

**UNIVERSITATEA "BABEȘ-BOLYAI"
FACULTATEA DE FIZICĂ**

**OPTIMIZAREA PARAMETRILOR FIZICO-
CHIMICI AI UNOR FILME EPITAXIALE DE AUR
ȘI SISTEME BIOMOLECULARE UTILIZATE
PENTRU CREȘTEREA CALITĂȚII VIETII**

Rezumatul tezei doctorale

**Realizată de către
Alia UNGUREAN**

**Conducător de doctorat
Prof. Dr. Leontin DAVID**

**CLUJ-NAPOCA
2014**



UNIVERSITATEA "BABEŞ-BOLYAI"
FACULTATEA DE FIZICĂ



**Optimizarea parametrilor fizico-chimici ai
unor filme epitaxiale de aur și sisteme
biomoleculare utilizate pentru creșterea
calității vieții**

Conducător de doctorat
Prof. Dr. Leontin David

Student-doctorand
Alia Ungurean

CLUJ-NAPOCA

2014

Cuprins

INTRODUCERE	2
Depunerea de filme subțiri de aur folosind tehnica de epitaxie în fascicul molecular.....	4
Detalii experimentale.....	4
Influența temperaturii substratului asupra proprietăților structurale și morfologice ale filmelor de Au/Si(111).....	5
Influența ratei de depunere asupra proprietăților structurale și morfologice ale filmelor de Au/Si(111)	9
Studii teoretice și spectroscopice ale unor antibiotice.....	12
Trimetoprim.....	12
Sulfametoxazol.....	22
Caracterizarea și discriminarea bacteriilor Gram - pozitive utilizând spectroscopiile Raman și SERS.....	33
Detalii experimentale.....	34
Spectrele Raman ale bacteriilor <i>L. casei</i> și <i>L. monocytogenes</i>	36
Spectrele SERS ale bacteriilor <i>L. casei</i> și <i>L. monocytogenes</i>	37
Discriminarea bacteriilor <i>L. casei</i> și <i>L. monocytogenes</i> pe baza analizei componentelor principale	40
CONCLUZII GENERALE.....	43
Bibliografie.....	45
Lista de publicații	48

Cuvinte cheie: *MBE, STM, Raman, SERS, filme subțiri de aur, antibiotice, bacterii Gram-pozitive.*

INTRODUCERE

Viața noastră se află într-o continuă schimbare, la fel ca și așteptările și perspectivele noastre asupra modului de trai. Omenirea este într-o permanentă încercare de a se adapta noului stil de viață alert, puternic influențat de către evoluția rapidă a tehnologiilor informaționale. În același timp, căutăm și încercăm să dezvoltăm noi metode și instrumente mai rapide, dar și mai blânde cu mediul, cu scopul final de a ne îmbunătăți calitatea vieții. Printre acestea se numără și metodele spectroscopice vibraționale, care au atras deja un interes considerabil și sunt utilizate cu succes în numeroase domenii de cercetare, printre care medicina, industria farmaceutică și chiar în domeniul asigurării calității alimentelor, tocmai datorită multiplelor avantaje, în detrimentul metodelor clasice.

Această teză a fost gândită ca un prim pas făcut înspre construirea și fabricarea de senzori miniaturizați, de înaltă sensibilitate și specificitate, cu posibile aplicații în îmbunătățirea calității vieții. Un parametru foarte important pentru obținerea unor astfel de dispozitive cu proprietăți senzoristice este reproductibilitatea. Pentru a obține rezultate reproductibile, este obligatorie o optimizare a procedurilor și metodelor experimentale, precum și a parametrilor experimentali. Scopul acestei tezei a fost acela de optimizare a parametrilor fizico-chimici a unor filme nanometrice de aur, dar și a unor sisteme biomoleculare cu aplicații în îmbunătățirea calității vieții.

Prima etapă a fost depunerea de filme metalice subțiri, cu terase atomice, care vor servi drept substrat pentru fabricarea de senzori și biosenzori. Doi parametrii experimentali au fost variați și optimizați, iar proprietățile structurale și morfologice ale filmelor de aur depuse au fost evaluate prin măsurători de difracție de raze X și prin microscopia de scanare prin efect tunel.

Următoarea etapă descrisă în această teză a constat în investigarea a două antibiotice (trimetoprim și sulfametoxazol) atât din punct de vedere teoretic, utilizând teoria funcționalei de densitate (DFT), cât și prin spectroscopiile IR, Raman și Raman amplificată de suprafață (SERS). Două modele teoretice au fost utilizate pentru a modela interacțiunea moleculei de trimetoprim cu suprafața de argint, această interacțiune având loc prin inelul de pirimidină, care se află perpendicular pe aceasta. Rezultatele sugerează că profilul spectrului experimental SERS este bine reprodus prin combinarea celor două modele teoretice folosite. Cel de-al doilea antibiotic studiat, sulfametoxazol, a fost

caracterizat prin spectroscopie FTIR/ATR, FT-Raman și SERS. Pentru o atribuire corectă a modurilor de vibrație ale moleculei studiate, tehnicile spectroscopice mai sus menționate au fost folosite împreună cu modelarea teoretică DFT. Accentul s-a pus pe studierea modului în care molecula interacționează cu suprafața nanoparticulelor de argint. S-a determinat calitativ geometria moleculei în apropierea suprafeței de argint, pe baza calculelor realizate pe molecula absorbită pe un sistem slab, cu rol în simularea suprafeței de Ag(111).

Ultimul scop al acestei teze a constat în aplicarea spectroscopiilor Raman și SERS cu scopul de a caracteriza două specii de bacterii Gram-pozitive și discriminarea lor pe baza rezultatelor spectroscopice și a analizei componentelor principale (PCA). Speciile studiate au fost *Lactobacillus casei* și *Listeria monocytogenes*. Spectrele Raman sunt foarte asemănătoare, aproape identice, iar discriminarea lor s-a putut face doar pe baza analizei statistice a spectrelor înregistrate. În cazul caracterizării prin SERS, două metode de preparare a probelor au fost testate și comparate. S-au urmărit diferențele spectrale dintre cele două specii, benzile spectrale comune și identificarea siteurilor SERS active, în funcție de metoda de preparare aplicată. Discriminarea s-a realizat cu succes și în cazul analizei SERS, iar componentele care au participat la discriminare au fost identificate.

Depunerea de filme subțiri de aur folosind tehnica de epitaxie în fascicul molecular

Aurul (Au) este un metal foarte cunoscut, cu o plajă variată de posibile aplicații, datorită proprietăților sale. Principalele sale avantaje, cum ar fi inerția chimică, temperatura joasă la care poate fi procesat și conductivitatea electrică fac din acest metal unul dintre cele mai utilizate materiale în fabricarea de sisteme microelectromecanice, cum ar fi MEMS și NEMS [1]. Proprietățile optice neobișnuite ale filmelor ultrasubțiri de Au (< 10 nm) evaporate pe substraturi transparente, cum ar fi mica sau cuarț fac din aceste filme baza perfectă pentru construirea de senzori optici [2]. Majoritatea acestor senzori se bazează pe afinitatea chimică a numeroase molecule față de suprafața de Au și au proprietatea de auto-asamblare.

Interesul față de optimizarea parametrilor de depunere cu scopul de a obține filme de Au cu terase atomice și rugozitate mică, de efectul tratamentului termic asupra filmelor depuse, dar și față de proprietățile de suprafață ale lor este încă prezent în rândul grupurilor de cercetare. Siliciul (Si) este un substrat de interes pentru depunerea de filme subțiri de Au. Ca și carbonul și germaniul, la temperatura camerei Si are structura cristalină de diamant, cu atomii legați prin legături covalente de 0.5431 nm. Celula elementară a Si conține 8 atomi, iar rețeaua cristalină este de cub cu fețe centrate.

Detalii experimentale

Filmele de Au au fost depuse pe substraturi de Si(111) care au dezvoltat reconstrucția 7×7 , folosind un sistem MBE care operează în vid ultraînalt UHV Lab-10 MBE, cuplat cu un echipament UHV SPM care poate să opereze la diferite temperaturi. Ambele facilități au fost achiziționate de la firma Omicron GmbH din Germania și instalate într-o cameră curată de clasa 100 000, din cadrul Departamentului de Fizică Moleculară și Biomoleculară, INCDTIM Cluj-Napoca.

Substraturile de Si(111) pe care s-au efectuat toate depunerile de Au au fost achiziționate de la Institutul de Tehnologie a Materialelor Electronice din Varșovia, Polonia. Toate sunt dopate cu P și au dimensiunile de 3 mm \times 13 mm, iar în grosime 0.5 mm. Materialul de Au (purtate de 99.9995 %) a fost cumpărat sub formă de bucăți de diferite dimensiuni de la Premion, Alfa, Germania. Materialul a fost pus într-un creuzet de PBN în interiorul unei celule de efuzie MBE și încălzit la temperatura de 1240 °C, pentru

filmele de Au depuse la diferite temperaturi ale substratului, pe când în cazul modificării ratei de depunere, temperatura de încălzire a Au a fost variată în intervalul 1190 – 1300 °C. Pentru optimizarea temperaturii substratului și a ratei de depunere, patru filme de Au au fost depuse la temperaturi ale substratului care au variat în intervalul 480 - 630 °C, și alte patru filme de Au au fost depuse la rate de depunere din intervalul 0.15 – 4.3 nm/min. După depunerea propriu-zisă, toate filmele au fost supuse unui tratament termic. Acesta s-a făcut timp de 60 de minute, la temperatura de depunere, și a fost urmat de o răcire controlată, cu o rată de 13 °C·min⁻¹ până s-a ajuns la temperatura camerei.

Caracterizarea STM a filmelor tratate termic s-a făcut ex situ cu un VT-SPM, iar imaginile STM au fost vizualizate cu ajutorul programului specializat SPIP (Scanning Probe Image Processor (SPIP) 6.0.10 Image Metrology ApS, Lyngby, Danemarca).

Reconstrucția 7×7 a substratelor de Si(111) a fost evaluată folosind imagini STM (Fig. 1) și măsurători de RHEED (Fig. 2).

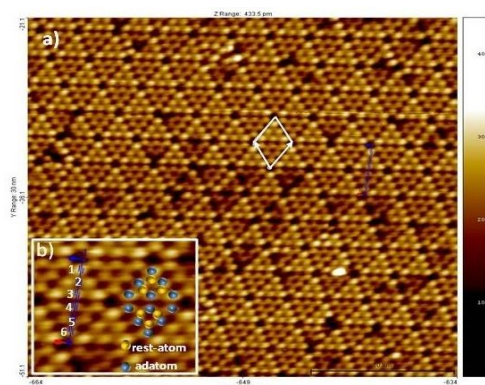


Figura 1. a) Imaginea STM a reconstrucției 7×7 a Si(111) obținută la o diferență de potențial de -2V și un curent de tunelare de 0.3 nA; b) Celula elementară pentru Si(111) 7×7.

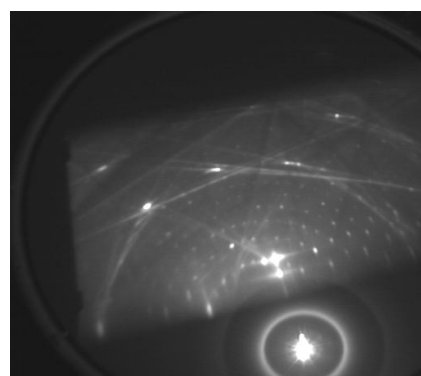


Figura 2. Imaginea RHEED pentru Si(111) obținută după curățarea substratului.

● Influența temperaturii substratului asupra proprietăților structurale și morfologice ale filmelor de Au/Si(111)

Scopul a fost acela de a depune filme subțiri de Au potrivite pentru studii STM și AFM de rezoluție moleculară. De aceea, filmele depuse trebuie să aibă o rugozitate cât mai mică și să prezinte terase atomice. Am investigat modul de variație a morfologiei filmelor depuse la temperaturi variabile ale substratului. Patru filme de Au, cu o grosime

de 100 nm au fost obținute la 480 °C (film 1), 530 °C (film 2), 580 °C (film 3) și 630 °C (film 4), și o rata de depunere de 1.6 nm/min.

- **Măsurători de difracție de raze X**

Orientarea filmelor a fost studiată prin difracție de raze X (XRD) în geometria Bragg-Brentano (θ - 2θ în intervalul 10° - 90°), cu un pas de scanare de 0.02° cu 0.8 s/pas. Figura 3 prezintă difractogramele normalizate ale filmelor depuse la patru temperaturi

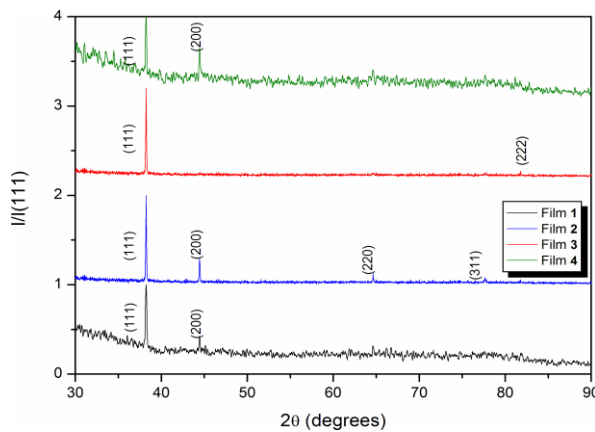


Figura 3. Difractograma de raze X pentru filmele subțiri de Au/Si(111) depuse la temperaturi diferite ale substratului.

preferențiale a cristalitelor, paralel cu substratul [3]. O dată cu creșterea temperaturii la 630 °C, în difractogramă apare peak-ul corespunzător planului (200), sugerând o modificare a orientării preferențiale a cristalitelor și implicit inducerea de defecte în film. Acest lucru influențează nucleația și creșterea filmelor subțiri, pentru ca în final să ducă la degradarea cristalinității [4-9].

Calcularea dimensiunii medii a cristalitelor s-a făcut pe baza formulei lui Scherrer [10], iar defectele de rețea (microstrain ϵ) a filmelor au fost determinate folosind formula din [11, 12]. Poziția și FWHM a peak-ului Au(111) au fost determinate prin fitarea datelor experimentale cu o funcție Lorentziană. În urma calculelor efectuate, dimensiunea medie a cristalitelor pentru filmul depus la cea mai mică temperatură a substratului (480 °C) este 40 nm. Valuarea maximă de 112.46 nm este atinsă la temperaturi ale substratului de \approx 550 °C. O dată cu creșterea dimensiunii cristalitelor, defectele de rețea scad și ating valuarea minimă de 0.31 la temperatura de 580 °C (Tabelul 1). Se poate observa că filmul 3 are

diferite ale substratului. Se observă că difractogramele filmelor depuse la o temperatură a substratului mai mică de 580 °C conțin peak-uri corespunzând indicilor Miller (111), (200), (220) și (311), ceea ce sugerează că aceste filme nu sunt depuse doar după planul (111) a substratului de Si. Filmul 3 depus la o temperatură de 580 °C prezintă doar două peak-uri corespunzând direcției (111). Acest lucru este un indiciu a orientării

valoarea cea mai mare în cazul dimensiunii medii ale cristalitelor și valoarea minimă a imperfecțiunilor de retea.

Tabel 1

Parametrii structurali calculați pe baza difractogramelor de raze X

Film depus	Temperatura substratului (°C)	B (grade)	2θ (grade)	D (nm)	$\epsilon \times 10^{-3}$
1	480	0.21	38.24	40.0	0.86
2	530	0.09	38.24	92.9	0.37
3	580	0.07	38.18	112.46	0.31
4	630	0.24	38.23	35.4	0.98

- **Caracterizarea STM a filmelor subțiri de Au**

Tabelul 2 prezintă parametrii folosiți pentru depunerea acestor filme de Au. Un parametru foarte important pentru descrierea calității și a rugozității filmelor obținute este root mean square (RMS) care are valori sub 1 nm în cazul filmelor care au suprafața formată de terase atomice [13].

Tabel 2

Parametrii folosiți pentru depunerile filmelor de Au

Film depus	Temperatura substratului (°C)	Rata de depunere (nm/min)	RMS (nm)
1	480		16.98
2	530	1.6	1.94
3	580		0.32
4	630		2.09

Imaginile STM 3D pe baza cărora s-a făcut calculul RMS sunt în Fig. 4, iar Fig. 5 arată morfologia filmelor depuse la scară atomică.

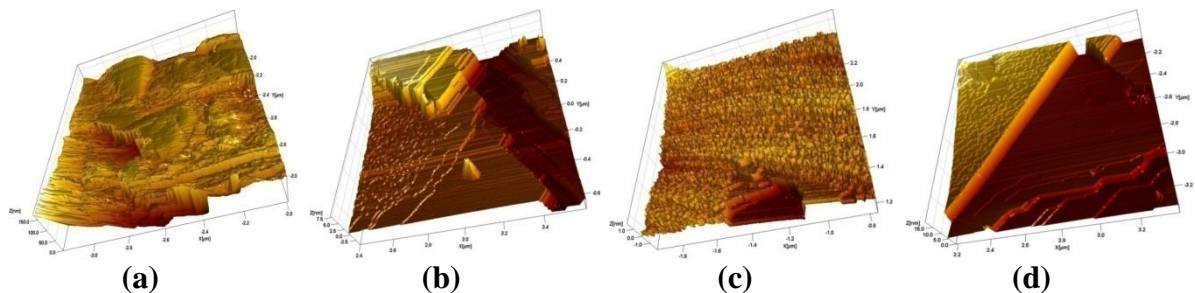


Figura 4. Imagini 3D STM ($1.2 \mu\text{m} \times 1.2 \mu\text{m}$) a filmelor de Au depuse la diferite temperaturi ale substratului. Imaginile STM au fost obținute la o diferență de potențial de 1.6V și un curent de tunelare de 0.3 nA.

Filmele depuse au o orientare 2D, după cum se observă în Fig. 4. Filmul **1** este caracterizat prin terase discontinue și înălțimi neregulate, cu o înălțime maximă de ≈ 150 nm. Se poate observa că insulele tind să se unească pentru formarea unei suprafețe continue, dar acest proces este incomplet, din cauza energiei insuficiente furnizate de către substrat în timpul depunerii și a procesului termic. În cazul filmului **2**, înălțimea maximă este de ≈ 4 nm, cu terase întinse, separate în principal prin pași monoatomici. O observație interesantă este legată de insula cu înălțimea maximă prezentă în Fig. 4 (b), care este o urmare a existenței locurilor de nucleație. Temperatura de 580°C pare potrivită pentru formarea de terase atomice fine, cu pași atomici de 3\AA în înălțime, această valoare fiind în concordanță cu [14]. Creșterea acestui film este strat cu strat și se poate vedea în Fig. 4 (c). Ultimul film a fost depus și tratat termic la 630°C și are înălțimea maximă de ≈ 10 nm. Suprafața lui este formată din terase line separate de spații adânci în domeniul zecilor de straturi atomice. Acest lucru este incompatibil cu rezoluția moleculară a experimentelor de STM [15, 16]. Prin compararea celor 4 filme se poate observa asemănarea în ceea ce privește forma și diametrul insulelor pentru filmele **2** și **4**. Acest fenomen a fost observat și de către Lussem et al. [17] în timpul depunerii de Au pe mică.

Morfologia filmelor subțiri depuse se poate observa în Fig. 5. De departe, filmul **3** are terase atomice line, cu înălțimea maximă de ≈ 0.8 nm. Filmul **1** pare a fi cel mai afectat de temperatura joasă de depunere, iar suprafața lui prezintă forme neregulate cu înălțimi diferite. Spațiile mari și terasele incomplete pot fi cel mai bine observate în cazul filmului **4**, fiind un rezultat al temperaturii mari de depunere. Înălțimea maximă a acestui film este comparabilă cu înălțimea filmului **3** (≈ 0.7 nm). În final, suprafața filmului **2** prezintă numeroase terase întinse dar incomplete, cu înălțimea maximă de ≈ 3.8 nm.

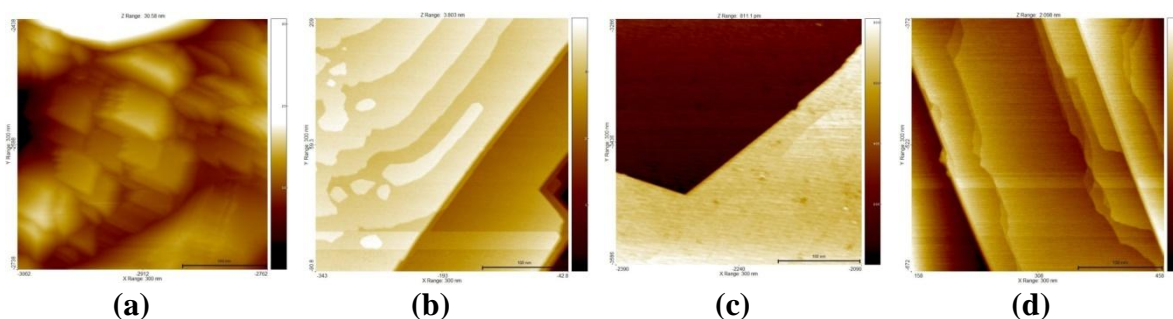


Figura 5. Imagini 3D STM ($300\text{ nm} \times 300\text{ nm}$) a filmelor de Au depuse la diferite temperaturi ale substratului. Imaginile STM au fost obținute la o diferență de potențial de 1.6 V și un curent de tunelare de 0.3 nA .

În concluzie, acest studiu a avut ca scop determinarea influenței temperaturii substratului asupra proprietăților structurale și morfologice ale filmelor subțiri de Au depuse prin tehnica de MBE. Difrakția de raze X a arătat că filmul depus la 580 °C prezintă peak-uri corespunzând direcției (111) și prin urmare, cristalitele au orientarea preferențială după direcția (111), paralel cu substratul. Orientarea cristalografică (111) este de asemenea indicată de valoarea maximă calculată a cristalitelor în cazul filmului **3** și de concentrația mică a defectelor de rețea. Măsurătorile STM au arătat că filmul depus la 580 °C prezintă un compromis bun dintre terase line de Au, aflate pe suprafețe mai mari de 100 nm, și rugozitate minimă, o condiție absolut necesară pentru a efectua experimente de STM.

● **Influența ratei de depunere asupra proprietăților structurale și morfologice ale filmelor de Au/Si(111)**

Un alt parametru care are o mare influență asupra calității și a orientării cristaline a filmelor subțiri este rata de depunere. Patru rate de depunere au fost testate: 0.15 nm/min (film **5**), 0.8 nm/min (film **6**), 1.6 nm/min (film **7**) și 4.3 nm/min (film **8**). Toate filmele au fost depuse la o temperatură optimă a substratului de 580 °C [18].

● **Măsurători de difracție de raze X**

Proprietățile structurale ale filmelor subțiri au fost studiate pe baza măsurătorilor

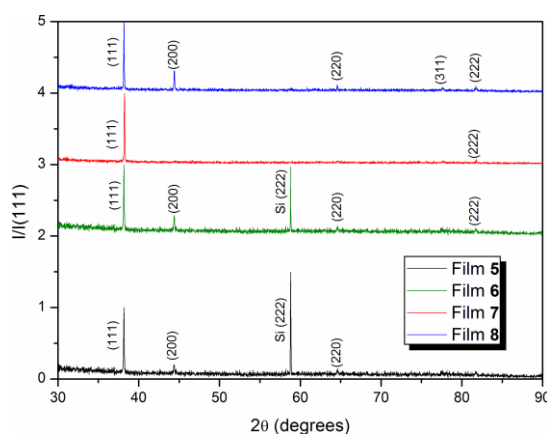


Figura 6. Difractograma de raze X pentru filmele subțiri de Au/Si(111) obținute la diferite rate de depunere.

XRD. Figura 6 prezintă difractogramele normalizate a celor 4 filme depuse la diferite rate de depunere. Se poate observa că difractogramele filmelor depuse la rate mici de depuneri conțin peak-uri corespunzătoare indicilor Miller (111), (200) și (220), care indică că aceste filme nu sunt depuse doar după direcția (111) a substratului de Si.

Prezența peak-ului substratului sugerează că filmele depuse au o grosime mică. Filmul **7** obținut la o rată

de depunere de 1.6 nm/min prezintă un singur peak corespunzător direcției (111). În

difractograma acestui film nu există alte peak-uri ale Au care să sugereze orientarea după alte plane cristalografice. În concluzie, cristalitele acestui film sunt orientate preferențial după planul substratului [46]. La o rată de depunere de 4.3 nm/min, s-a observat o creștere policristalină. În timpul depunerii, particulele de energii mari la rate mari de depunere induc defecte în filme. Nucleația și creșterea filmelor subțiri sunt afectate, ducând în final la degradarea cristalinității [19]. Lățimea peak-ului (111) depinde de rata de depunere (Tabelul 3) și duce la modificări în dimensiunea cristalitelor.

Tabel 3

Parametrii structurali calculați pe baza difractogramelor de raze X

Film depus	Rata de depunere (nm/min)	B (grade)	2θ (grade)	D (nm)	$\varepsilon \times 10^{-3}$
5	0.15	0.09	38.24	96.49	0.36
6	0.8	0.08	38.17	104.11	0.33
7	1.6	0.07	38.18	112.46	0.31
8	4.3	0.08	38.17	102.71	0.34

Prin aplicarea formulei lui Scherrer, s-a găsit că dimensiunea medie a cristalitelor în cazul filmului **5** este de 96.49 nm. O dată cu creșterea ratei de depunere are loc o creștere și a dimensiunii medii a cristalitelor până la valoarea maximă de 112.46 nm în cazul filmului **7**. La rate de depunere mai mari are loc o ușoară scădere a dimensiunii de cristalit până la o valoare de 102.71 nm. Parametrul care indică defectele din rețea atinge o valoare minimă în cazul filmului **7**. Scăderea defectelor de rețea indică o scădere a concentrației de imperfecțiuni în rețeaua filmelor de Au. Cea mai mică valoare pentru ε și valoarea maximă a dimensiunii medii a cristalitelor au fost atinse la o rată de depunere de 1.6 nm/min. La aceeași valoare a ratei de depunere filmul de Au are cea mai bună cristalinitate.

- **Caracterizarea STM a filmelor subțiri de Au**

Tabelul 4 cuprinde parametrii folosiți pentru obținerea filmelor de Au, dar și valorile RMS.

Tabel 4

Parametrii folosiți pentru depunerile filmelor de Au

Film depus	Rata de depunere (nm/min)	Temperatura substratului (°C)	RMS (nm)
5	0.15	580	0.19
6	0.8		1.41
7	1.6		0.02
8	4.3		0.73

Imaginile STM 3D (Fig. 7) ale filmelor de Au au fost obținute prin aplicarea unei tensiuni de 1.6V între fiecare probă și vârful STM, detectând un curent de 0.3 nA. Toate filmele au o orientare 2D, independent de rata de depunere folosită. Grosimea filmelor este direct proporțională cu rata de depunere. Topografia suprafețelor filmelor variază foarte mult de la un film la altul. În timp ce filmul **5** obținut cu cea mai mică rată de depunere are terase atomice incomplete și doar câteva monostraturi de Au, filmul **8**, depus cu cea mai mare rată de depunere prezintă multiple terase incomplete și tinde să formeze pe suprafețe mari mari site-uri de nucleație, acest fenomen fiind foarte cunoscut în literatură [20, 21].

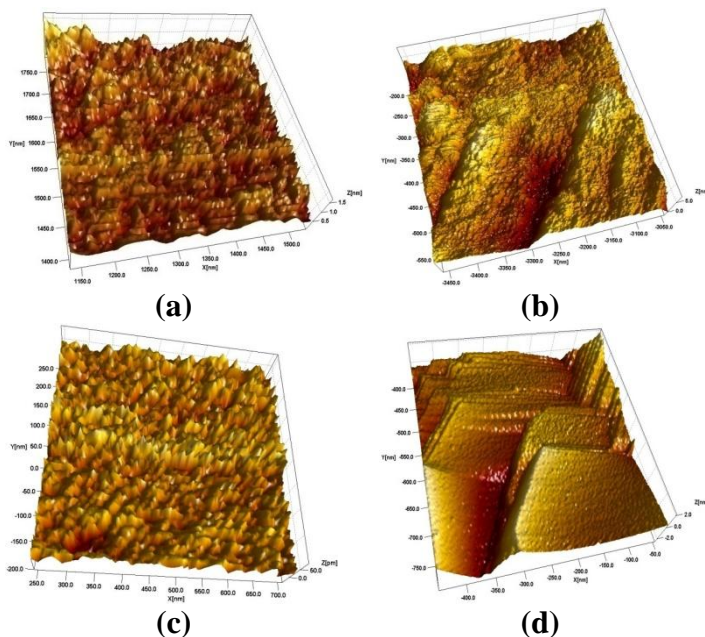


Figura 7. Imagini 3D reprezentative de STM pentru filmele de Au/Si(111) la rate de depunere de (a) 0.15 nm/min; (b) 0.8 nm/min; (c) 1.6 nm/min; (d) 4.3 nm/min.

Filmul depus la 0.8 nm/min are cea mai mare rugozitate dată de valoarea mare a RMS. Filmul obținut la rata de depunere de 1.6 nm/min are terase atomice line și o înălțime maximă de 0.05 nm. Modul de creștere al acestui film este de strat cu strat.

Prima etapă de creștere în cazul filmelor care au o grosime mai mică de 100 nm constă în nucleația clusterilor semisferici de Au pe Si(111) [20]. În acest caz este posibil și

un amestec între atomii de Au și atomii de Si de suprafață [22].

În concluzie, utilizând difracția de raze X și măsurători de STM s-a determinat influența ratei de depunere asupra proprietăților structurale și morfologice a filmelor de Au depuse prin MBE.

Difractogramele filmelor obținute au indicat faptul că rata de depunere de 1.6 nm/min este optimă pentru obținerea unor filme cu o singură orientare cristalină, similară cu cea a substratului. Pe baza măsurătorilor de XRD s-a determinat că cristalitele ating o valoare maximă de 112.46 nm pentru o rată de depunere de 1.6 nm/min. Defectele de rețea ating o valoare minimă la 1.6 nm/min, iar imperfecțiunile de rețea par să fie cele mai puține.

Topografia și rugozitatea suprafețelor filmelor de Au/Si(111) au fost evaluate prin investigații de STM. Filme subțiri de Au cu terase atomice line și rugozitate minimă pe substrat de Si(111) pot fi obținute cu o rată de depunere optimă de 1.6 nm/min.

Principalul rezultat al acestui studiu constă în găsirea valorii potrivite pentru rata de depunere, permițând obținerea unor filme subțiri de Au de înaltă calitate, cu terase atomice line, potrivite pentru fabricarea de dispozitive moleculare și electronice.

Studii teoretice și spectroscopice a unor antibiotice

● Trimetoprim

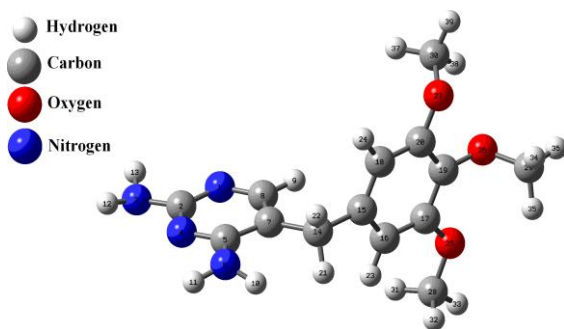


Figura 8. Geometria optimizată la nivelul de teorie B3LYP/6-31G(d) a moleculei de trimetoprim.

Trimetoprim (TMP), cu structura chimică arătată în Fig. 8, este un antibiotic cunoscut în principal în profilaxia și tratamentul infecțiilor tractului urinar [23, 24]. Acest studiu raportează investigații structurale ale TMP utilizând metode spectroscopice vibraționale (IR, Raman și SERS), precum și calcule bazate pe teoria funcționalei de densitate (DFT) [25].

De asemenea, două modele teoretice au fost utilizate pentru a modela interacțiunea moleculei de trimetoprim cu suprafața de argint. După cunoștințele noastre atribuirea modurilor normale de vibrație a moleculei de TMP prin spectroscopie IR și Raman cuplate cu calcule cuantice nu a fost până acum raportată.

Detalii experimentale

Spectrul FTIR pe TMP sub formă de pudră a fost înregistrat la temperatura camerei pe un spectrometru Vertex 70 (Bruker, Germania) echipat cu detector DTGS. Spectrul FT-Raman a fost obținut pe un sistem Raman Bruker FRA 106/S echipat cu un detector de Ge răcit cu LN₂. Linia laser folosită a fost de 1064 nm, iar puterea laserului pe probă a fost de 350 mW. Toate spectrele au fost obținute cu o rezoluție de 2 cm⁻¹ prin însumarea a 200 de acumulări. Spectrul SERS a fost înregistrat pe un spectrometru DeltaNu Advantage (DeltaNu, Laramie, WY) folosind un laser HeNe ce emite la 632.8 nm. Puterea laserului pe probă a fost de 3 mW și rezoluția spectrală de ≈ 10 cm⁻¹.

Toate substanțele chimice folosite au fost de calitate analitică. Coloidul de Ag folosit în măsurătorile SERS a fost preparat prin reducerea Ag⁺ cu hidroxilamină hidrocloridă [26]. Imediat după prepararea coloidului, pH-ul a avut valoarea de 10.

Geometria moleculei și a celor 2 complecși a fost optimizată, iar spectrele vibraționale au fost calculate utilizând software-ul Gaussian 09 [27], prin aplicarea metodei DFT, a funcționalei hibride B3LYP și a setului de bază standard 6-31G(d) [28, 29]. În cazul clusterului Ag₂₀, optimizarea s-a realizat folosind combinația B3LYP/DGDZVP potrivită pentru optimizarea modelelor de Ag [30]. Simetria sistemelor nu a fost restricționată pe durata optimizării de geometrie. Frecvențele vibraționale au fost calculate pe geometriile optimizate pentru ca să nu existe nici o frecvență imaginară. Atribuirea benzilor experimentale s-a făcut prin observarea frecvențelor și a intensității benzilor din spectrele experimentale și corelarea lor cu frecvențele calculate teoretic. Activitățile Raman calculate (S_i) au fost transformate în intensități relative Raman (I_i) folosind ecuația din [31]. Numerele de undă calculate au fost scalate cu un factor de scalare de 0.9614 [32]. Atribuirea benzilor spectrale s-a făcut printr-o inspecție vizuală a modurilor folosind programul GaussView 5.0 [33].

Spectrele IR ale moleculei de TMP

Spectrele IR experimentale și calculate ale moleculei de TMP, pe domeniul 600-3600 cm⁻¹ pot fi vizualizate în Fig. 9, iar atribuirea celor mai intense benzi spectrale sunt prezentate în Tabelul 5. În regiunea de numere de undă mari, benzile de la 3468 și 3313 cm⁻¹ au fost atribuite vibrațiilor de întindere din interiorul grupării amino N3H₂, benzile calculate fiind la 3567 și 3451 cm⁻¹. Următoarea regiune a spectrului IR este alcătuită din

benzi atribuite vibrațiilor de întindere simetrice și asimetrice ale grupărilor C28H3, C29H3 și C14H2.

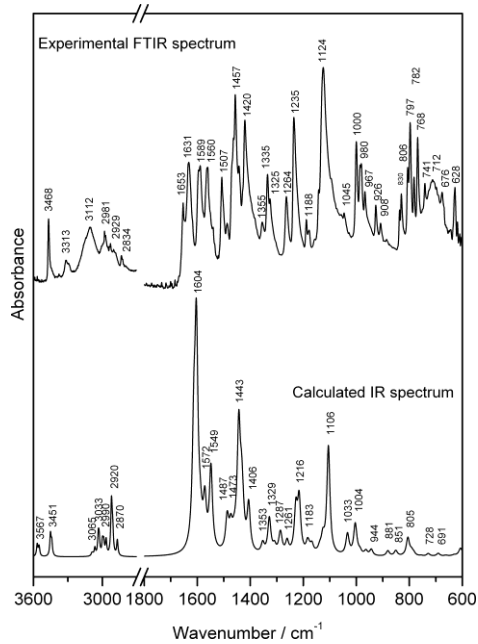


Figura 9. Spectrul FTIR experimental (sus) și spectrul IR calculat (jos) al moleculei de trimetoprim.

Cea mai intensă bandă din spectrul FTIR este la 1124 cm^{-1} și corespunde întinderii C-O. Alte benzi intense sunt localizate la 1457, 1420, 1235, 1000 și 797 cm^{-1} . Benzile de la 1457 și 1235 cm^{-1} provin în principal de la vibrațiile de bending din gruparea N3H2 și din inelul benzenic. Banda de la 1457 cm^{-1} este foarte bine reprodusă de calculele cuantice, atât intensitatea cât și poziția sa în spectru. Banda de la 1420 cm^{-1} a rezultat prin combinarea deformării în plan în cadrul inelului benzenic și a deformării de tip bending a grupărilor metil și metilen. Vibrațiile de întindere CO sunt reprezentate

în spectru prin banda de la 1000 cm^{-1} iar deformările de tip bending în afara planului a inelului de pirimidină dau naștere benzii IR de la 797 cm^{-1} . Spectrul FTIR conține de asemenea și un dublet reprezentat de benzile de la 1631 și 1653 cm^{-1} , care presupun deformarea de tip bending în gruparea N3H2, iar prezența lor poate fi explicată pe baza diferitelor aranjamente pe bază de legături de H care au loc în molecula în stare solidă [34]. Aceste benzi au o singură bandă corespondentă în spectrul calculat, iar aceasta este localizată la 1604 cm^{-1} . Diferența de intensitate dintre benzile experimentale și cea calculată poate fi explicată pe baza diferenței de stare de agregare pe care s-au înregistrat spectrele IR: probă solidă (spectrul experimental) și stare gazoasă (spectrul teoretic).

Tabel 5

Câteva benzi FTIR selectate, împreună cu benzile IR calculate ale TMP

Numere de undă experimentale (cm^{-1})	Numere de undă calculate (cm^{-1})	Atribuirea benzilor
FTIR	B3LYP/6-31G(d)	
3468	3567	$\nu_{\text{asym}}(\text{N3H}_2)$
3313	3451	$\nu_{\text{sym}}(\text{N3H}_2)$
3112	3065	$\nu(\text{C8H})$
	3033	$\nu(\text{C30H}_3)$

2981	2990	$\nu_{\text{asym}}(\text{C}29\text{H}_3)$
2929	2967	$\nu_{\text{asym}}(\text{C}28\text{H}_3)$
2902	2920	$\nu_{\text{sym}}(\text{C}29\text{H}_3)$
2834	2870	$\nu_{\text{sym}}(\text{C}14\text{H}_2)$
1653*	1604	$\delta(\text{N}3\text{H}_2)+\nu(\text{ring } 2)$
1631	1604	$\delta(\text{N}3\text{H}_2)+\nu(\text{ring } 2)$
1589	1572	$\tau(\text{C}14\text{H}_2)+\nu(\text{ring } 1)$
1560	1549	$\nu(\text{ring } 2, \text{CC}, \text{CN})+\delta(\text{H}11\text{NC})+\delta(\text{H}12\text{NC})$
1507	1487	$\delta(\text{C}30\text{H}_3)+\delta(\text{C}29\text{H}_3)+\delta(\text{C}28\text{H}_3)+$ $\text{ip}(\text{ring } 1)$
	1473	$\delta(\text{C}29\text{H}_3)+\delta(\text{C}28\text{H}_3)$
1457	1443	$\delta(\text{N}3\text{H}_2)+\nu(\text{N}3\text{C}2)+\text{ip}(\text{ring } 2)$
1420	1406	$\text{ip}(\text{ring } 1)+$ $\delta(\text{C}28\text{H}_3)+\delta(\text{C}30\text{H}_3)+\tau(\text{C}14\text{H}_2)$
1355	1353	$\omega(\text{C}14\text{H}_2)+\rho(\text{N}3\text{H}_2)+\nu(\text{ring } 2)$
1325	1329	$\nu(\text{ring } 1)+\nu(\text{C}17\text{O})+\nu(\text{C}19\text{O})+\nu(\text{C}20\text{O})$
	1287	$\omega(\text{C}14\text{H}_2)+\nu(\text{ring } 1)+\rho(\text{N}6\text{H}_2)+\text{ip}(\text{ring } 2)$
1264	1261	$\text{ip}(\text{ring } 2)+\omega(\text{C}14\text{H}_2)+\rho(\text{N}3\text{H}_2)+\rho(\text{N}3\text{H}_2)$
1235	1216	$\text{ip}(\text{ring } 1)+\nu_{\text{asym}}(\text{O}26\text{C}_2)+\omega(\text{C}29\text{H}_3)$
1188	1183	$\omega(\text{C}30\text{H}_3)+\tau(\text{C}14\text{H}_2)$
1124	1106	$\nu_{\text{asym}}(\text{O}25\text{C}_2)+\nu_{\text{asym}}(\text{O}27\text{C}_2)$
1000	1033	$\nu(\text{C}28\text{O})+\nu(\text{C}30\text{O})$
967	1004	$\nu(\text{C}29\text{O})$
926	964	$\gamma(\text{ring}2 \text{ CH})+\rho(\text{C}14\text{H}_2)$
908	944	$\rho(\text{C}14\text{H}_2)+\nu_{\text{asym}}(\text{O}25\text{C}_2)+\nu_{\text{asym}}(\text{O}27\text{C}_2)$
	881	$\gamma(\text{ring } 1 \text{ C}18\text{H})$
830	851	$\gamma(\text{ring } 1 \text{ C}16\text{H})$
797	805	$\gamma(\text{ring } 2)$
712	728	$\gamma(\text{ring } 2)+\rho(\text{C}14\text{H}_2)$
676	691	$\gamma(\text{ring } 1)$

* dublet cu 1631 cm^{-1} .

ν -stretching, δ -bending, ρ -rocking, τ -twisting, ω -wagging, γ -out of plane bending, ip.-in plane, ring1: inelul benzenic (C15-C16-C17-C19-C20-C18), ring2:pirimidină (N1-C2-N4-C5-C7-C8).

Spectrele Raman ale moleculei de TMP

Figura 10 prezintă spectrele teoretice și experimentale ale TMP, iar în Tabelul 6 sunt atribuite cele mai importante benzi vibraționale. După cum se poate observa există o bună corelație între benzile Raman calculate și cele experimentale. Diferențele care apar pot fi o consecință a anarmonicității și a tendinței generale a metodelor cuantice de a supraestima constantele de forță în cazul geometriilor de echilibru. Cu toate acestea,

rezultatele teoretice reproduc în mare măsură datele experimentale și permit atribuirea modurilor de vibrație.

Analizând Fig. 10 și Tabelul 6 se poate observa că benzile rezultate în urma

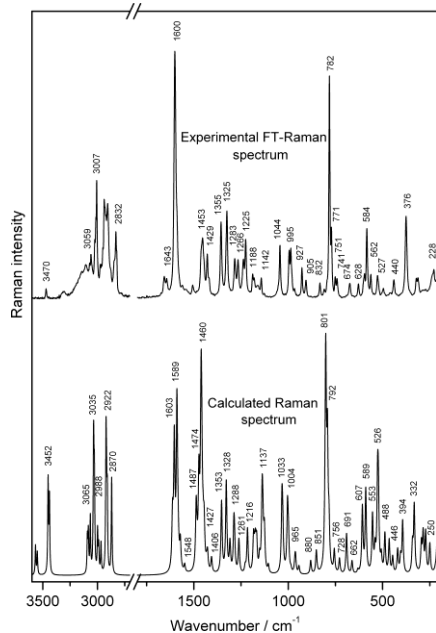


Figura 10. Spectrul experimental FT-Raman (sus) și spectrul Raman calculat (jos) a moleculei de trimetoprim.

întinderilor simetrice și asimetrice din grupările amino domină regiunea $3400-3600\text{ cm}^{-1}$, singura bandă prezentă în spectrul FT-Raman fiind la 3470 (calc. 3452 cm^{-1}) și corespunde întinderii simetrice în gruparea N_3H_2 . Următoarea regiune a spectrului ($2800-3100\text{ cm}^{-1}$) este alcătuită din benzi provenite de la întinderile CH din gruparea metil și de la inelul benzenic și pirimidină.

Vibrațiile de întindere ale inelului benzenic și cel de pirimidină, în combinație cu vibrațiile de torsiune din gruparea metilen și

deformarea de tip bending din gruparea amino dau naștere la benzile din domeniul $1570 - 1650\text{ cm}^{-1}$. Cea mai intensă bandă din această regiune este la 1600 cm^{-1} (calc. 1589 cm^{-1}) și corespunde întinderilor de tip C-C în inelul benzenic. Deformațiile care au loc în grupările de tip metil sunt localizate între 1130 și 1190 cm^{-1} , iar vibrațiile de întindere în gruparea metoxi se află între 990 și 1110 cm^{-1} . Alte deformații în afara planului se mai găsesc la 927 cm^{-1} (calc. 965 cm^{-1}), corespunzând la deformarea pirimidină-CH, dar și la 832 cm^{-1} (calc. 880 cm^{-1}) rezultând din deformația benzen-CH. Numerele de undă joase din spectrul Raman sunt dominate de deformările în plan din inelul benzenic și pirimidină, la 751 (calc. 756 cm^{-1}) și 741 cm^{-1} (calc. 728 cm^{-1}). A doua bandă ca și intensitate din spectrul FT-Raman ia naștere în urma vibrației de respirație a inelului de pirimidină și este la 782 cm^{-1} (calc. 801 cm^{-1}).

Tabel 6

Câteva benzi selectate FT-Raman și SERS, împreună cu benzile Raman calculate ale TMP

Numere de undă experimentale (cm ⁻¹)		Numere de undă teoretice (cm ⁻¹)	Atribuirea benzilor
FT-Raman	SERS	B3LYP/6-31G(d)	
		3567	$\nu_{\text{asym}}(\text{N3H}_2)$
		3551	$\nu_{\text{asym}}(\text{N6H}_2)$
3470		3452	$\nu_{\text{sym}}(\text{N3H}_2)$
		3440	$\nu_{\text{sym}}(\text{N6H}_2)$
3109		3083	$\nu(\text{C18H})$
3059		3065	$\nu(\text{C8H})$
3007		3035	$\nu(\text{C28H}_3)$
		2988	$\nu_{\text{asym}}(\text{C29H}_3)$
2938		2967	$\nu_{\text{asym}}(\text{C28H}_3)$
2906		2922	$\nu_{\text{sym}}(\text{C29H}_3)$
2832		2870	$\nu_{\text{sym}}(\text{C14H}_2)$
1643	1647	1603	$\nu(\text{ring 2})+\delta(\text{N3H}_2)$
1600	1600	1589	$\nu(\text{ring 1})$
1561		1571	$\nu(\text{ring 1})+\tau(\text{C14H}_2)$
		1548	$\nu(\text{ring 2, CC, CN})+\delta(\text{H11NC})+\delta(\text{H12NC})$
1506	1503	1487	$\delta(\text{C30H}_3)+\delta(\text{C29H}_3)+\delta(\text{C28H}_3)$ + ip(ring 1)
1453	1461	1474	$\delta(\text{C29H}_3)+\delta(\text{C28H}_3)$
		1460	$\rho(\text{C29H}_3)+\delta(\text{C30H}_3)$
1429	1406	1427	$\delta(\text{C29H}_3)$
		1406	ip(ring 1)+ $\delta(\text{C28H}_3)+\delta(\text{C30H}_3)+\tau(\text{C14H}_2)$
1355	1367	1353	$\omega(\text{C14H}_2)+\rho(\text{N3H}_2)+\nu(\text{ring 2})$
1325	1330	1328	$\nu(\text{ring 1})+\nu(\text{C17O})+\nu(\text{C19O})+\nu(\text{C20O})$
		1309	$\delta(\text{N1C8H})+\delta(\text{C7C8H})$
1283		1288	$\omega(\text{C14H}_2)+\nu(\text{CC CH ring 1})+\rho(\text{N6H}_2)$ + ip(ring 2)
1266		1261	ip(ring 2)+ $\omega(\text{C14H}_2)+\rho(\text{N3H}_2)+\rho(\text{N3H}_2)$
1225	1227	1216	ip(ring 1)+ $\nu_{\text{asym}}(\text{O26C}_2)+\omega(\text{C29H}_3)$
1188		1184	$\omega(\text{C30H}_3)$
1180		1173	$\rho(\text{C28H}_3)+\rho(\text{C29H}_3)$
1142	1152	1137	$\rho(\text{C30H}_3)$
		1126	$\rho(\text{N6H}_2)+\nu(\text{ring 2 CC CN})+\text{ip}(\text{ring 1 CH})$
		1105	$\nu_{\text{asym}}(\text{O25C}_2)+\nu_{\text{asym}}(\text{O27C}_2)$
1044	1031	1033	$\nu(\text{C28O})+\nu(\text{C30O})$
995	993	1004	$\nu(\text{C29O})$
927	926	965	$\gamma(\text{ring 2 CH})+\rho(\text{C14H}_2)$
905	903	943	$\rho(\text{C14H}_2)+\nu_{\text{asym}}(\text{O25C}_2)+\nu_{\text{asym}}(\text{O27C}_2)$
832		880	$\gamma(\text{ring 1 C18H})$

		851	$\gamma(\text{ring 1 C16H})$
782	777	801	breathing (ring 2)
771		792	$v_{\text{sym}}(\text{C19OC29}) + ip(\text{ring 1})$ + $v(\text{ring 2 CCC})$
751	747	756	$\gamma(\text{ring 1})$
741		728	$\gamma(\text{ring 2}) + \rho(\text{C14H}_2)$
674	698	691	$\gamma(\text{ring 1})$
628		662	$\gamma(\text{ring 1}) + \rho(\text{C14H}_2)$
596	591	607	$\tau(\text{ring1 C16H C18H}) + ip(\text{ring2})$
584		589	$ip(\text{ring2}) + ip(\text{ring1})$
562		553	$\Omega(\text{N6H}_2)$
527	525	526	$\rho(\text{N6H}_2) + \omega(\text{N3H}_2)$
495		488	$\Omega(\text{N3H}_2)$
		465	$\rho(\text{N3H}_2)$
440		446	$\omega(\text{N3H}_2) + \gamma(\text{CH ring2})$
		420	$Ip(\text{ring 1})$
376	370	394	$\delta(\text{C17OC}) + \rho(\text{C14H}_2)$
322		332	$\delta(\text{C20OC30}) + \delta(\text{C17OC28}) + \delta(\text{C19OC29})$
		285	$\rho(\text{C28H}_3)$
		272	$\rho(\text{C30OC20}) + \rho(\text{C28H}_3)$
228		250	$ip(\text{C5C7C14H}_2)$

v -stretching, δ -bending, ρ -rocking, τ -twisting, ω -wagging, γ -out of plane bending, ring1: inelul benzenic (C15-C16-C17-C19-C20-C18), ring2: pirimidină (N1-C2-N4-C5-C7-C8), ip.-in plane

Spectrul SERS al moleculei de TMP

Prin compararea spectrelor Raman și SERS (Fig. 11) a moleculei studiate se pot observa modificări semnificative în poziția și intensitatea relativă a benzilor. Aceste diferențe se pot datora interacțiunii moleculei cu suprafața de Ag. Astfel, cele mai șifitate benzi SERS sunt cele observate la 698, 1406, 1031 și 1152 cm^{-1} . Banda la 698 cm^{-1} este șifată cu 24 cm^{-1} și corespunde vibrației de bending a inelului benzenic. O altă bandă care corespunde vibrației de întindere tot a inelului benzenic și care apare amplificată este localizată la 1600 cm^{-1} . Banda de la 1406 cm^{-1} este spre numere de undă mai mici față de corespondența sa din spectrul FT-Raman și este atribuită deformației de bending în gruparea C_2H_3 . Vibrația acestei grupări metil combinată cu deformarea grupării C_2H_3 produce banda SERS de la 1461 cm^{-1} , care apare șifată spre numere de undă mai mari în comparație cu poziția sa în spectrul FT-Raman. O altă bandă atribuită întinderii $\text{O}_2\text{7-CH}_3$ este deplasată de la 1044 cm^{-1} în spectrul FT-Raman la 1031 cm^{-1} în spectrul SERS. De departe cele mai amplificate benzi în spectrul SERS sunt cele de la 777 și 1647 cm^{-1} .

Prima dintre acestea este șifată cu 5 cm^{-1} spre numere de undă mai mici, în comparație cu spectrul FT-Raman și reprezintă respirația inelului de pirimidină, pe când cea de-a doua bandă este o combinație dintre întinderea din pirimidină și deformația de tip bending din N3H_2 .

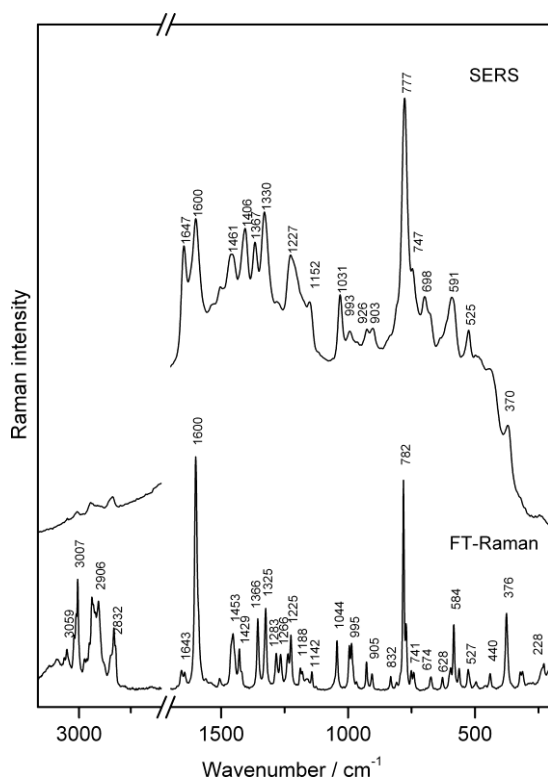


Figura 11. Spectrele SERS (sus) și FT-Raman (jos) ale moleculei de trimetoprim.

Și aceasta apare în spectrul SERS la valori mai mari ale numerelor de undă față de spectrul FT-Raman. Amplificarea acestor două benzi sugerează că atât inelul de pirimidină cât și cele două grupări amino din molecula studiată sunt localizate în apropierea suprafeței de Ag. În spectrul SERS există și benzi atribuite inelului benzenic și a grupărilor de tip metoxi. Deoarece amplificarea lor nu este semnificativă, putem concluziona că această zonă a moleculei se află la distanță mare de suprafața de Ag. În conformitate cu regulile de selecție SERS [35, 36], modurile normale de vibrație care prezintă o modificare în componenta perpendiculară pe suprafață a polarizabilității apar amplificate.

Teoretic, interacțiunea moleculei de TMP cu suprafața de Ag se poate face prin perechea de electroni liberi din atomii de N și O, dar și prin electronii de tip π a celor două inele. Absorbția moleculei de TMP pe suprafața de Ag este dedusă pe baza câtorva benzi de tip marker. Luând în considerare spectrul SERS, inelul de pirimidină pare să fie orientat perpendicular pe suprafața de Ag, în timp ce inelul benzenic este paralel cu suprafața de Ag.

Pe baza modelelor propuse de Schatz et al. [37] am folosit un cluster de 20 de atomi de Ag pentru a simula suprafața de Ag. În continuare este prezentată o analiză detaliată a interacțiunii dintre TMP și cluster, folosind calculele de tip DFT. Pentru simulări s-au folosit două configurații: un complex de tipul suprafață (S) și un complex de tipul vertex

(V) (Fig. 12). Complexul S presupune interacțiunea moleculei cu una din cele 4 fețe ale tetraedrului, iar complexul V constă în legarea moleculei de unul dintre atomii de Ag din vârf. Aceste două configurații au fost alese datorită diferitelor medii chimice locale [37].

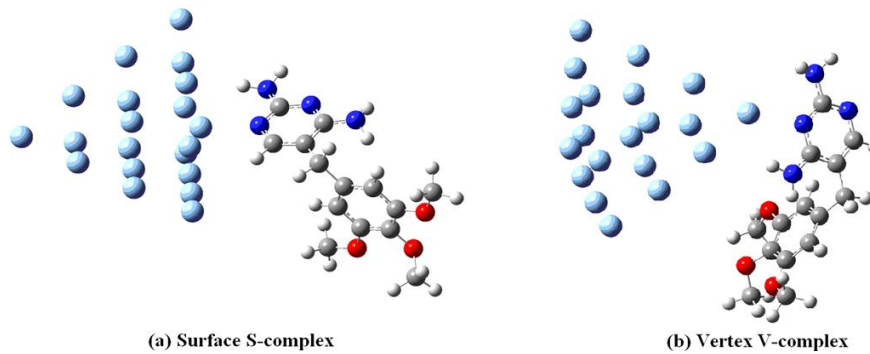


Figura 12. Geometriile optimizate ale celor doi complecși de TMP-Ag₂₀.

În cazul complexului V distanța calculată dintre atomul N1 a inelului de pirimidină și cel mai apropiat atom de Ag este de 2.42 Å, pe când în cazul complexului S este de 2.51 Å. Spectrele Raman calculate sunt comparate cu spectrul experimental SERS și sunt prezentate în Fig. 13.

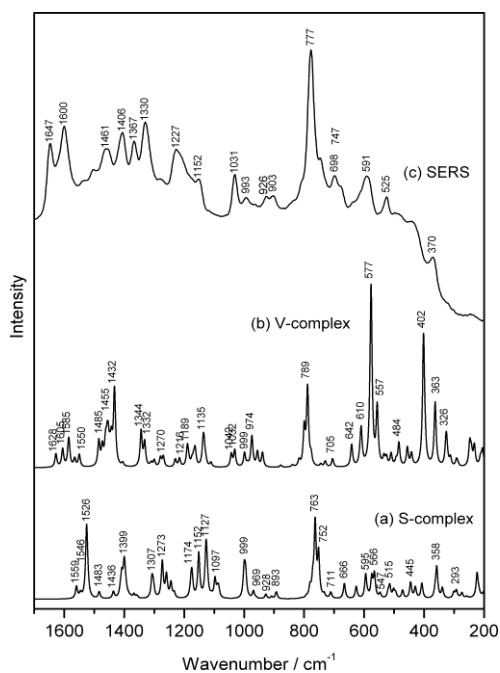


Figura 13. Spectrele Raman calculate pentru (a) complexul S de TMP-Ag₂₀, (b) complexul V de TMP-Ag₂₀ și (c) spectrul SERS experimental.

Pe baza atribuirii benzilor prezente în spectre se poate observa o diferență între pozițiile benzilor calculate pentru cei doi complecși. Majoritatea benzilor vibraționale situate peste 1040 cm⁻¹ în spectrul calculat al complexului V sunt deplasate spre numere de undă mai mari. Diferența de poziție dintre două benzi în spectrele celor doi complecși este între 8 și 59 cm⁻¹. Cea mai mare diferență apare în cazul benzii rezultate din vibrația de întindere în inelul benzenic. În spectrul Raman al complexului S apare la 1526 cm⁻¹, pe când în complexul V apare la 1585 cm⁻¹. Cea mai mică variație este

pentru modul de vibrație care e o combinație între mișcarea de rocking din C30H₃ și 2

vibrații de bending (O27C30H37 și O27C30H38). Această bandă este localizată la 1127 cm^{-1} și la 1135 cm^{-1} , în spectrul Raman al complexului S și al complexului V.

În cazul benzilor comune spectrelor Raman a celor 2 complecși, și care sunt șiftrate spre numere de undă mai mici, variația în poziția lor este în intervalul 4 - 55 cm^{-1} . Cea mai mare variație în poziție este în cazul benzii de la 1399 cm^{-1} în spectrul complexului S și care apare la 1344 cm^{-1} în spectrul Raman al complexului V. Acest mod de vibrație este o combinație a deformării de tip wagging și bending în gruparea metilen. Cea mai mică diferență de poziție este în cazul benzii de la 1436 cm^{-1} în spectrul Raman al complexului S, această bandă situându-se la 1432 cm^{-1} în spectrul Raman al complexului V.

Diferențe apar și în cazul intensității relative ale benzilor. Cea mai intensă bandă a complexului S are cea mai mică intensitate în cazul complexului V și invers. Cele mai intense benzi din spectrul Raman al complexului V sunt la 577 și 402 cm^{-1} , reprezentând vibrații de tip wagging în grupările N6H₂ și N3H₂. Schatz și colegii lui [37, 38] au găsit că intensitățile benzilor sunt sensibile la tipul funcționalei alese în calcul, de aceea ei nu au atribuit nici o semnificație fizică acestei diferențe în intensitățile benzilor. În cazul complexului S cele mai intense benzi sunt prezente la 763, 1526 și 1127 cm^{-1} .

Prezența unor benzi în spectrul Raman al complexului V ar putea sugera existența unui transfer de sarcină între molecula de TMP și clusterul Ag₂₀. Atomii de Ag implicați în aceste vibrații sunt cei aflați în apropierea moleculei, împreună cu atomii C2, C5, C7 și N4 din inelul de pirimidină și care sunt orientați perpendicular spre complexul V. Aceste benzi sunt localizate la 363, 789 și 974 cm^{-1} și toate sunt rezultatul vibrației de întindere dintre un atom de N și unul de Ag din vârful clusterului. Ca și observație, în zona 230-210 cm^{-1} din spectrul SERS al TMP și din spectrele Raman calculate a celor doi complecși nu am obținut benzi atribuite vibrației de întindere Ag-N. În plus nici Schatz et al. [37] nu a observat benzi Raman în această regiune în spectrele calculate de ei. Spectrul SERS experimental ar putea fi văzut ca o combinație a celor doua spectre Raman calculate. La numere de undă mari (1650-1300 cm^{-1}), profilul spectrului SERS este bine reprodus de către spectrul Raman al complexului V, în timp ce domeniul numerelor de undă mici este bine reprodus, atât poziția benzilor cât și intensitatea lor de către spectrul Raman al complexului S.

Gradul de asociere dintre benzile din spectrul SERS și spectrele celor doi complecși a fost evaluat pe baza coeficienților de corelare (Fig. 14). Coeficientul de corelare în cazul complexului V este de 0.999, și de 0.997 pentru complexul S. Aceste valori ar putea sugera o asemănare mai mare între poziția benzilor din spectrul complexului V și poziția benzilor în spectrul experimental SERS.

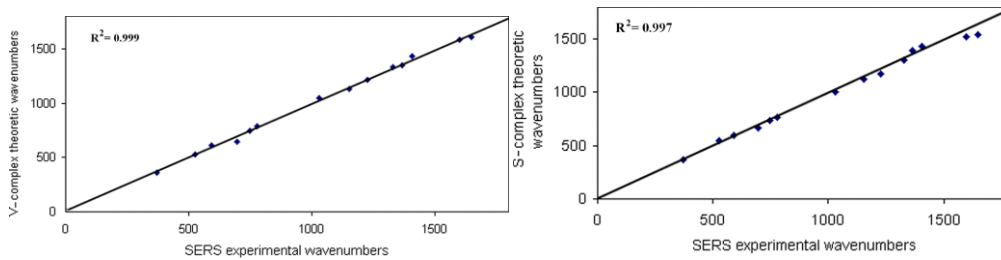


Figura 14. Gradul de corelație dintre numerele de undă din spectrul SERS și numerele de undă teoretice obținute pentru complexul V (stanga) și complexul S (dreapta).

În concluzie, spectrele FTIR, FT-Raman și SERS au fost înregistrate, iar benzile au fost atribuite pe baza calculelor DFT. Corelația bună găsită între datele experimentale și teoretice demonstrează o atribuire bună pentru toate modurile de vibrație ale moleculei.

Pe baza rezultatului experimental SERS, s-a putut face o interpretare calitativă a procesului de interacțiune dintre moleculă și suprafața de Ag. S-a stabilit că inelul de pirimidină este orientat pe direcția perpendiculară pe suprafața de Ag, iar inelul benzenic se află paralel cu suprafața de Ag.

Două modele alcătuite din 20 de atomi de Ag au fost utilizate pentru a simula interacțiunea dintre molecula studiată și coloidul de Ag. Spectrele calculate Raman a celor două posibile configurații au fost comparate cu rezultatele SERS, și o corelație între pozițiile benzilor în cele 3 spectre a fost posibilă.

Rezultatele au arătat că profilul spectrului experimental SERS este bine reprodus prin combinarea celor două modele.

● **Sulfametoxazol**

Sulfametoxazol (4-amino-*N*-(5-metilisoxazol-3-il)-benzensulfonamidă) (SMX), cu structura chimică prezentată în Fig. 15, este un binecunoscut antibiotic din clasa sulfonamidelor, și este utilizat în principal în tratarea infecțiilor tractului urinar.

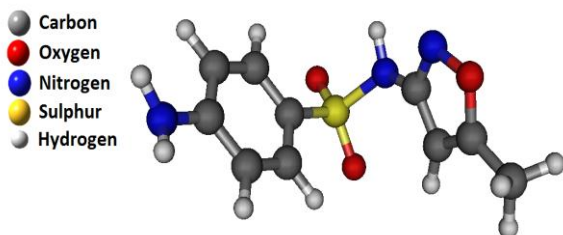


Figura 15. Geometria optimizată a moleculei de SMX în apă.

Chiar dacă această clasă de medicamente a fost de mare interes științific datorită spectrului larg de activitate antibacteriană [39-42], absorbția moleculei de SMX pe o suprafață coloidală de Ag nu a fost niciodată investigată. În plus, există foarte puține menționări în literatură

care să facă referire la corelarea datelor teoretice cu rezultatele experimentale pe această moleculă [43-46]. Cel mai recent studiu spectroscopic (atât teoretic cât și experimental) a moleculei de SMX a fost raportat de către Chamundeeswari et al. [47]. **Principalul scop al acestui studiu** [48] a fost de a explica modul de interacțiune a acestei molecule cu suprafața de Ag, prin corelarea tehnicii SERS cu metode cuantice DFT.

Detalii experimentale

Spectrul FTIR/ATR a moleculei de SMX sub formă de pudră s-a făcut la temperatura camerei pe un spectrometru FTIR Jasco 4100 cuplat cu un modul ATR. Rezoluția spectrală a fost de 2 cm^{-1} și numărul de achiziții de 30. Spectrul FT-Raman a fost înregistrat pe un spectrometru Bruker FRA 106/S cu modul Raman echipat cu detector de Ge, răcit cu LN_2 . Sursa de excitare a fost un laser Nd:YAG cu lungimea de undă de 1064 nm și cu o putere pe probă de 330 mW. Spectrul a fost înregistrat cu o rezoluție de 2 cm^{-1} prin acumularea a 150 de achiziții.

Spectrele SERS și Raman în soluție apoasă au fost achiziționate folosind un spectrometru DeltaNu Advantage (DeltaNu, Laramie, WY) cu un laser Nd:YAG care emite la 532 nm. Puterea totală a laserului a fost de 40mW și rezoluția spectrală de 8 cm^{-1} .

Medicamentul a fost cumpărat de la compania Sigma-Aldrich (>99% puritate) și a fost folosit ca atare în toate experimentele realizate. La temperatura camerei SMX există sub formă de pudră și este foarte puțin solubil în apă la pH 7 și în solvenți organici. În schimb este solubil în hidroxizii metalelor alcaline [49]. Spectrele experimentale au fost achiziționate la pH 10, când dizolvarea totală a compusului este posibilă. Concentrația finală a soluției apoase de SMX, folosită pentru înregistrarea spectrelor Raman, a fost de $7.2 \cdot 10^{-2}\text{ M}$, iar probele SERS au avut o concentrație de $3.4 \cdot 10^{-4}\text{ M}$. Aceste concentrații au

fost alese în așa fel încât să fie posibilă obținerea unor spectre Raman și SERS de rezoluție înaltă și cu un raport semnal/zgomot cât mai bun.

Ca și substrat SERS s-a folosit coloid de Ag preparat după metoda Lee-Meisel [50]. Proba SERS a fost pregătită prin amestecarea a 500 μl coloid de Ag cu 25 μl soluție de SMX și cu 15 μl soluție NaOH 1M. Influența diferitelor săruri cu diferite concentrații asupra semnalului SERS și asupra stabilității coloizilor a fost studiată [51] și s-a găsit că cel puțin două efecte au loc [52]. Unul dintre efecte se referă la modificări care țin de chimia suprafețelor, denumit și "activarea" cu anioni, care duce la o amplificare suplimentară a semnalului dat de moleculă [52]. Reproducibilitatea spectrelor SERS obținute în acest studiu a fost confirmată prin testarea repetată a probei SERS preparată. Nu s-a observat nici o modificare semnificativă în rezultatele experimentale, sugerând formarea unui complex stabil moleculă-suprafață de Ag.

Toate calculele de optimizare a geometriei moleculei și calculul spectrelor vibraționale s-au făcut utilizând software-ul Gaussian 09 [27]. S-au aplicat metode de calcul DFT, funcționala hibridă B3LYP în combinație cu setul de bază standard 6-31G(d) [28, 29]. Frecvențele vibraționale au fost calculate pe geometria optimizată a moleculei pentru a împiedica obținerea unor frecvențe imaginare. Spectrul Raman a soluției de SMX a fost calculat utilizând Polarizable Continuum Model (PCM) [53] implementat în Gaussian 09, apa fiind solventul luat în considerare pentru efectuarea calculelor. Atribuirea benzilor experimentale s-a făcut prin compararea și corelarea 1:1 a numerelor de undă și a intensităților benzilor din spectrele experimentale cu frecvențele calculate teoretic. Activitățile Raman calculate au fost convertite în intensități Raman relative pe baza formulei raportate în [31]. Pentru plotarea spectrelor IR și Raman calculate în fază gazoasă și lichidă, s-au folosit funcții Lorentziană cu HWHM de 2 cm^{-1} și 8 cm^{-1} . Numerele de undă calculate au fost scalate neuniform folosind o procedură bazată pe 9 parametrii, recent propusă de Borowski [54].

Absorbția moleculei de SMX pe o un model periodic de tip slab care simulează suprafața de Ag a fost redată folosind software-ul VASP [55-57] și funcționala de corelare și schimb GGA PBE [58]. Un set de bază cu unde plane și cu o valoare a energiei de cut-off de 450 eV a fost folosită, iar interacțiunea electronilor a fost reprezentată prin metoda PAW (projector augmented-wave) a lui Blöchl [59] implementată în programul VASP [60]. Suprafața de Ag(111) a fost modelată pe baza structurii propusă de Ge et al. [61].

Lungimea vectorilor celulei, a și b a fost setată la 20.16 Å cu un unghi între vectori de 92.9° și $c = 38.10$ Å. S-au luat în considerare două straturi de atomi de Ag, cu un număr total de 60 de atomi de Ag/strat. În timpul calculelor atomii de tip slab din structura internă au fost ținuti ficși în poziția lor de bulk, în timp ce atomilor de Ag din stratul de deasupra, precum și moleculei li s-a permis să se relaxeze. Substratul de Ag(111) a fost ales deoarece este unul dintre cele mai utilizate suprafețe pentru absorbția de molecule [62]. Dimensiunea sistemului optimizat rezultat a fost redus la 70 de atomi (42 atomi de Ag) pentru o nouă optimizare cu software-ul Gaussian, pas necesar înaintea calculelor de frecvențe. Pentru atomii de Ag s-a folosit setul de bază și potențialul de tip CRENBS [63].

Rezultate și discuții

Sulfametoxazol poate să fie în diferite stări de protonare în funcție de pH-ul mediului. Pe baza spectroscopiei UV, Zhou et al. [64] a obținut o valoare de 5.6 pentru pK_a , pe când Boreen et al. [65], prin titrare spectrofotometrică, a găsit că SMX poate să existe sub formă de trei specii diferite cu valori ale pK_a de 1.6 și 5.7. Utilizând programul ACD/pKa DB (Advanced Chemistry Development, Inc.) [66] pentru calculul pK_a am obținut valori de 1.39 și 5.81, în conformitate cu datele raportate anterior. În cazul experimentelor noastre molecula de SMX s-a aflat sub formă neutră.

În ceea ce privește calculele DFT, este important de amintit că, spre deosebire de studiul lui Chamundeeswari et al. [47], calculele s-au efectuat pe geometria moleculei extrasă din structura cristalină raportată de Price et al. [67]. În cazul conformerului în stare solidă, gruparea NH este în poziția *cis* cu atomul de N în heterociclu, iar configurația *trans* a fost utilizată în ref. [47]. Cu apa drept solvent, calculele noastre pe baza combinației B3LYP/6-31G(d) au arătat că molecula în starea *cis* este cu 2.9 kcal/mol ($\Delta G = -2.16$ kcal/mol) mai stabilă decât cea *trans*. Această diferență în energie înlătură orice contribuție semnificativă a conformerului *trans* la proprietățile moleculei. De aceea, la temperatura camerei, populația relativă Boltzmann este de 97.5 % și 2.5 %, pentru conformerul *cis* și *trans*.

Pentru calcularea spectrelor IR și Raman în stare solidă, am folosit un model capabil să includă cele mai importante interacțiuni de H care au loc atunci când moleculele se află în stare solidă. De aceea, un cluster de trei monomeri de SMX a fost scos din datele de raze X [67] și apoi optimizat la nivelul de teorie B3LYP/6-31G(d). Spectrele vibraționale simulate au fost obținute după o convoluție a numerelor de undă calculate cu

o Lorentziană, după cum este descris în secțiunea cu detaliile computaționale. Folosind această procedură am obținut spectrele simulate și raportate în Figs. 16-18. Atribuirea modurilor vibraționale experimentale și calculate sunt listate în Tabelul 7.

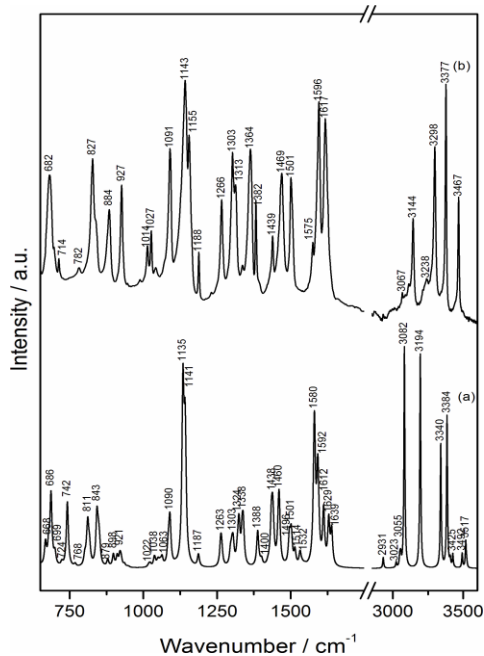


Figura 16. Spectrul teoretic IR (a) și experimental FTIR/ATR (b) a moleculei de SMX.

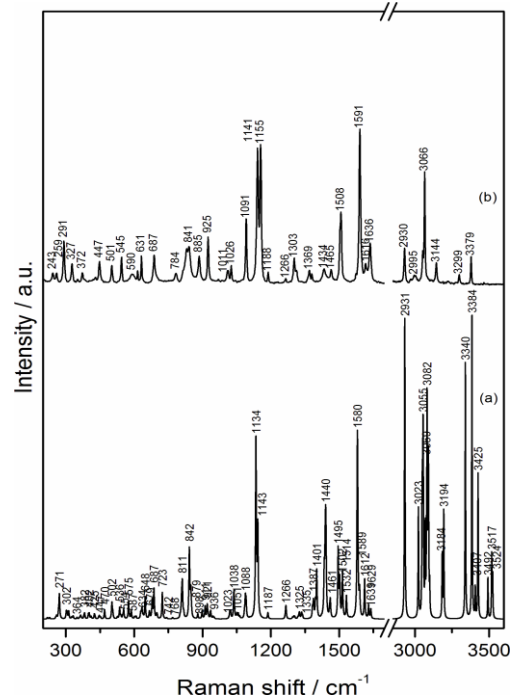


Figura 17. Spectrul teoretic Raman (a) și FT-Raman experimental (b) a moleculei de SMX.

SMX în stare solidă are trei forme polimorfice [68]. Prin compararea spectrului nostru FTIR/ATR cu cele obținute în literatură [47, 68, 69], am concluzionat că molecula de SMX este prezentă în forma I. Spectrele noastre vibraționale (Fig.16 and Fig. 17) sunt foarte asemănătoare cu cele raportate în [45], iar modurile normale de vibrație au aceeași atribuire pentru majoritatea benzilor. Cu toate acestea, potrivit rezultatelor actuale, dubletul observat la 1143 și 1155 cm^{-1} (modul Q11 din Tabelul 7) a fost reatribuit întinderii simetrice din gruparea sulfonyl, cuplată cu vibrația de întindere C-SO₂. Alte diferențe între atribuirile raportate în acest studiu și cele dintr-un studiu anterior [47] sunt observate pentru modurile de vibrație Q2, Q7, Q8, Q12 și Q15. Este important de menționat că spectrul Raman a fost obținut prin calculele efectuate pe un trimer de molecule de SMX care poate să pună în evidență într-o manieră rezonabilă, cele mai importante interacțiuni intermoleculare care au loc în stare solidă. De aceea, aceste noi

atribuiri sunt mai de încredere decât cele raportate până acum în literatură. Dubletul de la 1143 și 1155 cm^{-1} se poate observa și în spectrele Raman și SERS, dar șifrat spre valori mai mici cu $\approx 30 \text{ cm}^{-1}$. Interacțiunea moleculei de SMX cu suprafața de Ag ar trebui să aibă loc prin gruparea SO_2 , iar acest lucru este sprijinit de noua atribuire a dubletului. Această atribuire este în concordanță cu rezultatele găsite de către Lai et al. [39], deși în studiul lor benzile nu erau rezolvate.

Trebuie menționat că prin folosirea unui trimer pentru calculele cuantice și a unei proceduri de scalare neuniforme [54], vibrațiile de întindere de tipul XH (X=C,N) sunt mult mai bine reproduse decât în ref.[47] (vezi Q23-Q27).

La o privire mai în detaliu asupra $\delta(\text{NH}_2)$, se poate observa că se formează două benzi în spectrele Raman, la 1636 și 1616 cm^{-1} . Pe de altă parte în spectrul FTIR/ATR apare o singură bandă largă la 1617 cm^{-1} . După cum se poate observa în Tabelul 7, banda de la 1636 cm^{-1} este atribuită legăturilor de H din NH_2 , iar peak-ul de la 1616 cm^{-1} corespunde vibrațiilor din gruparea liberă amino.

O atenție sporită trebuie acordată benzii de la 1596 cm^{-1} din spectrul FTIR/ATR și benzii de la 1591 cm^{-1} din spectrul Raman. Conform calculelor, benzile au rezultat din două moduri vibraționale care reprezintă în principal vibrații de întindere C=C, primul dintre ele fiind asociat cu vibrațiile din interiorul inelului de benzenamidă, iar al doilea cu deformările din inelul de isoxazol. Atribuirea este în conformitate cu lucrarea lui Lai et al. [39]. Pe de altă parte, fiecare dintre modurile Q16 și Q17 este împărțit în două benzi asociate cu deformările din inelul de isoxazol. Modul de vibrație Q10 este la 1091 cm^{-1} și corespunde unei vibrații aproape identice cu cea care generează dubletul Q11, dar de o intensitate mai mică.

Absorbția moleculei de SMX pe suprafața de Ag

Spectrul SERS al moleculei de SMX este prezentat în Fig. 18, împreună cu spectrul Raman experimental în soluție apoasă și cu spectrul Raman teoretic calculat utilizând modelul PCM, solventul considerat fiind apa. Spectrul SERS și spectrul Raman în soluție apoasă nu prezintă asemănări evidente. Diferențe la fel de mari au fost observate și de către Lai et al. [39]. Lărgirea semnificativă a benzilor SERS, în comparație cu echivalentul lor din spectrul Raman poate fi pusă pe seama diferitelor orientări a moleculelor de SMX pe suprafața metalică. După cum indică și datele din literatură [41,

42], prezența benzilor SERS de la 1600 și 1115 cm^{-1} cu o intensitate mare indică concentrația mică (sub 1 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) de molecule de SMX absorbite pe suprafețele de Ag coloidal.

După regulile de selecție SERS [35, 36], modurile normale de vibrație care își modifică componenta perpendiculară pe suprafață a polarizabilității, apar amplificate în spectrul SERS. Teoretic, interacțiunea moleculelor de SMX cu suprafața de Ag poate avea loc prin electronii liberi ai atomilor de O, S și N, dar și prin electronii π delocalizați ai celor două inele.

Spectrul Raman calculat al moleculei de SMX absorbită pe atomii de Ag de tipul slab a fost simulat doar pentru a clarifica modul de interacțiune al moleculei cu suprafața metalică, dar și diferențele în pozițiile benzilor Raman. Aceste valori sunt trecute în Tabelul 7.

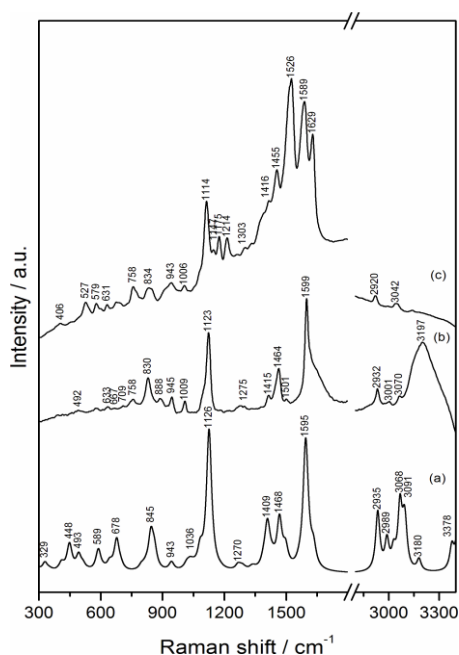


Figura 18. (a) Spectrul Raman teoretic al moleculei de SMX în mediul apos, (b) spectrul Raman experimental în soluție apoasă și (c) spectrul SERS experimental.

(1629 cm^{-1}) apare în urma deformației din gruparea NH_2 (modurile Q20 și Q21). Localizarea sa în spectru la numere de undă mai mari față de cum apar în mod normal vibrațiile grupării amino, ar putea fi influențată de interacțiunea sa cu suprafața sau cu moleculele de solvent [34]. Banda de intensitate medie de la 1114 cm^{-1} din spectrul SERS

Spectrul SERS al moleculei de SMX conține benzi de intensitate mare în zona 1500-1630 cm^{-1} . Banda de la 1526 cm^{-1} corespunde unei combinații dintre vibrațiile de întindere din inelul de benzenamidă, întinderea C-NH₂ și mișcarea de întindere C=N din isoxazol (modul Q18). Banda corespunzătoare din spectrul Raman calculat în apă se află la 1498 cm^{-1} , iar în spectrul complexului SMX@Ag slab a fost preconizată la 1545 cm^{-1} , fiind observată și experimental. Următoarea bandă de la 1589 cm^{-1} corespunde modului de vibrație Q19. Apariția ei a fost preconizată la 1580 cm^{-1} pentru complex, iar deplasarea la un număr de undă mai mic în raport cu poziția din spectrul Raman al moleculei în soluție este reprodusă cantitativ. A treia bandă

este atribuită vibrației de întindere din gruparea sulfonil în combinație C-SO₂, sugerând apropierea acestei grupări funcționale de suprafața metalică. După cum se poate observa în Figs. 17-18, această bandă este deplasată cu mai mult de 30 cm⁻¹ spre numere de undă mai mici față de spectrul Raman al SMX în stare solidă și formează un dublet la 1141 și 1155 cm⁻¹. Un comportament asemănător al acestor benzi a fost observat și în cazul altor medicamente din grupa sulfonamidelor [40]. Potențialul electrostatic molecular (MEP) poate oferi informații utile referitoare la modul de interacțiune a unei molecule cu nanoparticulele de Ag [70, 71]. În cazul moleculei de SMX, MEPul calculat sugerează că cea mai densitate de electroni este localizată în principal pe atomii de O din gruparea sulfonil și pe atomii de O și N din inelul de isoxazol.

Punând cap la cap toate rezultatele Raman și SERS obținute și luând în considerare și MEP-ul calculat al moleculei, am presupus că SMX este absorbită pe suprafața metalică în forma sa neutră, cu gruparea sulfonil în apropierea suprafeței și cu inelul de isoxazol orientat cu una din marginile sale spre suprafața de Ag, iar inelul de benzenamidă înclinat spre suprafață.

Aceste concluzii au fost deduse din analiza spectrului SERS și sunt în mare măsură sprijinite de către calculele DFT făcute pe molecula de SMX absorbită pe un model de tip slab alcătuit din atomi de Ag, folosit pentru a simula suprafața de Ag(111). Rezultatul simulării este prezentat în Fig. 19.

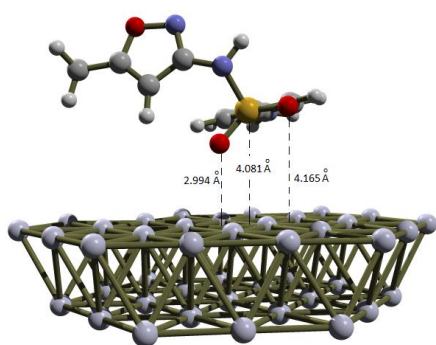


Figura 19. Structura optimizată a moleculei de SMX absorbită pe suprafața de Ag(111).

Simularea a fost realizată în doi pași: (i) molecula a fost optimizată pe un sistem periodic slab compus din 120 atomi de Ag, iar stratul superior de atomi de Ag a fost lăsat liber pe durata optimizării. (ii) Apoi pentru o nouă optimizare cu funcționala B3LYP, sistemul slab a fost redus la 42 atomi de Ag, și toți atomii au fost ținuți fixi.

După cum se poate observa în Fig.19, gruparea SO₂ se leagă asimetric de suprafață, iar cea mai mică distanță dintre atomul de O și stratul de sus al sistemului de Ag este de 2.994 Å, pe când cel de-al doilea atom de O se află la o distanță de 4.165 Å. Distanțele

dintre centrele inelelor de benzenamidă, isoxazol și stratul superior de Ag sunt de 4.175 Å și 6.103 Å. Mai mult, unghiul diedru dintre planul definit de inelul de benzenamidă și stratul superior de Ag este de 13.01°, pe când inelul de isoxazol face un unghi diedru de 71.45° cu suprafața de Ag.

Energia de absorbție a moleculei de SMX pe suprafața Ag(111) a fost estimată pe baza calculelor periodice după formula $E_{\text{ads}} = E_{\text{complex}} - E_{\text{slab}} - E_{\text{SMX}}$. Valoarea calculată a energiei este de -17.6 kJ/mol fără a lua în considerare corecția de dispersie, și valoarea de -89.1 kJ/mol, când este inclusă corecția în formalismul Grimme DFT-D3 [72]. Acest rezultat este în concordanță cu calculele similare realizate pe alte sisteme, după cum sugerează de exemplu și Reckien et al. [62] în cazul moleculei de formamidă absorbită pe Ag(111).

În concluzie, spectrele FTIR, FT-Raman, Raman pe soluție apoasă și SERS a moleculei de sulfametoxazol au fost atribuite pe baza spectrelor calculate la un nivel de teorie DFT. Folosind modele potrivite în cadrul calculelor s-a obținut o corelație bună între rezultatele experimentale și cele teoretice, sugerând o atribuire de încredere a modurilor vibraționale a moleculei studiate. În comparație cu studiul lui Chamundeeswari et al. [47], șase moduri de vibrație au fost reatribuite în urma noilor rezultate teoretice.

Pe baza rezultatelor SERS experimentale și pe baza distribuției MEP, s-a reușit să se simuleze calitativ interacțiunea moleculă-suprafață metalică. S-a stabilit că gruparea sulfonil este principala responsabilă pentru interacțiunea cu suprafața de Ag. Mai mult, inelul de isoxazol este orientat cu una din muchiile sale spre Ag, iar inelul de benzenamidă este înclinat față de suprafață. Rezultatele experimentale au fost susținute de calculele DFT realizate pe un complex alcătuit din molecula de SMX absorbită pe o suprafață de Ag(111) de tipul slab.

Tabel 7 Câteva benzi selectate din spectrele FTIR/ATR, FT-Raman, Raman și SERS, împreună cu benzile calculate ale SMX

Modul	Numere de undă experimentale (cm ⁻¹)				Numere de undă calculate (cm ⁻¹)				Atribuirea benzilor
	FTIR/ ATR	Raman	Raman aq.	SERS	IR	Raman	Raman aq	Raman SMX@Ag slab	
Q1	-	501	-	527	-	502	493	534	$\omega(\text{SO}_2)+\gamma(\text{CH},\text{ring1})$
Q2	-	545	-	579	-	554	-	585	$\omega(\text{SO}_2)+\delta(\text{CCC},\text{ring1})$
Q3	-	631	633	631	-	648	642	644	$\delta(\text{CCC},\text{ring1})$
Q4	682	687	-	-	686	687	678	683	$\gamma(\text{CC},\text{CN},\text{ring2})+\gamma(\text{CC},\text{ring1})$ $\nu(\text{CS})+\delta(\text{CCC},\text{ring1})$
Q5	827 839	829 841	830	834	811 843	811 842	821 845	806 848	$\text{ip}(\text{ring2})+\gamma(\text{CH})+\nu(\text{NS})$ $\gamma(\text{ring1},\text{CH})$
Q6	884	885	888	-	898	898	883	914	$\nu(\text{SN})+\delta(\text{ring1})+\delta(\text{ring2})$
Q7	927	925	945	943	921	921	943	-	$\delta(\text{ring2})+\rho(\text{CH}_3)$
Q8	1014	1011	1009	1006	1022	1023	1018	1008	$\delta(\text{ring1})$
Q9	1027	1026	-	-	1038	1038	1033	1049	$\delta(\text{ring2})+\rho(\text{CH}_3)$
Q10	1091	1091	1086	1076	1090	1088	1084	1087	$\nu_{\text{sym}}(\text{SO}_2)+\nu(\text{C-SO}_2)+\delta(\text{CCC},\text{ring2})$
Q11	1143 1155	1141 1155	1123	1114	1135 1141	1134 1143	1126	1132	$\nu_{\text{sym}}(\text{SO}_2)+\nu(\text{C-SO}_2)$
Q12	1188	1188	-	1175	1187	1187	1181	1181	$\delta(\text{CH},\text{ring1})+\nu(\text{CC},\text{ring1})$
Q13	1266	1266	1275	1263	1263	1266	1271	1272	$\nu_{\text{as}}(\text{SO}_2)+\nu(\text{CO},\text{ring2})+\delta(\text{C19N17H})$ $+\rho(\text{CH}_3)$

Q14	1303	1303	-	1303	1303	1301	1297	1302	v(C-NH ₂ HB)+v(CC,ring1) v(CC,ring1)
Q15	1313	1313	-	1334	1324	1325	1340	1341	v(CC,ring1)+ v _{as} (SO ₂)+δ(NH)
Q16	1364	1369	-	-	1388	1387	1409	1442	v(C=N,ring2)+δ(CH ₃)
	1382	1380			1400	1401			
Q17	1439	1434	1415	1416	1438	1440	1468	1475	v(CN)+v(CC,ring2)+δ(CH ₃)
	1469	1465	1464	1455	1460	1461			
Q18	1501	1508	1501	1526	1496	1495	1498	1545	v(CC,ring1)+v(C-NH ₂)+v(C=N,ring2)
					1501	1502			
Q19	1596	1591	1599	1589	1580	1580	1595	1580	v(CC,ring1)+δ(NH ₂)
					1592	1589			v(CC,ring2)+v(C=N,ring2)
Q20	1617	1616	1618	-	1612	1612	-	1614	δ(NH ₂)
Q21	-	1636	1641	1629	1629	1629	1630	1614	δ(NH ₂ HB)
					1639	1639			
Q22	-	2930	2932	2920	2931	2931	2935	-	v _{sym} (CH ₃)
Q23	-	3066	3070	-		3055	3068	-	v(CH,ring1)
						3082			
						3090			
Q24	3144	3144	-	-	3194	3184	3180	-	v(CH)
						3194			v(NH)
Q25	3298	3299	-	-	3340	3340	-	-	v _{sym} (NH ₂) HB
Q26	3377	3379	-	-	3384	3384	3378	-	v _{sym} (NH ₂) non-HB
Q27	3467	-	-	-	3492	3492	3520	-	v _{asym} (NH ₂) HB

v-stretching, δ-bending, ρ-rocking, ω-wagging, γ-out of plane bending, ip.-in plane, ring1: benzene ring, ring2: isoxazole ring, HB-hydrogen bonded. *Italic* is used when the values for the solvated SMX in water differ from those resulted from calculations on SMX trimer.

Caracterizarea și discriminarea speciilor de bacterii Gram - pozitive utilizând spectroscopiile Raman și SERS

Bacteriile reprezintă un domeniu mare în cadrul microorganismelor procariotice și se întâlnesc peste tot. Pe baza proprietăților lor de a se colora, bacteriile se clasifică în bacterii Gram-pozitive și Gram-negative, principalele diferențe dintre cele două tipuri se află la nivelul componentelor peretelui celular.

O bacterie Gram-pozitivă are un perete celular gros, format din mai multe straturi de peptidoglican (până la 80 nm în grosime). Acest strat mai este numit și mureină și înconjoară membrana citoplasmatică. Stratul de peptidoglican are structura asemănătoare unui exoskeleton care permite difuzia metaboliților în interiorul bacteriei și are un rol esențial pentru structura, reproducerea și supraviețuirea bacteriei. Reprezintă \approx 40-80% din greutatea în stare uscată a peretelui celular [73], și conține acizi teicoici și polizaharide, toate aceste componente fiind în mod normal înconjurate de un strat de suprafață paracristalin (S-layer) alcătuit din proteine [74]. Conține puțini aminoacizi, nu există deloc lipide dar există cantități mari de zaharuri și aminozaharuri [75], cum ar fi glucoză, ramnoză, glucozamină și acid muramic.

Ambele bacterii din acest studiu sunt Gram-pozitive, au formă de bastonașe și aparțin speciilor *Lactobacillus* (*Lactobacillus casei* ATCC 393) și *Listeria* (*Listeria monocytogenes* ATCC 19115).

Lactobacillus casei (*L. casei*) este o bacterie Gram-pozitivă care trăiește în mediul anaerob și care este recunoscută pentru proprietățile sale benefice pentru corpul uman [76]. Este un microorganism nepatogen care protejează organismul uman de diferite boli prin producerea de acid lactic. World Health Organization și Food and Agriculture Organization a Națiunilor Unite a clasificat *L. casei* în rândul probioticelor.

Listeria monocytogenes (*L. monocytogenes*) este unul dintre cei mai periculoși patogeni întâlniți în produse alimentare, și care declanșează boala numită listerioză.

În ultimii ani, un continuu interes s-a arătat înspre dezvoltarea unor noi metode mai rapide și mai sensibile pentru detecția microorganismelor. Printre aceste noi proceduri o mare atenție și popularitate au primit metodele moleculare, printre care și tehnicile de spectroscopie vibrațională. Printre avantajele lor se numără o acuratețe mai mare a rezultatelor, prepararea minimă a probelor și abilitatea de achiziție și de testare a probelor

în condiții *in-vivo*, fără a fi necesară folosirea de markeri [77]. Toate aceste avantaje au făcut din spectroscopiile IR și Raman candidate de bază pentru identificarea și discriminarea tipurilor de bacterii la nivel de specii. Un interes crescut a fost către SERS, datorită câtorva avantaje pe care le are față de tehnica Raman, cum ar fi posibilitatea de detecție la nivel de o singură moleculă și concentrația mică a probei ce urmează a fi analizată. Metodele vibraționale pot fi folosite în mod independent sau în combinație cu tehnici statistice de analiză pentru detecția și caracterizarea oricărui tip de bacterie, datorită fingerprintului spectral pe care îl are fiecare astfel de bacterie.

Scopul acestui studiu a fost de a identifica și caracteriza două specii de bacterii Gram-pozitive (*L. casei* ATCC 393 și *L. monocytogenes* ATCC 19115), folosind spectroscopiile Raman și SERS. Primul pas a constat în optimizarea parametrilor experimentali pentru a obține spectre reproductibile și de înaltă rezoluție. A doua etapă a constat în combinarea metodelor spectroscopice și a analizei componentelor principale (PCA) pentru a testa posibilitatea de discriminare a celor două bacterii.

Detalii experimentale

Cultivarea bacteriilor. *L. casei* ATCC 393 a fost cumpărată în formă liofilizată (Microbiologics, Minnesota, USA) și crescută în mediu de MRS (Oxoid, UK). Culturile inoculate sunt obținute în mod curent din celule uscate și înghețate suspendate în 5 mL MRS și incubate în condiții aerobice la 37 °C (24 h). Apoi bacteriile sunt din nou cultivate în 95 mL MRS și incubate în aceleași condiții descrise mai sus [78]. Culturile inoculate au fost crescute pentru 24 h în pahare Erlenmeyer care conțineau 100 mL MRS, tot amestecul aflându-se pe un shaker (Heidolph Unimax 1100, Germany) la 37 °C. *L. monocytogenes* ATCC 19115 a fost cultivată pe plăci de tip agar Oxford (Sifin, Germany) la 4°C. O singură colonie de *L. monocytogenes* a fost inoculată într-un tub cu diferiți nutrienți necesari creșterii bacteriilor (TSBYE) (Difco Laboratories) și incubate din nou pentru 24 h la 35 °C.

Creșterea celulară a fost monitorizată prin spectroscopie UV (Nanodrop ND-1000 Spectrofotometru, Nanodrop Technologies, USA) și s-a măsurat densitatea optică a bacteriilor la 600 nm. Concentrația *L. casei* a fost de 10¹⁴ CFU/ml (O.D. = 0.95), iar concentrația *L. monocytogenes* a fost de 10¹¹ CFU/ml (O.D. = 0.7).

Sinteza coloidului. Nanoparticulele de Ag (AgNPs) au fost obținute utilizând metoda de sinteză propusă de Leopold și Lendl [26].

Instrumentație. Imaginile AFM s-au făcut folosind un microscop AFM comercial NT-MDT NTEGRA Spectra (Rusia) la temperatura camerei. Imaginile au fost obținute la temperatura camerei, în modul contact-intermitent, folosind un cantilever de Si (NSG30-A, NT-MDT). Imaginile au fost prelucrate folosind programul Nova v1.1.0.1837 (NT-MDT).

Spectrele Raman și SERS ale bacteriilor au fost obținute pe un microscop convențional Renishaw inVia Raman Microscope echipat cu un laser HeNe (632.8 nm) cu o putere totală de 50 mW. Pentru a evita fotodegradarea probelor, s-au folosit filtre pentru a reduce puterea laserului pe probă, toate experimentele prezentate fiind obținute la o putere laser în intervalul 0.05 – 2.5 mW. Spectrometrul a fost calibrat folosind un substrat de Si, a fost focusat sub obiectivul de 50×, iar spectrul colectat a avut banda specifică Si la 521 cm⁻¹.

Pentru măsurătorile Raman și SERS, 2 ml de cultură de bacterii au fost centrifugați la 6000 rpm, timp de 10 min, iar mediul de cultură a fost îndepărtat. Pelletul rămas a fost spălat de trei ori cu 2 ml de apă MilliQ (rezistivitate 18 MΩ·cm⁻¹) și centrifugat în condițiile prezentate mai sus. Pelletul de *L. casei* a fost resuspendat în 1 mL apă MilliQ și pelletul de *L. monocytogenes* a fost resuspendat în 250 μl apă MilliQ pentru toate măsurătorile. Probele SERS preparate cu coloid *a priori* au fost obținute prin amestecarea a 500 μl de coloid de Ag preparat anterior cu 5 μl de bacterie. Probele *in situ* SERS au fost preparate după protocolul descris de către Zhou et al. [79].

Toate experimentele spectroscopice s-au efectuat pe 5 μl de bacterie spălată / amestec SERS, care au fost puse pe discuri de MgF₂ și focusate sub obiectivul de 50×. Fiecare spectru Raman este rezultatul a 10 acumulări, fiecare acumulare obținută în decursul a 10 s. Fiecare spectru SERS a fost obținut prin însumarea a trei acumulări, fiecare acumulare înregistrată în 5 s.

Toate rezultatele au fost colectate folosind programul WiRE. Spectrele Raman au fost colectate în domeniul spectral 400 - 1800 cm⁻¹, iar spectrele SERS pe domeniul 600 - 1700 cm⁻¹. Background-ul a fost îndepărtat prin însumarea și medierea a cinci spectre obținute în aceleași condiții experimentale. Următorul pas a constat în normalizarea

fiecărui spectru, la peak-ul cu cea mai mare intensitate. Tuturor spectrelor SERS li s-a aplicat o corecție în 10 puncte și o corecție de îndepărtare a zgomotului FFT în 5 puncte.

Analiza chemometrică. PCA este o tehnică multivariată folosită pentru a analiza structura inerentă a datelor, prin reducerea dimensionalității setului de date și găsirea unui set alternativ de coordonate, denumite componente principale (PC) [77, 80, 81]. Prin plotarea graficului PC-loadings în funcție de variabilele folosite, se va pune în evidență zonele în care apar diferențe în setul de date. În acest studiu s-a efectuat PCA pe toate spectrele Raman și SERS a celor două tipuri de bacterii, cu scopul de a le discrimina, pe baza structurii inerente a setului de informații spectrale. Pentru realizarea PCA s-a folosit programul Unscrambler X 10.0 (CAMO Software, Norvegia) pe spectrele neprocesate.

Rezultate și discuții

Viabilitatea bacteriilor spălate a fost evaluată prin imagini de AFM, și sunt prezentate în Figs. 20 și 21.

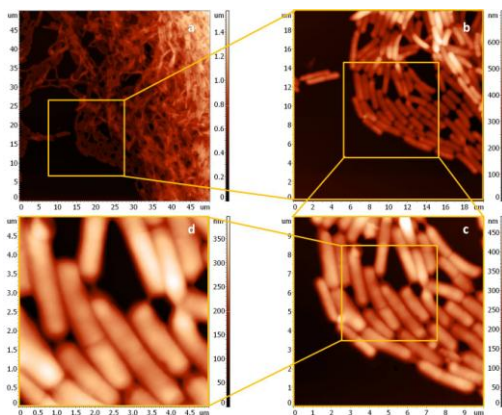


Figura 20. Imagini AFM ale bacteriei *L. casei* pe suprafața de (a) $50 \mu\text{m} \times 50 \mu\text{m}$; (b) $20 \mu\text{m} \times 20 \mu\text{m}$; (c) $10 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$ și (d) $5 \mu\text{m} \times 5 \mu\text{m}$.

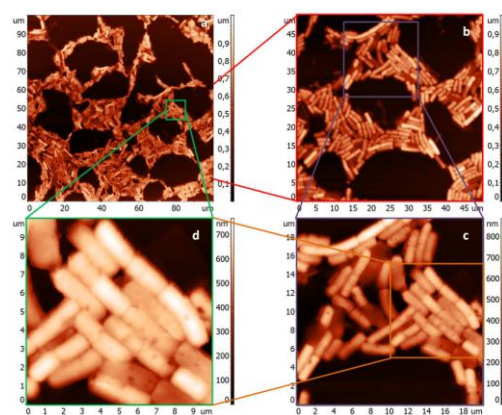


Figura 21. Imagini AFM ale bacteriei *L. monocytogenes* pe suprafața de (a) $100 \mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$; (b) $50 \mu\text{m} \times 50 \mu\text{m}$; (c) $20 \mu\text{m} \times 20 \mu\text{m}$ and (d) $10 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$.

Spectrele Raman ale bacteriilor *L. casei* și *L. monocytogenes*

Spectrele tipice Raman a unor bacterii oferă informații legate în primul rând de componentele peretelui celular și de componentele citoplasmatică. Concentrația mică de P din peretele celular al *L. casei* indică lipsa de acizi teicoici [75]. Caracterul anionic al peretelui *L. casei* este dat de acizii lipoteicoici (LTA) [74], alcătuiți din radicali de

poli(glicerofosfat), substituiți cu reziduri de esteri de D-alanil [82]. Chiar dacă în general peretele celular al bacteriei *L. casei* este protejat de o membrană de tipul S-layer, studiul lui Vadillo-Rodriguez et al. [83] a scos la iveală faptul *L. casei* ATCC 393 nu e îmbrăcată în S-layer, dar în schimb are un perete bogat în polizaharide [84]. Peretele celular al bacteriei *L. monocytogenes* are componentele tipice bacteriilor Gram-pozitive. Spectrele Raman ale celor 2 bacterii sunt prezentate în Fig. 22 și sunt foarte asemănătoare.

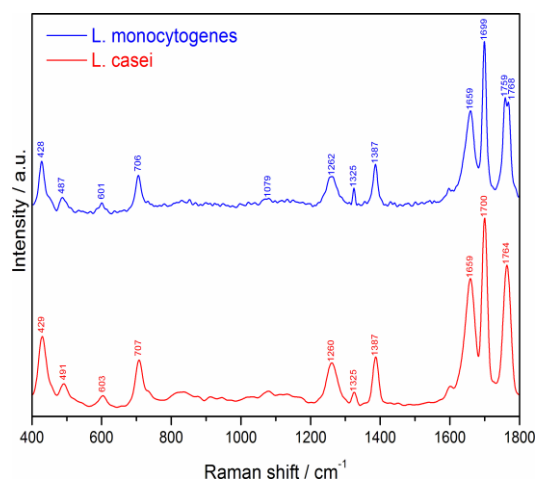


Figura 22. Spectrele Raman ale bacteriilor *L. monocytogenes* (sus) și *L. casei* (jos).

Vibrațiile din structura adeninei dau naștere la benzile prezente la 707 cm^{-1} (706 cm^{-1} în spectrul *L. monocytogenes*), 1325 și 1387 cm^{-1} . Ultimele două benzi pot proveni și de la vibrațiile din interiorul bazelor ADN de guanină, tirozină și uracil (banda 1325 cm^{-1}), sau de la timină (banda de la 1387 cm^{-1}). Aceste benzi au fost atribuite pe baza rezultatelor furnizate de către Gaus et al. [87]. Toate moleculele care furnizează benzi Raman sunt componente tipice bacteriilor Gram-pozitive [73]. După cum am precizat mai devreme, cele două spectre Raman sunt foarte asemănătoare, discriminarea celor două specii de bacterii putându-se face doar aplicând și analiza PCA.

Spectrele SERS ale bacteriilor *L. casei* și *L. monocytogenes*

Rezultatele SERS pentru *L. casei* și *L. monocytogenes*, obținute cu coloid *a priori*, dar și cu *in situ* AgNPs sunt prezentate în Figs. 23 și 24.

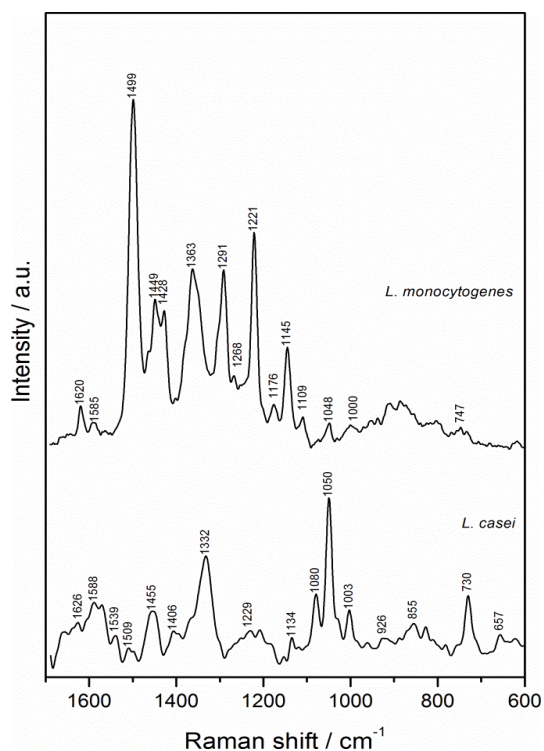


Figura 23. Spectrele SERS ale bacteriilor *L. monocytogenes* (sus) și *L. casei* (jos) folosind coloid de Ag preparat *a priori*.

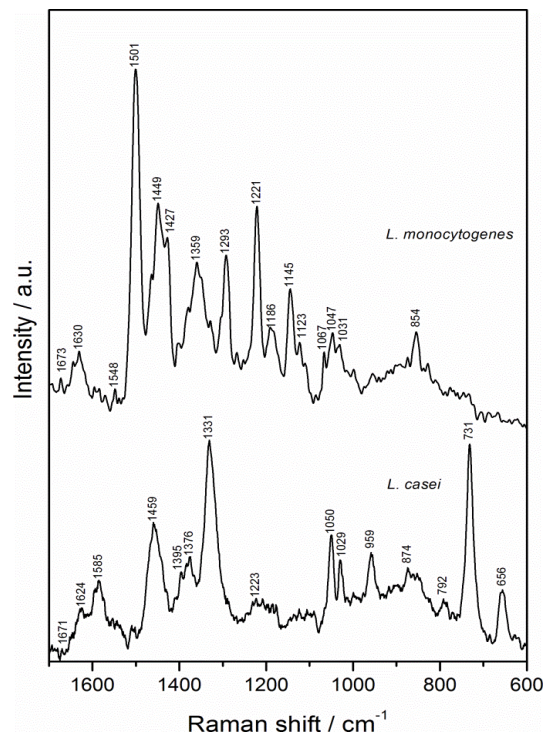


Figura 24. Spectrele SERS ale bacteriilor *L. monocytogenes* (sus) și *L. casei* (jos) folosind metoda de sinteză *in situ*.

Spectrele SERS obținute pot fi analizate din mai multe puncte de vedere: (i) în funcție de diferențele spectrale cauzate de metodele de preparare diferite; (ii) prin compararea fingerprintului spectral al celor două specii de bacterii, dar și (iii) prin găsirea asemănărilor sau a diferențelor dintre rezultatele raportate aici și cele raportate de către Mircescu et al. [90] în ceea ce privește viabilitatea folosirii acestei metode de sinteză *in situ* de AgNPs pentru detecția și discriminarea speciilor și a tipurilor de microorganisme. Toate spectrele SERS conțin câteva benzi comune, independent de metoda de preparare a probelor. Ambele spectre SERS ale *L. casei*, prezintă benzi la 657 cm^{-1} , 730 cm^{-1} , 1050 cm^{-1} , 1332 cm^{-1} , 1455 cm^{-1} , 1588 cm^{-1} și 1626 cm^{-1} , cu foarte mici diferențe în poziția lor. Acest lucru este valabil și pentru spectrele SERS ale *L. monocytogenes*.

Aceste benzi vibraționale sunt bine definite în ambele tablouri spectrale, cu mici variații în poziția și intensitatea lor. Aceste diferențe ar putea fi legate de efectele de împrăștiere întâlnite în mod frecvent în cazul experimentelor SERS, după cum explică și Mircescu et al. [90]. O altă explicație ar putea fi legată de siteurile de absorbție a AgNPs.

Cele mai mari diferențe în intensitatea benzilor sunt în cazul *L. casei*, benzile respective rezultând din vibrațiile care au loc în interiorul bazelor ADN, în principal adeninei (benzile de la 730, 1050, 1332/1331 cm^{-1}) [90-94] sau deformațiilor CH_2 din lipidele saturate (banda de la 1455/1459 cm^{-1}) [90, 91]. Această ultimă bandă a fost observată și de către Pucek et al. [95] la 1456 cm^{-1} în spectrele SERS ale altor bacterii Gram-pozitive și a fost atribuită vibrațiilor COH din oligozaharide. O explicație ar putea fi legată de posibilitatea mai mică a AgNPs preparate anterior de a intra în interiorul celulei, în comparație cu nanoparticulele sintetizate *in situ*. Ar trebui menționat și faptul că banda de la 1050 cm^{-1} a fost atribuită de unii autori vibrației de întindere C-O din molecula de glucoză [96]. Această atribuire ar putea fi valabilă, ținând cont că peretele celular al lui *L. casei* este alcătuit din cantități mari de zaharuri și aminozaharuri. Intensitatea benzilor din spectrele SERS ale *L. monocytogenes* sunt comparabile. Majoritatea benzilor prezente în aceste spectre provin de la componentele peretelui celular: banda de la 1145 cm^{-1} este rezultatul deformărilor CC, CO, COH din carbohidrați [97] sau a întinderii C-C din lipide [93]; banda de la 1221 cm^{-1} poate fi atribuită amidei III [98], pe când banda de la 1291/1293 cm^{-1} ia naștere din deformațiile CH din proteine [98]. Următoarea bandă, de la 1363/1359 cm^{-1} provine de la deformările CH a proteinelor sau de la întinderile simetrice $\nu(\text{COO}^-)$ [93, 99], iar benzile de la 1428/1427 cm^{-1} și 1449 cm^{-1} sunt deformări CH_2 ale lipidelor saturate [91]. O singură bandă de la 1620/1630 cm^{-1} a fost atribuită interacțiunii bazelor ADN cu AgNPs [91]. În concluzie, nanoparticulele interacționează în principal cu bazele codului genetic din interiorul celulei, în cazul *L. casei*, și cu părțile componente ale peretelui celular, în cazul *L. monocytogenes*.

Pe de altă parte, rezultatele *in situ* SERS au prezentat câteva asemănări, dar și deosebiri, cu spectrele SERS obținute de Mircescu et al. [90]. Asemănările sunt legate de prezența în aceeași zonă spectrală a vibrațiilor provenite de la nucleobaze. Acest lucru se poate explica prin asemănările foarte mari dintre codul genetic al bacteriilor Gram-pozitive și Gram-negative. Spectrele SERS ale *E. coli* prezintă numeroase benzi asociate cu bistratul fosfolipidic, aflat la exteriorul stratului de peptidoglican, substratul SERS fiind în apropiere de această membrană. Spectrele prezentate în acest studiu sunt alcătuite în principal din benzi care provin de la interacțiunea AgNPs cu stratul de peptidoglican, cu acizii lipoteicoici sau cu glucoza, aceasta din urmă în cazul *L. casei*, a cărui strat exterior este alcătuit din $\approx 43\%$ glucoză [75].

Discriminarea bacteriilor *L. casei* și *L. monocytogenes* pe baza analizei componentelor principale

Diferențele spectrale dintre cele două specii de bacterii Gram-pozitive au fost evaluate în spațiul PC folosind metoda PCA. Zece spectre Raman ale *L. casei* și 23 spectre Raman ale *L. monocytogenes* în domeniul spectral 420 – 1788 cm^{-1} au fost folosite pentru discriminarea PCA. În cazul spectrelor SERS *a priori*, PCA a fost aplicat pe 148 de spectre SERS ale *L. casei* și 62 de spectre SERS ale *L. monocytogenes* în intervalul 600 – 1700 cm^{-1} . Pentru analiza PCA pe probele *in situ* SERS s-au folosit 83 de spectre SERS ale *L. casei* și 11 spectre SERS ale *L. monocytogenes*, în același domeniu spectral ca și probele SERS menționate anterior. Toate măsurătorile au fost preprocesate folosind o corecție de tipul Multiplicative Scatter Correction (MSC) și prima derivată în 10 puncte pentru reducerea zgomotului.

• Rezultatele PCA pe spectrele Raman

Figura 25 prezintă analiza componentelor principale (PC-2 vs PC-1) obținută pe spectrele Raman ale bacteriilor *L. casei* și *L. monocytogenes*. Cele două bacterii sunt separate exemplar după PC-1, și care explică 23 % din varianța totală a setului de măsurători.

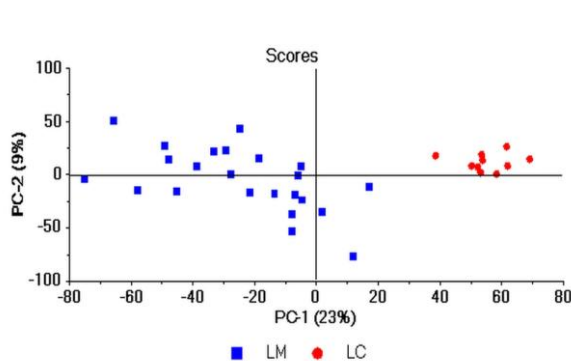


Figura 25. Scorul PCA obținut pe spectrele Raman ale bacteriilor of *L. monocytogenes* and *L. casei*.

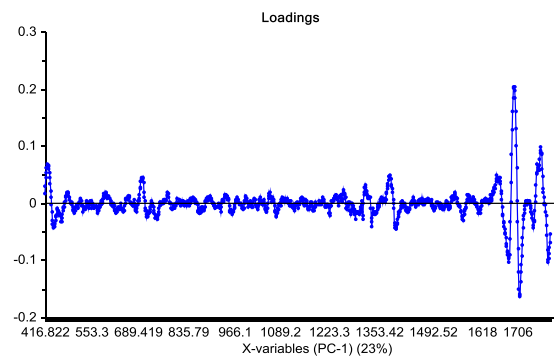


Figura 26. Graficul PC-loadings corespunzător rezultatelor PCA din Figura 25.

Graficul PC-loadings este în Fig. 26 și are rolul de a furniza informații referitoare la zonele din spectrele Raman după care s-a făcut discriminarea speciilor de bacterii. Diferențierea a fost posibilă în principal pe baza regiunii spectrale 1600-1800 cm^{-1} , dar și zona 1300 – 1400 cm^{-1} a participat la discriminare. Cea mai mare contribuție este corelată

cu banda localizată la 1700 cm^{-1} . Alte contribuții au provenit și de la banda 1759 cm^{-1} și cea de la 1768 cm^{-1} .

- **Rezultatele PCA pe spectrele SERS cu coloid de Ag preparat anterior**

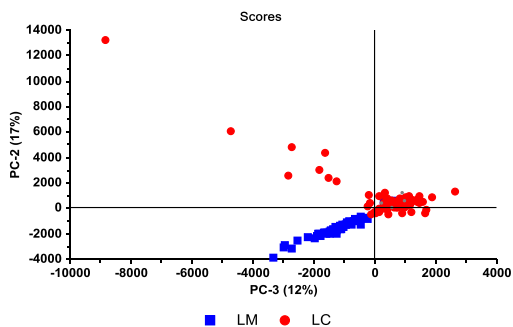


Figura 27. Scorul PCA obținut pe spectrele SERS cu coloid preparat *a priori*.

Graficul PCA (PC-2 vs PC-3) din Fig. 27 a fost obținut prin plotarea spectrelor SERS cu coloid preparat *a priori*. Se poate observa o separare clară de-a lungul PC-3, dar și după PC-2 a spectrelor SERS obținute pe bacteriile studiate. În cazul componentei PC-3 și PC-2, (Fig. 28 (a) și (b)), discriminarea se face în zonele $700\text{-}750\text{ cm}^{-1}$, $1200\text{-}1400\text{ cm}^{-1}$, dar și la banda de la $\approx 1490\text{ cm}^{-1}$.

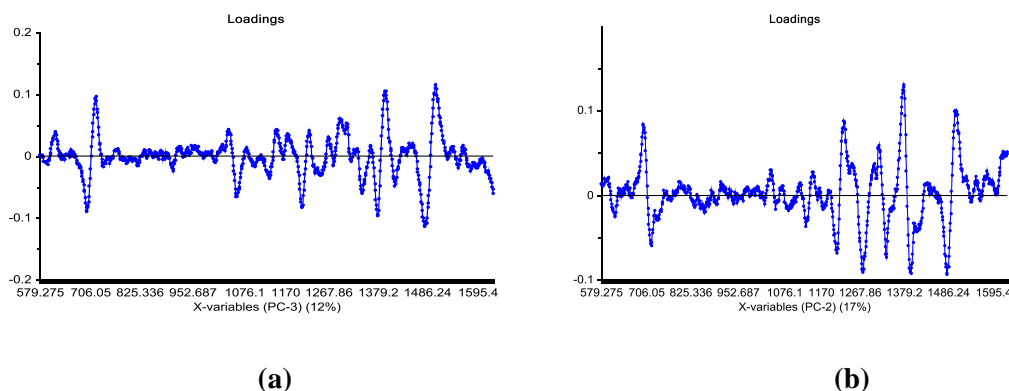


Figura 28. Graficele PC-loadings corespunzătoare rezultatelor PCA din Figura 27.

- **Rezultatele PCA pe spectrele SERS *in situ***

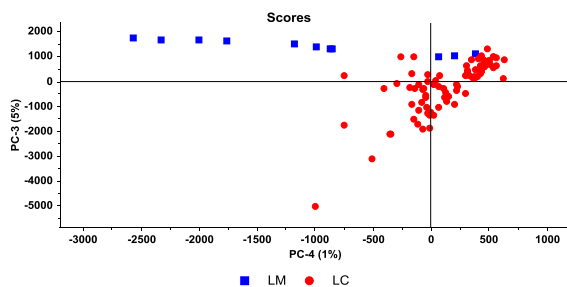


Figura 29. Scorul PCA obținut pe spectrele SERS utilizând metoda de sinteză *in situ*.

Graficul cu scorurile PCA (PC-4 vs PC-3) efectuate pe spectrele SERS *in situ* sunt prezentate în Fig. 29.

Separarea dintre *L. casei* și *L. monocytogenes* se face de-a lungul componentelor PC-4 și PC-3, și explică 1 % și 5 % din varianța totală a setului de măsurători. După cum se poate

observa și din graficele PC-loadings plots (Fig. 30 (a) și (b)), diferențele spectrale care participă la discriminarea dintre specii sunt localizate la nivelul benzii SERS de la 731 cm^{-1} , dar și a benzilor din regiunea spectrală $1145 - 1500\text{ cm}^{-1}$.

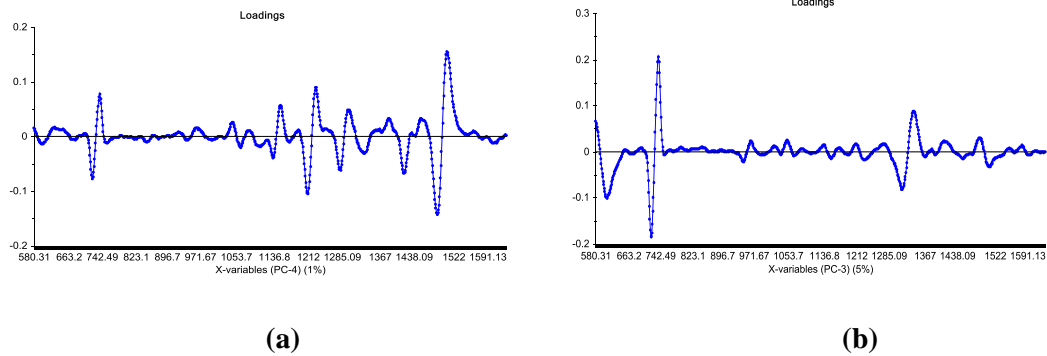


Figura 30. Graficele PC-loadings corespunzătoare rezultatelor PCA din Figura 29.

În concluzie, două specii de bacterii Gram-pozitive au fost caracterizate și discriminate cu succes pe baza spectrelor Raman și SERS, în combinație cu metoda statistică PCA. Spectrele Raman ale *L. casei* și *L. monocytogenes* prezentau caracteristici foarte asemănătoare, atât în poziția benzilor, cât și în intensitatea lor. Benzile prezente în spectrele Raman provin în principal de la bazele ADN, dar și de la componentele stratului de peptidoglican. Diferențele dintre tablourile spectrale Raman ale celor două bacterii au fost observate doar după aplicarea metodei PCA pe rezultatele experimentale, iar discriminarea s-a făcut cu succes.

În cazul analizei SERS, s-au testat și comparat două metode de preparare a probelor: prima metodă a constat în amestecarea fiecărei specii de bacterie cu coloid de Ag preparat anterior, iar a doua metodă a fost preluată din literatură și a constat în sinteza *in situ* de nanoparticule de Ag. Indiferent de metoda de preparare, toate tablourile spectrale au conținut benzi comune. Cele mai mari diferențe în intensitate s-au observat în cazul spectrelor pe *L. casei*, aceste benzi provenind de la vibrațiile bazelor ADN sau a lipidelor saturate. Spectrele SERS ale *L. monocytogenes* au prezentat foarte multe asemănări, fiind compuse din benzi provenite de la vibrațiile din componentele peretelui celular, sugerând interacțiunea nanoparticulelor de Ag cu stratul de peptidoglican. Și spectrele SERS au fost supuse analizei componentelor principale, demonstrându-se fezabilitatea spectroscopiei SERS în combinație cu PCA în discriminarea celor două specii de bacterii Gram-pozitive.

CONCLUZII GENERALE

Scopul acestei tezei a fost acela de optimizare a parametrilor fizico-chimici a unor filme nanometrice de aur, dar și a unor sisteme biomoleculare cu aplicații în îmbunătățirea calității vieții.

În prima parte de rezultate științifice s-au optimizat cu succes doi parametrii experimentali (temperatura substratului și rata de depunere) pentru obținerea de filme subțiri de Au cu terase atomice, cu posibile aplicații în fabricarea de senzori și biosenzori. O temperatură a substratului de 580 °C și o rată de depunere de 1.6 nm/min duc la obținerea unor filme epitaxiale, cu orientare preferențială a cristalitelor după planul substratului și cu un număr minim de defecte de rețea.

A doua parte s-a focusat pe investigații structurale, folosind metode spectroscopice cuplate cu metode teoretice de simulare, a două cunoscute antibiotice: trimetoprim și sulfametoxazol. De asemenea, s-au propus două tipuri de modele teoretice pentru simularea suprafeței de Ag și pentru a elucida modul de interacțiune al moleculelor studiate cu suprafața metalică, din cadrul experimentelor SERS. Au rezultat trei complecși, care au fost studiați pe baza spectrelor calculate Raman: doi complecși cu trimetoprim (complexul vertex și complexul suprafață), și un complex alcătuit din molecula de sulfametoxazol și o suprafață de Ag(111). Spectrele Raman calculate a celor trei complecși au fost de asemenea comparate cu rezultatele SERS experimentale. Spectrul SERS al moleculei de trimetoprim este o combinație a celor două modele teoretice aplicate, fiind totuși mai bine corelat cu complexul vertex. În cazul moleculei de sulfametoxazol, rezultatele teoretice au oferit informații cantitative legate de comportarea moleculei în apropierea suprafeței metalice.

Ultima parte a tezei a fost dedicată caracterizării și posibilității de discriminare a două specii de bacterii Gram-pozitive folosind spectroscopiile Raman și SERS, în combinație cu metoda statistică PCA. La prima vedere, spectrele Raman ale *L. casei* și *L. monocytogenes* prezentau caracteristici foarte asemănătoare. Discriminarea celor două specii s-a făcut totuși cu succes prin utilizarea analizei componentelor principale. În cazul analizei SERS, s-au testat și comparat două metode de preparare a probelor: prima metodă a constat în amestecarea fiecărei specii de bacterie cu coloid de Ag preparat anterior, iar a doua metodă a fost preluată din literatură și a constat în sinteza

in situ de nanoparticule de Ag. Indiferent de metoda de preparare, toate tablourile spectrale au conținut benzi comune. Cele mai mari diferențe în intensitate s-au observat în cazul spectrelor pe *L. casei*, aceste benzi provenind de la vibrațiile bazelor ADN sau a lipidelor saturate. Spectrele SERS ale *L. monocytogenes* au prezentat foarte multe asemănări, fiind compuse din benzi provenite de la vibrațiile din componentele peretelui celular, sugerând interacțiunea nanoparticulelor de Ag cu stratul de peptidoglican. Și spectrele SERS au fost supuse analizei componentelor principale, demonstrându-se fezabilitatea spectroscopiei SERS în combinație cu PCA în discriminarea celor două specii de bacterii Gram-pozitive.

Bibliografie

- [1] S.W. Han, H.W. Lee, H.J. Lee, J.Y. Kim, J.H. Kim, C.S. Oh, S.H. Choa, *Curr. Appl. Phys.* 6, Supplement 1 (2006) e81.
- [2] G. Kalyuzhny, M.A. Schneeweiss, A. Shanzer, A. Vaskevich, I. Rubinstein, *J. Am. Chem. Soc.* 123 (2001) 3177.
- [3] W.M. Bullis, *Solid-State Electron.* 9 (1966) 143.
- [4] B.A. Movchan, A.V. Demchishin, *Fiz. Met. Metalloved.* 28 (1969) 653.
- [5] J.A. Thornton, *Annu. Rev. Mater. Sci.* 7 (1977) 239.
- [6] C.R.M. Grovenor, H.T.G. Hentzell, D.A. Smith, *Acta Metall. Mater.* 32 (1984) 773.
- [7] R. Messier, A.P. Giri, R.A. Roy, *J. Vac. Sci. Technol. A* 2 (1984) 500.
- [8] P.B. Barna, M. Adamik, *Thin Solid Films* 317 (1998) 27.
- [9] M. Higo, K. Fujita, Y. Tanaka, M. Mitsushio, T. Yoshidome, *Appl. Surf. Sci.* 252 (2006) 5083.
- [10] B.D. Cullity, *Elements of X-Ray Diffraction*, 2nd ed., Addison-Wesley Publishing Company Inc., USA, 1978.
- [11] G.K. Williamson, R.E. Smallman, *Philos. Mag.* 1 (1956) 34.
- [12] P.K.R. Kalita, B.K. Sarma, H.L. Das, *Bull. Mater. Sci.* 23 (2000) 313.
- [13] U. Höpfner, H. Hehl, L. Brehmer, *Appl. Surf. Sci.* 152 (1999) 259.
- [14] E. Holland-Moritz, J. Gordon, G. Borges, R. Sonnenfeld, *Langmuir* 7 (1991) 301.
- [15] H. Klein, W. Blanc, R. Pierrisnard, C. Fauquet, P. Dumas, *Eur. Phys. J. B* 14 (2000) 371.
- [16] S.H. Leuba, J. Zlatanova, *Biology at the Single Molecule Level*, 1st Edition, in, Pergamon, New York, 2001.
- [17] B. Lüssem, S. Karthäuser, H. Haselier, R. Waser, *Appl. Surf. Sci.* 249 (2005) 197.
- [18] D. Marconi, **A. Ungurean**, *Appl. Surf. Sci.* 288 (2014) 166.
- [19] S. Hasegawa, Y. Nagai, T. Oonishi, S. Ino, *Phys. Rev. B* 47 (1993) 9903.
- [20] F. Ruffino, M.G. Grimaldi, *J. Appl. Phys.* 107 (2010) 104321.
- [21] F. Ruffino, V. Torrisi, G. Marletta, M. Grimaldi, *Nanoscale Res. Lett.* 6 (2011) 112.
- [22] A. Taleb-Ibrahimi, C.A. Sebenne, F. Proix, *J. Vac. Sci. Technol. A* 4 (1986) 2331.
- [23] E. Heikkilä, O.V. Renkonen, R. Sunila, P. Uurasmaa, P. Huovinen, *J. Antimicrob. Chemother.* 25 (1990) 275.
- [24] J. Sallai, A. Vernyik, G. Regdon, S. Gombkoto, J. Nemeth, G. Regdon, Jr., *J. Pharm. Pharmacol.* 49 (1997) 496.
- [25] **A. Ungurean**, N. Leopold, L. David, V. Chiş, *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 102 (2013) 52.
- [26] N. Leopold, B. Lendl, *J. Phys. Chem. B* 107 (2003) 5723.
- [27] M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G.A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H.P. Hratchian, A.F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J.L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J.A. Montgomery, J.E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J.J. Heyd, E. Brothers, K.N. Kudin, V.N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J.C. Burant, S.S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J.M. Millam, M. Klene, J.E. Knox, J.B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R.E. Stratmann, O. Yazyev, A.J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J.W. Ochterski, R.L. Martin, K. Morokuma, V.G. Zakrzewski, G.A. Voth, P. Salvador, J.J. Dannenberg, S. Dapprich, A.D. Daniels, Farkas, J.B. Foresman, J.V. Ortiz, J. Cioslowski, D.J. Fox, *Gaussian 09*, Revision B.01, in, Wallingford CT, 2009.
- [28] C. Lee, W. Yang, R.G. Parr, *Phys. Rev. B* 37 (1988) 785.
- [29] A.D. Becke, *J. Chem. Phys.* 98 (1993) 5648.
- [30] A. Kaczor, K. Malek, M. Baranska, *J. Phys. Chem. C* 114 (2010) 3909.
- [31] S. Williams, T. Johnson, T. Gibbons, C. Kitchens, *Theor. Chem. Acc.* 117 (2007) 283.
- [32] A.P. Scott, L. Radom, *J. Phys. Chem.* 100 (1996) 16502.
- [33] GaussView 5.0, Gaussian Inc., in.

- [34] G. Socrates, *Infrared Characteristic Group Frequencies*, 2nd ed., John Wiley: New York, NY, 1994.
- [35] J.A. Creighton, *Surf. Sci.* 124 (1983) 209.
- [36] M. Moskovits, J.S. Suh, *J. Phys. Chem.* 88 (1984) 5526.
- [37] Zhao, L. Jensen, G.C. Schatz, *J. Am. Chem. Soc.* 128 (2006) 2911.
- [38] J.M. Mullin, J. Autschbach, G.C. Schatz, *Comp. Theor. Chem.* 987 (2012) 32.
- [39] K. Lai, F. Zhai, Y. Zhang, X. Wang, B. Rasco, Y. Huang, *Sens. & Instrumen. Food Qual.* 5 (2011) 91.
- [40] W.S. Sutherland, J.J. Laserna, M.J. Angebrannt, J.D. Winefordner, *Anal. Chem.* 62 (1990) 689.
- [41] R. Montes, J.J. Laserna, *Analyst* 115 (1990) 1601.
- [42] C.G. Blatchford, J.R. Campbell, J.A. Creighton, *Surf. Sci.* 120 (1982) 435.
- [43] A.A. Muthu Prabhu, G. Venkatesh, N. Rajendiran, *J. Solution Chem.* 39 (2010) 1061.
- [44] T. Arslan, F. Kandemirli, E.E. Ebenso, I. Love, H. Alemu, *Corros. Sci.* 51 (2009) 35.
- [45] C. Topaçli, A. Topaçli, *J. Mol. Struct.* 644 (2003) 145.
- [46] B. Kesimli, A. Topaçli, C. Topaçli, *J. Mol. Struct.* 645 (2003) 199.
- [47] S.P. Vijaya Chamundeeswari, E. James Jebaseelan Samuel, N. Sundaraganesan, *Spectrochim. Acta, Part A* 118 (2014) 1.
- [48] **A. Ungurean**, M. Oltean, L. David, N. Leopold, J.P. Prates Ramalho, V. Chiş, *J. Mol. Struct.* 1073 (2014) 71.
- [49] Sigma-Aldrich, Product Information: Sulfamethoxazole, in.
- [50] P.C. Lee, D. Meisel, *J. Phys. Chem.* 86 (1982) 3391.
- [51] M. Cyrankiewicz, T. Wybranowski, S. Kruszewski, *J. Phys. Conf. Ser.* 79 (2007) 012013.
- [52] S.E.J. Bell, N.M.S. Sirimuthu, *J. Phys. Chem. A* 109 (2005) 7405.
- [53] J. Tomasi, B. Mennucci, R. Cammi, *Chem. Rev.* 105 (2005) 2999.
- [54] P. Borowski, *J. Phys. Chem. A* 116 (2012) 3866.
- [55] G. Kresse, J. Hafner, *Phys. Rev. B* 47 (1993) 558.
- [56] G. Kresse, J. Furthmüller, *Phys. Rev. B* 54 (1996) 11169.
- [57] G. Kresse, J. Furthmüller, *Comp. Mater. Sci.* 6 (1996) 15.
- [58] J.P. Perdew, K. Burke, M. Ernzerhof, *Phys. Rev. Lett.* 77 (1996) 3865.
- [59] P.E. Blöchl, *Phys. Rev. B* 50 (1994) 17953.
- [60] G. Kresse, D. Joubert, *Phys. Rev. B* 59 (1999) 1758.
- [61] M. Ge, B. Zhong, W.G. Klemperer, A.A. Gewirth, *J. Am. Chem. Soc.* 118 (1996) 5812.
- [62] W. Reckien, B. Kirchner, F. Janetzko, T. Bredow, *J. Phys. Chem. C* 113 (2009) 10541.
- [63] L.A. LaJohn, P.A. Christiansen, R.B. Ross, T. Atashroo, W.C. Ermler, *J. Chem. Phys.* 87 (1987) 2812.
- [64] W. Zhou, D.E. Moore, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 39 (1997) 63.
- [65] A.L. Boreen, W.A. Arnold, K. McNeill, *Environ. Sci. Technol.* 38 (2004) 3933.
- [66] A.C.D. Inc., ACD/pKa DB, version 12.0, in, Toronto, ON, Canada, 2012.
- [67] C.P. Price, A.L. Grzesiak, A.J. Matzger, *J. Am. Chem. Soc.* 127 (2005) 5512.
- [68] L. Maury, J. Rambaud, B. Pauvert, Y. Lasserre, G. Berge, M. Audran, *Can. J. Chem.* 63 (1985) 3012.
- [69] M. Takasuka, H. Nakai, *Vib. Spectrosc.* 25 (2001) 197.
- [70] P. Politzer, D.G. Truhlar, *Chemical Applications of Atomic and Molecular Electrostatic Potentials*, Plenum, New York, 1981.
- [71] D. Beveridge, R. Lavery, *Theoretical Biochemistry & Molecular Biophysics, Volume 2*, Adenine Press, Schenectady, New York, 1991.
- [72] S. Grimme, J. Antony, S. Ehrlich, H. Krieg, *J. Chem. Phys.* 132 (2010).
- [73] W. Jiang, A. Saxena, B. Song, B.B. Ward, T.J. Beveridge, S.C. Myneni, *Langmuir* 20 (2004) 11433.
- [74] J. Delcour, T. Ferain, M. Deghorain, E. Palumbo, P. Hols, A. van Leeuw, *J. Microb.* 76 (1999) 159.
- [75] M. Ikawa, E.E. Snell, *J. Biol. Chem.* 235 (1960) 1376.

- [76] W.H. Holzapfel, P. Haberer, R. Geisen, J. Bjorkroth, U. Schillinger, *Am. J. Clin. Nutr.* 73 (2001) 365S.
- [77] P. Mobili, A. Londero, G. De Antoni, A. Gomez-Zavaglia, *Rev. Mex. Fis.* 56 (2010) 378.
- [78] D. Vodnar, C. Socaciu, *Chem. Cent. J.* 6 (2012) 61.
- [79] H. Zhou, D. Yang, N.P. Ivleva, N.E. Mircescu, R. Niessner, C. Haisch, *Anal. Chem.* 86 (2014) 1525.
- [80] H. Martens, T. Naes, *Multivariate Calibration* Wiley, Chichester, England, 1989.
- [81] C.H. Esbensen, *Multivariate Data Analysis - in practice*, 5th ed., CAMO Process AS, Esbjerg, Denmark, 2005.
- [82] W.C. Childs, 3rd, D.J. Taron, F.C. Neuhaus, *J. Bacteriol.* 162 (1985) 1191.
- [83] V. Vadillo-Rodriguez, H.J. Busscher, W. Norde, J. de Vries, H.C. van der Mei, *J. Bacteriol.* 186 (2004) 6647.
- [84] H.C. van der Mei, J. de Vries, H.J. Busscher, *Surf. Sci. Rep.* 39 (2000) 1.
- [85] K. Maquelin, C. Kirschner, L.P. Choo-Smith, N. van den Braak, H.P. Endtz, D. Naumann, G.J. Puppels, *J. Microbiol. Methods* 51 (2002) 255.
- [86] X. Lu, H. Al-Qadiri, M. Lin, B. Rasco, *Food Bioprocess. Technol.* 4 (2011) 919.
- [87] K. Gaus, P. Rosch, R. Petry, K.D. Peschke, O. Ronneberger, H. Burkhardt, K. Baumann, J. Popp, *Biopolymers* 82 (2006) 286.
- [88] C. Fan, Z. Hu, A. Mustapha, M. Lin, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 92 (2011) 1053.
- [89] P. Mobili, C. Araujo-Andrade, A. Londero, C. Frausto-Reyes, R.I. Tzonchev, G.L. De Antoni, A. Gomez-Zavaglia, *J. Dairy Res.* 78 (2011) 233.
- [90] N.E. Mircescu, H. Zhou, N. Leopold, V. Chis, N.P. Ivleva, R. Niessner, A. Wieser, C. Haisch, *Anal. Bioanal. Chem.* 406 (2014) 3051.
- [91] A. Walter, A. Marz, W. Schumacher, P. Rosch, J. Popp, *Lab Chip* 11 (2011) 1013.
- [92] M. Kahraman, K. Keseroglu, M. Culha, *Appl. Spectrosc.* 65 (2011) 500.
- [93] N.P. Ivleva, M. Wagner, A. Szkola, H. Horn, R. Niessner, C. Haisch, *J. Phys. Chem. B* 114 (2010) 10184.
- [94] L. Zeiri, B.V. Bronk, Y. Shabtai, J. Eichler, S. Efrima, *Appl. Spectrosc.* 58 (2004) 33.
- [95] R. Prucek, V. Ranc, L. Kvitek, A. Panacek, R. Zboril, M. Kolar, *Analyst* 137 (2012) 2866.
- [96] S. Sivakesava, J. Irudayaraj, D. Ali, *Process Biochem.* 37 (2001) 371.
- [97] K.C. Schuster, I. Reese, E. Urlaub, J.R. Gapes, B. Lendl, *Anal. Chem.* 72 (2000) 5529.
- [98] M. Kahraman, M.M. Yazıcı, F. Şahin, M. Çulha, *Langmuir* 24 (2008) 894.
- [99] A. Sengupta, M.L. Laucks, N. Dildine, E. Drapala, E.J. Davis, *J. Aerosol Sci.* 36 (2005) 651.

Lista de publicații

Articole publicate în jurnale cotate ISI

- **A. Ungurean**, N. Leopold, L. David, V. Chiș, **Vibrational spectroscopic and DFT study of trimethoprim**, Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy 102 (2013) 52–58.
- **A. Ungurean**, M. Oltean, L. David, N. Leopold, J. P. Prates Ramalho, V. Chiș, **Adsorption of sulfamethoxazole molecule on silver colloids: A joint SERS and DFT study**, Journal of Molecular Structure 1073 (2014) 71-76.
- D. Marconi, **A. Ungurean**, **The effect of substrate temperature on structural and morphological properties of Au/Si(1 1 1) thin films**, Applied Surface Science 288 (2014) 166-171.
- A. I. G. Petrehele, D. Rusu, **A. Ungurean**, G. L. Turdean, E. Indrea, L. David, M. Rusu, **Structural and physico-chemical study of new Keggin polyoxometalates with mixed addenda**, Chemistry Magazine 65 (2014) 265-271.

Articole publicate în jurnale cotate BDI

- D. Rusu, D. Mare, C. Berindean, **A. Ungurean**, O. Baban, L. David, **Spectroscopic studies of lacunary polyoxotungstates Cerium (III) complexes based on α -B-[Bi^{III}W₉O₃₃]⁹⁻ units**, Studia UBB Physica 57(LVII) 1 (2012) 87 - 92.

Articole trimise spre evaluare

- **A. Colniță**, D. Marconi, I. Turcu, **Fabrication of interdigitated electrodes using molecular beam epitaxy and optical lithography**, Analytical Letters, 2014.
- D. Marconi, **A. Colniță**, I. Turcu, **The influence of deposition rate on structural and morphological properties of Au/Si(111) growth using molecular beam epitaxy method**, Analytical Letters, 2014.

Manuscris în pregătire

- **A. Ungurean-Colniță**, N. E. Dina, N. Leopold, D. C. Vodnar, V. Chiș, L. David, **Characterization and discrimination of Gram - positive bacteria using Raman spectroscopy**, 2014.

Participări la conferințe

Conferințe internaționale

- **A. Ungurean**, N. Leopold, S. Schlücker, S. Niebling, V. Chiș, L. David, **SERS experimental and DFT study of Trimethoprim**, 14th European Conference on the Spectroscopy of Biological Molecules (**ECSBM 2011**), 29 Aug. - 3 Septembrie 2011, Coimbra, Portugalia (**Poster**).
- **A. Ungurean**, N. Leopold, S. Schlücker, S. Niebling, V. Chiș, L. David, **A theoretical study of the SERS spectrum of Trimethoprim adsorbed on silver clusters**, 4th Conference on Advanced Spectroscopies on Biomedical and Nanostructured Systems (**BioNanoSpec 2011**), 4-7 Septembrie 2011, Cluj-Napoca, România (**Poster**).
- **A. Ungurean**, N. Leopold, V. Chiș, L. David, **Theoretic and vibrational spectroscopy investigations of Trimethoprim**, International Conference on Sciences, 11-12 Noiembrie 2011, Oradea, România (**Prezentare orală**).
- **A. Ungurean**, M. Oltean, L. David, N. Leopold, V. Chiș, **A spectroscopic study of Sulfamethoxazole adsorbed on silver nanoparticles**, 31st European Congress of Molecular Spectroscopy (**EUCMOS 2012**), 26 -31 August 2012, Cluj-Napoca, România (**Poster**).
- D. Rusu, A. I. G. Petrehele, **A. Ungurean**, M. Hubner, G. Borodi, M. Rusu, L. David, **Structural and physical - chemical study of the new Keggin polyoxometalates with mixed addenda**, 31st European Congress of Molecular Spectroscopy (**EUCMOS 2012**), 26 -31 August 2012, Cluj-Napoca, România (**Poster**).
- D. Marconi, **A. Ungurean**, R. Bratfalean, **The influence of deposition rate on structural and morphological properties of gold thin films on Si (111)**, 9th International Conference on Processes in Isotopes and Molecules (**PIM 2013**), 25-27 Septembrie 2013, Cluj-Napoca, România (**Poster**).
- **A. Colniță**, D. Marconi, I. Turcu, **Fabrication of interdigitated electrodes using molecular beam epitaxy and optical lithography techniques and its applications in molecular detection**, The 3rd International Conference on Analytical and Nanoanalytical Methods for Biomedical and Environmental Sciences (**IC-ANMBES 2014**), 13-15 Iunie 2014, Brașov, România (**Prezentare orală**).
- D. Marconi, **A. Colniță**, I. Turcu, **The effect of substrate temperature on structural and morphological properties of Au/Si(111) thin films**, The 3rd International Conference on Analytical and Nanoanalytical Methods for Biomedical and Environmental Sciences (**IC-ANMBES 2014**), 13-15 Iunie 2014, Brașov, Romania (**Poster premiat de către organizatori**).
- **A. Colniță**, N.E. Dina, D. Vodnar, N. Leopold, V. Chiș, L. David, **Characterization of gram positive bacteria using Raman spectroscopy**, The 3rd

- International Conference on Analytical and Nanoanalytical Methods for Biomedical and Environmental Sciences (**IC-ANMBES 2014**), 13-15 Iunie 2014, Braşov, România (**Poster**).
- **A. Colniță**, N. E. Dina, D. Vodnar, N. Leopold, V. Chiş, L. David, **The use of Raman spectroscopy in Gram-positive bacteria detection and characterization**, 5th Conference on Advanced Spectroscopies on Biomedical and Nanostructured Systems (**BioNanoSpec 2014**) 7-10 Septembrie 2014, Cluj-Napoca, România (**Poster**).

Conferințe naționale

- **A. Ungurean**, N.E. Mircescu, N. Leopold, D. Vodnar, L. David, **Label-free bacteria detection using Raman spectroscopy**, 12th National Conference on Biophysics (**NCB 2013**) – Biophysics for Health, with International Participation, 13-16 Iunie 2013, Iași, România (**Poster**).

Alte activități științifice relevante

- Participarea la Cursul Internațional "**Electroporation for Medicine: Basic Knowledge, Applications and Technologies**", organizat de către Universitatea de Medicină și Farmacie Carol Davila și de către Societatea Română de Biofizică Pură și Aplicată, cu suport financiar din partea Acțiunii COST TD 1104, 25 – 27 Octombrie 2012, București, România.
- Participarea la Workshopul Satelit "**Current reports on synthetic peptides, metals and molecular adaptors interaction with protein pores and reconstituted lipid membrane systems**", organizat pe durata conferinței **IC-ANMBES 2014**, 11-12 Iunie 2014, Braşov, România. **Prezentare orală** cu titlul "**Nanoimprint lithography: A versatile tool for high resolution nanofabrication**".