

**Universitatea Babeș-Bolyai  
Facultatea de Fizică**

**Rezumatul tezei de doctorat**

**FABRICAREA SI EVALUAREA UNOR SUBSTRATE  
PLASMONICE NECONVENTIONALE PENTRU  
APLICATII DE BIOSENZORISTICA SERS**

**Cosmin Ioan LEORDEAN**

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

**CLUJ-NAPOCA  
2014**

# Cuprins

<b>Prezentare a continutului tezei .....</b>	<b>2</b>
<b>Capitolul 1 BIOSENZORI PE BAZA DE NANOSTRUCTURI PLASMONICE: ASPECTE GENERALE .....</b>	<b>4</b>
1.1 Biosenori.....	4
1.2 Notiuni teoretice.....	4
1.2.1 Plasmoni de suprafata .....	4
1.2.2 Utilizarea nanostructurilor plasmonice in aplicatii de biosenzoristica .....	5
1.3 Metode de fabricare a substratelor nanostructurate.....	6
<b>Capitolul 2 FABRICAREA DE SUBSTRATE NANOSTRUCTURATE PE BAZA DE NANOPARTICULE DE AUR .....</b>	<b>8</b>
2.1 Fabricarea de substrate plasmonice prin asamblare de nanoparticule de aur.....	8
2.1.1 Metoda picurarii .....	8
2.1.2 Metoda atasarii chimice .....	9
2.1.3 Metoda auto-asamblarii convective.....	10
2.2 Performanta SERS a substratelor nanostructurate.....	11
2.3 Exploatarea substratelor plasmonice in aplicatii de detectie multi-analit de biomolecule din fluide biologice .....	13
2.3.1 Detectie multi-analit.....	13
2.3.2 Detectia ureei din lichide biologice .....	14
<b>Capitolul 3 FABRICAREA DE SUBSTRATE NANOSTRUCTURATE SI MICROTTEXTURATE PENTRU AMPLIFICARE SERS MULTIPLICATIVA .....</b>	<b>15</b>
3.1 Fabricarea filmului microtexturat periodic de nanoparticule de aur .....	15
3.2 Caracterizarea filmului microtexturat periodic de nanoparticule de aur.....	16
3.2.1 Caracterizare morfologica .....	16
3.2.2 Caracterizare optica.....	16
3.3 Evaluarea amplificarii electromagnetice SERS multiplicative .....	17
3.3.1 Eficienta SERS.....	17
3.3.2 Masuratori de reproductibilitate, stabilitate in timp si reutilizare a substratului .....	19
3.3.3 Simulari cu metoda Diferentelor Finite in Domeniul Temporal (engl. FDTD) .....	20
<b>Capitolul 4 FABRICAREA DE SUBSTRATE PLASMONICE ORDONATE PENTRU DETECTIE SI ANALIZA CANTITATIVA FOLOSIND SERS .....</b>	<b>21</b>
4.1 Metoda de fabricare in doi pasi a substratului cu nanostructuri piramidale prin litografie de nano-imprimare .....	21
4.2 Caracterizarea substratului cu nanostructuri piramidale .....	22
4.2.1 Caracterizare morfologica .....	22
4.2.2 Caracterizare optica.....	24
4.2.3 Simulari cu metoda Diferentelor Finite in Domeniul Temporal (engl. FDTD) .....	24
4.3 Proprietati spectroscopice ale substratului plasmonic cu nanostructuri piramidale .....	25
4.4 Detectia si analiza cantitativa a moleculelor de uree .....	26
<b>Capitolul 5 CONCLUZII FINALE .....</b>	<b>28</b>
<b>Referinte .....</b>	<b>29</b>
<b>Lista publicatiilor .....</b>	<b>31</b>

## PREZENTARE A CONTINUTULUI TEZEI

Biosenzorii constituie o piata in valoare de peste 13 miliarde de dolari la nivel mondial, cu aplicatii in medicina, farmacie, controlul si procesarea alimentelor, monitorizarea mediului, aparare si securitate. Costurile crescute ale asistentei medicale impreuna cu cresterea cererii, impun crearea unor noi senzori mai ieftini, portabili, integrati si non-invazivi, cu posibilitatea de fabricatie in serie, in scopul de a sustine mentinerea bunastarii, ingrijirea persoanelor in varsta, testarea si dezvoltarea farmaceutica, precum si diagnosticarea diferentiata. Nanotehnologia a inceput sa joace un rol tot mai important in dezvoltarea de biosenzori. Performanta si sensibilitatea biosenzorilor este imbunatatita prin utilizarea de materiale nanostructurate in procesul de fabricarea. In acest context, producerea unor nanostructuri plasmonice cu aplicabilitate in fabricarea senzorilor, reprezinta o provocare importanta pentru cercetatori.

**Capitolul 1** prezinta o imagine de ansamblu asupra biosenzorilor bazati pe nanostructuri plasmonice, evidentiind conceptele de baza ale biosenzorilor, in special biosenzorii plasmonici, aspect teoretice privind fenomenul de plasmoni de suprafata si diferite strategii utilizate la fabricarea materialelor nanostructurate, cum ar fi abordările „top-down” si „bottom-up”.

Urmatoarele patru capitole contin rezultatele experimentale obtinute in timpul perioadei mele de doctorat la Centrul de Nanobiofotonica al Institutului de Cercetari Interdisciplinare in Bio-Nano-Stiinte, din cadrul Universitatii Babes-Bolyai, Cluj-Napoca.

**Capitolul 2** prezinta trei strategii foarte simple, bazate pe asamblarea nanoparticulelor de aur sintetizate chimic (NPs), utilizate pentru a fabrica cu usurinta substrate plasmonice nanostructurate, cu aplicabilitate in detectia optica si identificarea speciilor moleculare de interes biologic sau chimic, a poluantilor, sau a agentilor de razboi, bazata pe metoda de imprastiere raman amplificata de suprafata (SERS).

Strategiile utilizate pot fi puse in aplicare in orice laborator, fara a fi nevoie de echipament specializat pentru sintetizarea NPs sferice stabilizate cu citrat, si constau in: (i) metoda picurarii, care induce asamblarea coloizilor in asa-numitele “inele de cafea”, (ii) asamblarea NP pe suprafete de sticla functionalizate chimic, care produce coloizi asamblati aleatoriu si grupari coloidale, si (iii) o varianta simplificata a auto-asamblarii convective (CSA), bazata pe evaporarea apei intr-o geometrie restransa, care produce benzi foarte uniforme de NP. Proprietatile SERS ale ansamblelor coloidale rezultate sunt evaluate comparativ pentru mai multe lungimi de unda de excitatie, folosind ca reporter Raman molecula de p-Aminotiofenol (pATP). Fasiile de NPs obtinute prin CSA s-au dovedesc a fi active SERS atat in regiunea vizibil cat si in NIR, si prezinta un raspuns SERS foarte uniform, demonstrat prin imagistica SERS confocala. De asemenea, este demonstrat faptul ca nanostructurile NPs obtinute, sunt eficiente in detectarea citozinei, o componenta a ADN-ului, si in detectia SERS multi-analit. Aceste rezultate arata faptul ca un substrat eficient SERS poate fi obtinut printr-o metoda foarte simpla de asamblare a unor NP de aur coloidale usor sintetizabile, putand avea un real impact in dezvoltarea de aplicatii SERS analitice.

In **Capitolul 3** este detaliata fabricarea de filme micro-structurate din NPs de aur coloidale, preparate dupa o abordare de auto-asamblare, fara a implica procedee de litografie, demonstrandu-se de asemenea capacitatea unor astfel de substraturi in generarea de amplificare electromagnetica SERS multiplicative in avalansa. Efectul de amplificare multiplicativa este obtinut prin combinarea campurilor plasmonice de suprafata apropiate, datorite structurilor nanometrice, cu cuplajul fonic in camp indepartat datorita structurilor periodice micrometrice. Efectul se observa atat pentru reporteri Raman interni (molecule atasate coloizilor de Au inainte de asamblarea lor) cat si pentru sonde Raman externe (molecule adsorbite pe proba dupa asamblarea filmului). Capacitatea de cuplaj in camp indepartat a luminii, detinuta de filmele structurate, este sustinuta de spectrele de reflexie, care prezinta minime/maxime in domeniul spectral vizibil. Rezultatele experimentale sunt confirmate de simulari FDTD ale distributiei campului electric. Substraturile SERS prezinta o buna reproductibilitate spatiala si stabilitate in timp, dovedita prin raspunsul SERS de-a lungul unei perioade de peste o luna. Demonstrarea experimentală a efectului de amplificare electromagnetica in avalansa contribuie la o mai buna intelegere a fenomenului SERS, si poate avea un efect pozitiv asupra proiectarii pe viitor a substraturilor active SERS. Mai mult, astfel de filme coloidale create prin CSA pot fi de interes general pentru domeniul larg al dispozitivelor bazate pe NPs.

**Capitolul 4** se axeaza pe evidentierea unei abordari simple pentru fabricarea unor nanostructuri piramidale metalice ordonate periodic si demonstrarea eficientei acestora ca substraturi active SERS. Metoda folosita se bazeaza pe litografia de nano-imprimare (NIL) si exploateaza proprietatile termice a doua clase de polimeri, materiale termoplastice si hidrogeluri. In timpul procesului de incalzire polimerii termoplastici incep sa se topeasca, in timp ce polimerii hidrogeluri se solidifica datorita evaporarii moleculelor de apa adsorbita in timpul procesului de dizolvare. Folosind aceasta abordare si un DVD comercial ca o matrita initiala, au fost fabricate cu success structuri piramidale cu o buna structurare si periodicitate. Aceasta tehnica reprezinta o alternativa ieftina la tehnicile clasice de litografie, permitand fabricarea pe zone intinse ( $\sim\text{cm}^2$ ) a nanostructurilor ordonate periodic intr-un mod controlabil si reproductibil folosind NIL. Eficienta SERS a substraturii fabricat este demonstrata prin detectia moleculelor de uree din amprenta. In plus, datorita periodicitatii structurilor de forma piramidala, substraturii fabricat poate fi folosit cu succes pentru corelarea intensitatii benzii SERS specifice ureei, cu concentratia de molecule, sugerand astfel posibilitatea realizarii unui sensor renal cantitativ.

Concluziile finale ale tezei sunt prezentate in **Capitolul 5**.

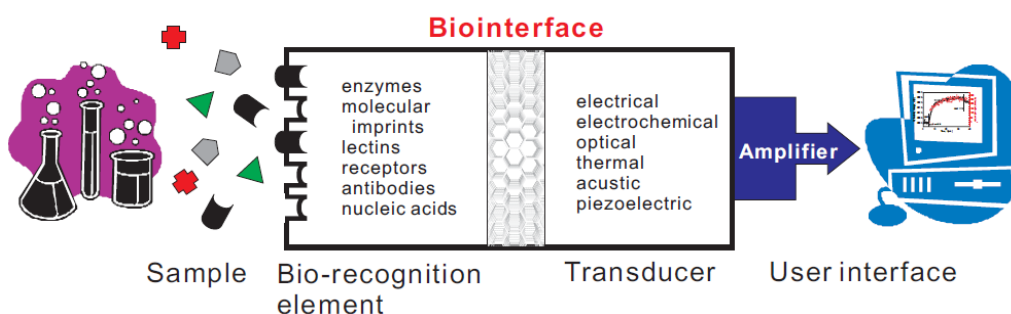
Aceasta teza a fost realizata cu sustinere financiara din proiectul: "Investeste in oameni" - Proiect co-finantat din Fondul Social European prin Programul Operatiional Sectorial pentru Dezvoltarea Resurselor Umane 2007-2013. Contract nr. POSDRU/159/1.5/S/132400- " Tineri cercetatori de succes – dezvoltare profesională în context interdisciplinar și internațional", Cluj-Napoca, Romania.

## CAPITOLUL 1

# BIOSENZORI PE BAZA DE NANOSTRUCTURI PLASMONICE: ASPECTE GENERALE

### 1.1 Biosenori

Domeniul biosenzorilor a aparut in 1967, cand Updike si Hicks au publicat in revista Nature informatii despre primul dispozitiv pentru detectia glucozei ( Updikeand Hicks, 1967). Din acest punct de plecare, s-au dezvoltat o gama larga de tehnologii ale biosenzorilor cu aplicatii in diverse domenii precum: controlul alimentelor (de ex. detectarea toxinelor alimentare), diagnostic medical (de ex. detectia markerilor bolii) si monitorizarea mediului (cum ar fi detectia poluantilor) (Turner 2000). Conform Uniunii pentru Chimie Pura si Aplicata, un biosensor poate fi descries ca fiind o unitate sau un dispozitiv de analiza, folosit pentru detectarea unui analit asociat sau care integreaza o componenta biologica intr-un detector fizico-chimic, mai precis, un traductor (Turner 2000). Componentele unui biosensor sunt reprezentate schematic in Figura 1-1.



**Figura 1-1:** Reprezentare schematica e unui biosensor.

In functie de elementul de bio-recunoastere, biosenzorii pot fi clasificati in doua grupuri majore: biosenzori catalitici si biosenzori de afinitate. Traductorul are rolul de a traduce elementele de recunoastere (de ex. cataliza enzimatica, sau captara analitului), intr-un semnal chimic sau fizic (de ex. electric, electrochimic, optic, termic, acustic). Printre diferitele tipuri de biosenzori optici dezvoltate in ultimii zece ani, cei bazati pe efecte plasmonice de suprafata au devenit cei mai populari, datorita sensibilitatii lor ridicate si datorita posibilitatii detectiei fara markeri si in timp real a legaturilor moleculare.

### 1.2 Notiuni teoretice

#### 1.2.1 Plasmoni de suprafata

In ultimul deceniu cercetatorii au efectuat o munca intensa cu scopul intelegerii fundamentelor plasmonicii si dezvoltarii de dispozitive plasmonice bazate pe nanostructuri. In domeniul nanofotonicii, plasmonica reprezinta o directie relativ noua care are la baza

proprietatiile oscilatiile collective ale electronilor de la suprafata filmelor sau nanostructurilor de metale nobile (Au, Ag, Cu), cunoscute ca si plasmoni de suprafata (Kreibig and Vollmer, 1995; Raether, 1988). Cercetatorii au observat faptul ca plasmoni de suprafata se pot afla sub diferite forme, ca si unde electronice propagative aflate la interfata dintre un mediu dielectric si un film metallic sau oscilatii localizate ale electronilor pe suprafata nanostructurilor sau nanoparticulelor.

Polaritonii plasmonici de suprafata (SPPs) pot fi descrisi ca si unde electromagnetice ce se propaga la interfata dintre un mediu metallic si un mediu dielectric. In 1902, Prof. Robert W. Wood face prima observare a SPPs. In 1968 doua echipe de cercetatori, una condusa de Andreas Otto cealalta condusa de Erich Kretschmann si Heinz Raether, au demonstrat aproape in acelasi timp, faptul ca folosind o prisma optica este posibil excitarea optica a plasmonilor in filme metalice (Kretschmann and Raether, 1968; Otto, 1968).

Nanoparticulele de metale nobile sunt cunoscute ca avand proprietati remarcabile aparute in urma interactiunii directe dintre lumina incidenta si oscilatiile colective ale electronilor aflati in jurul nanoparticulelor, acestea fiind cunoscute ca plasmoni localizati de suprafata (LSPs). Ca rezultat al acestei interactiuni, nanoparticulele de metal nobil prezenta o puternica banda de abosortie in regiunea UV-Vis, banda care nu este prezenta in spectru de absorbtie al metalului in forma macroscopica (Haynes and Van Duyne, 2001). Aceasta banda de absorbtie este cunoscuta ca rezonanta plasmonica de suprafata (LSPR). Excitarea LSPR rezulta intr-o imprastiere Rayleigh rezonanta (Michaels et al., 1999) cu o eficienta de aproximativ  $10^6$  ori mai mare decat cea a flurorforilor (Yguerabide and Yguerabide, 1998) si o amplificare a campului electromagnetic local din apropierea suprafetei nanoparticulei (Zhang et al., 2006).

### *1.2.2 Utilizarea nanostructurilor plasmonice in aplicatii de biosenzoristica*

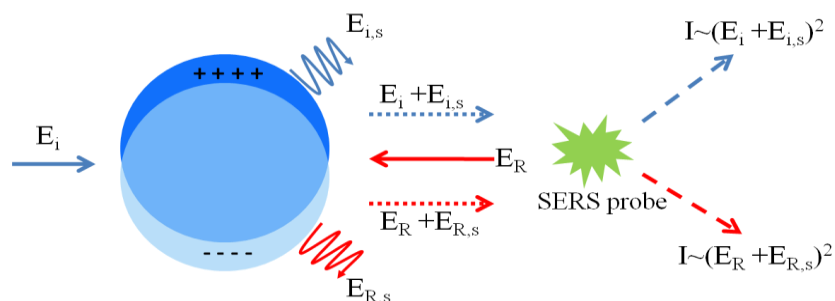
Biosenzorii optici bazati pe traductori plasmonici reprezinta o alegere foarte buna in analiza interctiunii biomoleculare fara marcarea in prealabil a acestora (Hall, 2001; Schuck, 1997). De exemplu, prin folosirea unui dispozitiv bazat pe rezonante plasmonice de suprafata (SPR), ce functioneaza ca un tranductor plasmonic bazat pe excitarea plasmonilor de suprafata pe o suprafata de aur planara, s-au putut indentifica schimbariile de mediu prin inregistrarea modificarilor aparute in spectrul de reflectivitate. Astfel rezultatele din literaturare demonstreaza ca biosenzorii bazati pe SPR pot fi utilizati in investigarea interactiunilor moleculare la concentratii foarte mici.

In cazul nanoparticulelor metalice, campul electromagnetic are un mod de operare foarte similar cu propagarea SPPs pe filmele metalice plane si permite traducerea interactiunii chimice intr-o deplasare masurabila a pozitiei maximului de extinctie. In ciuda demonstrarii in laborator a eficientei biosenzorilor LSPR bazati pe nanoparticule (Coe et al., 2008; Liu et al., 2006), fabricarea unui biosenzor LSPR bazat pe nanoparticule ramane o sarcina dificila si necesita imbunatatiri importante in ceea ce priveste rezolutia spatiala, reproductibilitatea si monodispersitatea in marime si forma a nanoparticulelor metalice.

Comparativ cu biosenzorii bazati pe LSPR, biosenzorii bazati pe imprastierea Raman amplificata de suprafata (SERS) functioneaza prin amplificarea semnalului Raman al

moleculilor de analit aflat in imediata apropiere sau in contact cu suprafata metalica a nanostructurilor si care interactioneaza cu SPR. Imprastierea Raman este un process inelastic in care fotonii incidenti pot sa primeasca sau sa piarda energie in urma interactiunii cu moleculele. Spectrul imprastierii Raman rezultat consta intr-o serie de benzi ce corespund unor tranzitii rotationale sau vibrationale specifice moleculei, oferind astfel o “amprenta” chimica foarte specifica foarte utila in indentificarea analitului.

In ciuda specificitatii, imprastierea Raman este un fenomen foarte slab, aproximativ 1 la  $10^6$ - $10^{10}$  fotoni sunt imprastiatii inelastic (McCreery, 2000). Astfel, utilizand nanostructuri plasmonice, cercetatorii au reusit sa detecteze amprenta chimica a unei singure molecule, datorita amplificarii semnalului Raman cu pana la 14-15 ordine de marime. Mecanismul electromagnetic cu cea mai mare contributie in efectul SERS este prezentat in Figura 1-2.



**Figura 1-2:** Reprezentare schematica a mecanismului de amplificare electromagnetică din SERS.

In cazul in care un fluorofor este plasat in apropierea unei suprafete metalice, interactiunea dintre electronii fluoroforului si campul plasmonic poate induce schimbari in emisia de fluorescenta, fie prin amplificarea sau fie prin stingerea acesteia. Primul care a observat acest fenomen de amplificare a emisiei de fluorescenta de catre o suprafata metalica (MEF) a fost Drexhage et al. in 1974.

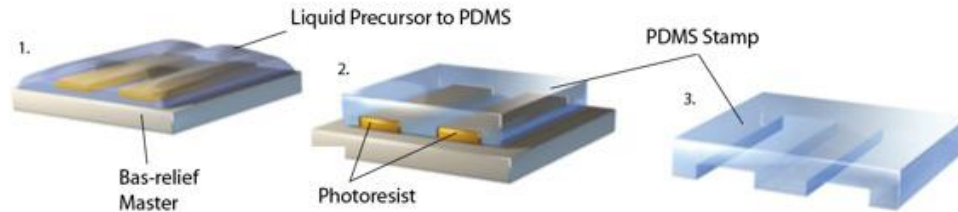
Campul electric simtit de catre un fluorofor este influentat de interactiunea dintre lumina incidenta cu suprafata metalica din imediata apropiere dar si de interactiunea dipolului sau oscilator cu suprafata metalica. Mai mult de atat, dipolul fluoroforului va induce un camp suprafetei metalice. De fapt, aceste interactiuni pot duce la amplificarea sau scaderea campului incident fluoroforului si la cresterea sau scaderea ratei de dezexcitare radiativa. Asadar, interactiunea dintre fluorofori si nanostructuri metalice constituie un subiect de interes datorita aplicabilitatii ca biosenzori sau materiale optice neliniare (Noginov et al., 2005). In concluzie, impreuna cu SERS, efectul de amplificare a fluorescentei prezinta aplicabilitate in detectia de proteine (Aslan et al., 2005), analiza medicamentelor sau analize imunologice.

### 1.3 Metode de fabricare a substratelor nanostructurate

Intr-o abordare larga, fabricarea la scara nanometrica sau mai simplu nanofabricarea, se refera la proiectarea, construirea si manipulara materialele cu dimensiuni mici, de obicei in

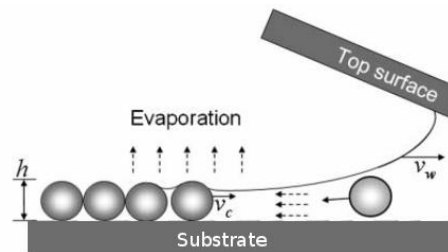
intervalul de la 1 la 100 nm. Metodele de fabricare sunt de obicei clasificate in doua categorii principale: (1) „top-down” si (2) „bottom-up”.

Abordarea „top-down” se refera la sculptarea de structuri la scara nanometrica prin indepartarea controlata de material din structuri macroscopice. Metoda de nanofabricare „top-down” implica procese fizice ca de exemplu tehnici de litografie sau procese chimice. Litografia de nano-imprimare (NIL) este o tehnica ieftina care implica fabricarea de structuri cu caracteristici la scara nano si micrometrica prin texturarea unui film polimeric cu ajutorul unei matrite.



**Figura 1-3:** Imagine ilustrativa a metodei de fabricare a matritei de PDMS. (Adaptata din Whitesides & Love, 2001)

Conceptul „bottom-up” se refera la fabricare de nanostructuri prin exploatarea conceptului de celule elementare, cum ar fi atomi , molecule sau nanoparticule, care apoi sunt auto-asamblate in structuri mai mari si mai complexe. Majoritatea metodelor de fabricare „bottom-up” se bazeaza pe sinteza chimica a nanoparticulelor. Una dintre cele mai obisnuite metode de nanofabricare „bottom-up” a substratelor solide este litografia coloidala sau pe baza de nanosfere (NLS). Aceasta se bazeaza pe auto-asamblarea nanosferelor de polistirene sau latex pe un substrat solid, urmand ca peste acestea sa se depuna un film metalic subtire de o grosime controlabila, ca mai apoi sferele sa fie inlaturate.



**Figura 1-4:** Prezentare schematica a procesului de uscare a unui film subtire, in urma evaporarii. Un strat de grosime  $h$  de nanoparticule coloidale va fi depus pe substrat in urma translatarii lamei superioare cu viteza  $v_w$ .

Nagayama et al. au utilizat o metoda de auto-asamblare convectiva pentru fabricarea unui monostrat pe o suprafata extinsa (Dimitrov and Nagayama, 1996; Rossi et al., 2000). In timpul asamblarii, particulele dispersate sunt aduse impreuna cristalizand in filme subtiri. O reprezentare schematica este prezentata in Figura 1-4.



## CAPITOLUL 2

### FABRICAREA DE SUBSTRATE NANOSTRUCTURATE PE BAZA DE NANOPARTICULE DE AUR

În acest capitol dorim să adresăm următoarea întrebare: ce tipuri de asamblări de nanoparticule de aur (AuNPs) pot fi obținute prin metode foarte simple, fără folosirea unor echipamente speciale, pentru fabricarea de substraturi SERS de o calitate apreciabilă în vederea folosirii lor în detecție SERS și aplicații analitice? În consecință, sunt propuse trei strategii diferite de asamblare pentru prepararea de filme de NPs, care sunt foarte simple de implementat în orice laborator. Cea mai simplă metodă se referă la picurare, adică simpla distribuție a unei picături pe un substrat și permiterea acesteia să se usuce. A doua metodă este bazată pe atasarea NPs pe substraturi funcționalizate chimic în prealabil, prin folosirea unor molecule chimice pentru atasarea coloizilor de aur pe suprafața de sticlă (Makiabadi et al., 2010; Toderas et al., 2007). A treia metodă este similară metodei prin picurare, dar în acest caz o formă predefinită este impusă picăturii de coloid prin fixarea picăturii între o placuță de microscop și substrat, această configurație fiind derivată din auto-asamblarea convectivă (CSA) (Bunzendahl et al., 2001; Ding et al., 2009; Prevo et al., 2005; Yuan et al., 2006). Asamblările de NP sunt în final obținute prin uscarea picăturii.

Activitatea SERS a AuNP asamblate este investigată atât în ceea ce privește intensitatea cât și reproductibilitatea semnalului, prin utilizarea unui reporter Raman. În final se arată faptul că nanostructurile de NPs preparate prin atasare chimică și CSA sunt promițătoare pentru utilizare ca substraturi SERS pentru detecția și analiza de molecule biologice relevante dar și pentru detecția simultană a mai multor analiți din aceeași probă.

#### 2.1 Fabricarea de substraturi plasmonice prin asamblare de nanoparticule de aur

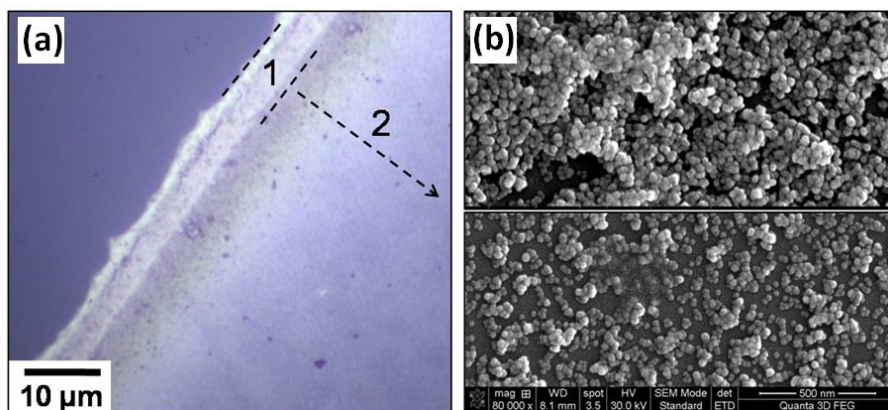
Un aspect important în fabricarea de substraturi plasmonice prin asamblarea de nanoparticule de aur pe substraturi solide este crearea unei suprafețe curate și hidrofobe a substratului solid. În funcție de tipul de substrat (de exemplu: placuțe de microscop, placuțe de polycarbonate etc), procesul de curățare și hidrofobizare se bazează pe tratamentul cu UV-Ozon. În continuare, vor fi descrise cele trei strategii de asamblare propuse.

##### 2.1.1 Metoda picurării

Una dintre cele mai utilizate metode de fabricare a unor structuri prin asamblarea de micro și nanoparticule este metoda picurării. O picătură de coloid este depusă pe un substrat solid. Acumularea și depunerea coloizilor de-a lungul marginii picăturii (meniscului sau a liniei de tripu-contact) este indusă de evaporarea apei, proces ce produce un flux de coloizi dinspre interiorul picăturii spre marginea sau meniscul acesteia. Picătura coloidală rămânând fixată pe substrat în timpul uscării, scăzând doar în înălțime, în urma uscării ceea ce se depune are aproximativ aceeași dimensiune ca și picătura inițială de coloid, rezultatul fiind reprezentat de o

banda circulara. In cazul nostru, *proba Picatura* se prepara prin simpla distribuire a unei picaturi de coloid de aur pe o suprafata de sticla si lasarea acesteia sa se usuce, astfel obtinandu-se o structura similara cu asa numitele „inele de cafea” (Deegan et al., 1997).

Procesul de uscare conduce la formarea unui depozit circular cu diametrul de 6-7 mm, delimitate de o margine mai groasa cu latimea de 7-8  $\mu\text{m}$ . Imaginea optica a picaturi de coloid uscata este prezentata in Figura 2-1(a). Dupa cum se poate observa, zona delimitate de liniile intrerupte reprezinta asa numitul „inel de cafea”. Sageata indica directia de la marginea picaturi catre centrul acesteia.



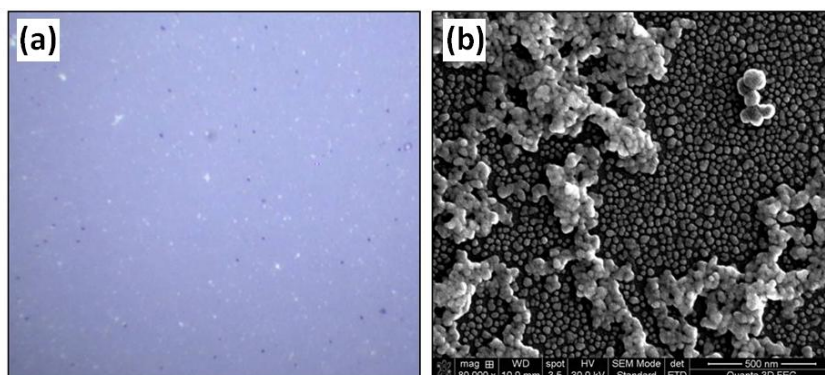
**Figura 2-1:** Imagini de microscopie optica (a) si SEM (b) a NPs asamblate in urma uscarii unei picaturi coloidale (*proba Picatura*). Regiunea 1 in (a) delimitata prin liniile intrerupte reprezinta asa numitul „inel de cafea”, sageata indicand centrul picaturi si regiunea 2.

### 2.1.2 Metoda atasarii chimice

O alta abordare in fabricarea de nanostructuri bazata pe asamblarea nanoparticulelor consta in atasarea chimica a nanoparticulelor pe un substrat solid prin folosirea unui ligand specific, de ex. aminopropiltrimetoxisilan (APTS) sau mercaptopropiltrimetoxisilan (MPTMS), avand rolul de a face legatura intre nanoparticule si substrat. Aceste molecule prezinta intr-un capat o grupare silan ( $\text{SiH}_4$ ) cu ajutorul careia se leaga de substratul de sticla ( $\text{SiO}_2$ ), iar in celalalt capat o grupare activa amino ( $-\text{NH}_2$ ) sau mercapto ( $-\text{SH}$ ), acestea formand o legatura covalenta cu nanoparticulele de aur (Baia et al., 2009).

Morfologia probei preparate prin imersia unei placute de sticla, functionalizata in prealabil, intr-o suspensie coloidala de AuNPs apare ca un film uniform asa cum se observa din imaginea optica (Figura 2-2 (a)). Multe dintre AuNPs sunt atasate individual pe substrat in urma formarii de legaturi chimice intre nanoparticulele de aur si gruparea  $\text{NH}_2$  a APTS-ului. In acelasi timp mai multe agregate de NPs depuse aleatoriu pot fi gasite pe *proba Func*, acestea corespund spoturilor luminoase din imaginea optica (Figura 2-2(a)). Acest lucru ar putea fi datorat faptului ca un anumit numar de molecule APTS prezente pe suprafata placutei de sticla in urma functionalizarii nu sunt foarte bine legate de aceasta, in urma imersiei ele desprinzandu-se si

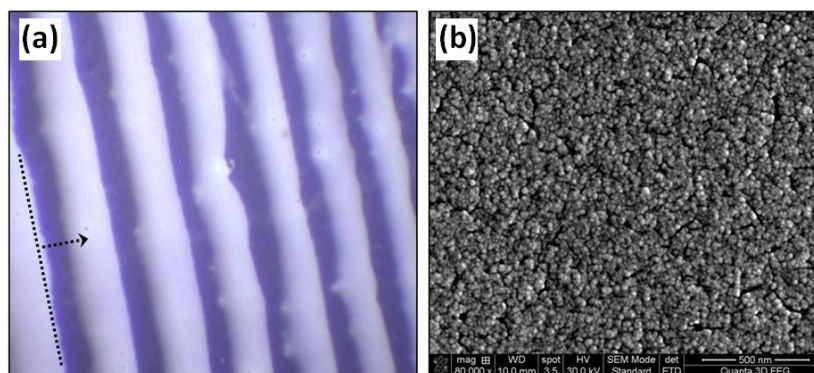
ducand la formarea aceste agregate. Figura 2-2(b) ne prezinta un exemplu de asemenea agregate de NPs cu forma neregulata.



**Figura 2-2:** Imagini de microscopie optica (a) si SEM (b) a NPs asamblate prin atasare chimica (*Proba Func*).

### 2.1.3 Metoda auto-asamblarii convective

Pentru a treia strategie de asamblare a NPs, un simplu sistem CSA a fost construit, dupa cum urmeaza: o placuta de sticla rectangulara este plasata foarte aproape de o substratul de sticla facand cu aceasta un unghi de  $90^\circ$  si avand o margine paralela cu substratul. O picatura de colloid a fost distribuita de-a lungul zonei lor de contact, aceasta fiind tinuta in loc prin forte capilare devenind astfel alungita. In acest fel doua meniscuri drepte s-au format pe substrat, unul de fiecare parte a placutei verticale. Astfel picatura prinsă între cele doua placute a fost lasata sa se usuce in conditii ambientale. Probele preparate in conformitate cu acest protocol vor fi mentionate ca si *proba CSA*. Prin urmare se obtin doua linii de triplu-contact, care sunt sub forma liniara si in jur de 1-2 cm una de fiecare parte a placii verticale. Imaginea optica din Figura 2-3(a) prezinta o multime de benzi paralele, cu latimea de 6-10  $\mu\text{m}$ , realizate din AuNPs si obtinute prin uscare de o parte si de cealalta a placutei verticale.

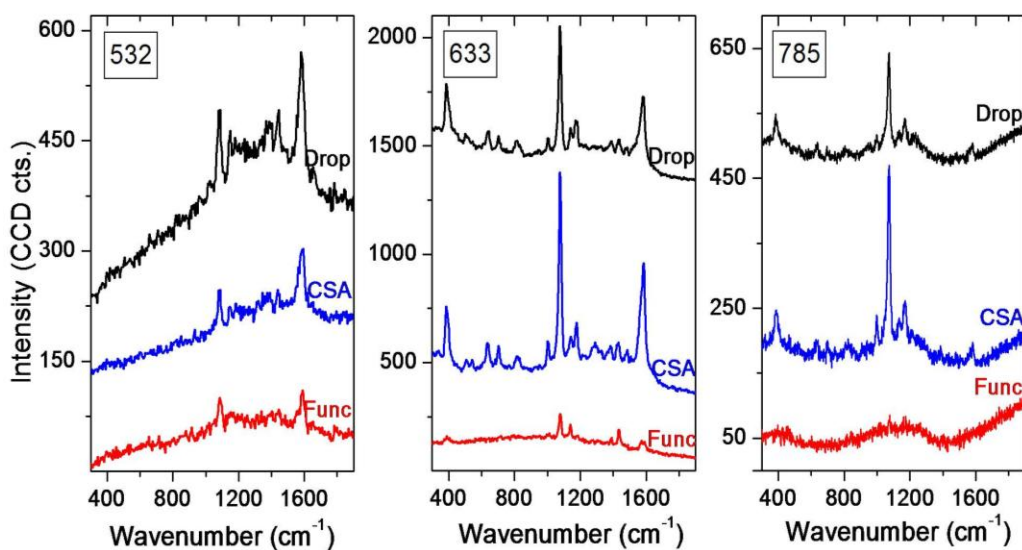


**Figura 2-3:** Imagini de microscopie optica (a) si SEM (b) a benzilor de NPs fabricate prin autoasamblare convectiva (*proba CSA*). Linia intrerupta si sageata din (a) indica orientarea si directia de translatare a meniscului in timpul procesului de uscare a picaturii.

Aceasta multime de benzi de NP este obtinuta prin intermediul mecanismului de „stick-slip” care este deja bine cunoscut (Grisolia et al., 2009; Watanabe et al., 2009; Xu et al., 2006) si care presupune fixarea periodica (stick) si deslipirea (slip) liniei de triplu-contact. Cea mai mare partea picaturii este sustinuta de placa verticala, astfel marginile picaturii sunt fortate sa se retraga inspre placa verticala in timpul procesului de evaporare. Asadar in urma deplasarii meniscului, benzi paralele de NP se formeaza pe substrat. Imaginile SEM prezinta asamblari de nanoparticule de aur dense, compacte si foarte uniforme in fiecare dintre benzi.

## 2.2 Performanta SERS a substratelor nanostructurate

Raspunsul SERS al celor trei tipuri de asamblari de NPs a fost testat utilizand trei linii laser diferite pentru excitare. Figura 2-4 reprezinta media spectrelor SERS tipice inregistrate pe fiecare tip de proba pentru fiecare linie laser. Spectrele au fost colectate din diferite puncte a unei regiuni ( $0.1 \times 0.1$  mm disponibile cu ajutorul unui sistem piezoelectric) si din mai multe regiuni aflate la distanta de cativa milimetri una fata de cealalta. O prima observatie este faptul ca toate tipurile de probe sunt active SERS pentru fiecare din cele trei linii laser, chiar daca ele prezinta eficiente diferite (Figura 2-4). Exceptie face proba Func care nu este activa la excitare cu 785 nm, in conditiile experimentale folosite. La excitarea cu 532 nm, pentru toate tipurile de asamblari se obtine o amplificare medie, proba Drop avand cel mai intens spectru, urmata apoi de proba CSA, in timp ce proba Func prezinta cea mai slaba intensitate.

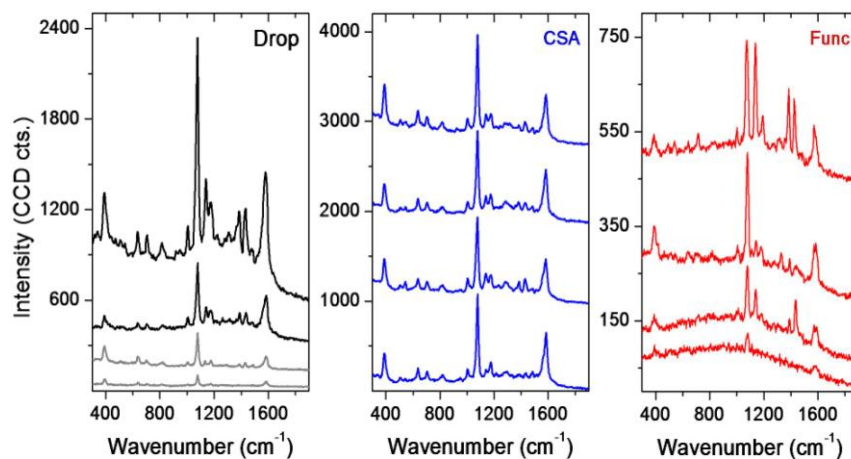


**Figura 2-4:** Media spectrelor SERS a p-ATP absorbit pe cele trei tipuri de substrat, inregistrate cu diferite linii laser de excitare, asa cum este marcat pe figura.

Spectrele inregistrate cu lungimea de unda 633 nm prezinta cea mai buna calitate in ceea ce priveste raportul semnal zgomot, precum si in ceea ce priveste numarul benzilor. Pe langa cele

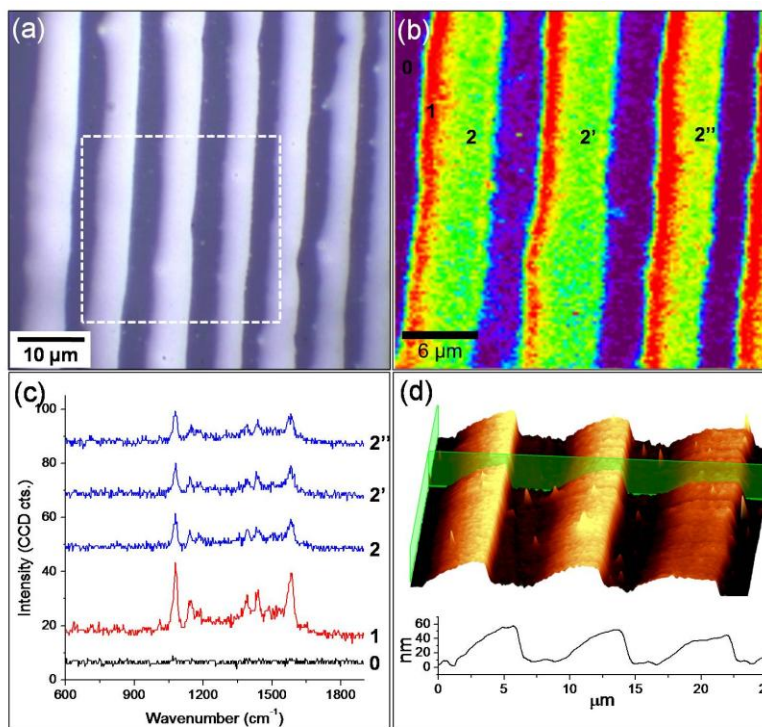
mai intense benzi SERS, de la 1079 and 1584  $\text{cm}^{-1}$ , se mai pot distinge foarte bine si benzile SERS de la 388, 637, 705, 1178  $\text{cm}^{-1}$  ( si altele mai putin intense). In functie de intensitatea spectrului SERS obtinut putem afirma ca proba CSA este cea mai eficienta, iar proba Func are cea mai scazuta eficienta. La excitarea cu laserul de 785 nm, au fost obtinute din nou spectre de buna calitate, proba CSA prezentand benzi mult mai intense decat Drop, iar in cazul probei Func neobservandu-se nici un semnal.

Asa cum subliniaza rezultatele de mai sus, 633 nm este cea mai eficienta lungime de unda excitatoare care la puteri mici ofera un raport bun semnal zgomot si o semnatura spectrala bogata. Mai departe vom discuta despre uniformitatea fiecarui tip de substrat in ceea ce priveste forma si intensitatea spectrului inregistrat pe suprafata probei. Figura 2-5 reprezinta o colectie de spectre SERS inregistrate in diferite puncte pentru fiecare proba in urma excitarii cu laser de 633 nm. Pentru proba Drop, o foarte mare variatie a intensitatii semnalului poate fi observata ( $\pm 90\%$ ) in functie de zona de unde a fost inregistrat, de la marginea circulara sau din centrul picaturi uscate. Benzile CSA prezinta un semnal foarte uniform, spectrele prezentate fiind inregistrate pe diferite benzi, iar punctul de colectare fiind selectat la mijlocul fiecărei benzi. . Mai mult, variatia intensitatii benzi 1080  $\text{cm}^{-1}$  se afla intr-un interval destul de ingust de  $\pm 13\%$ . Proba Func prezinta si ea o variatie ridicata in ceea ce prezinta forma spectrului si intensitatea acestuia, in jur de  $\pm 70\%$ .



**Figura 2-5:** Spectre SERS ilustrative a moleculei p-ATP inregistrate din diferite zone ale celor 3 substrate, utilizand lungimea de unda laser 633 nm.

Pentru a investiga mai mult originea uniformitatii semnalului, am efectuat imagistica SERS. Dreptunghiul din Figura 2-7(a) margheaza o regiune de pe proba CSA care a fost scanata cu ajutorul unui microscop confocal in modul de imagistica Raman. Dupa cum se poate observa, intensitatea semnalului pare sa fie omogena pe suprafata benzilor, exceptie facand partea din stanga a acestora unde intensitatea este mai mare. Ca sa intelegem acest efect de “margine” am efectuat masuratori AFM pe benzile de NPs, iar rezultatul este prezentat in Figura 2-6d. Asa cum se poate observa din sectiunea eficace a AFM-ului, benzile de NPs sunt mai subtiri intr-o parte.



**Figura 2-6.** Imagistica SERS a benzilor de NPs obtinute prin CSA: (a) imagine de microscopie optica; (b) imagine a zonei marcate in (a) obtinuta prin reprezentarea intensitatii spectrelor SERS ale p-ATP-ului. (c) spectre SERS din cele 4 zone marcate in (b); (d) imagine AFM a benzilor de NPs.

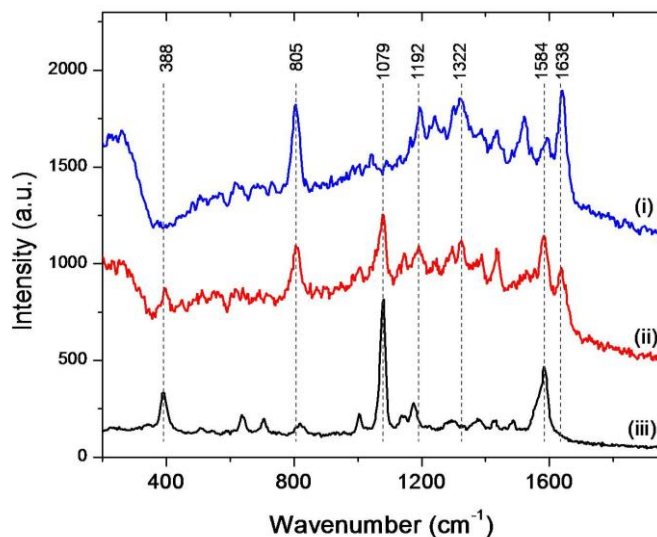
Acesta forma asimetrica a fost deja observata anterior (Farcau et al., 2010; Lee et al., 2009) pe asamblari de NPs obtinute prin CSA si este legata de forma meniscului si de directia acestuia de deplasare in timpul procesului de depunere. Astfel rezultatele obtinute indica faptul ca marginea mai subtire a benzilor de NPs, in care acestea sunt monostrat, asigura o amplificare mai mare decat restul benzi, unde NP sunt asamblate si prezinta o morfologie multistrat.

## 2.3 Exploatarea substratelor plasmonice in aplicatii de detectie multi-analit de biomolecule din fluide biologice

### 2.3.1 Detectie multi-analit

Substratul CSA a fost prima data imersat, peste noapte, intr-o solutie de citozina de concentratie  $10^{-5}$  M. Apoi substratul a fost spalut cu etanol si imersat pentru o ora intr-o solutie de p-ATP de concentratie  $10^{-4}$  M. Figura 2-7 prezinta spectrul SERS inregistrate la lungimea de unda de 633 nm in urma expunerii benzilor de NPs in solutia de citozina (spectrul i), alaturi de spectrul SERS obtinut dupa imersia succesiva a probei CSA intr-o solutie de citozina  $10^{-5}$  M peste noapte si apoi timp de o ora intr-o solutie de p-ATP (spectrul ii) si spectrul SERS al p-ATP (spectrul iii). Prin analiza spectrelor din figura, observam ca spectrul (ii) este compus din benzile vibrationale ale moleculei de p-ATP cat si de a celei de citozina. Mai specific

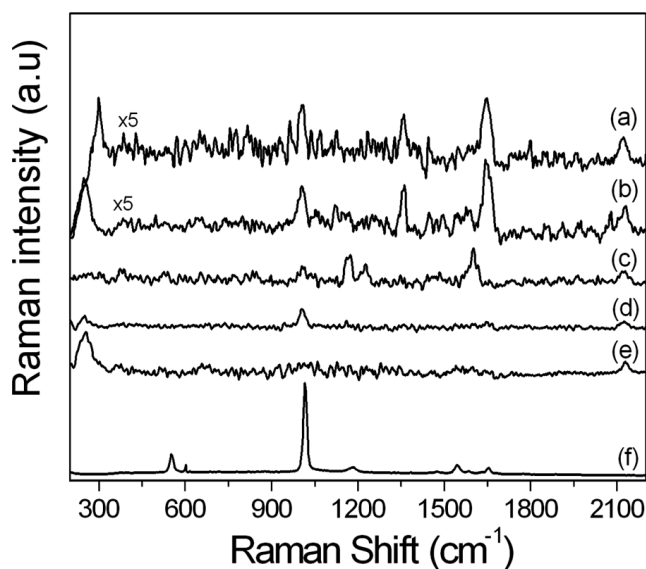
vibratiile de la 388, 1079 and 1584  $\text{cm}^{-1}$  corespund p-ATP-ului pe cand cele de la 805, 1192, 1322 and 1638  $\text{cm}^{-1}$  corespund modurilor vibrationale ale moleculelor de citozina.



**Figura 2-7.** Spectre SERS obtinute de pe proba CSA in urma expunerii acestuia la: (i)  $10^{-5}$  M citozina; (ii)  $10^{-5}$  M citozina urmata de  $10^{-4}$  M p-ATP; (iii)  $10^{-4}$  M p-ATP. Spectrele au fost inregistrate folosind pentru excitare linia laser de 633 nm.

### 2.3.2 Detectia ureei din lichide biologice

Figura 2-8 prezinta spectrele SERS compozite ale amprente, lacrimii, urinei si ureei depozitate pe proba Func si spectrul Raman al moleculei de uree in forma solida.



**Figura 2-8:** Spectrele SERS ale: (a) lacrimii, (b) amprente, (c) urinei si (d) ureei, impreuna cu spectrul Raman de referinta al substratului (e) si al ureei (f).

Ureea este o molecula organica simpla, compusa din doua grupari amini ( $-\text{NH}_2$ ) legate printr-o grupare carboxil ( $-\text{C}=\text{O}$ ). Keuleers et. al. a raportat un studiu complex vibrational in vederea analizei moleculelor de uree (Keuleers et al., 1999). Astfel spectrul Raman al ureei este dominat de vibratia simetrica a legaturii  $\text{N}-\text{C}-\text{N}$  de la  $1016\text{ cm}^{-1}$ , asa cum se poate observa si in Figura 2-8 spectrul (f). Mai mult asa cum se observa in Figura 2-8, utilizand tehnica spectroscopica SERS urme de uree la concentratii foarte mici au fost detectate in mai multe lichide biologice.

### CAPITOLUL 3

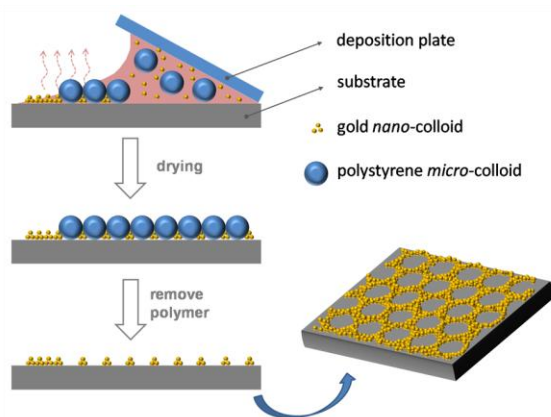
## FABRICAREA DE SUBSTRATE NANOSTRUCTURATE SI MICROTATURATE PENTRU AMPLIFICARE SERS MULTIPLICATIVA

In acest capitol este prezentata o metoda de auto-asamblare utilizata pentru fabricarea de substrata SERS nanostructurate microtaturate pe baza de nanoparticule de aur coloidale. Astfel, prin utilizarea auto-asamblari convective binare (BiCSA) si a unui amestec coloidal de nanoparticule de aur de 15 nm (AuNPs) si microsfera de polistiren de 500 nm am reusit sa obtinerea unui film de nanoparticule de aur microtaturat periodic.

Am evidentiat un efect multiplicativ de amplificare SERS prin analiza raspunsului SERS dintre un film plan si unul microtaturat de AuNP si am discutat aceste rezultate in corelatie cu raspunsul optic in reflectivitate si simulari FDTD. In plus am explorat si reproductibilitatea si stabilitatea in timp a substratului SERS microtaturat.

### 3.1. Fabricarea filmului microtaturat periodic de nanoparticule de aur

Un amestec de AuNPs sferice, avand o concentratie de  $13 \times 10^{13}$  particule/mL si microsfera de polistiren (PsMS), 2% w/v suspensie apoasa, a fost preparat in raport volumic de 1/100 PsMS/AuNPs.



**Figura 3-1:** Procesul de fabricare a filmului micro-structurat de AuNPs prin BiCSA. Apa se evapora din suspensia mixta de AuNPs si PsMS datorita geometriei impuse. Dupa uscare, sferile de PsMS sunt dizolvate in cloroform.

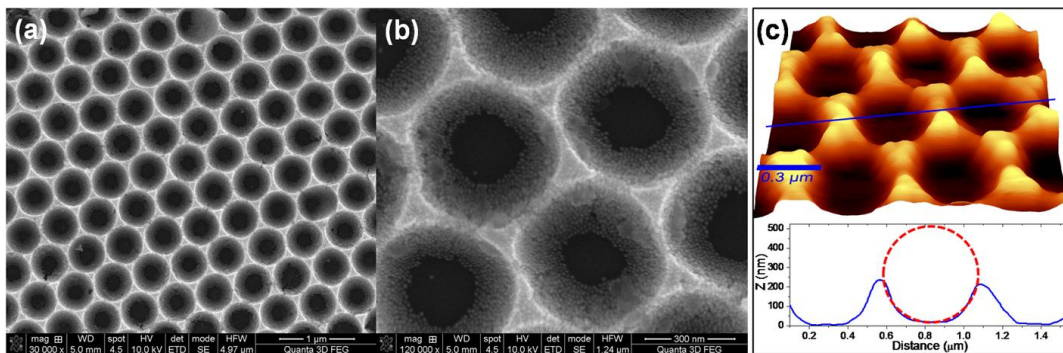


O placuta de sticla curata a fost plasata in pozitie oblica (la un unghi de aproximativ  $15^\circ$ ) fata de o placuta de sticla plasata orizontal. Apoi, o picatura ( $5 \mu\text{l}$ ) de amestec coloidal a fost plasata intre placuta oblica si cea orizontala, conform Figurii 3-1. Picatura este astfel tinuta intre cele doua placute de catre forte capilare si astfel un menisc drept se formeaza pe placuta orizontala. Apoi plicatura este lasata sa se usuce la temperatura camerei. Asa cum ne-am asteptat nanoparticulele de aur coloidale incepe sa se asambleze in spatiile libere dintre microsferelor de polistirene ce formeaza o retea periodica. Ultimul pas il reprezinta dizolvarea PsMS prin imersarea substratului in cloroform pentru 30 de minute.

### 3.2 Caracterizarea filmului microtexturat periodic de nanoparticule de aur

#### 3.2.1 Caracterizare morfologica

Asa cum se poate vedea in imagiile SEM (Figura 3-2 a,b) o retea ordonata hexagonala de orificii sub forma de cupa a fost obtinuta dupa dizolvarea PsMSs. Reteaua bidimensionala obtinuta este asemanatoare retelei hexagonale ce se obtine prin CSA a coloizilor sferici precum sfere de polistiren, PMMA sau silica. Pentru simplitate, filmul obtinut va fi numit in cele ce urmeaza AuNP microtexturat sau pe scurt  $\mu$ -Struc. Ca precizare, structuri asemanatoare au fost obtinute si de catre grupul Baumberg (Cole et al., 2007; Kelf et al., 2006).

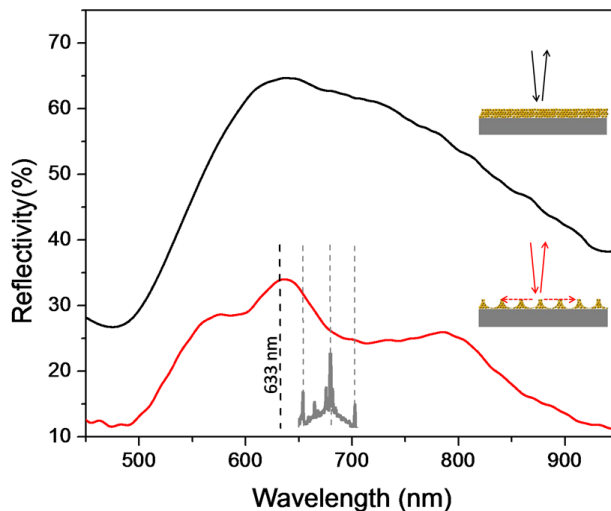


**Figura 3-2:** (a,b) Imagini SEM ale filmului AuNP  $\mu$ -Struc; (c) imagine AFM a filmului AuNP  $\mu$ -Struc (sus) si sectiunea eficace de-a lungul liniei indicate; linia punctata reprezinta un cerc cu diametrul de 500 nm asemanator unei sfere de polistiren sugerand pozitia acestora inainte de a fi inlaturata.

Figura 3-2b reprezinta o imagine SEM marita a filmului  $\mu$ -Struc in care se poate observa ca AuNPs au fost asamblate intr-o maniera compacta.

#### 3.2.2 Caracterizare optica

Spectrele de reflectivitate ale filmului plan cat si ale filmului  $\mu$ -Struc sunt prezentate in Figura 3-3. Filmul  $\mu$ -Struc prezinta mai multe minime si maxime in regiunea dintre 550 si 900 nm. In plus pe ambele probe se poate observa ca reflectivitatea in jurul valorii de 500 nm este scazuta datorita tranzitiei interbanda a aurului.



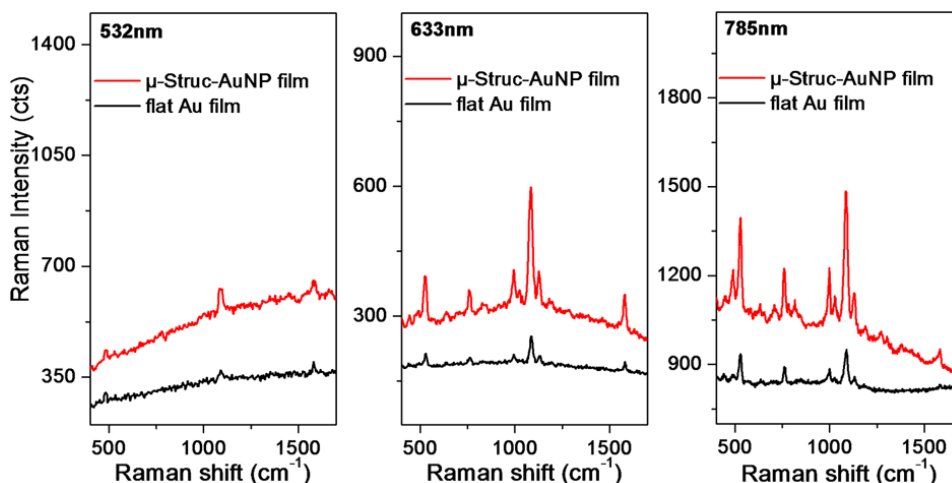
**Figura 3-3:** Spectrele de reflectivitate ale filmului  $\mu$ -Struc (jos) si filmului plan de AuNP (sus). Sunt marcate in figura pozitia liniei laser 633 nm utilizata si a spectrului Raman asociat, in intervalul  $500\text{ cm}^{-1} - 1600\text{ cm}^{-1}$ .

Modulatiile din spectrul filmului  $\mu$ -Struc sunt induse de catre reseaua periodica si sunt atribuite luminii imprastiata de catre aceasta. Putem astfel sugera faptul ca se observa un mod de propagare fotonica de tip Bloch.

### 3.3 Evaluarea amplificarii electromagnetice SERS multiplicative

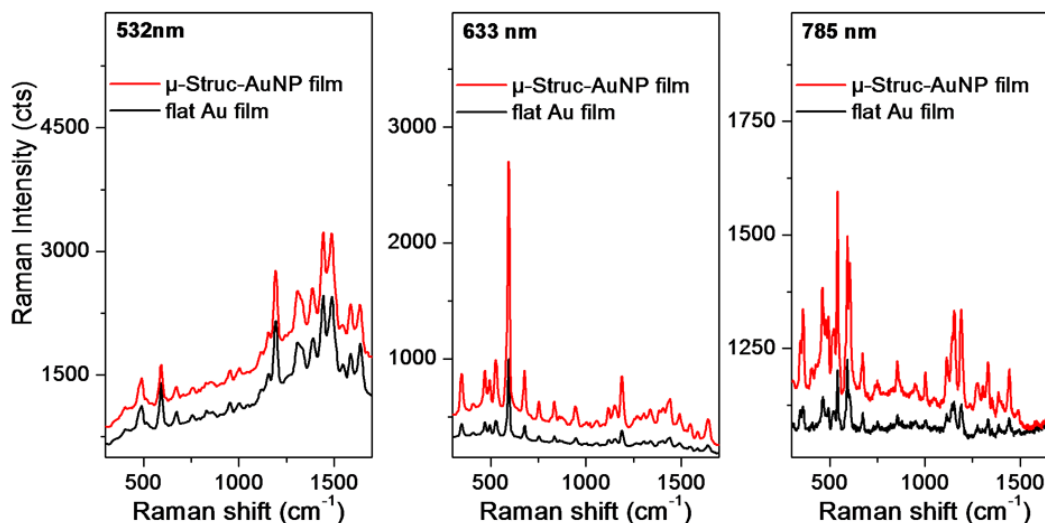
#### 3.3.1 Eficienta SERS

In ceea ce urmeaza am dorit sa investigam daca o amplificare Raman suplimentara apare in cazul unei morfologii precum cea prezentata mai sus. Astfel, in prima faza am evaluat activitatea SERS a filmelor de AuNP  $\mu$ -Struc cu ajutorul molecule BSPP (engl. bis(p-sulfonatophenyl) phenylphosphine dihydrate dipotassium) de pe suprafata AuNPs, ca reporter Raman "intern". In cadrul experimentelor, s-au folosit pentru excitare trei linii laser (532 nm, 633 nm si 785 nm). Mai mult, experimente comparative intre doua regiuni distincte, una texturata si una plana ( $\mu$ -Struc film si Flat film) au fost efectuate cu scopul de a le evalua performanta SERS. Asa cum se poate observa in Figura 3-4, benzi caracteristice ale moleculelor de BSPP au fost observate la excitarea cu cele trei linii laser atat pe filmul  $\mu$ -Struc cat si pe filmul Flat. O observatie importanta este ca, in fiecare caz, filmul  $\mu$ -Struc ofera un semnal SERS cu o intensitate mai mare decat filmul Flat. Intensitatea semnalului SERS a fost evaluata prin integrarea benzi SERS a BSPP-ului de la  $1084\text{ cm}^{-1}$ . Din valorile integrate s-a putut trage concluzia ca o amplificare multiplicative este prezenta in cazul filmului  $\mu$ -Struc comparativ cu filmul Flat. Ca sa putem confirma acest efect a fost necesar a se verifica in primul rand daca sursa acestei amplificari suplimentare a semnalului nu poate fi atribuita diferentei de suprafata active dintre filmul  $\mu$ -Struc si filmul Flat.



**Figura 3-4:** Spectrele SERS ale moleculelor BSPP de la suprafata AuNPs din filmul  $\mu$ -Struc film (sus) si filmul Flat (jos), obtinute la trei linii diferite de excitare.

Atfel calculand raportul ariei expuse pentru cele doua zone am aflat ca acesta este de 1.6 in favoarea filmului  $\mu$ -Struc. In ciuda dificultatii aprecierii suprafetei active, valoarea obtinuta este departe de valoarea 5, obtinuta in urma analizei raportului dintre benzile SERS. In plus, a fost explorata eficienta SERS a substratului fabricat utilizand un alt reporter Raman, cresil violet (CV), care a fost depus pe suprafata filmelor de NPs dupa fabricarea acestora, astfel este asteptat ca acesta sa fie absorbit in cu precadere pe suprafata filmului. Figura 3-5 ilustreaza spectrele SERS ale CV inregistrate cu trei linii laser.

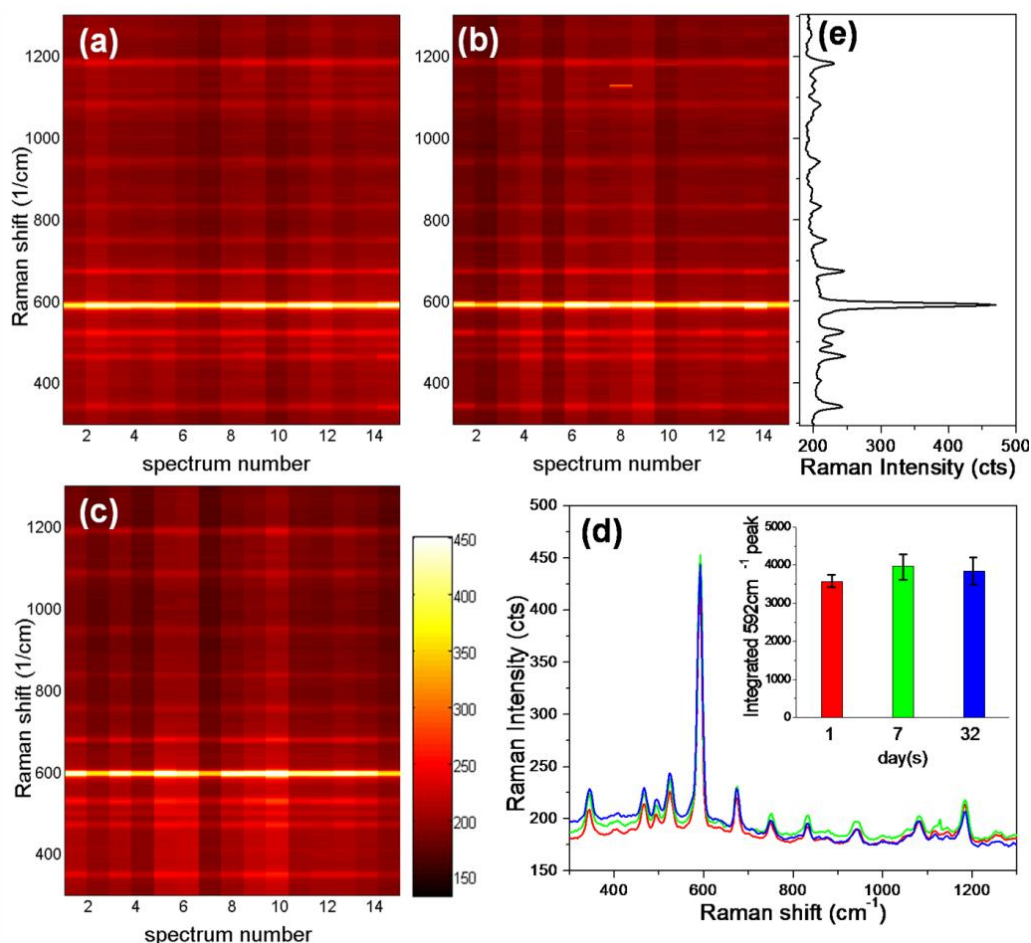


**Figura 3-5:** Spectrele SERS ale moleculelor de CV de la suprafata AuNPs din filmul  $\mu$ -Struc film (sus) si filmul Flat (jos), obtinute la trei linii diferite de excitare.

Intensitatea benzi SERS de la  $594\text{ cm}^{-1}$  a CV (atribuita vibratiei de indoire  $\text{NH}_2$  (Vogel et al., 2000)), a fost selectata in vederea cunatificarii diferentelor de intensitate dintre spectrele colectate de pe filmul  $\mu\text{-Struc}$  film si filmul Flat. Din nou un efect de amplificare suplimentar este observant la excitarea cu  $633\text{ nm}$  si  $785\text{ nm}$ . In cazul excitarii cu laser de lungime de unda  $532\text{ nm}$  nu se observa nici o diferente in intensitate intre cele doua morfologii.

### 3.3.2 Masuratori de reproductibilitate, stabilitate in timp si reutilizare a substratului

Pe langa o buna amplificare, reproductibilitatea si stabilitatea semnalului SERS sunt aspecte importante care trebuie luate in considerare atunci cand dorim sa consideram un substrat SERS ca fiind viabil. Pentru a demonstra reproductibilitatea semnalului SERS inregistrat pe filmul  $\mu\text{-Struc}$ , au fost inregistrate mai multe spectre SERS ale CV in diferite puncte, cu laserul de lungime de unda  $633\text{ nm}$ . Figura 3-6 reprezinta o harta de culori a 15 astfel de spectre.

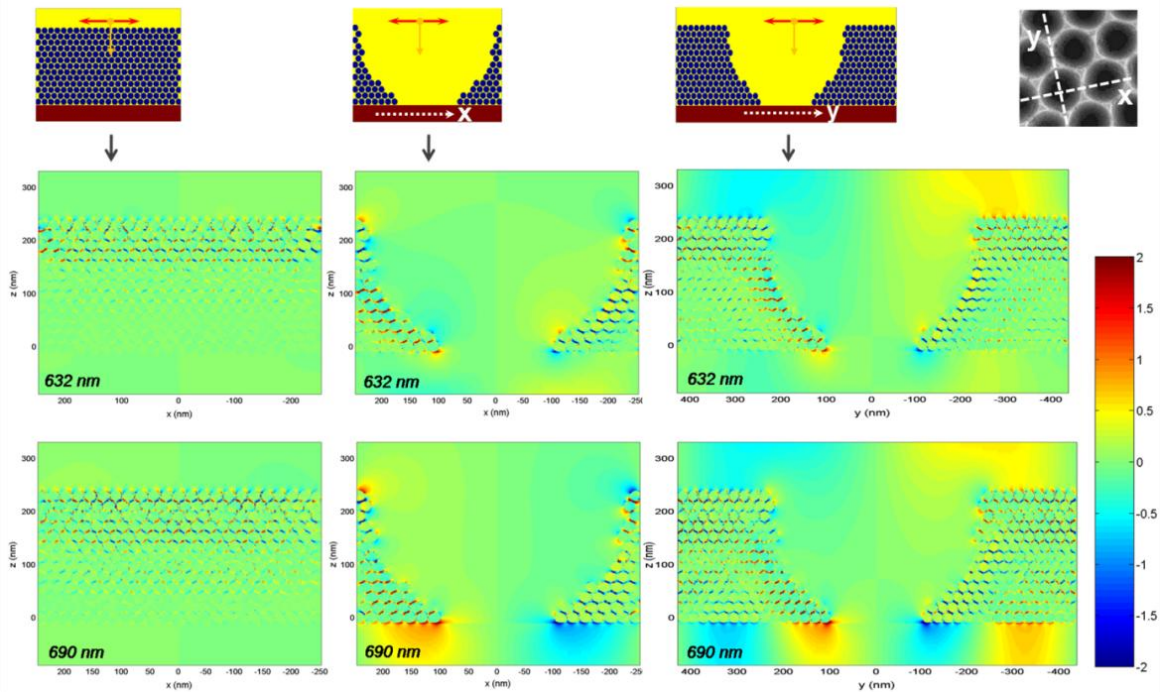


**Figura 3-6:** (a-c) Reprezentare in harta de culori a catorva spectre SERS colectate din diferite zone din proba, la diferite intervale de timp: (a)  $t_0$ ; (b)  $t_0 + 7$  zile; (c)  $t_0 + 30$  zile. (d) Media spectrelor SERS din (a-c); In inset este reprezentata intensitatea benzii SERS de la  $594\text{ cm}^{-1}$  SERS si deviatia standard. (e) Spectru SERS reprezentativ, pentru o mai buna vizualizare a hartilor.

Observam ca intensitatea si pozitia spectrala a benzilor SERS este relativ constanta, indicand o buna omogenitate a probei. In vederea testarii stabilitatii in timp a semnalului am efectuat analize similare dupa 7 (Figura 3-6b) si 30 de zile (Figura 3-6c). Asa cum figura 3-6 a-c demonstreaza, spectrelor SERS sunt stabile, aratand ca substratul fabricat este caracterizat de o buna stabilitate si reproductibilitate in timp.

### 3.3.3 Simulari cu metoda Diferentelor Finite in Domeniul Temporal (engl. FDTD)

Simulari bidimensionale FDTD ce au fost efectuate, desi nu reusesc sa reproduca cantitativ si cu mare precizie rezultatele experimentale, pot sa ofere informatii fenomenologice suficient de calitative.



**Figura 3-7:** Schema a configuratiilor simulate, cu reprezentarea axelor, a polarizarii campului electric si a directiei de propagare a luminii incidente (linia de sus). Componenta  $E_z$  a campului electric la 632 nm, la lungimea de unda de excitare (linia de mijloc). Componenta  $E_z$  a campului electric la 690 nm, la lungimea de unda de imprastiere Raman a fotonilor (linia de jos).

Asa cum se poate observa in Figura 3-7, in cazul filmului Flat, componenta  $E_z$  poate fi gasita doar in spatiile dintre nanoparticule. In plus, se observa ca lumina poate penetra doar primele 3-4 randuri de NPs, aceasta adancime de penetrare fiind putin mai mare pentru lungimi de unda mai mari. Analizand filmul  $\mu$ -Struc, observam aparitia unui camp electric additional, deasupra si in interiorul substratului, in urma excitarii cu 632 nm si 690 nm.

## CAPITOLUL 4

### FABRICAREA DE SUBSTRATE PLASMONICE ORDONATE PENTRU DETECTIE SI ANALIZA CANTITATIVA FOLOSIND SERS

Acest capitol descrie o metoda simpla si ieftina ce poate fi utilizata pentru fabricarea de substrat metalice cu nanostructuri piramidale, tehnica ce nu necesita folosirea unor procese de fabricare. Aceasta abordare consta in litografia de nano-imprimare (NIL), ce exploateaza proprietatile termice a doua clase de polimeri: termoplastici si hidrogeluri.

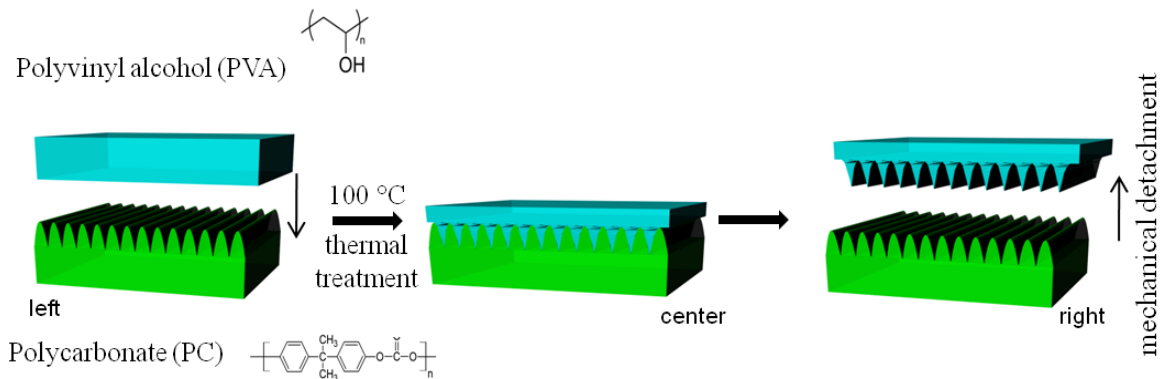
In acest studiu, policarbonatul (PC) joaca rolul polimerului termoplastic, pe cand alcolul polivinilic (PVA) a fost intrebuintat pe post de hidrogel datorita solubilitatii crescute in apa, bune rezistente chimice si a proprietatilor fizice, dar si datorita proprietatilor mecanice din stare uscata (Park et al., 2001). Cunoscand proprietatile termice ale acestor polimeri, am reusit texturarea PC-ului cu ajutorul PVA-ului folosind metoda NIL si un DVD comercial ca matrita initiala printr-un proces in doi pasi. Aceasta tehnica reprezinta o alternativa ieftina la metodele clasice de litografie, ce permite fabricarea de nanostructuri periodice cu grad ridicat de ordonare, pe suprafete considerabile ( $\sim\text{cm}^2$ ), intr-o maniera controlata si reproductibila.

De asemenea, am dorit exploatarea acestui tip de substrat in aplicatii de detectie si analiza cantitativa a unor biomolecule relevante (ex. urea), deoarece aceasta abordare ofera posibilitatea dezvoltarii de noi biosenzori capabili sa detecteze cantitati reduse de biomolecule.

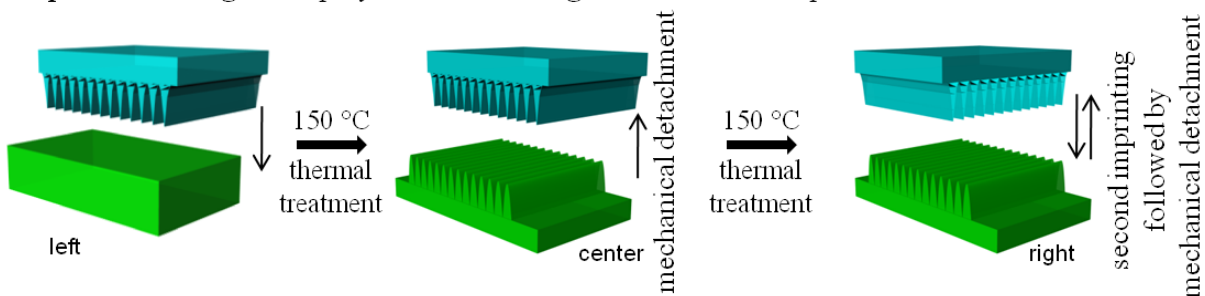
#### 4.1 Metoda de fabricare in doi pasi a substratului cu nanostructuri piramidale prin litografie de nano-imprimare

Primul pas in fabricarea substratului, a constat in depunerea unui film subtire de PVA deasupra suprafetei curate de policarbonat, desprinsa de pe DVD, dintr-o solutie apoasa de 20 wt% PVA, (vezi Schema 4-1, step1, stanga). Dupa aplicarea unui tratament termic la  $100^\circ\text{C}$  timp de 20 min (Schema 4-1, step1, mijloc), filmul de PVA a fost desprins mecanic de substratul de policarbonat. Precum era de asteptat, filmul de PVA prezinta, dupa transfer, aceleasi caracteristici structurale ca si DVD-ul (Schema 4-1, step1, dreapta). Acest film texturat de PVA a fost apoi utilizat ca matrita pentru imprimarea suprafetei de PC a DVD-ului. Astfel, al doilea pas a constat in plasarea policarbonatului de la DVD si a matritei texturate de PVA intre doua lamele de sticla microscopice (Schema 4-1, step2, stanga). Dupa aplicarea unei forte constante din ambele parti s-a aplicat un tratament termic la  $150^\circ\text{C}$  timp de 15 minute (Schema 4-1, step2, mijloc). Cunoscandu-se faptul ca policarbonatul DVD-ului este un termoplastic ce se topeste usor in timpul incalzirii (Neil et al., 2007), suprafata policarbonatului a fost astfel texturata cu caracteristicile structurale ale DVD-ului (Schema 4-1, step 2, mijloc). Pasul final a constat in desprinderea matritei de PVA, rotirea rapida a acesteia cu  $90^\circ\text{C}$  si efectuarea unui al doilea procedeu de imprimare a polimerului termoplastic folosind procedura descrisa mai (vezi Schema 1, step 2, dreapta).

*Step 1 : Creating a PVA mold using a DVD polycarbonate template*



*Step 2 : Texturing DVD polycarbonate using PVA mold as template*



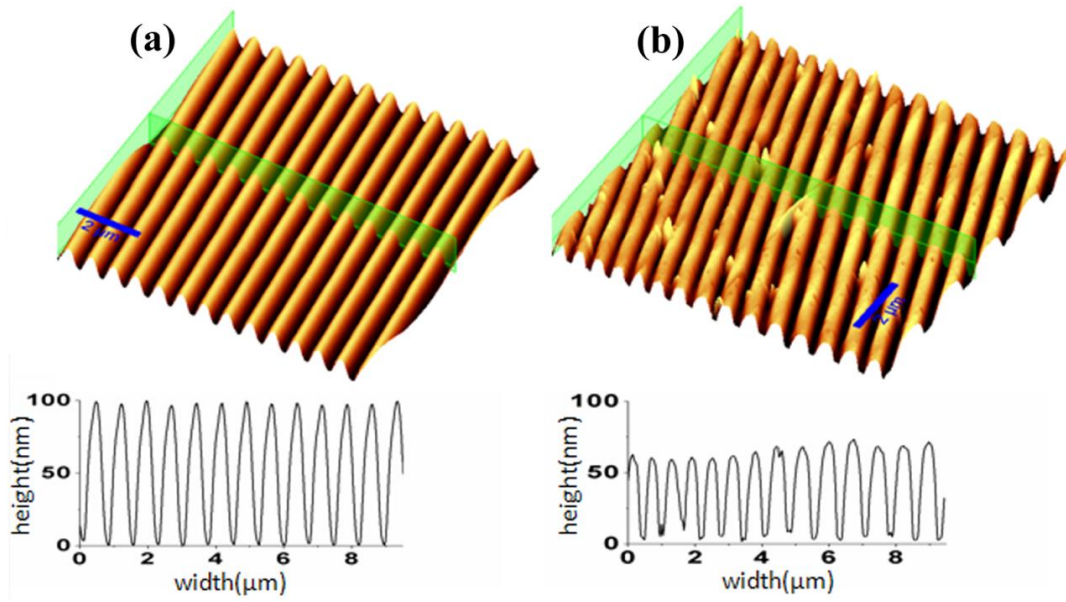
**Scheme 4-1:** Metoda de fabricare in doi-pasi a substratului cu nanostructuri piramidale. Primul pas consta in transferul caracteristicilor matritei filmului de hidrogel iar al doilea in imprimarea caracteristicilor filmului de hidrogel pe filmul termoplastice, la diferite unghiuri.

## 4.2 Caracterizarea substratului cu nanostructuri piramidale

### 4.2.1 Caracterizare morfologica

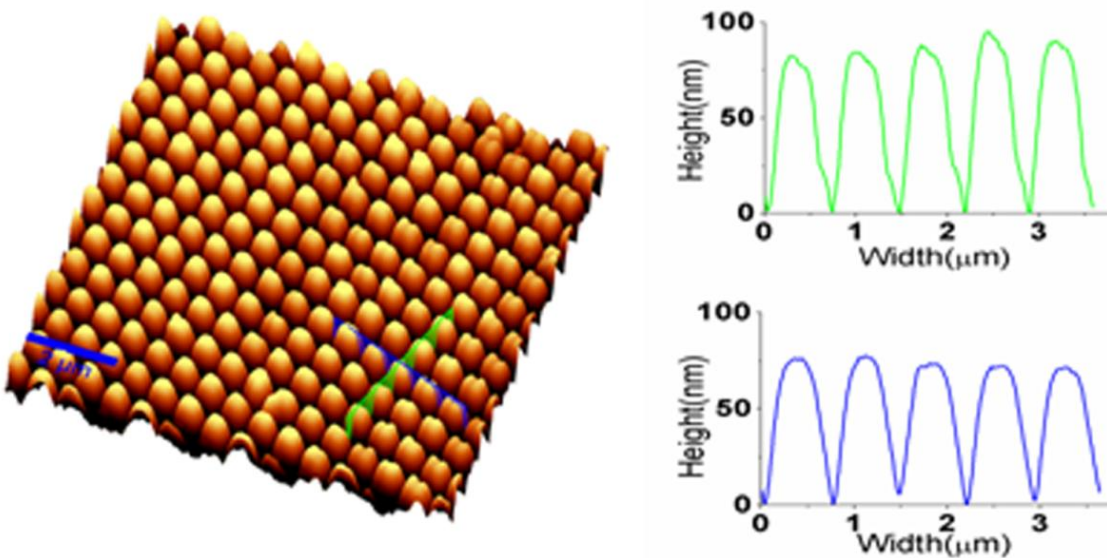
Figura 4-1 prezinta o imagine AFM corespunzatoare substratului de policarbonat din DVD-ul comercial impreuna cu o imagine AFM a substratului de PVA, rezultat in urma realizarii procesului de imprimare. Din analiza imaginii AFM, DVD-ul prezinta o structura cu jgheaburi inalte de 100 nm si cu o largime de 723 nm (Figura 4-1a).

In urma imprimarii cu structura substratului de policarbonat din DVD, filmul de PVA detine o morfologie foarte similara cu cea a matritei originale (vezi Figura 4-1b). Astfel, filmul prezinta striatii cu o inaltime de aproximativ 65 nm, diferenta de inaltime provenind de la posibila topire a polcarbonatului DVD-ului in urma celui de-al doilea tratament termic.



**Figura 4-1:** Imagine AFM a DVD-ului comercial (a) si a filmului de PVA texturat (b). Reprezentările grafice ale secțiunilor marcate în imaginile AFM prezintă înălțimea și lățimea structurilor. Scala: 2 μm.

În Figura 4-2 este ilustrată imaginea AFM 3D a nanostructurii piramidale ce se obține în urma celei de-a doua imprimări, împreună cu secțiunile obținute pe cele două direcții.



**Figura 4-2:** Imagine 3D AFM a substratului cu nanostructuri piramidale și reprezentare grafică a celor două secțiuni ce ilustrează direcțiile de texturare. Scala: 2 μm.



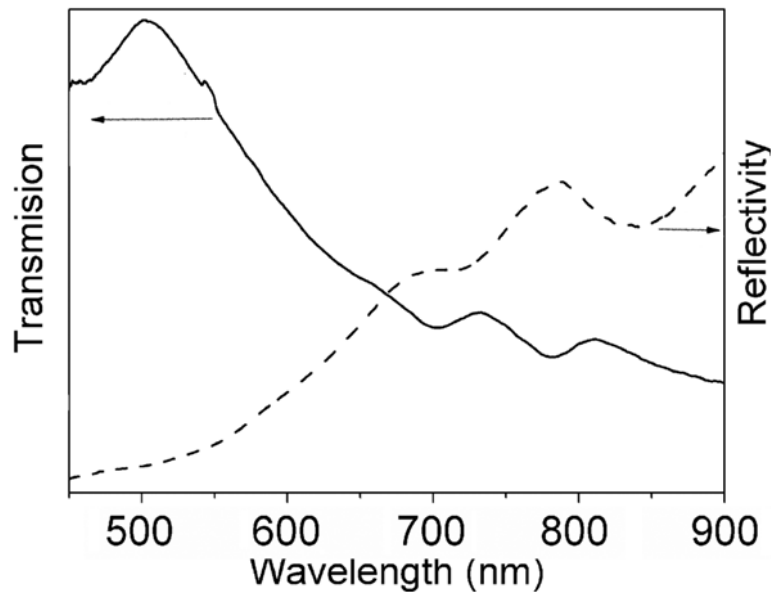
Diferenta dintre inaltimea nanostructurilor de cele doua directii poate fi considerate o consecinta a diferitelor dintre durata tratamentului termic aplicat in cele doua etape, care sunt de 15 si respectiv 10 minute.

#### 4.2.2 Caracterizare optica

Figura 4-3 prezinta spectrele de transmisie si reflectivitate ale substratului fabricat, la incidenta normala. Profilul de transmisie prezinta doua maxime localizate la 741 si 815 nm, ce sunt corelate cu cele doua minime din spectrul de reflectivitate.

O mai buna intelegere a originii celor doua benzi a fost obtinuta prin efectuarea de masuratori de transmisie la diferite unghiuri de incidenta, intre 0 si 30°. S-a observat faptul ca ambele maxime se deplaseaza inspre lungimi de unda mai mici o data cu cresterea unghiului de incidenta. Acest comportament sugereaza faptul originea celor doua benzi ar putea fi excitarea plasmonilor propagativi de suprafata printr-un mecanism legat de retea de difractie creata la suprafata substratului.

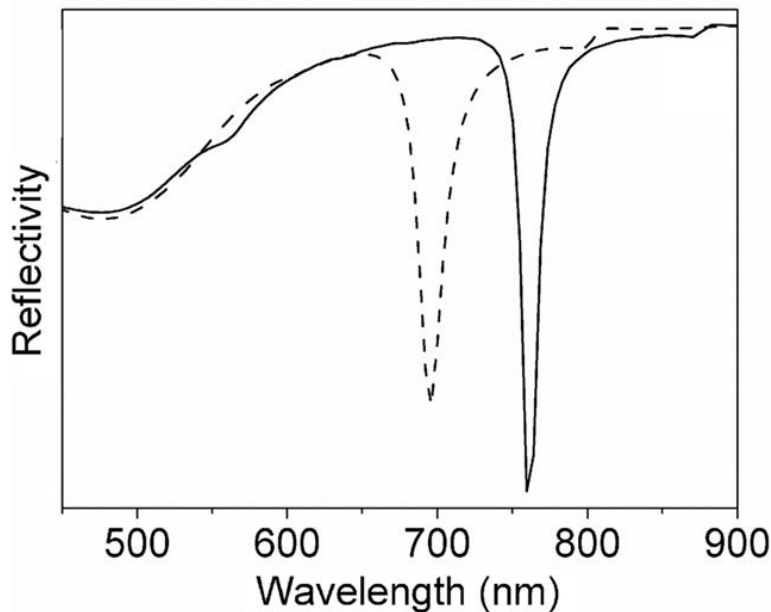
Cunsocandu-se faptul ca procesul de fabricare consta in doua proceduri de imprimare, suntem de parere ca dimensiunea piramidelor si perioada dintre acestea difera intr-o oarecare masura pe cele doua directii. Putem astfel sustine faptul ca cele doua minime ar corespunde propagarii plasmonilor de suprafata de-a lungul celor doua directii ale structurii.



**Figura 4-3:** Spectrul de transmisie (linie continua) si reflectivitate (linie intrerupta) al substratului cu nanostructuri piramidale, acoperit cu un film de aur.

#### 4.2.3 Simulari cu metoda Diferentelor Finite in Domeniul Temporal (engl. FDTD)

Pentru o mai buna intelegere a raspunsului optic experimental al structurii fabricate, au fost efectuate simulari numerice cu ajutorul metodei FDTD..



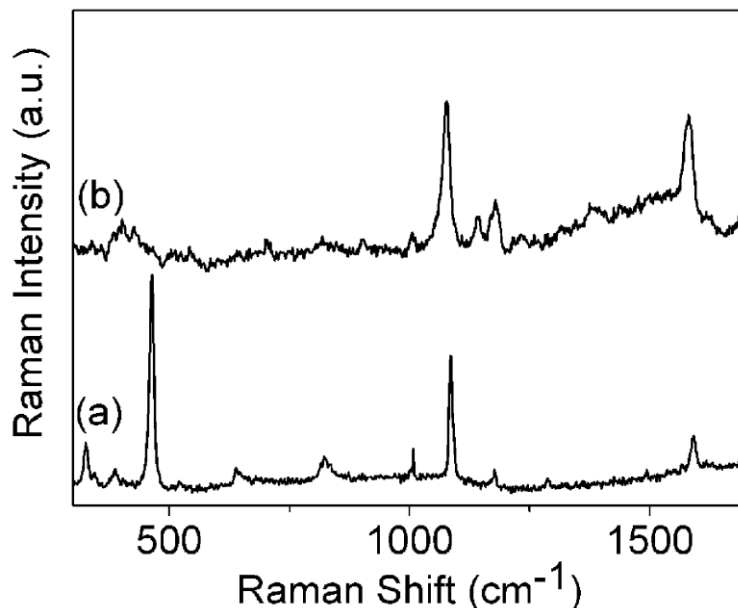
**Figura 4-4:** Spectrele de reflectivitate ale substratului cu nanostructuri piramidale simulate cu metoda FDTD, la incidenta normala, folosind o sursa polarizata paralel cu fiecare din cele doua directii ale nanostructurilor.

Spectrele de reflectivitate obtinute pentru doua moduri diferite de orientare a sursei de lumina sunt prezentate in Figura 4-4. Rezultatele demonstreaza o buna corelare intre pozitia minimelor si perioada nanostructurii pe fiecare din cele doua directii. Asadar, cele doua benzi observate experimental pot fi atribuite plasmonilor propagativi de suprafata, pe cele doua directii ale structurii.

#### 4.3 Proprietati spectroscopice ale substratului plasmonic cu nanostructuri piramidale

Pentru testarea raspunsului SERS al substratului cu nanostructuri piramidale, am ales sa excitam cu linia laser 785 nm, aflata in regiunea spectrala a benzii plasmonice vizibila in spectrul de reflectivitate. Figura 4-5 ilustreaza spectrul SERS al moleculelor de p-ATP adsorbite la suprafata substratului, in urma imersiei acestuia intr-o solutie metanolica de  $10^{-4}$  M p-ATP pentru 24 h, impreuna cu spectrul de referinta Raman al p-ATP-ului in stare solida.

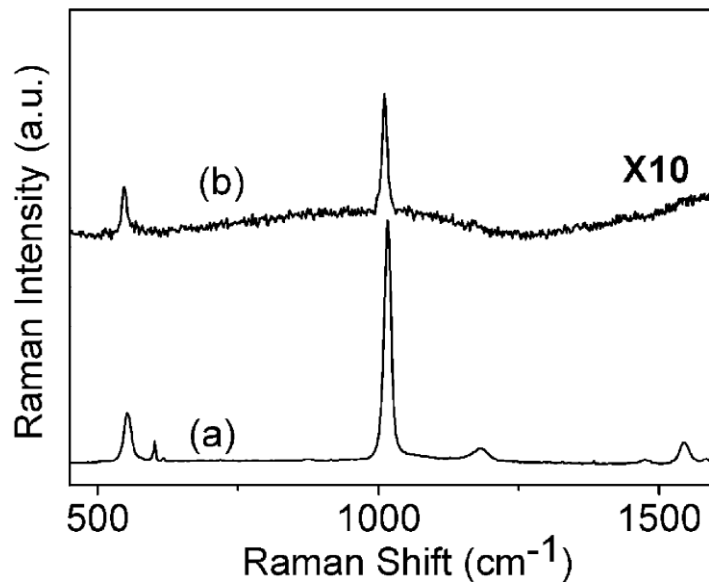
In comparatie cu spectrul Raman, in spectrul SERS al p-ATP-ului, banda specifica vibratiei C-S este deplasata spre  $1076\text{ cm}^{-1}$  datorita legarii covalente a moleculelor de p-ATP de substratul de aur (Baia et al., 2009). Mai mult de atat, se observa o scadere moderata a intensitatii benzii de la  $1178\text{ cm}^{-1}$  si de asemenea aparitia a doua benzi noi la  $1141$  si  $1386\text{ cm}^{-1}$ .



**Figura 4-5:** (a) Spectrul Raman al moleculei p-ATP in stare solida si (b) spectrul SERS al moleculei p-ATP adsorbit pe substratul cu nanostructuri piramidale.

#### 4.4 Detectia si analiza cantitativa a moleculelor de uree

In vederea testarii posibilitatii utilizarii substratului cu nanostructuri piramidale fabricat, in aplicatii biologice, am investigat eficienta lui in detectarea de biomolecule relevante. Pentru aceasta, am ales molecula de uree, un biomarker important al bolilor renale. Urea este o molecula organica simpla, ce contine o grupare carbonil ( $>C=O$ ) si doua grupari amino ( $-NH_2$ ).



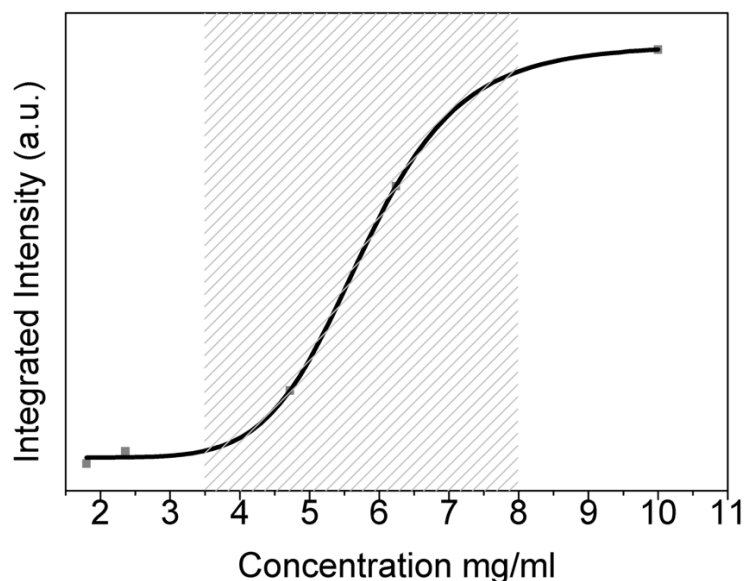
**Figura 4-6:** (a) Spectrul Raman al ureei in stare solida si (b) spectrul SERS al moleculelor de uree adsorbite pe substratul cu nanostructuri piramidale.

Spectrul Raman al ureei in stare solida (Figura 4-6, curba (a)) prezinta patru benzi de vibratie predominante localizate la 552, 1016, 1181 and 1545  $\text{cm}^{-1}$ , ce pot fi atribuite, conform datelor din literatura, vibratiei de indoire N-C-O, vibratiei simetrice de intindere C-N, vibratiei de forfecare  $\text{NH}_2$  si respectiv celei de indoire  $\text{NH}_2$  (Keuleers et al., 1999).

Prezenta benzii dominante de intindere C-N a ureei de la 1010  $\text{cm}^{-1}$ , in spectrul inregistrat dupa adsorptia moleculelor pe substratul cu nanostructuri piramidale, impreuna cu absenta benzilor vibrationale  $\text{NH}_2$  din spectru, demonstreaza detectia cu succes a unei concentratii mici de uree cu ajutorul metodei SERS.

Mai mult de atat, substratul fabricat poate fi exploatat nu numai pentru detectia adsorptiei moleculelor de uree dar si pentru corelarea concentratiei de uree cu intensitatea benzii Raman dominante din spectrele inregistrate.

Figura 4-7 prezinta curba de calibrare obtinuta, ce coreleaza concentratia ureei cu intensitatea benzii vibratiei N-C-N corespunzatoare, de la 1010  $\text{cm}^{-1}$ , din spectrul SERS. Aceasta curba demonstreaza faptul ca substratul fabricat poate fi utilizat cu success in detectarea uree in domeniul de concentratii 3.5 – 8 mg/ml. Asadar, putem sustine faptul ca substratul nostru nanostructurat poate fi integrat intr-un biosenzor capabil sa detecteze stari patologice ale rinichilor prin analiza cantitativa a urei din lichide biologice alternative, cu ajutorul metodei SERS.



**Figura 4-7:** Curba dependentei intensitatii integrate a benzii N-C-N caracteristice ureei de concentratia moleculei utilizata. Zona marcata indica domeniul de concentratii pentru care substratul a dovedit cea mai mare eficienta.

## CAPITOLUL 5

### CONCLUZII FINALE

► Prima parte a tezei este orientata inspre fabricarea de asamblari de nanoparticule de aur (NPs) de diferite morfologii utilizand trei strategii foarte simple bazate pe asamblare indusa prin evaporarea solventului (metoda picurarii si auto-asamblarea convectiva (CSA)) si functionalizare chimica. Performanta SERS a substratelor astfel fabricate a fost evaluata prin analiza raspunsului SERS al moleculei de para-aminotiofenol (p-ATP), folosita ca reporter Raman, obtinut prin excitare cu linii laser emisivie la 532, 633 si 785 nm.

Benzile de NPs obtinute prin CSA au dovedit a avea cea mai mare eficienta SERS, fiind active atat in regiunea vizibila a spectrului cat si in NIR si furnizand un raspuns SERS extrem de uniform, demonstrat prin analiza de spectre individuale si imagistica SERS.

In final am demonstrat ca aceste benzi de NPs sunt eficiente pentru detectia citozinei, o componenta a ADN-ului, si pentru detectie SERS multi-analit. Rezultatele prezentate, ce demonstreaza posibilitatea obtinerii de substrate SERS eficiente printr-o metoda simpla de asamblare a NPs de aur coloidale, pot avea un impact real in dezvoltarea de aplicatii SERS analitice.

► De asemenea, am fabricat substrate SERS microtexturate pe baza de filme periodice micro-texturate de NPs coloidale de aur, prin metoda binara CSA, utilizand un amestec coloidal de NPs de aur de 15 nm si microsferi de polistiren (Ps).

Am oferit o clara demonstratie asupra amplificarii SERS multiplicative generate de catre acest tip de substrate, aratand posibilul impact pe care rezultatele obtinute l-ar putea avea asupra viitoarelor tipuri de substrate SERS nano- si micro-structurate. Amplificarea SERS multiplicativa a fost evidentiata atat pentru reporteri Raman interni (molecule atasate la suprafata NPs inainte de asamblare) cat si pentru reporteri Raman externi (molecule adsorbite pe NPs dupa asamblare), fiind atribuita suprapunerii suprapunerii campurilor plasmonice de suprafata apropiate (datorata spatiilor nanometrice dintre nanoparticule) cu lumina imprastiata in camp-indepartat (datorita structurilor periodice micrometrice).

Mai mult de atat, abilitatea filmelor structurate de a induce cuplajul luminii incamp-indepartat este demonstrata de spectrele de reflectivitate, ce prezinta minime/maxime in domeniul vizibil, si distributia campului electric obtinut prin simulari FDTD. In plus, substratele SERS fabricate prezinta o buna reproductibilitate spatiala si stabilitate in timp, dovedita prin raspunsul SERS de-a lungul unei perioade de peste o luna

► In ultima parte a tezei este prezentata o metoda simpla, rapida si ieftina de fabricare a nanostructurilor periodice, ce se bazeaza pe proprietatile termice a doua clase de polimeri: higrogeluri si termoplastici. Astfel, prin aceasta abordare am reusit fabricarea de nanostructuri ordonate de tip piramidal folosind ca matrita initiala textura unui DVD comercial. Mai mult am demonstrat si eficienta SERS a structurii nou fabricate prin detectarea moleculelor de uree in

ampranta. In plus, datorita periodicitatii substratului nanostructurat cu forme piramidale, am putut corela cu success in intensitatea celei mai dominante benzi a spectrului SERS a ureei cu concentratii ale moleculelor obstinandu-se astfel o curba de calibrare intre intensitatea SERS si concentratie.

Mai mult de atat, deoarece concentratia ureei poate fi corelata cu prezenta unor disfunctii ale rinichilor, substratul fabricat poate fi promitator in dezvoltare de dispozitive „lab-on-a-chip” pentru decetia timpurie a bolilor rinichilor. In concluzie, substratul cu nanostructuri piramidale fabricat prin aceasta metoda ieftina, poate fi utilizat cu succes in fabricarea unui senzor renal SERS cantitativ.

## REFERINTE

- Aslan, K., Gryczynski, I., Malicka, J., Matveeva, E., Lakowicz, J.R., and Geddes, C.D. (2005). *Curr. Opin. Biotechnol.* 16, 55–62
- Baia, M., Toderas, F., Baia, L., Maniu, D., and Astilean, S. (2009). *ChemPhysChem* 10, 1106–1111.
- Bunzendahl, M., Lee-Van Schaick, P., Conroy, J.F.T., Daitch, C.E., and Norris, P.M. (2001). *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* 182, 275–283.
- Coe, J.V., Heer, J.M., Teeters-Kennedy, S., Tian, H., and Rodriguez, K.R. (2008). *Annu. Rev. Phys. Chem.* 59, 179–202.
- Cole, R.M., Baumberg, J.J., Garcia de Abajo, F.J., Mahajan, S., Abdelsalam, M., and Bartlett, P.N. (2007). *Nano Lett.* 7, 2094–2100.
- Deegan, R.D., Bakajin, O., Dupont, T.F., Huber, G., Nagel, S.R., and Witten, T.A. (1997). *Nature* 389, 827–829.
- Dimitrov, A.S., and Nagayama, K. (1996). *Langmuir* 12, 1303–1311.
- Ding, T., Song, K., Clays, K., and Tung, C.-H. (2009). *Adv. Mater.* 21, 1936–1940.
- Farcau, C., Moreira, H., Viallet, B., Grisolia, J., and Ressier, L. (2010). *ACS Nano* 4, 7275–7282.
- Grisolia, J., Viallet, B., Amiens, C., Baster, S., Cordan, A.S., Leroy, Y., Soldano, C., Brugger, J., and Ressier, L. (2009). *Nanotechnology* 20, 355303.
- Hall, D. (2001). *Anal. Biochem.* 288, 109–125
- Haynes, C.L., and Van Duyne, R.P. (2001). *J. Phys. Chem. B* 105, 5599–5611.
- Jensen, T.R., Malinsky, M.D., Haynes, C.L., and Van Duyne, R.P. (2000). *J. Phys. Chem. B* 104, 10549–10556.
- Kelf, T.A., Sugawara, Y., Cole, R.M., Baumberg, J.J., Abdelsalam, M.E., Cintra, S., Mahajan, S., Russell, A.E., and Bartlett, P.N. (2006). *Phys. Rev. B* 74, 245415.
- Keuleers, R., Desseyn, H.O., Rousseau, B., and Van Alsenoy, C. (1999). *J. Phys. Chem. A* 103, 4621–4630.

- Kreibig, P.D.U., and Vollmer, P.D.M. (1995). Introduction. In *Optical Properties of Metal Clusters*, (Springer Berlin Heidelberg), pp. 1–12.
- Kretschmann, E., and Raether, H. (1968). *Z Naturf* 23 A, 2135.
- Lee, J.A., Reibel, K., Snyder, M.A., Scriven, L.E., and Tsapatsis, M. (2009). *ChemPhysChem* 10, 2116–2122.
- Liu, G.L., Yin, Y., Kunchakarra, S., Mukherjee, B., Gerion, D., Jett, S.D., Bear, D.G., Gray, J.W., Alivisatos, A.P., Lee, L.P., et al. (2006). *Nat. Nanotechnol.* 1, 47–52.
- Makiabadi, T., Bouvrée, A., Nader, V.L., Terrisse, H., and Louarn, G. (2010). *Plasmonics* 5, 21–29.
- McCreery, R.L. (2000). *Raman Spectroscopy for Chemical Analysis*. In *Raman Spectroscopy for Chemical Analysis*, (John Wiley & Sons, Inc.),.
- Michaels, A.M., Nirmal, M., and Brus, L.E. (1999).. *J. Am. Chem. Soc.* 121, 9932–9939.
- Neil, E., Peter, G., and John, C. (2007). *Vibrational Spectroscopy of Polymers: Principles and Practice* (Willey).
- Noginov, M.A., Vondrova, M., Williams, S.N., Bahoura, M., Gavrilenko, V.I., Black, S.M., Drachev, V.P., Shalaev, V.M., and Sykes, A. (2005). *J. Opt. Pure Appl. Opt.* 7, S219.
- Otto, A. (1968). *Z. Für Phys.* 216, 398–410
- Park, J.-S., Park, J.-W., and Ruckenstein, E. (2001).. *Polymer* 42, 4271–4280.
- Prevo, B.G., Hwang, Y., and Velev, O.D. (2005). *Chem. Mater.* 17, 3642–3651.
- Raether, H. (1988). Introduction. In *Surface Plasmons on Smooth and Rough Surfaces and on Gratings*, (Springer Berlin Heidelberg), pp. 1–3
- Rossi, R.C., Tan, M.X., and Lewis, N.S. (2000). *Appl. Phys. Lett.* 77, 2698–2700.
- Sánchez-Cortés, S., and García-Ramos, J.V. (2001). *Surf. Sci.* 473, 133–142.
- Schuck, P. (1997). *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 26, 541–566.
- Toderas, F., Baia, M., Baia, L., and Astilean, S. (2007). *Nanotechnology* 18, 255702.
- Turner, A.P.F. (2000). *Biosensors--Sense and Sensitivity. Science* 290, 1315–1317.
- Updike, S.J., and Hicks, G.P. (1967). The enzyme electrode. *Nature* 214, 986–988.
- Vogel, E., Gbureck, A., and Kiefer, W. (2000). *J. Mol. Struct.* 550–551, 177–190.
- Watanabe, S., Inukai, K., Mizuta, S., and Miyahara, M.T. (2009). *Langmuir* 25, 7287–7295.
- Whitesides, G.M.; Love, J.C. (2001) *Sci. Am.* 285, 32 – 41.
- Xu, J., Xia, J., Hong, S.W., Lin, Z., Qiu, F., and Yang, Y. (2006).. *Phys. Rev. Lett.* 96, 066104.
- Yguerabide, J., and Yguerabide, E.E. (1998). *Anal. Biochem.* 262, 157–176.
- Yuan, Z., Burckel, D.B., Atanassov, P., and Fan, H. (2006). *J. Mater. Chem.* 16, 4637–4641.
- Zhang, X., Yonzon, C.R., and Van Duyne, R.P. (2006). *J. Mater. Res.* 21, 1083–1092.

## LISTA PUBLICATIILOR

### Legate de subiectul tezei (ISI)

**C. Leordean**, M. Potara, S. Boca-Farcau, A. Vulpoi, S. Astilean and C. Farcau, Multiscale electromagnetic SERS enhancement on self-assembled micropatterned gold nanoparticle films, **J. Raman Spectrosc.** **45** (2014) 627-635.

**C. Leordean**, A. M. Gabudean, V. Canpean and S. Astilean, Easy and cheap fabrication of ordered pyramidalshaped plasmonic substrates for detection and quantitative analysis using surface-enhanced Raman spectroscopy, **Analyst** **138** (2013) 4975-4981.

**C. Leordean**, V. Canpean and S. Astilean, Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) Analysis of Urea Trace in Urine, Fingerprint, and Tear Samples, **Spectrosc. Lett.** **45** (2012) 550-555.

C. Farcau, M. Potara, **C. Leordean**, S. Boca, S. Astilean, Reliable plasmonic substrates for bioanalytical SERS applications easily prepared by convective assembly of gold nanocolloids, **Analyst** **138** (2013) 546-552.

### In afara subiectului tezei (ISI)

I. Botiz, P. Freyberg, **C. Leordean**, A.M. Gabudean, S. Astilean, A. C.M. Yang, N. Stingelin Emission properties of MEH-PPV in thin films simultaneously illuminated and annealed at different temperatures, **Synt. Met.** 10.1016/j.synthmet.2014.10.031 (2014)

I. Botiz, P. Freyberg, **C. Leordean**, A.-M. Gabudean, S. Astilean, A. C.-M. Yang, N. Stingelin, Enhancing the Photoluminescence Emission of Conjugated MEH-PPV by Light Processing, **ACS Appl. Mater. Interfaces** **6** (2014) 4974–4979.

M. Iliut, **C. Leordean**, V. Canpean, C. M. Teodorescu and S. Astilean, A new green, ascorbic acid-assisted method for versatile synthesis of Au–graphene hybrids as efficient surface-enhanced Raman scattering platforms, **J. Mater. Chem. C** **1** (2013) 4094-4104.

M. Iliut, A. M. Gabudean, **C. Leordean**, T. Simon, C. M. Teodorescu, S. Astilean, Riboflavin enhanced fluorescence of highly reduced graphene oxide, **Chem. Phys. Lett.** **586** (2013) 127–131.