

**Universitatea Babeș-Bolyai  
Facultatea de Fizică**

**Rezumatul tezei de doctorat**

**NANOPARTICULE PLASMONICE MULTIFUNCTIONALE  
PENTRU METODE DE IMAGISTICĂ ȘI DETECTIE OPTICĂ**

**Ana-Maria GĂBUDEAN**

**Coordonator științific  
Prof. Univ. Dr. Simion AȘTILEAN**

**CLUJ-NAPOCA  
2012**

## CUPRINS

<i>PREZENTARE SUCCINTA A CONTINUTULUI TEZEI</i> .....	3
<i>CAPITOLUL 1 INTRODUCERE ASUPRA NANOPARTICULELOR DE AUR</i> .....	5
<b>1.1 Context istoric</b> .....	5
<b>1.2 Proprietatile optice ale nanoparticulelor de aur</b> .....	5
<b>1.3 Efecte plasmonice induse de nanoparticulele de aur</b> .....	6
<b>1.4 Nanoparticulele de aur in biomedicina</b> .....	6
<i>CAPITOLUL 2 SINTEZA NANOBASTONASELOR DE AUR CU DIVERSE INVELISURI</i> .....	7
<b>2.1 Nanobastonase de aur stabilizate cu bromura de cetiltrimetilamonium (CTAB)</b> .....	7
2.1.1 Introducere .....	7
2.1.2 Rezultatele spectroscopiei de rezonanta a plasmonilor de suprafata localizati (LSPR).....	8
2.1.3 Rezultatele microscopiei electronice de transmisie (TEM).....	8
<b>2.2 Nanobastonase de aur invelite in silica</b> .....	9
2.2.1 Introducere .....	9
2.2.2 Rezultatele spectroscopiei de rezonanta a plasmonilor de suprafata localizati (LSPR).....	9
2.2.3 Rezultatele microscopiei electronice de transmisie (TEM).....	10
<i>CAPITOLUL 3 APLICATII ALE NANOBASTONASELOR DE AUR STABILIZATE CU CTAB</i> .....	11
<b>3.1 Studii de spectroscopie de rezonanta a plasmonilor de suprafata localizati (LSPR) si spectroscopie Raman amplificata de suprafata (SERS) asupra adsorptiei para-aminotiofenolului la suprafata nanobastonaselor de aur</b> .....	11
3.1.1 Analiza dependentei spectrelor LSPR/SERS de concentratia de analit.....	11
3.1.2 Analiza dependentei spectrelor LSPR si SERS de pH-ul solutiei .....	12
<b>3.2 Nanosenzori plasmonici duali bazati pe nanobastonase de aur pentru detectia fluorescentei Amplificata de metal (MEF) si a imprastierii Raman amplificata de suprafata (SERS)</b> .....	14
3.2.1 Testarea substratului ca senzor MEF .....	14
3.2.2 Testarea substratului ca senzor SERS .....	15
3.2.3 Multiplexarea raspunsului spectroscopic .....	16
<i>CAPITOLUL 4 NANOBASTONASE DE AUR INVELITE IN SILICA CA EFICIENTE PLATFORME PLASMONICE</i> .....	18
<b>4.1 Testarea substratelor pentru detectie SERS in NIR</b> .....	18
<b>4.2 Testarea dualitatii substratelor in detectia multiplexata SERRS-MEF</b> .....	19
<i>CAPITOLUL 5 INVESTIGATII ALE INTERACTIUNII FLUOROFOR-METAL LA NIVEL DE NANOPARTICULA INDIVIDUALA PRIN MICROSCOPIE SI SPECTROSCOPIE OPTICA</i> .....	20
<b>5.1 Caracterizarea optica a nanocapsulelor de aur ce inglobeaza fluorofori</b> .....	20
5.1.1 Masuratori de extinctie si imprastiere a luminii .....	21
5.1.2 Masuratori de fluorescenta.....	22
<b>5.2 Studii de microscopie si spectroscopie de fluorescenta asupra nanoparticulelor de aur grefate direct cu fluorofori</b> .....	22
5.2.1 Nanoparticule de aur de forma stelara grefate cu fluorofori.....	23
5.2.2 Nanoparticule de aur de forma bipiramidala grefate cu fluorofori .....	23
<i>CAPITOLUL 6 STUDII DE ACUMULARE IN CELULE A NANOPARTICULELOR DE AUR EFECTUATE PRIN MICROSCOPIE SI SPECTROSCOPIE IN CAMP INTUNECAT</i> .....	24
<b>6.1 Teste de acumulare in celule ale nanoparticulelor de aur PEGylate</b> .....	24
<b>6.2 Teste de acumulare in celule ale nanoparticulelor de aur acoperite cu polimer_32k</b> .....	25
<i>CAPITOLUL 7 CONCLUZII FINALE SI PERSPECTIVE VIITOARE</i> .....	26
<i>REFERINTE</i> .....	28
<i>LISTA PUBLICATIILOR</i> .....	29

## PREZENTARE SUCCINTA A CONTINUTULUI TEZEI

**Capitolul 1** prezinta aspecte generale introductive asupra nanoparticulelor plasmonice, si in particular de aur, si a proprietatilor optice deosebite ale acestora. Sunt de asemenea prezentate, doua din cele mai interesante efecte plasmonice folosite in dezvoltarea de noi aplicatii, si anume: Spectroscopia Raman Amplificata de Suprafata (SERS) si Fluorescenta Amplificata de Suprafete metalice (MEF). In ultima parte a capitolului se realizeaza o scurta trecere in revista a posibilelor aplicatii ale nanoparticulelor de aur in domeniul biomedical.

Urmatoarele trei capitole cuprind rezultate obtinute in cadrul Centrului de Nanobiofotonica al Institutului de Cercetari Interdisciplinare in Bio-nano-stiinte al Universitatii Babes-Bolyai.

**Capitolul 2** este axat pe descrierea metodelor de preparare si caracterizare a nanoparticule de aur de forma alungita (nanobastonase) cu dimensiuni controlabile si stabilizate chimic cu diversi compusi moleculari. Astfel, in prima parte a capitolului este prezentata metoda chimica de sinteza a nanobastonaselor de aur prin crestere din germeni de cristalizare, ce foloseste ca stabilizator molecula surfactant bromura de cetiltrimetilamoniu (CTAB). In continuare, in vederea imbunatatirii chimiei suprafetei, a biocompatibilitatii si a stabilitatii nanoparticulelor, proprietati imperative in utilizarea lor in aplicatii biologice, am utilizat silica si polistirenul sulfonat ca materiale biocompatibile pentru invelirea bastonaselor de aur. Nanoparticulele obtinute sunt caracterizate optic si morfologic cu diferite tehnici.

**Capitolul 3** pune in evidenta deosebitele proprietati optice ale nanobastonaselor de aur stabilizate cu surfactantul CTAB prin punctarea a doua aplicatii relevante de detectie moleculara. Prima aplicatie a avut in vedere investigarea interactiunii moleculei reporter Raman para-aminotiofenol (p-ATP) cu nanobastonasele de aur stabilizate cu CTAB, studiindu-se dependenta concentratiei moleculelor de p-ATP si a pH-ului solutiei conjugatelor asupra raspunsului lor plasmonic prin intermediul metodelor spectroscopice de rezonanta a plasmonilor de suprafata localizati (LSPR) si SERS. De asemenea, in cadrul acestui capitol s-a punctat o problema recent dezbatuta si controversata in literatura de specialitate, privind formarea unei noi specii moleculare, si anume p,p'-dimercaptoazobenzen (DMAB), in urma transformarii chimice a moleculei de p-ATP pe substratul metalic.

A doua aplicatie a nanobastonaselor de aur stabilizate cu CTAB evidentiata in acest capitol, este abilitatea acestora de a fi utilizate ca si platforme plasmonice in vederea fabricarii de nanosonde spectroscopice cu raspuns dual. Astfel, s-a realizat conjugarea nanobastonase de aur stabilizate cu CTAB prin atasarea de molecule fluorescente de Rose Bengal (RB) si s-a aratat faptul sa excitarea selectiva a celor doua benzi de rezonanta plasmonica a AuNRs duce la amplificarea selectiva a emisiei de fluorescenta si a imprastierii Raman. Mai mult, s-a demonstrat ca excitarea rezonanta atat a moleculelor de RB cat si a plasmonilor de suprafata ai nanobastonaselor de aur permite detectia simultana a semnalelor de Imprastiere Raman Rezonanta Amplificata de Suprafata (SERRS) si MEF. Acest studiu reprezinta prima

demonstratie din literatura asupra obtinerii unui substrat plasmonic eficient bazat pe AuNRs capabil de a genera un dublu semnal spectroscopic amplificat detectabil prin spectroscopiile Raman si de fluorescenta.

In continuare, in **Capitolul 4** se demonstreaza posibilitatea utilizarii cu succes a AuNRs invelite in silica in aplicatii de detectie. In acest context, se efectueaza marcarea nanobastonasele de aur AuNRs invelite in silica cu doua clase diferite de molecule reporter Raman. Intr-o prima etapa se arata abilitatea sistemelor astfel create de a fi utilizate ca si nano-reporteri in spectroscopia SERS in domeniul infra-roosu apropiat. De asemenea, in finalul capitolului sunt prezentate rezultatele obtinute in urma testarii abilitatii AuNRs invelite in silica si marcate cu Nile Blue de a functiona ca platforme plasmonice cu dublu raspuns spectroscopic prin SERRS si MEF.

Rezultatele experimentale prezentate in urmatoarele doua capitole au fost obtinute in cadrul Laboratorului Interdisciplinar de Fizica al Universitatii Joseph Fourier si al Laboratorului de Chimie al Universitatii Claude Bernard din Franta.

In **Capitolul 5** se urmareste demonstrarea utilitatea microspectroscopiei optice ca metoda eficienta in investigarea si analizarea nano-obiectelor metalice fluorescente. In prima parte, sunt analizate nanoparticule de aur de tip core-shell cu interior lichid ce inglobeaza molecule fluorescente, obtinute printr-un procedeu inovativ. In cea de-a doua parte a capitolului se utilizeaza spectroscopia si microscopia de fluorescenta pentru caracterizarea proprietatilor de luminescenta ale nanoparticulelor de aur de forme stelara si bipiramidala decorate in mod direct cu molecule fluorescente de Lucifer Yellow.

In **Capitolul 6** se demonstreaza fezabilitatea utilizarii nanoparticulele de aur compatibilizate cu biopolimeri in aplicatii de imagistica intracelulara prin efectuarea de studii intracelulare cantitative pe diferite forme de nanoparticule de aur. Intr-o prima etapa, se evalueaza acumularea in celulele cancerigene B16-F10 a nanoparticulelor de aur de forma stelara si bipiramidala invelite intr-un strat biocompatibil de poli(etilen) glicol tiolat. In cea de-a doua parte a capitolului, se investigheaza interactiunea nanosferelor de aur invelite intr-un biopolimer ingenios sintetizat in laborator, cu celulele maligne B16-F10 si celulele limfoide BaF3 studiindu-se dependenta acumularii in celule de concentratia coloidala precum si de dimensiunea nanoparticulelor de aur, evaluandu-se astfel posibilitatea utilizarii lor in aplicatii intracelulare.

Aceasta teza a fost realizata cu finantare din proiectul: “Investeste in oameni” - Proiect co-finantat din Fondul Social European prin Programul Operatiional Sectorial pentru Dezvoltarea Resurselor Umane 2007-2013. Contrat nr. POSDRU/88/1.5/S/60185 – “Studii doctorale inovative intr-o societate bazata pe cunoastere”, Cluj-Napoca, Romania.

**CUVINTE CHEIE:** Nanoparticule de aur, reporteri Raman, fluorescenta, MEF, SERS, detectie

## CAPITOLUL 1

### *INTRODUCERE ASUPRA NANOPARTICULELOR DE AUR*

#### **1.1 Context istoric**

Deși nanoparticulele de metale nobile sunt considerate o descoperire a științei moderne, acestea au fost produse și utilizate încă din vremurile antice datorită proprietăților lor optice remarcabile. Erau de exemplu folosite în perioada civilizației antice romane pentru colorarea ceramicii și a sticlei în culori intense de roșu, galben, sau mov, în funcție de concentrația de aur, iar în chimia hindusă pentru diferite leacuri. Ca exemplu servește celebra cupă a lui Lycurgus din secolul al 4-lea î.H. cunoscută pentru faptul că este colorată în roșu când lumina este incidentă și verde când lumina se reflectă, datorită prezentei nanoparticulelor de aur (AuNPs) (Figura 1-1).



**Figure 1-1** Celebra cupă română a lui Lycurgus colorată în roșu sau verde în funcție de incidența luminii.

#### **1.2 Proprietățile optice ale nanoparticulelor de aur**

Cea mai atrăgătoare proprietate optică a AuNPs se bazează pe așa numită *plasmoni de suprafață* (PS), definiți ca fiind oscilații colective ale electronilor liberi de conducție liberi, induse de excitarea cu lumina rezonantă. Amplitudinea acestor oscilații atinge un maxim la o anumită frecvență, dând naștere la o bandă de *rezonanță a plasmonilor de suprafață* (RPS) în spectrul de absorbție al AuNPs.

Cea mai populară teorie utilizată pentru descrierea interacțiunii câmpului electromagnetic oscilant cu nanoparticulele de dimensiuni mai mici decât lungimea de undă a luminii incidente este cea elaborată de Mie (Mie, 1908). Așa cum s-a demonstrat deja în literatură, intensitatea, lungimea de undă și lățimea benzii RPS depinde de tipul de metal, dimensiunea, forma și compoziția nanoparticulelor precum și de constanta dielectrică a mediului înconjurător.

### **1.3 Efecte plasmonice induse de nanoparticulele de aur**

Campul electromagnetic intens generat de RPS ale AuNPs este capabil de a amplifica semnalul fluorescena si cel Raman al moleculelor situate in contact cu suprafata metalica sau în imediata apropiere. Imprastierea Raman se datoreaza interactiunii fotonilor cu dipolul electric al unei molecule si este considerat o metoda spectroscopica valoroasa pentru identificarea probelor biologice si chimice, precum si pentru elucidarea structurilor moleculare, a proceselor de suprafata sau a reactiilor de interfata.

Fenomenul prin care intensitatea imprastierii Raman datorata moleculelor aflate in imediata apropiere a suprafetelor metalice este mult amplificata se numeste *spectroscopie Raman amplificata de suprafata* (SERS). Desi au fost propuse mai multe modele teoretice in literatura de specialitate, momentan sunt acceptate doua mecanisme ce contribuie la amplificarea semnalului Raman: cel electromagnetic si cel chimic (Campion, 1998).

Asezarea moleculelor fluorescente in imediata apropiere a nanoparticulelor generatoare de campuri plasmonice intense, electronii din structura moleculara participanti in procesele de excitatie/emisie interactioneaza cu campul, determinand stingerea sau amplificarea emisiei de fluorescena. Fenomenul de amplificare al fluorescena (MEF) a fost intens studiat de catre Lakowicz si colaboratorii sai de-a lungul ultimei decade (Lakowicz, 2006). Pe scurt, in apropierea metalelor, proprietatile radiative ale fluoroforilor se modifica determinand o crestere a emisiei spontane asociata cu cresterea concomitenta a eficientei cuantice radiative. Acest lucru se datoreaza scurtarii timpului de fluorescena ce la randul ei determina accelerarea ciclului de fluorescena.

### **1.4 Nanoparticulele de aur in biomedicina**

In ultimele decenii, domeniul AuNPs a cunoscut o dezvoltare semnificativa. Acestea s-au dovedit a fi folositoare in numeroase aplicatii biomedicale cum ar fi livrarea controlata a medicamentelor, detectie, imagistica biomedicala, biosenzoristica, diagnostic clinic sau terapia cancerului (Tiwari, 2011). AuNPs reprezinta o alegere convenabila pentru efectuarea de teste biologice datorita dimensiunilor reduse, stabilitatii termice si chimice, simplitatii metodelor de sinteza cu un grad redus de toxicitate, precum si posibilitatii de a fi ulterior functionalizate cu molecule de interes biologice.

## **CAPITOLUL 2**

### **SINTEZA NANOBASTONASELOR DE AUR CU DIVERSE INVELISURI**

*Primul obiectiv al acestui capitol a fost de a sintetiza nanoparticule de aur cu forma alungita de diferite rapoarte de aspect, stabilizate cu bromura de cetiltrimetilamonium (CTAB). In al doilea rand, in vederea imbunatatirii stabilitatii, sensibilitatii si biocompatibilitatii nanobastonaselor de aur (AuNRs) am testat doua tipuri de invelisuri, si anume silica ( $\text{SiO}_2$ ) si polistirenul sulfonat (PSS).*

Posibilitatea ajustarii proprietatilor optice, catalitice si electronice ale AuNPs prin controlul dimensiunii, fomei si a compozitiei lor a dus la aparitia a numeroase publicatii asupra metodelor de preparare a AuNPs de diferite dimensiuni si forme de la sfere (Shankar, 2005), bastonase (Huang, 2009), bipiramide (Navarro, 2012), triunghiuri sau cuburi (Huang, 2006) la stele (Nehl, 2006) si flori (Boca, 2011). In particular, de-a lungul ultimei decade o deosebita atentie a fost indreptata asupra nanobastonaselor de aur (AuNRs) datorita simplitatii metodelor de fabricare si control asupra raportului de aspect. Mai mult, in vederea imbunatatirii proprietatilor AuNRs stabilizate cu CTAB prin cresterea stabilitatii impotriva agregarii, a sensibilitatii si specificitatii, au fost testate diferite metode de invelire a AuNRs in straturi protectoare.

#### **2.1 Nanobastonase de aur stabilizate cu bromura de cetiltrimetilamonium (CTAB)**

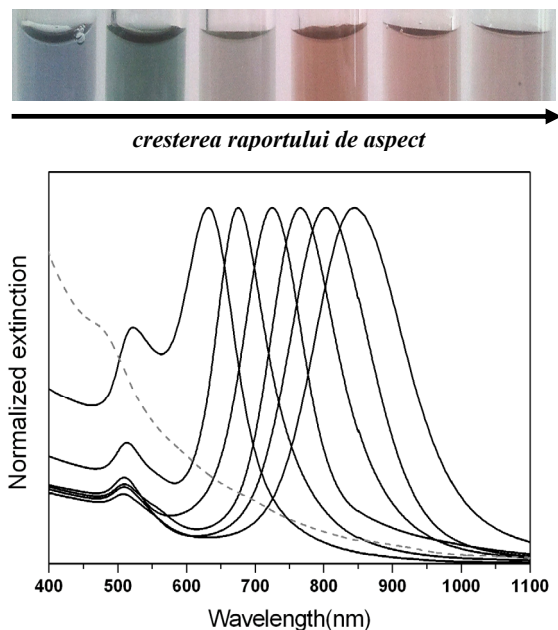
##### *2.1.1 Introducere*

Metoda de sinteza a germenilor de cristalizare este cea mai populara metoda folosita pentru fabricarea de AuNRs cu dimensiuni controlabile. Pe scurt, aceasta metoda implica in prima faza, prepararea de AuNPs sferice de mici dimensiuni prin reducerea sarii de aur ( $\text{HAuCl}_4$ ) cu un puternic agent reductor ce promoveaza cresterea izotropica. Al doilea pas consta in aditia germenilor de cristalizare intr-o solutie de crestere ce contine sare de aur suplimentara, un agent de reducere bland si un agent de directionare a cresterii pentru obtinerea anizotropiei.

*In aceasta sectiune este prezentata sinteza cu randament ridicat a AuNRs stabilizate cu CTAB de dimensiuni controlabile, prin metoda germenilor de cristalizare in prezenta ionilor de argint. Proprietatile optice ale AuNRs sunt caracterizate cu ajutorul Spectroscopiei de Rezonanta a Plasmonilor de Suprafata Localizati (LSPR) iar morfologia lor evaluata prin Microscopie Electronica de Transmisie (TEM).*

### 2.1.2 Rezultatele spectroscopiei de rezonanta a plasmonilor de suprafata localizati (LSPR)

Figura 2-1 prezinta spectrele de extinctie normalizate corespunzatoare AuNRs de diferite rapoarte de aspect precum si imaginile optice ale dispersiilor coloidale corespunzatoare.



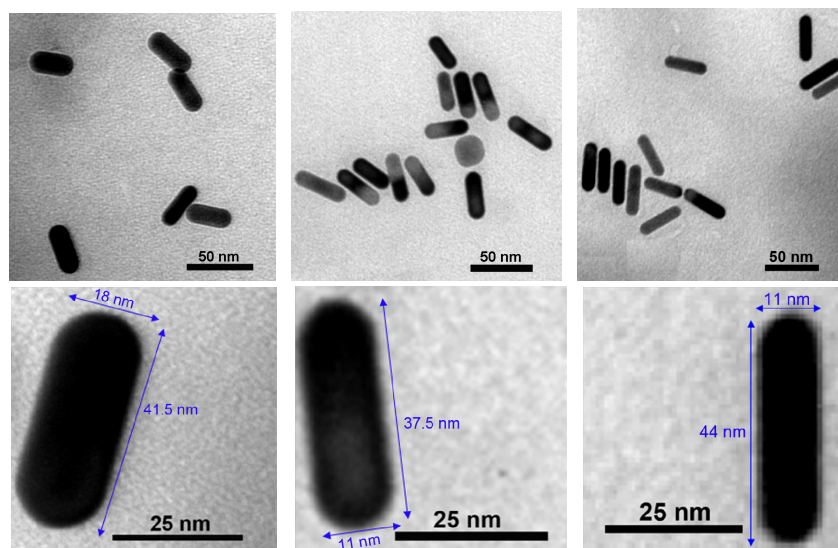
**Figura 2-1** Imaginile optice si spectrele de extinctie normalizate corespunzatoare AuNRs de diferite rapoarte de aspect in solutii apoase. Linia punctata reprezinta spectrum de extinctie al nanoparticulelor folosite ca si germeni.

Localizarea benzii plasmonice transversale la aproximativ 513 nm si controlul pozitiei benzii longitudinale in domeniul 630-840 nm confirma obtinerea diferitelor rapoarte de aspect cuprinse intre 2.2 si 4.4. Culoarea fiecarui set de AuNRs in suspensie apoasa este in stransa legatura cu raspunsul lor optic transpus prin pozitia benzii plasmonice longitudinale.

### 2.1.3 Rezultatele microscopiei electronice de transmisie (TEM)

Imagistica TEM a fost utilizata in acest studiu pentru a confirma formarea nanoparticulelor de forma alungita si de asemenea in vederea estimarii dimensiunilor si a rapoartelor lor de aspect. Figura 2-2 prezinta imaginile TEM a 3 tipuri de AuNRs sintetizate. Astfel, nanoparticulele analizate au forma alungita si prezinta o buna monodispersitate in privinta formei si a dimensiunii. Dimensiunile medii obtinute exprimate ca lungime  $\times$  diametru pentru rapoartele de aspect de 2.3, 3.4 and 4 sunt:  $41.5 \times 18$  nm,  $37.5 \times 11$  nm and  $44 \times 11$  nm.





**Figura 2-2** Imagini TEM ilustrative la scara mare, a 3 tipuri de AuNRs cu rapoartele de aspect de: 2.3, 3.4 and 4.

## 2.2 Nanobastonase de aur invelite in silica

### 2.2.1 Introducere

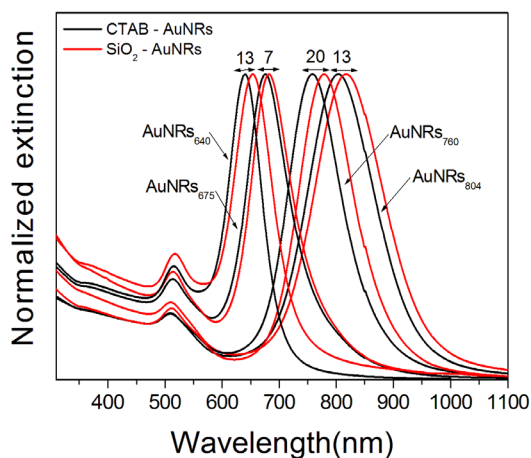
Strategiile actuale de acoperire a nanoparticulelor cu starturi protectoare din materiale biocompatibile (ex. silica ( $\text{SiO}_2$ )) in vederea imbunatatirii stabilitatii si a compatibilitatii, permite prepararea de probe potrivite in investigatii biomedicale.

*In aceasta sectiune, se demonstreaza incapsularea cu succes a AuNRs in  $\text{SiO}_2$  cu ajutorul unei simple metode bazata pe condensarea hidrolitica a moleculelor de tetraethylorthosilicate (TEOS). Acoperirea cu  $\text{SiO}_2$  este confirmata experimental cu ajutorul Spectroscopiei de Rezonanta a Plasmonilor de Suprafata Localizati (LSPR), a Microscopiei Electronice de Transmisie (TEM) si masuratorilor de Imprastiere Dinamica a Luminii (DLS) si Potential Zeta.*

### 2.2.2 Rezultatele spectroscopiei de rezonanta a plasmonilor de suprafata localizati (LSPR)

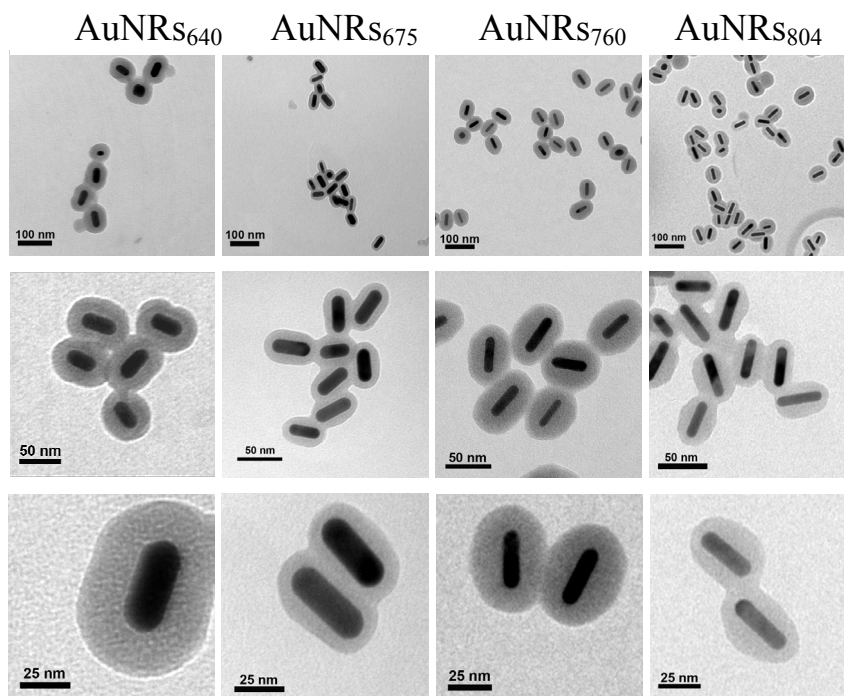
S-au efectuat experimente de acoperire cu  $\text{SiO}_2$  asupra AuNRs stabilizate cu CTAB de diferite rapoarte de aspect. In particular, au fost selectate AuNRs ce poseda benzi plasmonice longitudinale la 640, 675, 760 and 805 nm, notate in continuare cu AuNRs<sub>640</sub>, AuNRs<sub>675</sub>, AuNRs<sub>760</sub> si AuNRs<sub>805</sub>. Ca urmare a depunerii unui strat de  $\text{SiO}_2$  la suprafata AuNRs, rezonantele plasmonice longitudinale sunt deplasate inspre lungimi de unda mai mari datorita cresterii indicelui de refractie local in imediata apropiere a suprafetei metalice (vezi Figura 2-3).

Diferitele deplasari obtinute pentru banda longitudinala cuprinse intre 7 si 20 nm indica formarea a paturi de SiO<sub>2</sub> de diferite grosimi.



**Figura 2-3** Spectrele de extincție normalizate ale AuNRs de diferite rapoarte de aspect înainte și după acoperire cu SiO<sub>2</sub>. Cele 4 tipuri de probe au fost notate: AuNRs<sub>640</sub>, AuNRs<sub>675</sub>, AuNRs<sub>760</sub> și AuNRs<sub>805</sub>.

### 2.2.3 Rezultatele microscopiei electronice de transmisie (TEM)



**Figura 2-4** Imagini TEM ale AuNRs învelite în SiO<sub>2</sub> obținute la diferite mărimi. De sus în jos sunt exemplificate câte 3 imagini TEM pentru fiecare probă de AuNRs cu diferite rapoarte de aspect: AuNRs<sub>640</sub>, AuNRs<sub>675</sub>, AuNRs<sub>760</sub> și AuNRs<sub>805</sub>.

Figura 2-4 prezinta imagini TEM reprezentative pentru probele: AuNRs<sub>640</sub>, AuNRs<sub>675</sub>, AuNRs<sub>760</sub> and AuNRs<sub>805</sub>, dupa invelire cu SiO<sub>2</sub>. Stratul de SiO<sub>2</sub> este clar vizibil ca un invelis de culoare gri contrastant, de diferite dimensiuni. Se observa faptul ca deplasarea benzii plasmonice este cu atat mai mare cu cat stratul de SiO<sub>2</sub> este mai gros. De exemplu, cel mai mare shift observat, de 20 nm corespunde celui mai gros strat de SiO<sub>2</sub> format, de aproximativ 20 nm, observat pentru proba AuNRs<sub>760</sub>.

### **CAPITOLUL 3**

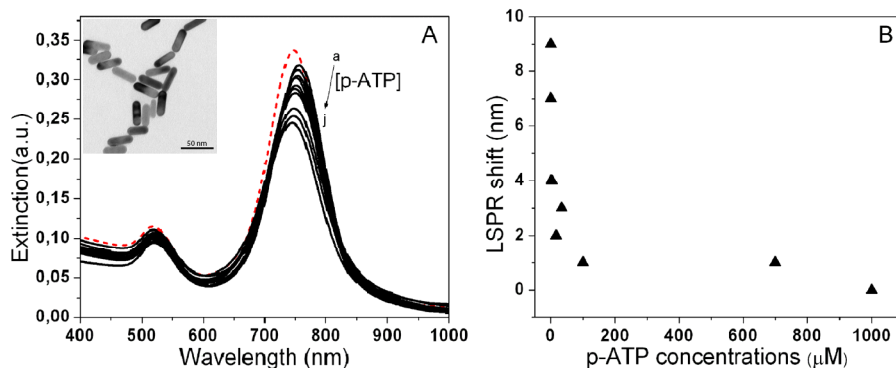
#### ***APLICATII ALE NANOBASTONASELOR DE AUR STABILIZATE CU CTAB***

##### **3.1 Studii de spectroscopie de rezonanta a plasmonilor de suprafata localizati (LSPR) si spectroscopie Raman amplificata de suprafata (SERS) asupra adsorptiei para-aminotiofenolului la suprafata nanobastonaselor de aur**

*In sectiunea de fata sunt explorate proprietatile optice ale AuNRs in vederea investigarii prin LSPR si SERS a adsorptiei para-aminotiofenolului (p-ATP) la suprafata AuNRs in functie de concentratia de analit si pH-ul solutiei. Distributia campului electromagnetic la suprafata AuNRs individuale si asamblate cap-la-cap este evaluata prin simulari efectuate cu metoda Diferentelor Finite in Domeniul Temporal (FDTD). In plus, se punctateaza o problema recent dezbatuta si controversata in literatura de specialitate, privind interpretarea spectrului SERS al unor noi specii formate prin cuplarea moleculelor de p-ATP.*

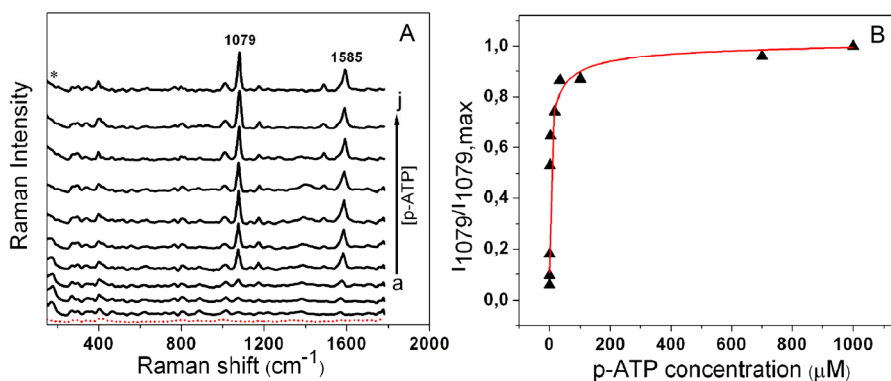
###### *3.1.1 Analiza dependentei spectrelor LSPR/SERS de concentratia de analit*

In prima etapa a fost investigat raspunsul optic al conjugatelor p-ATP/AuNRs in functie de concentratia de p-ATP. Figura 3-1A prezinta spectrele LSPR a 10 tipuri de conjugate preparate cu diferite concentratii de p-ATP. Banda de rezonanta plasmonica longitudinala scade in intensitate si se deplaseaza spectral o data cu cresterea concentratiei de p-ATP. Deplasarea inspre lungimi de unda mai mari scade prin cresterea cantitatii de analit, efect ce poate fi explicat ca o combinatie intre 2 efecte, si anume legarea moleculelor de p-ATP si desorbtiia celor de CTAB.



**Figura 3-1** (A) Spectrele de extincție ale AuNRs marcate cu p-ATP în soluție, înregistrate la diferite concentrații de p-ATP cuprinse între  $0.034 \mu\text{M}$  și  $1 \text{ mM}$  (a-j). Curba punctată corespunde soluției de AuNRs neconjugate. (B) Deplasarea benzii plasmonice longitudinale în funcție de concentrația de p-ATP.

Ilustrat în Figura 3-2A, semnalul SERS al moleculei de p-ATP crește sistematic o dată cu creșterea concentrației de analit. Spectrele SERS sunt dominate de modurile  $a_1$  de la  $1079 \text{ cm}^{-1}$  și  $1585 \text{ cm}^{-1}$  atribuite vibrațiilor de întindere ale legăturilor C-S și C-C. Acoperirea AuNRs cu p-ATP ajunge la saturatie pentru o concentrație  $\sim 100 \mu\text{M}$ , rezultat care este coroborat cu limita de detecție din LSPR (vezi Figura 3-1B). Prin interpolarea datelor experimentale din Figura 3-2B se obține un coeficient de adsorbție de  $3.55 \cdot 10^{-5} \text{ M}^{-1}$ .

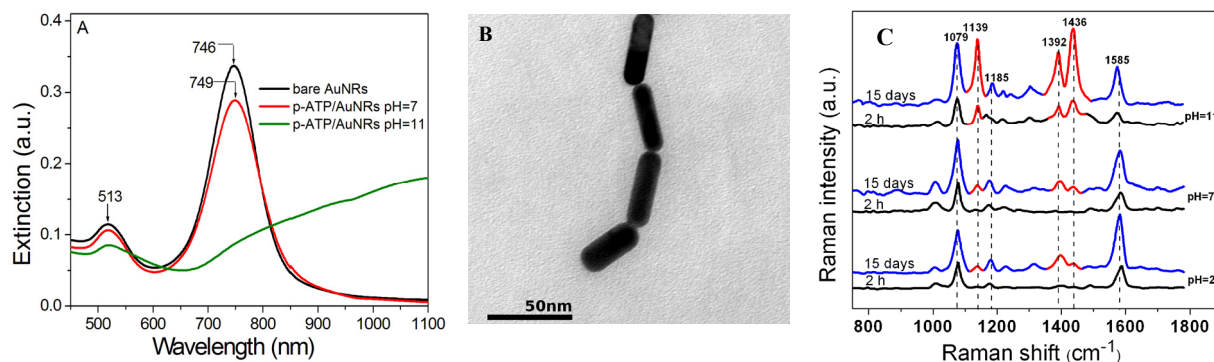


**Figura 3-2** (A) Spectrele SERS ale AuNRs marcate cu p-ATP în soluție, înregistrate la diferite concentrații de p-ATP cuprinse între  $0.034 \mu\text{M}$  și  $1 \text{ mM}$  (a-j). Curba punctată corespunde soluției de AuNRs neconjugate. (B) Langmuir curve.

### 3.1.2 Analiza dependentei spectrelor LSPR și SERS de pH-ul soluției

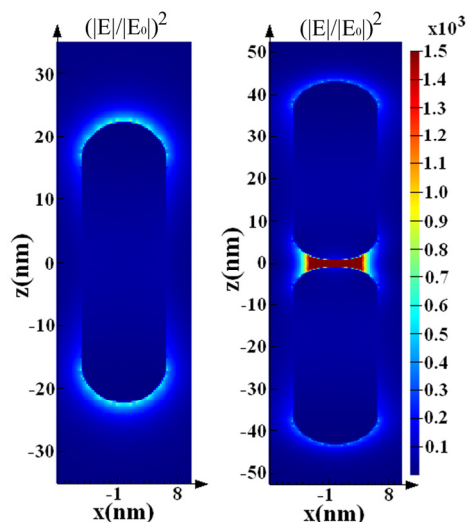
Următorul obiectiv a constat în investigarea modificărilor aduse de variația pH-ului soluției conjugatelor p-ATP/AuNRs asupra răspunsului lor LSPR și SERS. Astfel, la  $\text{pH} \sim 11$  se

observa o scadere semnificativa in intensitate a benzii de rezonanta longitudinala o data cu aparitia unui umar larg in regiune NIR-IR, ce ar putea indica asamblarea AuNRs cap-la-cap si acapararea moleculelor p-ATP in interspatiul dintre ele, cum e sugerat in figura (Figura 3-3A,B).



**Figura 3-3** (A) Spectrele de extincție ale AuNRs și conjugatelor p-ATP/AuNRs (concentrație p-ATP de 24 μM) în soluție la 2 pH-uri. (B) Imagine TEM reprezentativă a conjugatelor p-ATP/AuNRs la pH=11 și (C) spectrele SERS ale conjugatelor p-ATP/AuNR în soluție la 3 pH-uri, înregistrate la 2h (i) și 15 days (ii). Excitare: laserul 785 nm.

Spectrul SERS al conjugatelor la pH~11, ilustrat în Figura 3-3C, prezintă pe lângă modurile  $a_1$ , trei noi benzi la 1139, 1392 și 1436 cm<sup>-1</sup>, ce pot fi atribuite unei noi molecule, p,p'-dimercaptoazobenzene (DMAB), formată prin reacția de cuplare catalitică a moleculelor de p-ATP. Figura 3-4 arată distribuția intensității câmpului electromagnetic la suprafața AuNRs individuale și asamblate cap-la-cap la lungimea de undă de 785 nm, conform liniei laser utilizată în experimente.



**Figure 3-4** Distribuția câmpului electromagnetic la suprafața AuNRs la 785 nm: (stanga) bastonas individual și (dreapta) doua AuNRs cuplate cap-la-cap. Dimensiuni AuNRs: 42.5 × 12.5 nm lungime/grosime.

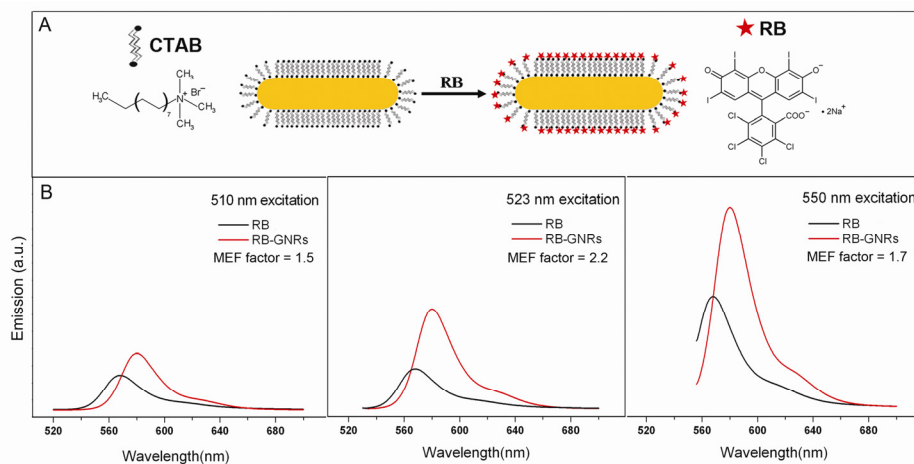
In cazul cuplarii cap-la-cap, in interstiul dintre nanoparticule se obtine un camp electromagnetic mult mai intens datorita cuplarii plasmonilor, ceea ce induce o amplificare si mai mare a semnalului Raman al moleculelor, determinand ceea ce se numeste „SERS hot spot”.

### 3.2 Nanosenzori plasmonici duali bazati pe nanobastonase de aur pentru detectia fluorescentei amplificate de metal (MEF) si a imprastierii Raman amplificate de suprafata (SERS)

In acest subcapitol este detaliat modul de obtinere a unor eficienti nanosenzori plasmonici cu multiplu raspuns spectroscopic bazat pe AuNRs stabilizate cu CTAB marcate cu molecule fluorescente de Rose Bengal (RB). In timp ce stratul de CTAB acapareaza moleculele de RB la o distanta favorabila de metal indeajuns pentru a se evita stingerea fluorescentei, excitarea selectiva a celor doua benzi de rezonanta plasmonica a AuNRs duce la amplificarea selectiva a emisiei de fluorescenta si a imprastierii Raman. Mai mult, se demonstreaza faptul ca excitarea rezonanta concomitenta a moleculelor de RB si ai PS ai AuNRs permite detectia simultana a semnalelor de Imprastiere Raman Rezonanta Amplificata de Suprafata (SERRS) si MEF.

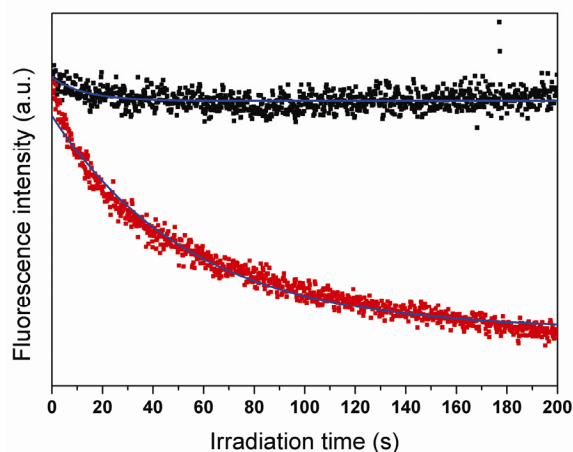
#### 3.2.1 Testarea substratului ca senzor MEF

In acest experiment, amplificarea semnalului de fluorescentei este asigurata de catre moleculele de CTAB care joaca un dublu rol, si anume atat de strat separator cat si de molecule de legatura prin fixarea moleculelor de CTAB la aproximativ 4 nm de metal (Yu, 2007) precum este aratat si in schema din Figura 3-5A.



**Figura 3-5** (A) Schema ilustrativa a legarii moleculelor de RB la suprafata AuNRs stabilizate cu CTAB. (B) Spectrele de emisie corespunzatoare conjugatelor RB-AuNRs si moleculelor libere de RB in apa, obtinute la 3 lungimi de excitatie diferite: 510, 523 si 550 nm.

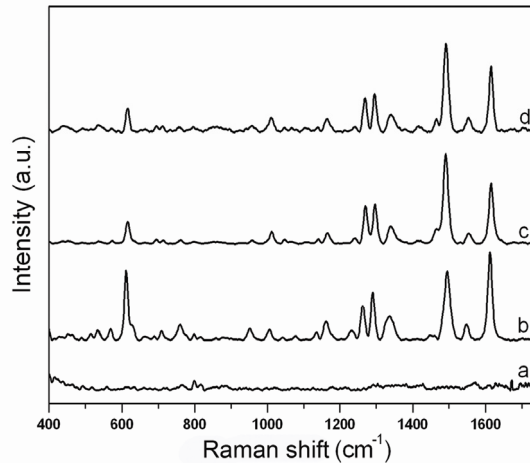
Indiferent de lungimea de unda de excitatie, spectrul de fluorescanta corespunzator conjugatelor RB-AuNRs este amplificat comparativ cu cel caracteristic moleculelor libere de RB. Cea mai mare amplificare de 2.2 este obtinuta atunci cand atat moleculele de RB cat si banda de rezonanta transversala a AuNRs din componenta conjugatelor sunt excitate rezonant cu lungimea de unda de 532 nm. Se presupune faptul ca efectul de amplificare a fluorescetei se bazeaza pe ambele mecanisme MEF, si anume cresterea emisiei radiative atunci cand bastonasele se comporta ca nanoantene optice eficiente si cresterea ratei de excitatie in cazul excitarii rezonante a plasmonilor de suprafata (Bharadwaj, 2009). Cresterea ratei radiative a moleculelor de RB in prezenta AuNRs este strans legata de cresterea timpului de fluorescanta. Astfel, a fost examinata fotostabilitatea moleculelor de RB libere si in stare conjugata prin inregistrarea intensitatii de emisie sub iradiere in flux continuu cu lumina laser. Asa cum este ilustrat in Figura 3-6, fluorescanta moleculele de RB in stare libera este mult mai repede stinsa decat a celor in stare conjugata, indicand cresterea fotostabilitatii fluoroforului in prezenta suprafetei metalice. Scaderea probabilitatii de stingere a fluorescetei demonstreaza indirect reducerea timpului de fluorescanta si, implicit contributia cresterii eficientei cuantice (ex. rata radiativa) in observarea fenomenului MEF.



**Figura 3-6** Rata de stingere a fluorescetei a conjugatelor RB-AuNRs (puncte negre) comparative cu rata moleculelor libere de RB (puncte rosii) in cazul iradierii continue cu lumina laser cu lungimea de unda de 532 nm.

### 3.2.2 Testarea substratului ca sensor SERS

Figura 3-7 arata comparative spectrele SERS corespunzatoare conjugatelor RB-AuNRs si moleculelor de RB in stare libera in solutie.



**Figura 3-7** Spectrele Raman si SERS pentru: (a) RB liber in solutie ( $10^{-6}$  M), (b) conjugate RB-AuNRs in solutie ( $10^{-6}$  M), (c) RB liber in solutie ( $5 \times 10^{-2}$  M), (d) conjugate RB-CTAB in solutie ( $5 \times 10^{-2}$  M). Excitare: linia laser 785 nm.

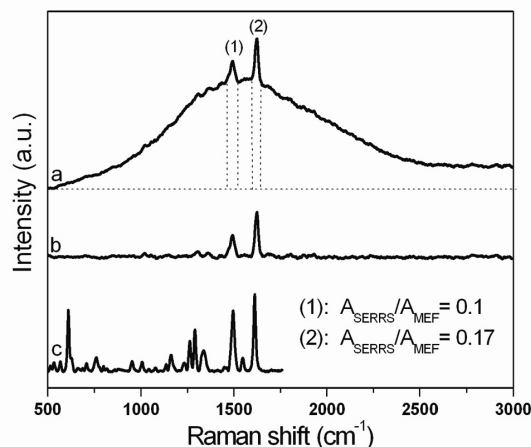
Pentru atribuirea benzilor de vibratie s-au utilizat bazele bibliografice existente asupra RB si altor molecule xantanice (Narayanan, 1994; Maciejewska, 1993; Vosgrçne, 2005). Cele mai importante observatii se refera la amplificarii benzilor de vibratie C-I si C-Cl de la  $611 \text{ cm}^{-1}$  and  $760 \text{ cm}^{-1}$ , precum si la amplificarea si modificarea raportului de aspect dintre intensitatile vibratiilor  $\nu_{\text{as}}(\text{C}=\text{C})$  and  $\nu_{\text{s}}(\text{C}=\text{C})$  de la  $1495 \text{ cm}^{-1}$  and  $1612 \text{ cm}^{-1}$  ceea ce sugereaza orientarea moleculelor de RB cu gruparile  $-\text{O}^-$  si  $-\text{COO}^-$  in directia gruparii  $(\text{CH}_3)_3\text{N}^+$  din structura moleculei de CTAB. Avand ca referinta banda de la  $611 \text{ cm}^{-1}$ , s-a obtinut un factor mediu de amplificare experimental de  $1.7 \times 10^5$ .

### 3.2.3 Multiplexarea raspunsului spectroscopic

Conjugatele RB-AuNRs prezinta abilitatea de a amplifica simultan semnalele de fluorescenta si Raman prin excitare la anumite lungimi de unda laser. Excitarea la 785 nm, situata departe de banda de absorptie a moleculei de RB, permite doar obtinerea unei amplificari a semnalului SERS, precum este detaliat in paragrafele anterioare. Insa, excitarea conjugatelor cu linia laser de 532 nm, situata in rezonanta atat cu banda de absorptie a RB cat si cu rezonanta plasmonica a substratului, este posibila detectia simultana a semnalelor MEF si de Imprastiere Raman Rezonanta Amplificata de Suprafata (SERRS). In mod normal in conditii de rezonanta, fluorescenta este stinsa de catre metal, insa in cazul nostru moleculele fluorescente sunt avantajos plasate la distanta fata de metal, pentru a impiedica acest lucru. Figura 3-8 prezinta

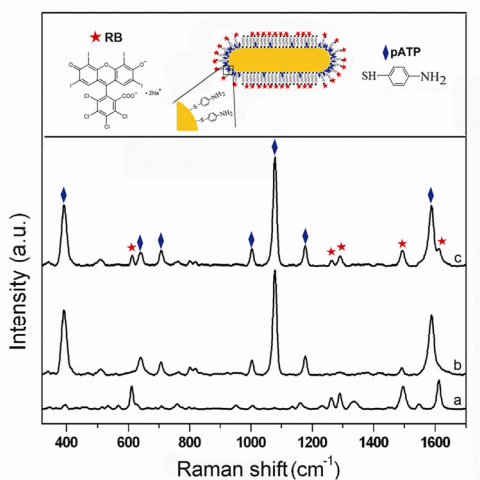


spectrul conjugatelor RB-AuNRs obtinut prin excitare la 532 nm la o intensitate sub nivelul de saturatie (spectrul a).



**Figura 3-8** Spectrele MEF si SERS corespunzatoare conjugatelor RB-AuNRs: (a) spectrele MEF si SERRS suprapuse (b) spectrul SERRS obtinut dupa substragerea background-ului de fluorescenta (c) spectrul SERS obtinut la 785 nm excitare.

In vederea demonstrarii potentialului AuNRs stabilizate cu CTAB de a functiona ca nanosenzori SERS multifunctionali, am marcat conjugatele RB-AuNRs cu o a doua molecula, non-fluorescenta, activa SERS si anume molecula de pATP. Spectrum SERS caracteristic conjugatelor astfel obtinute prezinta benzile reprezentative ale ambelor reporteri Raman (vezi Figura 3-9 spectrul c) asa cum rezulta din compararea cu spectrele SERS ale conjugatelor pATP-AuNRs and RB-AuNRs (Figura 3-9 spectrele a and b).



**Figura 3-9** Spectrele SERS ale conjugatelor: (a) RB-AuNRs, (b) pATP-AuNRs si (c) pATP-RB-AuNRs in solutie. Excitare: linia laser 785 nm.

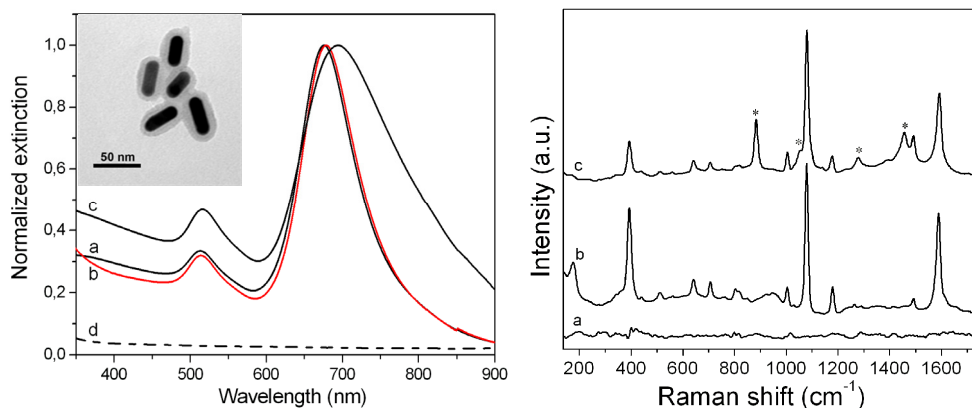
## CAPITOLUL 4

### NANOBASTONASE DE AUR INVELITE IN SILICA CA EFICIENTE PLATFORME PLASMONICE

In acest capitol se arata abilitatea AuNRs invelite in  $\text{SiO}_2$  marcate cu doua clase diferite de molecule reporter Raman de a fi utilizate ca si nano-reporteri in spectroscopia SERS in domeniul infra-roosu apropiat (NIR). De asemenea, ca urmare a utilizarii unor AuNRs cu rezonante plasmonice suprapuse peste banda de absorptie a moleculei de Nile Blue se demonstreaza abilitatea sistemului astfel creat de a functiona ca platforma plasmonica cu dublu raspuns spectroscopic prin SERRS si MEF.

#### 4.1 Testarea substratelor pentru detectie SERS in NIR

p-ATP a fost prima molecula reporter Raman aleasa pentru etichetarea AuNRs cu raport de aspect de 2.7 ce poseda o banda de rezonanta plasmonica longitudinala centrata la 676 nm. Dupa incubare cu p-ATP, banda transversala este deplasata cu 3 nm inspre lungimi de unda mai mari, sugerand legarea preferentiala a moleculelor de p-ATP ca capete bastonaselor. Ca urmare a invelirii ulterioare a AuNRs marcate intr-un strat de  $\text{SiO}_2$ , banda longitudinala este deplasata suplimentar cu 15 nm (vezi Figura 4-1 (stanga) – curba c). Stratul de silica este de asemenea vizibil in imaginea TEM ca un strat uniform de 9 nm grosime aproximativ, in jurul AuNRs.

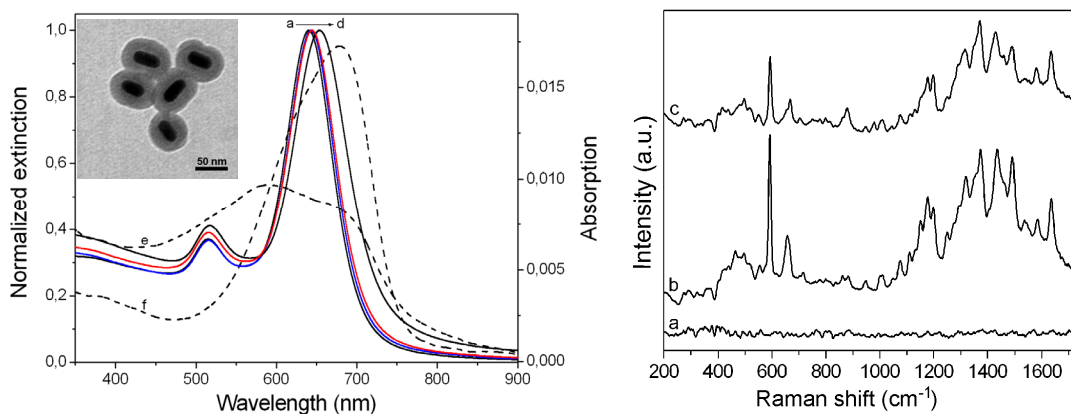


**Figura 4-1** (Stanga): Spectrele de extinctie normalizate corespunzatoare AuNRs simple (a) si conjugatelor p-ATP/AuNRs inainte (b) si dupa (c) invelire in  $\text{SiO}_2$ ; (d) p-ATP liber in solutie apoasa ( $10^{-5}$  M); Inset: Imagine TEM a conjugatelor p-ATP/AuNRs invelite in  $\text{SiO}_2$ . (Dreapta): (a) Spectrul Raman al moleculelor de p-ATP libere in solutie ( $10^{-5}$  M) si spectrele SERS ale conjugatelor p-ATP/AuNRs inainte (b) si dupa (c) invelire in  $\text{SiO}_2$ , in solutie. \* benzile Raman ale etanolului. Excitare: linia laser: 785 nm.

Dupa invelirea cu success a conjugatelor p-ATP/AuNRs in  $\text{SiO}_2$ , am fost interesati sa demonstram abilitatea substratelor fabricate de a functiona ca si platforme active SERS in NIR.

Figura 4-1 (dreapta) ne arata ca semnalul puternic SERS emis de catre conjugatele p-ATP/AuNRs este conservat dupa incapsulare in SiO<sub>2</sub> prin excitare cu linia laser 785 nm.

In continuare, am fabricat un al doilea tip de sistem activ NIR-SERS bazat pe AuNRs invelite in SiO<sub>2</sub> utilizand ca marker molecula fluorescanta pozitiv incarcata Nile Blue, binecunoscuta pentru proprietatile sale fotosensibilizatoare. In vederea imbunatatirii legarii moleculelor de suprafata metalica, am modificat pH-ul solutiei inspre valori alcaline pentru deprotonarea partiala a gruparilor pozitive din molecula NB si astfel, slabirea repulsiei cu CTAB. Fomarea conjugatelor este dovedita de catre red-shiftul benzii longitudinale a AuNRs pe cand deplasarea aditionala observata indica invelirea in SiO<sub>2</sub>. Grosimea stratului de SiO<sub>2</sub> format este de aproximativ 16 nm asa cum se poate deduce din imaginea TEM.



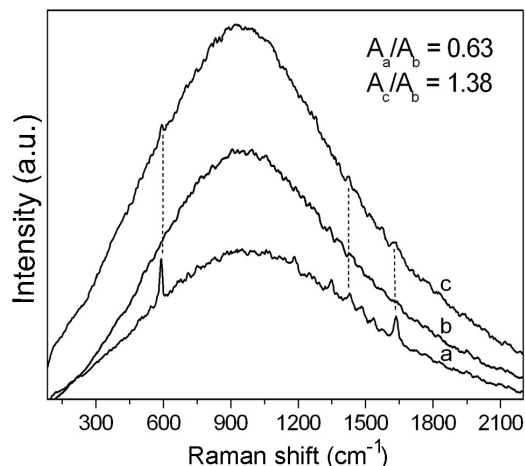
**Figura 4-2** (Stanga): Spectrele de extincție normalizate ale: (a) AuNRs, conjugatelor NB/AuNRs la (b) pH=6 si (c) pH=10 si (d) invelite in SiO<sub>2</sub>. Spectrul de absorpție al moleculelor de NB libere in solutie ( $1.5 \times 10^{-6}$  M) la (e) pH=6 si (f) pH=10. Inset: Imagine TEM a conjugatelor NB/AuNRs invelite in SiO<sub>2</sub>. (Dreapta): (a) Spectrul Raman al moleculelor de p-ATP libere in solutie ( $1.5 \times 10^{-6}$  M), si spectrele SERS ale conjugatelor NB/AuNRs in solutie (b) la pH 10 si (c) dupa invelire in SiO<sub>2</sub>. Excitare: linia laser 785 nm.

Spectrul SERS caracteristic molecule de NB (Figura 4-2 (dreapta) - curba b) prezinta numeroase benzi caracteristice ce sunt inca detectabile dupa invelirea conjugatelor in SiO<sub>2</sub>, demonstrand abilitatea substratelor create de a functiona ca si nanosenzori NIR-SERS.

#### 4.2 Testarea dualitatii substratelor in detectia multiplexata SERRS-MEF

In vederea fabricarii de conjugate biocompatibile dublu-responsive cu aplicabilitate in investigatii biologice, studiile noastre au fost extinse prin investigarea raspunsului spectroscopic al conjugatelor NB-AuNRs invelite in SiO<sub>2</sub>, in conditii de excitare rezonanta cu ajutorul liniei laser de 633 nm. Din raspunsul conjugatelor NB-AuNRs se observa faptul ca semnalul de

fluorescenta este doar partial stins de catre suprafata metalica permitand detectarea simultana la rezonanta a fluorescentei si a semnalului SERRS (Figura 4-3 curba a). Acest raspuns spectroscopic multiplex a putut fi detectat si dupa depunerea unui strat de SiO<sub>2</sub>. In ciuda scaderii in intensitate, cele mai importante benzi Raman sunt inca vizibile impreuna cu semnalul de fluorescenta amplificat.



**Figura 4-3** Spectrele de fluorescenta si Raman suprapuse ale moleculelor de NB in conditii de rezonanta: (a) spectrul fluorescenta/SERRS al conjugatelor NB/AuNRs la pH=10, (b) spectrul de fluorescent al moleculelor libere de NB in apa ( $1.5 \times 10^{-6}$  M) la pH=10 si (c) spectrul MEF/SERRS al conjugatelor NB/AuNRs invelite in SiO<sub>2</sub>. Excitare: linia laser 633 nm.

## **CAPITOLUL 5**

### ***INVESTIGATII ALE INTERACTIUNII FLUOROFOR-METAL LA NIVEL DE NANOPARTICULA INDIVIDUALA PRIN MICROSCOPIE SI SPECTROSCOPIE OPTICA***

*Interactiunea complexa a nano-obiectelor metalice cu moleculele fluorescente a fost intens studiată de-a ultimelor decenii ca fiind un subiect extreme de provocator. In acest context, microspectroscopia optica reprezinta o metoda ideala pentru caracterizarea si analiza cu acuratete a nano-probelor fluorescente.*

*Scopul acestui capitol a fost asadar de a furniza o caracterizare optica fiabila a nanoparticulelor de aur marcate cu fluorofori prin studii de microscopie si spectroscopie optica pe nanoparticule individuale.*

#### **5.1 Caracterizarea optica a nanocapsulelor de aur ce inglobeaza fluorofori**

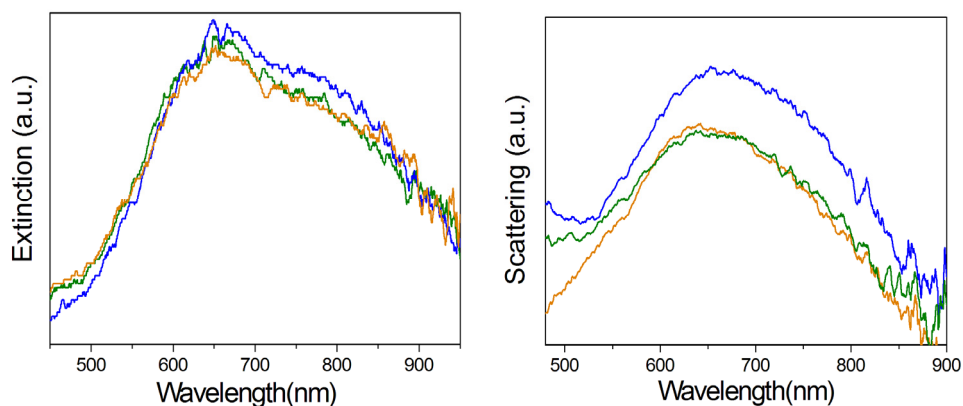
*Obiectivul acestui studiu a fost acela de a investiga prin analize de microscopie si spectroscopie optica pe particule izolate, proprietatile optice ale unui nou tip de nanoparticule fluorescente constand in nanocapsule de aur ce incorporeaza in interiorul lor lichid molecule de*

*fluorofori. Acesti coloizi reprezinta un nou model de nanoparticule hibride cu proprietati de fluorescent indeajuns de puternice pentru a fi observate si detectate pentru prima oara.*

Probele analizate au fost preparate in cadrul grupului de chimie al Laboratorului de Multimateriale si Interfete al Universitatii Claude Bernard din Lyon. Probele analizate au fost obtinute prin doparea nanocapsulelor de aur cu molecule de fluorofor derivat al dibromobenzenului (DmT) cu o grupare tiolica ce permite grefarea directa a acestuia de suprafata metalica.

### 5.1.1 Masuratori de extinctie si imprastiere a luminii

Dupa cum este ilustrat in Figura 5-1, nanoparticulele prezinta o banda larga de extinctie cu doua rezonante in regiunea spectrala cuprinsa dintre 600 si 800 nm. In mod specific, se poate distinge o banda principala situata la 650 nm alaturi de un umar de rezonanta in jurul valorii de 780 nm. Potrivit unei versiuni generalizate a teoriei imprastierii luminii elaborate de Mie (Sarkar, 1997), banda de la 650 nm corespunde contributiei cuadrupolilor.

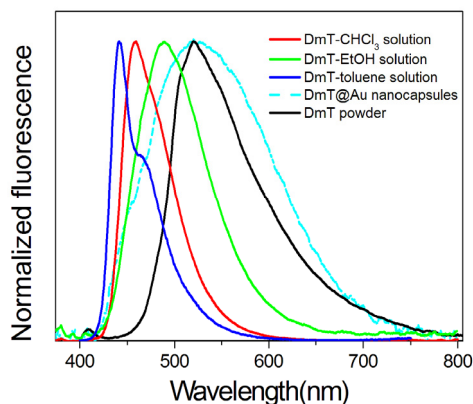


**Figura 5-1** Spectre de extinctie (stanga) si imprastiere (dreapta) colectate de la nanoparticule individuale DmT@Au redisersate in filme subtiri de BSA.

Studiul de fata a fost continuat prin inregistrarea spectrelor de imprastiere ale nanoparticulelor individuale DmT@Au in camp intunecat, in vederea estimarii contributiei acesteia la extinctia totala. Se observa faptul ca pierderile in transmisie se datoreaza in principal imprastierii luminii care are o contributie semnificativa, fapt ce poate fi observat prin compararea celor doua tipuri de spectre. Astfel pierderile prin absorptie sunt mult inferioare, fapt ce se datoreaza dimensiunilor mari ale nanoparticulelor.

### 5.1.2 Masuratori de fluorescenta

Pasul urmator in studiul nostru a fost de a evalua proprietatile de fluorescenta ale nanocapsulelor si de intelege locatia moleculelor de fluorofor precum si interactiune acestuia cu suprafata metalica. Din Figura 5-2 se observa faptul ca emisia de fluorescenta a moleculei de DmT localizata in interiorul capsulei este mult deplasata inspre lungimi de unda mai mari comparativ cu emisia moleculei libere redispersata in diversi fluorofori. Pozitia coincide insa cu pozitia benzii de fluorescenta a moleculei in stare solida. Cunoscand faptul ca aceasta nu este solubila in apa, putem concluda faptul ca fluoroforul se afla in stare agregata in interiorul lichid al capsulei.



**Figura 5-2** Spectrele de fluorescenta normalizate ale compusului DmT in diferiti solvent precum si in stare solida alaturi de spectrul de emisie al fluoroforului din complexul DmT@Au in film de BSA obtinute cu lungimea de unda de excitatie de 365 nm.

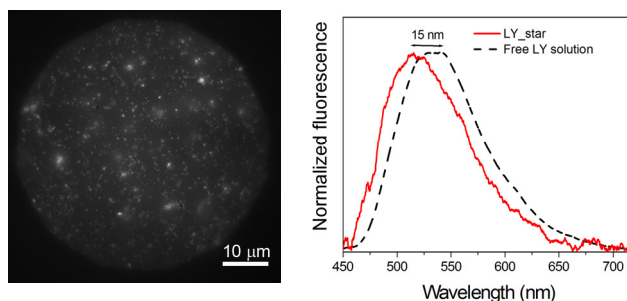
## 5.2 Studii de microscopie si spectroscopie de fluorescenta asupra nanoparticulelor de aur grefate direct cu fluorofori

*Aceasta sectiune cuprinde rezultate asupra prepararii cu success a unor nanoprobe intens fluorescente bazate pe AuNPs de forma stelara si bipiramidala grefate direct cu fluorofori ce au fost caracterizate prin imagistica microscopica si spectroscopie de fluorescenta.*

Pe scurt, am investigat interactiunea moleculei Lucifer Yellow Cadaverine (LY), un fluorofor comercial intens folosit in biologia celulara, cu doua tipuri de AuNPs : de forme stelara si bipiramidala. Sinteza nanoparticulele si conjugarea acestora cu fluorofori a fost realizata de catre grupul de chimie al Laboratorului de Multimateriale si Interfete al Universitatii Claude Bernard din Lyon.

### 5.2.1 Nanoparticule de aur de forma stelara grefate cu fluorofori

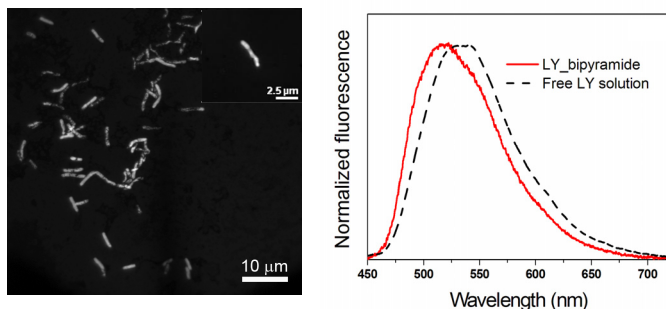
In urma excitarii cu lumina de lungime de unda de 390 nm, in rezonanta cu banda principala de absorptie a moleculei LY, conjugatele au fost detectate cu succes prin epi-fluorescenta ca fiind intens fluorescente (vezi Figura 5-3 (stanga)). Semnalul de fluorescenta emis de catre LY in stare conjugata prezinta un blue-shift de 15 nm in comparatie cu semnalul moleculei in stare libera ca urmare a interactiunii aparute intre nanoparticule si fluorofori (vezi Figura 5-13 B).



**Figura 5-3** (Stanga) Imagine de fluorescenta a conjugatelor LY\_star obtinuta in epi-fluorescenta. (Dreapta) Spectrele de fluorescenta normalizate ale molecule de LY in stare conjugata si libera in solutie. Excitare: 390 nm.

### 5.2.2 Nanoparticule de aur de forma bipiramidala grefate cu fluorofori

Excitarea rezonanta a benzii de absorptie a moleculei de LY la 390 nm determina aparitia emisiei de fluorescenta a moleculelor grefate la suprafata nanoparticulelor de aur de forma bipiramidala. In mod surprinzator, nanoparticulele individuale tind sa se autoasambleze in nanostructuri de tip lant, intens fluorescente, fenomen ilustrat prin imaginea de fluorescenta din Figura 5-4 (stanga).



**Figura 5-4** (Stanga) Imagine de fluorescenta a conjugatelor LY\_bipyramide obtinuta in epi-fluorescenta. (Dreapta) Spectrele de fluorescenta normalizate ale fluoroforului LY in stare libera si conjugata la suprafata AuNPs in solutie. Excitatie: 390 nm.

Atenta analiza nanostructurilor fluorescente indica prezenta a aproximativ 10 nanoparticule de forma bipiramidala in componenta unui nano-lant format. Spectrul de fluorescenta a unei astfel de structuri este prezentat in Figura 5-4 (dreapta). Se observa faptul ca banda de fluorescenta corespunzatoare fluoroforilor este deplasata inspre lungimi de unda mai mici in cazul conjugatelor comparativ cu cazul moleculelor libere demonstrand astfel aparitia unei interactiuni intre LY si nanoparticule.

## **CAPITOLUL 6**

### ***STUDII DE ACUMULARE IN CELULE A NANOPARTICULELOR DE AUR EFECTUATE PRIN MICROSCOPIE SI SPECTROSCOPIE IN CAMP INTUNECAT***

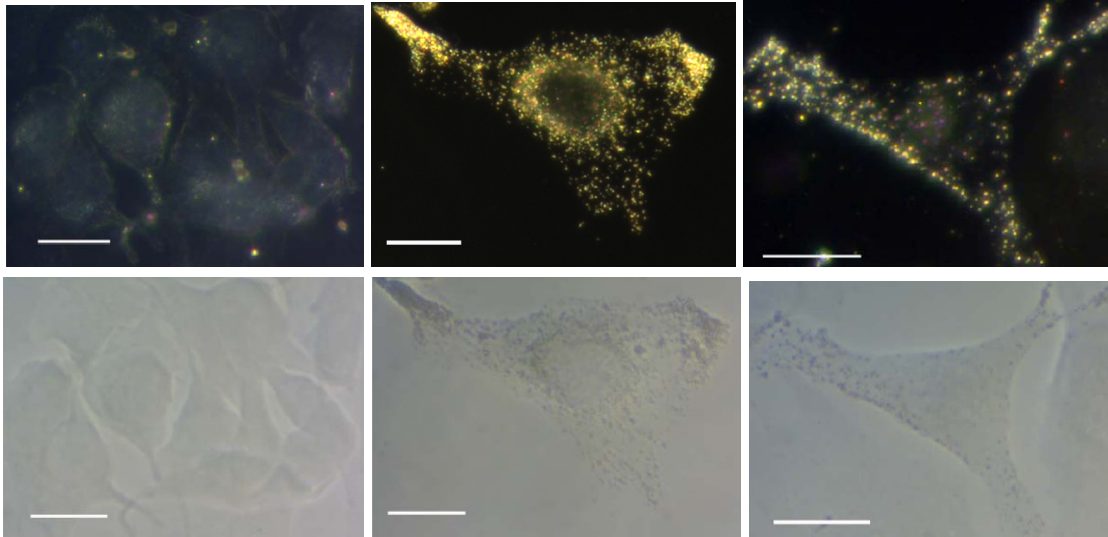
*In ciuda aplicabilitatii deja demonstrate a AuNPs intr-o larga varietate de aplicatii biomedicale, investigarea interactiunii lor cu sistemele biologice reprezinta un subiect de interes constant in comunitatea stiintifica de specialitate datorita necesitatii modelarii lor in vederea imbunatatirii stabilitatii, eficientei si a biocompatibilitatii. In acest capitol sunt prezentate cateva studii de acumulare celulara efectuate asupra nanoparticulelor de aur de diferite forme si invelite in diversi polimeri prin imagistica in camp intunecat si contrast de faza precum si spectroscopie de imprastiere a luminii.*

Pentru aceste studii au fost utilizate doua tipuri de nanoparticule: (i) AuNPs de forma stelara si bipiramidala biocompatibilizate cu poli(etilen) glycol tiolat (PEG<sub>2000</sub>-SH) si (ii) nanosfere de aur (AuNSs) invelite intr-un nou model de biopolymer sintetizat in laborator sub forma de lanturi avand o masa moleculara estimata la 32200 kDa (polimer<sub>32k</sub>), grefat cu molecule fluorescente.

#### **6.1 Teste de acumulare in celule ale nanoparticulelor de aur PEGylate**

Acumularea AuNPs PEGylate de catre in celulele canceroase B16-F10 a fost evaluata prin imagistica in camp intunecat si contrast de faza. In absenta AuNPs, celulele tumorale imprastie extrem de slab lumina incidenta care este distribuita uniform in interiorul celulei, putand fi detectat un numar infim de spoturi luminoase (Figura 6-1). Dupa incubarea timp de 24h cu AuNPs PEGylate in concentratie de ~ 0.5 nM, celule tumorale imprastie semnificativ mai mult lumina incidenta. Imaginile in camp intunecat confirma prezenta AuNPs in veziculele din citoplasma celulara. AuNPs internalizate apar sub forma unor spoturi extrem de luminoase datorita abilitatii lor a imprastia lumina in mod eficient.

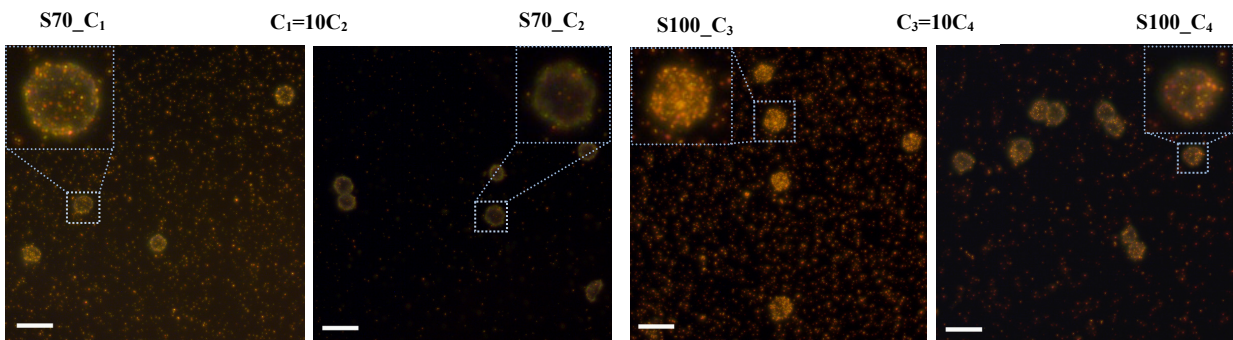




**Figura 6-1** Imagini de microscopie in camp intunecat (sus) si contrast de faza (jos) ale celulelor canceroase B16-F10 fara AuNPs (stanga) si incubate cu AuNPs PEGylate de forma stelara (mijloc) si bipiramidala (dreapta). Scala: 20  $\mu\text{m}$ , in toate imaginile.

## 6.2 Teste de acumulare in celule ale nanoparticulelor de aur acoperite cu polimer\_32k

In aceasta sectiune este evaluata influenta concentratiei si a dimensiunii AuNPs asupra gradului de acumulare in celule canceroase B16-F10 si limfoide BaF3 a AuNPs de forma sferica (AuNSs) invelite in polimeri. In Figura 6-2 sunt prezentate imagini ilustrative in camp intunecat ale celulelor BaF3 incubate cu AuNSs cu dimensiuni de 70 si 100 nm, imbracate in polimer. Acumularea in interiorul celulelor este demonstrata de aparitia unor spoturi luminoase ce imprastie lumina in culori de galben si portocaliu in citoplasma. Gradul de imprastiere al luminii creste direct proportional cu cresterea concentratiei si a dimensiunii AuNSs.



**Figura 6-2** Imagini de microscopie in camp intunecat ale celulelor Baf3 incubate cu AuNSs cu polimer\_32k cu diametru de 70 nm (stanga) and 100 nm (dreapta). Au fost utilizate cate 2 concentratii coloidale pentru fiecare tip de AuNSs, notate cu  $C_1$  and  $C_2$  pentru S70 si  $C_3$  and  $C_4$  pentru S100. Scala: 20  $\mu\text{m}$  in toate imaginile.

## CAPITOLUL 7

### *CONCLUZII FINALE SI PERSPECTIVE VIITOARE*

➤ In prima parte a tezei am sintetizat si caracterizat nanoparticule de aur (AuNRs) anizotropice de forma alungita de diferite rapoarte de aspect si stabilizate chimic cu diversi compusi moleculari. Am preparate cu succes diferite tipuri de AuNRs stabilizate cu bromura de cetiltrimetilamoniu (CTAB) prin metoda de crestere din germeni de cristalizare. Ulterior, in vederea imbunatatirii stabilitatii si a biocompatibilitatii, am incapsulat AuNRs sintetizate, in silica ( $\text{SiO}_2$ ) si polistiren sulfonat (PSS). Nanoconpozitele obtinute au fost caracterizate optic si morfologic.

Activitatile viitoare in acest domeniu se vor axa pe optimizarea procedului de incapsulare in  $\text{SiO}_2$  in vederea unui mai bun control al proprietatilor optice ale AuNRs precum si pe testarea altor biomateriale ca straturi protectoare.

➤ Ulterior, in vederea utilizarii AuNRs in aplicatii relevante, am studiat adsorptia moleculei reporter Raman p-ATP la suprafata AuNRs stabilizate cu CTAB prin investigarea efectului concentratiei moleculelor de p-ATP si al pH-ului solutiei asupra procesului, utilizand Spectroscopia de Rezonanta a Plasmonilor de Suprafata Localizati (LSPR) si Imprastierea Raman amplificata de Suprafata (SERS). Am corelat datele experimentale cu rezultatele teoretice obtinute prin metoda Diferentelor Finite in Domeniul Temporal (FDTD). De asemenea, am demonstrat formarea moleculei de p,p'-dimercaptoazobenzen (DMAB) prin transformarea chimica a moleculei de p-ATP la valori bazice ridicate ale pH-ului solutiei.

➤ O alta demonstratie semnificativa consta in fabricarea unei platforme plasmonice cu raspuns spectroscopic dual prin SERS si Fluorescenta Amplificata de Suprafete Metalice (MEF) in urma decorarii AuNRs stabilizate cu CTAB cu molecule fluorescente de Rose Bengal (RB). Am aratat faptul ca stratul de CTAB previne stingerea fluorescetei jucand un rol semnificativ in amplificarea semnalelor Raman si de fluoresceta prin excitarea selectiva a celor doua benzi de rezonanta a AuNRs. Detectia simultana a semnalelor MEF si SERRS a fost posibila prin excitarea simultana a benzii de absorptie a RB si a rezonantei plasmonilor a AuNRs. Aceasta

demonstratie reprezinta un rezultat original in domeniul utilizarii AuNRs ca platforme plasmonice multifunctionale.

➤ Am aratat de asemenea posibilitatea fabricarii de reporteri Raman eficienti in spectroscopia SERS in infrarosul apropiat prin marcarea de AuNRs invelite in  $\text{SiO}_2$  cu doua tipuri diferite de markeri SERS si anume, p-ATP, reprezentativ pentru categoria moleculelor cu o buna afinitate pentru aur inasa fara proprietati fluorescente, si Nile Blue (NB), o molecula fluorescenta cu o afinitate relativ scazuta pentru suprafetele metalice. Mai mult de atat, prin utilizarea de AuNRs invelite in silica ce posedea banda plasmonica in acelasi domeniu spectral cu absorptia moleculelor fluorescente de NB am demonstrat crearea unei platforme plasmonice cu dublu raspuns spectroscopic prin SERRS si MEF prin excitarea rezonanta a substratului.

➤ In cea de-a doua parte a tezei am analizat nano-probe fluorescente prin microspectroscopie optica efectuata pe particule individuale. Am demonstrat in prima faza, proprietatile de fluorescanta si de imprastiere a luminii ale unui nou tip de nanoparticule de tip core-shell cu interior lichid dopat cu molecule fluorescente prin microscopie si spectroscopie in camp luminos, intunecat si de fluorescanta.

➤ In plus, am utilizat microspectroscopia de fluorescanta pentru demonstrarea formarii de noi nano-probe fluorescente prin grefarea cu molecule de Lucifer Yellow a AuNPs de tip stelar si bipiramidal. Rezultate au aratat asamblarea AuNPs cu forma bipiramidala in lanturi nanometrice intens fluorescente in urma interatiunii cu LY.

Ca activitati viitoare, mentionez optimizarea procedurii de preparare a conjugatelor, testarea unor noi molecule fluorescente, precum si caracterizarea suplimentara prin TEM sau Microscopie de Forata Atomica (AFM).

➤ In ultima parte a tezei am dovedit fezabilitatea utilizarii AuNPs in aplicatii de imagistica intracelulara prin efectuarea de studii cantitative de acumulare celulara asupra diverselor tipuri de AuNPs invelite in polimeri. Astfel, AuNPs de forma stelara si bipiramidala biocompatibilizate cu poli(etilen) glycol tiolat au fost cu success internalizate de catre celulele tumorale B16-F10. De asemenea, am evaluat interactiunea AuNPs sferice invelite intr-un biopolimer ingenios sintetizat in laborator, cu celulele maligne B16-F10 si celulele limfoide BaF3 in functie de concentratia coloidala si de dimensiunea AuNPs utilizate.

## **REFERINTE**

- Bharadwaj P.**, Deutsch B., Novotny L. *Adv. Opt. Photon.* **2009**, 1, 438–483.
- Boca S**, Rugina D, Pinteá A, Barbu-Tudoran L, Astilean S. *Nanotechnology* **2011**, 22, 055702.
- Campion A.**, Kambhampati P. *Chem. Soc. Rev.* **1998**, 27, 241-250
- Huang C. J.**, Chiu P. H., Wang Y. H., Chen W. R., Meen T. H. *J Electrochem Soc.* **2006**, 153:D129.
- Huang X.**, Neretina S., El-Sayed M. A. *Adv. Mater.* **2009**, 21, 4880–4910.
- Lakowicz J. R.**, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Third Edition, Springer, **2006**.
- Maciejewska W.**, Polewski K., Grundwald-Wyspiadska M. *Carbohydr. Res.* **1993**, 246, 253-265.
- Mie G.** *Ann. Phys.* **1908**, 25, 377-445.
- Narayanan V. A.**, Stokes D. L., Vo-Dinh T. J. *Raman Spectrosc.* **1994**, 25, 415-422.
- Navarro J. R. G.**, Manchon D., Lerouge F., Cottancin E., Lermé J., Bonnet C., Chaput F., Mosset A., Pellarin M., Parola S. *Nanotechnology* **2012**, 23, 145707.
- Nehl C. L.**, Liao H., Hafner J. H., *Nano Lett.* **2006**, 6, 683–688.
- Sarkar D.**, Halas N. J. *Phys. Rev. E.* **1997**, 56, 1102-1112.
- Shankar S. S.**, Bhargava S., Sastry M. *J Nanosci Nanotechnol.* **2005**, 5, 1721-1727.
- Tiwari P. M.**, Vig K., Dennis V. A., Singh S. R. *Nanomaterials* **2011**, 1, 31-63.
- Vosgręne T.**, Meixner A. J. *Chem Phys Chem* **2005**, 6, 154–163.

## **LISTA PUBLICATIILOR**

### **Articole publicate in jurnale cotate ISI:**

1. **A. M. Gabudean**, M. Focsan, S. Astilean, *Gold Nanorods Performing as Dual-Modal Nanoprobes via Metal- Enhanced Fluorescence (MEF) and Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS)*, Journal of Physical Chemistry, C 116 (2012) 12240-12249. (IF 4.805)
2. **A. M. Gabudean**, D. Biro, S. Astilean, *Localized surface plasmon resonance (LSPR) and surface-enhanced Raman scattering (SERS) studies of 4-aminothiophenol adsorption on gold nanorods*, Journal of Molecular Structure, 993(2011) 420-424. (IF 1.634)
3. **A. M. Gabudean**, F. Lerouge, T. Gallavardin, M. Iosin, S. Zaiba, O. Maury, P. L. Baldeck, C. Andraud, S. Parola, *Synthesis and optical properties of dyes encapsulated in gold hollow nanoshells*, Optical Materials, 33(2011) 1377-1381. (IF 2.023)

### **Articole publicate in jurnale BDI:**

**A. M. Gabudean**, D. Biro, S. Astilean, *Synthesis and characterization of silica-encapsulated gold nanorods*, Studia Universitatis "Babeş-Bolyai" Physica, 55, nr. 2, 2010, 33-39.

### **Articole trimise spre publicare**

**A. M. Gabudean**, D. Biro, S. Astilean, *Hybrid plasmonic platforms based on silica-encapsulated gold nanorods as effective spectroscopic enhancers for Raman and fluorescence spectroscopy*, submitted to Nanotechnology (2012).

### **Articole in stransa legatura cu subiectul tezei**

1. S. Zaiba, F. Lerouge, **A. M. Gabudean**, M. Focsan, J. Lerne, T. Gallavardin, O. Maury, C. Andraud, S. Parola, and P. L. Baldeck, *Transparent Plasmonic Nanocontainers Protect Organic Fluorophores against Photobleaching*, Nano Letters 11 (2011) 2043-2047. (IF 13.198)
2. M. Potara, **A. M. Gabudean** and S. Astilean, *Solution-phase, dual LSPR-SERS plasmonic sensors of high sensitivity and stability based on chitosan coated anisotropic silver nanoparticles*, Journal of Materials Chemistry, 21 (2011) 3625-3633. (IF 5.968)
3. M. Focsan (Iosin), **A. M. Gabudean**, V. Canpean, D. Maniu and S. Astilean, *Formation of size and shape tunable gold nanoparticles in solution by bio-assisted synthesis with bovine serum albumin in native and denaturated state*, Materials Chemistry and Physics, 129 (2011) 939-942. (IF 2.234)
4. S. Boca, M. Potara, **A. M. Gabudean**, A. Juhem, P. Baldeck, S. Astilean, *Chitosan-coated triangular silver nanoparticles as a novel class of biocompatible, highly effective photothermal transducers for in vitro cancer cell therapy*, Cancer Letters, 311 (2011) 131-140. (IF 4.238)