

**Universitatea Babeş-Bolyai**  
**Facultatea de Fizică**  
**Şcoala Doctorală de Fizică**

**Rezumatul tezei de doctorat**

**FABRICAREA DE NANOSTRUCTURI PLASMONICE  
PENTRU APLICAȚII DE BIOSENZORISTICĂ PRIN  
SPECTROSCOPIE OPTICĂ**

Tié Bi Djè Leopold

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

**CLUJ-NAPOCA**

**2021**

<b>INTRODUCERE.....</b>	<b>4</b>
<b>CAPITOLUL 1: NANOPARTICULE PLASMONICE.....</b>	<b>6</b>
1.1. ISTORIA NANOPARTICULELOR DE METAL NOBIL .....	6
1.2 PROPRIETAȚILE OPTICE ALE NANOPARTICULELOR DE METAL NOBIL .....	6
1.3 APLICAȚIILE BIOMEDICALE ALE NANOPARTICULELOR DE AUR .....	8
<b>CAPITOLUL 2: METODE DE FABRICARE A SUBSTRATELOR SERS .....</b>	<b>9</b>
2.1. EFECTUL RAMAN.....	9
2.2. EFECTUL SERS.....	9
2.3. SINTEZA CHIMICA A NANOPARTICULEOR DE AUR.....	9
2.3.1. Creșterea mediată prin germeni de cristalizare a nanobastonașelor de aur (AuNR) .....	9
2.3.2. Creșterea mediată prin germeni de cristalizare a nanosferelor de aur (AuNS).....	10
2.4. METODA AUTO-ASAMBLARII .....	10
2.4.1. Auto-asamblare convectivă .....	10
<b>CAPITOLUL 3: CONTROLUL ASAMBLĂRII DE TIP "END-TO-END" A NANOBASTONAȘELOR DE AUR PENTRU ÎMBUNĂTĂȚIREA RĂSPUNSULUI PLASMONIC ÎN NIR .....</b>	<b>11</b>
3.1 DETALII EXPERIMENTALE .....	11
3.1.1 Sinteza chimică a AuNR .....	11
3.2 CARACTERIZAREA A NANOBASTONAȘELOR DE AUR .....	11
3.2.1. Rezultatele spectroscopiei UV-Vis.....	11
3.2.2. Microscopie electronică de transmisie (TEM) .....	12
3.3. REZULTATE ȘI DISCUTII .....	12
3.3.1. Auto-asamblarea mediată de cisteină a AuNR coloidale .....	12
3.3.2. Simulări FDTD ale AuNR autoansamblate .....	13
3.3.3. Amplificarea semnalului SERS prin controlul asamblării de tip „end-to-end” .....	14
<b>CAPITOLUL 4: SUBSTRATE PLASMONICE VERSATILE FUNCȚIONALIZATE CU POLIPEPTIDĂ PE POST DE NANOPLATFORME ANTIMICROBIENE PE SUPORT DE HÂRTIE.....</b>	<b>16</b>
4.1 DETALII EXPERIMENTALE .....	16
4.1.1 Sinteza coloidală de nanosfere de aur.....	16
4.1.2. Caracterizarea optică și morfologică a AuNS înainte și după imobilizarea acestora pe substratul de hârtie .....	16
4.2. FABRICAREA ȘI FUNCȚIONALIZAREA SUPORTULUI DE HARTIE PLASMONICA .....	19
4.2.1. Biocompatibilitatea hârtiei plasmonice funcționalizate .....	19
4.2.2. Evaluarea morfologiei și viabilității celulelor BJ prin imagistică de fluorescență în vitro .....	20
4.2.3. Activitatea antimicrobială pe biofilme planctonice și bacteriene .....	21
<b>CAPITOLUL 5: FABRICAREA SUBSTRATELOR SERS PRIN ASAMBLAREA CONVECTIVĂ A MICROSFERELOR DE POLISTIREN.....</b>	<b>24</b>

5.1. DETALII EXPERIMENTALE .....	24
5.1.1 Ansamblu convectiv .....	24
5.2. CARACTERIZAREA OPTICA ȘI MORFOLOGICA A SUBSTRATELOR DE STICLA .....	24
5.2.1. Rezultatele spectroscopiei UV-Vis.....	24
5.2.2. Microscopia de forță atomică (AFM).....	25
5.3. CARACTERIZAREA AFM ȘI SEM A FILMELOR DE ARGINT DEPUSE PE MONOSTRATURILE COLOIDALE CRISTALINE.....	26
5.3.1. Microscopie de forță atomică (AFM).....	26
5.3.2. Microscopie electronică de baleiaj (SEM).....	27
5.4 EVALUAREA ACTIVITAȚII SERS ȘI DETECTAREA ESCHERICHIA COLI ȘI ENTEROCOCCUS FAECALIS .....	29
<b>CONCLUZII ȘI PERSPECTIVE .....</b>	<b>32</b>
<b>REFERINȚE .....</b>	<b>34</b>
<b>LISTA PUBLICAȚIILOR .....</b>	<b>37</b>
LUCRARI ȘTIINȚIFICE PUBLICATE IN REVISTE COTATE ISI.....	37
LUCRARI ȘTIINȚIFICE IN CURS DE PREGATIRE .....	37
CONFERINȚE.....	38
<b>MULȚUMIRI .....</b>	<b>39</b>

## ***INTRODUCERE***

Această teză se axează pe investigarea noilor nanostructuri plasmonice, începând de la proiectare și fabricație până la caracterizarea și validarea capacității lor de detecție a biomoleculilor relevante și a agenților bacterieni prin spectroscopie optică, în speță Spectroscopia Raman Amplificată de Suprafață (SERS) și Rezonanța Plasmonică Localizată de Suprafață (LSPR). Astfel, această teză este structurată după cum urmează:

**Capitolul 1** prezintă o perspectivă istorică nanoparticulelor de aur. De asemenea, detaliază proprietățile lor optice remarcabile apărute din forme particulare, cum ar fi sferele și bastonașele. Începem prin a pune un accent deosebit pe acel fenomen numit Rezonanță Plasmonică Localizată de Suprafață (LSPR). Pe baza acestui fenomen, oferim detalii privind interacțiunea luminii cu nanoparticulele prin absorbție și împrăștiere. În cele din urmă, le-am detaliat potențialul în aplicațiile biomedicale.

**Capitolul 2** oferă o prezentare generală a spectroscopiei vibraționale și discută despre originea efectelor Raman și SERS. Spectroscopia Raman complementară spectroscopiei de absorbție în infraroșu în caracterizarea tranzițiilor vibraționale moleculare. Fabricarea substratelor SERS prin metode de sinteză chimică și metode de auto-asamblare, cu accent pe nanobastonașe, sunt prezentate împreună cu aplicațiile relevante din literatură.

**Capitolul 3** descrie fabricarea nanobastonașelor de aur (AuNR) printr-o metodă de sinteză chimică formată din doi pași: prepararea germenilor de aur, urmată de soluția de creștere. AuNR obținute au fost caracterizate urmărind răspunsul lor LSPR prin spectroscopia UV-Vis și prin Microscopia Electronică de Transmisie (TEM). După care, am utilizat cisteina pe post de moleculă de legare pentru a forma autoasamblate de AuNR. Cu alte cuvinte, am realizat asamblarea liniară a AuNR. Pentru a ne atinge obiectivul, am modificat pH soluției inițiale într-unul mai acid, ajungând la o valoare de 3.1. Următorul pas a fost funcționalizarea cu cisteină a AuNR pentru a genera lanțuri de AuNR. Am înregistrat în timp formarea nanolanțurilor și am observat formarea de autoasamblate de diferite lungimi. De fapt, am reușit să producem o nouă bandă plasmonică NIR, care continuă să se deplaseze spre roșu, în comparație cu cea înregistrată după o jumătate de oră. În consecință, mecanismul de creștere al AuNR autoasamblate poate fi ușor reglat, generând răspunsuri plasmonice caracteristice diferitelor procedee de asamblare. Mai mult, formarea ansamblurilor liniare de tip „end-to-end” prin

legarea cisteinei a fost confirmată nu numai experimental prin apariția benzii plasmonice NIR specifice, ci și prin imaginile TEM ale ansamblurilor de AuNR, dar și prin simulări efectuate cu metoda Domeniul de timp cu diferență finită (FDTD). În cele din urmă, un câmp electromagnetic mult mai intens între nanobastonașele legate a fost ulterior demonstrat prin detecția SERS a moleculelor cu un factor de amplificare mai bun decât al AuNR individuale.

Prima parte a **capitolului 4** prezintă fabricarea și caracterizarea unei nanoplatforme plasmonice biocompatibile versatile bazate pe hârtie de filtru Whatman care încorporează particule nanosferice de aur încărcate pozitiv prin metoda imersiei. În timp ce în a doua parte, activitatea antimicrobiană a hârtiei plasmonice funcționalizate cu polipeptida P2 a fost testată pe bacterii planctonice și pe biofilme a două tulpini de referință: bacterie Gram-pozitivă, *Staphylococcus aureus*, și Gram-negativă, *Escherichia coli*, determinând astfel o inhibare microbiană de până la 100% pentru bacteriile planctonice.

**Capitolul 5** prezintă fabricarea substratelor active SERS funcționalizate cu acidul 4-mercaptofenilboronic (4-MPBA) pentru a detecta tulpini bacteriene precum *Escherichia coli* (*E. coli*) și *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*). Am început să depunem trei diametre diferite (500, 607 și 800 nm) de microsferă din polistiren (PS) pe lamele de sticlă prin metoda de asamblare convectivă. Cristalele asemănătoare monostratului, așa cum se observă din caracterizarea utilizând microscopia de forță atomică (AFM), au fost apoi acoperite cu un film de argint având grosimea de 60 nm. Dintre cele trei substraturi pregătite, substratul de interes este reprezentat prin aceste dimensiuni cuplate 607nm, 60nm, respectiv diametrul microsferelor de PS și grosimea filmului de argint, demonstrate de imaginile SEM și AFM. Ulterior, acest substrat a fost funcționalizat cu molecule de 4-MPBA pentru a discrimina și caracteriza tulpinile bacteriene menționate mai sus. Analiza spectrelor Raman/ SERS ale *E. faecalis* scăzute din *E. coli* combinate cu 4-MPBA au condus la identificarea bacteriilor.

**Cuvinte cheie:** Nanoparticule de Aur, Rezonanță Plasmonică de Suprafață Localizată, Biosenzori, Spectroscopie SERS, Bacterii, Auto-asamblare, Nanoplatforme Antibacteriene.

## ***CAPITOLUL 1: NANOPARTICULE PLASMONICE***

### ***1.1. Istoria nanoparticulelor de metal nobil***

Data exactă pentru extracția de aur pare a fi ambiguă, dar, potrivit arheologilor, ar putea fi datată din mileniul 3 sau 4 î.Hr. Datorită proprietăților sale optice remarcabile, aurul, în formele sale coloidale, a fost utilizat într-un număr mare de domenii, cum ar fi textil, arhitectură și bijuterii. Astfel, în timpul Imperiului Roman, meșterii au folosit nanoparticulele metalice ca și pigmenți (Figura 1) pentru vitralii, în haine și ceramică <sup>2,3</sup>.



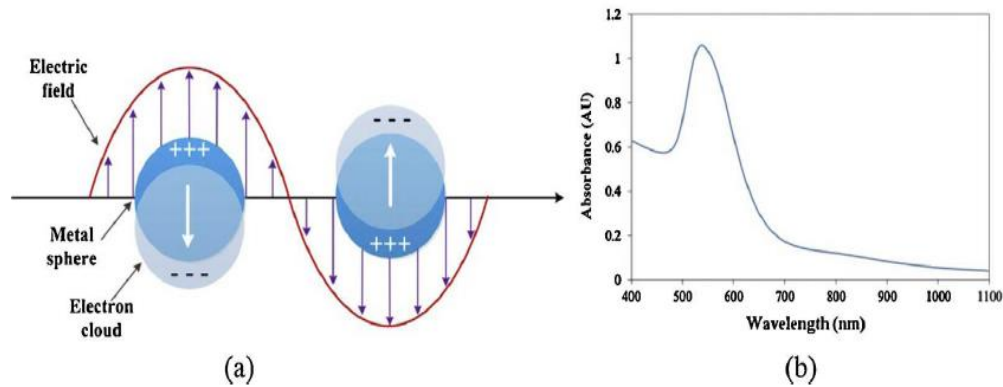
**Figura 1.** Graficul particulelor coloidale încorporate în vitralii.

<http://guad.deviantart.com/art/Davos-Seaworth-Stained-Glass-Window-330453541>

### ***1.2 Proprietățile optice ale nanoparticulelor de metal nobil***

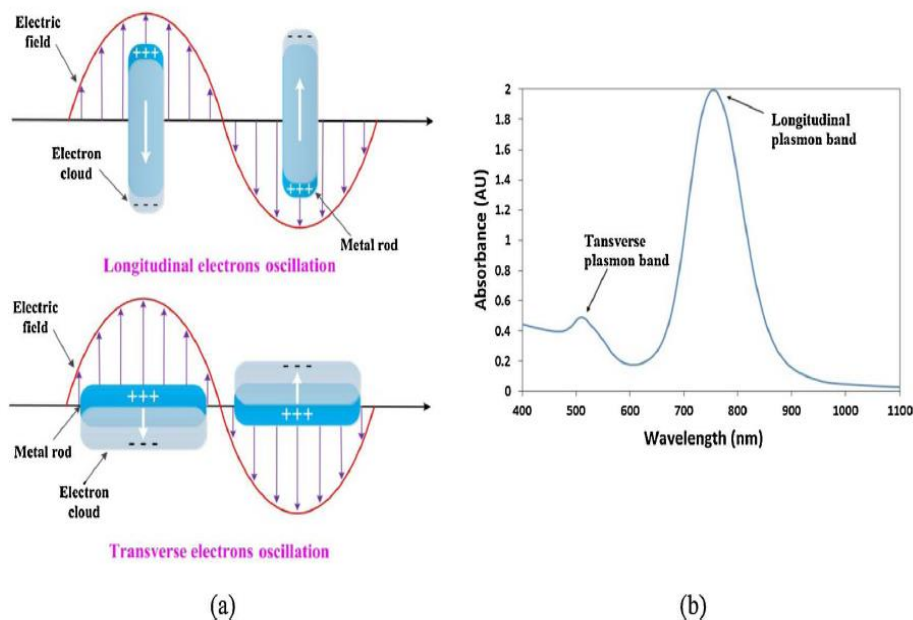
În comparație cu proprietățile observate în metalul solid, nanoparticulele metalice (AuNP) posedă proprietăți optice unice care variază considerabil. Când lumina incidentă interacționează cu AuNP-urile, câmpul electric al luminii induce o oscilație colectivă a electronilor de conducție de la suprafața metalică. Această oscilație colectivă produce un fenomen numit rezonanță plasmonică de suprafață sau SPR atunci când frecvența de oscilație este în rezonanță cu frecvența luminii incidente <sup>4, 5</sup>. Prezintă o varietate de forme, dimensiuni și tipuri de materiale, AuNP-urile prezintă proprietăți de absorbție diferite care corespund fiecărei culori. În literatură, de exemplu, soluția AuNP coloidală prezintă culori strălucitoare de o gamă diversă, atunci când dimensiunea variază de la 1 la 100 nm. Mai mult, proprietățile optice ale nanomaterialului depind de dimensiunea și forma acestuia. Prin urmare, oscilațiile electromagnetice „localizate” (LSPR) pot fi implicate în SPR. Exemplul clasic de LSPR,

demonstrat în Figura 2a, apare din excitația de către un câmp luminos extern al unei singure nanoparticule sferice de aur. În spectrul său de absorbție, așa cum se arată în Figura 2b, se poate observa doar o singură bandă de absorbție situată în regiunea vizibilă de la 500 la 550 nm <sup>6</sup>.



**Figura 2.** (a) Ilustrarea schematică a excitației LSPR pentru AuNS și (b) o bandă tipică de absorbție LSPR a AuNS <sup>7</sup>.

Pentru nanostructurile anizotrope, cum ar fi AuNR-urile avem două benzi LSPR așa cum se poate vedea în Figura 3a și b. Una de la oscilația transversală și alta, la lungimi de undă mai mari, datorită oscilației longitudinale a norului de electroni.



**Figura 3.** (a) Ilustrarea schematică a excitației LSPR pentru AuNR și (b) benzile de absorbție LSPR ale AuNR: banda plasmonică longitudinală și transversală corespunzătoare oscilației electronilor de-a lungul axei lungi (Figura 3a sus) și pe fețele transversale (Figura 3a jos) <sup>7</sup>.

### ***1.3 Aplicațiile biomedicale ale nanoparticulelor de aur***

Cuplarea biomoleculilor și a materialelor la scală nanometrică are capacitatea de a revoluționa multe domenii ale științelor și tehnologiei, având un impact semnificativ asupra tehnologiilor biomedicale actuale, nanoelectronică și a domeniilor conexe <sup>8-16</sup>. Deoarece nanoparticulele și biomoleculile au de obicei aceeași scală de lungime nanometrică, ele se pot regăsi în sistemele hibride. În caz contrar, nanotehnologia modernă este inspirată parțial de sistemele biologice și este dezvoltată în mod constant pentru noi abordări în diagnosticare și terapie (teranostice). Acesta este motivul pentru care nanoparticulele de aur (AuNP) sunt un exemplu clar al expansiunii lor rapide în aplicațiile biomedicale. Cu toate acestea, este bine-cunoscut faptul că AuNP au fost utilizate în medicină de mai bine de 500 de ani <sup>17</sup>, dar o abordare cu adevărat științifică a fost aplicată pentru studierea potențialului lor biomedical abia recent <sup>18,19</sup>. Proprietățile fizico-chimice și starea avansată a chimiei sintetice oferă AuNP un potențial excelent pentru aplicațiile lor biomedicale, inclusiv diagnosticarea și terapia bolilor aparent incurabile. Pe de altă parte, forma diferitelor particule de aur, cum ar fi sferice, bastonașele, cuburile, stelele, cu proprietăți controlabile la scală nanometrică, le oferă capacitatea de utilizare în sisteme biomedicale și tehnologice. Deși, AuNP par să aibă o bună biocompatibilitate, lucru favorabil pentru utilizarea acestora în aplicații biomedicale. Avantajele acestor particule includ sinteze ușoare, non-toxice și protocoale de modificare a chimiei de suprafață. Ulterior, funcționalizarea nanoparticulelor datorită specificității lor de legare, precum și cu o mare varietate de grupări funcționale sau biomolecule (acizi nucleici, proteine) oferă noi oportunități de a fi utilizate în sistemele biomedicale.



## ***CAPITOLUL 2: METODE DE FABRICARE A SUBSTRATELOR SERS***

### ***2.1. Efectul Raman***

Când fasciculul de lumină este incident pe sistemul atomilor dintr-o moleculă, interacțiunea are loc între câmpul electric al luminii și norul de electroni al orbitalilor încărcăți negativ. Această interacțiune, dă naștere la împrăștierea luminii prin trei mecanisme distincte.

- (1) În împrăștierea elastică, denumită împrăștiere Rayleigh, frecvența undeii împrăștiate este egală cu frecvența undeii incidente  $\bar{\nu}_0$ .
- (2) Într-o formă de împrăștiere inelastică, radiația cu frecvență mărită este emisă după împrăștiere; aceasta se numește împrăștiere anti-Stokes Raman  $\bar{\nu} = \bar{\nu}_0 + \bar{\nu}_i$ .
- (3) Într-o altă formă de împrăștiere inelastică, radiația cu frecvență scăzută se emite după împrăștiere; aceasta se numește împrăștiere Stokes Raman.  $\bar{\nu} = \bar{\nu}_0 - \bar{\nu}_i$ .

### ***2.2. Efectul SERS***

Experimentul tipic SERS implică un semnal Raman împrăștiat situat la suprafața metalică sau foarte aproape de aceasta; aceste suprafețe metalice cu proprietăți de amplificare ale câmpului electric, sunt denumite substrat SERS. Se poate considera astfel că contribuția electromagnetică la îmbunătățirea semnalului SERS total este aproximativ proporțională cu puterea a patra a factorului de amplificare a câmpului, presupunând că diferența de frecvență  $\nu_{\text{Laser}} - \nu_{\text{Stokes}}$  este suficient de mică pentru a lua în considerare o îmbunătățire similară atât la fotonii incidenti, cât și la cei împrăștiați, aceasta implică faptul că lățimea de linie a modurilor plasmonice implicate, care generează îmbunătățirea, este mai mare decât modificarea Raman Stokes, ceea ce este corect în majoritatea cazurilor.<sup>20</sup>

### ***2.3. Sinteza chimică a nanoparticulelor de aur***

#### **2.3.1. Creșterea mediată prin germeni de cristalizare a nanobastonașelor de aur (AuNR)**

Dintre diferitele metode de sinteză ale AuNR raportate, metoda de creștere mediată de germeni este cea mai populară și aceasta a fost aplicată pe scară largă datorită simplității procedurii

experimentale, randamentul ridicat de fabricare de nanobastonașe de înaltă calitate, ușurința controlării dimensiunii particulelor și flexibilitatea în modificările structurale <sup>21</sup>. Abordarea de creștere mediată de germeții pentru AuNR coloidale a fost demonstrată pentru prima dată de Jana și colab. în 2001. <sup>22</sup>

### **2.3.2. Creșterea mediată prin germeții de cristalizare a nanosferelor de aur (AuNS)**

Această metodă de fabricare a nanosferelor de aur implică două etape: primul pas al acestei sinteze constă în prepararea de nanoclusteri de aur care sunt acoperite cu CTAB, acești clusteri fiind denumiți „germeții de cristalizare”. În acest caz, soluțiile apoase de H<sub>Au</sub>Cl<sub>4</sub> și CTAB au fost amestecate împreună la temperatura camerei, urmată de injectarea rapidă a unei soluții apoase răcite cu gheață de NaBH<sub>4</sub>. Suspensia maro rezultată este utilizată direct ca germeții pentru a genera nanosfere de aur. Într-o sinteză standard, soluțiile apoase de H<sub>Au</sub>Cl<sub>4</sub>, CTAC și acid ascorbic au fost amestecate împreună la temperatura camerei, urmată de adăugarea unei anumite cantități de germeții. Amestecul a devenit roșu în câteva secunde, indicând astfel formarea rapidă a nanoparticulelor de aur. <sup>23</sup>

## **2.4. Metoda auto-asamblării**

### **2.4.1. Auto-asamblare convectivă**

O astfel de metodă este dezvoltată de grupul <sup>24</sup> al lui Velev. Această tehnică se bazează pe trasarea meniscului la interfața dintre o soluție coloidală/ substrat de sticlă/ aer pe un substrat, lăsând în urma sa o matrice strânsă de coloizi. Timpii rapizi de depunere (cm<sup>2</sup> de cristale coloidale/minut) și controlul asupra numărului de straturi sunt unele dintre numeroasele avantaje oferite de această metodă.

## **CAPITOLUL 3: CONTROLUL ASAMBLĂRII DE TIP "END-TO-END" A NANOBASTONAȘELOR DE AUR PENTRU ÎMBUNĂTĂȚIREA RĂSPUNSULUI PLASMONIC ÎN NIR**

### **3.1 Detalii experimentale**

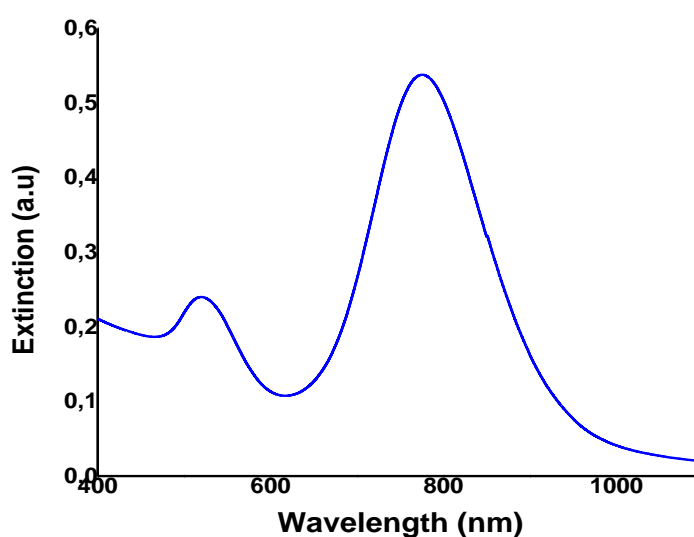
#### **3.1.1 Sinteza chimică a AuNR**

Această metodă chimică de creștere mediată de germeni cuprinde două etape principale utilizate pentru a produce nanobastonașe de aur. AuNR coloidale cu diferite rapoarte de aspect au fost sintetizate prin adaptarea protocolului de creștere mediat de germeni dezvoltat de Nikoobakht și colab<sup>25</sup>. Pentru sinteza AuNR cu bandă longitudinală LSPR localizată la 738 nm și un raport de aspect de ~ 3.2, s-a folosit o abordare tipică de creștere mediată de germeni, care implică două etape<sup>26</sup>.

### **3.2 Caracterizarea a nanobastonașelor de Aur**

#### **3.2.1. Rezultatele spectroscopiei UV-Vis**

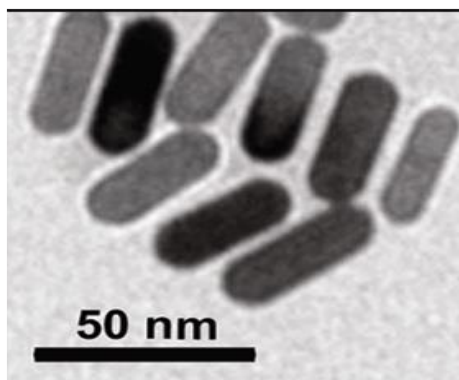
Spectrul de absorbție al nanoparticulelor obținute este prezentat în Figura 4. Răspunsul plasmonic prezintă două benzi LSPR, una, datorită oscilațiilor transversale, în jurul valorii de 519 nm și una, la lungimi de undă mai mari datorită oscilațiilor longitudinale, la 776 nm.



**Figura 4.** Spectrul de absorbție a AuNR.

### 3.2.2. Microscopie electronică de transmisie (TEM)

Morfologia nanoparticulelor de aur sintetizate (AuNR) a fost investigată prin măsurători TEM. Figura 5 prezintă imaginile TEM reprezentative ale AuNR sintetizați care demonstrează în mod clar sinteza nanobastonașelor de aur.



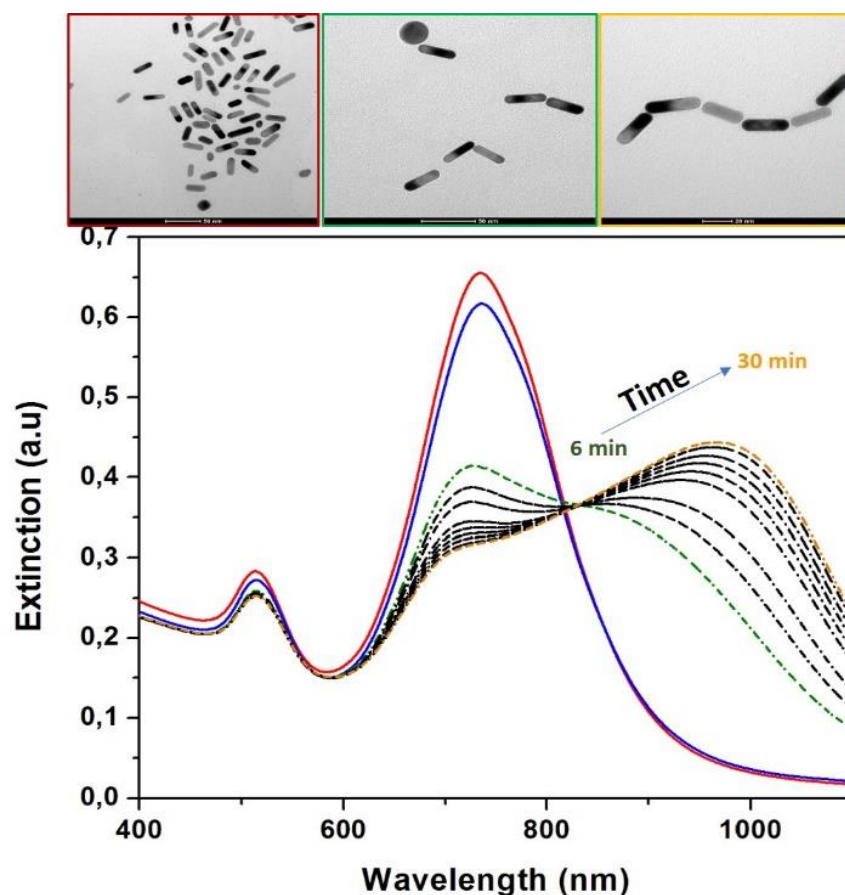
**Figura 5.** Imagine reprezentativă TEM ale AuNR-urilor.

### 3.3. Rezultate și discuții

#### 3.3.1. Auto-asamblarea mediată de cisteină a AuNR coloidale

În primul rând, pH-ul soluției coloidale de AuNR a fost redus la 3,1 folosind o soluție apoasă de acid acetic Figura 6 - spectrul albastru, urmată de adăugarea linkerului molecular cisteină (Cys) care a indus o scădere rapidă a benzii longitudinale LSPR localizate inițial la 738 nm, în timp ce apariția umărul la lungime de undă mai mare începe să apară (Figura 6 - spectrul punctat verde). Această schimbare spectrală este monitorizată în timp real și asociată cu formarea dimerilor în primele 6 minute după incubare (Figura 6 - spectru punctat verde), urmată de auto-asamblarea progresivă a AuNR în lanțuri liniare după 30 de minute (Figura 6 - portocaliu spectru punctat).

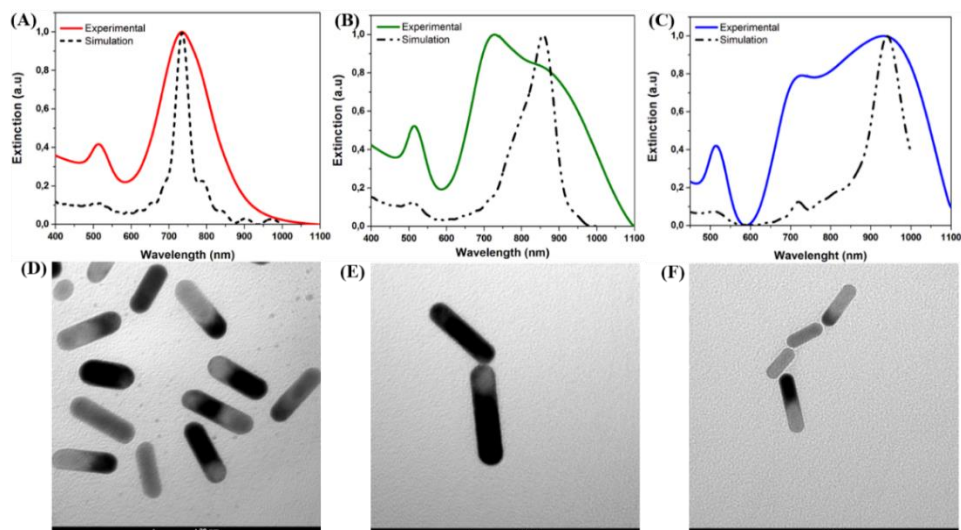
Această bandă plasmonică NIR nou formată continuă să se deplaseze spre roșu în comparație cu cea înregistrată după 30 de minute, ca o consecință a extinderii în timp a reacției de asamblare liniară a AuNR-urilor în configurația de tip „end-to-end” în lanțuri mai lungi. De remarcat este faptul că banda transversală LSPR situată la 514 nm rămâne neafectată de prezența linkerului cisteină, excluzând deci un posibil ansamblu de AuNR-uri de tip „side-to-side”. Totuși, prezența punctului izosbestic (de egală absorbantă) bine definit la 834 nm este în concordanță cu o „reacție de ordinul întâi” între AuNR asamblate „ca produse finale”<sup>27</sup>.



**Figura 6.** Evoluția în timp a spectrelor de extincție înregistrate succesiv ale ansamblurilor de AuNR induse de linkerul Cys la pH 3,1 și imaginile reprezentative TEM colectate la diferite faze ale procesului de asamblare (adică fără linker Cys, după 6 și 30 de minute de incubare cu Cys).

### 3.3.2. Simulări FDTD ale AuNR autoansamblate

Pentru o mai bună înțelegere a proprietăților plasmonice ale mecanismului de asamblare AuNR dependente de timp observat experimental, am efectuat în continuare simulări FDTD pentru trei cazuri selectate: i) AuNR-uri individuale cu un diametru de 18 nm și 40 nm lungime (Figura 7A) (așa cum se obține din imaginea TEM), ii) un dimer cu o distanță de 2 nm între AuNR-urile (Figura 7B) și iii) un lanț format din patru AuNR asamblate (Figura 7C). Figura 7 prezintă comparația spectrelor experimentale înregistrate cu spectrele de extincție simulate FDTD pentru tipurile de ansambluri considerate, reflectând un bun acord al datelor obținute.



**Figura 7.** Spectrele de extincție simulate experimentale și FDTD obținute pentru individul considerat (A), dimerii (B) și tetramerii AuNR (C) orientați „end-to-end” și imaginile TEM colectate corespunzătoare în timpul procesului de asamblare liniară (D-F). Scala este de 20 nm.

### 3.3.3. Amplificarea semnalului SERS prin controlul asamblării de tip „end-to-end”

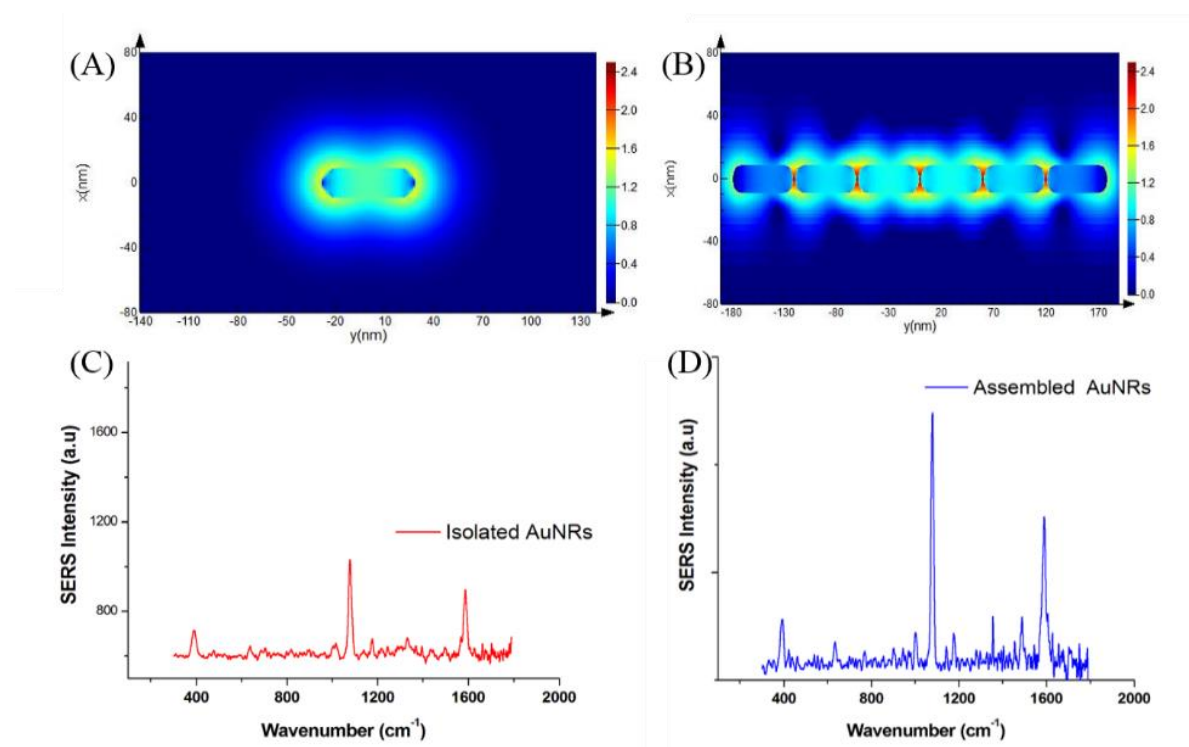
Este bine cunoscut faptul că, atunci când două AuNR sunt cuplate, se generează un câmp electromagnetic intens localizat în spațiul dintre particule <sup>28, 29</sup>. În acest context, performanța SERS a AuNR liniare asamblate comparativ cu AuNR individuale a fost investigată în continuare prin utilizarea moleculei de p-aminotiofenol (p-ATP,  $c=10^{-4}$  M) ca reporter Raman activ și o linie laser de excitație de 785 nm de la un spectrometru portabil Raman. În cazul nostru, atașarea directă a moleculelor de p-ATP pe suprafața AuNR individuale a fost dovedită prin deplasarea cu 16 nm spre roșu a benzii longitudinale LSPR localizate inițial la 738 nm, fără a avea o lărgire spectrală (datele nu sunt prezentate).

Ca o primă observație, când analitul p-ATP a fost atașat covalent pe vârfurile AuNR individuale, semnalul Raman caracteristic al p-ATP a fost înregistrat în Figura 8C.

În contrast, când complexul AuNR-p-ATP în soluție apoasă a început să se auto-asambleze prin intermediul linkerului Cys, se observă comportamentul spectral al ansamblului liniar de tip „end-to-end”, împreună cu un semnal Raman considerabil îmbunătățit al moleculelor de p-ATP localizate la joncțiunile dintre AuNR (Figura 8D).

Acest efect este atribuit regiunilor formate între capetele bastonașelor generate prin auto-asamblare, demonstrând prin urmare că lanțurile liniare de AuNR dau naștere unui semnal SERS mult mai amplificat în comparație cu AuNR individuale.

Ulterior, pentru a înțelege modificarea intensității Raman a moleculei de analit p-ATP în cele două cazuri investigate mai sus, am evaluat, de asemenea, - folosind metoda FDTD - distribuția intensității relative a câmpului electromagnetic  $|E / E_0^2|$  la suprafața unui AuNR individual (Figura 8A) și a șase AuNR asamblate într-o manieră de tip „end-to-end” (Figura 8B).



**Figura 8.** Hărți  $|E / E_0^2|$  calculate pentru un AuNR individual cu lungimea de 40 nm și diametrul de 18 nm (A) și un lanț liniar de AuNR perfect asamblate (B) sub excitație laser de 785 nm, obținut prin utilizarea simulărilor FDTD; Spectrele SERS ale p-ATP grefate pe AuNR izolate (C) și AuNR asamblate liniar (D), utilizând o excitație laser de 785 nm.

## CAPITOLUL 4: SUBSTRATE PLASMONICE VERSATILE FUNCȚIONALIZATE CU POLIPEPTIDĂ PE POST DE NANOPLATFORME ANTIMICROBIENE PE SUPORT DE HÂRTIE

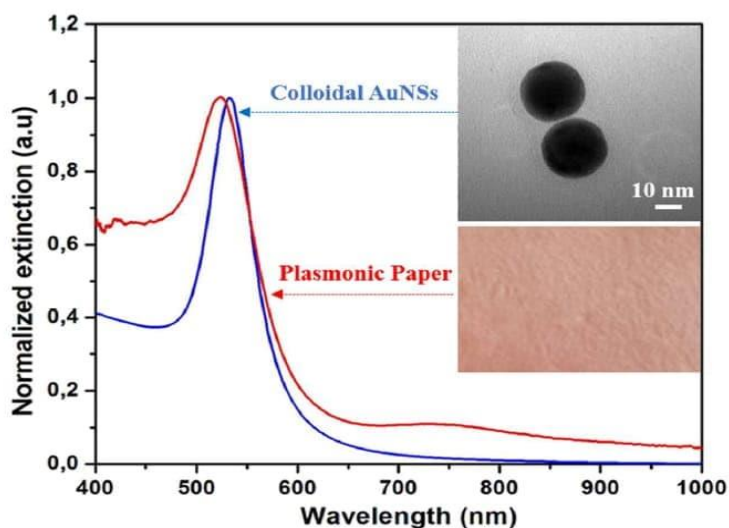
### 4.1 Detalii experimentale

#### 4.1.1 Sinteza coloidală de nanosfere de aur

Pentru fabricarea nanosferelor de aur (AuNS) stabilizate prin clorură de cetiltrimetilamoniu (CTAC), o versiune adaptată a abordării succesive a creșterii mediată prin germeni raportată anterior de Zheng și colab.<sup>30</sup> a fost utilizată.

#### 4.1.2. Caracterizarea optică și morfologică a AuNS înainte și după imobilizarea acestora pe substratul de hârtie

În acest context, răspunsul optic al nanostructurilor sintetizate a fost înregistrat folosind un spectrofotometru UV-Vis-NIR. În Figura 9, spectrul albastru corespunde AuNS în soluție apoasă, și așa cum era de așteptat, acestea prezintă o bandă LSPR la 529 nm datorită oscilațiilor electronilor de conducție la suprafața nanostructurilor, fenomen descris teoretic de teoria Mie<sup>31</sup>. Inserția din dreapta sus arată o imagine TEM reprezentativă a AuNS sintetizate, confirmând astfel forma sferică a acestora.

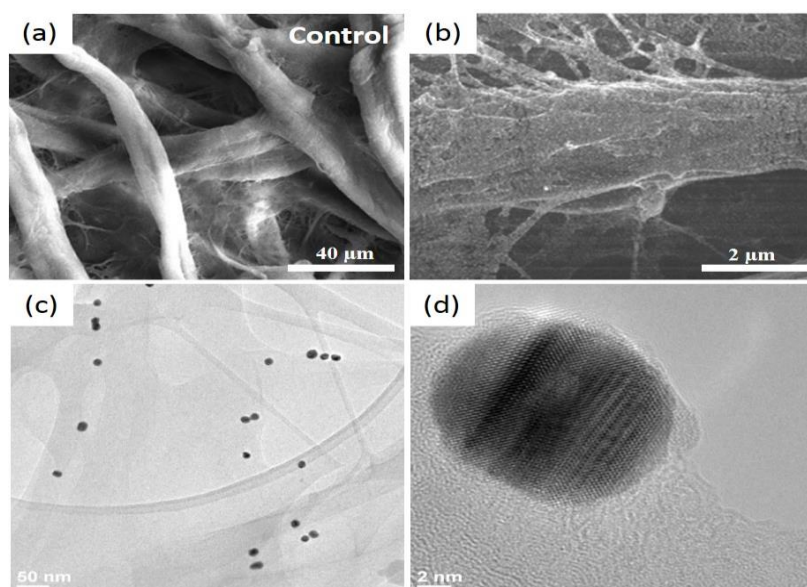


**Figura 9.** Spectrele de extincție normalizate ale AuNS-urilor înainte și după imobilizarea lor pe substratul de hârtie. Inserția din partea de sus-dreapta: O imagine reprezentativă TEM a AuNS sintetizate. Inserția din partea de jos-dreapta: O fotografie digitală a substratului de hârtie după imobilizarea AuNS.



În plus, potențialul de suprafață a fost investigat prin măsurători de potențial Zeta, obținând o valoare pozitivă de + 51 mV. Această caracteristică specială este extrem de avantajoasă pentru adsorbția ulterioară a nanostructurilor. De fapt, adsorbția uniformă a AuNS pe fibrele de hârtie se datorează interacțiunii electrostatice dintre nanoparticulele încărcate pozitiv și hârtie, care prezintă un număr mare de grupări hidroxil care sunt accesibile, în general, pentru atașarea speciilor încărcate pozitiv <sup>32, 33</sup>. Ulterior, s-a înregistrat răspunsul LSPR al hârtiei plasmonice (Figura 9: spectrul roșu), răspunsul optic al nanostructurilor coloidale este bine conservat, indicând imobilizarea nanosferelor individuale pe fibrele de celuloză fără agregare.

Mai mult, banda de extincție a suferit o deplasare spre albastru de 5 nm, ceea ce nu este surprinzător având în vedere că banda LSPR este extrem de sensibilă la mediul înconjurător al nanoparticulelor și, prin urmare, depinde de indicele de refracție al mediului în care se află. Prin uscarea hârtiei plasmonice, AuNS sunt transferate din apă ( $n = 1,333$ ) în aer ( $n = 1$ ). Toate aceste rezultate confirmă imobilizarea cu succes a AuNS-urilor pe substratul de hârtie. Mai mult, analiza SEM a hârtiei plasmonice consolidează rezultatele optice obținute. Figura 10a și b prezintă imaginile SEM reprezentative ale fibrelor de celuloză înainte și după imobilizarea AuNS pe substratul de hârtie (ca puncte albe), respectiv.

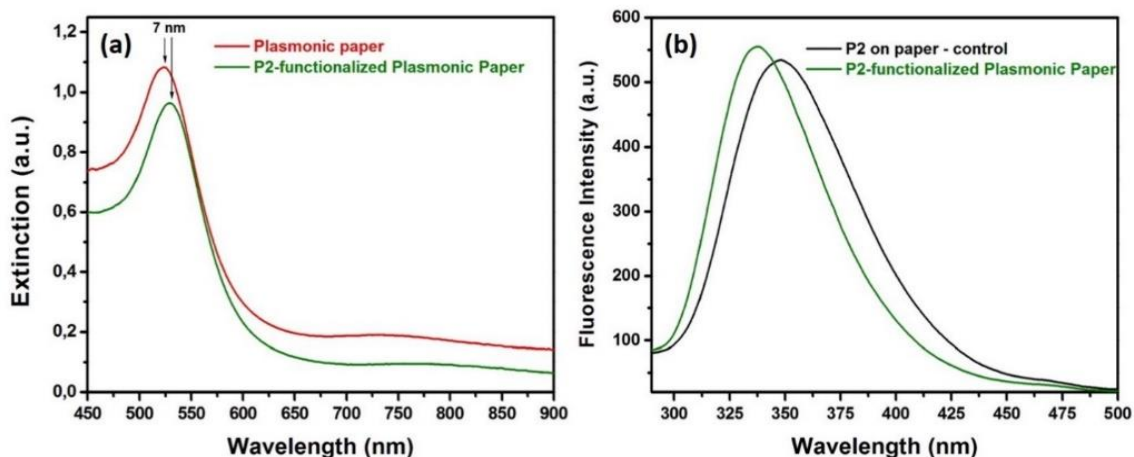


**Figura 10.** Imagini reprezentative SEM ale hârtiei Whatman care prezintă microfibrele sale interconectate (a) și după decorarea suprafeței hârtiei cu AuNS (puncte luminoase) (b), precum și imaginile tipice HRTEM de joasă (c) și de înaltă rezoluție (d).

AuNS sunt bine adsorbite pe structura poroasă 3D a hârtiei Whatman, datorită interacțiunii electrostatice dintre cele două încărcături de suprafață opuse. În plus, acestea prezintă o

distribuție omogenă ca un film subțire, fără agregare la scară largă. Pentru o vizualizare mai bună, HRTEM a fost folosit pentru a distinge nanostructurile individuale (Figura 10c) umezind hârtia cu alcool și zgâriind-o pentru a obține resturi, care au fost apoi depuse pe o rețea de carbon și lăsate să se usuce înainte de analiză. Rezultatele obținute prin HRTEM sunt în concordanță cu cele optice și concluzionează că, după imobilizare, AuNS și-au menținut forma și dimensiunea; tratamentul de uscare termică și nici etapele succesive de imersie nu au indus modificări morfologice. Mărind și mai mult, cristalinitatea AuNS pot fi evaluată ca fiind monocristalină (Figura 10d).

După adsorbția AuNS pe matricea de hârtie, funcționalizarea nanoplatformei cu polipeptida P2 a fost abordată în continuare. Având în vedere afinitatea grupurilor amino de a se lega de suprafața aurului, P2 a fost atașat prin adăugarea a 10  $\mu$ L soluție apoasă de 50  $\mu$ M molecule P2 pentru a crea un monostrat polipeptidic pe hârtia plasmonică. După funcționalizarea cu P2, banda de extincție a hârtiei plasmonice înregistrează o deplasare spre roșu de 7 nm indicând faptul că mediul din vecinătatea apropiată a AuNS s-a modificat din nou, confirmând astfel funcționalizarea cu succes a polipeptidei P2 (Figura 11a). Mai mult decât atât, emisia de fluorescență a fost apoi monitorizată pentru a obține informații cu privire la interacțiunea electrostatică dintre peptidele P2 și suprafața AuNS (Figura 11b), prin monitorizarea emisiei puternice de fluorescență a hârtiei plasmonice funcționalizate cu P2 (Figura 11b- spectrul verde), în comparație cu moleculele libere de P2 depuse pe hârtie Whatman (Figura 11b- spectrul negru), în regiunea spectrală cuprinsă între 295 și 500 nm, folosind o lungime de undă de excitație fixă la 280 nm. După cum putem vedea în Figura 11b- spectrul negru, polipeptidele P2 atașate direct pe hârtia Whatman prezintă o bandă puternică de emisie fluorescentă intrinsecă la 339 nm, care provine din emisia reziduurilor de triptofan. Reziduurile de triptofan sunt, în general, extrem de sensibile la schimbările mediului local și, prin urmare, atunci când moleculele P2 au fost depuse pe hârtia plasmonică, o schimbare a emisiilor de fluorescență de până la 9 nm, de la 339 la 348 nm, a fost observată, indicând modificări de polaritate în jurul reziduurilor de triptofan, care coroborează rezultatele obținute din spectrele LSPR, ducând la concluzia că polipeptida P2 a fost legată cu succes de AuNS adsorbite pe substratul de hârtie



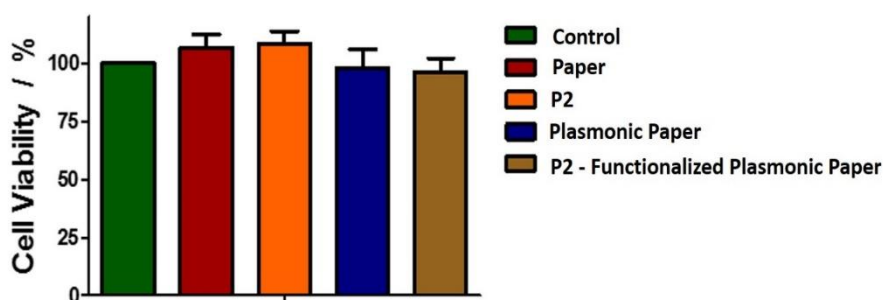
**Figura 11.** (a) Spectrele de extincție ale hârtiei plasmonice înainte și după funcționizarea cu polipeptida P2 și (b) spectrele de fluorescență ale P2 pe hârtie goală și pe substratul de hârtie plasmonică realizat.

## 4.2. Fabricarea și funcționizarea suportului de hârtie plasmonică

Pentru a fabrica substratul de hârtie plasmonică, s-a folosit hârtie de filtru Whatman nr.1, din care au fost tăiate fâșii de hârtie. Pentru imobilizarea nanoparticulelor, benzile au fost apoi imersate în soluția coloidală și lăsate la uscat timp de 10 minute. Substratele au fost uscate la 45 °C timp de încă 10 min. Pentru a asigura o încărcare ridicată a AuNS pe fibrele de hârtie, concentrația de nanoparticule imobilizate a fost crescută prin aplicarea procedurii de imersiune de 3 ori consecutiv. Hârtia plasmonică a fost apoi funcționizată cu polipeptidă P2 sintetică, prin picurarea a 10  $\mu$ L soluție apoasă de 50  $\mu$ M de molecule P2 pentru a crea un monostrat polipeptidic pe hârtia plasmonică.

### 4.2.1. Biocompatibilitatea hârtiei plasmonice funcționizate

Comparativ cu celulele BJ de control, celulele crescute în prezența P2 sau a hârtiei prezintă o viabilitate ușor crescută, demonstrând astfel că cele două componente nu sunt toxice pentru celulele pielii, așa cum era de așteptat. Studiile anterioare au raportat că platformele pe hârtie, precum hârtia Whatman, câștigă teren în aplicațiile biomedicale datorită biocompatibilității lor asupra celulele eucariote, eficiența costurilor, accesibilitatea etc.<sup>34</sup>. Mai mult, aceste rezultate sunt în acord cu un studiu anterior asupra polipeptidei P2, care a evaluat că P2 nu are toxicitate împotriva celulelor eucariote la concentrațiile utilizate aici<sup>35</sup>.



**Figura 12.** Biocompatibilitatea noilor nanoplatforme împotriva celulelor BJ umane.

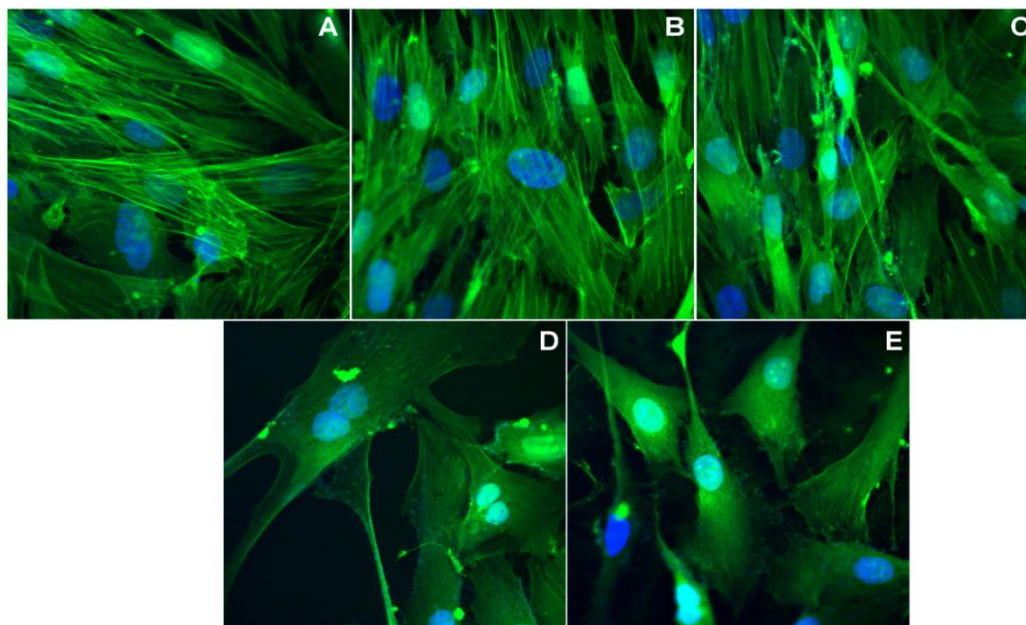
Cu toate acestea, în prezența hârtiei plasmonice și a substratelor plasmonice funcționalizate cu P2, se observă o scădere mică a viabilității celulare. După incubarea cu ambele sisteme plasmonice, viabilitatea scade cu 10%.

Cu toate acestea, scăderea nu este semnificativă, indicând faptul că noile nanoplatforme plasmonice obținute nu sunt toxice pentru celulele pielii umane, favorizând implementarea lor în aplicații antibacteriene.

#### **4.2.2. Evaluarea morfologiei și viabilității celulelor BJ prin imagistică de fluorescență în vitro**

Am investigat modificările structurale induse în celulele BJ de către nanoplatformele plasmonice. Figura 13 prezintă imagini reprezentative în microscopia confocală de fluorescență a celulelor BJ în toate condițiile testate după procesul de colorare a nucleului cu Hoechst 33.342 (albastru) și filamente de actină cu Faloidin-FITC (verde). Celulele martor au o morfologie alungită, bipolară, cu filamente de actină bine organizate, aproape paralele, mergând aproape de la un capăt la celălalt capăt al figurii celulare. În plus, nucleul prezintă morfologia ovoidă specifică. Caracteristici similare sunt observate pentru celulele crescute în prezența hârtiei Whatman figura 13b și a peptidei P2 figura 13c, confirmând astfel, împreună cu testele de viabilitate, că cele două nu induc modificări ale structurii celulare. În cazul nanoplatformei plasmonice figura 13d și funcționalizată cu peptida antimicrobiană P2 figura 13e, se observă unele modificări morfologice. În loc de forma specifică alungită, celulele BJ prezintă o formă modificată devenind mai mică cu o morfologie stelară, cu 3 sau mai multe procese care se extind de la corpul celulei. De asemenea, filamentele de actină sunt mai puțin organizate în comparație cu celulele martor. Chiar dacă forma celulelor s-a schimbat, nucleul nu prezintă nicio

modificare, indicând faptul că funcțiile celulare nu sunt afectate. Această observație este susținută și de faptul că celulele au fost găsite în diviziune în ambele cazuri.



**Figura 13.** Imagini de microscopie confocală care subliniază schimbările structurale ale celulelor BJ după tratamentul de 24 de ore cu: (A) fără celule control-tratament, (B) hârtie Whatman simplă, (C) P2 liberă, (D) pe bază de hârtie plasmonică și (E) nanoplatforma plasmonică ficționalizată cu P2.

Scala este de 10  $\mu\text{m}$ .

Din nou, rezultatele obținute sunt bine corelate cu testul de viabilitate MTT raportate, numărul de celule crescute este redus în prezența nanoplatformelor plasmonice, în ciuda faptului că prezintă funcționalitatea diviziunii celulare. În concluzie, nanoplatforme plasmonice dezvoltate s-au dovedit a fi biocompatibile pentru celulele pielii umane utilizând două tehnici complementare, sprijinind astfel testarea lor ulterioară în ceea ce privește activitatea antimicrobiană.

#### 4.2.3. Activitatea antimicrobială pe biofilme planctonice și bacteriene

Activitatea microbială a nanoplatformei noastre de hârtie a fost testată în două cazuri diferite: (i) bacterii planctonice: descrise în general ca fiind celule planctonice independente, nelegate în suspensii diluate și (ii) biofilme bacteriene: formate prin aderența celulele bacteriene între ele sau către o suprafață. Pentru ambele situații, tulpinile Gram-pozitive *Staphylococcus aureus* 12600 și *Escherichia coli* Gram-negativ 25922 au fost alese pentru validarea și evaluarea efectului antimicrobial al nanoplatformei pe bază de hârtie plasmonică.

În cazul bacteriei planctonice, hârtia plasmonică a fost investigată în două configurații, în special în absența și funcționalizată cu polipeptida P2 sintetizată chimic. Ca și control, am urmat aceeași procedură experimentală fără hârtia plasmonică. În primul rând, a fost utilizată metoda clasică de numărare a coloniilor de extracție prin diluare. Hârtia plasmonică cu și fără P2 a arătat o activitate antimicrobiană puternică, susținută de capacitatea lor de a reduce creșterea bacteriană cu mai mult de 6 logCFU / mL. Activitatea reziduală antimicrobiană a combinațiilor de discuri după extracție a fost absentă, după cum a fost verificat prin metoda de difuzie a discului atât spre *S. aureus*, cât și către *E. coli*. Cu toate acestea, se pare că, deși componentele antimicrobiene sunt extractibile, ele nu sunt la fel de difuzibile, deoarece discurile non-extrase nu au dezvoltat diametre mari de inhibare Tabelul 1.

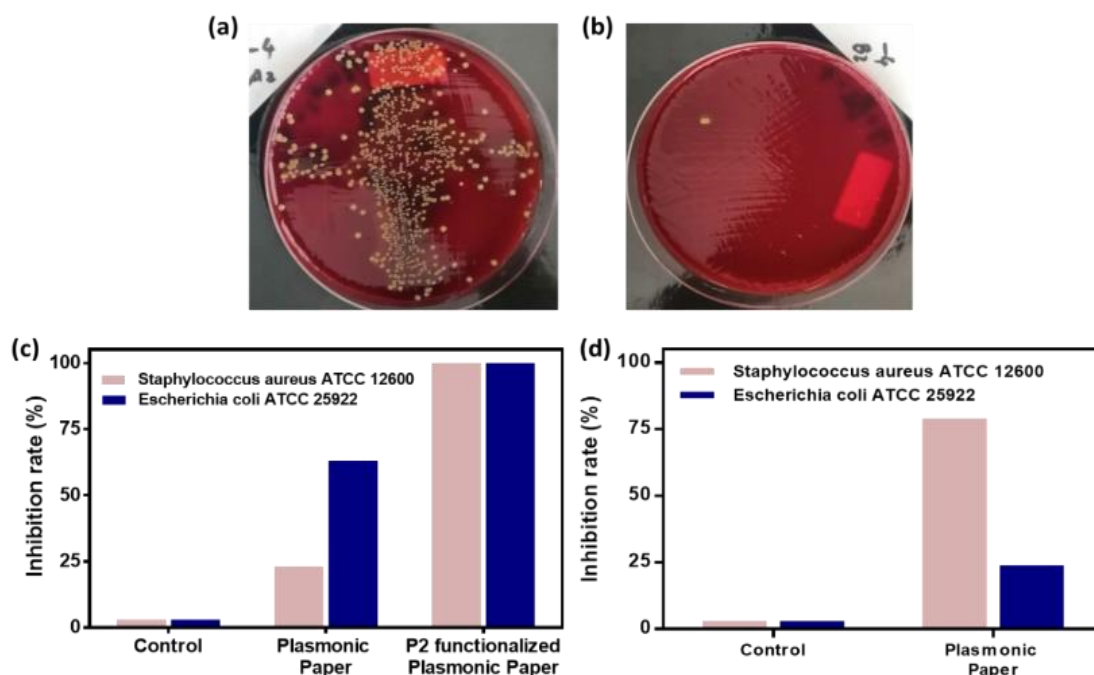
O zonă de inhibare de 5 mm indică absența unei substanțe efective difuzibile antimicrobiene, deoarece cei 5 mm sunt reprezentați de diametrul discului în sine.

**Tabelul 1.** Activitatea antimicrobiană comparativă a diferitelor combinații de discuri înainte și după extracția componentelor active antimicrobiene exprimate prin diametrul inhibiției.

Disc/Peptide	<i>Staphylococcus aureus</i> 12600		<i>Escherichia coli</i> 25922	
	Before Extraction	After Extraction	Before Extraction	After Extraction
Blank/P2 50 mM	5 mm	5 mm	5 mm	5 mm
Plasmonic Paper/0	6 mm	5 mm	6 mm	5 mm
Plasmonic Paper/P2 50 mM	6 mm	5 mm	6 mm	5 mm

În plus, activitatea antimicrobiană diferențială a nanoplatforme noastre plasmonice proiectate, așa cum este documentată în al doilea experiment de numărare a coloniilor, poate fi confirmată vizual prin observarea plăcilor de numărare a coloniilor, așa cum se vede în Figura 14a și b, în prezența funcționalizării P2 hârtie plasmonică creșterea bacteriană este redusă drastic. Pentru a evalua capacitatea fiecărei nanoplatforme pe hârtie de a inhiba în mod eficient creșterea bacteriană, a fost determinat numărul unităților care formează colonii (CFU / mL) și exprimat în continuare ca rate de inhibare procentuală Figura 14. De exemplu, numai hârtia plasmonică determină o reducere a creșterii cu 23% (6 logCFU / mL) a bacteriei *Staphylococcus aureus* 12600, cu toate acestea, activitatea sa anti-bacteriană este mult mai eficientă pentru *Escherichia coli* 25922, ajungând la o rată de inhibare de 63% (6,6 logCFU / mL). După funcționalizarea hârtiei plasmonice cu polipeptida P2, formarea coloniilor bacteriene este total inhibată, rata de

reducere fiind semnificativ îmbunătățită prin atingerea atât a tulpinilor Gram-pozitive cât și a Gram-negative 100% (7 logCFU / mL).



**Figura 14.** Imagini digitale reprezentative ale plăcilor de numărare a coloniilor cu *Staphylococcus aureus* ATCC 12600 care arată activitatea antimicrobiană împotriva bacteriilor planctonice fără (a) și cu hârtia plasmonică funcționalizată P2 (b); Ratele de inhibare a creșterii bacteriene pentru (c) bacterii planctonice și (d) biofilm bacterian determinate pentru nanoplataforma pe bază de hârtie astfel concepută atunci când sunt aplicate atât culturilor bacteriene *Staphylococcus aureus* ATCC 12600, cât și *Escherichia coli* ATCC 25922.

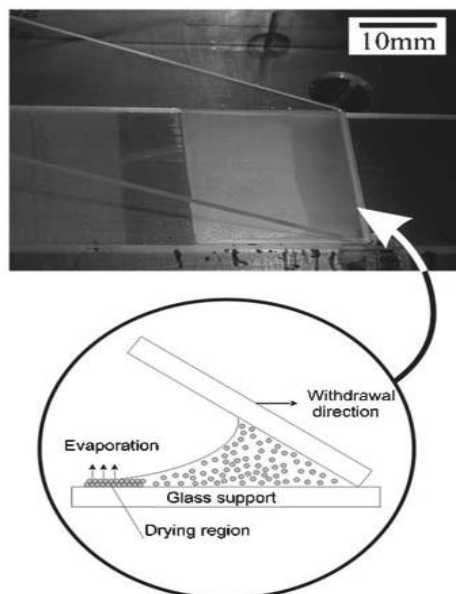
Mai mult, inhibarea creșterii bacteriene a fost testată pentru hârtia plasmonică în timpul formării biofilmului în cazul ambelor tulpini bacteriene. Așa cum era de așteptat, probele martor prezintă o inhibare de 0%, deoarece procesul lor de creștere nu este modificat sau perturbat în niciun fel. În comparație cu activitatea antimicrobiană împotriva bacteriilor planctonice, pentru inhibarea creșterii biofilmului bacterian, hârtia plasmonică este de 3.3 ori mai eficientă împotriva *Staphylococcus aureus* ATCC 12600, atingând o rată de reducere cu 79% comparativ cu 24% împotriva *Escherichia coli* ATCC 25922.

## CAPITOLUL 5: FABRICAREA SUBSTRATELOR SERS PRIN ASAMBLAREA CONVECTIVĂ A MICROSFERELOR DE POLISTIREN

### 5.1. Detalii experimentale

#### 5.1.1 Ansamblu convectiv

Auto-asamblarea convectivă este dezvoltată de grupul <sup>36</sup> al lui Velev. Această tehnică se bazează pe trasarea meniscului către o soluție coloidală/ substrat de sticlă/ interfață de aer pe substrat, lăsând în urma acestuia matrici strânse de coloizi. Timpii de depunere rapidă (cm<sup>2</sup> de cristale coloidale/minute) și controlul asupra numărului de straturi sunt unele dintre numeroasele avantaje oferite de această metodă Figura 15. Trei diametre diferite de sfere de polistiren (PS) au fost utilizate în studiul nostru: 500, 607 și 800 nm.



**Figura 15.** Schema configurației experimentale pentru asamblarea cristalelor coloidale <sup>37</sup>.

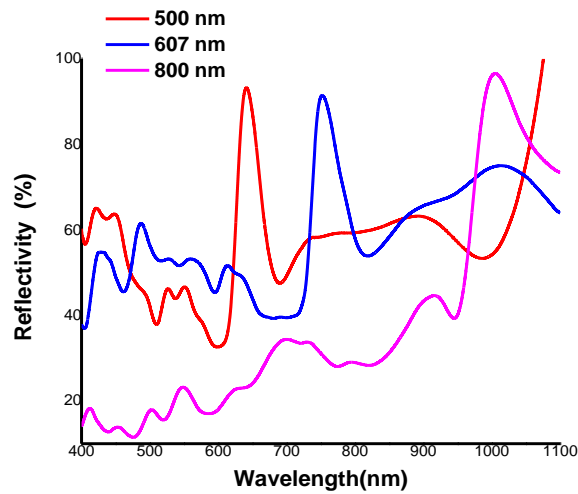
### 5.2. Caracterizarea optică și morfologică a substratelor de sticlă

#### 5.2.1. Rezultatele spectroscopiei UV-Vis

Așa cum este ilustrat în Figura 16, substratele astfel-fabricate au fost caracterizate optic. Cea mai importantă caracteristică a spectrelor de reflectanță este prezența modului de ghid de undă de ordinul întâi, numit și „mod de primă ordine sau rezonanță”. După cum se poate vedea în figura 1 prin săgeți, acestea sunt situate la aproximativ 600, 720 și, respectiv, 980 nm pentru



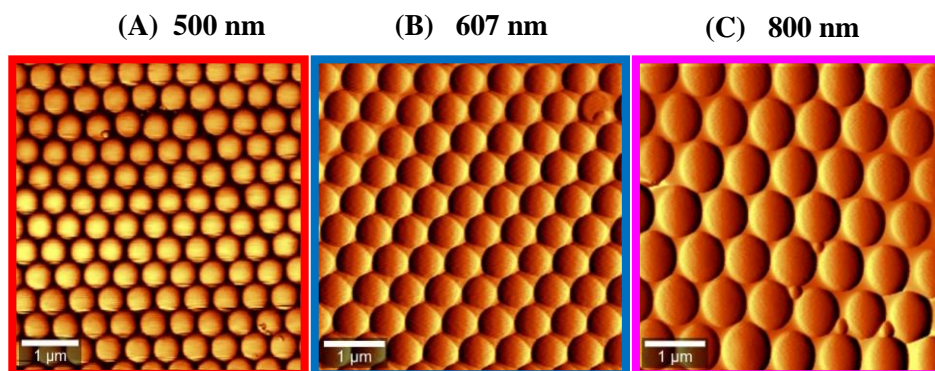
diametre de 500 (spectru roșu), 607 (spectru galben) și 800 nm (spectru roz). Prin urmare, reflectanță acestor microsferă din polistiren prezintă diferite răspunsuri plasmonice.



**Figura 16** Spectrele optice de reflectivitate ale cristalelor monostrat coloidale PS 500, 607, 800 nm.

### 5.2.2. Microscopia de forță atomică (AFM)

Imaginile AFM cu magnificare mai mare din Figura 17 afișează clar faptul că monostratul prezintă o dispunere ordonată hexagonală strânsă a sferelor de polistiren PS. În plus, imaginile arată că matricele PS monostrat prezintă ambalaje hexagonale pe substrat pe o suprafață mare, care contribuie la formarea unei game comandate de înaltă calitate de PS. De asemenea, Figura 17 prezintă imagini AFM ale sferelor PS monostrat cristaline fabricate la diferite volume și viteze de depunere.



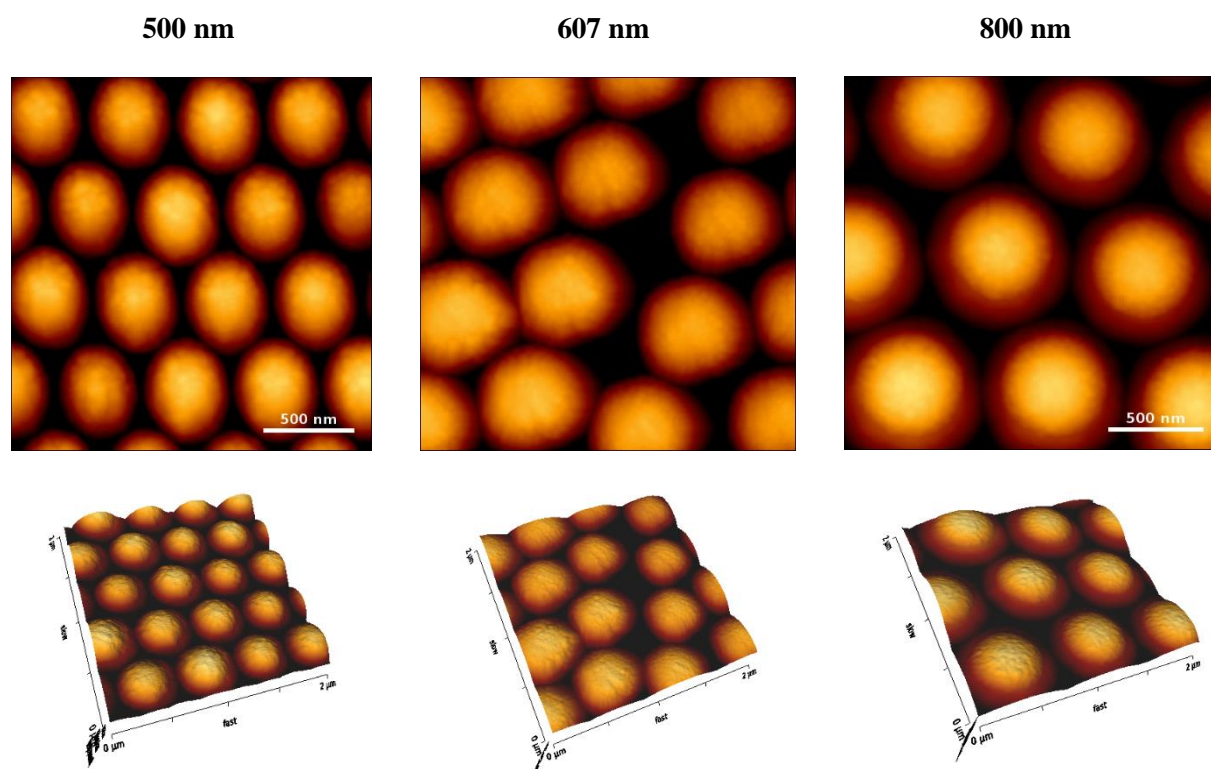
**Figura 17.** Imagini AFM ale monostratului de PS preparat folosind diametre diferite (scală: 1  $\mu\text{m}$ ): (A) 500 nm; (B) 607 nm; (C) 800 nm.

### 5.3. Caracterizarea AFM și SEM a filmelor de argint depuse pe monostraturile coloidale cristaline

Depunerea filmului de Ag utilizat ca substrat SERS a fost efectuată utilizând un sistem de epitaxie cu fascicul molecular-lab (10). Pentru a ne atinge obiectivul, filmul de 60 nm Ag a fost depus pe suprafața de polistiren (500, 607 și 800 nm).

#### 5.3.1. Microscopie de forță atomică (AFM)

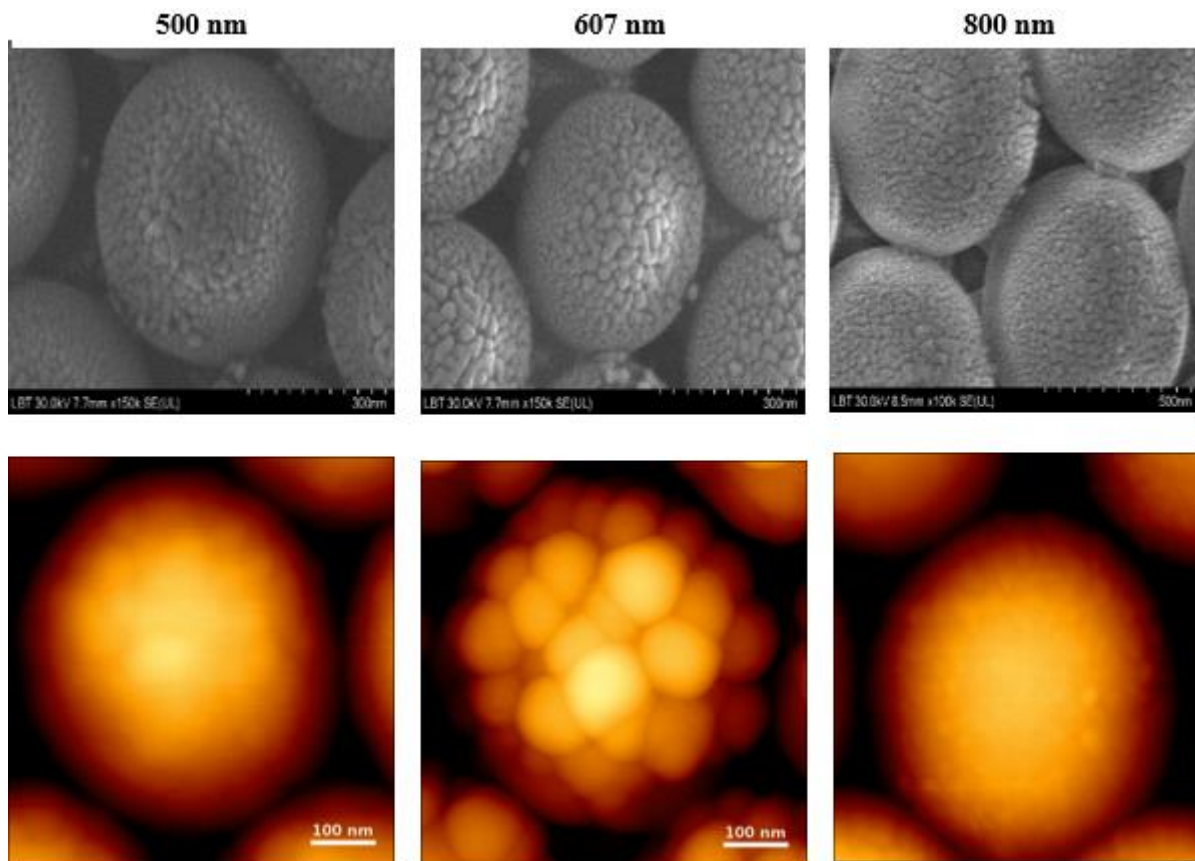
Nanostructurile metalice/ dielectrice rezultate au fost caracterizate prin metoda AFM după depunerea filmului de 60 nm Ag. Mai mult, imaginile AFM din Figura 18 (rândul de sus) arată zone locale distincte produse de prezența particulelor de argint la suprafața materialului, care se află în contrast cu proba de referință care constă din PS pur. Aceasta este o indicație că partea superioară a PS este acoperită de particule de argint care pot interacționa diferit cu suprafața cristalelor. Pe baza imaginilor de sus din Figura 18 (rândul de jos), măsurătorile AFM au dezvăluit prezența unei rugozități scăzute deasupra suprafeței nanocristalelor.



**Figura 18.** Imagini AFM ale monostraturilor de cristal coloidale din sfere PS de 500, 607 și 800 nm acoperite cu sfere de Ag.

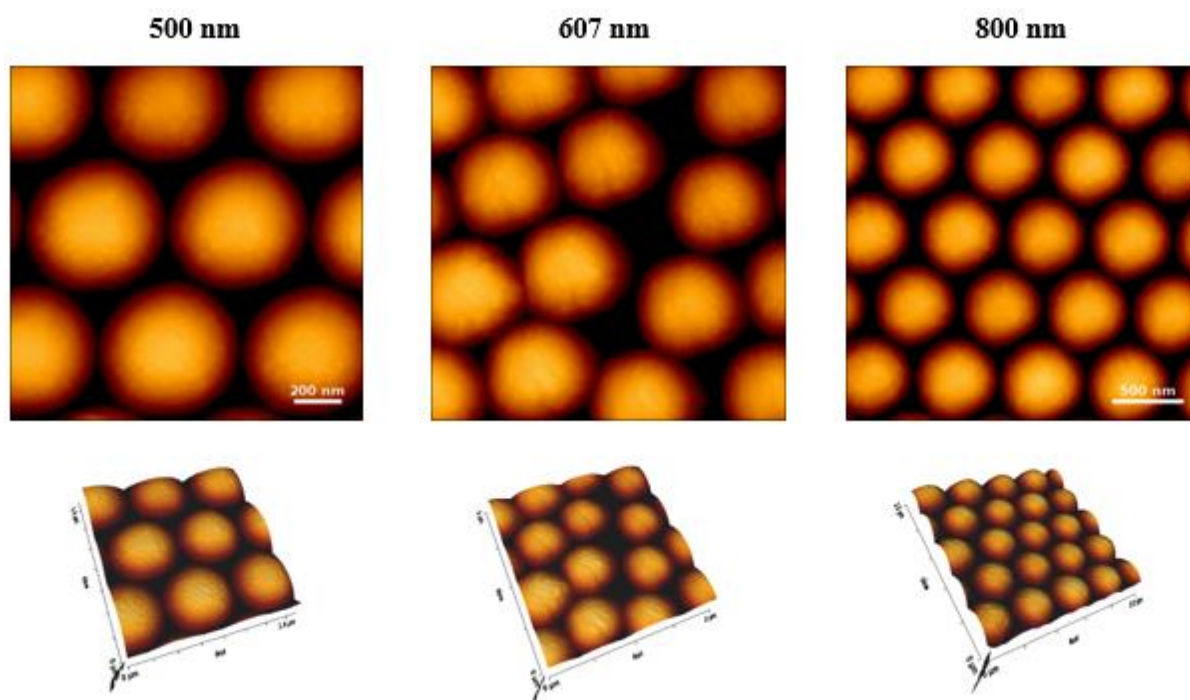
### 5.3.2. Microscopie electronică de baleiaj (SEM)

Așa cum este demonstrat de imaginile SEM din figura 19, observăm ondulație, goluri de dimensiuni nanometrice, vârfuri ascuțite sau creste deasupra cristalelor coloidale, care pot confirma prezența punctelor de amplificare SERS. Câmpurile puternic îmbunătățite și factorii de amplificare SERS sunt promovate în continuare de prezența rugozității la scară nanometrică, cum ar fi marginile, vârfurile, colțurile sau golurile de pe suprafața nanostructurii metalice <sup>38</sup>. Cazul nostru a relevat prezența anumitor compuși anorganici pe suprafața nanocristalelor formate. Mai mult, așa cum se poate observa și în imaginile SEM, cristalele coloidale nu sunt decuplate, ci se formează o punte care interconectează fiecare sferă cu cele de lângă vecinătatea acestora. Pe lângă aceasta, există luminozitate, chiar dacă această luminozitate pe suprafață poate fi atribuită rolului neglijabil al rugozității suprafeței filmului pentru îmbunătățirea SERS. Între timp, imaginea AFM în cazul sferelor de PS cu diametrul de 607 nm sugerează că câmpurile electromagnetice foarte îmbunătățite sunt localizate la marginea de suprafață și la joncțiunile dintre nanocristale, dar întotdeauna între sferele de polistiren acoperite cu argint învecinate. Deoarece nanocristalele sunt aici în contact, așa cum se arată în imaginea AFM pentru sferele cu diametrul de 607 nm, câmpurile electromagnetice locale sunt localizate între microsferile acoperite cu argint.



**Figura 19.** Imagini SEM și AFM ale cristalelor coloidale acoperite cu Ag 60 nm cu diametrele PS de 500, 607 și 800 nm.

Așa cum se arată în Figura 19, imaginile microscopiei electronice de baleiaj și a microscopie de forță atomică arată rugozitatea suprafeței în partea de sus a diferitelor diametre de PS 500, 607, 800 nm. Pe baza tuturor acestor observații și a remarcilor prezentate în această lucrare, am decis să continuăm pașii următori ai acestui studiu, concentrându-ne pe nanocristale realizate cu microsferă de 607 nm acoperite cu film de Ag 60 nm.



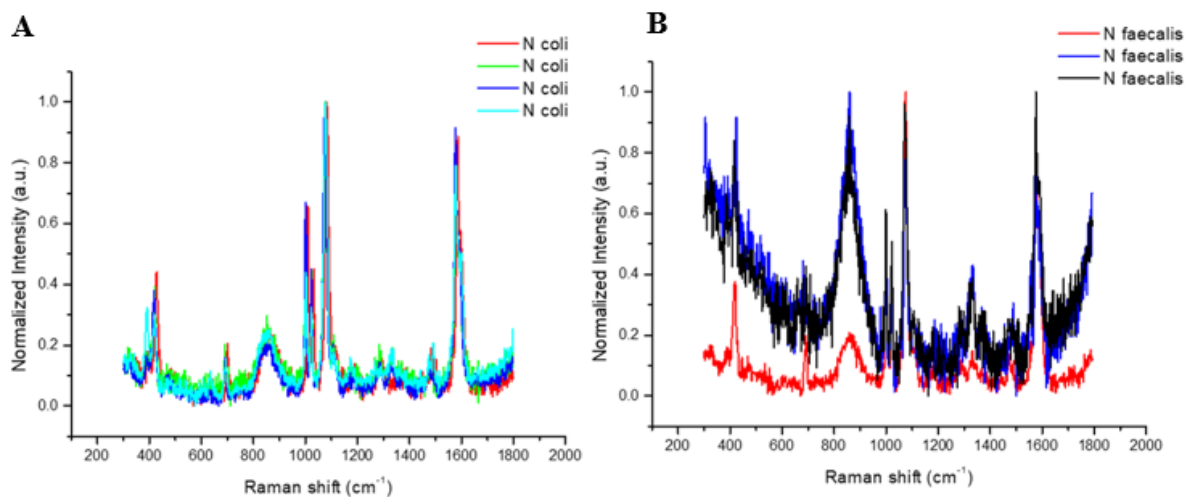
**Figura 20.** Imagini AFM ale monostratelor de cristale coloidale acoperite cu argint (grosimi de 30, 60 și 90 nm) din sfere PS cu diametrul de 607 nm.

De fapt, substratele SERS fabricate pe cristale coloidale auto-asamblate relevă că proprietățile plasmonice și SERS ale acestor substraturi sunt determinate de mărimea șabloanelor coloidale utilizate și de grosimea filmului metalic depus.

#### **5.4 Evaluarea activității SERS și detectarea *Escherichia Coli* și *Enterococcus faecalis***

În acest scop, am testat mai multe substraturi active SERS pentru detectarea a două specii de bacterii reprezentative, și anume *Escherichia coli* Gram-negativă (*E. coli*) și, respectiv, *Enterococcus faecalis* Gram-pozitiv (*E. faecalis*). În acest scop, moleculele de 4-MPBA au fost adsorbite pe aceste trei substraturi acoperite cu un film de 60 nm de Ag (500, 607 și 800 nm diametru al microsferelor de polistiren). Figura 21 prezintă reproductibilitatea spectrelor SERS ale *E. coli* și respectiv *E. faecalis*. Toate spectrele înregistrate au fost normalizate în conformitate cu intensitatea celei mai intense benzi după scăderea liniei de bază. Pentru a demonstra reproductibilitatea punct-cu-punct, au fost achiziționate mai multe spectre din diferite locații ale aceluiași eșantion. Acest spațiu dintre nanocapurile de argint poate fi între 50 și 150 nm, care este mult mai mic decât cel al unei bacterii (scară micrometrică), asigurându-se astfel că bacteriile capturate sunt întinse pe suprafața <sup>40</sup>. Se știe că rugozitatea suprafeței metalice poate îmbunătăți dramatic împrăștierea Raman a moleculelor adsorbiți pe suprafața <sup>41-</sup>

<sup>42</sup>. Prin urmare, am ajuns la concluzia că activitatea SERS a substratelor noastre este susținută în principal de zone electromagnetice situate la dispunerea neomogenă a particulelor de argint, precum și între nanocapurile metalice din partea superioară a matricelor de microsfele.



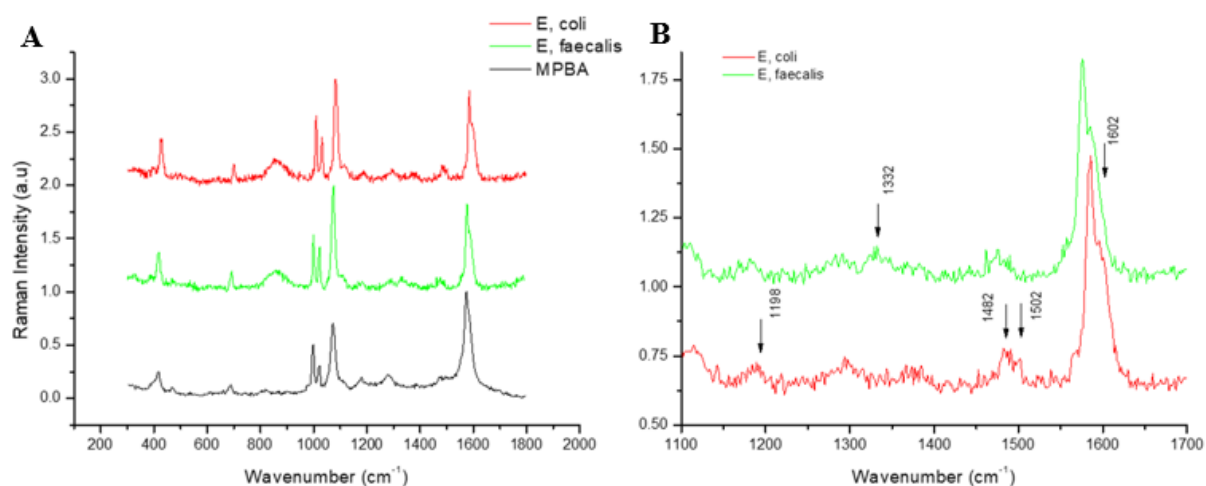
**Figura 21.** Reproducibilitatea spectrelor SERS ale *E. Coli* (A) și *E. faecalis* (B) achiziționate din diferite puncte pe substrat.

Pentru a valida conceptul, am ales detectia a două specii de bacterii reprezentative, *Escherichia coli* Gram-negativă (*E. coli*) și, respectiv, *Enterococcus faecalis* Gram-pozitiv (*E. faecalis*). Această activitate SERS a fost evaluată mai întâi prin detectia de 4-MPBA ca molecule de biorecunoaștere și reporter Raman. Gruparea acidului boronic din 4-MPBA se va lega de peptidoglican de peretele celular al bacteriei <sup>43</sup>. În etapa de detecție SERS, 4-MPBA care acționează ca reporter Raman furnizează un semnal Raman puternic. În prezent, amprentele Raman ale 4-MPBA arată corespunzător modificărilor atunci când bacteriile sunt depuse pe substrat. Acest lucru poate fi folosit pentru a discrimina diferitele tipuri de bacterii. Mai mult, am investigat eficiența biosenzorului nostru prin compararea spectrelor SERS ale ambelor bacterii în prezența moleculei de 4-MPBA. Acest spectru SERS reprezintă o suprapunere a vibrațiilor moleculare ale compușilor celulari specifici <sup>44</sup>.

Figura 22A prezintă asocierea spectrelor SERS colectate de pe acele substraturi cultivate cu două specii bacteriene (*E. coli* Gram negativă și *E. faecalis* Gram pozitivă) împreună cu spectrul de referință colectat de pe substratul funcționalizat cu biomolecule de 4-MPBA. Se poate vedea că compușii și arhitectura învelișului bacterian sunt foarte diferite între bacteriile gram-pozitive și gram-negative <sup>45</sup>.

Putem observa cu ochiul liber că ambele bacterii prezintă spectre aproape identice, în caz contrar, benzile Raman de 4-MPBA sunt prezente printre componentele spectrelor SERS

colectate de la două bacterii. Există încă diferențe minore între cele două tulpini în intervalul de benzi de la 1100 la 1700  $\text{cm}^{-1}$ , după cum se poate vedea în Figura 22B, o vizualizare marita arată această bandă largă la 1602  $\text{cm}^{-1}$  și aceste trei vârfuri la numerele de undă 1198, 1482 și 1502  $\text{cm}^{-1}$  <sup>46-50</sup> au fost observate în spectrul *E. coli*. Mai mult, o singură bandă localizată la 1602  $\text{cm}^{-1}$  (C = C), corespunzătoare inelului de vibrație fenilalanină care aparține *E. coli* poate fi observată <sup>51-53</sup>. Datorită aspectului acestei benzi, putem confirma prezența *E. coli*. În timp ce, o singură bandă la 1332  $\text{cm}^{-1}$  atribuită – C – vibrații de întindere de fenil aparține în mod special de *E. faecalis*. În consecință, am remarcat că banda care rezultă din 4-MPBA nu interferează cu benzile reprezentative de amprente bacteriene în intervalul cuprins între 1100 și 1700  $\text{cm}^{-1}$ . Cu toate acestea, o analiză statistică specifică este în progres pentru a distinge astfel de diferențe minore între spectrele SERS.



**Figura 22.** (A) Semnalul Raman al *Escherichia coli* (*E. coli*), *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) și acid 4-mercaptofenilboronic (4-MPBA); (B) benzile specifice *E.coli* și *E. faecalis*.

## ***CONCLUZII și PERSPECTIVE***

- Am reușit să sintetizez soluții coloidale de AuNR reproductibile prin abordarea de creștere mediată de germeni. Procesul auto-asamblării a fost inițiat prin schimbarea pH-ului la 3.1 și urmată de adăugarea moleculei de cisteină (Cys) și monitorizarea în timp real (de la minute până la o oră) a imaginilor microscopiei electronice de transmisie (TEM). Rezultatele confirmă formarea de lanțuri lungi de AuNR cu un răspuns plasmonic în NIR (aproape în infraroșu apropiat) mai intens. Mai mult, prezența punctului izosbestic observat la 834 nm sugerează prezența AuNR izolate și asamblate.
- Distribuția câmpului electromagnetic la suprafața AuNR individuale și asamblate cap-la-cap a fost evaluată prin simulări efectuate cu metoda Diferențelor Finite în Domeniul Temporal (FDTD) și ne-am dat seama că rezultatele teoretice FDTD se suprapun cu rezultatele optice obținute experimental.
- În plus, câmpurile electromagnetice intense localizate în spațiul dintre nanoparticulele legate au fost dovedite prin experimentele SERS folosind ca analit molecula de para-aminotiofenol (p-ATP) pentru a demonstra un factor de amplificare mai mare în raport cu AuNR individuale.
- Lucrările viitoare ar putea implica studiul evoluției cuplării în timp și localizarea semnalului SERS în lanț în timpul de evoluție.
- Am combinat sinergic avantajul nanosferelor de aur încărcate pozitiv immobilizate electrostatic pe o hârtie Whatman, ca transductori plasmonici miniaturizați, cu polipeptida sintetică RRWHRWWRR-NH<sub>2</sub>, ca peptidă antimicrobiană, pentru a obține o nanoplatformă eficientă capabilă să inhibe atât activitatea microbiană, cât și formarea biofilmului corespunzător celor două tulpini bacteriene de referință: *Staphylococcus aureus* ATCC 12600 și, respectiv, *Escherichia coli* ATCC 25922.
- Activitatea antimicrobiană a polipeptidei sintetice speciale RRWHRWWRR-NH<sub>2</sub> pe hârtia plasmonică ficționalizată asupra bacteriilor planctonice și biofilmelor a fost testată împotriva a două tulpini de referință: Bacterii Gram-pozitive *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) și



bacteriile Gram-negative *Escherichia coli* (*E. coli*) determinând inhibarea microbiană de până la 100% pentru bacteriile planctonice.

- Am fabricat trei tipuri de substraturi folosind nanosfere cu diametre de 500, 607 și 800 nm la început. În plus, am folosit un sistem de epitaxie cu fascicul molecular (MBE) pentru a depune nanoparticule de argint de 60 nm. Am demonstrat, de asemenea, pe baza rezultatelor obținute prin imagini SEM și AFM, că substratul 607 nm după procesul de depunere a particulelor de argint ne-a atras mai mult atenția datorită rugozității sale de suprafață marcate de ondulație, goluri de dimensiuni nanometrice, vârfuri ascuțite sau creste situate deasupra cristalelor coloidale care indică prezența punctelor de tip “hot spot” SERS.
- După scăderea semnalului corespunzător 4-MPBA din fiecare probă (*E. faecalis* și *E. coli*) semnalul Raman rezultat arată benzile specifice până la valorile pozitive ale *E. coli* și valorile negative ale *E. faecalis*. Rezultatele obținute arată benzile specifice pentru *E. coli* și *E. faecalis*. Având în vedere faptul că molecula de 4-MPBA ar putea oferi probabil informații despre eventuala prezență a ambelor specii de bacterii, aceasta poate fi utilizată pentru a discrimina sau caracteriza tulpinile utilizând platforma noastră propusă.

Studiile viitoare implică optimizarea pregătirii substraturilor și caracterizarea suplimentară pe probele cu 4-MPBA. Ar fi interesant să testăm această abordare și să verificăm fezabilitatea discriminării sau identificării clare a fiecărei tulpini bacteriene.

## **REFERINȚE**

- [1] Daniel M. C., D. Astruc., Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. *Chem. Rev.* 104, 293-346 (2004).
- [2] Warner M. G., HUTCHISON J. E., în *Synthesis, Functionalization and Surface treatment of nanoparticles* (Ed.M.-I. BARATON), American Scientific Publishers: Stevenson Ranch, California, Chapter 5, p. 67 (2003)
- [3] Giulio F. P., David G. I. K., and Lawrence. T., Colloidal Gold Nanoparticles: A Novel Nanoparticle Platform for Developing Multifunctional Tumor-Targeted Drug Delivery Vectors. *Drug Dev. Res.* 67:47–54, (2006).
- [4] Willets K. A., Van Duyne R. P., Localized surface plasmon resonance spectroscopy and sensing. *Annual Review of Physical Chemistry, Annual Reviews, Palo Alto.* 58, 267–297 (2007).
- [5] Anker J. N., Hall W. P., Lyandres. O., Shah N. C., Zhao. J., Van Duyne R. P., Biosensing with plasmonic nanosensor. *Nature Materials.* 7, 442–453 (2008).
- [6] Lin S.Y., et al., *J. Phys. Chem. B* 108, 2134 (2004).
- [7] Kreibig. U. and Vollmer. M., *Optical Properties of Metal Cluster.* Springer, Berlin, (1995).
- [8] Niemeyer C. M., Nanoparticles, proteins, and nucleic acids: biotechnology meets materials science. *Angew. Chem. Int. Ed.* 113 (22), 4128-4158 (2001). Functional hybrid devices of proteins and inorganic nanoparticles. *Angew. Chem. Int. Ed.* 42 (47), 5796-5800 (2003).
- [9] Katz. E., Willner. I., Integrated nanoparticle-biomolecule hybrid systems: synthesis, properties, and applications. *Angew. Chem. Int. Ed.* 43 (45), 6042-6108 (2004).
- [10] Katz. E., Shipway A. N., Willner. I., Biomaterial-nanoparticle hybrid systems: Synthesis, proprieties and applications în *Nanoparticles from Theory to Applications* (Ed.: G. SCHMID), Wiley-VCH, Weinheim. 368-421 (2003).
- [11] Parak. W., Gerion J. D., Pellegrino. T., Zanchet. D., Micheel. C., Williams S. C., Boudreau. R., Le Gros M. A., Larabeil C. A., Alivisatos A. P., Biological applications of colloidal nanocrystals. *Nanotechnology.* 14 (7), R15-R17 (2003).
- [12] Sak C. A., Maubach. G., Born. D., Reichert. J., Fritzsche. W., DNA-based molecular nanotechnology. *Single Mol.* 3 (5-6), 275-280 (2002).
- [13] Penn S. G., Hey. L., Natan M. J., Nanoparticles for bioanalysis. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 7 (5), 609-615 (2003).
- [14] West J. L., Halas N. J., Engineered nanomaterials for biophotonics applications: improving sensing, imaging, and therapeutics. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 5, 285-292 (2003).
- [15] Alivisatos A. P., The use of nanocrystals în biological detection. *Nat. Biotechnol.* 22, 47-57 (2004).
- [16] Verma. A., Rotello V. M., Surface recognition of biomacromolecules using nanoparticles receptors. *Chem. Commun.* 3, 303-312 (2005).
- [17] Antonii. F., *Panacea aurea-auro potabile.* Hamburg: Ex Bibliopolio Frobeniano, 250 (1618).
- [18] Dreifuss. T., Barnoy. E., Motiei. M., Popovtzer. R., Bulte. J. Modo. M. (eds.) *Theranostic Gold Nanoparticles for CT Imaging In: Design and Applications of Nanoparticles în Biomedical Imaging.* Springer International Publishing, Cham, pp. 403-427 (2017).
- [19] Dreaden E. C., Alkilany A. M., Huang. X., Murphy C. J., El-Sayed M. A., The golden age: gold nanoparticles for biomedicine. *Chemical Society Reviews.* 41 (7), 2740-2779 (2012a).
- [20] Pietro G. G., Marc L. C., and Nathalie. L-G., *Handbook of Enhanced Spectroscopy,* (2016).
- [21] Huang. X., Neretina. S., El-Sayed M. A., Gold nanorods: from synthesis and properties to biological and biomedical applications, *Advanced Materials.* 21, 4880–4910 (2009).

- [22] Jana N. R., Gearheart. L., Murphy C. J., Seed-mediated growth approach for shape-controlled synthesis of spheroidal and rod-like gold nanoparticles using a surfactant template. *Advanced Materials*. 13, 1389–1393 (2001).
- [23] Zheng. Y., Zhong X., Li. Z., Xia Y., Successive, Seed-Mediated Growth for the Synthesis of Single-Crystal Gold Nanospheres with Uniform Diameters Controlled in the Range of 5–150 nm. *Particle & Particle. Systems. Characterizations*. 31, 266-273 2014,
- [24] Prevo B. G., O. D. Velev, Controlled Rapid Deposition of structured Coatings from Micro-and Nanoparticle Suspensions, *Langmuir* 20, 2099 (2004).
- [25] Nikoobakht. B., El-Sayed M. A., *J. Phys. Chem. A* 107, 3372-3378 (2003).
- [26] Nikoobakht. B., and El-Sayed M. A., Preparation and growth mechanism of gold nanorods (NRs) using seed-mediated growth method. *Chem. Mater.* 15, 1957, 62 (2003).
- [27] Haidar. I., Aubard. J., Lévi. G., Lau-Truong. S., Mouton. L., Neuville D. R., Félidj N. B-L. L., Design of stable plasmonic dimers in solution: importance of nanorods aging and acidic medium, *J. Phys. Chem. C*. 58, 119 23149 (2015).
- [28] Jain P. K., Eustis. S., and El-Sayed M. A., Plasmon coupling in nanorod assemblies: optical absorption, discrete dipole approximation simulation, and exciton-coupling model. *J. Phys. Chem. B* 53, 110 18243(2006).
- [29] Funston A. M., Novo. C., Davis T. J., and Mulvaney. P., Plasmon coupling of gold nanorods at short distances and in different geometries, *Nano Lett.* 8, 9 1651 (2009).
- [30] Mie. G., Beiträge zur Optik trüber Medien, speziell kolloidaler Metallösungen. *Annalen der Physik*. 330, 377–445 (1908).
- [31] Bacalum. M., Janosi. L., Zorila. F., Tepes A.-M., Ionescu. C., Bogdan. E., Hadade. N., Craciun. L., Grosu. I., Turcu. I., et al., Modulating short tryptophan- and arginine-rich peptides activity by substitution with histidine. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1861, 1844–1854 (2017).
- [32] Tsai T.-T., Huang T.-H., Chang C.-J., Ho N.Y.-J., Tseng Y.-T., Chen C.-F., Antibacterial cellulose paper made with silver-coated gold nanoparticles. *Sci. Rep.* 7, 3155 (2017).
- [33] Zheng. Y., Zhong. X., Li. Z., Xia. Y., Successive, Seed? Mediated Growth for the Synthesis of Single? Crystal Gold Nanospheres with Uniform Diameters Controlled in the Range of 5–150 nm. *Part. Part. Syst. Charact.* 31, 266–273 (2013).
- [34] Lantigua. D., Kelly Y. N., Unal. B., Camci-Unal. G., Engineered Paper-Based Cell Culture Platforms. *Advanced Healthcare Materials*. 6, 1700619 (2017).
- [35] Pinto R. J. B., Marques P. A. A. P., Barros-Timmons A. M., Trindade. T., Neto, C.P. Novel SiO<sub>2</sub>/cellulose nanocomposites obtained by in situ synthesis and via polyelectrolytes assembly. *Composites Science and Technology*. 68, 1088–1093 (2008).
- [36] Li Y. Q., Zhu. B., Li. Y., Leow W. R., Goh. R., Ma. B., Fong. E., Tang. M., Chen. X., *Angew. Chem. Int. Ed.* 53, 5837-5841(2014); *Angew.Chem.* 126, 5947-5951 (2014).
- [37] Dimitrov A. S., Nagayama. K., *Chem. Phys. Lett.* 243, 462-468 (1995).
- [38] Caldwell J. D., Glembocki O. J., Bezares F. J., Kariniemi M. I., Niinisto J. T., Hatanpaa T. T., Rendell R. W., Ukaegbu. M., Ritala M. K., Prokes S. M., Hosten C. M., Leskela M. A., Kasica. R., *Opt. Express*. 19, 26056 (2011).
- [39] Sau T. K., Rogach A. L., Jäckel. F., Klar T. A., Feldmann. J., *Adv. Mat.* 22, 1805 (2010).
- [40] Kirchoff. J., Glaser. U., Bohnert. J. A., Pletz. M., Popp. J., Neugebauer. U., Simple ciprofloxacin 389 resistance test and determination of minimal inhibitory concentration (MIC) within two hours using 390 Raman spectroscopy. *Anal. Chem.* 90, 1811–1818 (2018).
- [41] Harz. A., Rosch. P., Popp. J., *Cytometry Part A*, 75, 104-113 (2009).

- [42] Kirschner. C., Maquelin. K., Pina. P., Thi. N. A. N., Choo-Smith. L. P., Sockalingum G. D., Sandt C., Ami. D., Orsini. F., Doglia. S. M., Allouch. P., Mainfait. M., Puppels. G. J., Naumann. D., Journal of Clinical Microbiology. 39, 1763-1770 (2001).
- [43] Notingher, I. Sensors. 7, 1343-1358 (2007).
- [44] Notingher. I., Verrier. S., Romanska. H., Bishop A. E., Polak J. M., Hench L. L., Spectroscopy-an International Journal. 16, 43-51 (2002).
- [45] Puppels G. J., Demul F. F. M., Otto. C., Greve. J., Robertnicoud. M., Arndtjovin D. J., Jovin T. M., Nature. 347, 301-303 (1990).

## **LISTA PUBLICAȚIILOR**

### ***Lucrări științifice publicate în reviste cotate ISI***

**Leopold Tie**, Monica Focsan, Jocelyne Bosson, Cristian Tira, Andreea Campu, Adriana Vulpoi and Simion Astilean, *Controlling the end-to-end assembly of gold nanorods to enhance the plasmonic response in near infrared*. **Material Research Express**. 6 (2019) 095038.

**Leopold Tie**, Mina Raileanu, Mihaela Bacalum, Irina Codita, Stefania Madalina Negrea, Costin Stefan Caracoti, Elena-Carmina Dragulescu, Andreea Campu, Simion Astilean and Monica Focsan, *Versatile Polypeptide-Functionalized Plasmonic Paper as Synergistic Biocompatible and Antimicrobial Nanoplatform*. **Molecules**. 25 (2020) 3182.

### ***Lucrări științifice în curs de pregătire***

**Leopold Tie**, Alia Colniță, Daniel Marconi, Ioana Brezeștean, Lucian Barbu-Tudoran, Tiberiu Szöke-Nagy, Bogdan Cozar, Ioan Turcu, Simion Astilean and Monica Focsan, *Fabrication of SERS Substrates by Convective Assembly of Polystyrene Microspheres*.

## **Conferințe**

*Controlling the end-to-end assembly of gold nanorods to enhance the plasmonic response in near infrared*, **Leopold Tie**, Monica Focsan, Jocelyne Bosson, Cristian Tira, Andreea Campu, Adriana Vulpoi and Simion Astilean. The Sixth International Workshop on Advanced Nano- and Biomaterials and Their Device Applications French-Romanian Topical Meeting on Nano and Biomaterials “NABM 2019” Cluj-Napoca, România, 12–16 May 2019, **Prezentare Orală**.

*Designing Plasmonic Nanostructure for Biosensing Applications by Optical Spectroscopy*, **Leopold Tie**, Alia Colniță, Daniel Marconi, Ioana Brezeștean, Lucian Barbu-Tudoran, Tiberiu Szöke-Nagy, Bogdan Cozar, Ioan Turcu, Simion Astilean and Monica Focsan. Conference of Doctoral Students from the University Consortium, 26-28 September 2019, București, România, **Prezentare Orală**.

*Controlling the end-to-end assembly of gold nanorods to enhance the plasmonic response in near infrared*, **Leopold Tie**, Monica Focsan, Jocelyne Bosson, Cristian Tira, Andreea Campu, Adriana Vulpoi and Simion Astilean. The 15<sup>th</sup> Edition of International Conference on Analytical and Nanoanalytical Methodes for Biomedical and Environmental Sciences “IC-ANMBES 2018” Brașov, România, 23 – 25 May 2018, **Prezentare Poster**.

## ***MULȚUMIRI***

Îi dedic în primul rând teza Domnului meu, care a fost și este cu mine până la sfârșitul acestui studiu.

Aș dori să mulțumesc conducătorului meu Prof. Dr. Simion Aștilean pentru că m-a acceptat să fac parte din echipa sa excelentă. El și-a direcționat cu adevărat toate eforturile spre mine pentru a-mi oferi facilitățile de cercetare în aceste domenii ale fotonicii și plasmonicii. Dincolo de toate acestea, el și-a făcut datoria de tată față de mine.

Aș dori să mulțumesc CS I. Habil. Dr. Monica Focșan pentru că m-a angajat în proiectul ei și m-a învățat multe lucruri despre cercetarea în acest domeniu. M-a ținut de mâini să urc treptele în aceste domenii moderne, ca un copil mic ce învață să meargă pas cu pas. Aș dori, de asemenea, să-mi exprim recunoștința față de Prof. Dr. Mihai Todică și Conf. Dr. Dana Maniu pentru toată atenția și contribuția lor la realizarea acestei lucrări.

Îi mulțumesc colegii mele Dr. Andreea Câmpu pentru ajutorul oferit, mai ales în redactarea articolelor și a experimentelor de laborator. Le mulțumesc tuturor colegilor mei, Dr. Monica Potara, Dr. Ana-Maria Crăciun, Dr. Timea Nagy-Simon, Dr. Sorina Suărășan, Dr. Sanda Boca-Farcău, Dr. Andra-Sorina Tătar, Drd. Raluca Ghiman, Drd. Raluca Borlan, Drd. Laurențiu Șușu, Drd. Alexandru Hada. Aș dori să le comunic faptul că fiecare dintre ei a contribuit mult la succesul meu.

Mulțumesc și prietenilor mei Drd. Jucan Darius, Drd. Isirabahenda Gonzague, Cornel, Dr. Popa Daniela, Dr. Ioan Botiz, Bogdan Marta, Drd. Cristian Țira și familia Zie și Toh bi pentru încurajări, finanțe și sprijin prin rugăciune.

Îi sunt recunoscătoare soției mele Mathilde Tie pentru marea răbdare, sprijinul și toleranța în acele vremuri în care am lipsit și nu uit de pastorii mei și de toți membrii bisericii pentru toate lucrurile pe care le-au făcut pentru mine.

Nu în ultimul rând, trebuie să le mulțumesc tatălui și mamei mele pentru sprijinul acordat în timpul studiilor mele și pentru înțelegerea lor pentru puținul timp pe care l-am putut petrece cu ei când, deși am fost prezent, am fost absent din cauza educației mele.