, rezonante plasmonice de suprafata localizate (LSPR), spectroscopia Raman amplificata de suprafata (SERS), agent antibacterian.

Capitolul 1

Sinteza Bibliografica

1.1. Nanoparticulele de metal nobil si proprietatile acestora

1.1.1. Absorbția și împrăștierea plasmonică a nanoparticulelor de metal nobil

Atunci când dimensiunea unui material se apropie de scara nanometrică, proprietățile sale fizice și chimice se modifică substanțial. Cel mai spectaculos fenomen este culoarea strălucitoare a nanoparticulelor coloidale, care este rezultatul interacțiunilor electromagnetice dintre lumina incidentă și electronii de conducție din nanoparticulele metalice. În acest caz lumina incidentă se cuplează cu frecvența de oscilație a electronilor de conducție în nanoparticulele de metal nobil, producând așa numitele *rezonanțe plasmonice de suprafață* (SPR), care determină apariția unei benzi de absorbție intense în spectrul vizibil [1]. În cazul nanoparticulelor metalice aceste SPR sunt localizate la suprafața nanoparticulelor și se numesc *rezonanțe plasmonice de suprafață localizate* (LSPR).

1.2. Aplicațiile biomedicale ale nanoparticulelor de metal nobil

Datorită proprietăților lor chimice, electronice și plasmonice excepționale, nanoparticulele metalice sunt foarte atractive pentru o gamă largă de aplicații biomedicale cum sunt: detectia moleculară, diagnosticul molecular, acțiunea antibacteriană, transportul medicamentelor, terapia cancerului, etc. [2].

1.2.1. Biodetecția bazată pe agregarea coloidală

Sensibilitatea ridicată a poziției și intensității LSPR la mici modificări ale mediului din jurul nanoparticulelor este deosebit de atractivă pentru aplicații în detecție. În funcție de originea modificărilor LSPR, se pot distinge două categorii de senzori: (1) senzori colorimetrici și (2) senzori bazati pe indicii de refracție (RI). În primul caz adsorbția moleculelor pe suprafața nanoparticulelor induce agregarea acestora, fenomen însoțit de o modificare drastică a culorii soluției coloidale. În consecință, detecția poate fi vizualizată cu ochiul liber. Agregarea coloidală a fost utilizată pe scară largă pentru detecția moleculelor relevante biologic, cum sunt ADN, anticorpi, etc. [3].

1.2.2. Biodetecția bazată pe deplasarea LSPR

A doua clasă de senzori se bazează pe deplasarea LSPR, determinată de modificarea indicelui de refracție al mediului din jurul nanoparticulelor. În acest caz detecția se poate monitoriza spectroscopic prin deplasarea poziției LSPR. Se disting două moduri de schimbare a mediului din jurul nanoparticulelor și anume: (1) modificarea întregului mediu din jurul nanoparticulelor și (2)

modificarea locala a mediului prin adsorbția unui strat molecular pe suprafața nanoparticulelor. În cea de a doua situație, adsorbția directă a moleculelor pe suprafața nanoparticulelor sau adsorbția prin intermediul unui receptor sau molecule gazda produce o deplasare a LSPR, fapt deosebit de important în biodetecție. O primă demonstrație în care s-au folosit senzorii bazati pe modificarea indicelui de refracție pentru detectia unor molecule biologice relevante este modelul biotina-streptavidina [4]. De atunci, metoda de detectie bazata pe deplasarea LSPR a atras o atenție deosebită.

1.2.3. Biodetecția bazată pe împrăștierea Raman amplificată de suprafață

Capacitatea de a identifica și de a furniza informații structurale despre speciile moleculare în concentrație scăzută face ca spectroscopia Raman amplificată de suprafață (SERS) să fie o metodă excelentă pentru biodetecția ultrasensibilă, analiza și imagistică a probelor biologice [5]. SERS se bazează, în mare măsură, pe crearea unor câmpuri electromagnetice puternice la suprafața nanoparticulelor de metal nobile datorită oscilațiilor colective ale electronilor de conducție excitați de lumina incidentă. Aceste câmpuri amplifică împrăștierea Raman a moleculelor situate în această regiune [6]. Este bine cunoscut faptul că amplificarea enormă a semnalului Raman este determinată, în principal, de acest efect, numit efect electromagnetic (EM). Când un analit este adsorbit pe așa numitele puncte fierbinți, cum sunt spațiile goale sau jonctiunile create între nanoparticulele interconectate, semnalul său Raman crește considerabil, obținându-se un factor de amplificare suficient de mare pentru a putea detecta chiar și o singură moleculă. Transferul de sarcină (CT) dintre moleculă adsorbită și banda de conducție a metalului este al doilea efect principal, care contribuie, la întregul semnal SERS. În timp ce efectul electromagnetic se extinde dincolo de o anumită distanță față de suprafața metalului, transferul de sarcină este operational doar dacă moleculele de analit sunt adsorbite direct pe suprafața metalică.

1.2.4. Activitatea antibacteriană a nanoparticulelor de argint

Efectul antibacterian al nanoparticulelor de argint față de bacteriile Gram-negativă și Gram-positivă a fost exploatat într-un număr mare de studii. Totuși, mecanismul lor de toxicitate este doar parțial explicat. Numeroase studii sugerează faptul că nanoparticulele interacționează cu membrana celulară și că unele dintre acestea penetrează peretele celular bacterian, cauzând astfel moartea bacteriilor [7]. Unele ipoteze susțin faptul că mecanismul antimicrobian al nanoparticulelor de argint este mediat de formarea radicalilor liberi, care produc distrugerea membranei bacteriene și respective, moartea celulară [8]. Un alt mecanism sugerează faptul că activitatea antimicrobiană a nanoparticulelor se datorează ionilor eliberați de acestea [9]. O idee general acceptată este aceea că

efectul antibacterian al nanoparticulelor de argint depinde de diferiti parametri, cum sunt dimensiunea si forma particulelor, precum si stabilitatea acestora in mediul de crestere.

1.3. Biopolimerul chitosan: proprietati si aplicatii biomedicale

Chitosanul ((β -1, 4)-legat de D-glucozamina, N-deacetilat) este un derivat al chitinei, cel mai raspandit polimer natural dupa celuloza si se gaseste in exoscheletul artropodelor sau in peretii celulari ai ciupercilor si drojdiei [10]. Chitosanul se obtine prin deacetilarea partiala a chitinei (minim 50 %), asa cum este reprezentat schematic in Figura 1-1. In consecinta, chitosanul este un polimer natural, biocompatibil, biodegradabil care are proprietatea de a forma filme, prezinta o rezistenta mecanica ridicata si este usor de modificat chimic. Deoarece deacetilarea chitinei este incompleta, chitosanul este un copolimer, compus din glucozamina si N-acetilglucozamina (a se vedea Figura 1-1).

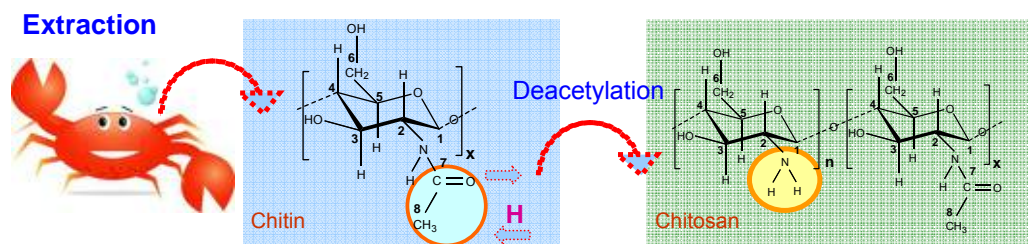


Figura 1-1. Reprezentarea schematica a extractiei si a deacetilarii chitinei.

Datorita proprietatilor sale unice, chitosanul este un material foarte atractiv pentru numeroase aplicatii biologice, printre care eliberarea controlata a medicamentelor, agent antibacterian, agent in vindecarea ranilor, supliment nutritional, agent pentru eliminarea toxinelor, substrat pentru ingineria tesuturilor, membrana semipermeabila, etc.[11].

Capitolul 2

Nanocompozite de Aur-Chitosan: Sinteza si Caracterizare

2.1. Formarea nanoparticulelor de aur in solutia de chitosan

Suspensia coloidală de aur a fost preparată la 50 °C printr-o metodă de sinteză ecologică, în care se utilizează biopolimerul chitosan ca agent reductor și stabilizator [12]. Formarea nanoparticulelor de aur (GNPs) a fost pusă în evidență vizual, prin culoarea roșie specifică soluției coloidale. Culoarea vizibilă este rezultatul interacțiunii rezonante a luminii cu GNPs prin excitarea plasmonilor de suprafață din nanoparticulele metalice. Deoarece spectrul optic al GNPs depinde de dimensiunea și forma acestora, precum și de mediul lor local și de cuplajul electromagnetic, formarea GNPs a fost monitorizată nu doar vizual, ci, mai precis, prin spectroscopia de extincție UV-vis și microscopia electronică de transmisie (TEM).

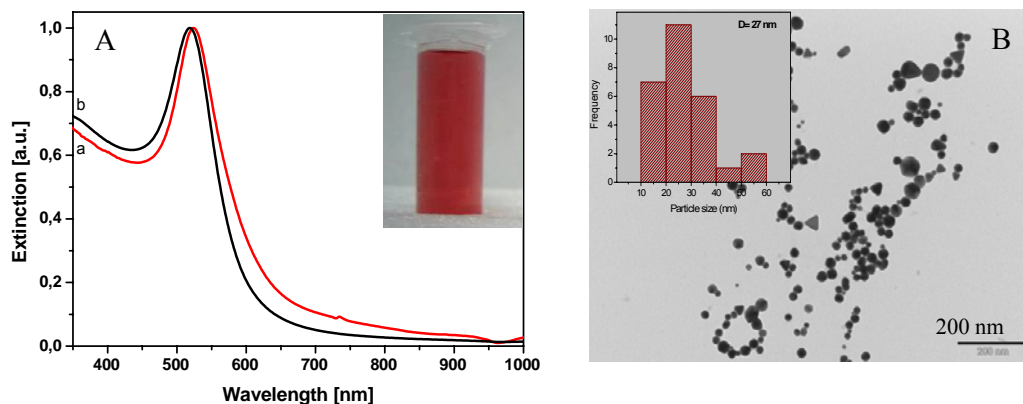


Figura 1-2. (A) Spectrele de extincție UV-vis normalizate ale nanoparticulelor de aur sintetizate astfel: (a) folosind chitosanul ca agent reductor și stabilizator and (b) folosind citratul de sodiu ca agent reductor și stabilizator. În interior este prezentată o imagine fotografică a soluției coloidale de nanoparticule de aur sintetizate în prezența chitosanului. (B) O imagine TEM reprezentativă a GNPs sintetizate în prezența chitosanului. În interior este prezentată histograma pentru distribuția de dimensiuni a nanoparticulelor.

Figura 1A-2 ilustrează o imagine fotografică a soluției coloidale împreună cu spectrul de extincție UV-vis al acestei soluții, măsurat la sfârșitul procesului de sinteză. Spectrul prezintă o bandă plasmonică localizată la 525 nm. Pentru comparație, în Figura 1Ab-2 este introdus spectrul de extincție UV-vis al nanoparticulelor sferice de aur cu diametrul de 18 nm sintetizate prin metoda Turkevich-Frens [13].

Prin măsurătorile TEM au fost obținute informații mai precise cu privire la forma și dimensiunea nanoparticulelor sintetizate. Figura 1B-2 ilustrează o imagine TEM reprezentativă a nanoparticulelor de aur astfel sintetizate. Imaginile TEM pun în evidență faptul că soluția coloidală preparată constă, în principal, în nanoparticule sferice de aur dispersate în soluție, având un diametru

mediu de 27 nm (a se vedea histograma in [Figura 1B-2](#) din interior). Aceste rezultate au fost obtinute prin analiza mai multor imagini TEM.

2.2. Studiul formarii nanoparticulelor de aur in solutia de chitosan la diferite temperaturi de reactie

Efectul modificarii temperaturii de sinteza, in timp ce raportul dintre reactanti este mentinut constant, e semnificativ si acest lucru este evidentiat clar in [Figura 2-2](#), in care am introdus pentru comparatie si imaginea TEM a probei preparate la 50 °C.

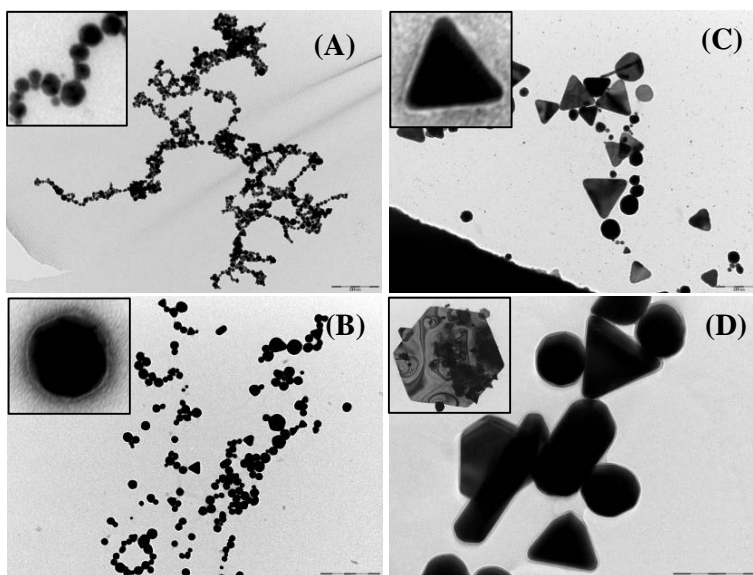


Figure 2-2. Imaginile TEM ale nanoparticulelor de aur preparate. (A) 100 °C. In interior este prezentata o imagine marita a lantului de nanoparticule de aur. (B) 50 °C. In interior este prezentata imaginea unei nanosfere individuale de aur inconjurata de un strat de chitosan. (C) 10 °C. Imaginea din interior pune in evidenta stratul de chitosan prezent pe laturile unui nanocrystal individual de aur. (D) 4 °C. In interior este prezentata imaginea marita a unui crystal individual. In figurile (B) si (C) stratul de chitosan este evidentiat prin colorarea in contrast.

De exemplu, in cazul probei preparate la 100 °C, [Figura 2A-2](#) pune in evidenta formarea nanoparticulelor sferice de aur cu un diametru mediu de 18 ± 2 nm si asamblarea acestora in lanturi ramificate de zeci pana la sute de particule. La temperatura medie, [Figura 2B-2](#) ilustreaza formarea unor nanoparticule sferice de aur de dimensiuni mai mari, avand un diametru mediu de 27 ± 5 nm. Dimpotriva, la temperatura joasa, [Imaginea 2C-2](#) evidentiaza formarea de nanoparticule anizotrope de dimensiuni mari cu forma de triunghiuri, triunghiuri tesite si hexagoane, cu latura cuprinsa intre 40 nm si 200 nm, impreuna cu un numar mic de nanoparticule sferice. Mai mult, micsorarea temperaturii de la 10 °C la 4 °C determina atat cresterea numarului de nanoparticule anizotrope, cat si a dimensiunii laturii acestora, la aproximativ 300 nm in cazul particulelor triunghiulare si in jur de 174 nm in cazul celor hexagonale ([Figura 2D-2](#)).

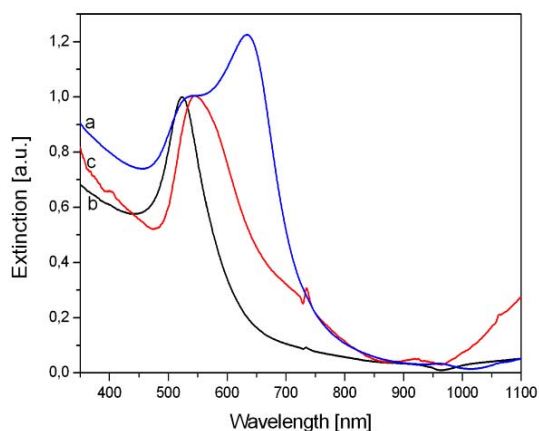


Figura 3-2. Spectrele de extincție UV-vis ale GNPs sintetizate în soluție de chitosan la trei temperaturi reprezentative. (a) temperatura ridicată (100 °C). (b) temperatura medie (50 °C). (c) temperatura joasă (10 °C). Pentru a putea fi comparate mai ușor spectrele au fost normalizate la maximum de extincție al GNPs individuale.

Efectul temperaturii de reacție asupra dimensiunii, formei și morfologiei nanoparticulelor de aur sintetizate a fost studiat, de asemenea, și prin spectroscopia de extincție UV-vis. Proba sintetizată la temperatura medie prezintă un spectru caracteristic nanoparticulelor sferice de aur (Figura 3b-2), în timp ce proba sintetizată la temperatura joasă (10 °C) prezintă un spectru semnificativ diferit (Figura 3c-2). Astfel, prima bandă plasmonică este deplasată la 544 nm și, în plus față de această bandă, se observă apariția unui nou maxim de extincție în domeniul infraroșu apropiat (NIR), maxim care depășește domeniul spectral de măsurare al spectrometrului nostru (Figura 3c-2). Această a doua bandă corespunde rezonanței plasmonice caracteristice nanoparticulelor anizotrope de aur, de formă triunghiulară, așa cum pot fi observate în imaginea TEM (Figura 2C-2) [14]. Pe lângă banda plasmonică atribuită nanoparticulelor sferice individuale, spectrul soluției coloidale preparate la 100 °C prezintă o a doua rezonanță plasmonică localizată la 634 nm care depășește primul maxim în ceea ce privește intensitatea (Figura 3a-2). Pe baza simularilor teoretice (FDTD) am presupus că banda plasmonică localizată la 528 nm în spectrul experimental al probei preparate la 100 °C este determinată de suprapunerea rezonanțelor plasmonice ale nanoparticulelor sferice individuale și a benzii plasmonice transversale caracteristice nanoparticulelor de aur interconectate. A doua bandă, deplasată spre lungimi de undă mai mari, localizată la 634 nm, este determinată de răspunsul plasmonic al nanoparticulelor interconectate, așa cum pot fi observate în Figura 2A-2.

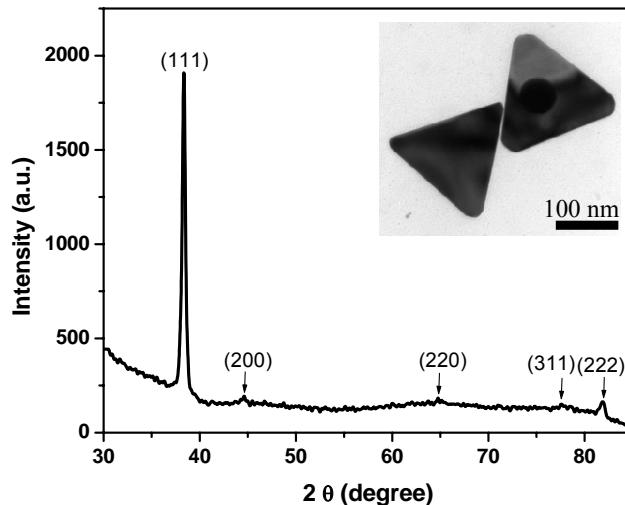


Figure 4-2. Spectrul XRD al unui film reprezentativ de compozite de aur-chitosan sintetizate la 10°C . In interior este ilustrata imaginea TEM marita a probei preparate la 10°C .

Spectrul de difracție de raze X (XRD) în [Figura 4-2](#) evidențiază în mod clar structura cristalină a nanoparticulelor de aur sintetizate la temperatura joasă. Maximele din acest spectru de difracție corespund planelor $\{111\}$, $\{200\}$, $\{220\}$, $\{311\}$ și $\{222\}$ caracteristice unui cristal de aur cu fete centrate cubic (fcc) (JCPDS-fisierul nr.040784). Valoarea mare a intensității maximului de difracție localizat la $2\theta = 38.2^{\circ}$, atribuit fetelor $\{111\}$ ale unui cristal de aur fcc, diferită față de intensitățile relative caracteristice structurii cristaline a aurului la nivel macroscopic, scoate în evidență faptul că procesul de creștere la temperatura joasă este direcționat specific și că planul dominant al nanocristalelor obținute este $\{111\}$.

2.3. Studiul stabilității nanocompozitelor de aur-chitosan preparate

Interacțiunile dintre aur și chitosan au fost investigate prin măsurătorile în infraroșu cu transformata Fourier. Rezultatele pun în evidență implicarea grupărilor hidroxil și amino primare ale chitosanului în procesul de reducere și stabilizare a nanoparticulelor de aur. Nanoparticulele obținute prezintă o stabilitate ridicată în diferite condiții de mediu, și anume pe durata depozitării, la concentrații ridicate de sare, la modificarea pH-ului.

Capitolul 3

Sinteza Nanoparticulelor Anizotrope de Argint Mediata de Chitosan

3.1. Cresterea nanoparticulelor triunghiulare

3.1.1. Primul pas: Prepararea solutiei de germeni de crestere

Pentru a sintetiza nanoparticule de argint de dimensiune si forma controlabila, am dezvoltat o metoda de sinteza mediata de germeni de crestere [15]. Pentru aceasta a fost preparata o solutie stoc de particule de argint, numite “germeni de crestere”, prin reducerea azotatului de argint cu borohidrua de sodiu la temperatura ghetii.

3.1.2. Al doilea pas: Cresterea nanoparticulelor triunghiulare de argint

In al doilea pas a fost preparat un amestec de solutie de germeni de crestere, citrat de sodiu, acid ascorbic si chitosan, care a fost apoi incalzit si mentinut la temperatura de 35 ± 2 °C. Peste acest amestec s-au adaugat picaturi de azotat de argint sub continua agitare magnetica. Reactia s-a finalizat intr-un interval de 5 minute, timp in care culoarea solutiei s-a modificat de la incolor la galben, apoi portocaliu, roz, mov, albastru, turcoaz si, in final, verde inchis.

3.1.3. Analiza morfologica prin TEM

Caracterizarea detaliata a morfologiei nanoparticulelor de argint a fost obtinuta prin masuratorile de microscopie electronica de transmisie (TEM).

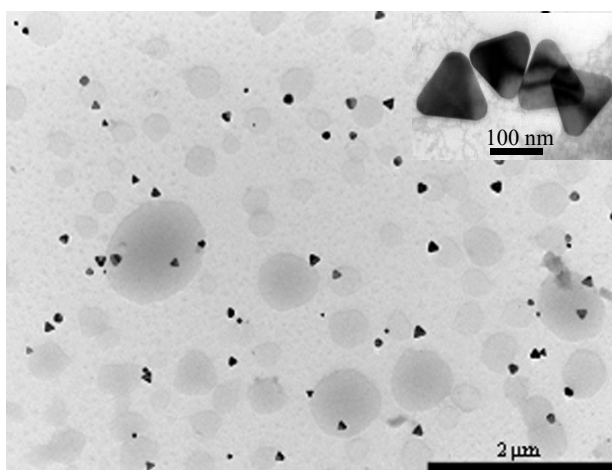


Figura 1-3. O imagine TEM reprezentativa a nanoparticulelor triunghiulare de argint sintetizate. In interior este prezentata o imagine magnificata a nanotriunghiurilor de argint.

Figura 1-3 ilustreaza o imagine TEM reprezentativa a nanostructurilor de argint sintetizate care pune in evidenta, in mod clar, formarea nanoparticulelor individuale de argint, in special cu forma de triunghiuri sau triunghiuri tesite, avand dimensiunea laturii cuprinsa intre 115 nm si 123 nm. Aceste valori au fost obtinute prin analiza mai multor imagini TEM.

3.1.4. Rezonantele plasmonice de suprafata ale nanotriunghiurilor de argint

Proprietatile optice ale nanoparticulelor triunghiulare de argint sintetizate au fost investigate prin masuratorile spectroscopice de extinctie UV-VIS-NIR la sfarsitul procesului de sinteza. Spectrul de extinctie al suspensiei coloidale (Figura 2a-3) prezinta toate cele patru maxime corespunzatoare modurilor de excitatie plasmonica a nanoparticulelor triunghiulare [16].

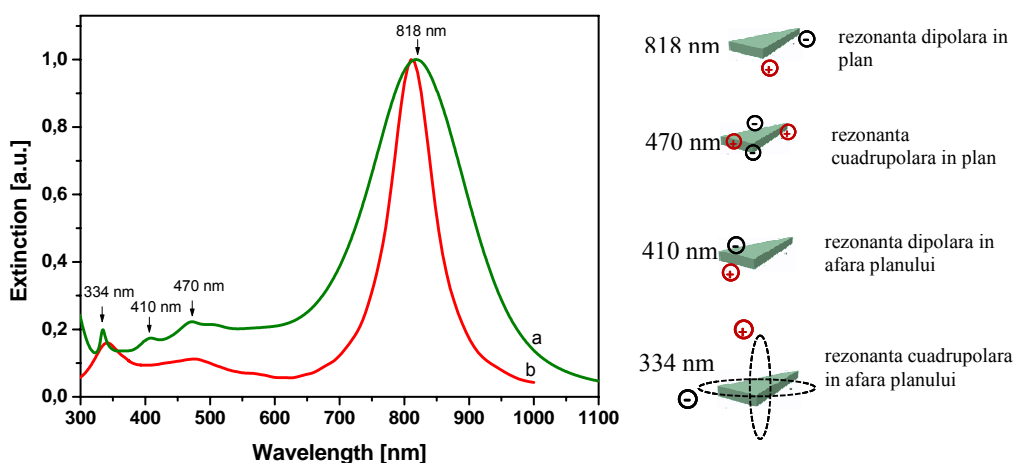


Figura 2-3. Compararea spectrelor de extinctie (a) masurate si (b) calculate prin FDTD, corespunzatoare nanoparticulelor triunghiulare de argint sintetizate.

Cele doua benzi dominante si anume, banda intensa si larga situata la 818 nm si banda ingusta localizata la aproximativ 334 nm, sunt atribuite rezonantei plasmonice dipolare in plan si, respectiv, rezonantei plasmonice cuadrupolare in afara planului. Banda de intensitate scazuta, localizata la 410 nm este caracteristica rezonantei plasmonice dipolare in afara planului, iar banda localizata la 470 nm este specifica rezonantei plasmonice cuadrupolare in plan. Spectrul de extinctie calculat prin metoda numerica a diferentelor finite in domeniul temporal (FDTD) in Figura 2b-3 este in concordanta cu spectrul optic experimental in Figura 2a-3 si confirma raspunsul spectral al nanoparticulelor triunghiulare de argint izolate in domeniul UV-Vis-NIR.

3.2. Ajustarea dimensiunii si morfologiei nanoparticulelor de argint

3.2.1. Efectul citratului de sodiu asupra dimensiunii si morfologiei nanoparticulelor

Pentru intelegerea mecanismul de formare a nanoparticulelor de argint, a fost investigat efectul relativ al diferitilor componentii de reactie, incluzand concentratia de citrat de sodiu, chitosan si acid ascorbic. Efectul modificarii concentratiei de citrat de sodiu, in timp ce ceilalti parametri experimentali sunt mentinuti constanti, este semnificativ si o prima ilustrare este evidentiata in mod clar in [Figura 3-3](#).

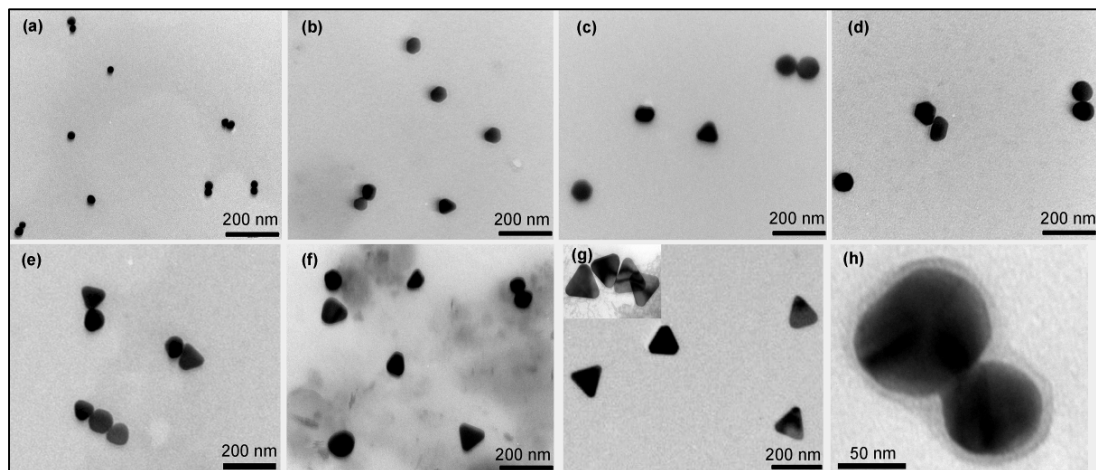


Figura 3-3. Imaginile TEM ale coloizilor de argint preparati prin cresterea concentratiei de citrat de sodiu (de la (a) la (g)). (h) O imagine magnificata a nanoparticulelor de argint invelite intr-un strat de chitosan.

Imaginile TEM in [Figura 3-3](#) pun in evidenta evolutia nanoparticulelor, de la formele sferice initiale la cele triunghiulare, in functie de concentratia de citrat de sodiu. Concentratia ridicata de citrat de sodiu determina formarea, in principal, a nanoparticulelor anizotrope de dimensiuni mari, cu forma de triunghiuri si triunhiri tesite, precum si a unui numar mic de nanoparticule sferice. Nu se pot obtine triunghiuri de argint folosind o concentratie scazuta de citrat de sodiu, particulele sferice fiind produsul principal chiar si dupa prelungirea duratei de sinteza ([Figura 3a-3](#)). Imaginea magnificata a nanoparticulelor de argint, in [Figura 3h-3](#), pune in evidenta, prin colorare in contrast, prezenta unui strat subtire de chitosan in jurul particulelor.

Efectul diferitilor parametrilor de reactie asupra dimensiunii, formei si morfologiei nanoparticulelor sintetizate a fost investigat, de asemenea, si prin spectroscopia de extinctie UV-VIS-NIR.

[Figura 4-3](#) ilustreaza spectrele de extinctie ale celor sapte probe sintetizate, masurate la sfarsitul procesului de sinteza, impreuna cu imaginile lor fotografice. Se remarca faptul ca, pe

masura ce pozitia benzilor plasmonice de suprafata localizate (LSPR) se deplaseaza spre lungimi de unda mai mari, de la 414 nm la 818 nm, probele isi modifica progresiv culoarea.

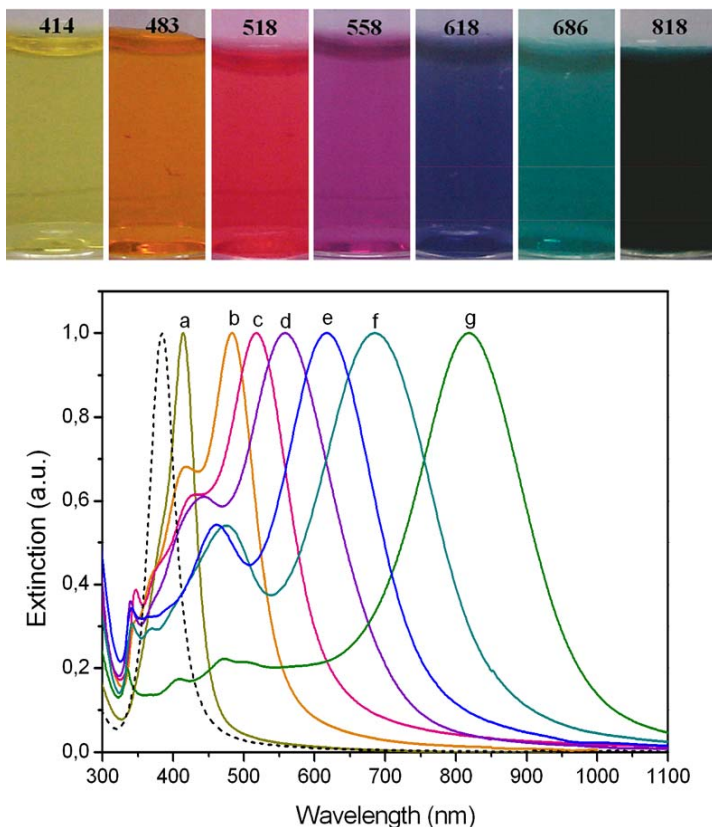


Figura 4-3. Spectrele de extinctie UV-VIS-NIR normalizate si imaginile fotografice corespunzatoare ale colorilor de argint sintetizati prin cresterea concentratiei de citrat de sodiu (de la (a) la (g)). Numerele de pe flacoane corespund pozitiei spectrale ale rezonantei plasmonice dipolare in plan. Pentru comparatie, am inserat spectrul de extinctie al solutiei de germeni de crestere (cu linie punctata).

Solutia coloidala galbena prezinta un singur maxim de extinctie, usor asimetric, localizat la 414 nm, caracteristic rezonantei plasmonice a nanoparticulelor sferice de argint [17]. Mentionam faptul ca aceasta solutie este obtinuta cand procesul de crestere este condus in prezenta celei mai scazute concentratii de citrat de sodiu. Dimpotriva, solutia coloidala verde inchis prezinta patru maxime de extinctie iar procesul de crestere are loc in prezenta celei mai ridicate concentratii de citrat de sodiu. Spectrele celorlalte probe, preparate cu valori intermediare ale concentratiei de citrat de sodiu prezinta aceleasi caracteristici. In ceea ce priveste pozitiile spectrale discutate mai sus, benzile corespunzatoare sunt deplasate, si anume, rezonanta plasmonica dipolara in plan se deplaseaza spre lungimi de unda mai mici datorita scaderii dimensiunii laturilor triunghiurilor, iar rezonanta plasmonica cuadrupolara in afara planului se deplaseaza spre lungimi de unda mai mari datorita cresterii grosimei triunghiurilor. Spectrul optic de extinctie masurat in domeniul 410 -470 nm este usor mai intens decat ar fi de asteptat pentru probele care contin doar forme triunghiulare.

Acest rezultat poate fi explicat prin suprapunerea benzilor caracteristice triunghiurilor peste rezonanțele plasmonice ale nanoparticulelor sferice de argint, care se formează în detrimentul triunghiurilor pentru o concentrație scăzută de citrat de sodiu.

3.2.2. Efectul concentrației de chitosan asupra dimensiunii și morfologiei nanoparticulelor

Pentru a înțelege rolul chitosanului s-au efectuat două experimente comparative, și anume: (a) în absența chitosanului în soluție și (b) în prezența chitosanului în soluție.

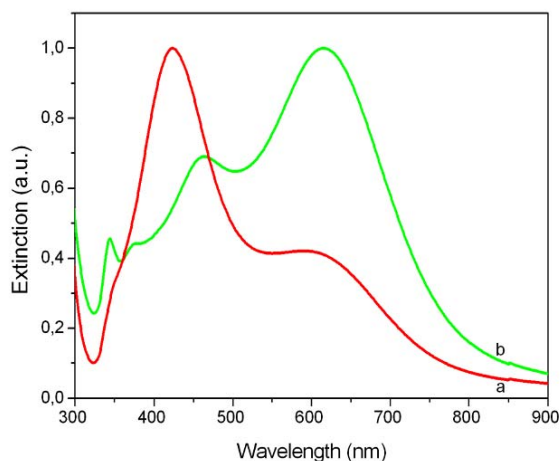


Fig. 5-3. Spectrele UV-VIS-NIR normalizate ale probelor obținute: (a) fără chitosan. (b) cu o concentrație a chitosanului de 2 mg/mL .

Figura 5-3 ilustrează spectrele de extincție ale celor două probe. Din analiza acestora se constată că, în primul caz spectrul de extincție (Figura 5a-3) prezintă caracteristici specifice nanoparticulelor sferice (banda dominantă la 423 nm), în timp ce în al doilea caz spectrul optic (Figure 5b-3) pune în evidență formarea particulelor triunghiulare confirmată de prezența modului plasmonic cuadrupolar la 340 nm și a benzii dipolare la 618 nm. Totuși, nanotriunghiurile pure pot fi obținute doar în prezența chitosanului și a unei concentrații ridicate de citrat de sodiu, ceea ce indică faptul că cei doi compuși acționează sinergic în procesul de creștere anizotropă.

3.3. Stabilitatea nanocompozitelor de chitosan-argint sintetizate

3.3.1. Caracterizarea FT-IR

Pentru a analiza structura nanocompozitelor și a identifica grupurile moleculare care interacționează cu nanoparticulele de argint au fost efectuate măsurători de infraroșu cu transformata Fourier (FT-IR). Figura 6-3 prezintă două spectre reprezentative evidențiind

principalele spectre vibrationale ale chitosanului in acord cu datele spectroscopice raportate in literatura de specialitate [18].

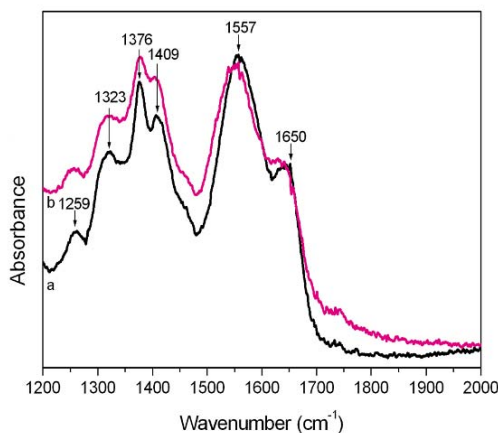


Figure 6-3. Spectrele FT-IR spectra ale: (a) unui film pur de chitosan. (b) unui film de nanocompozite de chitosan-argint.

Majoritatea benzilor caracteristice chitosanului, si anume benzile de la 1650 cm^{-1} (amida I caracteristica vibratiei de intindere C=O a gruparii acetil), 1409 cm^{-1} (vibratia de indoire a gruparii OH), 1376 cm^{-1} (modul vibrational de deformare simetrica a CH_3), 1323 cm^{-1} (vibratia de balansare a CH_2 in alcoolul primar) si 1259 cm^{-1} (vibratia amidei III datorata combinarii modului vibrational de deformare a N-H cu cel de intindere a C-N), nu sunt sensibile la prezenta suprafetei metalice. Totusi, banda cea mai intensa, localizata la 1557 cm^{-1} in filmul pur de chitosan si atribuita gruparii amino se deplaseaza spre numere de unda mai mici (1548 cm^{-1}) in prezenta nanoparticulelor de argint. Acest rezultat evidentiaza implicarea gruparilor amino in interactiunea cu suprafata metalica, aceste grupari actionand ca puncte de legatura pentru stabilizarea nanoparticulelor de argint.

3.3.2. Studiul stabilitatii nanoparticulelor de chitosan-argint in diferite conditii de mediu

Performanta nanoparticulelor de argint in diferite aplicatii nu depinde doar de prepararea controlata in ceea ce priveste dimensiunea si forma acestora, ci si de stabilitatea particulelor in diferite conditii de mediu, si anume pe durata stocarii, la concentratii de sare, la modificarea pH-ului, in fluidele biologice, etc.

In general, stabilitatea sistemelor coloidale se refera la tendinta acestora de a agrega sau de a sedimenta sub actiunea gravitatiei. Stabilitatea nanoparticulelor anizotrope in solutie ar trebui tratata, de asemenea, si in ceea ce priveste evolutia dimensiunii si a formei lor in diferite conditii fizice si chimice, incluzand durata depozitarii, modificari de pH, medii biologice, etc. In lucrarea de fata am investigat stabilitatea nanocompozitelor de chitosan-argint preparate in ceea ce priveste agregarea acestora si conservarea dimensiunii si a formei in diferite conditii de mediu. Rezultatele au aratat ca

lantul biopolimeric adsorbit pe suprafata acestora confera nanoparticulelor o protectie electrosterica, mentinandu-le segregate in soute in diferite conditii de mediu, si anume pe durata stocarii, la concentratii de sare, la diferite valori ale pH-ului si in mediul celular.

Capitolul 4

Nanoparticulele Anizotrope de Argint Invelite in Chitosan ca Senzori Plasmonici Duali LSPR-SERS

4.1. Nanoparticulele anizotrope de argint invelite in chitosan ca senzori plasmonici duali LSPR-SERS in solutie

4.1.1. Sensibilitatea LSPR de indice de refractie (RI) efectiv (bulk)

Pentru modificarea indicelui de refractie efectiv (bulk) al mediului din jurul nanoparticulelor de la 1.333 (doar apa) la 1.473 (doar glicerina) au fost preparate mai multe amestecuri de apa si glicerina.

Nanoparticulele de argint invelite in chitosan au fost separate de solutia originala prin centrifugare si au fost re-dispersate in amestecurile de apa si glicerina. Figura 1A-4 prezinta spectrele de extinctie UV-VIS-NIR normalizate ale celor opt probe suspendate in aceste amestecuri. Similaritatea spectrelor de extinctie, masurate inainte si dupa transferul in amestecurile de apa si glicerina, confirma stabilitatea ridicata a nanoparticulelor de argint. Este important de subliniat faptul ca prezenta chitosanului pe suprafata particulelor nu impiedica schimbul cu mediul din jurul acestora, mentinandu-se astfel abilitatea nanoparticulelor de a fi sensibile la modificarile valorilor indicelui de refractie.

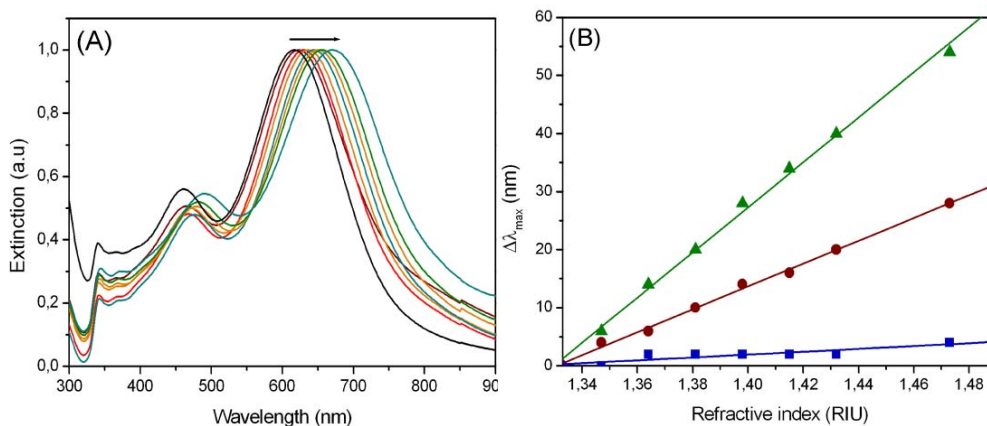


Figura 1-4. (A) Spectrele de extinctie UV-VIS-NIR normalizate ale coloizilor de argint suspendati in solutii de glicerina de diferiti indici de refractie, de la stanga la dreapta: 1.333, 1.347, 1.364, 1.381, 1.398, 1.415, 1.432, and 1.473. Normalizarea spectrelor a fost facuta fata de banda plasmonica dipolara in plan. (B) Rezentarea grafica ilustrand dependenta liniara a pozitiei benzilor plasmonice in functie de indicii de refractie. (\blacktriangle) banda plasmonica dipolara in plan, (\bullet) combinatia dintre banda cuadrupolara in plan si modul dipolar in afara planului, si (\blacksquare) banda cuadrupolara in afara planului.

Sensibilitatea rezonanțelor plasmonice de suprafață localizate (LSPR) ale nanoparticulelor de argint învelite în chitosan față de indicele de refracție efectiv al soluțiilor a fost evaluată prin reprezentarea grafică a deplasării poziției lungimii de undă a benzilor plasmonice ($\Delta\lambda_{\max}$) în funcție de indicele de refracție (Figura 1B-4). S-a observat o deplasare liniară a rezonanțelor plasmonice înspre lungimi de undă mai mari odată ce creșterea indicelui de refracție al solventului. Din analiza de regresie liniară s-a obținut o valoare a sensibilității bulk de indice de refracție de 387 nm RIU^{-1} pentru banda plasmonică dipolară, 196 nm RIU^{-1} pentru combinația dintre banda cuadrupolară în plan și modul dipolar în afara planului și, respectiv, de 25 nm RIU^{-1} pentru banda cuadrupolară în afara planului.

4.1.2. Sensibilitatea LSPR de suprafață

Metoda LSPR de detecție a analitilor biomoleculari a fost demonstrată anterior pentru un ansamblu de nanoparticule imobilizate pe un substrat transparent și, ulterior, a fost extinsă până la limita unei singure nanoparticule [19]. În cazul de față am utilizat ca potențial chemosenzor LSPR nanoparticulele anizotrope de argint învelite în nanostraturi de chitosan, dispersate în soluție, iar ca moleculă probă, p-ATP. Spre deosebire de alte molecule, tiolii interacționează foarte puternic cu suprafața de argint deoarece pot forma legături covalente cu atomii de pe suprafața de argint prin legături π cu atomii de sulf. Figura 2A-4, partea a, prezintă spectrul de extincție al soluției coloidale de nanoparticule de argint amestecate cu p-ATP (concentrație finală de p-ATP $9.9 \times 10^{-6} \text{ M}$), măsurat după câteva ore de la adăugarea analitului pentru a se obține absorbția maximă a moleculelor de p-ATP pe suprafața particulelor. Pentru comparație, în Figura 2A-4, partea b, este ilustrat spectrul original al soluției coloidale (fără p-ATP). În comparație cu spectrul original al nanocompozitelor de argint-chitosan, în prezența moleculelor de p-ATP se remarcă o scădere a intensității benzii plasmonice dipolare în plan și o deplasare a acesteia de 10 nm înspre lungimi de undă mai mari. În plus, maximum de absorbție al celorlalte benzi plasmonice se deplasează, de asemenea spre lungimi de undă mai mari, dar pe un domeniu spectral mai mic (6 nm în cazul rezonanței plasmonice dipolare în afara planului și 2 nm în cazul rezonanței plasmonice cuadrupolare în afara planului). Acest rezultat este în concordanță cu cele anterioare care demonstrează o sensibilitate mai mare a rezonanței plasmonice dipolare în plan față de mediul chimic din jurul acestor nanocompozite.

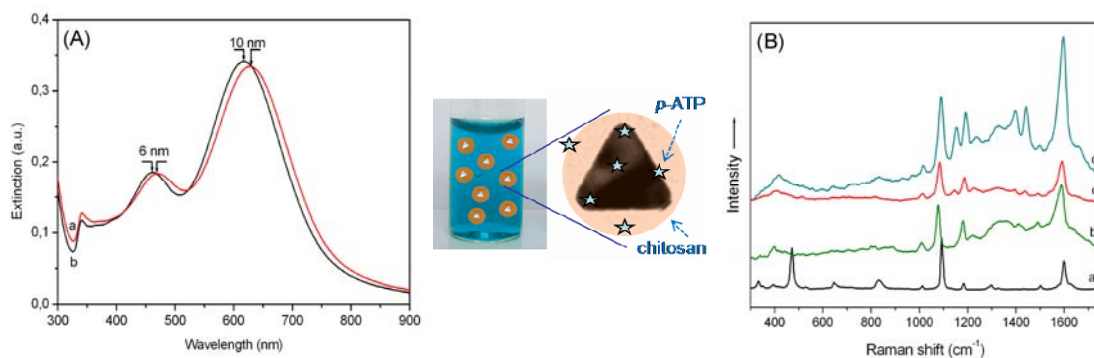


Figura 2-4. (A) Spectrele de extincție UV-VIS-NIR ale coloidului de argint: (a) după adăugarea soluției de *p*-ATP, (b) înainte de adăugarea soluției de *p*-ATP (B) Spectrul Raman al *p*-ATP (a) și spectrele SERS ale *p*-ATP măsurate folosind ca linie excitatoare un laser la 785 nm (b), 633 nm (c), 532 nm (d). Pentru măsurătorile SERS concentrația moleculelor de *p*-ATP în soluție este de 9.9×10^{-6} M.

Prezența moleculelor de analit pe suprafața de argint determină o modificare a sarcinii electrice pe suprafața nanoparticulelor precum și variația indicelui de refracție al mediului din jurul particulelor ceea ce, în consecință, induce o scădere a intensității benzilor de extincție și, respectiv, deplasarea acestora înspre lungimi de undă mai mari. Aceste observații pun în evidență un rezultat relevant pentru investigațiile în mediile biologice, și anume faptul că biopolimerul chitosan are rolul unui înveliș protector excelent care împiedică agregarea nanoparticulelor, dar, în același timp, permite difuzia moleculelor de analit prin nanoporozitățile sale interne și atașarea acestora de suprafața metalică.

4.1.3. Sensibilitatea SERS

Moleculele probă adsorbite pe suprafața de argint au fost identificate prin măsurătorile de spectroscopie Raman amplificată de suprafață (SERS), care oferă atât specificitate, cât și o sensibilitate mai ridicată comparativ cu măsurătorile LSPR. Așa cum se poate observa în [Figura 1B-4](#), au fost înregistrate spectre SERS de înaltă calitate, folosind ca surse de excitație trei linii laser, două în domeniul vizibil la 532 și 632.8 nm, și una în infraroșu apropiat (NIR) la 785 nm. Din analiza amplificării benzilor vibraționale specifice s-au identificat în mod clar prezența și orientarea moleculelor de *p*-ATP pe suprafața de argint. Conform datelor din literatură, cele două benzi pronunțate de la 1093 și 1596 cm^{-1} , împreună cu alte două benzi de intensitate medie, localizate la 465 și 1171 cm^{-1} , sunt atribuite modurilor vibraționale a_1 ale moleculelor de *p*-ATP, și anume vibrației de întindere C-S, vibrației de îndoire C-C-C și vibrației de îndoire C-H [20]. Amplificarea puternică a vibrației de întindere C-S și absența modului de întindere S-H de la 2558 cm^{-1} sugerează ruperea legăturii S-H și atașarea moleculelor de *p*-ATP pe suprafața argintului prin intermediul atomilor de sulf.

Este important de remarcat faptul ca nu apare semnal SERS caracteristic biopolimerului chitosan. Un comportament similar a fost raportat anterior in literatura in cazul altor polimeri utilizati atat pentru stabilizarea nanoparticulelor metalice folosite ca reporteri SERS, cat si pentru fabricarea substraturilor SERS biocompatibile [21].

Ca o dovada a conceptului pentru aplicatii in biodetectie si a functionalitatii duble a platformei plasmonice am demonstrat, prin masuratorile combinate LSPR-SERS, detectia unei molecule biologice relevante, adenina. Am determinat valoarea de 12×10^{-6} M ca fiind concentratia de adenina cea mai mica detectabila folosind nanoparticulele coloidale anizotrope de argint.

4.2. Nanoparticulele anizotrope de argint invelite in chitosan pentru detectia SERS la nivel unimolecular

In continuare suntem interesati sa obtinem o limita de detectie SERS cat mai joasa, pana la nivelul unei singure molecule. Pentru realizarea acestui obiectiv este foarte importanta producerea punctelor fierbinti (*hot-spots*), cum sunt spatiile goale si jonctiunile create intre nanoparticulele interconectate. Am demonstrat anterior ca nanoparticulele nu pot fi agregate nici in prezenta unui agent de destabilizare. In consecinta, am putea produce *hot-spots* intre nanoparticulele interconectate prin asamblarea a 2-3 nanoparticule anizotrope pe un substrat solid, in urma evaporarii solventului. In acest sens a fost folosita o metoda simpla, prin picurare, pentru a depune filme subtiri care constau in nanoparticule de chitosan-argint amestecate anterior cu molecule de analit [22].

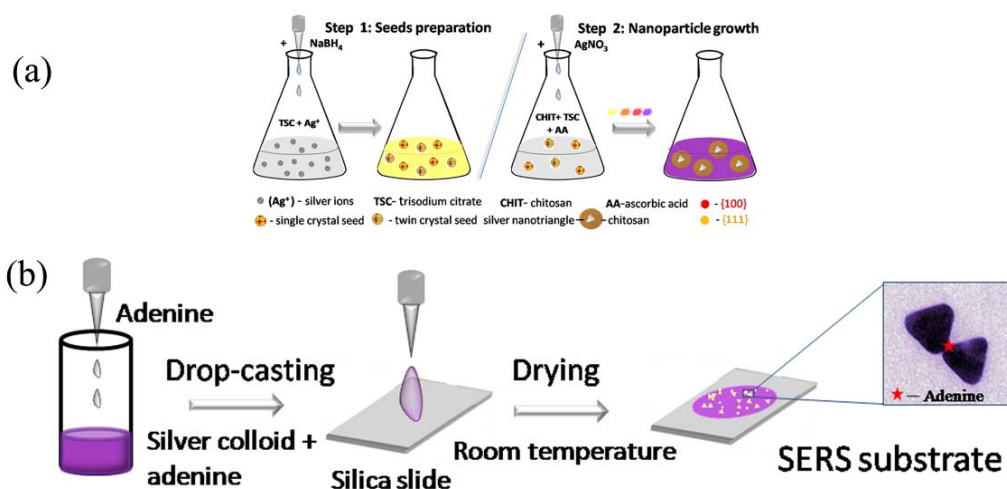


Figura 3-4. Ilustrarea schematica a: (a) procedurii tipice, in doi pasi, de preparare a nanoparticulelor anizotrope de argint invelite in chitosan si (b) prepararii filmului solid.

Prin aceasta procedura se formeaza ansambluri mici de nanoparticule anizotrope de argint cu spatii inguste intre ele, care pot produce o amplificarea uriasa a semnalului Raman al moleculelor localizate in aceste regiuni. [Figura 6-4](#) prezinta schematic atat prepararea nanoparticulelor anizotrope de argint, cat si a substraturilor SERS.

4.2.1. Caracterizarea morfologica si optica a substratelor SERS

Caracterizarea detaliata a morfologiei filmelor a fost obtinuta prin masuratorile de microscopie de forta atomica (AFM) si microscopie electronica de baleiaj (SEM). Imaginile AFM si SEM, in [Figura 4-4](#) pun in evidenta atat prezenta nanoparticulelor izolate de argint, cat si a ansamblurilor mici formate pe suprafata solida.

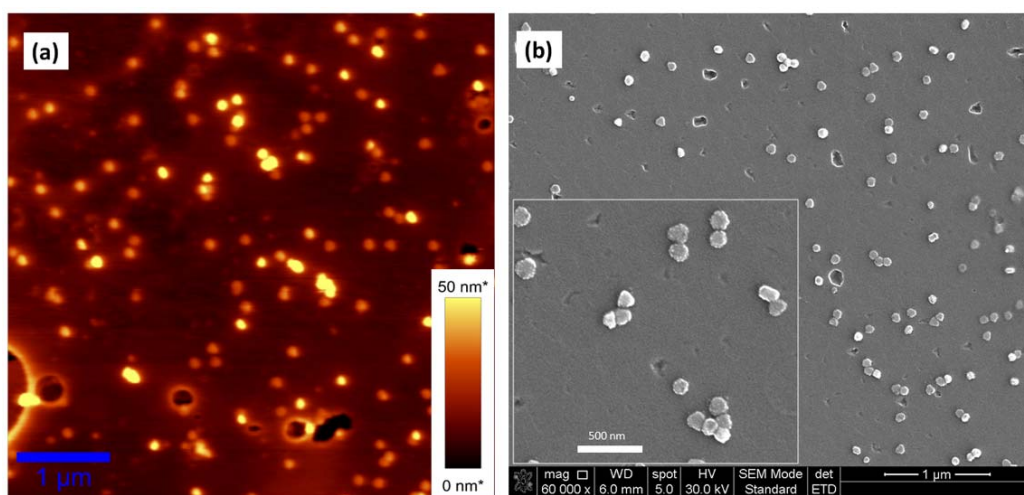


Figura 4-4. (a) O imagine AFM reprezentativa a unui film activ SERS. Scala este de 1 μm . (b) O imagine SEM reprezentativa a unui film activ SERS. In interior este prezentata o imagine magnificata a ansamblurilor mici formate pe substratul solid.

Proprietatile optice ale filmelor astfel preparate sunt investigate prin masuratorile UV-VIS-NIR. [Figura 8-4](#) ilustreaza spectrele de extinctie UV-VIS-NIR ale solutiei coloidale si substratului SERS. In comparatie cu spectrul nanocompozitelor coloidale de argint-chitosan ([Figura 8b-4](#)), benzile plasmonice ale filmului solid se deplaseaza cu aproximativ 7 nm inspre lungimi de unda mai mari, sunt usor largite si intensitatea acestora scade considerabil. Deplasarea si largirea benzilor poate fi determinata de formarea dimerilor, trimerilor si a ansamblurilor mici pe suprafata de quart, asa cum se observa in imaginile SEM ([Figure 7b-4](#)).

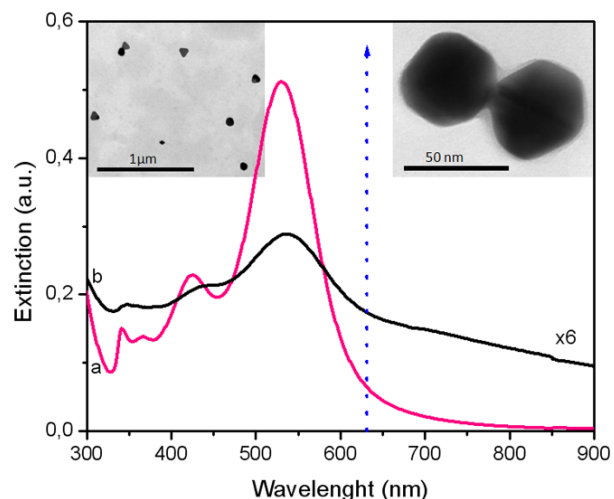


Figure 5-4. Spectrele de extincție UV-VIS-NIR ale (a) soluției coloidale de nanoparticule de argint în mediul de creștere și (b) filmului preparat cu o concentrație de adenina de 12×10^{-12} M. Sageata indică poziția liniei laser excitatoare. În interiorul din stanga este ilustrată o imagine TEM reprezentativă a nanoparticulelor de argint preparate. În interiorul din dreapta este ilustrat un dimer de nanoparticule anizotrope de argint înglobat în matricea polimerică.

4.2.2. Detectia SERS a ansamblului de molecule de adenina

Pentru a evalua activitatea SERS a substraturilor preparate măsurătorile au fost efectuate mai întâi pe proba cu cea mai mare concentrație de adenina (12×10^{-6} M concentrație finală).

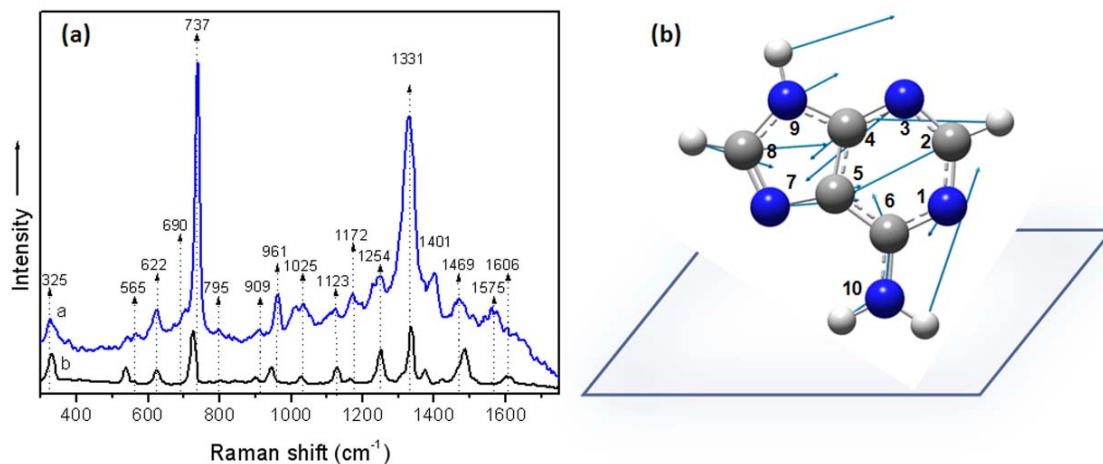


Figura 6-4. (a) Spectrul SERS al adeninei pe film solid (a). Spectrul Raman al adeninei (b). Concentrația moleculelor de adenina pentru măsurătorile SERS este de 12×10^{-6} M. (b) Reprezentarea schematică a orientării moleculei de adenine față de suprafața de argint.

Figura 6a-4 partea (a) prezinta spectrul SERS al adeninei inregistrat folosindu-se ca linie excitatoare un laser cu lungimea de unda de 632.8 nm. Pentru comparatie, in Figura 6a-4 partea (b) este ilustrat spectrul Raman al adeninei. Spectrul prezentat in Figura 6a (a)-4 identifica in mod clar prezenta moleculelor de analit pe suprafata de argint si permite elucidarea orientarii acestora prin analiza amplificarii benzilor vibrationale specifice. Benzile proeminente de la 737 si 1331 cm^{-1} prezente in spectrul SERS al adeninei corespund celor de la 722 cm^{-1} (vibratia de respiratie a intregului inel al moleculei) si 1333 cm^{-1} (intindere C5-N7, N1-C2, indoire C2-H, C8-H) din spectrul Raman al adeninei [23].

Analiza spectrului SERS indica faptul ca interactiunea cu suprafata de argint are loc prin intermediul grupurilor amino ale adeninei si ca moleculele sunt orientate inclinat fata de suprafata metalica, asa cum se poate observa in Figura 6b-4.

Analiza substraturilor SERS extreme de populate poate ascunde prezenta *punctelor fierbinti* si comportamentul dinamic ale moleculelor proba, care sunt foarte importante in caracterizarea experimentelor SERS. In consecinta, am redus concentratia de molecule proba. Am constatat ca filmele care contin concentratii mai mici de adenina prezinta aceleasi caracteristici, doar ca intensitatea semnalului SERS scade progresiv. In plus, spectrele colectate de pe filmul cu cea mai scazuta concentratie de adenina prezinta fluctuatii temporale semnificative ale intensitatii semnalului anumitor benzi, precum si a raportului intensitatii benzilor.

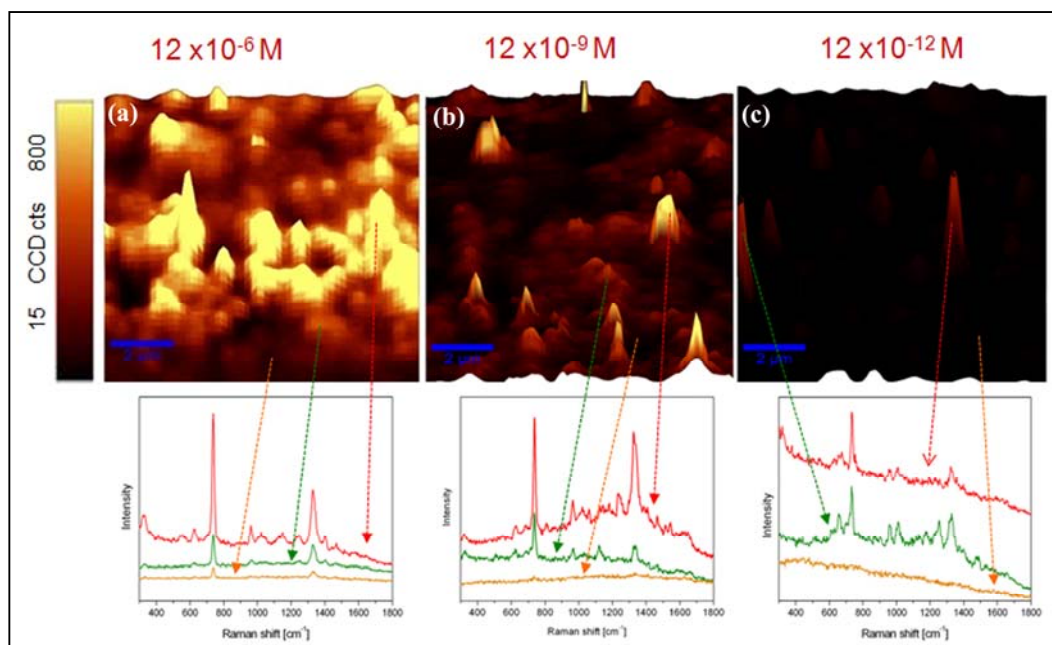


Figura 7-4. Sus: Hartile spatiale SERS 3D obtinute prin reprezentarea distributiei intensitatii modulului vibrational de la 737 cm^{-1} pe suprafetele scanate ale filmelor continand diferite concentratii de adenina (a) 12×10^{-6} M, (b) 12×10^{-9} M, (c) 12×10^{-12} M. Jos: Spectre SERS ale adeninei colectate din diferite puncte ale hartilor prezentate sus. Harta din figura C arata ca adenine poate fi detectata in regim unimolecular. Scala este 2 μm .

Prin imagistica SERS au fost obtinute informatii suplimentare in ceea ce priveste performanta substraturilor testate.

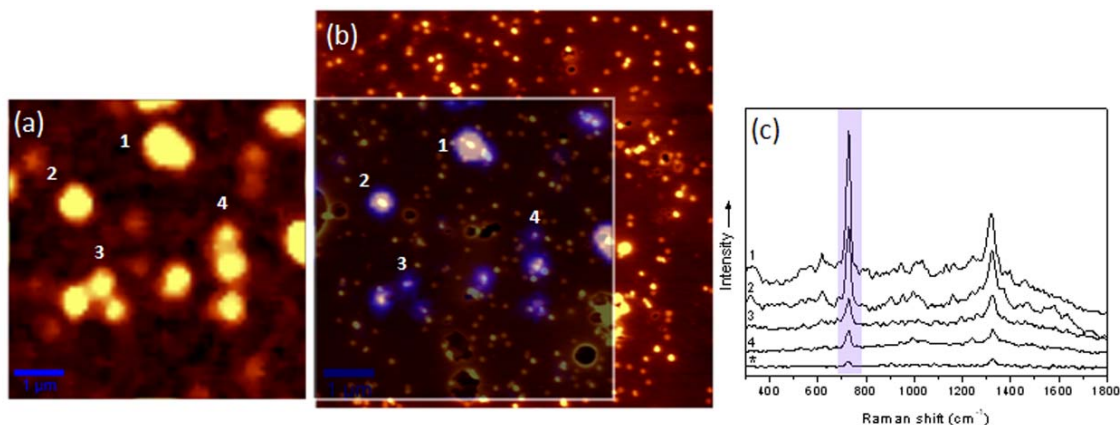


Figura 8-4. Corelarea hartii SERS cu distributia nanoparticulelor pe suprafata, determinate prin AFM. (a) harta SERS neprocesata corespunzatoare hartii procesate prezentate in (b). (b) harta SERS procesata (transparenta) benzii adeninei de la 737 cm^{-1} suprapusa peste imaginea AFM. Aria scanata prin AFM este mai mare decat aria SERS scanata. Scala este $1\ \mu\text{m}$. (c) Exemple de spectre SERS colectate din spoturile indicate in (a) si (b). Spectrul marcat cu * a fost colectat de pe particulele individuale.

[Figura 7-4](#) prezinta imaginile SERS obtinute prin reprezentarea intensitatii SERS a benzii de la 737 cm^{-1} pe aria scanata a filmelor continand diferite concentratii de adenina, asa cum este indicat, impreuna cu cateva spectr SERS selectate din diferite locuri de pe suprafata filmelor, punand in evidenta diferite nivele de amplificare a semnalului. Astfel, [Figura 7a-4](#) ilustreaza o imagine SERS colectata de pe filmul cu o concentratie a adeninei de $12 \times 10^{-6}\text{ M}$. Desi se observa o distributie neregulata a intensitatii SERS pe suprafata selectata, este important de mentionat faptul ca s-au putut colecta spectre SERS pe toata suprafata scanata. Asa cum este de asteptat, microrarea treptata a concentratiei de adenina determina o scadere a intensitatii semnalului SERS (a se vedea [Figura 7b-4](#)).

Pentru a investiga originea celor mai intense zone SERS am corelat morfologia filmelor cu eficienta lor SERS. [Figura 8b-4](#) ilustreaza o imagine corelata AFM-Raman obtinuta prin suprapunerea hartii spatiale SERS peste imaginea AFM corespunzand aceleasi arii scanate. Regiunile cu amplificare foarte mare a semnalului Raman coincid cu ansamblurile de nanoparticule, sub forma de dimeri, trimeri sau configuratii mai complexe. [Figure 8c-4](#) prezinta cateva spectre SERS corespunzand zonelor indicate prin numerele 1-4 in [Figura 8-4](#) partile a si b. Este demonstrat faptul ca nanoparticulele cuplate pot crea puncte fierbinti in care se produce o amplificare uriasa a campului electromagnetic, ceea ce determina o crestere foarte mare a intensitatii semnalului Raman, fiind posibila detectia semnalului SERS chiar si de la o singura molecula [24]. Este de asteptat ca, in timpul evaporarii solventului, moleculele de analit sa fi fost nu doar legate de suprafata

nanoparticulelor, ci si prinse in spatiile create intre nanoparticulele interconectate. In consecinta, semnul Raman cel mai intens este produs de aceste puncte fierbinti, a caror densitate variaza pe suprafata filmului (a se vedea Figura 8-4).

4.2.3. Detectia SERS unimoleculara a adeninei

In continuare am investigat filmul preparat cu o concentratie a adeninei de 12×10^{-12} M, deoarece detectia unor concentratii extreme de scazute poate fi considerata ca o dovada a unei sensibilitati inspre limita unimoleculara. Figura 7c-4 ilustreaza o imagine SERS a modului vibrational al adeninei de la 737 cm^{-1} , colectata de pe filmul cu cea mai scazuta concentratie de analit. Se poate observa ca activitatea SERS este extrem de localizata, corespunzand catorva zone active Raman. Spectrele SERS in Figura 7c-4 de jos pun in evidenta faptul ca aceste puncte fierbinti produc o amplificarea uriasa, fiind astfel posibila detectia semnalului SERS chiar si de la o concentratie atat de scazuta de analit. Pe baza analizei spectrale se remarca o modificare semnificativa a formei spectrului SERS in functie de punctele fierbinti din care este colectat (a se vedea Figura 9A-4). Astfel, am constatat ca anumite puncte fierbinti produc o amplificare mare Raman in special pentru anumite moduri SERS care erau slabe sau chiar inactivate in spectrul colectat de pe filmul cu o concentratie ridicata a adeninei. Avand in vedere regulile de selectie in SERS, potrivit carora amplificarea maxima se produce pentru modurile vibrationale care implica o modificare mare a polarizabilitatii perpendicular pe suprafata metalului, am presupus ca aceste diferente spectrale sunt determinate de reorientarea moleculelor de analit pe durata masuratorilor.

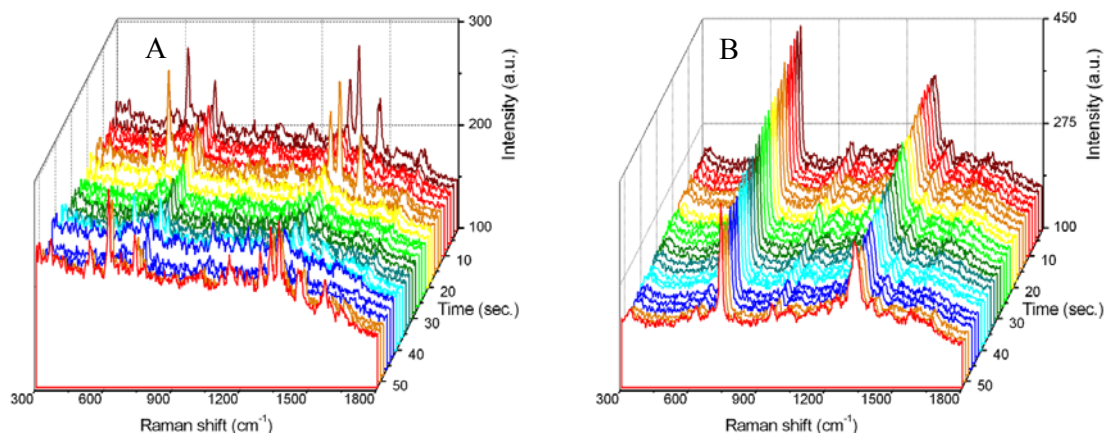


Figure 9-4. (A)Prezentarea in cascada a evolutiei in timp a unor spectre SERS ale adeninei, colectate de pe filmul cu cea mai scazuta concentratie de adenine, punand in evidenta fluctuatiile specifice regimului de unimolecula. (B) Prezentarea in cascada a evolutiei in timp a spectrelor adeninei colectate de pe un punct fierbinte localizat pe filmul cu cea mai ridicata concentratie de adenine. Timpul de integrare: 0.5 s, laser: 632.8 nm

Evolutia in timp a semnalului SERS colectat din diferite puncte fierbinti localizate pe suprafata substratului cu cea mai scazuta concentratie de adenina a fost investigata, de asemenea, prin

colectarea seriilor temporale a spectrelor SERS. Am remarcat o fluctuatie spectaculoasa in timp a intensitatii anumitor benzi spectrale, precum si a raportului intensitatilor benzilor, asa cum se poate observa in [Figura 9A-4](#).

Este important de specificat ca aceasta variatie in timp a semnalului SERS in punctele fierbinti poate fi observata doar pe proba cu cea mai scazuta concentratie de adenina. Prin marirea treptata a concentratiei de adenine intensitatea semnalului SERS creste, iar spectrele SERS colectate din diferite regiuni ale filmelor sunt similare. [Figura 9B-4](#) prezinta o serie temporala a spectrelor SERS colectate dintr-un punct fierbinte localizat pe filmul cu cea mai ridicata concentratie de adenina. Dupa cum se poate observa, spectrul este foarte stabil in timp. Reproducibilitatea masuratorilor SERS a fost testata prin colectarea, in acelasi mod, a mai multor spectre individuale si serii temporale de pe regiuni ale filmelor, iar diferentele au fost doar in ceea ce priveste intensitatea spectrelor, fara modificari semnificative ale pozitiei benzilor, grosimii benzilor sau a raportului intensitatilor benzilor.

Posibilitatea de a inregistra un semnal SERS de la o concentratie extrem de scazuta de analit, doar de pe cateva regiuni ale suprafetei substratului, coroborata cu un fluctuatiile semnalului in timp ne conduc la concluzia ca nanoparticulele anizotrope de argint inglobate intr-un film de chitosan sunt substraturi SERS foarte eficiente, capabile sa detecteze adenina la nivel unimolecular.

Capitolul 5

Activitatea Antibacteriana Sinergistica a Nanocompozitelor de Chitosan-Argint asupra *Staphylococcus Aureus*

5.1. Determinarea valorilor MIC si MBC

In studiul de fata am efectuat teste comparative pentru a evalua impactul nanoparticulelor de argint, al compozitelor de chitosan-argint si al biopolimerului chitosan asupra a doua tulpini reprezentative de *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) rezistente la metilina. Testele au fost efectuate prin incubarea bacteriilor in prezenta a diferitelor concentratii de nanoparticule si chitosan. S-au preparat doua probe suplimentare, si anume controlul negativ (doar mediu steril de crestere), si controlul pozitiv (suspensie bacteriana fara nanoparticule sau chitosan). Efectele antimicrobiene au fost evaluate determinand concentratia minima inhibitoare (MIC) si concentratia minima bactericida (MBC), care reprezinta metodele microbiologice standard de evaluare a proprietatilor bacteriostatice si bactericide ale agentilor antimicrobieni. Cresterea bacteriilor a fost evaluata vizual si a fost determinata valoarea MIC corespunzatoare concentratiei minime care inhiba complet cresterea. Pentru a determina MBC, au fost extrase din godeurile in care nu a fost vizibila cresterea bacteriilor volume identice (100 μ L) de suspensie bacteriana incubata cu nanoparticule sau chitosan si depuse pe placute de agar Mueller Hinton. Apoi placutele au fost incubate la 37°C timp de 24 ore. Dupa incubare au fost numarate coloniile formatoare de unitati (CFUs), corespunzatoare numarului de celule supravietuitoare. Valoarea MBC corespunde concentratiei minime care inhiba formarea coloniilor. Pentru a confirma reproductibilitatea rezultatelor noastre, toate testele antibacteriene au fost facute in duplicat si au fost repetate dupa cateva zile. Rezultatele sunt prezentate in [Tabelul 1-5](#) si reprezinta valorile medii MIC si MBC pentru fiecare agent antibacterian testat. Deviatia standard pentru valorile MIC si MBC este, de asemenea, prezentata in [Tabelul 1-5](#).

Tabelul 1-5. MIC (μ g/mL) si MBC (μ g/mL) a nanocompozitelor chitosan-argint, nanoparticulelor de argint si a chitosanului asupra a doua tulpini de *S. aureus*.

Tulpina	Nanocompozite chitosan-argint Sintetizate la 0 °C		Nanocompozite chitosan-argint sintetizate la 35 °C (4 mM TSC)		Nanocompozite chitosan-argint sintetizate la 35 °C (16.5 mM TSC)		Nanoparticule de argint (fara chitosan) sintetizate la 0 °C		Chitosan	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
UCLA 8076	1.25 \pm 0.75	6 \pm 0	4 \pm 0	15 \pm 0	4.5 \pm 1.5	19 \pm 3	9 \pm 4	>28	10 \pm 0	30
1190	0.75 \pm 0.25	6 \pm 0	4 \pm 0	13.5 \pm 1.5	6 \pm 0	22 \pm 0	10.5 \pm 2.5	>28	10 \pm 0	30

Pentru nanoparticulele de argint fara chitosan valorile MIC si MBC sunt mai mici sau similare cu cele raportate anterior in literatura [9]. Cand este aplicat singur, chitosanul exercita efecte antibacteriene la concentratii similare cu cele prezentate in literatura [25]. Nanoparticulele de argint

invelite in chitosan, sintetizate atat la 0°C, cat si la 35°C au efecte mai pronuntate decat componentii lor [26]. Acest fapt este evident in special in ceea ce priveste actiunea lor bacteriostatica, determinata prin valoarea MIC. Efectul sinergic observat poate fi explicat prin modificarea chimiei suprafetei nanoparticulelor si, in consecinta, a proprietatilor lor biologice, in urma acoperirii cu un biopolimer.

5.2. Imagistica AFM a efectelor antibacteriene ale nanoparticulelor de argint asupra *S. aureus*

In acest studiu am folosit microscopia de forta atomica (AFM) pentru a investiga modificarile morfologice si structurale induse in celulele de *S. aureus*, dupa expunerea la nanoparticulele de argint invelite in chitosan. A fost utilizat modul AC pentru a obtine in timpul scanarii atat imaginile topografice AFM, cat si cele de faza (a se vedea Figura 1-5).

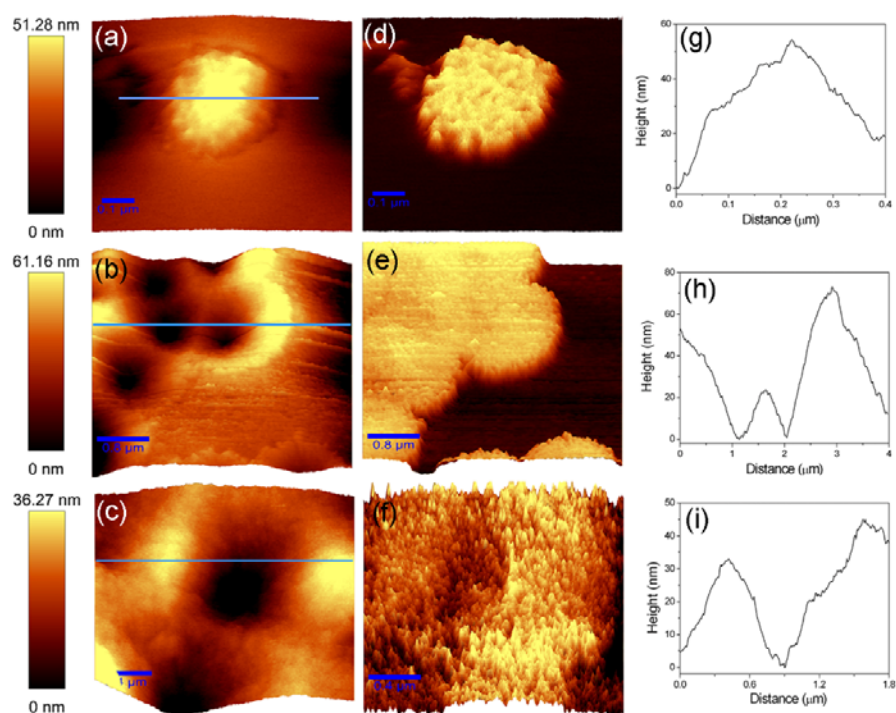


Figura 1-5. Imagini topografice AFM reprezentative ale *S. aureus*: (a) fara tratament, (b), (c) dupa tratamentul cu nanocompozite chitosan-argint sintetizate la 0 °C. Imaginile AFM de faza (d-f) si analiza de sectiune eficace (g-i) corespunzatoare topografiilor.

Imaginea topografica si cea de faza corespunzatoare (Figura 1-5 a si d) ilustreaza forma tipica, aproximativ sferica a unui *S. aureus* izolat, inainte de expunerea la nanoparticulele de argint. Dupa tratamentul cu nanocompozitele de chitosan-argint se poate observa o modificare substantiala a structurii celulelor de *S. aureus*. Imaginile topografice AFM in Figura 1-5 b si c ilustreaza in mod clar formarea mai multor cratera adanci in structura biofilmului ca rezultat al ruperii membranei celulare dupa incubarea cu nanoparticulele de chitosan-argint. Mai mult, imaginile de faza corespunzatoare (Figura 1-5 e si f) nu sunt afectate de topografia locala si pun in evidenta variatiile

in interactiunea varf-proba, care sunt in concordanta cu modificarile proprietatilor suprafetei ca urmare a deteriorarii integritatii celulei bacteriene. Analiza de sectiune eficace in [Figura 1-5](#) h si i demonstreaza ca gaurile distincte formate in biofilmul de bacterii provin din eliberarea continutului bacterian in urma tratamentului cu nanocompozitele de chitosan-argint.

5.3. Masuratorile SERS

[Figura 2-5](#) a si b ilustreaza spectrele de imprastire Raman amplificata de suprafata (SERS) colectate din amestecuri de 700 μl coloid de argint si 100 μl *S. aureus* (10^5 CFU/mL). Pentru referinta, este masurat spectrul SERS al solutiei coloidale de nanoparticule de argint (fara a se adauga bacterii) si, in acest caz, nu se obtine semnal Raman specific ([Figura 2c-5](#)). Analiza ulterioara a amplificarii benzilor vibrationale demonstreaza interactiunea dintre celulele bacteriene si suprafata de argint si identifica biochimia suprafetei celulare a *S. aureus* [27]. Banda proeminenta de la 741 cm^{-1} este caracteristica bacteriilor Gram-pozitive si provine din vibratiile inelului glicozidic asociat cu prezenta polizaharidelor pe suprafata celulei. Benzile de la 966 si 1035 cm^{-1} sunt determinate, probabil, de vibratiile componentilor stratului de lipide din peretii celulari si membrane, iar domeniul spectral 1220-1660 cm^{-1} a fost atribuit anterior vibratiilor amidei I, II si III asociata cu vibratiile de intindere ale scheletului proteic si ale acizilor carboxilici. Benzile de la 1090 si 1460 cm^{-1} pot fi atribuite modurilor vibrationale ale proteinelor.

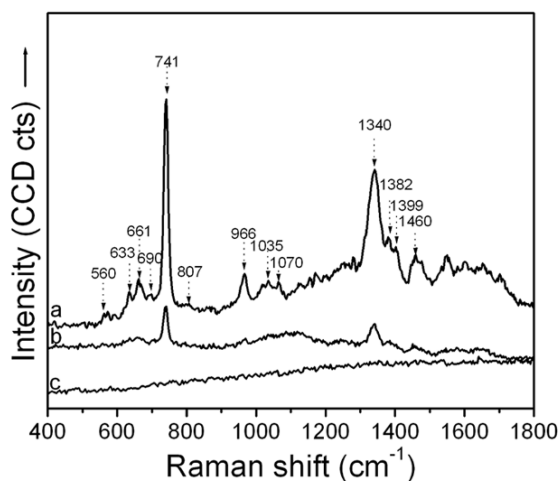


Figure 2-5. Spectrele SERS ale *Staphylococcus aureus* masurate in solutie folosind ca sursa de excitare un laser cu lungimea de unda de 632.8 nm. (a) cu nanoparticule de argint ca substrat SERS, (b) cu bionanocompozite de chitosan-argint ca substrat SERS. Concentratia finala a probei bacteriene a fost 1.25×10^4 CFU/mL. (c) Spectrul SERS al solutiei coloidale de argint (fara a se adauga bacterii).

Este important de mentionat faptul ca se observa o scadere semnificativa a semnalului Raman in cazul in care se folosesc nanocompozitele de chitosan-argint ca substrat SERS ([Figura 2b-5](#)). In acest caz presupunem ca stratul de chitosan din jurul nanoparticulelor impiedica interactiunea

directă dintre celulele bacteriene și miezul metalic, precum și agregarea nanoparticulelor, fapt care duce la o scădere pronunțată a semnalului SERS.

Concluzii

În această teză am preparat, caracterizat și studiat proprietățile optice și mecanismele de formare ale nanocompozitelor anizotrope de chitosan și metal nobile. În plus, am demonstrat aplicabilitatea nanoparticulelor sintetizate în detecția, imagistica și terapia biomedicală.

- 1. Am sintetizat nanocompozite de aur-chitosan de diferite dimensiuni, forme și morfologii.**
- 2. Am obținut nanostructuri plasmonice biocompatibile, bazate pe chitosan și nanoparticule anizotrope de argint, ale căror rezonanțe plasmonice sunt ajustabile.**
- 3. Am introdus un sensor plasmonic multifuncțional în soluție prin combinarea a două metode de detecție: LSPR-SERS.**
- 4. Am introdus un substrat SERS nou, biocompatibil bazat pe ansambluri mici de nanoparticule anizotrope de argint înglobate într-un film de chitosan.**
- 5. Am demonstrat că biopolimerul chitosan și nanoparticulele de argint acționează sinergic asupra a două tulpini Gram-pozitive de *Staphylococcus aureus* rezistent la metilina.**

Referinte

- [1] S. Link, M. A. El-Sayed. *Optical properties and ultrafast dynamics of metallic nanocrystals* Annu. Rev. Phys. Chem. **54** (2003) 331-366.
- [2] P. K. Jain, X. Huang, I. H. El-Sayed, M. A. P. El-Sayed. *Review of some interesting surface plasmon resonance-enhanced properties of noble metal nanoparticles and their applications to biosystems*. Plasmonics. **2** (2007) 107-118.
- [3] J. N. Anker, W. P. Hall, O. Lyandres, N. C. Shah, J. Zhao, R. P. Van Duyne. *Biosensing with plasmonic nanosensors*. Nat. Mater. **7** (2008) 442-453.
- [4] A. J. Haes, R. P. Van Duyne. *A nanoscale optical biosensor: sensitivity and selectivity of an approach based on the localized surface plasmon resonance of triangular silver nanoparticles*. J. Am. Chem. Soc. **124** (2002)10596–10604.
- [5] W. Xie, P. Qiu, C. Mao. *Bio-imaging, detection and analysis by using nanostructures as SERS substrates*. J. Mater. Chem. **21** (2011) 5190-5202.
- [6] M. Baia, S. Astilean, T. Iliescu. *Raman and SERS investigations of pharmaceuticals*. (2008) Berlin: Springer.
- [7] L.F.E. Cristobal, G.A.M. Castanon, R.EM Martinez, J.P.L. Rodriguez, N.P. Marin, J.F.R. Macias, F. Ruiz. *Antibacterial effect of silver nanoparticles against Streptococcus mutans*. Mater. Lett. **63** (2009)
- [8] J.S. Kim, E. Kuk, K. N. Yu, J. H. Kim, S. J. Park, H. J. Lee, S. H. Kim, Y.K. Park, Y. H. Park, C.Y. Hwang, Y. K. Kim, Y. S. Lee, D. H. Jeong, M. H. Cho. *Antimicrobial effects of silver nanoparticles*. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine **3** (2007) 95–101.
- [9] J. R. Morones, J. L. Elechiguerra, A. Camacho, K. Holt, J.B. Kouri, J.T. Ramirez, M.J. Yacaman. *The bactericidal effect of silver nanoparticles*. Nanotechnology **16** (2005) 2346–2353.
- [10] M. Rinaudo. *Chitin and chitosan: Properties and applications*. Prog. Polym. Sci. **31** (2006) 603-632
- [11] M.N.V.Ravi Kumar, R.A.A.Muzzarelli, C.Muzzarelli, H.Sashiwa, A.J.Domb. *Chitosan Chemistry and Pharmaceutical Perspectives*. Chem. Rev. **104** (2004) 6017- 6084.
- [12] **M. Potara**, D. Maniu, S.Astilean. *The synthesis of biocompatible and SERS-active gold nanoparticles using chitosan*. Nanotechnology. **20** (2009) 315602 (7pp).
- [13] P. K. Jain, K. S. Lee, I. H. El-Sayed, M. A. El-Sayed. *Calculated absorption and scattering properties of gold nanoparticles of different size, shape, and composition: Applications in biological imaging and biomedicine*. J. Phys. Chem. B **110** (2006) 7238-7248
- [14] W. Xu, S. Xu, X. Ji, B. Song, H. Yuan, L. Mac, Y Bai. *Preparation of gold colloid monolayer by immunological identification*. Colloids Surf. B. **40** (2005) 169-172.
- [15] **M. Potara**, A. Gabudean, S. Astilean. *Solution-phase, dual LSPR-SERS plasmonic sensors of high sensitivity and stability based on chitosan-coated anisotropic silver nanoparticles*. J. Mater. Chem. **21** (2011) 3625-3633.
- [16] I. Pastoriza-Santos, L. M. Liz-Marzan. *Colloidal silver nanoplates. State of the art and future challenges*. J. Mater. Chem. **18** (2008) 1724–1737.
- [17] M. C. Moulton, L. K. Braydich-Stolle, M. N. Nadagouda, S. Kunzelman, S. M. Hussain, R. S. Varma. *Synthesis, characterization and biocompatibility of “green” synthesized silver nanoparticles using tea polyphenols*. Nanoscale. **2** (2010) 763-770
- [18] G. Socrates. *Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies* (2001) 3rd edn (Chichester: Wiley)
- [19] L. J. Sherry, R. Jin, C. A. Mirkin, G. C. Schatz, R. P. Van Duyne. *Localized surface plasmon resonance spectroscopy of single silver triangular nanoprisms*. Nano Lett. **6** (2006) 2060–2065.
- [20] X. Zou, S. Dong. *Surface-enhanced Raman scattering studies on aggregated silver nanoplates in aqueous solution*. J. Phys. Chem. B. **110** (2006) 21545–21550.
- [21] L. Rodriguez-Lorenzo, R. A. Alvarez-Puebla, F. J. Garcia de Abajo, L. M. Liz-Marzan. *Surface enhanced Raman scattering using star-shaped gold colloidal nanoparticles*. J. Phys. Chem. C **114** (2010) 7336–7340.
- [22] **M. Potara**, M. Baia, C. Farcau, S. Astilean, *Chitosan-coated anisotropic silver nanoparticles as a SERS substrate for single molecule detection*, Nanotechnology **23** (2012) Article number 055501(10pp).
- [23] B. Giese, D. McNaughton. *Surface-enhanced Raman spectroscopic and Density Functional Theory study of adenine adsorption to silver surfaces*. J. Phys. Chem. B **106** (2002) 101-112.
- [24] J. P. Camden, J. A. Dieringer, Y. Wang, D. J. Masiello, L. D. Marks, G. C. Schatz, R. P. Van Duyne. *Probing the structure of single-molecule surface- enhanced Raman scattering hot spots*. J. Am. Chem.

- Soc. 130 (2008) 12616-12617
- [25] L. Qi, Z. Xu, X. Jiang, C. Hu, X. Zou. *Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles*. Carbohydr. Res. **339** (2004) 2693–2700.
- [26] **M. Potara**, E. Jakab, A. Damert, O. Popescu, V. Canpean, S. Astilean, *Synergistic antibacterial activity of chitosan-silver nanocomposites on Staphylococcus aureus*, Nanotechnology 22 (2011) Article number 135101 (9pp)
- [27] H. Chu, Y. Huang, Y. Zhao. *Silver nanorod arrays as a surface-enhanced Raman scattering substrate for foodborne pathogenic bacteria detection*. Appl. Spectrosc. 62 (2008) 922-931.