

UNIVERSITATEA BABEȘ-BOLYAI
FACULTATEA DE FIZICĂ

**Implementarea Nano-Bipiramidelor de Aur ca
Amplificatori în Biosenzoristică și Generatori
Termoplasmonici Eficienți**

De

CÂMPU ANDREEA-MARIA

Rezumatul tezei de doctorat

CONDUCĂTOR DE DOCTORAT
Prof. Univ. Dr. SIMION AȘTILEAN

CLUJ-NAPOCA

2020

Conținut

Motivație și prezentare generală	iv
Abrevieri	vi
Capitol I. Nanoparticule de aur: Introducere și aplicații plasmonice	1
I.1 Nanoparticulele de aur	1
I.2 Proprietățile optice ale nanoparticulelor de aur	1
I.2.1 Spectroscopie Raman amplificată de suprafață (SERS)	2
I.2.2 Absorbție infra-roșu amplificată de suprafață (SEIRA)	4
I.2.3 Fluorescență amplificată de metal (MEF).....	4
I.3 Efecte terapeutice pentru aplicații biomedicale.....	5
I.3.1 Efectul fototermic	6
I.3.2 Efectul fotodinamic.....	6
Capitol II. Nano-bipiramide de aur – sinteză chimică și caracterizare –	7
II.1 Introducere	7
II.2 Nano-bipiramide de aur – sinteză chimică și purificare	7
II.3 Caracterizarea LSPR și TEM.....	8
II.4 Sensibilitate de indice de refracție a mediului <i>Bulk</i> (RIS)	9
II.5 Concluzii	9
Capitol III. Dezvoltarea de bio-nano-senzori plasmonici în diferite configurații	10
III.1 Introducere	10
III.2 Senzor imunologic în soluție pe bază de AuBPs pentru detecția LSPR-SERS-SEIRA	10
III.2.1 Investigarea sensibilității SERS și LSPR în funcție de raportul de aspect al AuBPs.....	10
III.2.2 Prepararea elementului de recunoaștere.....	11
III.2.3 Protocolul de biodetecție.....	11
III.2.4 Detecția multimodală LSPR-SERS-SEIRA.....	11
III.2.5 Detecția interacțiunii imunologice anti-IgG uman- IgG uman	13

III.2.6	Concluzii	14
III.3	Nano-senzor plasmonic pe bază de hârtie pentru detecție multimodală.....	14
III.3.1	Fabricarea nano-senzorului pe bază de hârtie prin caligrafie plasmonică	14
III.3.2	Caracterizarea nanoplatfomei plasmonice de hârtie	15
III.3.3	Optimizarea nanoplatfomei plasmonice și evaluare sensibilității	16
III.3.4	Protocol de biodetecție.....	16
III.3.5	Detecție multimodală LSPR-SERS-MEF	16
III.3.6	Concluzii	18
III.4	Bio-nano-senzor plasmonic integrat în canal microfluidic pentru detecția în flux laminal	18
III.4.1	Prepararea substratului plasmonic	18
III.4.2	Caracterizarea optică și morfologică a substratului plasmonic.....	19
III.4.3	Sensibilitatea de indice de refracție <i>bulk</i> a substratului plasmonic.....	19
III.4.4	Fabricarea canalului microfluidic și integrarea substratului plasmonic.....	19
III.4.5	Detecție duală LSPR/SERS în flux laminal	20
III.4.6	Concluzii	21
Capitol IV.	Aplicații terapeutice ale bipiramidelor de aur	22
IV.1	Introducere	22
IV.2	Proprietăți terapeutice intrinseci	22
IV.2.1	Proprietăți fototermice și eficiențe de conversie.....	22
IV.2.2	Generare de oxigen singlet.....	24
IV.2.3	Concluzii	24
IV.3	Nano-bipiramide de aur încărcate cu ICG cu potențial terapeutic activabil în NIR pentru terapia duală PTT-PDT	25
IV.3.1	Protocol de bio-compatibilizare și încapsulare a ICG-ului	25
IV.3.2	Proprietăți fototermice și fotodinamice în soluție.....	25
IV.3.3	Validare <i>in vitro</i> a terapiei duale PTT-PDT	26
IV.3.4	Concluzii	27

Capitol V. Concluzii Finale și Perspective	28
V.1 Concluzii finale.....	28
V.2 Perspective.....	29
Diseminarea rezultatelor	I
Lista publicațiilor rezultate din teza de doctorat	I
Articole publicate în reviste ISI	I
Manuscrise în pregătire	II
Alte Publicații	II
Articole publicate în reviste ISI	II
Articole publicate în reviste non-ISI.....	III
Capitole de carte publicate în reviste ISI	III
Participări la conferințe.....	IV
Prezentări Orale	IV
Prezentări Poster	IV
Contribuții la prezentări	V
Cerere de patent rezultată din teza de doctorat	VIII
Premii	VIII
Activitate didactică.....	VIII
Cursuri de specializare și stagii de cercetare.....	VIII
Funding and grants	IX
Granturi obținute prin competiție.....	IX
Memberu în proiecte de cercetare	IX
Mulțumiri	X

Motivație și prezentare generală

Cercetarea în domeniul nanotehnologiilor progresează continuu dorind să satisfacă nevoile industriilor și comunităților care au un impact major asupra societății. Una dintre cele mai importante preocupări ale comunității științifice este sistemul de sănătate, în mod specific, necesitatea de a oferi pacienților o îngrijire adecvată, eficientă și accesibilă tuturor. Astfel, eforturile oamenilor de știință sunt concentrate asupra celor mai potrivite abordări în ceea ce privește prevenția, diagnosticul timpuriu și tratamentul eficient al bolilor.

În acest context științific, dezvoltarea de nanosisteme simple, accesibile și precise în vederea implementării acestora în aplicații medicale este de mare interes. Cu acest scop, nanoparticulele de aur având proprietăți optice unice datorate mării varietăți de forme și dimensiuni au atras atenția cercetătorilor. Cu toate acestea, nanostructurile de aur cu forma bipiramidală sunt mai puțin studiate în literatura de specialitate. Datorită morfologiei, acestea prezintă avantaje promițătoare atât în aplicații de biosenzoristică cât și de terapie. Prin urmare, această lucrare își propune să analizeze și să studieze proprietățile acestor nanoparticule alungite pentru a le exploata mai departe în încercarea de a răspunde solicitărilor provenite din domeniul de diagnostic medical și terapie. În mod concret, se urmărește dezvoltarea de nanosisteme ușor de manipulat, care prezintă stabilitate și biocompatibilitate crescută, timp de reacție redus, specificitate și selectivitate crescută, abilități de amplificare și aplicare multimodală simultană.

Primul capitol oferă o imagine de ansamblu din literatura de specialitate asupra nanostructurilor de aur din perspectiva considerentelor teoretice cu accent pe descrierea proprietăților radiative și non-radiative ale acestora, care ne permit implementarea lor cu succes în aplicații specifice de biosenzoristică și tratament.

Capitolul II prezintă metoda de sinteză a nanoparticulelor de aur de formă bipiramidală (AuBPs), evidențiind avantajele și provocările întâmpinate în încercarea de a obține astfel de nanostructuri în mod controlat și, implicit, cu proprietăți optice modulabile. Caracterizarea optică și morfologică este investigată concomitent cu evaluarea sensibilității acestora.

În capitolul al treilea am propus și validat trei configurații diferite de biosenzori care se bazează pe capacitatea AuBPs de a acționa ca nano-antene active și eficiente. Astfel, am dezvoltat: (i) un senzor imunologic în soluție capabil să detecteze multimodal *via* LSPR-SERS-SEIRA interacțiunea specifică biotină-streptavidină; (ii) o nanoplatformă plasmonică versatilă pe suport de hârtie Whatman pe care am izolat spațial diferite linii

plasmonice printr-o metodă inovatoare de caligrafie plasmonică, dezvoltând astfel un biosenzor ieftin, eficient, flexibil, portabil, miniaturizat ce permite detecția multiplexată; și (iii) un dispozitiv plasmonic de detecție integrat în canal microfluidic, care permite detecția volumetrică tridimensională în flux laminar a moleculelor de interes în timp real la concentrații foarte scăzute.

Proprietățile non-radiative ale AuBPs sunt discutate în detaliu în capitolul IV. Concret, acest studiu investighează abilitățile fototermice (PTT) și fotodinamice (PDT) intrinseci ale nanostructurilor în urma expunerii acestora la două surse laser din domeniul infra-roșu apropiat (785 și 808 nm). Astfel, am dezvoltat un nou nano-sistem hibrid pe bază de AuBPs având un fotosensibilizator (PS) incorporat pentru terapia duală PTT-PDT amplificată.

În final, capitolul V punctează cele mai importante concluzii ale studiilor efectuate în cadrul acestei teze de doctorat precum și perspectivele de viitor propuse.

Rezultatele obținute în această teză de doctorat au fost valorificate prin publicarea a 5 articole în reviste cotate ISI cumulând un factor de impact de 21,53 și un scor de influență de 4,31, și prin prezentarea acestora la conferințe internaționale, așa cum reiese din secțiunea *Diseminarea rezultatelor*.

Cuvinte cheie: Nano-bipiramide de aur, Sinteză, Biodetecție multimodală, Detecție multiplexă, Proprietăți fototermice intrinseci, Proprietăți fotodinamice intrinseci, Terapie duală fototermică și fotodinamică

Abrevieri

- LSPR** – Rezonanță plasmonică localizată de suprafață
- SPR** – Rezonanța plasmonică de suprafață
- SERS** – Spectroscopie Raman amplificată de suprafață
- SEIRA** – Absorbție infra-roșu amplificată de suprafață
- MEF** – Fluorescență amplificată de metal
- PTT** –Terapie fototermică
- PDT** – Terapie Fotodinamică
- ROS** – Specii reactive de oxigen
- PS** – Fotosensibilizator
- NIR** – Infra-roșu apropiat
- IR** – Infra-roșu
- UV** - Ultraviolet
- AuBPs** – Nanobipiramide de aur
- AuNRs** – Nanobastonașe de aur
- AR** – Raport de aspect
- RIS** – Sensibilitate de indice de refracție
- RI** – Indice de refracție
- FWHM** – Lărgimea benzii la semi-înălțime
- FOM** – Figură de merit
- LOD** – Limită de detecție
- POC** – Point-of-Care
- LOC** – Lab-on-a-Chip
- DLS** – Împrăștierea dinamică a luminii
- TEM** – Microscopie electronică de transmisie
- HR-TEM** – Microscopie electronică de transmisie de rezoluție înaltă
- SEM** – Microscopie electronică de baleaj
- TLC** – Cromatografie pe strat subțire
- FT-IR** – Spectroscopie Infra-roșu cu transformata Fourier
- DFT** – Transformata Fourier discretă
- FDTD** – Domeniul de timp cu diferență finită
- TFSF** – Câmpul total incluzând câmpul împrăștiat
- EM** – Câmp electromagnetic

Capitol I. Nanoparticule de aur: Introducere și aplicații plasmonice

I.1 Nanoparticulele de aur

Nanoparticulele de aur, deși folosite încă din antichitate, au atras atenția comunității științifice în ultimele decenii. Prima dată au fost folosite în colorarea sticlei ¹ pentru a obține frumoasele vitralii pe care le admirăm la obiectivele turistice. În zilele noastre, nanoparticulele de aur sunt considerate de mare interes pentru o vastă varietate de aplicații de la instrumente de diagnostic, dispozitive de detecție și/sau agenți terapeutici exploatare proprietățile acestora unice.

I.2 Proprietățile optice ale nanoparticulelor de aur

Datorită dimensiunilor lor nanometrice, nanoparticulele de aur prezintă proprietăți optice unice ². Caracteristicile de absorbție sunt datorate rezonanței plasmonice de suprafață localizate (LSPR), care rezultă din oscilațiile colective ale electronilor de conducție de suprafață în urma excitației rezonante cu o undă electromagnetică, în particular lumina pentru domeniul vizibil (Figura I.1.2.). Acest fenomen a fost descris pentru prima dată folosind teoria lui Mie ³, care se adresează cazului simplu a unei nanosfere de aur și determină faptul că spectrul de extincție este format atât din absorbția cât și din împrăștierea luminii de către material. Prin rezolvarea ecuațiilor lui Maxwell ⁴, răspunsul LSPR este demonstrat a fi sensibil la indicele de refracție al mediului local din vecinătatea nanoparticulelor și totodată dependent de forma și dimensiunea acestora. Mai mult, interacțiunea rezonantă a nanoparticulelor de aur cu lumina generează la suprafața acestora un câmp electromagnetic amplificat, promovând amplificarea semnalului spectroscopic în cazul spectroscopiei Raman și de fluorescență ⁵.

¹ Marie-Christine Daniel and Didier Astruc, "Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size-Related Properties, and Applications toward Biology, Catalysis, and Nanotechnology," *Chemical Reviews* 104, no. 1 (January 1, 2004): 293–346, <https://doi.org/10.1021/cr030698+>.

² K. Kaur, "Optical Biosensing Using Localized Surface Plasmon Resonance of Gold Nanoparticles" (University of Waterloo, Canada, 2011).

³ Gustav Mie, "Beiträge zur Optik trüber Medien, speziell kolloidaler Metallösungen," *Annalen der Physik* 330, no. 3 (1908): 377–445, <https://doi.org/10.1002/andp.19083300302>.

⁴ Daniel and Astruc, "Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size-Related Properties, and Applications toward Biology, Catalysis, and Nanotechnology."

⁵ M. Iosin et al., "Study of Protein–Gold Nanoparticle Conjugates by Fluorescence and Surface-Enhanced Raman Scattering," *Journal of Molecular Structure* 924–926 (April 2009): 196–200, <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2009.02.004>.

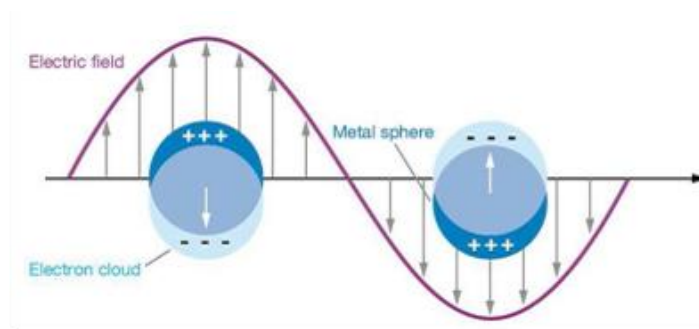


Figura I.2. Ilustrarea schematică a fenomenului de rezonanță plasmonică de suprafață pentru cazul simplu al unei nanosfere de aur.

Nano-senzorii plasmonici bazați pe LSPR sunt priviți ca instrumente de detecție eficiente, Sharma et al. furnizează o lucrare care însumează diversitatea de molecule de interes care au fost puse în evidență cu succes prin LSPR atingându-se limite de detecție până la 350 fM ⁶. Profitând de funcționalizarea nanoparticulelor cu molecule specifice, limitele de detecție au fost îmbunătățite până la 0.1 aM ⁷. Jean-Francois Masson face o recenzie a implementării biosenzorilor SPR/LSPR în aplicații clinice, punctând utilitatea modelelor LSPR pentru scopuri clinice ⁸ precum și în aplicații legate de mediu, industria alimentară, agricultură și detecția gazelor volatile ⁹.

I.2.1 Spectroscopie Raman amplificată de suprafață (SERS)

Spectroscopia Raman reprezintă o tehnică vibrațională de analiză importantă, care permite identificarea moleculelor pe baza structurii acestora chimice. Efectul Raman este descris de teoria electromagnetică clasică: în urma interacțiunii dintre o sursă incidentă de lumină și o moleculă polarizabilă, cea din urmă devenind un dipol oscilant, care ulterior reemite sau împrăștie lumina cu aceeași frecvență cu cea a oscilațiilor dipolului.

Efectul Raman este un fenomen foarte slab, comparativ fluorescența este de 6 până la 10 ordine de mărime mai intensă ¹⁰. În acest context, pentru a depăși această limitare, moleculele sunt plasate în imediata vecinătate a unei suprafețe metalice nanostructurate pentru a amplifica semnalul Raman. Acest efect este numit împrăștiere Raman amplificată de suprafață (SERS). SERS a fost observat pentru prima dată în 1974 de către Fleischmann,

⁶ Shubhanshi Sharma et al., "Optical Biosensing with Electromagnetic Nanostructures," *Reviews in Physics* 5 (November 2020): 100044, <https://doi.org/10.1016/j.revip.2020.100044>.

⁷ Yuanyuan Tian, Lei Zhang, and Lianhui Wang, "DNA-Functionalized Plasmonic Nanomaterials for Optical Biosensing," *Biotechnology Journal* 15, no. 1 (January 2020): 1800741, <https://doi.org/10.1002/biot.201800741>.

⁸ Jean-Francois Masson, "Surface Plasmon Resonance Clinical Biosensors for Medical Diagnostics," *ACS Sensors* 2, no. 1 (January 27, 2017): 16–30, <https://doi.org/10.1021/acssensors.6b00763>.

⁹ Jean-Francois Masson, "Portable and Field-Deployed Surface Plasmon Resonance and Plasmonic Sensors," *The Analyst* 145, no. 11 (2020): 3776–3800, <https://doi.org/10.1039/D0AN00316F>.

¹⁰ Eric C. Le Ru and Pablo G. Etchegoin, *Principles of Surface-Enhanced Raman Spectroscopy: And Related Plasmonic Effects*, 1st ed (Amsterdam ; Boston: Elsevier, 2009).

Hendra și McQuillan, aceștia au remarcat faptul ca rugozitatea suprafeței electrodului de argint influențează semnalul Raman al moleculei de piridină ¹¹. Până în prezent, studiile arată o amplificare a semnalului Raman de până la 10^{10} - 10^{11} ordine de mărime prin SERS. Pentru a descrie mecanismul SERS, comunitatea științifică acceptă două teorii ¹²: amplificarea electromagnetică (EM) și mecanismul chimic (CM), respectiv.

EM este legat de substrat și independent de molecula absorbită, apare datorită fotoexcitării rezonante a plasmonilor de suprafață și astfel induc o amplificare semnificativă a câmpului electromagnetic ¹³.

Contrar, CM apare din interacțiunea dintre molecula absorbită și substratul metalic, în principiu, prin transferul de sarcină între cele două entități inducând astfel schimbări la nivelul polarizabilității moleculei ¹⁴.

În mod convențional, substratele SERS sunt fabricate prin depunerea nanoparticulelor metalice pe un suport solid obținându-se astfel o suprafață rugoasă. Recent, au fost dezvoltate modele mult mai interesante. Substratele pe bază de hârtie flexibile și ecologice au captivat atenția în aplicații SERS. Ogundare și van Zyl realizează o imagine de ansamblu asupra dezvoltării și implementării acestora în bioanaliză atingându-se limite de detecție de până la 100 fM ¹⁵. Utilizarea de nanoparticule bimetalice și matrice de silica în realizarea de substrate SERS s-a dovedit a fi eficientă în detecția de explozivi cu limite de detecție de nanomolari ¹⁶. Substratele de natură polimerică sunt cunoscute că adsorb nanoparticule fiind totodată flexibile și transparente ¹⁷. Mai mult, un avantaj al tehnicii SERS este subliniat de Sun et al., în mod specific, abilitatea de a putea fi implementat la fața locului ¹⁸.

¹¹ M. Fleischmann, P. J. Hendra, and A. J. McQuillan, "Raman Spectra of Pyridine Adsorbed at a Silver Electrode," *Chemical Physics Letters* 26, no. 2 (May 15, 1974): 163–66, [https://doi.org/10.1016/0009-2614\(74\)85388-1](https://doi.org/10.1016/0009-2614(74)85388-1).

¹² Cheng Zong et al., "Surface-Enhanced Raman Spectroscopy for Bioanalysis: Reliability and Challenges," *Chemical Reviews* 118, no. 10 (May 23, 2018): 4946–80, <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00668>.

¹³ George C Schatz and Richard P Van Duyne, "Handbook of Vibrational Spectroscopy," *New York: Wiley* 1 (2002): 759; P. Alonso-González et al., "Resolving the Electromagnetic Mechanism of Surface-Enhanced Light Scattering at Single Hot Spots," *Nature Communications* 3, no. 1 (January 2012): 684, <https://doi.org/10.1038/ncomms1674>; Song-Yuan Ding et al., "Nanostructure-Based Plasmon-Enhanced Raman Spectroscopy for Surface Analysis of Materials," *Nature Reviews Materials* 1, no. 6 (June 2016): 16021, <https://doi.org/10.1038/natrevmats.2016.21>.

¹⁴ Pilot et al., "A Review on Surface-Enhanced Raman Scattering," *Biosensors* 9, no. 2 (April 17, 2019): 57, <https://doi.org/10.3390/bios9020057>.

¹⁵ Segun A. Ogundare and Werner E. van Zyl, "A Review of Cellulose-Based Substrates for SERS: Fundamentals, Design Principles, Applications," *Cellulose* 26, no. 11 (July 2019): 6489–6528, <https://doi.org/10.1007/s10570-019-02580-0>.

¹⁶ Sree Satya Bharati Moram et al., "Instantaneous Trace Detection of Nitro-Explosives and Mixtures with Nanotextured Silicon Decorated with Ag–Au Alloy Nanoparticles Using the SERS Technique," *Analytica Chimica Acta* 1101 (March 2020): 157–68, <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.12.026>.

¹⁷ Zhuoyao Li, Xiao Huang, and Gang Lu, "Recent Developments of Flexible and Transparent SERS Substrates," *Journal of Materials Chemistry C* 8, no. 12 (2020): 3956–69, <https://doi.org/10.1039/D0TC00002G>.

¹⁸ Ji Sun et al., "Surface-enhanced Raman Spectroscopy for On-site Analysis: A Review of Recent Developments," *Luminescence*, March 11, 2020, bio.3796, <https://doi.org/10.1002/bio.3796>.

I.2.2 Absorbție infra-roșu amplificată de suprafață (SEIRA)

Absorbția în infra-roșu amplificată de suprafață (SEIRA) este o tehnică de analiză de suprafață sensibilă care asemeni SERS profită de proprietățile electromagnetice ale nanoparticulelor metalice. Mecanismul SEIRA este descris de către Heberle și Ataka, aceștia discută două teorii asociate cu amplificarea de suprafață observată: amplificarea câmpului electromagnetic și mediul efectiv compus¹⁹. Principiul tehnicii presupune excitarea mediului compozit și, ulterior, cuplarea dipolului oscilant al moleculelor cu oscilațiile electronilor de conducție aflați la suprafața metalului astfel îmbunătățindu-se absorbția totală. Această metodă de analiză nu detectează doar moleculele absorbite, ci mai mult, permite determinarea orientării acestora față de suprafața metalică²⁰. Amplificarea semnalului este de $10^3 - 10^6$ ordine de mărime, dovedind astfel sensibilitatea mare a tehnicii²¹.

I.2.3 Fluorescență amplificată de metal (MEF)

În ciuda faptului ca fenomenul de fluorescență amplificată de metal (MEF) a fost observat pentru prima dată în 1974²², acesta a fost studiat și descris abia de Lakowicz²³. MEF apare în urma interacțiunii dintre fluoroforii prezenți în stare excitată și rezonanțele plasmonice de suprafață ale metalelor. Fluoroforii în stare excitată se comportă ca dipoli oscilanți la care metalul reacționează prin a le modifica ratele de emisie și distribuția spațială a energiei emise. Interacțiunea metalului atât cu sursa incidentă cât și cu fluoroforul induce modificări ale câmpului electromagnetic simțit de către fluorofor. Pe de altă parte, fluoroforul generează și el un câmp electric care afectează metalul. În urma acestor interacțiuni, câmpul incident al fluoroforului și rata acestuia de dezexcitare radiativă pot fi crescute sau scăzute. Creșterea ratei de dezexcitare radiativă poate fi explicată folosind diagrama Jablonksi (Figura I.2.3.) luând în considerare comportamentul fluoroforului atât în lipsa cât și în prezența metalului. Astfel, în prezența metalului, rata de dezexcitare radiativă este crescută datorită ratei de excitare suplimentare (E_m) asociate metalului care aduce în plus o nouă rată de dezexcitare radiativă (Γ_m).

¹⁹ Joachim Heberle and Kenichi Ataka, "Surface Enhanced Infrared Absorption Spectroscopy," in *Encyclopedia of Biophysics*, ed. Gordon C. K. Roberts (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013), 2528–31, https://doi.org/10.1007/978-3-642-16712-6_127.

²⁰ Masatoshi Osawa, "Surface-Enhanced Infrared Absorption," in *Near-Field Optics and Surface Plasmon Polaritons*, ed. Satoshi Kawata, vol. 81, Topics in Applied Physics (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2001), 163–87, https://doi.org/10.1007/3-540-44552-8_9.

²¹ Hang Yin et al., "Gold Nanonails for Surface-Enhanced Infrared Absorption," *Nanoscale Horizons*, 2020, 10.1039/D0NH00244E, <https://doi.org/10.1039/D0NH00244E>.

²² K. H. Drexhage, "Progress in Optics XII," *Progress in Optics (North-Holland, Amsterdam, 1974)*, 1974.

²³ Joseph R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Third edition, corrected at 4. printing (New York, NY: Springer, 2010).

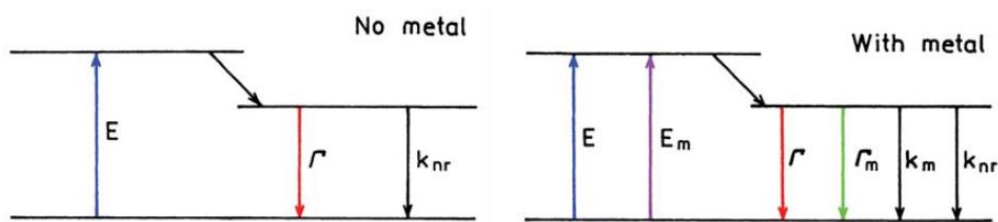


Figura I.2.3. Diagrama Jablonski descrie emisia de fluorescență în lipsa (stânga) și prezența (dreapta) suprafeței metalice.

I.3 Efecte terapeutice pentru aplicații biomedicale

Progresul este înregistrat nu doar pentru obținerea de instrumente de biodetecție în vederea diagnosticului timpuriu ci și în dezvoltarea de tratamente eficiente ale bolilor cu risc crescut sau incurabile precum cancerul. Actual, cele mai comune tratamente ale cancerului sunt chirurgia, chimioterapia, imunoterapia și, de curând, terapia fotodinamică a fost acceptată pentru teste clinice ²⁴. Însă datorită limitărilor și efectelor adverse ale acestora, mult efort este depus în dezvoltarea de metode terapeutice bazate pe biomateriale cu specificitate, biocompatibilitate, abilități de țintire și localizare a tumorii îmbunătățite având ca scop înlocuirea tratamentelor invazive folosite momentan ²⁵.

Nanoparticulele plasmonice reprezintă o clasă de nano-sisteme care merită exploatate în acest sens și au fost demonstrate a avea un rol important în dezvoltarea de strategii terapeutice inovative ale cancerului ²⁶. Agenți terapeutici eficienți au fost dezvoltați prezentând activare multimodală prin: (i) stimulare internă prin pH și temperatură ²⁷ și (ii) declanșare externă ²⁸. Mai mult, diferitele modificări ale chimiei de suprafață asigură atât o specificitate și biocompatibilitate îmbunătățită pentru recunoașterea celulară cât și integrarea mai multor funcționalități pe aceeași platformă promovând astfel ideea de teranostic și sinergia dintre terapia fototermică și fotodinamică asistată de plasmoni ²⁹.

²⁴ Beatriz Domingues et al., "Melanoma Treatment in Review," *ImmunoTargets and Therapy* 7 (2018): 35–49, <https://doi.org/10.2147/ITT.S134842>.

²⁵ M.A. Stokman et al., "Preventive Intervention Possibilities in Radiotherapy- and Chemotherapy-Induced Oral Mucositis: Results of Meta-Analyses," *Journal of Dental Research* 85, no. 8 (August 2006): 690–700, <https://doi.org/10.1177/154405910608500802>;

Carole Soussain et al., "CNS Complications of Radiotherapy and Chemotherapy," *The Lancet* 374, no. 9701 (November 2009): 1639–51, [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)61299-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)61299-X);

²⁶ Zhixuan Song et al., "Mesoporous Silica-Coated Gold Nanorods with a Thermally Responsive Polymeric Cap for near-Infrared-Activated Drug Delivery," *Journal of Materials Science* 53, no. 10 (May 2018): 7165–79, <https://doi.org/10.1007/s10853-018-2117-7>.

²⁷ Wei Li et al., "Overcoming Photodynamic Resistance and Tumor Targeting Dual-Therapy Mediated by Indocyanine Green Conjugated Gold Nanospheres," *Journal of Controlled Release* 258 (July 2017): 171–81, <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.05.015>.

²⁸ Wei Li et al., "Gold Nanospheres-Stabilized Indocyanine Green as a Synchronous Photodynamic–Photothermal Therapy Platform That Inhibits Tumor Growth and Metastasis," *ACS Applied Materials & Interfaces* 9, no. 4 (February 2017): 3354–67, <https://doi.org/10.1021/acsami.6b13351>.

²⁹ Shan Fang et al., "Dual-Stimuli Responsive Nanotheranostics for Multimodal Imaging Guided Trimodal Synergistic Therapy," *Small* 13, no. 6 (February 2017): 1602580, <https://doi.org/10.1002/sml.201602580>;

I.3.1 Efectul fototermic

Efectul fototermic (PTT) este descris de o serie de fenomene de tip cascadă induse de absorbția luminii, în mod specific de fotoexcitarea rezonantă a electronilor de suprafață, ducând astfel la disipare termică. Odată ce fotonii sunt absorbiți, particulele încep să oscileze și astfel distribuția de sarcină non-termală este indusă prin termalizarea împrăștierii elastice electron-electron până când se atinge un echilibru al distribuției electronice Fermi corelat cu o temperatură înaltă la nivelul electronilor. Astfel, temperatura de la suprafața metalică crește rapid. Răcirea distribuției Fermi este asociată unui proces de cuplare electron-fonon, care aduce sistemul într-o stare de echilibru formând o structură metalică încinsă. Următoarele interacțiuni de tip fonon-fonon asigură disiparea căldurii la interfața dintre particulă și mediul înconjurător ³⁰.

I.3.2 Efectul fotodinamic

Terapia fotodinamică (PDT) este bazată pe un concept simplu de aplicabilitate cu scopul de a induce moartea celulelor canceroase în mod eficient, țintit, astfel protejându-se țesutul sănătos. Mecanismul presupune fotoexcitarea unui fotosensibilizator (PS), care trece de pe nivelul energetic de bază (S_0) pe nivelul de energie excitat (S_1). Relaxarea PS înapoi pe nivelul de bază se realizează radiativ prin emisie de fluorescență și non-radiativ prin conversia internă a lumii în căldură și disiparea acestia mediului înconjurător și/sau trecerea într-o stare de excitație temporară de triplet (T_1) inducând astfel o serie de reacții fotochimice, respectiv, generarea de specii reactive de oxigen (ROS) responsabile de PDT. Capacitățile de a absorbi lumină eficient împreună cu proprietățile de stabilitate ale nanoparticulelor de aur le fac promițătoare pentru aplicații PDT ca amplificatori a activității PDT a PS.

Na An, Huiming Lin, and Fengyu Qu, "Synthesis of a GNRs@mSiO₂-ICG-DOX@Se-Se-FA Nanocomposite for Controlled Chemo-/Photothermal/Photodynamic Therapy" *European Journal of Inorganic Chemistry* 2018, no. 39 (October 24, 2018): 4375–84, <https://doi.org/10.1002/ejic.201800572>;

Muhammad Rizwan Younis et al., "Low Power Single Laser Activated Synergistic Cancer Phototherapy Using Photosensitizer Functionalized Dual Plasmonic Photothermal Nanoagents," *ACS Nano*, February 11, 2019, acsnano.8b09552, <https://doi.org/10.1021/acsnano.8b09552>;

Fangfang Xia et al., "Matrix Metalloproteinase 2 Targeted Delivery of Gold Nanostars Decorated with IR-780 Iodide for Dual-Modal Imaging and Enhanced Photothermal/Photodynamic Therapy," *Acta Biomaterialia* 89 (April 2019): 289–99, <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.03.008>.

³⁰ Essraa A. Hussein et al., "Recent Advances in Functional Nanostructures as Cancer Photothermal Therapy," *International Journal of Nanomedicine*, May 17, 2018, <https://doi.org/10.2147/IJN.S161031>; Stephan Link and Mostafa A. El-Sayed, "Shape and Size Dependence of Radiative, Non-Radiative and Photothermal Properties of Gold Nanocrystals," *International Reviews in Physical Chemistry* 19, no. 3 (July 1, 2000): 409–53, <https://doi.org/10.1080/01442350050034180>;

D. Keith Roper, W. Ahn, and M. Hoepfner, "Microscale Heat Transfer Transduced by Surface Plasmon Resonant Gold Nanoparticles," *The Journal of Physical Chemistry C* 111, no. 9 (March 2007): 3636–41, <https://doi.org/10.1021/jp064341w>.

Capitol II. Nano-bipiramide de aur – sinteză chimică și caracterizare –

II.1 Introducere

Nano-bipiramidele de aur (AuBPs) fac parte din categoria de nanoparticule anisotropice alungite împreună cu nano-bastonașele de aur (AuNRs), prezentând similitudini în ceea ce privește forma și, implicit, proprietățile optice precum LSPR și amplificarea câmpului electromagnetic local. Formarea acestor particule se bazează în principal pe interacțiunea agenților chimici precum surfactanți, liganzi, polimeri, etc cu diferitele suprafețe de creștere ale particulelor. Aceste interacțiuni definesc morfologia nanostructurilor și permit modularea dimensiunii acestora.

II.2 Nano-bipiramide de aur – sinteză chimică și purificare

Un progres important în fabricarea AuBPs a fost înregistrat de către Narvarro et al.³¹ și Chateau et al.³², astfel, bazându-ne pe metodele raportate de aceștia, o versiune adaptată a sintezei chimice mediate prin germeni a fost folosită în această lucrare. Procesul presupune doi pași: (i) sinteza germenilor de creștere și (ii) creșterea AuBPs.

În vederea formării de AuBPs, germeni sferici policristalini stabilizați cu CTAC au fost obținuți prin amestecarea a 1 M clorură aurică (HAuCl_4) cu 25 w % CTAC la temperatura camerei și în condiții de agitare puternică pentru câteva secunde. 0.25 M acid azotic (HNO_3) au fost adăugate urmate de a 50 mM soluție de borohidruă de sodiu (NaBH_4). Ulterior, s-a adăugat 1 M de acid citric și soluția de germeni de creștere a fost introdusă în baie de apă la temperatura de 80 °C pentru 60 - 90 minute fără agitare.

Pentru soluția de creștere s-a folosit: 25 mM HAuCl_4 amestecat cu 45 mM CTAB, 5 mM AgNO_3 și 0.4 M HQL. La final s-au adăugat diferite volume de germeni de creștere de la 300 la 6 μL . Această etapă a fost realizată la temperatura camerei și agitare ușoară după fiecare adăugare. Soluția finală a fost supusă unui tratament termic pentru 50 de minute la 45 °C. Pentru a obține nanoparticule mai mari, agentul de reducere HQL s-a adăugat în două etape: 2/3 din volum în timpul sintezei, iar 1/3 în timpul tratamentului termic. Pentru această abordare s-au folosit volume mici de germeni de creștere. Excesul de reactanți și potențiale produse secundare au fost îndepărtate prin centrifugare timp de 15 minute la 8000 rotații/minut și redispersie în apă ultrapură.

³¹ Julien R. G. Navarro et al., "Synthesis, Electron Tomography and Single-Particle Optical Response of Twisted Gold Nano-Bipyramids," *Nanotechnology* 23, no. 14 (2012): 145707, <https://doi.org/10.1088/0957-4484/23/14/145707>.

³² D. Chateau et al., "From Gold Nanobipyramids to Nanojavelins for a Precise Tuning of the Plasmon Resonance to the Infrared Wavelengths: Experimental and Theoretical Aspects," *Nanoscale* 7, no. 5 (February 7, 2015): 1934–43, <https://doi.org/10.1039/c4nr06323f>.

II.3 Caracterizarea LSPR și TEM

Înainte de a fi folosite, AuBPs fabricate au fost caracterizate optic și morfologic. Figura II.3(a) prezintă imagini digitale ale soluțiilor coloidale obținute, având colorație diferită de la verde închis la maro închis corespunzând cu răspunsurile optice înregistrate.

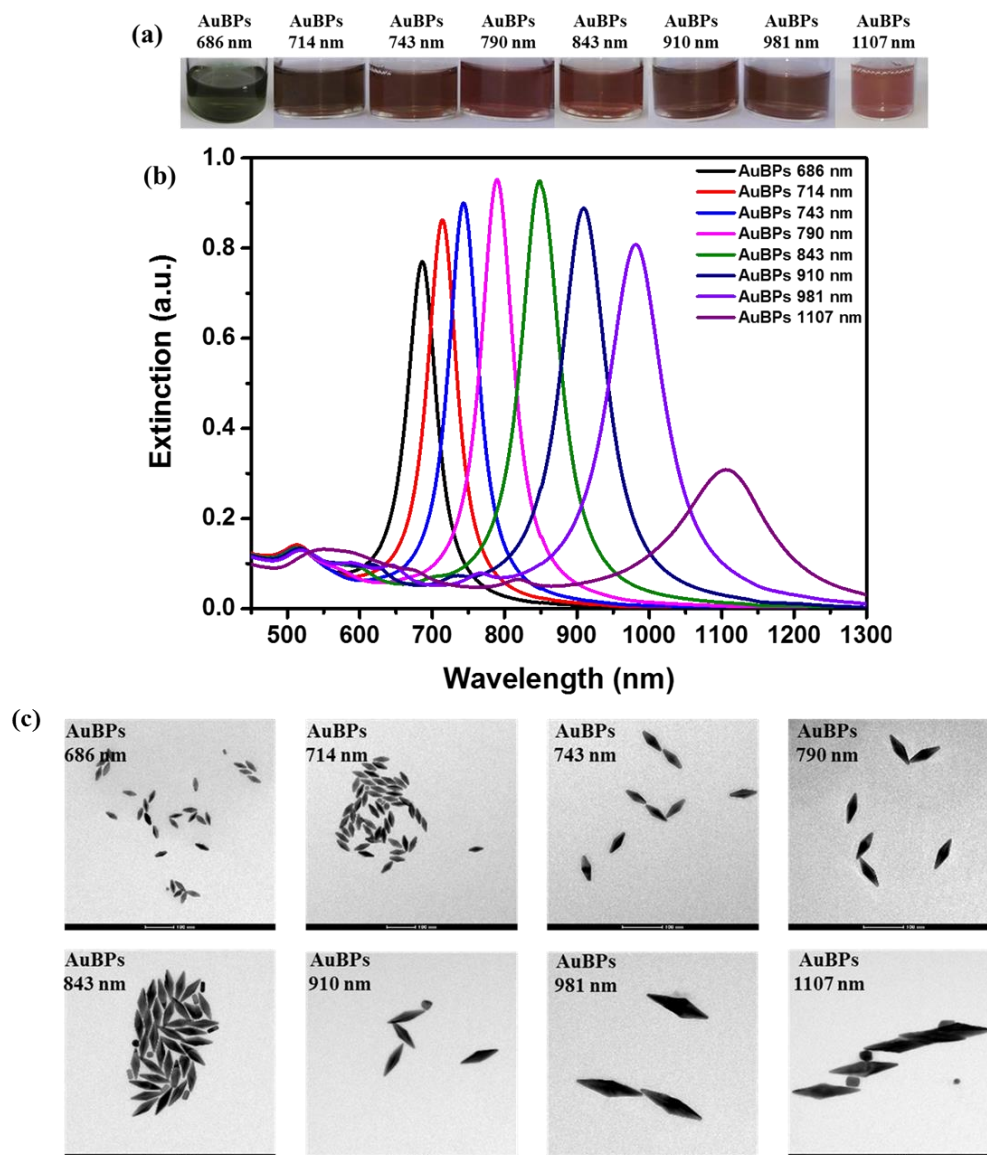


Figura II.3. (a) Imagini digitale cu soluțiile coloidale de AuBPs, (b) spectrele corespunzătoare de extincție și (c) imaginile microscopice TEM ale AuBPs la scala de 100 nm.

Toate spectrele de extincție înregistrate exprimă cele două benzi LSPR caracteristice, în mod specific, o bandă staționară la 512 nm atribuită oscilațiilor colective ale electronilor de conducție pe axa transversală și o bandă mai intensă și îngustă asociată oscilațiilor longitudinale. Aceasta din urmă are poziții spectrale de la 686 la 1107 nm

(Figura II.3(b)) în funcție de raportul de aspect (AR) al nanoparticulelor. Valorile AR au fost determinate pe baza imaginilor obținute prin microscopia electronică de transmisie (TEM) (Figura II.3(c)) și au valori cuprinse între 2.9 și 5.79 corelându-se cu pozițiile spectrale ale benzilor LSPR. Rezultatele obținute au fost coroborate cu măsurători de împrăștiere dinamică a luminii (DLS), determinându-se astfel diametrul hidrodinamic al nanostructurilor. De asemenea, potențialul de suprafață a fost evaluat la + 27 mV prin măsurători de potențial Zeta.

II.4 Sensibilitate de indice de refracție a mediului *Bulk* (RIS)

Determinarea capacităților de detecție LSPR a AuBPs sintetizate este bazată pe evaluarea sensibilității la indicele de refracție (RIS) atunci când indicele de refracție (RI) al mediului înconjurător se modifică de la 1.333 la 1.473. Spectrele de extincție înregistrate prezintă deplasări ale benzi longitudinale LSPR de până la 60 nm. Din fitarea deplasărilor ca funcție de RI, s-au determinat RIS cu valori între 222 nm/ unitate RI (nm/RIU) până la 551 nm/RIU pentru AuBPs sintetizate.

II.5 Concluzii

Acest capitol reprezintă primul pas în dezvoltarea de nanoplatforme pe bază de AuBPs pentru o mare varietate de aplicații demonstrând procedeul de sinteză a AuBPs cu mare reproductibilitate și uniformitate a proprietăților morfologice precum și stabilitatea acestora și sensibilitatea LSPR la modificările mediului înconjurător din vecinătatea acestora.

Capitol III. Dezvoltarea de bio-nano-senzori plasmonici în diferite configurații

III.1 Introducere

Unul din principalele obiective ale comunității științifice în bio-nano-tehnologii este dezvoltarea și îmbunătățirea unor nanoplatforme inovative care sunt capabile să detecteze cu specificitate și sensibilitate mare biomarkeri în stadiul incipient al bolilor prin evidențierea modificărilor realizate la nivel molecular în corpul uman³³. Acest domeniu a atras foarte multă atenție datorită necesității unui diagnostic timpuriu care are un impact major asupra sănătății pacienților asigurând un tratament adecvat cu mai puține efecte adverse și monitorizarea progresului sau regresului bolilor.

III.2 Senzor imunologic în soluție pe bază de AuBPs pentru detecția LSPR-SERS-SEIRA

În cele ce urmează, ne propunem să dezvoltăm un concept nou de imunosenzor în soluție capabil să detecteze sinergic LSPR-SERS-SEIRA interacțiuni de recunoaștere anticorp-antigenă specifice folosind AuBPs ca amplificatori plasmonici. Fezabilitatea imunosenzorului dezvoltat a fost demonstrată folosind interacțiunea biotină-streptavidină. Mai mult, capacitățile de detecție au fost validate pentru evenimentul biologic de legare anti-IgG uman-IgG uman demonstrându-se astfel detecția optică duală în soluție a unor proteine de interes.

III.2.1 Investigarea sensibilității SERS și LSPR în funcție de raportul de aspect al AuBPs

Dezvoltarea unor nanoplatforme eficiente LSPR-SERS au la bază exploatarea modulării răspunsului optic al AuBPs alături de câmpul electromagnetic amplificat localizat la vârfurile acestora. Pentru a evalua sensibilitatea tehnicilor LSPR și SERS s-a utilizat molecula reporter Raman p-aminotiofenol (p-ATP) ca analit de interes.

Identificarea modurilor vibraționale caracteristice ale p-ATP s-a realizat prin SERS demonstrându-se astfel că toate soluțiile coloidale de AuBPs sunt active în SERS. Performanța SERS crește cu cât răspunsul LSPR al AuBPs este mai aproape de condiția de rezonanță. Simultan, performanțele de detecție LSPR au fost evaluate prin monitorizarea

³³ Ibtisam Tothill and Zeynep Altintas, "Molecular Biosensors: Promising New Tools for Early Detection of Cancer," *Nanobiosensors in Disease Diagnosis*, January 2015, 1, <https://doi.org/10.2147/NDD.S56772>.

shiftului benzii longitudinale LSPR, astfel s-a observat că asemeni SERS toate platformele sunt capabile să detecteze molecula de p-ATP și, mai mult, că aceasta se atașează pe vârful nanostructurilor.

III.2.2 Prepararea elementului de recunoaștere

Pentru a testa specificitatea, sensibilitatea și eficiența unei nanoplatforme de detecție se folosește o interacțiune moleculară de referință bine cunoscută, în acest caz, interacțiunea de recunoaștere dintre biotină și streptavidină.

În acest context, propunem marcarea chimică a moleculei de biotină cu reporterul Raman p-ATP realizată după o adaptare a metodei propuse în literatura de specialitate ³⁴. Soluții de biotină-NHS disponibilă comercial și p-ATP au fost preparate având concentrația de 0.318 mmol după care acestea au fost amestecate și lăsate peste noapte pentru ca reacția să aibă loc. Folosind tehnici de evaporare și precipitare, excesul de reactanți a fost îndepărtat obținându-se o soluție finală de p-ATP@biotină de 15 mM.

Pentru a confirma legarea dintre cele două molecule, s-a realizat o caracterizare spectroscopică utilizând spectroscopia FT-IR. Mai mult, rezultatele obținute experimental au fost coroborate cu calcule chimice cuantice pentru a atribui corect și precis frecvențele vibraționale ale p-ATP și P-ATP@biotină. Concret, benzile vibraționale caracteristice ale p-ATP și biotină se regăsesc atât în spectrele experimentale cât și teoretice confirmând astfel marcarea cu succes a moleculei de biotină cu p-ATP.

III.2.3 Protocolul de biodetecție

Soluția obținută de p-ATP@biotină a fost adăugată peste AuBPs sintetizate și purificate, iar soluția finală este supusă unui tratament termic la 45 °C pentru 30 minute acesta favorizând grefarea compusului nou obținut peste suprafața de aur, urmând apoi să fie lasat peste noapte la temperatura camerei. Pentru captarea specifică a proteinei, p-ATP@Biotin-AuBPs a fost incubat cu streptavidină peste noapte la temperatura camerei.

III.2.4 Detecția multimodală LSPR-SERS-SEIRA

Interacțiunea specifică biotină-streptavidină este des utilizată în dezvoltarea de teste biologice datorită specificității sale precum și a legăturii puternice dintre acestea. De aceea, aceasta este utilizată pentru a demonstra eficiența și sensibilitatea nanoplatformei propuse.

³⁴ Jiang et al., "Biotinylated Glyco-Functionalized Quantum Dots."

Pentru a evidenția interacțiunea biotină-streptavidină, spectrele de extincție a p-ATP@Biotin-AuBPs înainte și după legarea proteinei au fost înregistrate cu un spectrofotometru UV-Vis-NIR (Figura III.2.4.(a)). După legarea complexului p-ATP@biotină, banda longitudinală a AuBPs este deplasată 11 nm spre lungimi de undă mai mari, confirmând astfel greșirea compusului. Odată ce proteina este captată, banda longitudinală mai suferă o translație suplimentară de 2 nm, demonstrând detecția specifică și sensibilă a proteinei țintă, și anume streptavidină. Mai mult, simulările teoretice realizate prin metoda FDTD se corelează cu rezultatele obținute experimental.

Complementar la spectroscopia LSPR, s-a folosit tehnica ultrasensibilă de detecție și analiză cantitativă SERS, pentru care AuBPs reprezintă un mare avantaj datorită câmpului electromagnetic amplificat localizat la vârfurile acestora. Spectrele SERS au fost înregistrate înainte și după captarea streptavidinei (Figura III.2.4.(d)). În primul rând, s-a demonstrat prin identificarea benzilor caracteristice ale p-ATP³⁵ și biotinei formarea complexului p-ATP@Biotin-AuBPs. Apoi, după captarea streptavidinei de către nanosistemul biotinitat, se observă modificări semnificative ale spectrului SERS. Modulile vibraționale au fost studiate și atribuite conform Figurii III.2.4.(e).

Mai mult, o analiză cantitativă a performanței SERS a dezvăluit o limită de detecție (LOD) de 10^{-12} M folosind imunosenzorul propus. De asemenea, s-a evaluat LOD prin tehnica LSPR ajungându-se la detectarea unei concentrații de streptavidină de 10^{-7} M.

În mod similar cu SERS, SEIRA este o tehnică care profită de câmpul electromagnetic amplificat caracteristic al nanoparticulelor de aur. Folosind spectroscopia FT-IR, prima dată s-a confirmat legarea p-ATP@biotină de suprafața de aur prin atribuirea frecvențelor vibraționale din spectrul p-ATP@biotină-AuBPs atât moleculei de p-ATP cât și biotinei. Atribuirile sunt susținute de calculul teoretic al spectrului de absorbție FT-IR. Interacțiunea biotină-streptavidină este confirmată apoi de apariția benzilor vibraționale ale grupărilor amidă I și amidă II³⁶. Respectând aceleași condiții experimentale, s-a determinat LOD în SEIRA ca fiind 10^{-12} M concentrație de streptavidină.

³⁵ Baia et al., "Surface-Enhanced Raman Scattering and Density Functional Theoretical Study of Anthranil Adsorbed on Colloidal Silver Particles."

³⁶ M. J. Swamy, T. Heimburg, and D. Marsh, "Fourier-Transform Infrared Spectroscopic Studies on Avidin Secondary Structure and Complexation with Biotin and Biotin-Lipid Assemblies," *Biophysical Journal* 71, no. 2 (August 1, 1996): 840–47, [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(96\)79285-8](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(96)79285-8).

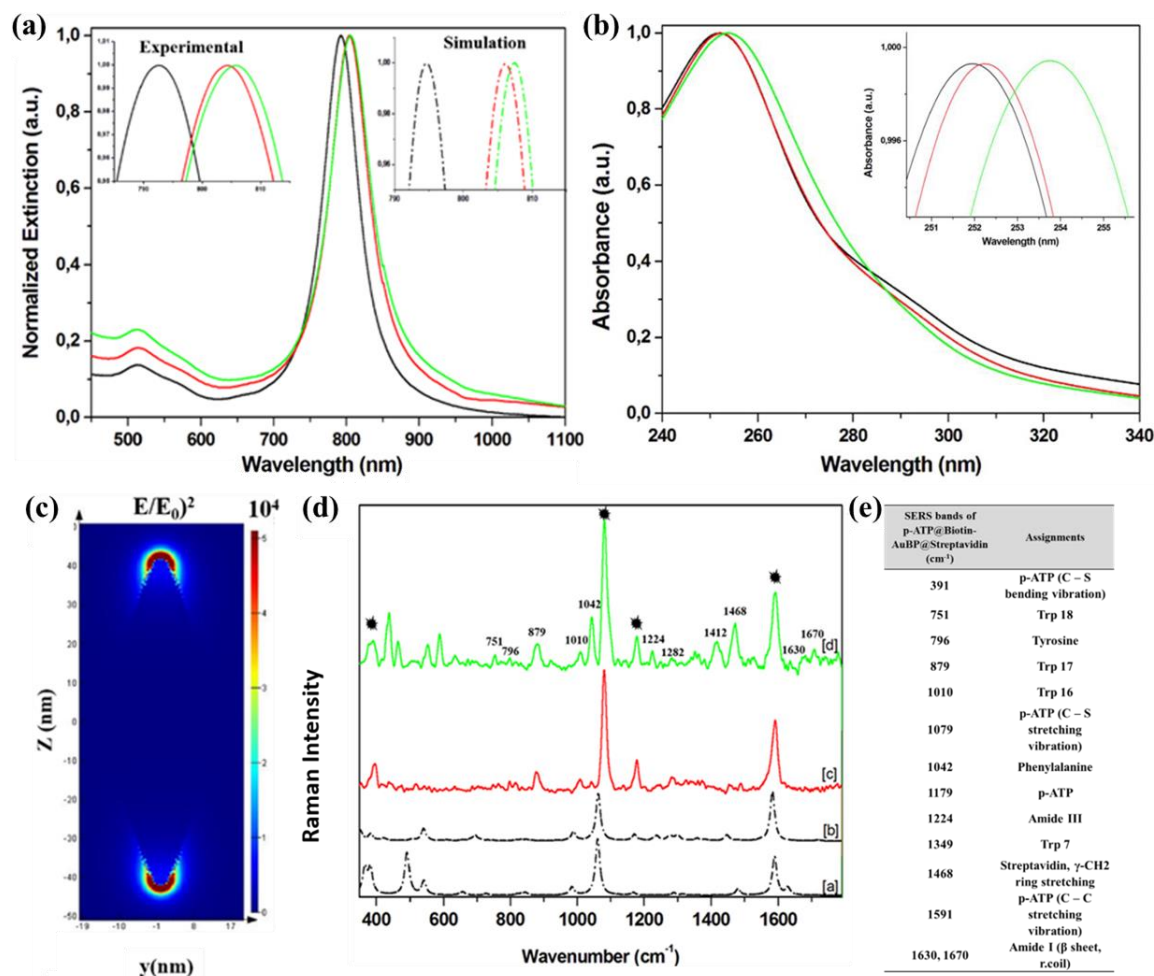


Figura III.2.4. (a) Spectrele de extincție înregistrate după fiecare pas al protocolului de biodetecție. Inserțiile arată mărit spectrele experimentale și simulate FDTD ale AuBPs.; (b) Spectrele de absorbție a p-ATP@Biotină (spectrul negru), p-ATP@Biotină-AuBPs înainte (spectrul roșu) și după (spectrul verde) detecția specifică a streptavidinei; (c) Harta calculată $|E/E_0|^2$ pentru AuBPs selectate expuse la excitație la 785 nm; (d) Spectrele Raman simulate DFT a p-ATP@Au (spectrul a) și p-ATP@Biotină-Au (spectrul b), împreună cu spectrele SERS experimentale obținute pentru p-ATP@Biotină-AuBPs înainte (spectrul c) și după detecția streptavidinei (spectrul d); (e) Atribuirea benzilor SERS importante din spectrul complexului biotină-streptavidină.

III.2.5 Detecția interacțiunii imunologice anti-IgG uman- IgG uman

Pentru a demonstra fezabilitatea imunosenzorului propus în aplicații clinice de diagnostic, acesta a fost implementat pentru a evidenția reacția specifică anti-IgG uman-

IgG uman³⁷. Astfel, prima dată s-au monitorizat răspunsurile optice după fiecare pas al funcționalizării demonstrat prin deplasări succesive ale benzii longitudinale LSPR spre roșu confirmând formarea cu succes a complexului imunologic și validarea AuBPs ca nanosenzori LSPR eficienți și fezabili. În ciuda faptului ca SERS este în general sensibil la primul strat de molecule adsorbite³⁸, în acest caz imunosenzorul propus a fost capabil să detecteze evenimentul biologic anti-IgG uman-IgG uman urmărind modificările survenite în spectrul SERS ca urmare a interacțiunii de recunoaștere. Prin urmare, variația modurilor vibraționale, în special a reziduurilor de Phe, demonstrează detecția specifică a reacției imunologice anti-IgG uman-IgG uman

III.2.6 Concluzii

În concluzie, acest studiu și-a atins scopul de a dezvolta o nouă nanoplatformă multi-modală LSPR-SERS-SEIRA profitând de proprietățile unice ale nanoparticulelor bipiramidale de aur. Fezabilitatea imunosenzorului proiectat a fost demonstrată prin detecția specifică a interacțiunii biotină-streptavidină atingându-se LOD de până la 10^{-12} M. De asemenea, conceptul dezvoltat a fost testat și validat pentru aplicații clinice de diagnostic prin detecția evenimentului biologic reprezentat de interacțiunea imunologică anti-IgG uman-IgG uman.

III.3 Nano-senzor plasmonic pe bază de hârtie pentru detecție multimodală

În acest studiu, ne propunem să proiectăm un concept inovativ de nanosenzor pe bază de hârtie prin implementarea unei abordări ieftine, ușor de utilizat, rapidă și potrivită pentru multiplexare spațială³⁹ de caligrafie în vederea testării detecției multimodale LSPR-SERS-MEF a interacțiunii specifice biotină-streptavidină. O astfel de nanoplatformă pentru biodetecție are putea avea rezultate promițătoare pentru aplicații medicale.

III.3.1 Fabricarea nano-senzorului pe bază de hârtie prin caligrafie plasmonică

Pentru fabricarea nanosenzorului, un pix comercial Schneider cu cartușe goale a fost folosit. Fiecare cartuș a fost umplut cu soluții coloidale de AuBPs. Astfel s-au trasat linii

³⁷ Zhuyuan Wang et al., "SERS-Activated Platforms for Immunoassay: Probes, Encoding Methods, and Applications," *Chemical Reviews* 117, no. 12 (June 28, 2017): 7910–63, <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00027>.

³⁸ Kwan Kim, Hyoung Kun Park, and Nam Hoon Kim, "Silver-Particle-Based Surface-Enhanced Raman Scattering Spectroscopy for Biomolecular Sensing and Recognition," *Langmuir* 22, no. 7 (March 2006): 3421–27, <https://doi.org/10.1021/la052912q>.

³⁹ Limei Tian et al., "Bioplasmonic Calligraphy for Multiplexed Label-Free Biodetection," *Biosensors and Bioelectronics* 59 (September 2014): 208–15, <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.03.043>.

plasmonice izolate spațial pe fâșii de hârtie de filtru Whatman No.1 substratele de hârtie obținute au fost lăsate să se usuce la temperatura camerei. Această procedură a fost repetată de trei ori prin retrasarea liniilor plasmonice și uscare acestora.

III.3.2 Caracterizarea nanoplatformei plasmonice de hârtie

Prima dată, au fost evaluate proprietățile optice ale nanoplatformelor fabricate prin înregistrarea spectrelor acestora de extincția (Figura III.3.2.- spectrele solide). Astfel s-au obținut nanoplatforme cu răspuns optic tunabil: paper@AuBPs 618 cu LSPR la 618 nm (spectrul negru), paper@AuBPs 675 cu LSPR la 675 (spectrul albastru) și paper@AuBPs 800 cu LSPR la 800 nm (spectrul verde), respectiv. Soluțiile coloidale de AuBPs au fost intenționat sintetizate pentru a avea răspuns optic după imobilizare atât în condiție de rezonanță cât și înafara rezonanței cu emisia de fluorescență a complexului streptavidină conjugată cu Alexa 680.

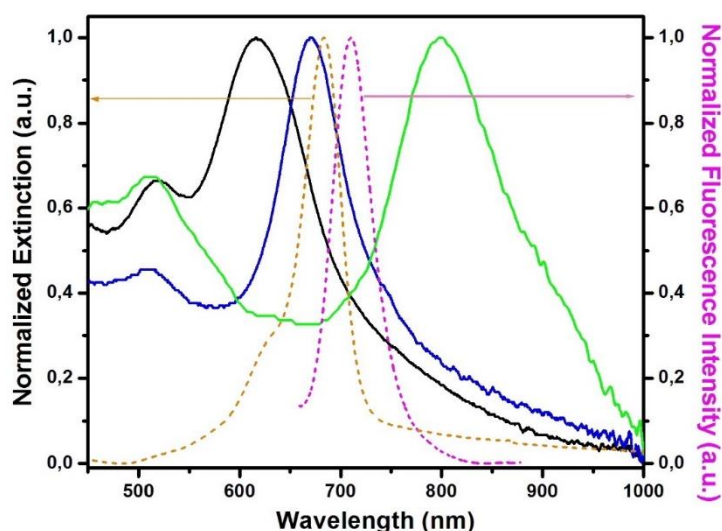


Figura III.3.2. Spectrele de extincție normalizate ale nanoplatformelor plasmonice (spectrele solide) suprapuse cu absorbția (spectrul portocaliu) și emisia de fluorescență (spectrul magenta) a complexului streptavidină@Alexa 680 adsorbită pe hârtie Whatman goală.

Mai departe, pentru a înțelege modalitatea de atașare a AuBPs pe fibrele de celuloză ale hârtiei, morfologia nanoplatformelor a fost investigată. În consecință, substratele plasmonice de hârtie au fost analizate utilizând tehnica SEM demonstrându-se astfel distribuția de AuBPs individuale pe fibrele de celuloză. Folosind HR-TEM, s-a arătat că AuBPs nu suferă nicio modificare de natura morfologică în urma imobilizării. De asemenea, imaginile microscopice HR-TEM permit vizualizarea plaurilor cristalografice ale

nanoparticulelor indicând faptul că AuBPs s-au atașat de fibrele de celuloză prin fețele lor lăsând vârfurile expuse și accesibile grefării analiților de interes.

III.3.3 Optimizarea nanoplatforme plasmonice și evaluare sensibilității

În dezvoltarea de astfel de nanoplatforme plasmonice, eficiența optică a acestora joacă un rol important. De aceea s-a elaborat o strategie de a îmbunătăți încărcarea cu AuBPs a fibrelor de celuloză și implicit de a crește densitatea optică înregistrată. Astfel, metoda de caligrafie plasmonică a fost implementată în repetate rânduri pe aceeași nanoplatformă, iar intensitatea benzii longitudinale LSPR a fost monitorizată. Densitatea optică se saturează după 5-6 retrăsări ale liniilor plasmonice. Mai mult, sensibilitatea bulk a acestora a fost testată prin modificarea RI a mediului înconjurător evaluându-se astfel valori RIS de 83 nm/RIU până 287 nm/RIU.

III.3.4 Protocol de biodetecție

Protocolul de biodetecție propus presupune picurarea succesivă a 1.5 mM p-ATP@Biotină și apoi a 0.25 mg/ml Streptavidină@Alexa 680 (în PBS pH 7.2) pe liniile plasmonice trasate în prealabil pe substratul de hârtie. Odată realizată interacțiunea de recunoaștere moleculară biotină-streptavidină, distanța necesară dintre suprafața metalică și fluorofor devine cea optimă pentru a promova MEF, extinzând astfel capacitățile de detecție ale nanosenzorului fabricat.

III.3.5 Detecție multimodală LSPR-SERS-MEF

Funcționalizarea liniilor plasmonice cu complexul biotină marcată cu p-ATP, ca și element de recunoaștere, a fost confirmată inițial prin spectroscopia UV-Vis-NIR pentru toate cele trei nanoplatforme fabricate prin înregistrarea spectrelor de extincție înainte și după procesul de legare (Figura III.3.5.(a-c)). Modificarea RI indusă de prezența complexului activ generează deplasări ale benzii longitudinale LSPR de 13 până la 17 nm. Mai departe, identificarea specifică a complexului biotinat s-a realizat prin măsurători SERS, care permit diferențierea cu precizie a amprentelor Raman ale moleculelor de interes. Figura III.3.5.(d-f) prezintă spectrele SERS comparative confirmând funcționalizarea cu succes a liniilor plasmonice cu p-ATP@biotină prin identificarea benzilor caracteristice ale fiecărui compus implicat în reacție ⁴⁰.

⁴⁰ Galarreta, Norton, and Lagugné-Labarthe, "SERS Detection of Streptavidin/Biotin Monolayer Assemblies [†]"; Andreea Campu et al., "Gold NanoBipyramids Performing as Highly Sensitive Dual-Modal Optical Immunosensors," *Analytical Chemistry* 90, no. 14 (July 17, 2018): 8567–75, <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b01689>.

Mai mult, după captarea cu succes a proteinei streptavidină, răspunsurile LSPR înregistrează deplasări adiționale de 14 până la 18 nm (Figura III.3.5.(a-c) – spectrele albastre), care confirmă detecția specifică a streptavidinei și, implicit, a interacțiunii anticorp-antigen. Sensibilitatea detecției LSPR a fost evaluată prin determinarea LOD de 0.01 mg/ml pentru nanoplatforma paper@AuBPs 675 selectată.

În plus, spectrele SERS corespunzătoare măsurătorilor LSPR (Figura III.3.5.(d-f) - spectrele albastre) demonstrează încă o dată detecția specifică a complexului streptavidină@Alexa 680. Pe lângă semnalul dominant de fluorescență al fluoroforului Alexa 680, modurile vibraționale ale p-ATP și streptavidinei sunt prezente în toate spectrele SERS. În cazul nanoplatformei paper@AuBPs 800, este observat un semnal mult mai intens al emisiei de fluorescență cauzat de excitarea rezonantă a benzii longitudinale LSPR la 800 nm demonstrând astfel abilitatea platformei de a detecta semnale SERS și MEF simultan.

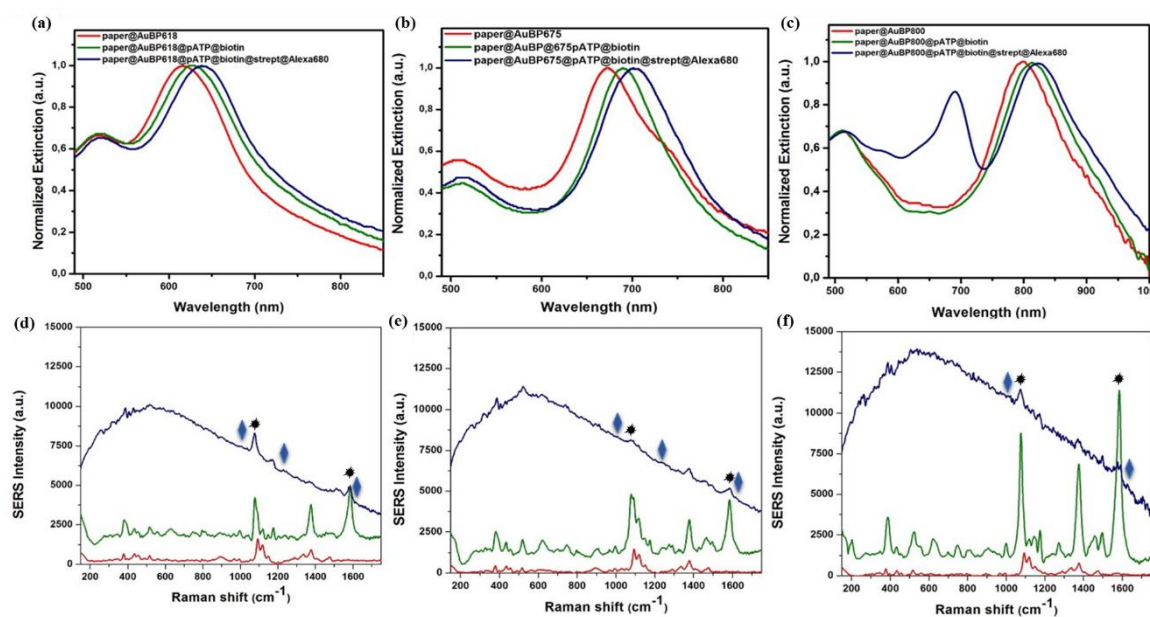


Figura III.3.5. Spectrele de extincție normalizate (a-c) împreună cu spectrele SERS înregistrate (d-f) ale nanoplatformelor plasmonice de hârtie fabricate având răspunsuri plasmonice tunabile (spectrele roșii), după funcționalizarea cu complexul biotinitat (spectrele verzi), și după legarea specifică a streptavidinei (spectrele albastre), demonstrând capacitățile nanoplatformelor de detecție duală LSPR-SERS.

În final, performanța MEF a nanoplatformelor propuse a fost analizată. Emisia de fluorescență a fluoroforului a fost evaluată atât când interacțiunea specifică biotină-streptavidină s-a realizat cât și pe hârtie Whatman simplă în apropierea liniilor plasmonice.

În cazul complexului streptavidină@Alexa 680 pe paper@AuBPs 675 emisia moleculelor Alexa 680 este amplificată de 2 ori comparativ cu emisia de fluorescență a fluoroforului liber adsorbit pe hârtie (lângă liniile plasmonice) utilizând o lungime de undă de excitare de 675 nm, în rezonanță atât cu fluoroforul cât și cu banda plasmonică.

III.3.6 Concluzii

În concluzie, am dezvoltat o nanoplatformă plasmonică pe bază de hârtie inovatoare, flexibilă și tunabilă utilizând tehnica de caligrafie plasmonică, AuBPs jucând rolul de cerneală plasmonică pentru un pix comercial cu care s-au trasat linii plasmonice izolate spațial având răspunsuri LSPR modulabile. Interacțiunea biotină-streptavidină a fost utilizată pentru a demonstra conceptul propus și potențialul acestor nanoplatforme de a fi implementate ca dispozitive eficiente de biodetecție cu capacități de multiplexare LSPR-SERS-MEF.

III.4 Bio-nano-senzor plasmonic integrat în canal microfluidic pentru detecția în flux laminal

Acestă lucrare propune o nouă abordare de fabricare a unui dispozitiv microfluidic robust și ieftin care integrează eficiența de amplificatori a AuBPs cu portabilitatea, sensibilitatea crescută și timpul redus de analiză a măsurătorilor dinamice. Particularitățile sistemului microfluidic plasmonic miniaturizat permit detecția și identificarea analiților de interes în flux laminal cu mare specificitate, acuratețe și eficiență reprezentând astfel un model pentru viitoare dezvoltări ale acestora în vederea unor aplicații mai complexe.

III.4.1 Prepararea substratului plasmonic

Substrate de sticlă disponibile comercial au fost curățate după cum urmează: prima dată au fost imersate în amestec cromic, apă ultrapură și detergent alcalin, apoi au fost uscate la temperatura camerei și tratate UV timp de 30 de minute utilizând sistemul de ozon PSD Pro Series Digital UV. Silanizarea substratelor de sticlă presupune imersia acestora într-o soluție de 10% APTES (în etanol) pentru 1 oră⁴¹. Strategia de depunere a AuBPs propusă prevede picurarea soluției coloidale pe substratul silanizat și lăsarea acestuia peste noapte la temperatura camerei pentru a se atașa de substratul funcționalizat.

⁴¹ Seunghyun Lee, Kathryn M. Mayer, and Jason H. Hafner, "Improved Localized Surface Plasmon Resonance Immunoassay with Gold Bipyramid Substrates," *Analytical Chemistry* 81, no. 11 (June 1, 2009): 4450–55, <https://doi.org/10.1021/ac900276n>.

III.4.2 Caracterizarea optică și morfologică a substratului plasmonic

După depunerea AuBPs, morfologia substratelor plasmonice glass@AuBPs obținute a fost investigată precum și proprietățile acestora optice. Imaginile microscopice SEM indică o acoperire omogenă a substratului de sticlă. În plus, se observă că AuBPs se atașează în două conformații: ca nanoparticule individuale având forme bine definite și asamblate în lanțuri scurte de AuBPs. Observațiile morfologice sunt susținute de rezultatele optice. În spectrele de extincție se disting trei răspunsuri optice: o bandă la 515 nm atribuită răspunsului optic transversal, o bandă îngustă la 685 nm asociată benzii LSPR longitudinale ale AuBPs și o nouă bandă la 825 nm apărută datorită cuplajului plasmonic dintre AuBPs indicând o auto-aranjare de tip „end-to-end” confirmată și prin simulări numerice.

III.4.3 Sensibilitatea de indice de refracție *bulk* a substratului plasmonic

Capacitățile de detecție LSPR au fost evaluate prin determinarea *bulk* RIS a glass@AuBPs. Odată cu creșterea RI se înregistrează deplasări tot mai mari atât ale benzii longitudinale ale AuBPs individuale cât și a răspunsului optic atribuit AuBPs auto-asamblate. Astfel, s-au determinat următoarele valori ale RIS: 243 nm/RIU pentru nanoparticulele individuale și 150 nm/RIU pentru cuplajul plasmonic.

III.4.4 Fabricarea canalului microfluidic și integrarea substratului plasmonic

Pentru fabricarea de canale microfluidice s-a utilizat tehnica de modelare după o replică dezvoltată și raportată în grup ⁴². Pe o replică negativă a canalelor microfluidice s-a turnat un amestec în raport de 10:1 format din elastomerul transparent PDMS și agentul de conservare. Sistemul obținut a fost tratat termic pentru 1 oră la 65 °C. La final, canalele microfluidice au fost dezlipite de pe replică și tratate în plasmă împreună cu substratele plasmonice pentru a fi mai apoi aduse în contact în vederea formării unei legături permanente ⁴³ și, implicit, a integrării elementului plasmonic în dispozitivul microfluidic.

⁴² Monica Iosin et al., “Laser Microstructuring of Three-Dimensional Enzyme Reactors in Microfluidic Channels,” *Microfluidics and Nanofluidics* 10, no. 3 (March 1, 2011): 685–90, <https://doi.org/10.1007/s10404-010-0698-9>; Monica Focsan et al., “Two-Photon Fabrication of Three-Dimensional Silver Microstructures in Microfluidic Channels for Volumetric Surface-Enhanced Raman Scattering Detection,” *Optical Materials Express* 6, no. 5 (May 1, 2016): 1587–93, <https://doi.org/10.1364/OME.6.001587>.

⁴³ Alex Y. N. Hui et al., “Microwave Plasma Treatment of Polymer Surface for Irreversible Sealing of Microfluidic Devices,” *Lab on a Chip* 5, no. 10 (October 2005): 1173–77, <https://doi.org/10.1039/b504271b>; Liangcai Xiong, Peng Chen, and Quansheng Zhou, “Adhesion Promotion between PDMS and Glass by Oxygen Plasma Pre-Treatment,” *Journal of Adhesion Science and Technology* 28, no. 11 (June 3, 2014): 1046–54, <https://doi.org/10.1080/01694243.2014.883774>.

III.4.5 Detecție duală LSPR/SERS în flux laminal

Eficiența detecției duale LSPR-SERS în flux laminal flow a dispozitivului microfluidic plasmonic integrat a fost evaluată folosind molecula de p-ATP⁴⁴ și un sistem Raman portabil cu excitație a 785 nm. Astfel, o soluție de 10⁻⁶ M p-ATP a fost injectată în microcanal, iar odată cu pornirea fluxului continuu s-au înregistrat prima dată spectrele LSPR. În urma detecției moleculei țintă, răspunsul longitudinal LSPR suferă o deplasare de 18 nm spre roșu, în timp ce banda atribuită cuplajului plasmonic se deplasează 9 nm spre roșu confirmând împreună detecția LSPR a p-ATP-ului. Identificarea reporterului Raman s-a realizat în același punct de măsurare prin SERS, astfel obținându-se amprenta Raman a p-ATP-ului și, implicit, demonstrându-se capacitățile de detecție volumetrică SERS. Mai mult, s-a evaluat performanța SERS prin determinarea valorii LOD de 10⁻¹⁴ M, dovedind sensibilitatea de detecție foarte mare a dispozitivului dezvoltat.

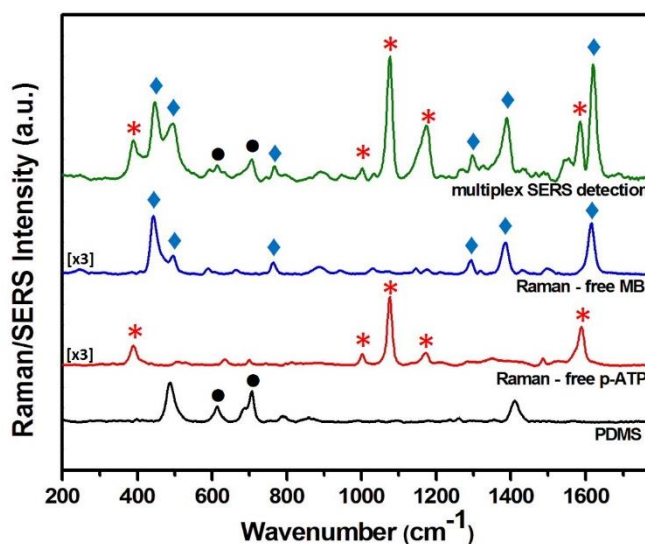


Figura III.4.5. Raman spectra of PDMS (black spectrum), free p-ATP (red spectrum) and Methley blue (blue spectrum) together with SERS spectrum of multiplex analytes inside the as-designed plasmonic device.

Ținând cont de capacitățile de detecție ale dispozitivului microfluidic plasmonic integrat, aria de aplicabilitate a fost extinsă prin detecția multiplexă SERS a doi analiți de interes simultan, în mod specific p-ATP și albastru de metilenă (MB). [Figura III.4.5.](#) prezintă spectrele Raman obținute pe p-ATP și MB pudră în comparație cu spectrele SERS

⁴⁴ M. Baia et al., "Probing the Enhancement Mechanisms of SERS with P-Aminothiophenol Molecules Adsorbed on Self-Assembled Gold Colloidal Nanoparticles," *Chemical Physics Letters* 422, no. 1-3 (April 2006): 127-32, <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2006.02.054>.

înregistrate înăuntrul chipului microfluidic după ce am fost injectate. Astfel, prezența simultană a multiple amprente a fost validată prin distingerea eficientă a două molecule grefate simultan pe suprafața metalică.

III.4.6 Concluzii

În concluzie, acest studiu raportează o metodă inovativă de fabricare a unui dispozitiv microfluidic miniaturizat și portabil având integrat transductori plasmonici care permit analiza rapidă a unor probe cu volum redus. AuBPs -ca nanoantene eficiente, au fost depuse pe un substrat de sticlă silanizat și apoi integrate în canalul microfluidic permitând astfel detecția „online” și identificare moleculei de p-ATP în flux laminar. În SERS s-a determinat o limita de detecție de 10^{-14} M și s-au demonstrat apoi capacitățile de detecție multiplexă prin identificarea simultană a două molecule de interes.

Capitol IV. Aplicații terapeutice ale bipiramidelor de aur

IV.1 Introducere

Nanoparticulele de aur au atras multă atenție recent datorită potențialului acestora de a opera ca agenți terapeutici ținând cont de proprietățile unice optice ale acestora, în mod specific LSPR, care poate fi modulată după necesități fiind dependent de forma și dimensiunea nanostructurilor. Nanoparticulele cu absorbante în domeniul NIR sunt de interes deoarece: (i) în NIR țesuturile sunt transparente optic asigurând o penetrare mai adâncă și (ii) nanoparticulele prezintă proprietăți de absorbție/împrăștiere a luminii mai bune. AuBPs prezintă caracteristici optice atractive permițând modularea răspunsului LSPR pe întreg spectrul electromagnetic din domeniu vizibil până în NIR precum și având proprietăți non-radiative intrinseci.

IV.2 Proprietăți terapeutice intrinseci

Recent, proprietățile optice ale AuBPs au fost exploatate și implementate în nano-sisteme terapeutice, astfel, validându-le ca agenți terapeutici robusți ⁴⁵. Pentru a folosi aceste proprietăți în avantajul nostru, este imperativ să le înțelegem principiile fundamentale. Astfel, o caracterizare riguroasă a AuBPs din punctul de vedere al abilităților fototermice și fotodinamice intrinseci este necesară, și, conform cunoștințelor noastre, lipsește din literatura de specialitate.

IV.2.1 Proprietăți fototermice și eficiențe de conversie

Scopul acestui studiu este de a determina abilitățile fototermice intrinseci ale AuBPs, astfel, s-a realizat o analiză meticuloasă și o evaluare a proprietăților fototermice a AuBPs coloidale cu diferite rapoarte de aspect.

Soluțiile de AuBPs au fost iradiate cu două surse laser (785 și 808 nm) pentru 30 minute timp în care s-au înregistrat imagini termografice. Pe baza imaginilor termice obținute s-au extras temperaturile (T) atinse la fiecare minut. Pentru a determina contribuția termică a AuBPs, din T înregistrat s-a scăzut temperatura ambientală (T_{env}). Diferența de temperatură s-a (ΔT) a fost reprezentată ca funcție de timp. **Figura IV.2.1.(a) și (c)** prezintă

⁴⁵ Jie Feng et al., "Bioconjugation of Gold Nanobipyramids for SERS Detection and Targeted Photothermal Therapy in Breast Cancer," *ACS Biomaterials Science & Engineering* 3, no. 4 (April 10, 2017): 608–18, <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.7b00021>; Jung-Hoon Lee et al., "Plasmonic Photothermal Gold Bipyramid Nanoreactors for Ultrafast Real-Time Bioassays," *Journal of the American Chemical Society* 139, no. 24 (June 21, 2017): 8054–57, <https://doi.org/10.1021/jacs.7b01779>; Shuang Zhao et al., "High and Low Molecular Weight Hyaluronic Acid-Coated Gold Nanobipyramids for Photothermal Therapy," *RSC Advances* 8, no. 16 (2018): 9023–30, <https://doi.org/10.1039/C7RA11667E>.

curbele termice abținute în urma fitării exponențiale conform modelului teoretic descris de ecuația de echilibru energetic a datelor experimentale. Astfel, se observă că toate probele se încălzesc și ating saturația după 14-15 minute în cazul ambelor surse de iradiere. Pentru laserul 785 nm, ΔT variază între 5 și 18°C (Figura IV.2.1.(a)), în timp ce pentru laserul 808 nm, ΔT variază între 4 și 25°C.

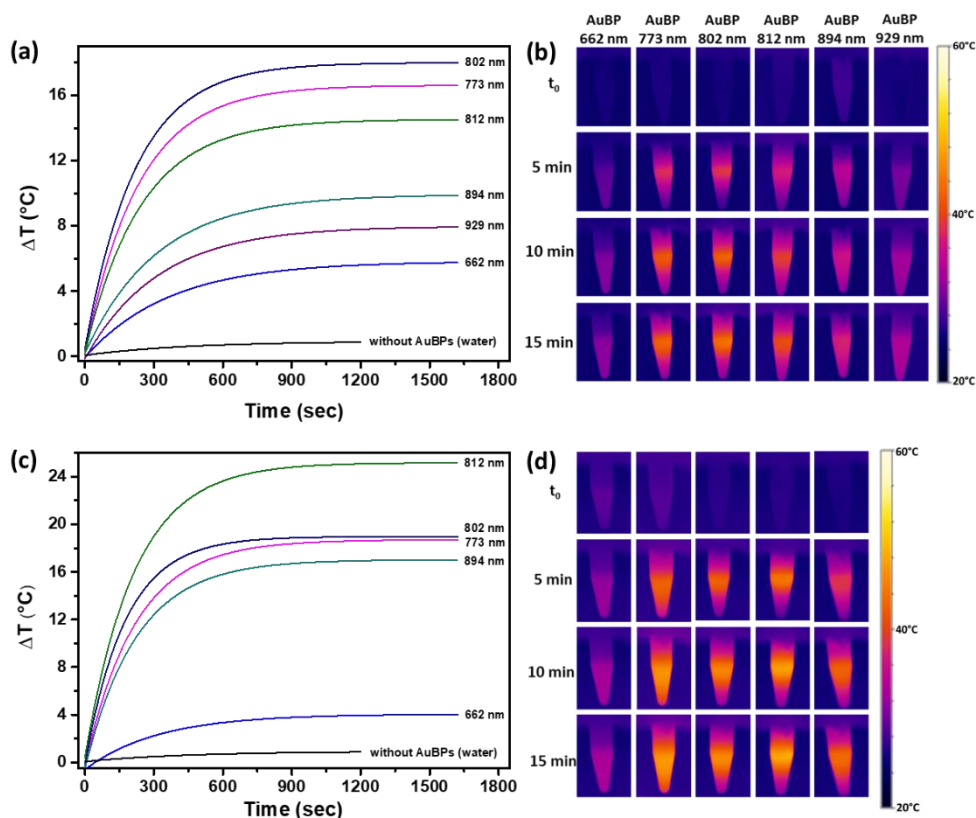


Figura IV.2.1. Curbele termice fitate a AuBPs obținute în urma iradierii cu laserul 785 nm (a) și 808 nm (c) și imaginile termografice corespunzătoare (b) și (d).

Mai mult, curbele termice sunt susținute de imaginile termografice înregistrate în timpul expunerilor la laserii 785 și 808 nm (Figura IV.2.1.(b) și (d)). Astfel, AuBPs 802 se încălzesc cel mai bine atunci când sunt expuse laserului 785 nm, în timp ce AuBPs 812 convertesc cel mai bine lumina în temperatură sub excitația la 808 nm.

Mai departe, sistemele coloidale au fost supuse la 4 cicluri de iradiere On/OFF demonstrând că de fiecare dată AuBPs ating aceeași T_{max} , indicând o mare reproductibilitate a rezultatelor obținute. Stabilitatea nanoparticulelor este dovedită prin preservarea răspunsului optic chiar și după 24 de ore de la iradiere.

Potențialul de conversie termică al nanoparticulelor este evaluat prin determinarea eficienței de conversie fototermică (η). Eficiențele de conversie fototermică calculate

variază între 40 și 97 %. Concret, AuBPs cu LSPR la 802 nm exprimă η de 97% pentru laserul 785 nm, iar în cazul fotoexcitării la 808 nm, AuBPs cu răspuns optic la 812 nm ating η de 74 %.

Pentru a optimiza condițiile experimentale, comportamentul termic a fost monitorizat atunci când densitatea optică, volumul probei și puterea laserului au fost modificate pe rând. Procesul de conersie termică este mai accelerat atunci când probele sunt mai concentrate sau au un volum mai mic. Mai mult, s-a observat ca odată cu creșterea puterii incidente a laserului temperatura maximă atinsă crește.

Mai mult, AuBPs au fost supuse unor teste de stabilitate în condiții relevante biologic astfel fiind validate ca potențiali agenți terapeutici.

IV.2.2 Generare de oxigen singlet

În această parte, proprietățile fotodinamice intrinseci ale AuBPs au fost studiate. În mod specific, s-a evaluat abilitatea acestora de a transfera electroni la mediul înconjurător în timpul expunerii la o sursă externă de excitare având ca scop inducerea unor reacții fotochimice de generare de ROS toxici, ex. $^1\text{O}_2$ format în urma transferului de electroni de la un donor la oxygenul molecular ⁴⁶. Din spectrele de extincție înregistrate s-au extras absorbanțele benzii ABDA localizate la 380 nm urmând a fi reprezentate în funcție de timp. Astfel, la expunerea unei excitații de 785 nm, cele mai eficiente AuBPs sunt cele cu răspuns optic la 804 nm generând o scădere de 30 % a intensității absorbantei ABDA, în timp ce AuBPs cu LSPR la 815 nm induce o scădere de 32 % pentru laserul 808 nm. Astfel, aceste nanoparticule de aur sunt dovedite a fi generatori eficienți de ROS și, implicit, a avea potențial de agenți terapeutici PDT.

IV.2.3 Concluzii

În concluzie, acest studiu reprezintă o analiză sistemică a proprietăților fototermice și fotodinamice ale AuBPs cu diferite rapoarte de aspect la expunerea la două surse laser din domeniul NIR. Considerând caracteristicile de absorbție ale sistemelor, acestea prezintă toate activitate PTT și PDT. Cele mai eficiente sisteme sunt însă AuBPs cu LSPR la 802 nm cu $\eta_{802} = 97\%$ și scădere a intensității absorbției ABDA de 30 % pentru laserul 785 nm și AuBPs cu LSPR la 812 nm cu $\eta_{812} = 74\%$ și 32 % reducere a cantității de ABDA.

⁴⁶ Reinhard Schmidt, "Photosensitized Generation of Singlet Oxygen," *Photochemistry and Photobiology* 82, no. 5 (April 30, 2007): 1161–77, <https://doi.org/10.1562/2006-03-03-IR-833>.

IV.3 Nano-bipiramide de aur încărcate cu ICG cu potențial terapeutic activabil în NIR pentru terapia duală PTT-PDT

Această lucrare are scopul de a integra activitățile terapeutice a două biomateriale fotoactive în NIR într-un singur sistem hibrid care operează ca agent dual PTT-PDT cu eficiență amplificată. Un astfel de sistem bazat pe AuBPs a fost dezvoltat și validat pentru terapia duală PTT-PDT atât în soluție cât și *in vitro* utilizând linia celulară B16-F10.

IV.3.1 Protocol de bio-compatibilizare și încapsulare a ICG-ului

Pentru a îmbunătăți biocompatibilitatea AuBPs sintetizate, acestea au fost funcționalizate cu acid polilactic. În acest context, o soluție stock de 1% PLA a fost preparată și adăugată peste AuBPs cu un raport de volum de AuBPs:PLA=1:10. În urma separării de fază, AuBPs@PLA au fost recuperate. Îmbrăcarea în biopolimer a fost confirmată prin înregistrarea spectrului de extincție observându-se o deplasare de 8 nm spre albastru a benzii longitudinale LSPR. Mai mult, prin determinarea diametrului hidrodinamic înainte și după îmbrăcarea cu PLA, procesul de funcționalizare a fost confirmat.

Cu scopul de a amplifica performanțele terapeutice intrinseci ale AuBPs, s-a incorporat fotosensibilizatorul ICG, care este cunoscut a prezenta proprietăți PTT și PDT: Pentru incorporare, o soluție metanolică de 1 mg/ml ICG a fost pregătită și adăugată peste AuBPs@PLA, demonstrându-se o eficiență de încapsulare de 41%. Incorporarea ICG-ului a fost demonstrată prin spectroscopia de absorbție.

IV.3.2 Proprietăți fototermice și fotodinamice în soluție

După fabricarea nanosistemului hibrid AuBPs@PLA@ICG, proprietățile acestuia PTT și PDT au fost evaluate în soluție și comparate cu performanțele AuBPs singure (Figura IV.3.2.). În cazul AuBPs, temperatura mediului este crescută până la 17°C, după ce au fost funcționalizate cu ICG, sistemul se încălzește cu încă 2°C atribuite contribuției fotosensibilizatorului. De asemenea, stabilitatea termică este verificată constatându-se o reproductibilitate bună a comportamentului termic.

În mod similar, capacitățile de generare a $^1\text{O}_2$ de către sistemul dezvoltat au fost evaluate în funcție de proprietățile PDT intrinseci ale AuBPs (Figura IV.3.2.(c)). AuBPs@PLA@ICG scade absorbția ABDA cu 60% sugerând că ICG-ul este responsabil pentru dublarea cantității de $^1\text{O}_2$ produs. Mai mult, s-au calculat eficiența de conversie

fototermică (η) și randamentul cuantic de oxigen singlet ($\Phi(^1O_2)$). Efectul cumulat al nanosistemului hibrid a generat o eficiență termică de 76 %, în timp ce randamentul cuantic de 1O_2 a fost evaluat ca fiind 0.297 pentru lungimea de undă excitatoare de 785 nm.

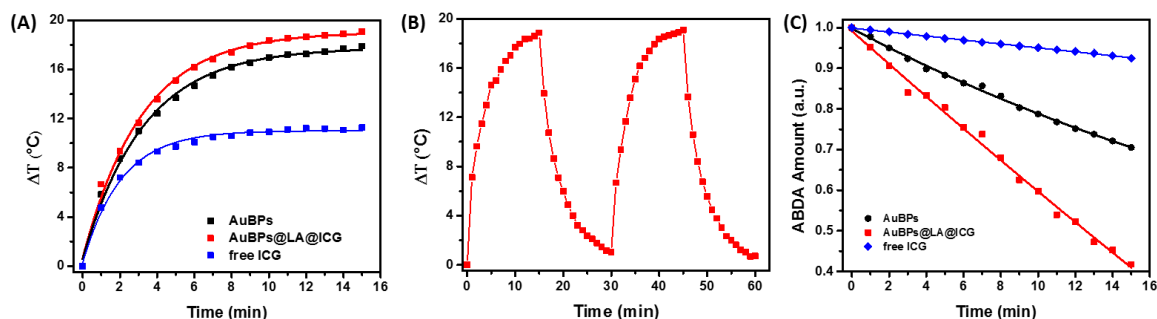


Figura IV.3.2. (a) Curbele termice obținute în urma fitării exponențiale, (b) curbele termice obținute pentru AuBPs@PLA@ICG în urma a două cicluri laser și (c) reprezentarea grafică a curbelor PDT.

IV.3.3 Validare *in vitro* a terapiei duale PTT-PDT

Acest studiu are ca scop evaluarea eficienței nanosistemului hibrid în tratamentul cancerului de piele, analiza *in vitro* fiind realizată pe o linie celulară de melanom epitelial (B16-F10). Pentru a ținti specific aceste celule canceroase, AuBPs@PLA@ICG a fost funcționalizat cu acid folic (FA) activat cu NHS-EDC. FA a fost selectat deoarece linia celulară B16-F10 exprimă pe membrană receptori de folat, astfel fiind susceptibile la FA.. Prin urmare, AuBPs@PLA@ICG au fost funcționalizate cu FA activat cu EDC-NHS reprezentând elementul de recunoaștere celulară ⁴⁷ pentru utilizarea ulterioară în experimentele *in vitro*. Conjugarea cu FA a fost confirmată prin deplasarea cu 4 nm spre roșu a benzii longitudinale LSPR.

Biocompatibilitatea sistemului hibrid a fost investigată folosind un test WST-1. AuBPs s-au dovedit a fi toxice în concentrații mai mari de 63 μ M, în timp ce, după funcționalizările cu PLA, ICG și FA, nanosistemul prezintă limită de concentrație de inhibiție (IC50) de 84 μ M. Datorită proprietății AuBPs de a împrăști lumină eficient, internalizarea sistemului a fost pusă în evidență prin microscopia de câmp întunecat (Figura IV.3.3.(a) and (b)).

⁴⁷ Ronak H. Patel et al., "Multifunctionality of Indocyanine Green-Loaded Biodegradable Nanoparticles for Enhanced Optical Imaging and Hyperthermia Intervention of Cancer," *Journal of Biomedical Optics* 17, no. 4 (April 2012): 046003, <https://doi.org/10.1117/1.JBO.17.4.046003>.

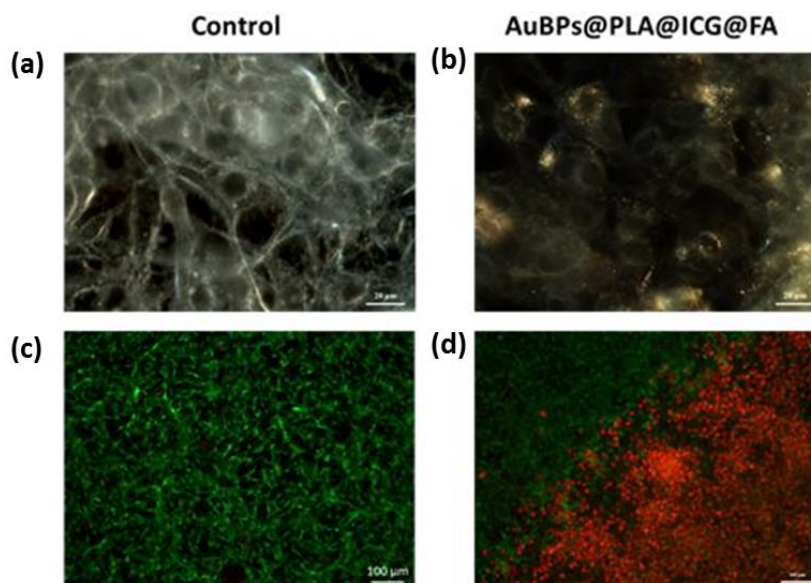


Figura IV.3.3. (a),(b) Imagini de microscopie în câmp întunecat a celulelor control și a celulelor tratate cu AuBPs@PLA@ICG@FA treated cells înainte de expunerea la laser și (c),(d) imagini de microscopie de fluorescență ale acestora după iradiere.

Mai departe, vizualizarea efectului terapeutic a fost asigurată atât pentru proba control cât și pentru proba tratată după iradiere prin colorarea cu: calceină (culoarea verde) a celulelor vii și iodura de propidiu (culoarea roșie) a celulelor moarte. [Figura IV.3.3.\(c\)](#) arată proba control după iradiere, indicând faptul că expunerea la laser nu a avut efect antitumoral sesizabil prezentând doar colorația verde a celulelor vii. Contrar, celulele B16-F10 tratate cu 42 μM AuBPs@PLA@ICG@FA pentru 24 de ore și iradiate prezintă o eficiența antitumorală mai mare de 90%, după cum se poate vedea în [Figura IV.3.3.\(d\)](#) în partea dreaptă jos apar preponderent celule marcate cu roșu.

IV.3.4 Concluzii

Pentru a concluziona, aceasta lucrare propune dezvoltarea unui nanosistem hibrid eficient bazat pe AuBPs cu performanțe fototermice și fotodinamice amplificate pentru terapia duală PTT-PDT. Cele mai eficiente AuBPs din puncte de vedere al proprietăților PTT și PDT au fost biocompatibilizate cu PLA. În urma funcționării cu fotosensibilizatorul ICG, performanțele sistemului obținut au fost amplificate: creștere adițională în temperatură cu 2°C și dublarea cantității de $^1\text{O}_2$ generat. Prin conjugarea cu FA, s-a asigurat internalizarea cu succes a nanosistemului hibrid de către linia celulară de melanom epitelial B16-F10 utilizată pentru validarea *in vitro* a terapiei duale PTT-PDT contribuind astfel la progresul nanotehnologiilor pentru tratamentul eficient al cancerului.

Capitol V. Concluzii Finale și Perspective

V.1 Concluzii finale

Această teză de doctorat a avut ca scop investigarea și demonstrarea fezibilității nanoparticulelor bipiramidale de aur de a fi integrate cu succes în dezvoltarea unor nanosisteme hibride cu proprietăți amplificate încurajând astfel implementarea acestora în diferite aplicații medicale de interes.

În acest context, principalele concluzii sunt:

- Am reușit să sintetizăm cu mare reproductibilitate și precizie AuBPs coloidale cu răspuns optic modulabil de la 600 la 1200 nm prezentând benzi LSPR înguste, valori mari ale RIS și FOM, monodispersitate ridicată, și reactivitate chimică a suprafeței.
- Am marcat cu succes moleculele de biotină cu bine-cunoscutul reporter Raman, p-aminotiofenol, astfel obținându-se un sistem biotinitat care îndeplinește mai multe funcții esențiale: i) element de recunoaștere, ii) etichetă Raman, iii) agent de legătură cu suprafața de aur, și iv) asigură distanța pentru MEF.
- Sensibilitățile LSPR și SERS ale AuBPs cu rapoarte de aspect diferite au fost investigate demonstrându-se că AuBPs cu LSPR la 793 nm sunt cele mai eficiente în configurația experimentală utilizată.
- Capacitățile de detecție multimodală prin LSPR-SERS-SEIRA a AuBPs în soluție apoasă au fost demonstrată cu ajutorul interacțiunii de recunoaștere biotină-streptavidină. Limitele de detecție au fost determinate pentru LSPR 10^{-7} M, în timp ce pentru SERS și SEIRA s-a atins concentrația de 10^{-12} M. Pentru a valida senzorul imunologic, interacțiunea IgG uman-anti-IgG uman a fost evidențiată cu succes prin detecție duală LSPR-SERS.
- O nouă nanoplatformă plasmonică pe bază de hârtie a fost dezvoltată prin metoda inovativă de caligrafie plasmonică. Acest model a fost demonstrat a avea capacități de detecție multiplexă datorită fabricării de linii plasmonice izolate spațial. În plus față de detecția LSPR și SERS, moleculele implicate în evenimentul biologic au fost puse în evidență prin detecția MEF, astfel emisia de fluorescență a Alexa 680 a fost amplificată de 2.05 ori atunci când interacțiunea de recunoaștere a fost realizată.
- Am integrat cu succes AuBPs prin depunerea acestora pe un substrat solid de sticlă într-un dispozitiv microfluidic pentru detecția duală LSPR-SERS a moleculelor de interes în flux laminal. Pentru configurația propusă s-a determinat o limită de detecție SERS

de 10^{-14} M, iar abilitatea de detecție multiplexă a fost demonstrată prin identificarea simultană a doi analiți de interes.

- Proprietățile fototermice intrinseci ale AuBPs cu diferite rapoarte de aspect au fost demonstrate pentru două surse laser cu lungime de undă în domeniul NIR, astfel determinându-se eficiențe de conversie fototermică cu valori între 40 și 97%.

- Activitatea fotodinamică intrinsecă a AuBPs a fost demonstrată prin monitorizarea absorbantei unei molecule senzor de $^1\text{O}_2$ (ABDA) în timpul iradierii cu cele două lasere. Astfel, s-a determinat o scădere de 30 % ABDA pentru cele mai eficiente AuBPs.

- Cele mai eficiente AuBPs în ceea ce privește activitatea PTT și PDT au fost ulterior funcționalizate cu acid polilactic crescându-le astfel biocompatibilitatea și permitând incorporarea fotosensibilizatorului indocianină verde (ICG) în matricea biopolimerică.

- Fotoexcitarea simultană a AuBPs și ICG a rezultat în creșterea performanței PTT cu 4%, în timp ce randamentul cuantic de generare a $^1\text{O}_2$ a fost determinat 0.3. Astfel, s-a demonstrat abilitatea AuBPs de a amplifica performanța PTT și PDT a ICG-ului.

- Nanosistemul hibrid a fost validat prin evaluarea simultană și duală a terapiilor PTT-PDT utilizând o linie celulară de melanom epitelial.

Toate rezultatele obținute încurajează utilizarea AuBPs în dezvoltarea unor dispozitive de detecție inovative eficiente, ieftine, rapide, portabile și miniaturizate precum și implementarea acestora în modele de sisteme terapeutice pentru terapiile PTT-PDT localizate, eficiente și minim invazive.

V.2 Perspective

Considerând proprietățile impresionante ale AuBPs, acestea prezintă abilități și capacități care merită exploatate mai departe în diferite domenii de aplicabilitate. Câteva direcții de cercetare sunt vizate ca perspective de lucru bazându-ne pe rezultatele obținute până acum:

- O viitoare traiectorie profită de abilitatea AuBPs de a opera ca (nano)antene optice active și propune implementarea acestora în dezvoltarea unui sistem de citire duală care furnizează informații calitative și cantitative pentru detecția de pesticide cum ar fi malationul, care afectează sistemul nervos provocând probleme severe de sănătate.

- Următorul obiectiv propus ar fi să îmbunătățim nanoplatforma plasmonică pe bază de hârtie prin atribuirea mai multor funcționalități liniilor plasmonice trasate pe hârtie utilizând molecule precum aptamerii, care prezintă specificitate crescută față de analiți de interes, astfel contribuind la progresul nanotehnologiilor prin dezvoltarea de dispozitive inovative personalizate pentru detecție rapidă.
- Exploatarea proprietăților PTT și/sau PDT intrinseci ale bipiramidelor de aur poate dezvălui o cale spre dezvoltarea unor dispozitive cu proprietăți de auto-curățare și auto-sterilizare prin simpla expunere a AuBPs integrate la o sursă de lumină.

Diseminarea rezultatelor

Lista publicațiilor rezultate din teza de doctorat

Articole publicate in reviste ISI

“ICG-loaded gold bipyramids towards their near-infrared PTT-PDT synergistic therapeutic potential in epithelial melanoma cells”

A. Campu, M. Focsan, F. Lerouge, R. Borlan, L. Tie, D. O. Rugina, S. Astilean.

Colloids and Surfaces B:Biointerfaces Journal, 2020, 194, 111213

DOI: 10.1016/j.colsurfb.2020.111213.

Factor de impact 4.389, Scor de influență 0.682.

“Microfluidic Platform for Integrated Plasmonic Dual Detection”

A. Campu, F. Lerouge, A. M. Craciun, T. Murariu, I. Turcu, S. Astilean, M. Focsan.

Nanotechnology, 2020, 31, 335502 DOI: 10.1088/1361-6528/ab8e72.

Factor de impact 3.551, Scor de influență 0.706.

“Assessment of the Photothermal Conversion Efficiencies of Tunable Gold Bipyramids under Irradiation by Two Laser Lines in NIR Biological Window”

A. Campu, A. M. Craciun, M. Focsan, S. Astilean.

Nanotechnology, 2019, 30, 405701 DOI: 10.1088/1361-6528/ab2d90.

Factor de impact 3.551, Scor de influență 0.706.

“Multimodal Biosensing on Paper-Based Platform Fabricated by Plasmonic Calligraphy Using Gold Nanobipyramids Ink”

A. Campu, L. Susu, F. Orzan, D. Maniu, A.M. Craciun, A. Vulpoi, L. Roiban, M. Focsan, S. Astilean.

Frontiers in Chemistry, 2019, V. 7, 55; DOI: 10.3389/fchem.2019.00055.

Factor de impact 3.693, Scor de influență 0.869.

Diseminarea rezultatelor

"Gold NanoBipyramids Performing as Highly Sensitive Dual-Modal Optical Immunosensors"

A. Campu, F. Lerouge, D. Chateau, F. Chaput, P. Baldeck, S. Parola, D. Maniu, A.M. Craciun, A. Vulpoi, S. Simion, M. Focsan.

Analytical Chemistry, 2018, V.90, P. 8567-8575; DOI: 10.1021/acs.analchem.8b01689.

Factor de impact 6.35, Scor de influență 1.348

Manuscrise în pregătire

"Gold Nanobipyramid-based SEIRA Immunosensor"

A. Campu et al.

Alte Publicații

Articole publicate în reviste ISI

"Versatile Polypeptide-Functionalized Plasmonic Paper as Synergistic Biocompatible and Antimicrobial Nanoplatfom"

L. Tie, M. Răileanu, M. Bacalum, I. Codita, S. M. Negrea, C. S. Caracoti, E.-C. Drăgulescu, **A. Campu**, S. Astilean and M. Focsan.

Molecules, 2020, 25(14), 3182 DOI: 10.3390/molecules25143182.

Factor de impact 3.267, Scor de influență 0.601.

"Calligraphed Selective Plasmonic Array on Paper Platform for Complementary Dual Optical "ON/OFF Switch" Sensing"

L. Susu, **A. Campu**, S. Astilean, M. Focsan.

Nanomaterials, 2020, 10(6), 1025 DOI: 10.3390/nano10061025.

Factor de impact 4.324, Scor de influență 0.671.

"Controlling the End-To-End Assembly of Gold Nanorods to Enhance the Plasmonic Response in Near Infrared"

L. Tie, M. Focsan, J. Bosson, C. Tira, **A. Campu**, A. Vulpoi, S. Astilean.

Materials Research Express, 2019, 6, 095038 DOI: 10.1088/2053-1591/ab2eb0.

Factor de impact 1.929, Scor de influență 0.229.

Diseminarea rezultatelor

"Designing Efficient Low-Cost Paper-Based Sensing Plasmonic Nanoplatfoms"

L. Susu*, **A. Campu***, A.M. Craciun, A. Vulpoi, S. Astilean, M. Focsan. (* These authors contributed equally to this work.)

Sensors, 2018, V. 18, 3035; DOI: 10.3390/s18093035.

Factor de impact 3.031, Scor de influență 0.517.

"A simple and efficient design to improve the detection of biotin-streptavidin interaction with plasmonic nanobiosensors"

M. Focsan, **A. Campu**, C. Leordean, M. Potara, A. Gabudean, D. Maniu, S. Astilean.

Biosensors and Bioelectronics, 2016, V.86, P. 728-735; DOI: 10.1016/j.bios.2016.07.054.

Factor de impact 7.78, Scor de influență 1.178.

Articole publicate în reviste non-ISI

"Engineered Paper Platform loaded with Gold Nanospheres to improve SERS Performance for Analyte Detection"

F. Orzan, **A. Campu**, S. Suarasan, S. Astilean, M. Focsan.

Studia UBB Physica, 2018, V. 63, 1-2, 143-152; DOI: 10.24193/subbphys.2018.15.

Factor de impact -, Scor de influență -.

Capitole de carte publicate în reviste ISI

"Chapter 8. Advanced nanostructures for microbial contaminants detection by means of spectroscopic methods"

M. Potara*, **A. Campu***, D. Maniu*, M. Focsan*, I. Botiz* and S. Astilean*

Elsevier 2020, Advanced Nanostructures for Environmental Health, Micro and Nano Technologies, Pages 347-384.

DOI: 10.1016/B978-0-12-815882-1.00008-2.

ISBN: 978-0-12-815882-1.

*Toți autorii au contribuit în mod egal la realizarea lucrării.

Participări la conferințe

Prezentări Orale

5th International Workshop on Nano- and Biophotonics (IWNBP 2019), 22-27 September 2019, St Nectaire, France.

“Photothermal and Photodynamic Properties of ICG Containing Gold Bipyramids Towards their Therapeutic Potential in the NIR Biological Window”

A. Campu, M. Focsan, D.O. Rugina, F. Lerouge, S. Parola, S. Astilean.

Nanophotonics and Micro/Nano Optics International Conference Nanop 2018, 1-3 October, Rome, Italy.

“Enhanced multimodal biosensing using plasmonic paper-based nanoplatfoms”

A. Campu, F. Orzan, F. Lerouge, S. Parola, S. Astilean, M. Focsan.

Gold 2018, 15-18 July 2018, Paris, France.

“Photothermal Therapy: optimal nanogold morphology for efficient heat generation”

A. Campu, L. Susu, F. Lerouge, S. Parola, S. Astilean, M. Focsan.

5th Edition of International Conference on Analytical and Nanoanalytical Methods for Biomedical and Environmental Sciences IC-ANMBES 2018, 23-25 Mai 2018, Brasov, Romania.

“Microfluidic Platform for Integrated Plasmonic Dual Detection”

A. Campu, F. Orzan, T. Murariu, I. Turcu, I. Botiz, S. Astilean, M. Focsan.

3rd International Workshop on Nano and Bio-Photonics, 6-11 December 2015, Cabourg, France:

“Sharp gold nanostructures for fluorescence enhancement”

A. Campu, M. Focsan, F. Lerouge, P. Baldeck, S. Parola.

Prezentări Poster

Single-Molecule Sensors and nanoSystems International Conference, 3-5 April 2019, Munich, Germany.

Diseminarea rezultatelor

“Gold Nanobipyramid-based SEIRA Immunosensor in Solution”

A. Campu, D. Maniu, S. Astilean, M. Focsan.

16th European Student Colloid Conference 2017, 19-22 June, Florence, Italy.

“Controlling the Assembly of Colloidal Gold Bipyramids for Dual-Modal Plasmonic Biodetection”

A. Campu, M. Focsan, F. Lerouge, S. Parola, D. Maniu, S. Astilean.

Molecular Plasmonics 2017, 18-20 May, Jena, Germany.

“Gold Bipyramids performing as Dual-Modal Optical Immunosensors”

A. Campu, M. Focsan, F. Lerouge, S. Parola, D. Maniu, S. Astilean.

BioNanoSpec 2014, 7-10 September 2014, Cluj-Napoca, Romania.

“Raman Spectroscopy in Authenticity Studies, The discrimination of Inks and Stamps”

A. Campu and N. Leopold

Contribuții la prezentări

5th International Workshop on Nano- and Biophotonics (IWNBP 2019), 22-27 September 2019, St Nectaire, France.

Invited Lecture, “Calligraphed Plasmonic Paper Platforms for Multiplexed Detection”

L. Susu, **A. Campu**, F. Lerouge, S. Parola, S. Astilean, **M. Focsan**.

Invited Lecture, “Designing Versatile Plasmonic-Based Nanoplatfoms for Applications in Nanomedicine”

S. Astilean, M. Potara, T. Simon, S. Suarasan, M. Focsan, A. Craciun, **A. Campu**, S. Boca-Farcau, C. Farcau, D. Maniu.

Materials and Nanomaterials M&Ns-19, 17-19 July 2019, Paris, France.

Oral Presentation, “Engineering Miniaturized Nanoplatfoms via Plasmonic Calligraphy for Efficient Multimodal Biodetection”

A. Campu, L. Susu, F. Orzan, L. Tie, S. Astilean, **M. Focsan**.

Diseminarea rezultatelor

Molecular Plasmonics 2019, 23-25 May, Jena, Germany.

Poster Presentation, “Calligraphed plasmonic lines on paper operating as a miniaturized portable biosensing device”

L. Șușu, **A. Câmpu**, S. Aștilean, M. Focșan.

Sixth International Workshop on Advanced, Nano- and Biomaterials and Their Applications and Sixth French-Romanian Topical Meeting on Nano and Biomaterials, 12-16 May 2019, Cluj-Napoca, Romania.

Oral Presentation, “Cysteine-Mediated Linear Assemblies of Gold Nanorods for Induced SERS Hot-Spots”

L. Tie, J. Bosson, C. Tira, **A. Campu**, A. Vulpoi, S. Astilean, M. Focșan.

Invited Talk, “Designed Plasmonic-Based NanoSensors for Integrated Multimodal Biodetection”

A. Campu, L. Susu, L. Tie, A. M. Craciun, F. Lerouge, S. Parola, S. Astilean, M. Focșan.

Invited Talk, “Plasmonic nanoplatfoms for theranostic applications”

M. Potara, T. Simon, S. Suarasan, M. Focșan, A. Gabudean-Craciun, S. Boca-Farcau, **A. Campu**, D. Maniu, S. Astilean.

Nanophotonics and Micro/Nano Optics International Conference Nanop 2018, 1-3 October 2018, Rome, Italy.

Poster Presentation, “Triple dyes-labeled polyelectrolyte microcapsules@gold nanoparticles for anthocyanins delivery as topical administration for tumor skin cells”

R. Ghiman, D. Rugina, M. Focșan, **A. Campu**, A. Pinteaa, S. Astilean.

Biosensors as tools for today’s challenges, 23 July 2018, Bucharest, Romania.

Invited Lecture, “Gold NanoBipyramids Performing as Highly Sensitive Dual-Modal Optical Immunosensors”

A. Campu, L. Susu, S. Astilean, M. Focșan.

Gold 2018, 15-18 July 2018, Paris, France.

Poster Presentation, “Designing light-responsive nanogold-polyelectrolyte microsystems for controlled drug release in human retinal cells”

Diseminarea rezultatelor

R. Ghiman, D. Rugină, **A. Campu**, M. Focsan, S. Astilean.

NN18 15th International Conference on Nanosciences & Nanotechnologies, 3-6 July 2018, Thessaloniki, Greece.

Oral Presentation, “Fabrication of innovative plasmonic paper-based nanosensors for label-free biodetection”

A.Campu, L. Susu, F. Orzan, F. Lerouge, S. Astilean, M. Focsan.

The Fifth Edition of International Conference on Analytical and Nanoanalytical Methods for Biomedical and Environmental Sciences IC-ANMBES 2018, 23-25 Mai 2018, Brasov, Romania.

Poster Presentation, “Designing Efficient Low-Cost Paper-based Sensing Nanoplatfoms”

L. Susu, **A. Campu**, S. Astilean, M. Focsan.

Poster Presentation, “Controlling the End-to-End Assembly of Gold Nanorods to Enhance the Plasmonic Response in Near Infrared (NIR)”

L. Tie, M. Focsan, C. Tira, **A.Campu**, A. Vulpoi, J. Bosson, S. Astilean.

10th National Congress of Nefrology, 19-21 October 2017, Bucharest, Romania.

Poster Presentation, “Plasmonic-microfluidic sensor for real-time on-site detection of ANCA antibodies”

A. Campu, D. Maniu, S. Astilean, M. Focsan, F. Puskas, A. R. Potra, C. C. Rusu, D. T. Moldovan, I. M. Kacso.

2nd International Conference on NanoMaterials for health, energy and enviroment, 7-11 September 2016, Flic en Flac, Mauritius.

Invited Lecture, “Self-assembled Plasmonic Nanostructures for Ultrasensitive Detection”

M. Focsan, **A. Campu**, A.M. Craciun, M. Potara, C. Leordean, D. Maniu, S. Astilean.

7th International Conference on Metamaterials, Photonic Crystals and Plasmonics (META16), 25-28 July 2016, Torremolinos-Malaga, Spain.

Diseminarea rezultatelor

Poster Presentation, “Controlling fluorescence emission by surface plasmon resonance in multilayer “core-shell” metallic nanoparticles”

M. Focsan, **A. Campu**, A. Craciun, S. Suarasan, C. Tira, A. Lazar, S. Astilean.

3rd International Workshop on Nano and Bio-Photonics, 6-11 December 2015, Cabourg, France.

Invited Lecture, “Plasmonic Platforms for Ultrasensitive Detection”

M. Focsan, **A. Campu**, S. Suarasan, A. Gabudean, M. Potara, D. Maniu, S. Astilean.

3rd International Conference on BioPhotonics 2015, 20-22 May 2015, Florence, Italy.

Poster Presentation, “Sensitivity improved Plasmonic Platform for specific Biomarkers Detection”

M. Focsan, **A. Campu**, C. Leordean, M. Potara, A. Gabudean, D. Maniu, S. Astilean.

Cerere de patent rezultată din teza de doctorat

Cerere de Patent Nr. A 2018 00958

„Dispozitiv microfluidic plasmonic pe bază de nanoparticule bipiramidice de aur”

M.Focsan, **A. Campu**, S. Astilean, T. Murariu, I.Turcu.

Premii

Premiul Procter&Gamble: Cel mai bun Poster al Femeilor din Știință 2017.

Activitate didactică

2019 – 2020: Predarea **Labratoarelor de Optică** pentru studenții din primul an ai Facultății de Chimie la Facultatea de Fizică, Universitatea Babeș-Bolyai.

Cursuri de specializare și stagii de cercetare

03 – 11 November 2016: *Stagiu de cercetare în cadrul grupului de Materiale Funcționale al Laboratorului de Chimie de la École Normale Supérieure din Lyon și Universitatea Lyon 1, Lyon, Franța.*

29 Noiembrie – 09 Decembrie 2017: *Stagiu de cercetare la Laboratorul CSPBAT, Universitatea Paris 13, Paris, Franța.*

Diseminarea rezultatelor

06 – 08 Martie 2018: *Cursul de formare 10th European short course on "Time-Resolved Microscopy and Correlation Spectroscopy"*.

09 Martie 2018: *Cursul de formare 18th SymPhoTime Training Day – "Hands-on Data Analysis"*.

Funding and grants

Granturi obținute prin competiție

Unitatea Executivă pentru Finanțarea Învățământului Superior, a Cercetării, Dezvoltării și Inovării, CNCS-UEFISCDI – ca Director de proiect, tip de proiect: *Proiect de Mobilitate pentru Cercetători*, numărul proiectului: **PN-III-P1-1.1-MC-2017-3573**.

Memberu în proiecte de cercetare

Unitatea Executivă pentru Finanțarea Învățământului Superior, a Cercetării, Dezvoltării și Inovării, CNCS-UEFISCDI – ca Membru în 10 proiecte de cercetare.

Mulțumiri

*“Dă-i unui om un pește și îl hranești toată ziua.
Învăță-l să pescuiască și îl hranești toată viața!”*

(Proverb vechi)

De-a lungul ultimilor ani am primit ajutorul și susținerea voluntară și involuntară a unui număr mare de persoane, care, asemeni mesajului transmis de vechiul proverb, nu mi-au arătat doar calea, ci m-au învățat cum să o parcurg. Acești ani au contribuit semnificativ la dezvoltarea mea atât pe plan profesional cât și personal.

În primul rând, doresc să aduc cele mai profunde mulțumiri familiei mele, mamei și fratelui meu, care au fost cei mai mari și infocați suporteri ai mei de-a lungul vieții, cei cu care am împărtășit bucurii dar și tristeți. Încrederea, sprijinul și iubirea lor necondiționate (împreună cu ocazionalele imbolduri, ca să fiu corectă) mă definesc astăzi. Nu am cuvinte să le pot mulțumi și să le pot spune cât de mult îi apreciez.

Deasemenea, doresc să le ulțumesc prietenilor pentru sprijinul și constantele încurajări, pentru că au crezut în mine și au fost alături de mine indiferent de timp și distanță. Vă mulțumesc!

Doresc să îmi exprim recunoștința față de conducătorul de doctorat, domnul profesor Simion Aștilean, pentru că mi-a oferit oportunitatea de a învăța și de a lucra într-un grup de cercetare cu o vastă și recunoscută experiență. Atât sprijinul și sfaturile cât și setea de cunoaștere a domnului profesor m-au ajutat să evoluez și să mă perfecționez. În ciuda comunicării uneori provocatoare, ceea ce ați dorit să transmiteți a fost auzit înțelegând că este spre binele meu. De aceea, pot doar spera că am ajuns la nivelul așteptărilor și că poate le-am și depășit.

Cel mai bun dar primit în acești ani a fost de a îmi cunoaște mentorul, Habil. Dr. Monica Focsan, cu care am lucrat în mod direct și activ și care m-am învățat enorm. Sunt străini pe care ajungem să îi numim cunoștințe și apoi prieteni, dar cele mai neprețuite legături sunt acelea cu oameni pe care îi consideri ca membri de familie. Încrederea și sprijinul necondiționat pe care mi le-ai oferit și-au lăsat amprenta atât pe realizările științifice cât și în dezvoltarea mea personală sporindu-mi încrederea în mine și ajutându-mă să îmi conștientizez forțele și capacitățile proprii. Îți sunt profund recunoscătoare pentru toate oportunitățile pe care mi le-ai oferit și pe care le-ai împărtășit cu mine, formăm o

Mulțumiri

echipă grozavă. De ar fi mai mulți oameni ca tine! Îți mulțumesc din suflet pentru răbdare și pentru că m-ai lăsat să fiu cine sunt! Îți mulțumesc pentru tot! Sper să fi mândră de mine!

Doresc să îi mulțumesc deasemenea domnului Conf. Dr. Frederic Lerouge pentru ajutorul și pentru sprijinul oferit de-a lungul acestor ani, pentru timpul petrecut pentru a-mi răspunde întrebărilor (uneori stupide) de chimie. Vă mulțumesc pentru încurajări, susținere și încredere, au avut un impact major asupra mea profesional și personal. Vă apreciez enorm pentru asta și multe altele.

Colegilor mei de la Centrul de Nanobiofotonică și Microscopie Laser doresc să le mulțumesc pentru camaraderie, pentru atmosfera plăcută și amuzantă de la laborator. Vă mulțumesc pentru discuțiile constructive (indiferent de subiect), pentru seriile de muncă târzii (dar distractive) de muncă și pentru prietenia voastră atât în cadrul colectivului de la laborator cât și în afara lui.

În încheiere, doresc să mulțumesc tuturor celor care au fost implicați și au contribuit efectiv la realizarea acestei teze de doctorat cât și membrilor comisiei de îndrumare pentru sugestiile și sfaturile constructive.

**Mulțumesc tuturor celor care m-au învățat să pescuiesc căci le voi fi recunoscătoare
toată viața.**