



Universitatea Babeș-Bolyai
Cluj-Napoca
Facultatea de Fizică



Sinteza de nanoparticule de aur și argint și interacțiunea acestora cu lumina și structuri moleculare

Rezumatul tezei de doctorat

Student doctorand

Tóador István Szabolcs

Conducător de doctorat

Prof. Dr. Vasile Chiș

Universitatea Babeș-Bolyai

Cluj-Napoca, România

2019

Abstract

Prezenta teza de doctorat contribuie la lumina științifică a nanomaterialelor prin dezvoltarea unor noi nanoparticule de aur și de argint. Aceste noi nanostructuri pot fi folosite ca substrat de amplificare pentru radiația împrăștiată Raman, în așa numita tehnică surface-enhanced Raman scattering (SERS). Pe lângă substrat SERS, nanoparticulele de aur pot fi candidați potențiali pentru terapia hipertermică, iar cele de argint, acoperite cu ioni de clor, oferă noi perspective asupra principiilor fundamentale ale spectroscopiei SERS.

Partea introductivă a tezei cuprinde o prezentare generală a nanoparticulelor și aplicațiile acestora deja prezente în literatură. De asemenea, evidențiază ajunsurile spectroscopiei SERS legate de existența așa numitelor "hot-spot"-uri care ar genera semnalul SERS foarte intens în cazul concentrațiilor foarte reduse, subliniind necesitatea unor noi nanostructuri care pot ajuta în explicarea principiilor fundamentale ale spectroscopiei SERS.

Primul capitol descrie teoria din spatele tehnicilor folosite pentru caracterizarea celor două tipuri de nanostructuri dezvoltate în timpul doctoratului.

Capitolul doi prezintă dezvoltarea și caracterizarea nanoparticulelor de aur sintetizate de noi. Aceste nanoparticule au fost sintetizate prin reducerea acidului cloroauric cu clorhidrat de hidroxilamină la temperatura camerei, fără folosirea altor agenți

de nucleație sau de reducere. Mai mult de atât, dimensiunea acestor ansambluri de nanoparticule (NPAs) poate fi controlată între 20-120 nm prin stabilizarea acestora cu albumină serică bovină (BSA) la diferite momente de timp după sinteză. De asemenea, a fost studiată posibilitatea ca aceste nanoansambluri să fie folosite în terapia fototermică a cancerului prin testarea citotoxicității și capabilității acestora de a transforma lumina în căldură.

În capitolul trei este descrisă sinteza nanoparticulelor de argint (AgNPs) fotoredate doar în prezența clorurii de sodiu. Această metodă de sinteză asigură o suprafață deja activată pentru cuplarea electronică între analit și suprafața nanoparticulelor de argint, ceea ce conduce la obținerea unor spectre SERS foarte intense.

Ultimul capitol prezintă un model adaptat pentru spectroscopia SERS. Scoate în evidență faptul că amplificarea Raman provine de la cuplarea electronică a analiților cu suprafața metalică, mediată de ioni specifici care formează zone active SERS pe suprafața nanoparticulelor. Spectrele analiților cationici și anionici pot fi înregistrate în mod specific prin generarea unor zone active SERS specifice prin absorbția unor ioni, cum ar fi Cl^- și Ca^{2+} .

Cuvinte cheie

Nanoparticule de aur, ansambluri de nanoparticule, dimensiune controlabilă, reducere cu clorhidrat de hidroxilamină la temperatura camerei, suprafață modificată cu albumină, efect fototermic, cartografie Raman, agent fototerapeutic, cuplare electronică, fotoreducere, nanoparticule de argint, SERS, zone active-SERS.

Cuprinsul tezei

Abstract	5
Concepte fundamentale și motivație.....	7
Capitolul I	
1. Teorie și metodologie.....	11
1.1. Spectroscopia vibrațională.....	11
1.1.1. Spectroscopia Raman și infraroșu.....	11
1.1.2. Spectroscopia Raman amplificată de suprafață.....	17
1.1.2.1. Amplificare electromagnetică.....	18
1.1.2.2. Amplificare chimică.....	19
1.1.2.3. Subtraturi SERS.....	20
1.2. Analiza în componente principale.....	21
1.3. Metode de evaluare biologică.....	22
1.3.1. Evaluarea citotoxicității.....	22
1.3.2. Evaluarea stresului oxidativ.....	24
1.4. Instrumentație.....	26
Capitolul II	
2. Nanoparticule reduse cu clorhidrat de hidroxilamină.....	28
2.1. Introducere.....	28
2.1.1. Materiale.....	29

2.2. Sinteza nanoparticulelor.....	29
2.3. Caracterizarea optică și fizică a ansamblurilor de nanoparticule de aur.....	31
2.4. Nanoparticule cu dimensiuni controlabile.....	35
2.5. Amplificarea SERS a nanoparticulelor NPAs ₂₀	38
2.6. Evaluare biologică.....	40
2.6.1. Test de citotoxicitate.....	41
2.6.2. Evaluarea stresului oxidativ.....	43
2.7. Proprietăți fototermice.....	45
2.7.1. Imagistică Raman.....	47
2.8. Concluzii	52
Capitolul III	
3. Nanoparticulelor de argint reduse cu clorură.....	53
3.1. Introducere.....	54
3.1.1. Materiale.....	54
3.2. Sinteza nanoparticulelor de argint reduse cu clorură.....	54
3.3. Proprietățile fizice și chimice a nanoparticulelor Cl-AgNPs.....	56
3.4. Amplificarea SERS a nanoparticulelor Cl-AgNPs.....	61
3.5. Concluzii.....	64

Capitolul IV

4. Abordarea amplificării SERS prin modelul adatom.....	65
4.1. Introducere.....	65
4.2. Activarea nanoparticulelor.....	66
4.3. Zone active SERS dependente de concentrații.....	71
4.4. Detecție SERS specifică.....	75
4.5. Concluzii.....	81
Lista de publicații.....	82
Mulțumiri.....	83
Bibliografie.....	84

Cuprins

Concepte fundamentale și motivație.....	9
1. Nanoparticule reduse cu clorhidrat de hidroxilamină	12
2. Nanoparticule de argint reduse cu clorură.....	19
3. Abordarea amplificării SERS în modelul adatom.....	25
4. Concluzii.....	32
5. Lista de publicații	
5.1. Articole științifice.....	34
5.2. Articole trimise spre publicare.....	36
5.3. Postere prezentate la conferințe.....	36
6. Bibliografie selectivă.....	37

Concepte fundamentale și motivație

Nanotehnologia a devenit în secolul 21 parte integrantă din viața noastră. Una dintre cele mai vaste domenii ale nanotehnologiei este reprezentată de sinteza nanoparticulelor, care a devenit o cercetare multidisciplinară importantă datorită varietății sale largi de aplicabilitate.

Tehnologiile medicale sunt în continuă dezvoltare, astfel încât nanoparticulele ar putea fi utilizate pentru a îmbunătăți sau înlocui terapiile sau metodele de diagnostic actuale. Avantajul major al nanoparticulelor, comparativ cu tehnicile obișnuite este că acestea pot fi construite pentru a avea anumite proprietăți. Diagnosticul și tratamentul precoce este esențial pentru a avea o șansă mai bună pentru vindecarea bolilor, în special a cancerului. Astfel, multe dintre aplicațiile aflate la granița dintre biofizică, nanotehnologie și nanomedicină sunt bazate pe nanoparticule de metal nobile, în special cele de argint și de aur, datorită proprietăților lor chimice și optice speciale [1, 2]. Proprietățile lor speciale oferă un control bun legat de dimensiune, formă, funcționalizarea suprafeței și biocompatibilitatea acestora [3, 4]. Nanoparticulele metalice au fost utilizate pentru detectarea neinvazivă a cancerului [5], ca vehicule de transport pentru medicamente [6], pentru terapia fototermică [7], ca agenți de contrast [8] sau ca substraturi pentru SERS [9].

Spectroscopia Raman reprezintă o tehnică atractivă pentru aplicații în domeniul științelor vieții. Marele potențial al

spectroscopiei Raman constă în informațiile moleculare bogate și în sensibilitatea general ridicată a metodei SERS. În ciuda unui număr tot mai mare de studii SERS, într-o gamă largă de domenii de cercetare, originea amplificării ridicate nu este încă înțeleasă complet. Există două mecanisme acceptate pe scară largă, ca fiind cauzele amplificării spectrelor SERS. Unul dintre ele este amplificarea electromagnetică bazată pe excitarea plasmonilor de suprafață localizați [10]. Al doilea mecanism, numit amplificarea chimică sau electronică, este bazat pe efectul transferului de sarcină [11]. În cazul unor amplificări extrem de ridicate, la nivel de singură moleculă, efectul SERS se explică și prin formarea unor "hot-spot"-uri electromagnetice generate de nanoparticule agregate [12]. Incoerențe legate de modelul "hot-spot" au fost formulate de Otto și colaboratorii săi, propunând astfel un model de adatom [13-16].

Chiar dacă amplificarea SERS nu este încă complet înțeleasă, este necesară dezvoltarea unor nanomateriale fabricate, cu noi proprietăți fizice, chimice și biologice. Nanoparticulele se pot asambla fie într-o manieră organizată, conform unui model predeterminat, fie în mod aleatoriu. În afară de geometrii controlate, s-au dovedit utile superstructurile tridimensionale auto-organizate [17, 18], nanostructuri metalice hibride anisotrope, cum ar fi nanoparticulele de forma unor steluțe de aur și argint [19] sau nanoparticule în formă de floare [20].

Sinteza și aplicațiile biomedicale ale nanoparticulelor cu formă similară floricelelor de porumb (popcorn) au fost raportate recent

de Lu și colaboratorii săi [21, 22]. Nanoparticulele de aur cu formă de popcorn au fost sintetizate în prezența bromurii de cetil trimetilamoniu (CTAB). S-a constatat că agregarea nanoparticulelor pe suprafața celulelor canceroase conduce la absorbția luminii în regiunea infraroșu apropiat (NIR). Astfel, a fost evaluată aplicabilitatea nanoparticulelor de aur de popcorn pentru terapia fototermică.

Terapia fototermică este o nouă armă promițătoare împotriva cancerului. În timpul iradierii celulelor canceroase cu lumină NIR, proprietatea de rezonanță a plasmonilor de suprafață a nanoparticulelor transformă undele electromagnetice în căldură care provoacă modificări în fiziologia celulară, ducând astfel moartea celulelor.

Un număr mare de nanostructuri sunt deja disponibile pentru diferite domenii de interes, dar există încă spațiu și necesitatea de dezvoltarea altora. Astfel, teza prezintă dezvoltarea unor noi nanostructuri coloidale de aur cu dimensiuni controlabile prin reducerea dintr-un singur pas a acidului cloroauric cu clorhidrat de hidroxilamină fără utilizarea oricărui alt agent de nucleație. S-a studiat potențialul acestor nanostructuri coloidale de a fi utilizate ca agenți fototerapeutici. De asemenea, în teză sunt descrise noi nanoparticule de argint activate cu clorură, sintetizate prin fotoreducere. Aceste nanoparticule facilitează detectarea moleculelor la concentrații scăzute și oferă noi perspective asupra principiilor fundamentale ale împrăștierii Raman amplificate de suprafață.

1. Nanoparticule reduse cu clorhidrat de hidroxilamină

Nanostructurile de aur nou dezvoltate au fost sintetizate prin reducerea Au^{3+} în prezența clorhidratului de hidroxilamină. O ușoară modificare a ordinii de adăugare a reactanților a condus la ansambluri de nanoparticule de dimensiuni diferite. Cele două tipuri de nanoparticule au fost denumite NPAs20 și NPAs120 după diametrul mediu al acestora. Cele două seturi de nanoparticule au proprietăți morfologice și optice diferite. **Figura 1.1.** prezintă spectrele de absorbție UV-Vis ale celor doi coloizi, în timp ce în **Figura 1.2.** este prezentată morfologia acestora.

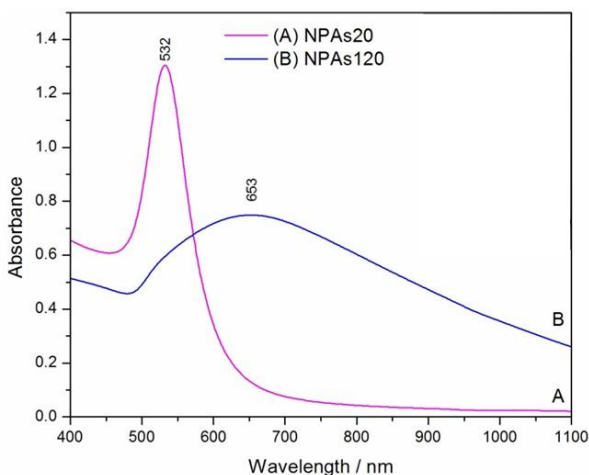


Figura 1.1. Spectrele UV-Vis ale coloizilor NPAs20 (A) și NPAs120 (B) înregistrate la o zi după preparare.

Cei doi coloizi necesită un timp de stabilizare, prin urmare, maximul de absorbție a coloizilor preparați a fost măsurat la o zi după sinteză. Lărgimea benzilor și pozițiile maximelor de absorbție UV-Vis a coloizilor indică faptul că coloidul NPAs120, cu un maxim de absorbție la 653 nm, conține nanostructuri cu diametre mai mari și o distribuție dimensională mai largă decât cele din coloidul NPAs20, care prezintă un maxim de absorbție la 532 nm.

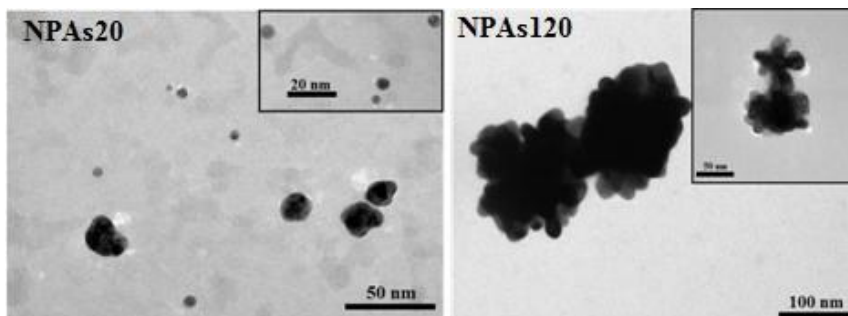


Figura 1.2. Imagini de microscopie electronică în transmisie (TEM) ale NPAs20 (stânga) și NPAs120 (dreapta).

Imaginile TEM ale coloidului NPAs20 prezintă structuri heterogene cu diametre de 10-35 nm, dar și nanoparticule mai mici cu diametre de 4-8 nm. Coloidul NPAs120 conține nanostructuri neregulate, cu forme asemănătoare de tip popcorn, cu o distribuție largă a dimensiunilor în domeniul 80-140 nm.

După cum s-a menționat anterior, cei doi coloizi necesită un timp de stabilizare. Imediat după amestecarea reactanților și sinteza coloizilor, se formează ansambluri mari, care se rup în bucăți mai

mici pe durate unei zi. Prin adăugarea albuminei serice bovine în timpul procesului de fragmentare naturală, dimensiunea ansamblurilor de nanoparticule poate fi controlată în intervalul de 20-120 nm.

Activitatea SERS ridicată a NPA-urilor coloidale de aur dezvoltate de noi a fost demonstrată prin măsurători comparative SERS, utilizând nanoparticule reduse cu hidroxilamină și nanoparticule convenționale reduse cu citrat [23]. Rezultatele sunt prezentate în **Figura 1.3**.

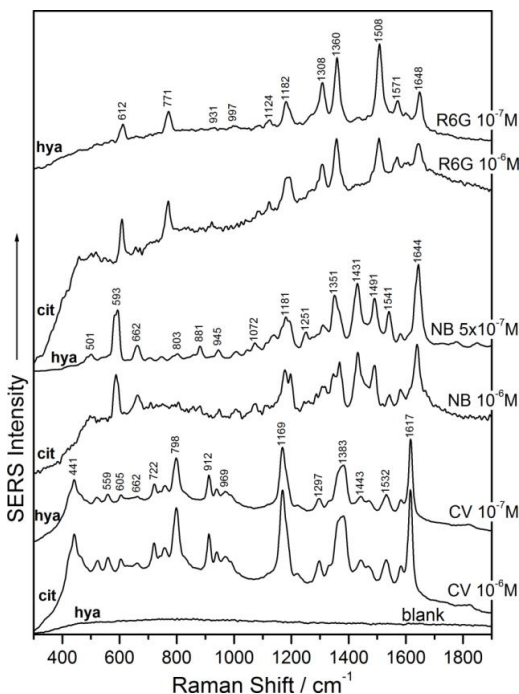


Figura 1.3. Spectrele SERS ale analiților test Cristal Violet (CV), Nile Blue (NB) și Rhodamine 6G (R6G) obținute prin utilizarea coloizilor de aur redușicu hidroxilamină (hya) și cu citrat (cit)

Spectrele SERS obținute au o calitate similară în cazul ambilor coloizi, dar concentrația analiților în cazul coloidului redus cu hidroxilamină a fost de 10 ori mai mică.

Pentru a folosi nanomateriale în celulele vieste necesară testarea în prealabil a biocompatibilității acestora. Citotoxicitatea nanoparticulelor depinde de mai mulți factori, cum ar fi dimensiunea, forma sau compoziția chimică a suprafeței acestora [24, 25].

Efectul citotoxic al NPA a fost evaluat utilizând testul MTT, care se bazează pe reducerea enzimatică a reactivului MTT galben la cristale violet de formazan numai decătre celule(adenocarcinom pulmonar uman (A549)) metabolic active. Rezultatele au fost exprimate ca procent de supraviețuire în comparație cu celule netratate și sunt prezentate în **Figura 1.4.**

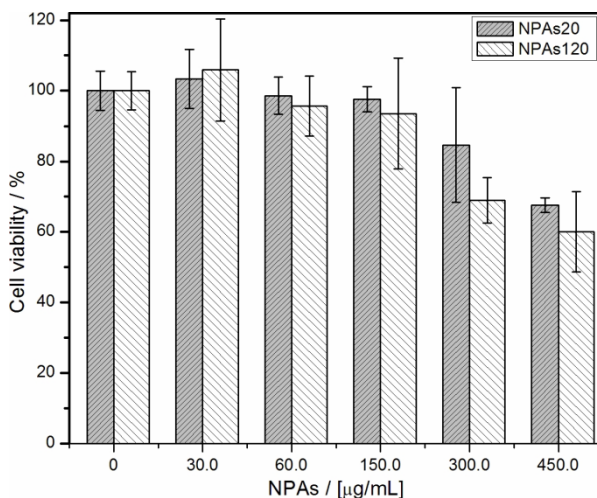


Figura 1.4. Viabilitatea celulelor A549 expuse la NPs20 și NPs120 în concentrații de aur cuprinse între 30 și 450 $\mu\text{g} / \text{ml}$ timp de 24 de ore.

Datele din figură arată că NPs induc o scădere semnificativă a viabilității celulare numai la concentrații mari de aur (300 sau 450 $\mu\text{g} / \text{ml}$). Un studiu anterior care a implicat terapia fototermică mediată de structuri de aur a arătat că o concentrație de aur de 100 $\mu\text{g/g}$ în sânge este suficientă pentru obținerea unui răspuns semnificativ după iradiere[26].

După testul de biocompatibilitate, s-a analizat posibilitatea ca nanoparticulele de aur reducătoare de hidroxilamină să fie utilizate ca agenți de terapie fototermică, prin testarea capacității acestora de a transforma lumina în căldură. Capacitatea de conversie a nanoansamblor a fost măsurată prin monitorizarea creșterii temperaturii coloizilor concentrați datorită iradierii cu laser.

Pentru iradiere, au fost utilizate comparativ două lasere cu lungimi de undă diferite (532 nm și 785 nm).

S-a constatat că NPAs120 convertesc energia luminii în căldura mai eficient decât NPAs20 în cazul ambelor lungimi de undă folosite. Acest lucru se datorează probabil benzii de rezonanță plasmonică largă centrate în jurul valorii 653 nm (vezi **Figura 1.1.**) caracteristică NPAs120. NPAs120 au atins o temperatură maximă de 57.6 °C cu laserul de 785 nm și 43.6 °C cu laserul de 532 nm, în timp ce NPAs20 au atins o temperatură maximă de 39.6 °C cu laserul de 532 nm și doar 33.9 °C cu laserul de 785 nm. Utilizarea laserului de 785 nm este avantajoasă în special pentru aplicațiile *in vivo/ex vivo*, datorită faptului că se potrivește cu fereastra terapeutică din domeniul 650 nm și 1350 nm în care lumina NIR poate să penetreze cel mai adânc țesutul.

Deoarece validarea utilizării NPAs ca agenți fototermici *in vivo* necesită utilizarea laserilor, a fost implementată cartografierea Raman. Imagistica Raman a fost utilizată pentru a detecta leziunile țesutului provocate de efectul fototermic al NPAs asupra celulelor la iradierea cu laserul. Datele spectrale au fost analizate utilizând analiza componentelor principale (PCA). **Figura 1.5.** prezintă celulele înainte și după iradiere, împreună cu harta Raman corespunzătoare, bazată pe analiza PCA.

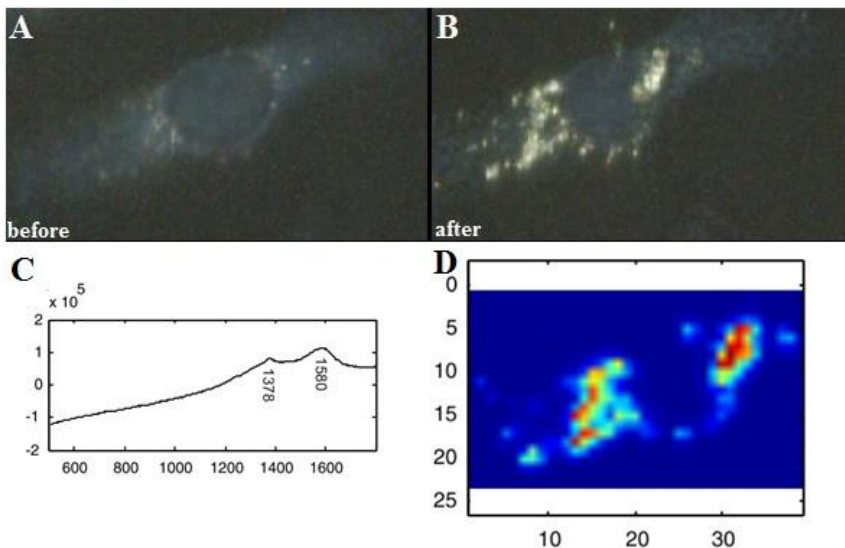


Figura 1.5. Imagini reprezentative ale celulelor obținute prin imagini cu microscopie optică înainte (A) și după (B) iradiere, rezultatul analizei PCA (C) și harta Raman corespunzător PCA-ului (D).

Spectrele Raman ale celulelor prezintă benzi la 1378 cm^{-1} și 1580 cm^{-1} , reprezentând benzile D și G ale materialelor carbonice, care sunt produși secundar datorită distrugerii termice [27]. Conform **Figurii 1.5.**, zonele roșii de pe harta Raman reprezintă regiunile cu leziuni termale intense. În comparație cu imaginile optice ale aceleiași celule, observăm o suprapunere între aceste zone roșii și grupurile mari de NPAs120. Astfel, se poate concluziona că nanoparticulele sunt direct responsabile pentru degradările termice din celulă.

2. Nanoparticule de argint reduse cu clor

Pentru prepararea soluției coloidale de argint reduse în prezența clorurii de sodiu (Cl-AgNPs), reactivii au fost adăugați într-un recipient de laborator gradat și apoi expuși la lumina unei lămpi convenționale echipată cu un bec LED comercial, sub agitare magnetică constantă. În **Figura 3.1.**, imaginea (A) prezintă configurația experimentală a sintezei Cl-AgNPs, în timp ce imaginea (B) prezintă coloidul preparat.

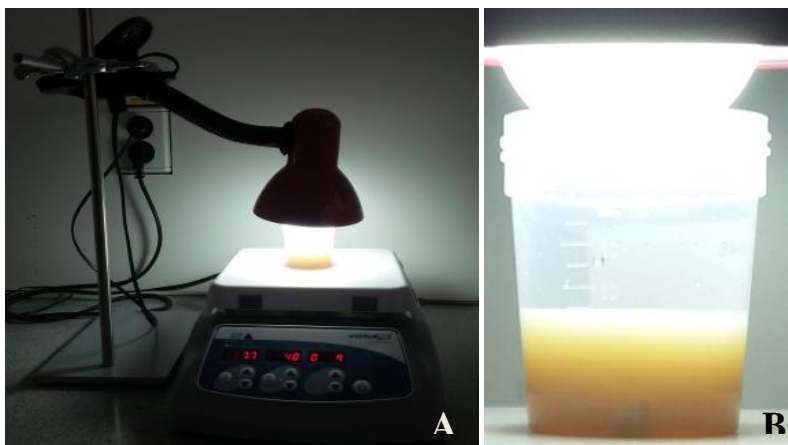


Figura 2.1. Imaginea (A) prezintă schema experimentală pentru sinteza Cl-AgNPs. O lampă de birou echipată cu un bec LED a fost plasată deasupra recipientului care conține amestecul de reactivi. Imaginea (B) prezintă soluția coloidală de Cl-AgNPs obținută după 10 minute de expunere la lumină.

După trei minute de expunere la lumină, soluția transparentă a devenit galben pal. După cinci minute de expunere, culoarea

coloidului s-a modificat în maro-cenușiu, indicând o concentrație ridicată de nanoparticule de argint în soluție.

Fotoreducerea nanoparticulelor de argint este deja raportată în literatură. În majoritatea studiilor raportate, fotosinteza a fost efectuată în prezența agenților organici de stabilizare cum ar fi citratul [28] sau poli(N-vinilpirolidona) [29, 30]. În comparație cu aceste studii, principala noutate a protocolului nostru este reprezentată de sinteza rapidă, la temperatura camerei a soluției coloidale și de lipsa oricărui agent de stabilizare organic.

Amestecarea azotatului de argint și a clorurii de sodiu în soluția de reacție a determinat formarea unui precipitat flocculat de AgCl. Prezența particulelor de AgCl în soluție a fost evidențiată în spectrele UV-Vis prin banda de absorbție intensă la 254 nm (**Figura 2.2**). Fotoconversia microparticulelor de AgCl în nanoparticule de argint a fost monitorizată prin spectroscopie UV-Vis și este prezentată în **Figura 2.2**. Pe durata expunerii la lumină, intensitatea benzii de la 254 nm datorată absorbției microparticulelor de AgCl scade, în timp ce intensitatea benzii plasmonice de argint la 429 nm crește, datorită formării de AgNP.

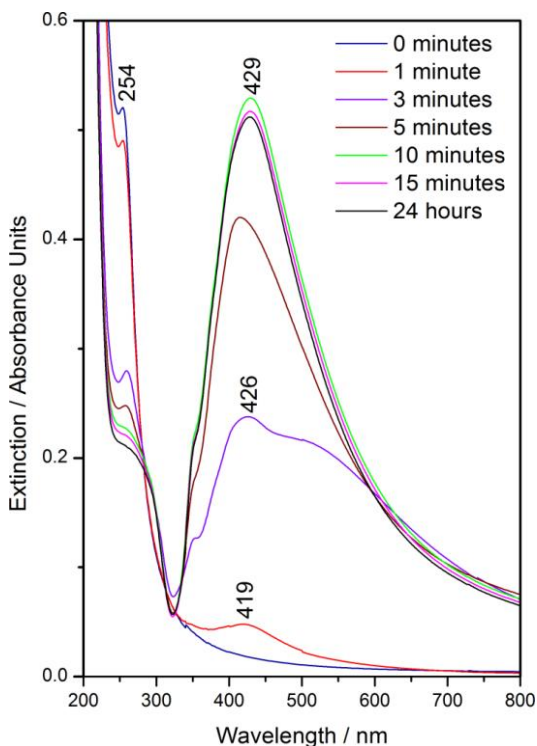


Figura 2.2. Spectrele de extincție UV-Vis obținute în timpul sintezei Cl-AgNP, înregistrate după 0, 1, 3, 5, 10 și 15 min de expunere la lumină și 24 de ore după sinteza coloidului.

În timpul procesului de fotoreducere, suprafața particulelor de AgCl devine acoperită de grupuri de atomi de Ag, fenomen deja raportat de Wang și colaboratorii săi [31]. Grupurile de atomi de argint cresc în mod continuu în timpul expunerii la lumină, ducând la formarea de AgNPs pe suprafața microparticulelor

deAgCl. După 5 minute de expunere la lumină, banda de rezonanță plasmonică devine mai îngustă, prezentând o formă tipică pentru coloizii de argint.

Între 5 și 10 minute de expunere la lumină, intensitatea benzii plasmonice la 429 nm atinge valoarea maximă. După 10 minutenu s-a observat o creștere suplimentară a intensității benzii plasmonice. Dimensiunea AgNPs prezintă polidispersitate cu diametre în intervalul 10-80 nm și diferite geometrii, cum ar fi sferice sau poliedrice. Polidispersitateapotea fi rezultatul lipsei unui surfactant organic.

Pentru a evidenția capacitatea de amplificare SERS a noilor Cl-AgNP, s-au efectuat măsurători Raman comparative, folosind nanoparticule de argint reduse cu citrat (cit-AgNPs) și cu clorhidrat de hidroxilamină (hya-AgNPs). Rezultatele măsurătorilor SERS sunt prezentate în **Figura2.3**.

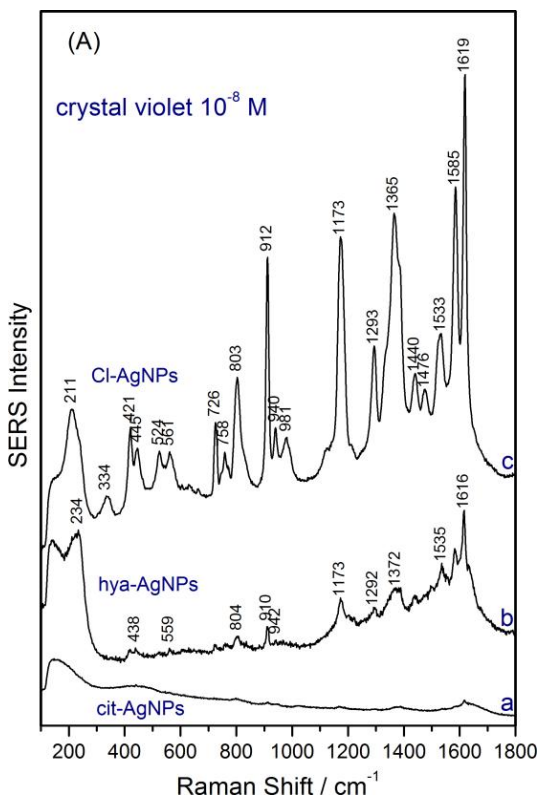


Figura 2.3. Spectrele SERS ale cristalului violet la concentrația 10^{-8} M utilizând cit-AgNPs (a), hya-AgNPs (b) și Cl-AgNPs (c) ca substraturi SERS.

După cum se poate observa în **Figura 2.3**, substratul Cl-AgNPs determină de departe cea mai mare intensitate SERS în cazul cristalului violet. Acest lucru poate fi explicat în modelul adatom, prin concentrația ridicată a anionilor de Cl^- , care determină o cuplare electronică între suprafața metalică și sianalită. Ioni de clorură chemisorbiți mediază cuplarea electronică a

moleculilor cationice prin formarea complecșilor de suprafață Cl-analit [31], formând zone active SERS pe suprafața AgNPs. Coloidul hya-AgNP conține un număr mult mai redus de anioni Cl⁻, prezenți în soluție datorită sării de clorhidrat a hidroxilaminei. Astfel, sunt disponibile doar un număr limitat de zone active SERS datorită prezenței ionilor Cl⁻, ceea ce explică spectrele SERS de intensitate scăzută. Când se folosește coloidul cit-AgNP ca substrat SERS, nu s-au putut obține spectre la concentrația testată. Totuși, după adăugarea de 0.1 M NaCl la coloidul cit-AgNPs, a fost posibilă obținerea spectrelor SERS cu intensitate comparabilă cu cele obținute cu substratul Cl-AgNPs.

3. Abordarea amplificării SERS în modelul adatom

Anionii de clorură sunt adesea adăugați la coloizii metalici pentru a amplifica semnalul Raman. Când efectul SERS este explicat prin mecanismul electromagnetic, un efect de agregare al nanoparticulelor coloidale este atribuit ionilor de clorură. Agregatele nanoparticulare pot conduce la formarea de "hot-spot"-uri electromagnetice - zone cu amplificări ale câmpului electromagnetic. Absența amplificării celorlalte componente moleculare din soluția coloidală datorită "hot-spot"-urilor, cum ar fi apa, este încă neexplicată.

O altă explicație a amplificării ridicate SERS obținută după adăugarea ionilor Cl⁻ constă în generarea de noi zone active SERS. Crearea site-urilor active SERS prin activarea cu clorură poate fi explicată în modelul adatom, propus de Otto și colegii săi, prin formarea unor complecși stabili de suprafață, de tip clorură-moleculă, care facilitează amplificarea prin transfer de sarcină.

În acest capitol este arătat faptul că prin utilizarea adatomilor adecvați, semnalul SERS al diferiților analiți poate fi îmbunătățit și că agregarea nanoparticulelor, formarea "hot-spot"-urilor, nu este necesară pentru creșterea semnalului SERS.

În timpul sintezei substraturilor SERS, reactivii utilizați se află în domeniul de concentrație mM, prin urmare spectroscopia Raman normală nu este suficient de sensibilă pentru a observa benzi distincte ale substraturilor SERS. Surfactantul utilizat în timpul sintezei împiedică agregarea nanoparticulelor prin repulsia

electrostatică între nanoparticule. Dacă nu există o cuplare electronică între suprafața metalică și surfactant, atunci aceasta din urmă nu generează niciun spectru SERS. În anumite condiții, atunci când surfactantul este adsorbit pe AgNP și intră în contact chimic cu suprafața nanoparticulelor, surfactantul prezintă semnal SERS intens. Spectrul Raman al coloizilor în comparație cu apa poate fi văzut în **Figura 3.1**.

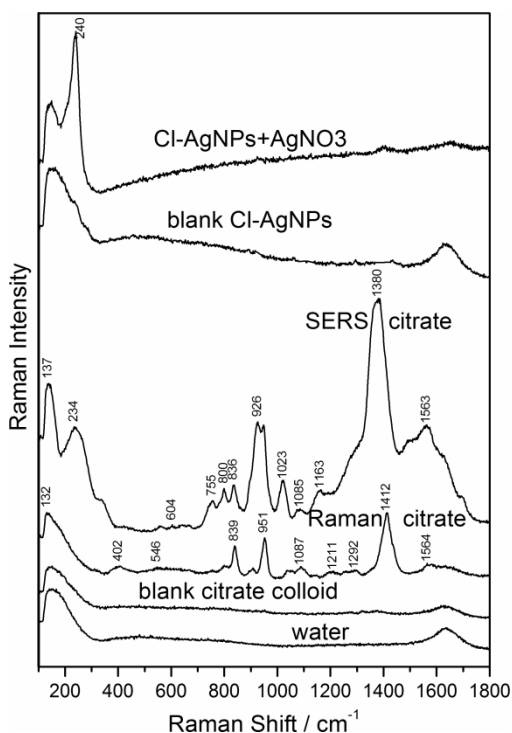


Figura 3.1. Spectrul Raman al apei, spectrul Raman al soluției coloidale de argint obținut prin reducerea cu citrat, spectrul Raman al citratului 1 M, spectrul SERS al citratului obținut după adăugarea de AgNO₃ la coloidul de

argint, spectrul Raman al soluției coloidale de Cl-AgNP, spectrul SERS al soluției coloidale de Cl-AgNP care prezintă banda Ag-Cl după adăugarea AgNO_3 la coloidul de argint.

Intensitatea SERS a unui analit poate fi amplificată prin adăugarea de cationi cum ar fi Ag^+ , Mg^{2+} sau Ca^{2+} . Astfel, adăugarea cationilor Ag^+ la coloidul citrat facilitează formarea complexilor Ag^+ -citrat la suprafața de argint a nanoparticulei, indicând o legătură chimică între adsorbat și substratul de argint. **Figura 3.1.** arată spectrul SERS intens al citratului obținut după adăugarea de AgNO_3 . Banda intensă la 234 cm^{-1} indică interacțiunea complexului anionic citrat $-\text{Ag}^+$ cu suprafața de argint, banda de la 234 cm^{-1} fiind atribuită unei vibrații de întindere Ag-O .

În mod similar, în cazul coloidului AgCl, lipsesc vibrațiile Ag-Cl, sugerând o interacțiune electrostatică între ionii de clorură și suprafața de argint. Prin adăugarea de AgNO_3 la soluția coloidală deja preparată, o bandă intensă la 240 cm^{-1} este clar vizibilă, atribuită vibrației Ag-Cl. Astfel, ionul de clorură este adsorbit pe suprafața de argint mediat de ionii Ag^+ și formează complecși de suprafață $\text{Ag}^+ -\text{Cl}^-$, în conformitate cu modelul adatom. Lipsa site-urilor active SERS în cit-AgNPs permite observarea într-un mod instructiv a efectului SERSselectiv după activarea SERS a coloidului și cuplarea analitului pe suprafața de argint. **Figura 3.2** prezintă activarea nanoparticulelor reduse cu citrat.

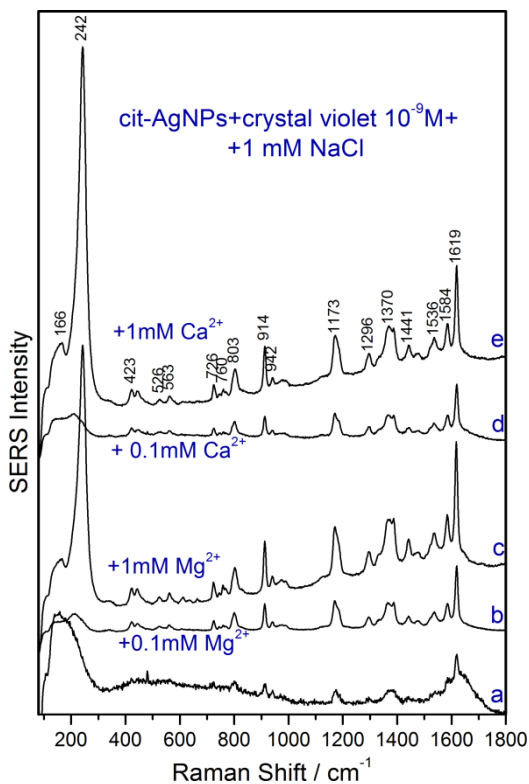


Figura 3.2. Spectrele SERS ale cristalului violet la 10^{-9} M înregistrate utilizând ca substrat cit-AgNps: cit-AgNPs + 1 mM NaCl (a), cit-AgNPs + 1 mM NaCl și 10^{-4} M MgSO_4 (b), cit-AgNP + 1 mM NaCl și 1 mM MgSO_4 (c), cit-AgNPs + 1 mM NaCl și 10^{-4} M $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (d), cit-AgNP + 1 mM NaCl și 1 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (e).

Substratul Cit-AgNPs nu a permis înregistrarea benzilor SERS ale cristalului violet la concentrație de 10^{-9} M, astfel încât a fost necesară adăugarea de NaCl 1 mM pentru a activa

nanoparticulele. Prezența clorurii a condus numai la o slabă activare (spectrul a). Adăugarea în continuare a cationilor în concentrații variind de la 10^{-4} - 10^{-3} M la soluție cit-AgNPs care conținea deja 1 mM NaCl a condus la pornirea efectului SERS și înregistrarea spectrelor SERS foarte intense ale cristalului violet la concentrația 10^{-9} M. Mai mult, o creștere suplimentară a intensității spectrelor SERS poate fi observată prin creșterea concentrației de ioni Mg^{2+} sau Ca^{2+} la 1 mM. Așadar, intensitatea spectrului SERS al unui analit la o concentrație dată, depinde de concentrația zonelor active SERS ale substratului utilizat.

S-a demonstrat deja că prin adăugarea de cationi la coloidul de argint redus cu citrat poate fi obținut spectrul SERS al citratului (**Figura 3.3.**, spectrul b). Adionii de Ca^{2+} activează efectul SERS, prin medierea chemisorbției citratului pe suprafața metalică a argintului. După adăugarea de NaCl 10^{-3} M la aceeași soluție coloidală, spectrul SERS al citratului dispare complet și spectrul SERS al Ag-Cl apare, indicat de o bandă la 242 cm^{-1} (spectrul c). Adsorbția selectivă a citratului și a clorurii poate fi explicată prin afinitățile lor diferite pentru suprafața de argint a nanoparticulelor. Afinitatea clorurii este mai puternică decât afinitatea citratului pentru suprafețele de argint, prin urmare, Cl^{-} poate înlocui cu ușurință citratul de la locurile specifice SERS. Deoarece sărurile adăugate au fost în concentrații reduse, apariția spectrelor datorate agregării a fost exclusă. Coloizii s-au dovedit a fi stabili timp de mai multe săptămâni.

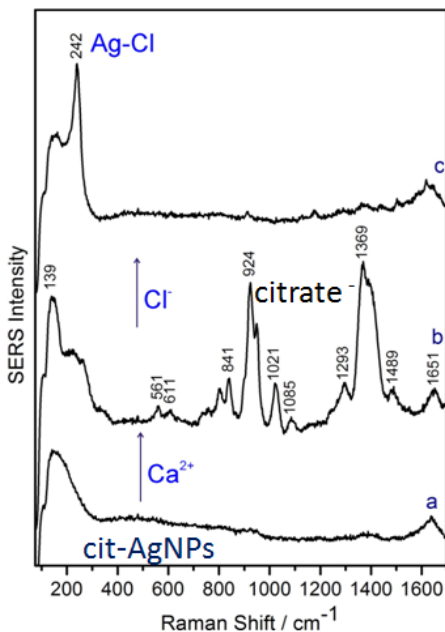


Figura 3.3. Spectrul Raman al cit-AgNPs (a); Spectrul SERS al citratului obținut prin adăugarea de Ca^{2+} la cit-AgNPs(b);Spectrul SERS cit-AgNPs obținut după adăugarea de Cl^- la cit-AgNPs(c).

Detecția specifică SERS a fost studiată suplimentar prin utilizarea cristalului violet ca analit test. Tabloul spectral din **Figura 3.4.** conține spectre înregistrate din aceeași soluție de cristal violet 10^{-8} M în cit-AgNPs, modificată prin adăugarea secvențială a ionilor Ca^{2+} și Cl^- . Spectrul SERS al cristalului violet la concentrația 10^{-8} M cu cit-AgNPs este gol (spectrul a). Când în aceeași soluție, se adaugă $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 10^{-4} M, spectrul înregistrat prezintă benzile SERS ale citratului (spectrul b), indicând faptul că zonele active SERS de Ca^{2+} promovează chemisorbția anionilor de citrat.

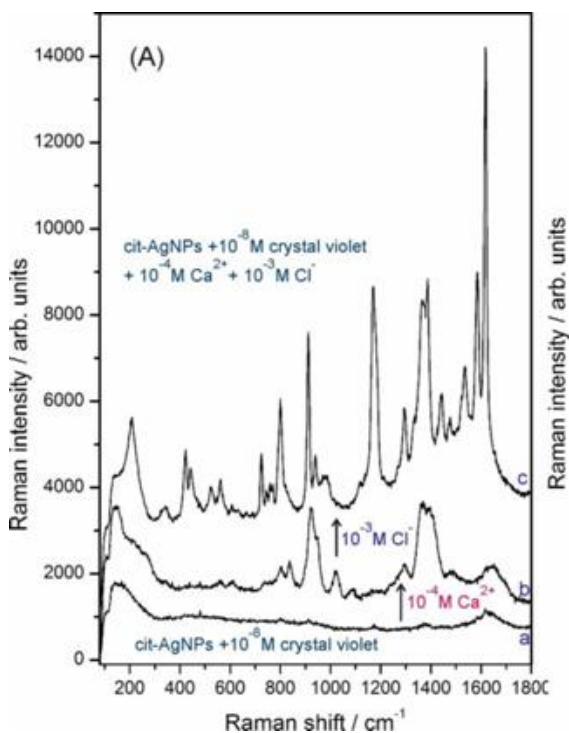


Figura 3.4. Detecția specifică SERS a anionului citrat și a colorantului cationic CV prin activarea SERS a cit-AgNP cu Ca^{2+} și cu Cl^- . Spectrul gol obținut pentru CV 10^{-8} M în cit-AgNPs (a), spectrul SERS al citratului după activarea coloidului cu Ca^{2+} (b), spectrul SERS al CV după adăugarea de Cl^- (c);

Când se adaugă $\text{NaCl } 10^{-3}\text{M}$ la aceeași soluție, benzile SERS de la citrat dispar, în timp ce benzile SERS ale cristalului violet apar (spectrul c). Astfel, ionii de Cl^- , datorită afinității lor mai mari față de suprafața de argint, înlocuiesc anionii de citrat din locurile active SERS Ca^{2+} , formând acum locuri active SERS pentru cristalul violet.

4. Concluzii

A fost descrisă o procedură nouă, eficientă și simplă pentru prepararea nanostructurilor de aur cu diametre medii de 20 și 120 nm pe baza reducerii aurului cu clorhidrat de hidroxilamină. Toți coloizii preparați au fost stabili cel puțin timp de două luni. Nanostructurile de 120 nm prezintă absorbție în regiunea spectrală NIR, o caracteristică care le oferă posibilitatea de a fi folosite în terapia fototermică. Prin modificarea suprafeței cu albumină la diferite momente de timp după sinteză, pot fi obținute nanoparticule foarte stabile de dimensiuni controlabile.

Spectrele SERS obținute utilizând nanoparticule reduse cu hidroxilamină prezintă o amplificare SERS mai bună, comparativ cu nanoparticulele coloidale convenționale reduse cu citrat.

Nanoansamblurile de aur sunt bine tolerate de celulele A549 până la o concentrație de aur de 300 $\mu\text{g} / \text{ml}$. În ceea ce privește capacitățile fototermice, s-a constatat că NPAs120 convertesc energia luminoasă în căldură mai eficient decât NPAs20, mai ales atunci când sunt iradiate cu laserul de 785 nm.

Am demonstrat că spectroscopia Raman poate evidenția în mod efectiv deteriorarea celulară datorită efectului fototermic, prin identificarea intracelulară a benzilor caracteristice Raman ale produșilor secundari de carbon. Regiunile cu produși secundari de carbon s-au dovedit a se suprapune cu regiunile intracelulare care erau bogate în nanoparticule. Aceste rezultate evidențiază faptul că NPAs obținute prin reducerea aurului cu hidroxilamină sunt

potențiali candidați pentru terapia fototermică pe bază de nanoparticule.

S-a descris metodologia de sinteză pentru nanoparticule de argint reduse prin fotoconversie. În comparație cu nanoparticulele de argint convenționale, Cl-AgNPs sunt avantajoase datorită prezenței clorurii ca agent stabilizator, conducând la o suprafață curată din punct de vedere al spectroscopiei SERS. Această strategie previne apariția unor artefacte datorate adsorbției pe suprafața de argint a produșilor de reacție organică.

Cl-AgNPs prezintă spectre SERS foarte intense pentru analiți cationici. S-a demonstrat că efectul SERS este dependent de prezența zonelor active SERS pe AgNPs. Pentru a susține teoria adatomului, am arătat că spectrul SERS al anionilor, cum ar fi citratul sau Cl⁻, poate fi înregistrat atunci când aceste molecule sunt chemisorbite prin cationi precum Ag⁺ sau Mg²⁺, în conformitate cu modelul adatom. În prezența mai multor specii anionice în soluție, adsorbția pe suprafața de argint are loc în ordinea afinității lor pentru suprafață. Acest lucru arată că amplificarea de suprafață apare datorită numărului crescut de zone active SERS și nu datorită agregării de AgNPs.

Am arătat că efectul SERS este un fenomen specific în care pentru detectarea speciilor anionice se adaugă ioni cationici, în timp ce pentru speciile cationice este necesară adăugarea ionilor anionici, pentru a forma site-uri specifice active SERS. Mai mult, intensitatea spectrului SERS este proporțională cu numărul site-urilor active SERS existente.

5.1. Articole științifice

- Todor, Istvan Sz**, Szabo, Laszlo, Marisca, Oana T., Chis, Vasile, & Leopold, Nicolae. (2014). Gold nanoparticle assemblies of controllable size obtained by hydroxylamine reduction at room temperature. *Journal of Nanoparticle Research*, 16(12).
- Leopold, Nicolae, Stefanecu, Andrei, Herman, Krisztian, **Todor, Istvan Sz.**, Iancu, Stefania D., Moisoiu, Vlad, & Leopold, Loredana F. (2018). The role of adatoms in chloride-activated colloidal silver nanoparticles for surface-enhanced Raman scattering enhancement. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 9, 2236-2247.
- Boitor, R. A., **Todor, I. Sz**, Leopold, L. F., & Leopold, N. (2015). Room Temperature Synthesis of Highly Monodisperse and Sers-Active Glucose-Reduced Gold Nanoparticles. *Journal of Applied Spectroscopy*, 82(3), 415-419.
- Leopold, Loredana Florina, **Todor, Istvan Szabolcs**, Diaconeasa, Zorita, Rugina, Dumitrita, Stefanecu, Andrei, Leopold, Nicolae, & Coman, Cristina. (2017). Assessment of PEG and BSA-PEG gold nanoparticles cellular interaction. *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects*, 532, 70-76.
- Magyari, Klara, One, Roxana, **Todor, Istvan-Szabolcs**, Baia, Monica, Simon, Viorica, Simon, Simion, & Baia, Lucian. (2016). Titania effect on the bioactivity of silicate bioactive glasses. *Journal of Raman Spectroscopy*, 47(9),

1102-1108.

- Pinzaru, S. Cinta, Muller, Cs., **Todor, I. S.**, Glamuzina, B., & Chis, V. (2016). NIR-Raman spectrum and DFT calculations of okadaic acid DSP marine biotoxin microprobe. *Journal of Raman Spectroscopy*, 47(6), 636-642.
- Szabo, Laszlo, Herman, Krisztian, Mircescu, Nicoleta Elena, **Todor, Istvan Szabolcs**, Simon, Botond Lorand, Boitor, Radu Alex, . . . Chis, Vasile. (2014). Surface-enhanced Raman scattering and DFT investigation of 1,5-diphenylcarbazine and its metal complexes with Ca(II), Mn(II), Fe(III) and Cu(II). *Journal of Molecular Structure*, 1073, 10-17.
- Marta, B.;Leordana,C.;**Istvan, T.**;Baritchi,R.; Astilean,S., Optimazition of various parameters for graphene synthesis by thermal chemical vapor deposition (CVD) on copper substrate., *Studia Universitatis Babes-Bolyai, Physica* . Dec2014, Vol. 59 Issue 2, p35-45. 11p
- Bogdan Marta, Cosmin Leordean, **Todor Istvan**, Ioan Botiz, Simion Astilean, Efficient etching-free transfer of high quality, large-area CVD grown graphene onto polyvinyl alcohol films, *Applied Surface Science*, Volume 363, 2016, Pages 613-618,

5.2. Articole trimise spre publicare

István Sz Tódor, Oana Marisca, Dumitrita Rugina, Zorita Diaconeasa, Loredana Leopold, Cristina Coman, Elisabeta Antonescu, Zoltán Bálint, László Szabó, Stefania Iancu, Vasile Chis, Nicolae Leopold. (2019). Photothermal property assessment of gold nanoparticle assemblies obtained by hydroxylamine reduction

5.3. Postere prezentate la conferințe

Highly SERS Active Gold Nanoparticles Assemblies of Controllable Size, 8th International Conference on Vibrational Spectroscopy (ICAVS), 2015 Viena, Austria

Preparation and Spectroscopic Characterization of Heparin-reduced Gold Nanoparticles at Room Temperature, 5th Conference on Advanced Spectroscopies on Biomedical and Nanostructured Systems (BIONANOSPEC), 2014 Cluj-Napoca, România

Synthesis of Popcorn Shaped Nanoparticle Assemblies, TIM13 International Physics Conference, 2013 Timișoara, România

Popcorn Shaped Gold Nanoparticles with Absorbance in NIR, The 5th National Conference of Applied Physics, CNFA 2013, Iași, România

6. Bibliografie selectivă

1. Qian, X., et al., *In vivo tumor targeting and spectroscopic detection with surface-enhanced Raman nanoparticle tags*. Nature Biotechnology, 2008. **26**(1): p. 83-90.
2. Lee, K.S. and M.A. El-Sayed, *Gold and silver nanoparticles in sensing and imaging: Sensitivity of plasmon response to size, shape, and metal composition*. Journal of Physical Chemistry B, 2006. **110**(39): p. 19220-19225.
3. Sperling, R.A. and W.J. Parak, *Surface modification, functionalization and bioconjugation of colloidal inorganic nanoparticles*. Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences, 2010. **368**(1915): p. 1333-1383.
4. Dreaden, E.C., et al., *The golden age: gold nanoparticles for biomedicine*. Chemical Society Reviews, 2012. **41**(7): p. 2740-2779.
5. Lin, D., et al., *Colorectal cancer detection by gold nanoparticle based surface-enhanced Raman spectroscopy of blood serum and statistical analysis*. Optics Express, 2011. **19**(14): p. 13565-13577.
6. Iyer, A.K., et al., *Exploiting the enhanced permeability and retention effect for tumor targeting*. Drug Discovery Today, 2006. **11**(17-18): p. 812-818.
7. Dickerson, E.B., et al., *Gold nanorod assisted near-infrared plasmonic photothermal therapy (PPTT) of squamous cell carcinoma in mice*. Cancer Lett, 2008. **269**(1): p. 57-66.
8. Mornet, S., et al., *Magnetic nanoparticle design for medical applications*. Progress in Solid State Chemistry, 2006. **34**(2-4): p. 237-247.
9. Nie, S. and S.R. Emory, *Probing Single Molecules and Single Nanoparticles by Surface-Enhanced Raman Scattering*. Science, 1997. **275**(5303): p. 1102-1106.

10. Jeanmaire, D.L. and R.P. Van Duyne, *Surface raman spectroelectrochemistry: Part I. Heterocyclic, aromatic, and aliphatic amines adsorbed on the anodized silver electrode*. Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry, 1977. **84**(1): p. 1-20.
11. Albrecht, M.G. and J.A. Creighton, *Anomalous intense Raman spectra of pyridine at a silver electrode*. Journal of the American Chemical Society, 1977. **99**(15): p. 5215-5217.
12. Moskovits, M., *Surface-enhanced Raman spectroscopy: A brief retrospective*. Journal of Raman Spectroscopy, 2005. **36**(6-7): p. 485-496.
13. Billmann, J., G. Kovacs, and A. Otto, *Enhanced Raman effect from cyanide adsorbed on a silver electrode*. Surface Science, 1980. **92**(1): p. 153-173.
14. Otto, A., et al., *The "adatom model" of SERS (Surface Enhanced Raman Scattering): The present status*. Surface Science, 1984. **138**(2): p. 319-338.
15. Otto, A. and M. Futamata, *Electronic Mechanisms of SERS*, in *Surface-Enhanced Raman Scattering: Physics and Applications*, K. Kneipp, M. Moskovits, and H. Kneipp, Editors. 2006, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 147-182.
16. Otto, A., et al., *Surface-enhanced Raman scattering*. Journal of Physics: Condensed Matter, 1992. **4**(5): p. 1143-1212.
17. Urban, A.S., et al., *Three-dimensional plasmonic nanoclusters*. Nano Letters, 2013. **13**(9): p. 4399-4403.
18. Xu, L., et al., *Nanoparticle assemblies: Dimensional transformation of nanomaterials and scalability*. Chemical Society Reviews, 2013. **42**(7): p. 3114-3126.
19. Garcia-Leis, A., J.V. Garcia-Ramos, and S. Sanchez-Cortes, *Silver nanostars with high SERS performance*. Journal of Physical Chemistry C, 2013. **117**(15): p. 7791-7795.

20. Boca, S., et al., *Flower-shaped gold nanoparticles: Synthesis, characterization and their application as SERS-active tags inside living cells*. *Nanotechnology*, 2011. **22**(5).
21. Fan, Z., et al., *Popcorn-shaped magnetic core-plasmonic shell multifunctional nanoparticles for the targeted magnetic separation and enrichment, label-free SERS imaging, and photothermal destruction of multidrug-resistant bacteria*. *Chemistry - A European Journal*, 2013. **19**(8): p. 2839-2847.
22. Lu, W., et al., *Gold nano-popcorn-based targeted diagnosis, nanotherapy treatment, and in situ monitoring of photothermal therapy response of prostate cancer cells using surface-enhanced raman spectroscopy*. *Journal of the American Chemical Society*, 2010. **132**(51): p. 18103-18114.
23. Lee, P.C. and D. Meisel, *Adsorption and surface-enhanced Raman of dyes on silver and gold sols*. *Journal of Physical Chemistry*, 1982. **86**(17): p. 3391-3395.
24. Khalili Fard, J., S. Jafari, and M.A. Eghbal, *A Review of Molecular Mechanisms Involved in Toxicity of Nanoparticles*. *Adv Pharm Bull*, 2015. **5**(4): p. 447-54.
25. Khlebtsov, N. and L. Dykman, *Biodistribution and toxicity of engineered gold nanoparticles: a review of in vitro and in vivo studies*. *Chem Soc Rev*, 2011. **40**(3): p. 1647-71.
26. Day, E.S., et al., *Nanoshell-mediated photothermal therapy improves survival in a murine glioma model*. *J Neurooncol*, 2011. **104**(1): p. 55-63.
27. Jawhari, T., A. Roid, and J. Casado, *Raman spectroscopic characterization of some commercially available carbon black materials*. *Carbon*, 1995. **33**(11): p. 1561-1565.
28. Sato-Berrú, R., et al., *Silver nanoparticles synthesized by direct photoreduction of metal salts. Application in surface-enhanced Raman spectroscopy*. *Journal of Raman Spectroscopy*, 2009. **40**(4): p. 376-380.

29. Huang, H.H., et al., *Photochemical Formation of Silver Nanoparticles in Poly(N-vinylpyrrolidone)*. *Langmuir*, 1996. **12**(4): p. 909-912.
30. Xu, G.-n., Qiao, Xue-liang, Qiu, Xiao-lin, Chen, Jian-guo, *Preparation and characterization of stable monodisperse silver nanoparticles via photoreduction*. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2008. **320**(1-3).
31. Muniz-Miranda, M. and G. Sbrana, *Evidence for Surface Ag⁺ Complex Formation by an Anion-Induced Effect in the SER Spectra of Phthalazine Adsorbed on Silver Sols*. *Journal of Raman Spectroscopy*, 1996. **27**(2): p. 105-110.