



**UNIVERSITATEA BABEŞ-BOLYAI**  
**FACULTATEA DE FIZICĂ**  
**SCOALA DOCTORALĂ DE FIZICĂ**



**De la nanoparticule clasice de metal nobil  
la nanoplatforme controlate  
pentru biodetecție ultrasenzitivă SERS**

**Rezumatul tezei doctorale**

**Coordonator științific:**  
**Prof. Dr. Leontin David**

**Doctorand:**  
**Ioana Andreea Brezeştean**

**Cluj-Napoca**

**2022**

## Cuprins

Introducere.....	3
Capitolul I. Utilizarea tehnicilor vibraționale în detecția de biomolecule complexe, bacterii și secrețiile acestora.....	6
I.1 Studiul spectroscopic al exopolizaharidelor ca potențiale bioresurse.....	6
I.1.1 Studiul Raman al Exopolizaharidelor .....	6
I.1.2 Studiul FT-IR al Exopolizaharidelor .....	10
Capitolul II. Utilizarea SERS a nanoparticulelor de argint obținute prin reducere chimică.....	12
II.1 Detecția speciilor anorganice și a sărurilor din ape minerale naturale prin spectroscopia Raman .....	12
II.2 Analiza SERS a apelor minerale .....	14
II.3 Nanoparticule coloidale de argint pentru detecția microorganismelor acvatice.....	16
II.3.1 Analiza Raman al lotului de cultură de microorganisme acvatice.....	17
II.3.2 Analiza SERS a microorganismelor acvatice în soluție.....	18
II.3.3 Analiza Raman și SERS pe o singură celulă .....	20
II.3.4 Detecția SERS a fucoxantinului: cuantificarea carotenoidului în celule vii de diatomee <i>C. closterium</i> .....	22
III. Nanoplatforme structurate pentru detecție SERS eficientă .....	24
III.1 Nanoplatforme 3D fabricate prin nanolitografie.....	24
III.2 Detecția cianotoxinei Nodularin .....	29
III.2.1. Analiza Raman a cianotoxinei Nodularin prin DCRD (Drop Coating Raman Deposition) .....	30
III.2.2 Detecția SERS a cianotoxinei Nodularin .....	32
III.3 Nanoparticule de argint coloidal autoasamblate pe substrat solide.....	34
III.3.1 Detecția SERS a fungicidului tiabendazol .....	36
III.3.2 Detecția SERS a insecticidului endosulfan .....	38
Concluzii finale.....	42
Bibliografie.....	44
Anexa 1. Diseminarea rezultatelor.....	52

**Cuvinte cheie:** *Raman, SERS, filme subțiri de argint, toxine marine, microorganisme acvatice, nanostructuri ordonate periodic, pesticide*

## Introducere

Metodele de spectroscopie vibrațională au atras un interes considerabil în diverse domenii de cercetare precum: medicina, industria farmaceutică, științele mediului și chiar industria alimentară datorită multiplelor avantaje pe care le au față de metodele convenționale. Spectroscopia Raman împreună cu cele mai noi dispozitive tehnologice este unul dintre cele mai utile instrumente pentru obținerea de informații specifice structurii și proprietăților compușilor biomoleculari cum ar fi carotenoizi, cianotoxine, toxine sau poluanți din mediu.

În acest context științific, prezenta teză de doctorat își propune să abordeze diverse metode de sintetizare atât a suspensiilor coloidale (AgNPs) cât și a Argintului (Ag) sub formă de filme subțiri depuse pe suprafețe ordonate periodic. Aplicațiile SERS dezvoltate cu aceste substraturi au fost utilizate pentru detecția de diferite molecule plecând de la cianobacterii detectate în ape, la diatomee și ajungând până la detecția de cianotoxine și pesticide.

În cadrul acestei lucrări de doctorat, am exploatat avantajele metodelor spectroscopice ultrasenzitive pornind de la tehnica Raman și ajungând la spectroscopia Raman amplificată de suprafață (SERS). Astfel, am detectat și identificat cianobacterii, cianotoxine și pesticide folosind AgNPs și am dezvoltat noi substraturi SERS accesibile, ieftine și ușor de implementat în aplicații de interes precum protecția mediului.

Pentru a avea o viziune de ansamblu asupra considerațiilor teoretice ale efectului Raman și a tehnicilor complementare deja cunoscute și bine descrise, în literatura de specialitate, **Capitolul I** prezintă și discută teoria Raman clasică și cuantică împreună cu evoluția acesteia. Spectroscopia Raman amplificată de suprafață (SERS) este introdusă și sunt prezentate tipuri de substraturi în aplicații SERS.

**Capitolul II** prezintă utilizarea spectroscopiei Raman și a spectroscopiei în infraroșu cu transformată Fourier (FT-IR) în monitorizarea în timp real a componentele exopolizaharidelor (EPS) purificate din specia *Arthrospira platensis* (cunoscută și ca *Spirulina sp.*). Au fost raportate spectrele preliminare pentru EPS în comparație cu molecula de dextran. Am atribuit în mod cuprinzător benzile Raman și IR înregistrate și observate pentru EPS extrase din *A. platensis*. Am coroborat rezultatele experimentale cu studii recente care au raportat specii de zaharide similare, utilizând spectroscopia Raman.

**Capitolul III** prezintă utilizarea tehnicii SERS pentru detecția sărurilor anorganice din apele minerale de izvor, care au fost evaluate cu ajutorul AgNPs și agregarea acestora în funcție de timp în prima parte. În a doua parte a capitolului sunt prezentate studii privind interfața dintre

AgNPs și diatomeele *Cylindrotheca closterium* ușor silicificate *in vivo*, atât în cultura de celule, cât și la nivelul unei singure celule. S-au detectat acizi grași polinesaturați împreună cu markeri SERS specifici carotenoidelor și clorofilelor. Spectrele de rezonanță Raman de rezonanță (RR) și de împrăștiere Raman de rezonanță îmbunătățită de suprafață (SERRS) ale fucoxantinei au fost investigate în funcție de concentrație, pentru a prospecta capacitatea tehnicilor de estimare cantitativă a carotenoidului în speciile de diatomee vii, *Cylindrotheca closterium*.

**Capitolul IV** prezintă nanoplatforme paternate pentru detecția SERS a unor molecule de interes din mediu. În prima parte sunt prezentate nanoplatforme 3D fabricate prin nanolitografie, studiul având ca și scop dezvoltarea unor substrate cu un mare potențial ca platforme de detecție SERS. Acestea s-au fabricat prin litografie prin nanoimprimare (NIL) în plastic și au fost acoperite cu filme de Ag cu grosimi de 10-100 nm prin depunere în curent continuu (DC). S-a evaluat contribuția nanostructurilor plasmonice conținute în filmele de Ag la factorul de amplificare SERS.

A doua parte prezintă caracterizarea moleculei de Nodularin (NOD) din punct de vedere vibrațional. În plus s-a detectat NOD prin SERS la concentrații ultrascazute folosind AgNPs, substrate comerciale nanopaternate cu piramide periodice inversate (substrat Klarite), lamele hidrofobe SpecTrim™ și nanolinii fabricate în propriul laborator (*in house*). Limita de detecție atinsă pentru dectectarea NOD prin utilizarea de AgNPs a fost 58 pM în soluție de etanol (EtOH).

Ultima parte a acestui capitol prezintă filme fabricate prin tehnica de autoasamblare convectivă (CSA) din AgNPs pe substrat planar solid și utilizarea lor pentru analizele SERS a două tipuri de pesticide, tiabendazol (TBZ) și  $\alpha$ -endosulfan ( $\alpha$ -ES). Aceste filme de AgNPs sunt utilizate ca atare sau hidrofobizate folosind octanethiol și hexanethiol, pentru o mai bună ancorare a ES în apropierea suprafeței metalice. Măsurătorile SERS ale TBZ și ES sunt explorate și analizate în corelație cu calculele teoriei funcționale a densității (DFT). Prezentul studiu demonstrează utilitatea filmelor autoasamblate de nanoparticule coloidale ca substrate SERS și contribuie la dezvoltarea de senzori SERS eficienți pentru detecția și identificarea specifică pesticidelor.

Cele mai frecvente substrate SERS active în mod curent pot fi clasificate în următoarele trei categorii generice: (1) nanoparticule metalice în suspensie; (2) nanoparticule metalice autoasamblate pe substrate solide; și (3) nanostructuri fabricate pe substrate solide prin nanolitografie.

Pentru a obține o amplificare maximă a semnalului Raman, lungimea de undă a radiației incidente trebuie să fie potrivită metalului suport. Astfel, pentru argint se utilizează liniile emitatoare 488 și 514.5 nm ale laserului cu argon ionizat.

**Coloizii metalici** au o mare răspândire ca medii active datorită ușurinței cu care se prepară. Coloizii utilizați ca substraturi SERS sunt foarte atractivi, deoarece pot fi preparați într-un mod reproductibil, cu costuri minime și disponibilitate comercială. Cei mai utilizați coloizi se bazează pe nanoparticule de argint sau aur, în intervalul de 10 - 150 nm. Există mai multe metode sugerate pentru preparare coloizilor de argint și acestea se bazează pe reducerea chimică a ionilor de la  $Ag^+$  la  $Ag^0$ . Cele mai comune două metode sunt sugerate Lee-Meisel <sup>1</sup> și Leopold <sup>2</sup>. Acestea produc particule coloidale monodisperse mici (25-50 nm) necesare pentru a evita autoagregarea și a crește și mai mult amplificarea SERS. Dimensiunile nanoparticulelor în suspensie coloidală pot fi determinate, fie folosind o tehnică de microscopie de scanare electronică (SEM), fie măsurători UV-Vis. Astfel de coloizi pot fi uscați sau depuși pe diferite substraturi pentru fabricarea nanostructurilor metalice plane.

**Alte substraturi active SERS** sunt filmele obținute prin depunere de nanoparticule, ce oferă o reproductibilitate ridicată a rezultatelor, suprafețe SERS comerciale, cum ar fi Klarite <sup>3</sup>, Tienta SpectRIM <sup>5</sup> sau SERSitive <sup>6</sup> ori suprafețe nanostructurate ordonate, simple sau funcționalizate. Caracteristicile unui substrat SERS activ performant sunt :

- Suprafață de interacțiune ridicată dată de rugozitatea substratului ce oferă o bună amplificare a câmpului electromagnetic, precum și reproductibilitate și stabilitate.
- Performanța SERS controlată prin fabricare de *paternuri* periodice sau nanostructuri cu anumite proprietăți optice, specifice aplicației țintite.
- Posibilitatea de a efectua măsurători SERS cantitative dacă se utilizează un etalon pentru a monitoriza orice modificări datorate schimbărilor de substrat <sup>7</sup>.

### **Provocări majore actuale în spectroscopia SERS**

Provocările majore și limitările tehnicii SERS actuale cunoscute sunt: (1) această metodă necesită un contact între suprafața de îmbunătățire propusă și analitul utilizat (2) substraturile se degradează în timp, ceea ce duce la o scădere a semnalului; (3) selectivitatea limitată a substraturilor pentru un anumit analit; (4) reutilizarea limitată a substraturilor; și (5) probleme legate de omogenitatea și reproductibilitatea semnalului SERS <sup>8</sup>. Reproductibilitatea uneori slabă a semnalului SERS este o provocare majoră care este dată de o serie de factori în aplicații practice.

# Capitolul I. Utilizarea tehnicilor vibraționale în detecția de biomolecule complexe, bacterii și secrețiile acestora

## I.1 Studiul spectroscopic al exopolizaharidelor ca potențiale bioresurse

**Exopolizaharidele bacteriene (English-Exopolissacharide-EPS)** sunt biopolimeri secretați în timpul formării biofilmului și conțin o diversitate de componente de zahăr, de la zaharuri neutre (de exemplu, ramnoza) la monomeri precum glucoza, galactoza și manoză, precum și zaharuri amino (N-acetilamino zaharuri). Acești biopolimeri sunt cercetați extensiv și sistematic de zeci de ani în căutarea de noi resurse industriale, noi medicamente anticancerigene, produse farmaceutice, imunomodulatoare sau benefice pentru sănătate, cu costuri de producție minime<sup>9-13</sup>. În ciuda tuturor acestor eforturi, doar câteva EPS bacteriene sunt exploatate pentru valoarea lor comercială, cum ar fi celuloza bacteriană, alginatul, dextranul, guma xantan, etc.<sup>9</sup>. Variabilitatea naturală a acestor subproduse determină proprietățile lor definite de compoziția chimică, structura moleculară, greutatea moleculară medie, glicozilul, legăturile și configurațiile acestora.

În acest context, acest subcapitol își propune implementarea spectroscopiilor Raman și FTIR pentru a clarifica unele aspecte asupra proprietăților unice ale EPS al cianobacteriilor (*A. platensis*). EPS au un potențial ridicat ca bioresurse exploatabile, după purificare, în procesele de producție alimentară, cosmetică și farmaceutică. Doar câteva exemple de utilizare ulterioară a acestora ar fi: aditivi alimentari cu conținut scăzut de calorii, înlocuitori bioactivi și terapeutici superiori ai plasmei sanguine în comparație cu cea pe bază de dextran, îmbunătățirea controlului eliberării medicamentelor.

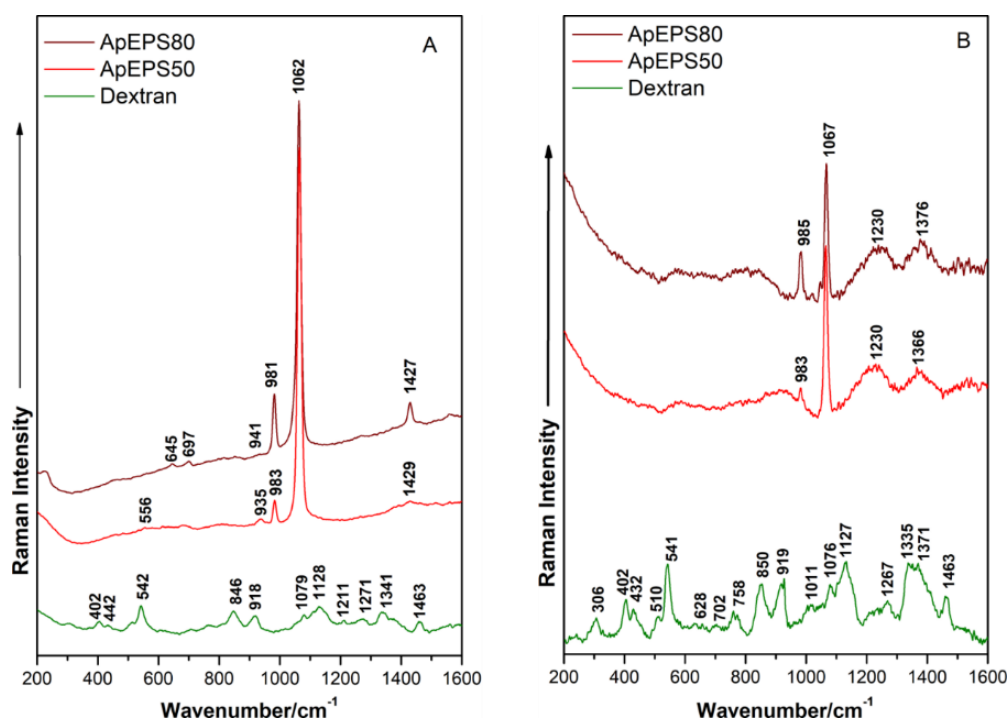
### I.1.1 Studiul Raman al Exopolizaharidelor

Există două tipuri de EPS recunoscute: EPS "eliberat" în mediul de creștere și EPS legat la suprafața organismului, "polizaharide capsulare". Scopul acestui studiu este de a identifica componentele majoritare din EPS-ul eliberat de specia *A. platensis*. Am utilizat o purificare în etape a EPS pe baza constatărilor lui Xu *et al.*<sup>14</sup>. Studiul lor arată modul în care variația concentrației etanolului utilizat pentru purificarea EPS natural influențează precipitarea polizaharidelor de diferite dimensiuni moleculare și structuri. Acest lucru sugerează că, în cazul extragerii EPS natural prin precipitare cu etanol, concentrația de etanol trebuie să fie optimizată pentru fiecare tip de probă.

În timpul dezvoltării biofilmului matur, matricea care conține substanțe polimerice extracelulare formează o arhitectură 3D complexă formată din polizaharide, proteine, lipide, acizi nucleici etc. De regulă, producția de EPS este asociată cu creșterea sau factorii de stres indus. Prin utilizarea microspectroscopiei Raman, biofilmul poate fi investigat în mod non-invaziv chiar și în mediul de creștere <sup>15</sup>. Există puține studii efectuate pentru a caracteriza variațiile spectrale pentru EPS purificat într-un mod etapizat. În acest caz, am separat EPS-urile eliberate în mediul de creștere din biomasa de cianobacterii și le-am purificat.

Investigarea prin Raman se bazează, de obicei, pe asocierea intensității sau a numerelor de undă ale benzilor Raman cu structură moleculară specifică probelor și concentrația acestora. În acest caz, ne așteptăm să găsim amprente similare atribuite speciilor de monozaharide care se găsesc în proporții diferite ca și cum ar compune heteropolizaharidele (HePS - un complex de 5 până la 9 monomeri cu elemente de structură similare). Acest fapt este susținut de benzile Raman puternice observate în jurul valorii de  $1062\text{ cm}^{-1}$  pe lângă benzile specifice dextranului, o homopolizaharidă comună (HoP). HePS sunt compuse din subunități monozaharidice repetate, cum ar fi d- $\alpha$ -glucoza, d-galactoza, l-rhamnoza sau alți derivați cum ar fi N-acetilglucozamina sau N-acetilgalactosamina <sup>13</sup> (*Figura 1.1*).

Mai multe specii de zaharide standard, altele decât dextranul, care ar trebui să se regăsească în probele de EPS analizate, au fost investigate prin spectroscopie Raman și sunt prezentate ca spectre de referință (*Figura 1.2* și *Figura 1.3*). Deoarece semnalul Raman are caracteristici spectrale care sunt mediate din toate componentele de tip zaharidă, am ales să căutăm variații spectrale semnificative în benzile Raman (intensitate, poziție) atribuite acestor componente particulare. Spectroscopia Raman este o metodă promițătoare de identificare și monitorizare în timp real a celulelor vii și permite un screening precis de mare capacitate <sup>15,16</sup> (direct în vasele Petri care conțin culturi viabile). Limita de detecție Raman raportată pentru EPS extras din alge a fost de  $100\text{ mg/L}$  <sup>17</sup>.

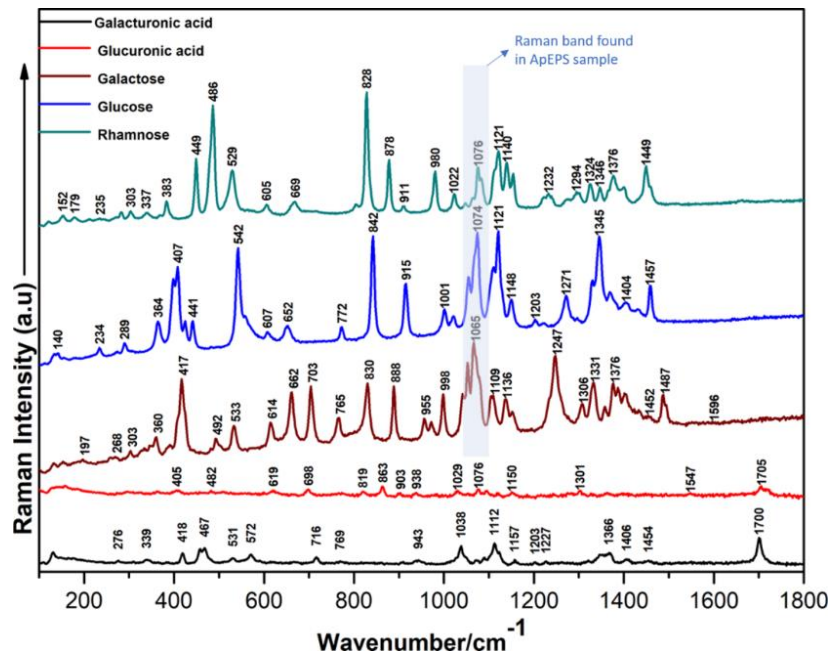


**Figura 1.1** Spectrele Raman ale dextranului, ApEPS50 și, respectiv, ApEPS80, înregistrate cu liniile laser 532 nm (A) și respectiv 633 nm (B) (Reprodus din I. Brezeștean, M. Bocăneală, A. M.R. Gherman, S. Porav, I. Kacsó, E. Rakosy-Tican, N. E. Dina, doi.org/10.1016/j.molstruc.2021.131228, J. Mol. Struct) <sup>18</sup>.

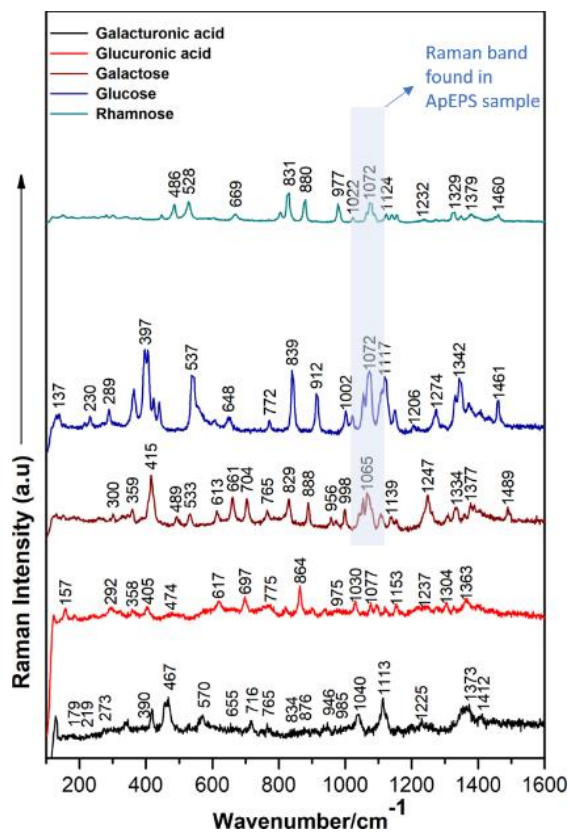
Benzile Raman pentru zaharide se găsesc de obicei în regiunea cuprinsă între 1000 - 1200  $\text{cm}^{-1}$  și, respectiv, 1300 - 1500  $\text{cm}^{-1}$  <sup>19</sup>. În plus, s-au găsit amprente Raman foarte asemănătoare pentru  $\beta$ -D-glucoză și D-(+)-dextroză ( $\alpha$ -D-glucoză), precum și pentru dimerii și polimerii acestora. Banda intensă Raman prezentă la 1062/1067  $\text{cm}^{-1}$  în spectrele EPS și, respectiv, 1079  $\text{cm}^{-1}$ , dar foarte slabă pentru dextran, este atribuită vibrației de întindere C – C din carbohidrați. Deoarece amprenta Raman a dextranului nu prezintă această bandă cu o intensitate la fel de mare, tindem să atribuim banda Raman de la 1062  $\text{cm}^{-1}$  altor constituenți din specii de zaharide (ampretele spectrale Raman prezentate în **Figurile 1.2 și 1.3**).

Zaharidele care prezintă benzi Raman atât de puternice în această poziție sunt: L(+)-ramnoza, D(+)-mannoza și anomerii glucozei, dar raportate ca o bandă puternică cu două diviziuni <sup>20</sup>, iar la D(+)-galactoză ca o bandă foarte ascuțită <sup>21</sup>. Rhamnoza este singura specie care prezintă, de asemenea, o bandă Raman de intensitate medie la 980  $\text{cm}^{-1}$ , așa cum se regăsește în ampretele spectrale EPS raportate aici. Modul vibrațional de la 1127  $\text{cm}^{-1}$  este prezent doar în spectrele dextranului, fiind atribuit în mod obișnuit carbohidraților, dar și mai multor grupuri de molecule, cum ar fi proteinele și lipidele <sup>93</sup>. Absența proteinelor și lipidelor este însă susținută de absența benzilor Raman specifice în intervalul 1600 - 1750  $\text{cm}^{-1}$ .





**Figura 1.2** Spectrele Raman ale unor tipuri de zaharide standard înregistrate cu linia laser 532 nm (Reprodus din I. Brezeștean, M. Bocăneală, A. M.R Gherman, S. Porav, I. Kacsó, E. Rakosy-Tican, N. E. Dina, doi.org/10.1016/j.molstruc.2021.131228, J. Mol. Struct) <sup>18</sup>.

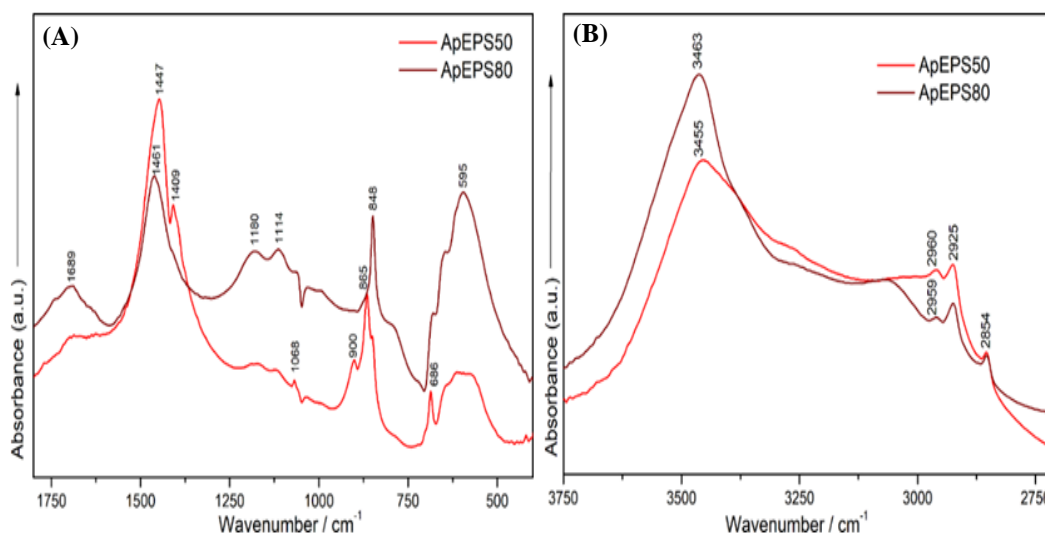


**Figura 1.3** Spectrele Raman ale unor tipuri de zaharide standard înregistrate cu linia laser de 633 nm (Reprodus din I. Brezeștean, M. Bocăneală, A. M.R Gherman, S. Porav, I. Kacsó, E. Rakosy-Tican, N. E. Dina, doi.org/10.1016/j.molstruc.2021.131228, J. Mol. Struct) <sup>18</sup>.

### I.1.2 Studiul FT-IR al Exopolizaharidelor

Ca o analiză complementară, au fost înregistrate și discutate spectrele FTIR, după cum urmează. Spectrele FTIR ale probelor de EPS, extrase cu etanol 96 % (rece ca gheața) la diferite concentrații, sunt prezentate în **Figurile 1.4**.

Prin compararea spectrelor IR ale celor două probe s-a observat că banda largă cu maximum la  $3455\text{ cm}^{-1}$  din spectrul probei ApEPS50, atribuită vibrației de întindere a grupărilor -OH în compoziții polimerice de natură polizaharidică<sup>22-24</sup>, este deplasată la  $3463\text{ cm}^{-1}$  în spectrul probei ApEPS80. Benzile de absorbție de la  $2925$  și  $2854\text{ cm}^{-1}$  au fost atribuite vibrației de întindere asimetrică și simetrică C – H a grupărilor  $\text{CH}_2$  și  $\text{CH}_3$ <sup>23,24</sup>. Intensitatea benzii vibraționale largi de la  $1689\text{ cm}^{-1}$ , atribuită prezenței grupărilor C = O sau C = C în structurile analizate<sup>23</sup>, este mai mare în spectrul probei ApEPS80. Absența unei benzi puternice la  $1647\text{ cm}^{-1}$  în spectrele IR, care ar fi atribuită legăturilor C = O sau C = N în amida I<sup>24</sup>, indică faptul că nu există proteine în probele EPS, ceea ce este în concordanță cu determinările Raman efectuate. Banda intensă de la  $1447\text{ cm}^{-1}$ , atribuită vibrațiilor de întindere C – O și  $\text{CH}_2$ <sup>24,25</sup>, se deplasează la  $1461\text{ cm}^{-1}$  cu intensitate mai mică pentru proba ApEPS80.



**Figura 1.4 (A)** Spectrele FTIR ale probelor de ApEPS, domeniul spectral  $1800\text{-}400\text{ cm}^{-1}$ . **(B)** Spectrele FTIR ale probelor de ApEPS, domeniul spectral  $3750\text{-}2700\text{ cm}^{-1}$  (Reprodus din I. Brezeștean, M. Bocăneală, A. M.R Gherman, S. Porav, I. Kacsó, E. Rakosy-Tican, N. E. Dina, doi.org/10.1016/j.molstruc.2021.131228, J. Mol. Struct)<sup>18</sup>.

În domeniul spectral  $1000 - 1200\text{ cm}^{-1}$ , sunt prezente vibrațiile de întindere ale grupărilor laterale C – OH și legăturile glicozidice C – O – C, atribuite polizaharidelor și structurilor de tip polizaharidic<sup>97-99</sup>. Benzile slabe de absorbție de la  $1123$  și  $1068\text{ cm}^{-1}$

observate în spectrul probei ApEPS50 pot fi atribuite vibrațiilor de întindere ale inelelor de piranoză <sup>25</sup>, iar acestea apar cu intensitate inversată și decalate la 1114, respectiv, 1062 cm<sup>-1</sup>, în spectrul probei ApEPS80. Prezența unor benzi de absorbție puternice în intervalul 600 - 950 cm<sup>-1</sup> indică legătura glicozidică a polizaharidelor <sup>22</sup>.

În ceea ce privește rapoartele de intensitate pentru primele două benzi, cele mai intense în spectrele Raman ale probelor ApEPS, am observat o tendință specială care se observă și în spectrele FT-IR. Benzile Raman de la 958 cm<sup>-1</sup> (linia laser - 633 nm) și 981 cm<sup>-1</sup> (linia laser - 532 nm) înregistrează o creștere a intensității de 2 ori (1:0.39 pentru 532 și 1:0.52 pentru 633 nm). Raportul de intensitate al benzii Raman 1067/1062 cm<sup>-1</sup> urmează o tendință opusă - scade în intensitate de la prima etapă de purificare (**ApEPS50**) la a doua etapă (**ApEPS80**), dar raportul nu este atât de semnificativ (1:1.06 pentru 532 și 1:1.25 pentru 633 nm). Așadar, cea mai intensă bandă Raman observată este ușor influențată de linia laser de excitație în timpul procesului de purificare.

În consecință, atribuirea acestei benzi unui produs secundar de tip fosfonat este mai mult bine susținută de rezultate. Specii organice extracelulare similare au fost raportate de Stuart *et. al* <sup>26</sup>, atunci când au urmărit EPS marcate izotopic care au fost reutilizate de celulele cianobacteriene. Se știe că și concentrația de etanol utilizată pentru purificare influențează speciile de zaharide precipitate din matricea extracelulară, dar, în acest caz, pentru constituentul major al probelor purificate (**ApEPS50** și **ApEPS80**), concentrația de etanol nu modifică semnificativ răspunsul spectral. Presupunem că în probele purificate putem găsi încă în proporție mare unele specii de fosfonați ca săruri organice eliberate din biomasă. Prin urmare, trebuie depus un efort mai mare pentru eficientizarea protocolului de purificare. Pentru aceasta, intenționăm să aplicăm purificarea prin membrane de dializă și liofilizarea ulterioară. O perspectivă moleculară suplimentară a fost găsită în spectrul <sup>13</sup>C CP-MAS. Acesta este dominat de liniile RMN de la 172.4 și 167.9 ppm, care pot fi cel mai bine atribuite la <sup>13</sup>C care se găsește în diferite sisteme de carbonați <sup>27</sup>.

Două linii mult mai mici, cu amplitudini mai mici de 1% din rezonanțele dominante, sunt identificate la 73.3 și 64 ppm - marcate cu săgeți roșii în imagine. Pozițiile lor sunt caracteristice pentru diferite situsuri de carbon din glucoză, indicând astfel prezența unei cantități infime de zaharide. Sensitivitatea limitată pentru probele cu puritate non-analitică și specificitatea tehnicii RMN pentru speciile care conțin materie organică (cu C în compoziție) explică aceste rezultate. Concluzionăm că speciile de carbonați sunt detectate în special în

probele noastre prin utilizarea RMN, în timp ce speciile de zaharide și alte impurități organice au fost evidențiate de spectrele vibraționale în contribuții mai mari.

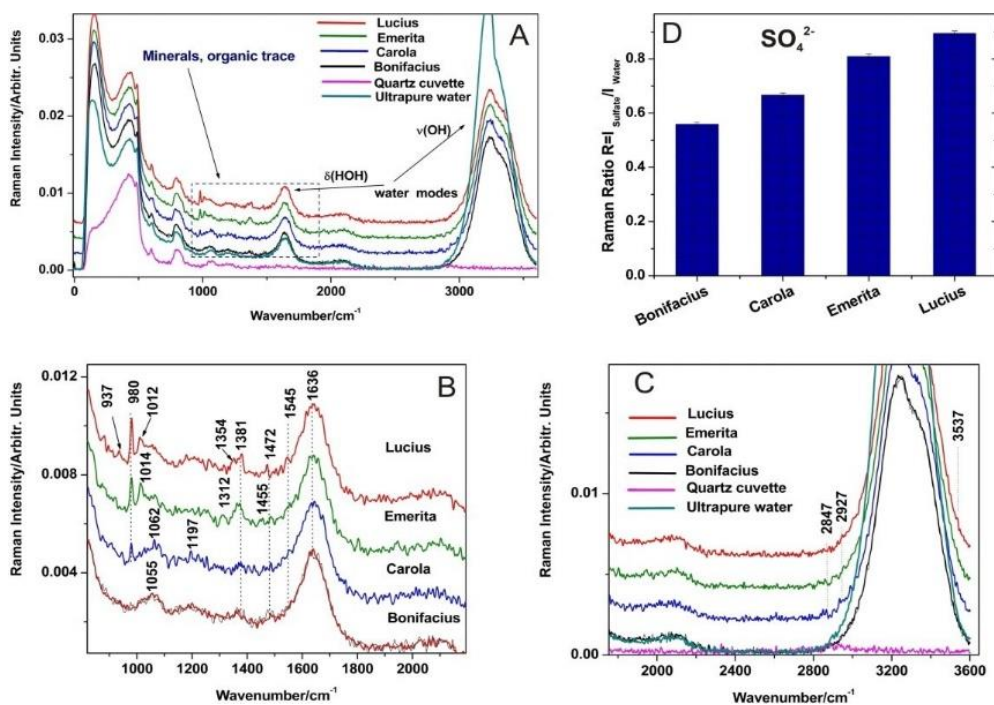
Prin coroborarea rezultatelor spectrale înregistrate cu studii recente care au raportat specii de zaharide similare, am reușit să atribuim cu exactitate benzile Raman înregistrate. Complexitatea descifrării informațiilor din spectrele vibraționale raportate în prezentul studiu constă în numărul de monozaharide și/sau derivați ai acestora care sunt combinați în structura finală biosintetizată a polimerului. Am raportat amprentele Raman și FT-IR atribuite speciilor de monozaharide găsite în diferite proporții ca alcătuind HePS, precum și alte impurități datorită faptului că, pe lângă benzile Raman caracteristice zaharidelor, am putut observa benzi specifice atribuite fosfaților. Speciile de zaharide identificate provizoriu în probele noastre sunt ramnoza, D(+)-glucoza și D(+)-galactoza.

## Capitolul II. Utilizarea SERS a nanoparticulelor de argint obținute prin reducere chimică

În cele ce urmează am exploatat coloizi de Ag preparați atât după metoda reducerii cu citrat cât și cu hidroxilamină pentru a detecta sărurile specifice unor ape minerale naturale de interes și respectiv diatomee specifice apelor de mare naturală.

### II.1 Detecția speciilor anorganice și a sărurilor din ape minerale naturale prin spectroscopia Raman

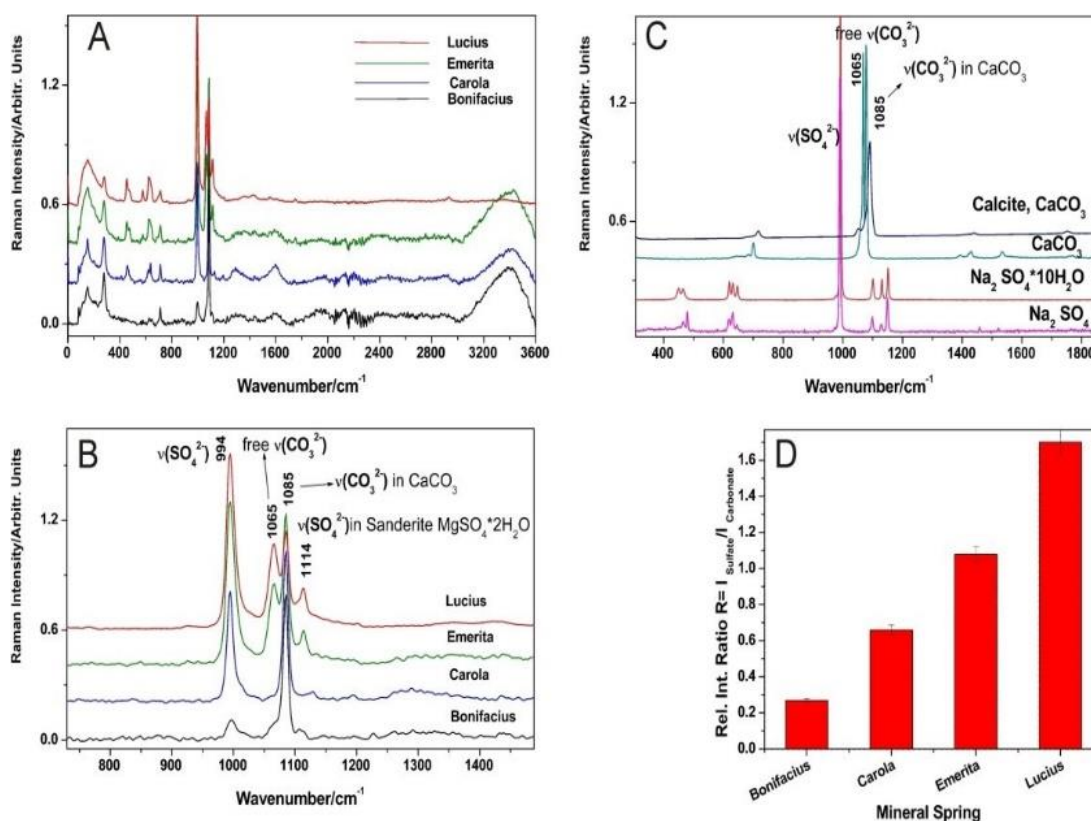
Spectrele FT-Raman caracteristice brute ( $0 - 3600 \text{ cm}^{-1}$ ) ale celor patru probe de apă minerală de izvor (Lucius, Emerita, Carola și Bonifacius) sunt prezentate în **Figura 2.1**. Spectrele FT-Raman ale probelor de apă prezintă benzi caracteristice anionilor bicarbonat, carbonat și sulfat, precum și dioxid de carbon liber și urme organice, în soluție apoasă. Atribuirea acestor benzi este în bună concordanță cu datele publicate pentru specii similare în incluziuni de fluide naturale (paleofluide)<sup>1</sup>, apă de mare<sup>134</sup>, apă minerală<sup>28</sup> sau soluții apoase sintetice<sup>29,30-33</sup>.



**Figura 2.1.** (A) Spectrele FT-Raman ale apelor minerale naturale: Lucius, Emerita, Carola și Bonifacius (0 - 3600  $\text{cm}^{-1}$ ); (B) Zoom din A. (C) Zoom al intervalului de numere de undă înalte din A; benzile de urme organice sunt evidențiate. Excitare: 1064 nm, 350 mW. (D) Reprezentarea grafică a raportului dintre suprafața benzilor de sulfat la 980  $\text{cm}^{-1}$  și apă pentru cele patru probe (Reprodus din S. Cîntă Pinzaru, M. Ardeleanu, I. Brezeștean, F. Nekvapil, M.M. Vențer; 11: 800 - 812. DOI: 10.1039/c8ay02580k, *Anal. Methods*)<sup>34</sup>.

O ierarhie similară a izvoarelor în ceea ce privește conținutul de  $(\text{SO}_4)^{2-}$ , dar cu un factor de creștere diferit, reiese din datele analitice (1997) expuse la gurile izvoarelor în scop de informare publică, cu 1.570 g/L pentru Lucius, 1.381 g/L pentru Emerita, 0.211 g/L pentru Carola și respectiv 0.165 g/L pentru Bonifacius. Calculul  $1.570/1.381 = 1.13$  pentru raportul concentrației de sulfat Lucius/Emerita se traduce prin creșterea factorului de 1.26 ori din datele Raman.

În plus față de benzile atribuite modurilor de vibrație ale anionilor anorganici, spectrele FT-Raman ale tuturor probelor de apă relevă mai multe benzi slabe în domeniul numerelor de undă mari (1455, 1472, 1545, 2847, 2927  $\text{cm}^{-1}$ ), sugerând contribuții organice la semnalul Raman general. De exemplu, modurile de îndoire  $\text{CH}_n$  pot fi atribuite în intervalul numerelor de undă mici, în timp ce modurile de întindere pot fi atribuite în intervalul de numere de undă mari, pentru o mare varietate de compuși organici<sup>35</sup>. Spectrele FT-Raman ale probelor de sare sub formă de pulbere (0 - 3600  $\text{cm}^{-1}$ ) și detalii ale intervalului spectral 750 - 1500  $\text{cm}^{-1}$  sunt prezentate în **Figura 2.2A** și, respectiv, **2.2B**. Spectrele FT-Raman de referință ale sulfatului de sodiu anhidru și hidratat policristalin pur, precum și ale carbonatului de calciu și ale mineralului de calcit sunt prezentate în **Figura 2.2C** pentru comparație.



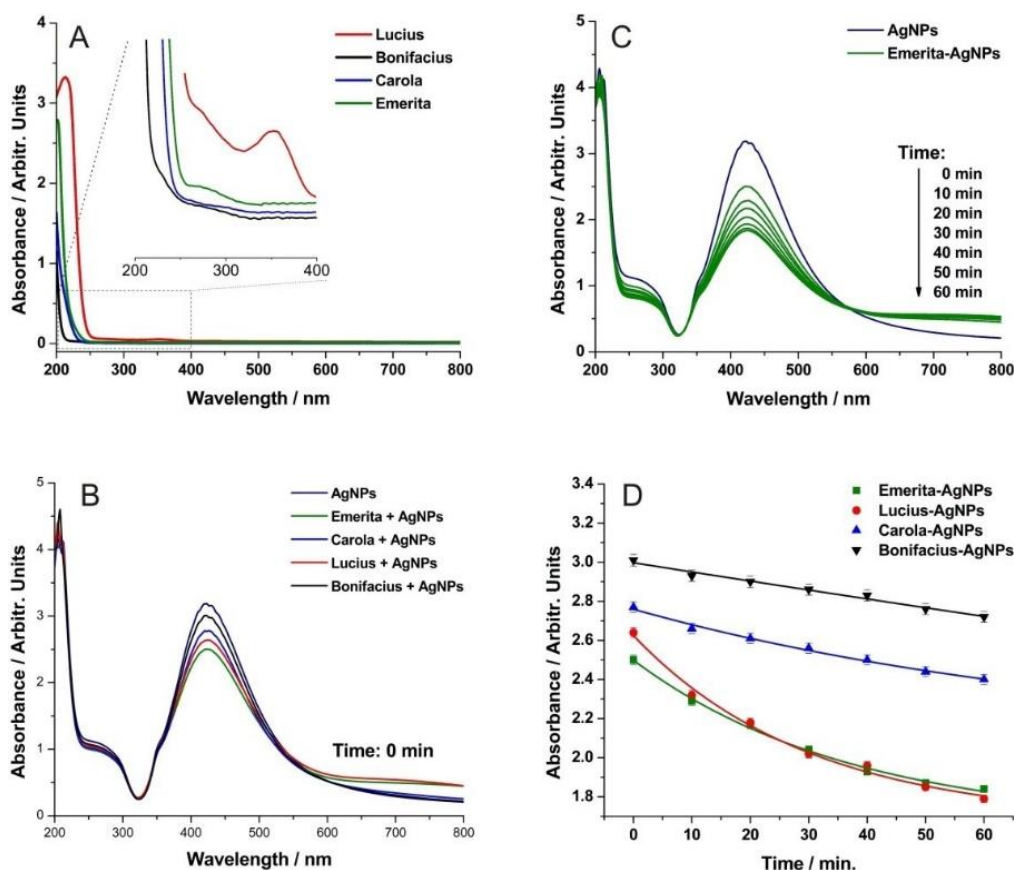
**Figura 2.2** (A) Spectrele FT-Raman ale probelor de sare din apele minerale naturale: Lucius, Emerita, Carola și Bonifacius (0-3600 cm<sup>-1</sup>). (B) Zoom al intervalului 750-1500 cm<sup>-1</sup> din A. (C) Spectrul FT-Raman ale sulfatului de sodiu policristalin anhidru și hidratat, carbonatului de calciu și calcitului mineral (400-1800 cm<sup>-1</sup>). (D) Reprezentarea grafică a intensității benzii sulfatului la 994 cm<sup>-1</sup> în raport cu cea a carbonatului la un procent de 3.96 % din date (Reprodus din S. Cîntă Pinzaru, M. Ardeleanu, I. Brezeștean, F. Nekvapil, M.M. Vențer; 11: 800 - 812. DOI: 10.1039/c8ay02580k, Anal. Methods)<sup>34</sup>.

## II.2 Analiza SERS a apelor minerale

Analizele SERS ale apelor minerale (Lucius, Emerita, Carola și Bonifacius) sunt abordate în mod comparativ, pentru a prospecta capacitatea tehnicii de a detecta orice componente organice. În timpul preparării probelor SERS, s-a observat o schimbare rapidă a culorii nanoparticulelor atunci când au fost adăugate picăturile de apă minerală. Conținutul lor bogat în anioni era de așteptat să asigure agregarea nanoparticulelor și, prin urmare, a fost investigată extincția lor optică. (**Figura 2.3**).

Spectrele de extincție ale apelor minerale brute (**Figura 2.3A**) prezintă benzi de absorbție abia vizibile în domeniul UV (200 - 400 nm), care se datorează urmelor organice. Pentru a stabili influența conținutului de minerale al apelor asupra AgNPs, au fost înregistrate spectrele de

extincție ale amestecurilor de apă minerală - AgNPs, împreună cu cele ale AgNPs pure (**Figura 2.3B**). Deoarece măsurătorile fizice au fost efectuate în modul de absorbție, spectrele optice din **Figura 2.3** sunt afișate ca absorbție în funcție de lungimea de undă. Adăugarea de apă minerală la AgNPs a dus la scăderea intensității benzii de absorbție, în timp ce poziția la 424 nm rămâne constantă.



**Figura 2.3** A) Spectrele de extincție UV-Vis ale apelor minerale naturale: Lucius, Emerita, Carola și Bonifacius (200-800 nm). B) Spectrele de extincție UV-Vis ale AgNPs și ale amestecurilor de apă minerală-AgNPs, proaspăt preparate. C) Spectrele de extincție UV-Vis în funcție de timp ale amestecului de apă Emerita- AgNPs. D) Reprezentarea grafică a absorbantei la 424 nm a amestecurilor de apă-AgNPs în funcție de timp (Reprodus din S. Cîntă Pinzaru, M. Ardeleanu, I. Brezeștean, F. Nekvapil, M.M. Vențer; 11: 800 - 812. DOI: 10.1039/c8ay02580k, *Anal. Methods*)<sup>34</sup>.

Spectrele Raman ale sărurilor sub formă de pulbere fină obținute ca reziduuri solide după evaporarea apei au evidențiat carbonat majoritar ( $1085\text{ cm}^{-1}$ ,  $712\text{ cm}^{-1}$ ), calcit polimorf și sulfat ( $994\text{ cm}^{-1}$ ) modurile de vibrație fiind în concordanță cu prezența mineralelor rezultate în urma dizolvării rocilor de bază. Stratele de roci care cuprind dolomită, serpentinită și alte roci metamorfice asigură mineralizarea ridicată.

Analizele SERS ale apelor au fost abordate comparativ, au dezvăluit capacitatea tehnicii de a evalua atât componentele organice, cât și cele anorganice, fiind astfel potrivită pentru implementarea unui management durabil a apelor de izvor carbogazoase. Apele minerale au indus agregarea AgNPs și au furnizat o amprentă SERS caracteristică beta-carotenului. Spectrele de extincție ale apelor minerale brute și ale apelor minerale și a amestecurilor de apă minerală cu AgNPs au dovedit că agregarea a fost dependentă de timp a fost semnificativ legată de conținutul de minerale, fiind astfel specifică apei.

### II.3 Nanoparticule coloidale de argint pentru detecția microorganismelor acvatice

Acumularea de celule mucilaginoase și a materiei mucilaginoase la scară largă, cuprinzând uneori sute de kilometri pătrați, ar putea împiedica drastic activitatea de acvacultură, ar afecta calitatea apei de mare, ar induce mortalitatea faunei sedentare, ar perturba comunitatea de plancton și ar afecta activitatea turistică. Tecile ușor silicioase de *Cylindrotheca fusiformis* Reimann și Lewin, a speciilor de diatomee a fost caracterizată de mult timp<sup>36</sup>. Studii ample<sup>37,38</sup> au fost consacrate diferitelor determinări ale compoziției în raport cu condițiile de creștere, deoarece diatomeele au prezentat un mare potențial pentru biodiesel, dar și pentru acvacultură. În ceea ce privește compoziția chimică, *C. closterium* cultivată a prezentat acidul palmitoleic (acidul gras mononesaturat omega-7) ca fiind acidul gras dominant, urmat de acidul oleic, în timp ce cei mai abundenți acizi grași saturați au fost acidul pentadecanoic și acidul palmitic<sup>37</sup>. Alte studii au evidențiat diferențele în compoziția chimică a 60 de clone de *C. fusiformis* izolate și cultivate în condiții de lot<sup>38</sup>.

Până în prezent, studiile disponibile privind compoziția diatomeelor se bazează pe tehnici de extracție și separare. Studii extinse au fost axate pe teacă sau pe frustule ale diferitelor specii de diatomee<sup>36,39-41</sup> prin tehnici ca SEM sau AFM care au arătat că fiecare parte a învelișului de siliciu este atașat de material organic, în timp ce întregul corp este înconjurat de material mucilaginos. În plus, o primă abordare în a înțelege absorbția AgNPs de către *C. diatomee* în care s-a utilizat tehnica AFM, a constatat că AgNPs pătrund în peretele celular prin regiunea valvei de siliciu sub formă de NPs încorporate în matrice organică. AgNPs au provocat o deteriorare locală în interiorul celulei fără a distruge membrana celulară<sup>40</sup>. În plus, s-a constatat că secreția de **materie polimerică extracelulară (EPM)** a fost stimulată de prezența NPs și ca un mecanism de apărare. Compoziția chimică a corpurilor de alge și a substanțelor secretate necesită, de obicei, tehnici de separare și extracție, cu principalele dezavantaje ale



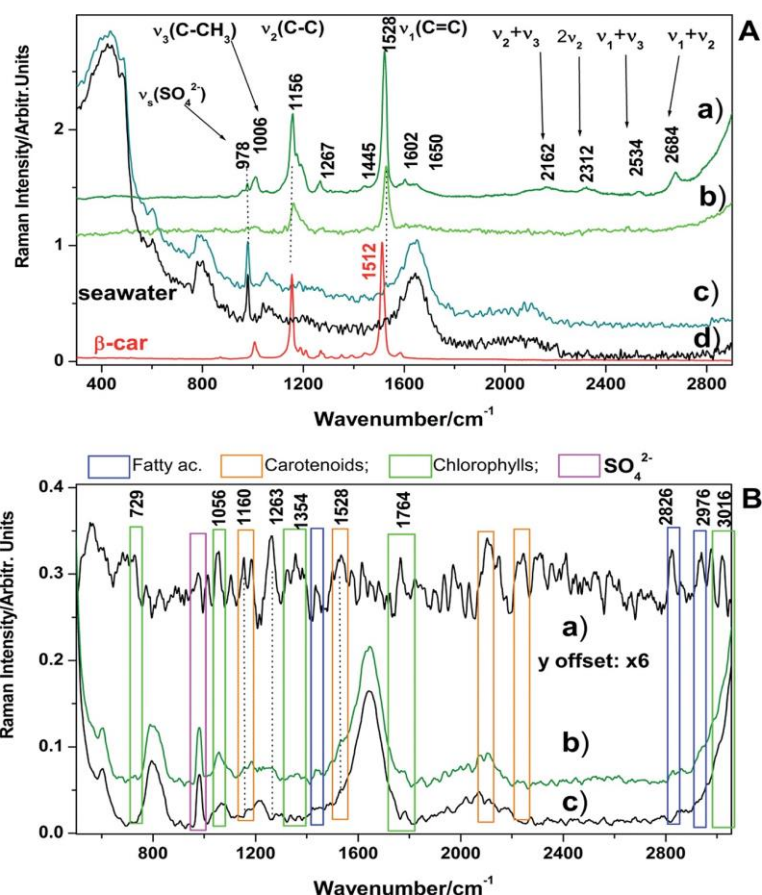
multiprocesării în mai multe etape și a substanțelor chimice necesare, fiind relativ costisitoare și consumatoare de timp.

În acest studiu am investigat interfața dintre diatomeele marine vii *C. closterium* și AgNPs prin exploatarea tehnicii SERS atât în cultura celulară, cât și la nivel de singură celulă, pentru: (i) a relaționa atât conținutul de carotenoizi cât și conținutul de secreție mucilaginoasă cu semnalul Raman normal și respectiv SERS, (ii) a evalua comportamentul spectral al diatomeelor în prezența AgNPs în mediul lor nativ; (iii) a evalua reproductibilitatea rezultatelor obținute cu un echipament Raman compact și portabil, potrivit pentru monitorizarea *in situ* a diatomeelor.

### II.3.1 Analiza Raman al lotului de cultură de microorganisme acvatice

Pentru a evalua semnalul Raman al lotului culturii, am utilizat atât excitația în vizibil (532 nm), cât și în infraroșu apropiat (1064 nm) folosind un sistem Raman compact și unul portabil. Spectrele Raman ale algelor proaspăt colectate din lotul de culturi de diatomee înregistrate cu trei instrumente diferite sunt prezentate în **Figura 2.4A**. Instrumentul FT-Raman cu excitație NIR (1064 nm) a furnizat un semnal slab al lotului de cultură *Cylindrotheca*, aproape similar cu cel al apei de mare naturale colectate din apa de coastă (coasta de sud-est a Adriaticii, în Dubrovnik). Acest lucru se datorează, probabil, timpului de achiziție mai lung necesar, care ar putea duce la o sedimentare lentă a celulelor pe fundul flaconului de sticlă și, în consecință, la o slabă împrăștiere Raman colectată din soluție în geometria instrumentului FT-Raman. Banda de sulfat de la  $978\text{ cm}^{-1}$ , tipică spectrului FT-Raman al apei de mare neprocesată a fost singura bandă majoră a soluției de cultură (**Figura 2.4A, c**), semnalul carotenoidelor depășind cu greu nivelul de zgomot pentru excitația NIR. Raportul intensității relative Raman a modului de întindere a sulfatului față de modul de întindere a apei la  $3214\text{ cm}^{-1}$  ( $R \approx \frac{1}{4} I_{(978)}/I_{(3214)}$ ) a fost calculat atât pentru *Cylindrotheca* în lotul de soluție cât și pentru apa de mare neprocesată. Benzile Raman ale celulelor de diatomee în soluție observate pentru excitația 532 nm la 1528, 1156 și respectiv la  $1007\text{ cm}^{-1}$  împreună cu combinațiile lor liniare și armonice în intervalul  $2110 - 2700\text{ cm}^{-1}$  (**Figura 2.4 A, spectrul a**) sunt caracteristice carotenoidelor<sup>28,42-49</sup>.

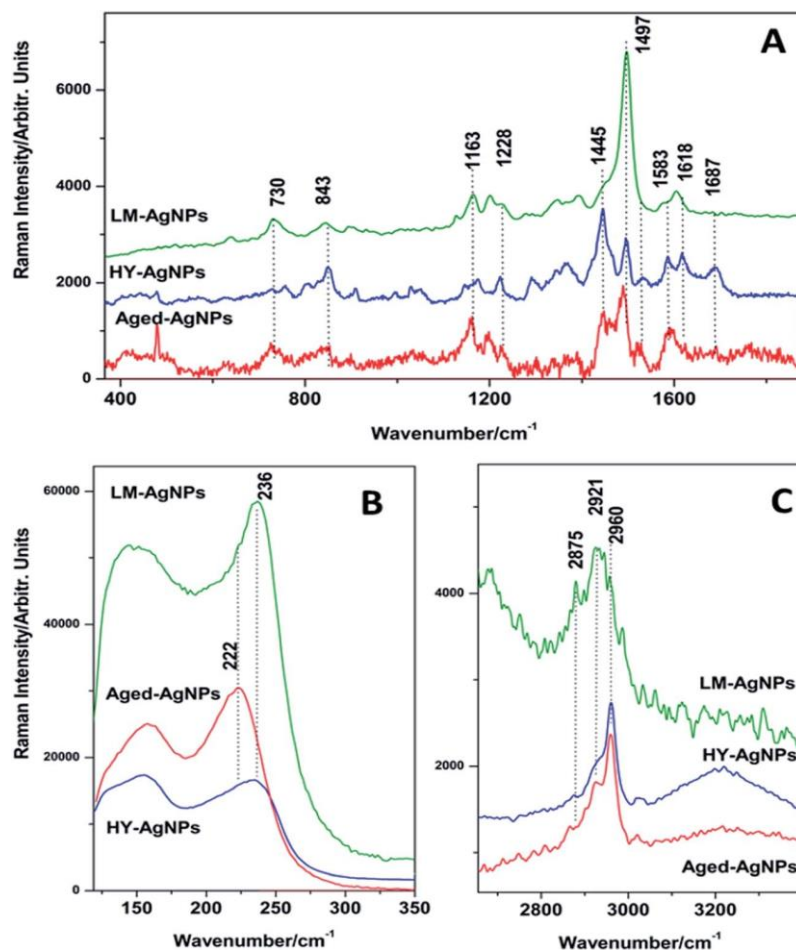
Informațiile spectrale furnizate de echipamentul portabil (**Figura 2.4A, spectrul b**), deși mai puțin sensibil, sugerează posibilitatea de a monitoriza starea culturii de celule vii și a conținutul de carotenoizi. Banda Raman a *C. closterium* la  $1528\text{ cm}^{-1}$  sugerează că fucoxantina este cea mai dominantă specie<sup>44,46,49</sup>.



**Figura 2.4 (A).** Spectre Raman normalizate ale soluției de cultură de *C. closterium* înregistrate cu un instrument Renishaw (a) cu un spectrometru DeltaNu compact, portabil și rapid (b), respectiv cu sistemul FT-Raman (c). Pentru comparație, sunt prezentate spectrele FT-Raman ale apei de mare brute (d) și ale  $\beta$ -carotenului solid roșu). Excitare: 532 nm (a și b) și 1064 nm (c și d). **(B).** Diferența spectrală (a) între spectrele FT-Raman medii ale *Cylindrotheca* (b) și ale apei de mare (c). Deși slab, semnalul de diferență arată urme caracteristice clorofilelor, carotenoizilor, acizilor grași și ionilor de sulfat, care sunt evidențiate în dreptunghiuri (Reprodus din S. Cîntă Pînzaru, C. Müller, S. Tomšić, M. M Vențer, I. Brezeștean, S. Ljubimir, B. Glamuzina, 42899-42910 DOI: 10.1039/C6RA4255D, RSC Advance) <sup>50</sup>.

### II.3.2 Analiza SERS a microorganismelor acvatice în soluție

Spectrele SERS ale soluției de diatomee în suspensie pe HY-AgNPs și LM-AgNPs sunt prezentate în **Figura 2.5A** (intervalul 300 - 1800  $\text{cm}^{-1}$ ).



**Figura 2.5** (A) Spectre SERS ale diatomeelor *Cylindrotheca* în amestec cu, *Lee-Meisel* (LM), hidroxilamină redusă (HY) și, respectiv, AgNPs HY- vechi. Sunt evidențiate detaliile din intervalul de numere de undă joase (B) și înalte (C). Excitare: 532 nm (Reprodus din S. Cîntă Pînzaru, C. Müller, S. Tomšić, M. M Vențer, I. Brezeștean, S. Ljubimir, B. Glamuzina, 42899-42910 DOI: 10.1039/C6RA4255D, RSC Advance) <sup>50</sup>

**Figura 2.5B și C** evidențiază gama din regiunea de undă joasă ( $120 - 330 \text{ cm}^{-1}$ ) și, respectiv, înaltă ( $2550 - 3200 \text{ cm}^{-1}$ ). Adăugarea unei cantități mici de  $10 \mu\text{l}$  de cultură de diatomee în lotul de nanoparticule duce la o schimbare instantanee a culorii de la galben închis la albastru-gri închis, datorită agregării rapide în prezența diatomeelor și a anionilor din cultura din lot, inclusiv a apei de mare. Agregarea nanoparticulelor a fost confirmată de deplasare puternică a rezonanței plasmonice a AgNPs și lărgirea benzii de absorbție pe toată gama vizibilă.

**Până în prezent, acesta este primul experiment SERS realizat pe diatomee vii, iar informațiile cu privire la moleculele lor sau comportamentul *in vivo* sunt puține. Nanoparticulele sunt rapid agregate de sărurile din apa de mare și din mediul de cultură.**

Toate cele trei cazuri de experimente SERS au prezentat o caracteristică neașteptată: absența modului Raman principal al diatomeelor caracteristic vibrației la  $1528 \text{ cm}^{-1}$ . Prezența

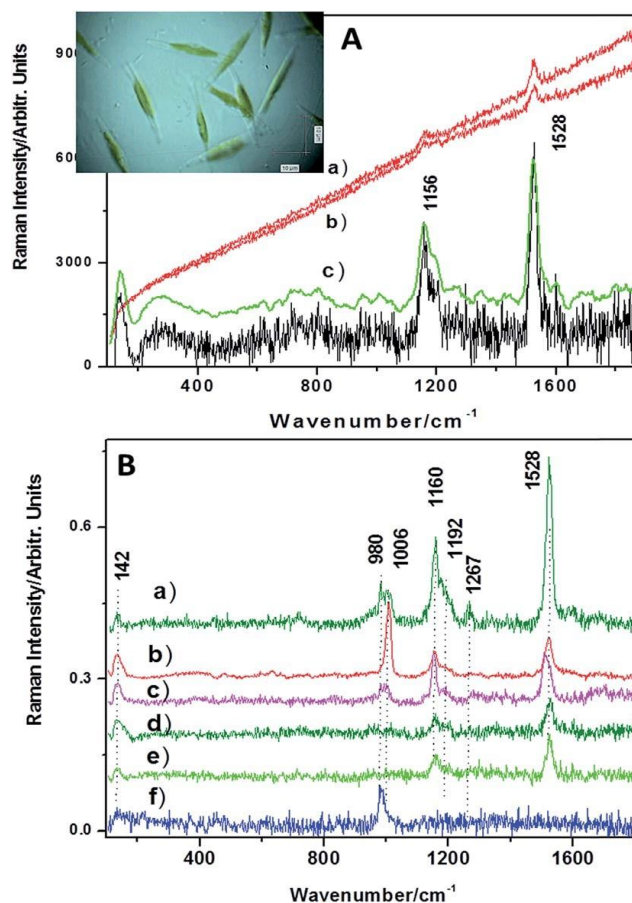
benzii SERS de la  $1497\text{ cm}^{-1}$  ar putea fi atribuită carotenoidului adsorbit de AgNPs; cu toate acestea, o decalare mare de  $31\text{ cm}^{-1}$  este destul de neobișnuită în SERS.

O astfel de interacțiune ar necesita o absorbție instantanee a NPs prin teaca și membrana celulară a diatomeelor, deoarece semnalul este observat în primele secunde după pregătirea probei SERS. Cel mai probabil, proteinele fucoxantină-clorofilă ar fi responsabile pentru această bandă SERS, care este dominantă și în cazul AgNPs învechite. Această ipoteză este susținută de observarea altor benzi SERS caracteristice ale clorofilelor la 730, 805, 910, 1165, 1228, 1346, 1369, 1618 și respectiv  $1680\text{ cm}^{-1}$ .

Diferențe mari între semnalele Raman normale și SERS (*Figura 2.4A și 2.5*) indică în mod clar alte specii decât carotenoidele, responsabile pentru interacțiunea diatomee - AgNPs. Acest rezultat sugerează că efectul Raman de (pre)rezonanță observat la diatomee în soluția de cultură nu mai este dominant și în SERS. Dat fiind că peretele celular este un aranjament complex de substanțe silicioase și organice, care cuprind frustuline, pleuraline, silafine și poliamine cu lanț lung<sup>40,51</sup> AgNPs care ajung în apropierea lor s-ar putea lega la terminalul N al acestora, explicând efectul observat în SERS și datorat legăturii Ag-N. Modurile simetrice  $\nu(\text{SiO})$  în spectrele Raman observate de obicei în materialele silicioase la 787 și respectiv  $764\text{ cm}^{-1}$  pentru acidul silicic ar fi prezente în semnalul SERS împreună cu benzile Raman tipice ( $430, 800, 1060$  și respectiv  $1200\text{ cm}^{-1}$ ) atribuite vibrațiilor fundamentale ale cadrului de sticlă de siliciu hidratat. Semnalul SERS foarte slab la aceste poziții a fost observat în spectrele diatomeelor, ceea ce indică faptul că materialul silicios din frustule<sup>51</sup> nu contribuie substanțial la semnalul SERS global.

### II.3.3 Analiza Raman și SERS pe o singură celulă

Imaginea optică furnizată de microscopul Raman pentru obiectivul  $100\times$  (*Figura 2.6* inserție) arată celulele iradiate pentru achiziția spectrelor Raman. Semnalul Raman brut (*Figura 2.6 A, a și b*) înregistrat la suprafața celulei cuprinde un fond puternic de fluorescență și benzile Raman ale carotenoidelor. După sustragerea fondului (*Figura 2.6 A, c și B, a-e*), diferite celule au prezentat semnalul specific carotenoizilor (fucoxantină dominantă). Caracteristica dominantă a spectrelor micro-Raman normale colectate de la celule individuale de diatomee a fost modul de întindere al legăturii C=C al fucoxantinei de la  $1528\text{ cm}^{-1}$  a cărui variație de intensitate a fost observată de la o celulă la alta și din diferite puncte de pe corpul verde al aceleiași celule.

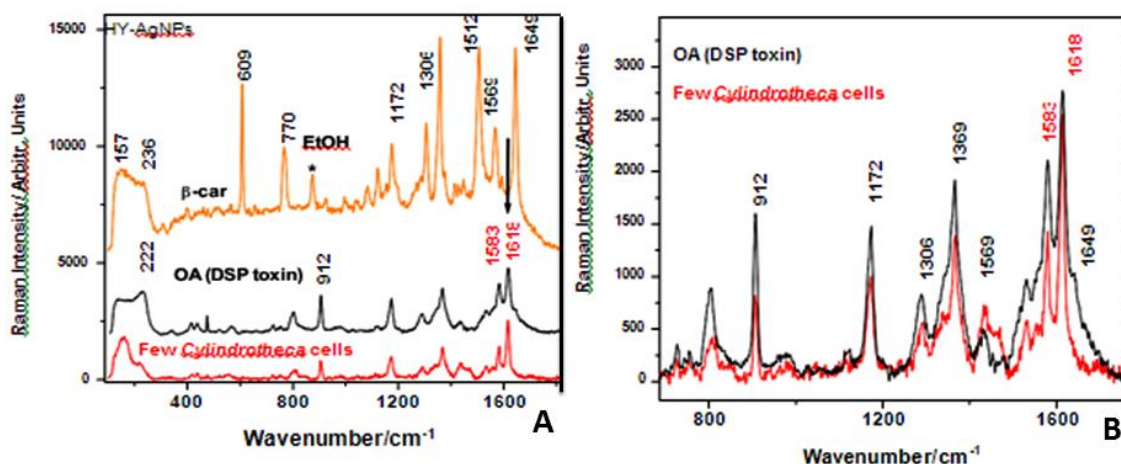


**Figura 2.6** (A) Semnalul tipic micro-Raman brut (a și b) al celulelor unice *C. closterium* pe o placă hidrofobă și semnalul de fond sustras (c). Semnalul netezit este evidențiat în verde. Imagine de microscopie optică a celulelor *C. closterium* acoperite cu picături pe placa hidrofobă (obiectivul 100×) este prezentată în inserție. (B) Spectrele Raman colectate din corpul verde al mai multor celule vii (a-e) și din corpul terminal transparent (f). Excitare: 532 nm (Reprodus din S. Cîntă Pînzaru, C. Müller, S. Tomšić, M. M Vențer, I. Brezeștean, S. Ljubimir, B. Glamuzina, 42899-42910 DOI: 10.1039/C6RA4255D, RSC Advance)<sup>50</sup>.

Spectrele SERS ale unor diatomee individuale sunt prezentate în **Figura 2.7**, atât pentru LM-AgNPs (**Figura 2.7A**), cât și pentru HY-AgNPs (**Figura 2.7B**). Banda intensă de la 236  $\text{cm}^{-1}$  din **Figura 2.7A** indică un proces semnificativ de chemisorbție SERS a speciilor moleculare care conțin N pe suprafața NPs, precum și o structură diferită a rețelei de nanoagregate (banda de la 149  $\text{cm}^{-1}$ ), în timp ce banda medie de la 222  $\text{cm}^{-1}$  prezentă în panoul **B** sugerează că proba conține specii de O chemisorbite în raport cu HY-AgNPs<sup>52,53</sup>.

În ambele cazuri, carotenoidele au fost dominante, dar cu rezultate diferite. Banda fucoxantinei de la 1528  $\text{cm}^{-1}$  a fost absentă în ambele cazuri. În cazul HY-AgNPs, semnalul SERS colectat de la corpul diatomeelor (**Figura 2.7B**, spectrele **a-c**) au evidențiat în mod clar o contribuție puternică a  $\beta$ -carotenului adsorbit de Ag, pe baza similitudinii dintre pozițiile benzilor și intensitățile relative.

În cazul folosirii nanoparticulelor LM-AgNPs, semnalul SERS este dominat de carotenoidele convenționale cu benzile Raman caracteristice (1156, 1521, respectiv 1526  $\text{cm}^{-1}$ ) și nu avem o caracteristică a benzilor chimisorbite<sup>28</sup>. Benzile suplimentare observate la 1254, 1359, respectiv 1690  $\text{cm}^{-1}$  au fost atribuite acizilor grași polinesaturați și clorofilelor<sup>40,51,54-58</sup>.



**Figura 2.7** A: Spectrele SERS colectate din celule de diatomee *Cyndrotheca* cu HY-AgNPs în comparație cu semnalul SERS al unei toxine DSP (acid okadaic). B: Detaliat intervalul 700-1800  $\text{cm}^{-1}$  (Reprodus din S. Cîntă Pînzaru, C. Müller, S. Tomšić, M. M Vențer, I. Brezeștean, S. Ljubimir, B. Glamuzina, 42899-42910 DOI: 10.1039/C6RA4255D, RSC Advance)<sup>50</sup>.

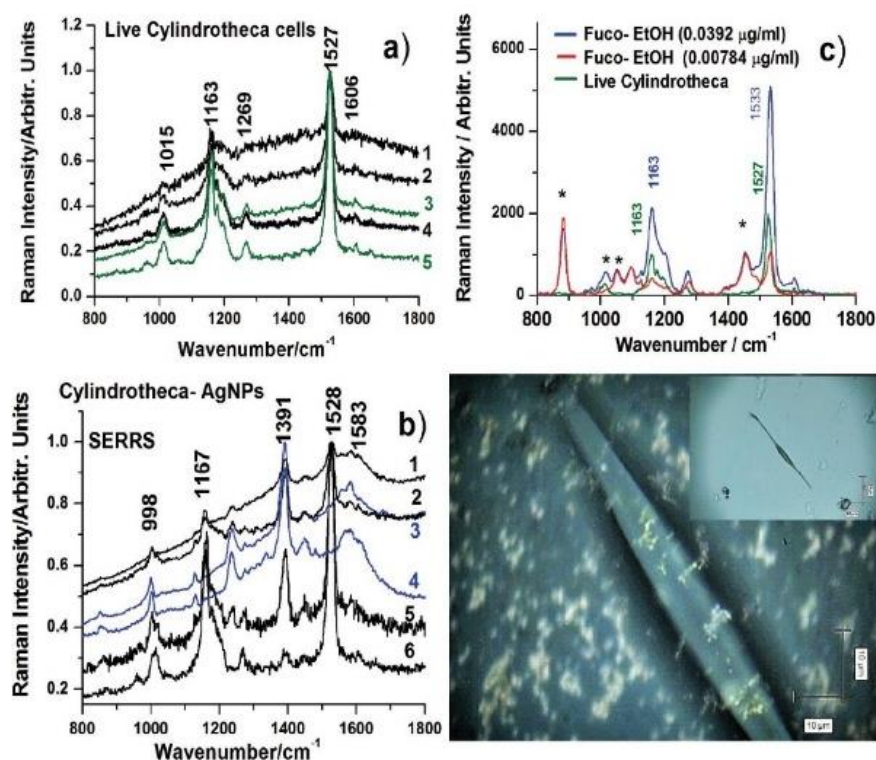
În plus, banda SERS foarte puternică de la 225  $\text{cm}^{-1}$  susține ipoteza absorbției de O prin intermediul grupărilor carboxilice ale acizilor grași de pe suprafața coloidală a Ag.

EPS reprezintă o rețea subtilă de fibrile de polizaharide reticulate în joncțiuni de fibrile și interconexiuni fibriloglobulare cu globule care conectează două sau mai multe fibrile<sup>40,41</sup>. Unitățile de glucoză caracteristice polizaharidelor prezintă benzi Raman la 405  $\text{cm}^{-1}$  (s), 440  $\text{cm}^{-1}$  (m), 542  $\text{cm}^{-1}$  (s), 650  $\text{cm}^{-1}$  (mw), 772  $\text{cm}^{-1}$  (mw), 841  $\text{cm}^{-1}$  (ms), 914  $\text{cm}^{-1}$  (ms), 1002  $\text{cm}^{-1}$  (mw), 1022  $\text{cm}^{-1}$  (m), 1054  $\text{cm}^{-1}$  (m), 1075  $\text{cm}^{-1}$  (ms), 1120  $\text{cm}^{-1}$  (ms), 1149  $\text{cm}^{-1}$  (m), 1272  $\text{cm}^{-1}$  (m), 1296  $\text{cm}^{-1}$  (ms), 1459  $\text{cm}^{-1}$  (m)<sup>18,59</sup>.

### II.3.4 Detecția SERRS a fucoxantinului: cuantificarea carotenoidului în celule vii de diatomee *C. closterium*

Pentru a prospecta detectarea semnalului Raman al fucoxantinei în sisteme biologice native, s-au înregistrat spectre Raman din culturi de *C. closterium* (**Figura 2.8**) izolate și cultivate din probe proaspete de fitoplancton. Diatomeele sunt bogate în fucoxantină<sup>60-64</sup>, cu toate acestea, ele conțin și alte carotenoide care influențează profilul spectral al benzii  $\nu_1(\text{C}=\text{C})$ . Semnalul spectral al celulelor *C. closterium* prezintă benzi principale proeminente de

carotenoizi. Benzile  $\nu_1$ ,  $\nu_2$  și  $\nu_3$  au fost înregistrate la 1527, 1163 și, respectiv, 1015  $\text{cm}^{-1}$  poziții ușor diferite de cele din soluțiile de fucoxantină, care este caracteristică pentru matrici biologice (încorporate în membrane lipidice sau purtători de proteine).



**Figura 2.8** Spectre Raman de rezonanță colectate de la fiecare cinci celule vii distincte de *C. closterium*, numerotate de la 1 la 5: (a) obținute din cloroplastele verzui din interiorul corpului celular; (b) semnale SERRS tipice prelevate din celule vii expuse la AgNPs, care prezintă răspunsuri distincte, cu focalizare pe suprafața celulară, de la matricea extracelulară de pe celulă (spectre albastre) sau de la cloroplaste, prin focalizare în interiorul celulei (spectre negre); (c) comparație a poziției modului principal al carotenoidelor în spectrul *C. closterium* pentru două soluții de fucoxantină de diferite concentrații, asteriscurile indică benzile de etanol. Excitare: 532 nm. Inserția prezintă o micrografie a unei celule de *C. closterium* expusă la AgNPs iar în colț este prezentată o celulă vie, observată prin microscopia optică în soluție de cultură de diatomee (Reprodus din F., I. Brezeștean, G. Lazar, C. Firța, S. Cînta Pînzaru, Volume 1250, Part 1, doi.

10.1016/j.molstruc.2021.131608, *J. Mol. Struct.*)

Caracteristica unică a semnalului fucoxantinei este banda din jurul valorii de 1606  $\text{cm}^{-1}$ , care corespunde întinderii C=C în afara planului, prezentă în spectrele din celule și a cărei intensitate este o confirmare a dominanței fucoxantinei printre alte carotenoide din celule.

**Figura 2.8** evidențiază în mod clar că poziția benzii specifice din soluția de fucoxantină la 1532  $\text{cm}^{-1}$ / 1527  $\text{cm}^{-1}$ . Banda SERRS atribuită modului de întindere C=C a fost observată la 1528  $\text{cm}^{-1}$ , dar celule diferite au prezentat un profil diferit de bandă (sau chiar nicio bandă),

echivalentă cu celulele "moarte" din investigația RR. Astfel, o estimare a concentrației de carotenoide pe baza intensității SERRS și a profilului modului C=C ar putea fi considerată doar cu prudență.

### III. Nanoplatforme structurate pentru detecție SERS eficientă

#### III.1 Nanoplatforme 3D fabricate prin nanolitografie

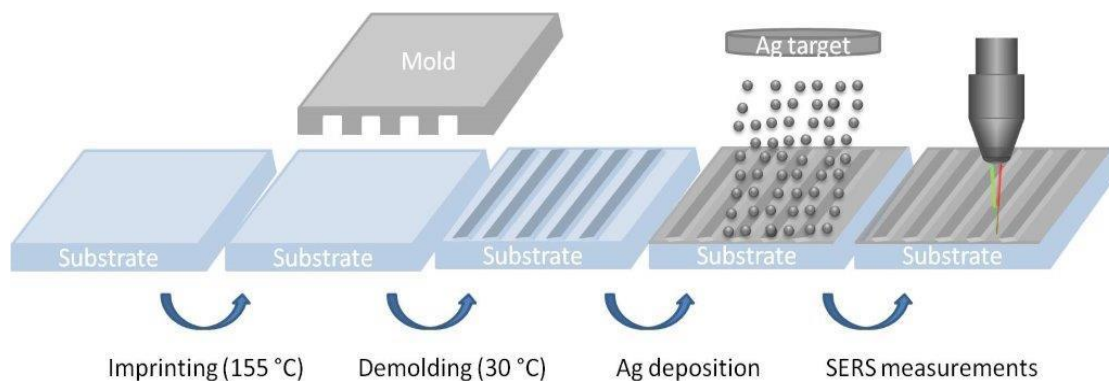
Litografia prin nanoimprimare (NIL) este o metodă simplă, reproductibilă și scalabilă pentru a crea nanostructuri plasmonice cu diverse modele și cu aplicabilitate largă, de exemplu, pentru fabricarea substratelor SERS. NIL poate depăși limitările altor tehnici de imprimare, cum ar fi costul ridicat, consumul de timp și laboratoarele de nanofabricare foarte bine echipate, profitând de metoda roll-to-roll<sup>65</sup>. NIL permite producerea de diverse nanostructuri periodice de înaltă rezoluție atât pe suprafețe dure, cât și pe suprafețe moi, cum ar fi materialele plastice și substratele flexibile: hârtie, plastic și alte foi de polimeri<sup>66-69</sup>.

Noile modele 3D au dobândit un interes ridicat, în special datorită capacității lor de a crește semnificativ suprafața de detecție, permițând o densitate mai mare de nanostructuri plasmonice și permițând o detecție moleculară extrem de reproductibilă, ultrasenzitivă și specifică<sup>70</sup>. În acest studiu s-a propus o nouă platformă de detecție 3D nanostructurată, reproductibilă, fabricată prin tehnica NIL, cu senzitivitate ridicată, până la concentrații de analit de până la 10 pM. Ca substrat SERS, am depus filme subțiri de Ag cu grosimi cuprinse între 10 nm și 100 nm pe un substrat de plastic IPS®. Pentru a evalua performanța SERS a substratelor flexibile, transparente, imprimate, acoperite cu Ag de patru grosimi diferite, am ales CV ca analit. CV are caracteristici vibraționale bine stabilite ca o moleculă standard utilizată în mod obișnuit și a fost raportată ca analit în studiile care au atins detecția monomoleculilor prin utilizarea SERS<sup>71-73</sup>. *Ca o noutate, în această lucrare, potențialul de îmbunătățire a SERS a fost explorat luând în considerare sinergia a trei aspecte cheie: metalizarea Ag, efectul creșterii grosimii filmului de Ag și contribuția la amplificarea SERS a nanotrenches-urilor periodice fabricate prin NIL.*

În experimentele noastre am folosit o matriță Si de 4.5 cm × 4.5 cm fabricată la comandă de către producător prin litografie cu fascicul electronic (EBL). Acesta constă într-o suprafață pătrată de 1 cm × 1 cm care conține o rețea periodică de nanolinii cu lățime egală (400 nm) și nanogapuri cu o adâncime de 300 nm și un pas de 800 nm. Pentru a preveni degradarea și lipirea, matrița a fost supusă unui tratament de acoperire cu perfluorodeciltriclorosilanul,

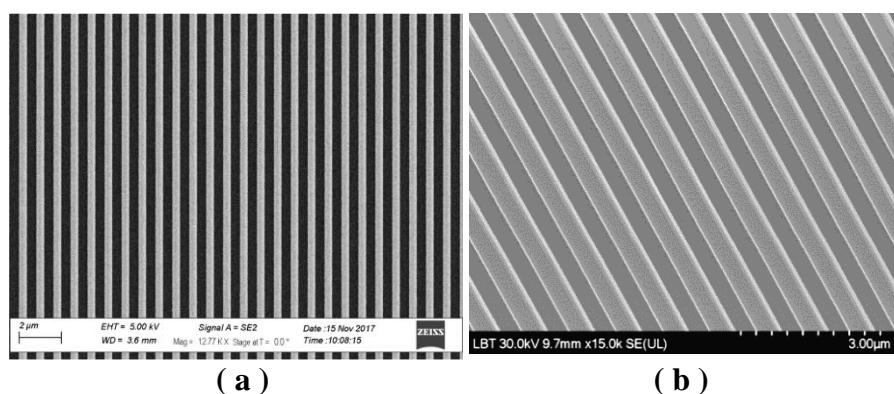


cunoscut și sub numele de FDTS ca strat antiadeziv. **Figura 3.1** ilustrează un protocol schematic în etape de fabricare a substratului imprimat și utilizarea ulterioară a acestuia pentru măsurători SERS.



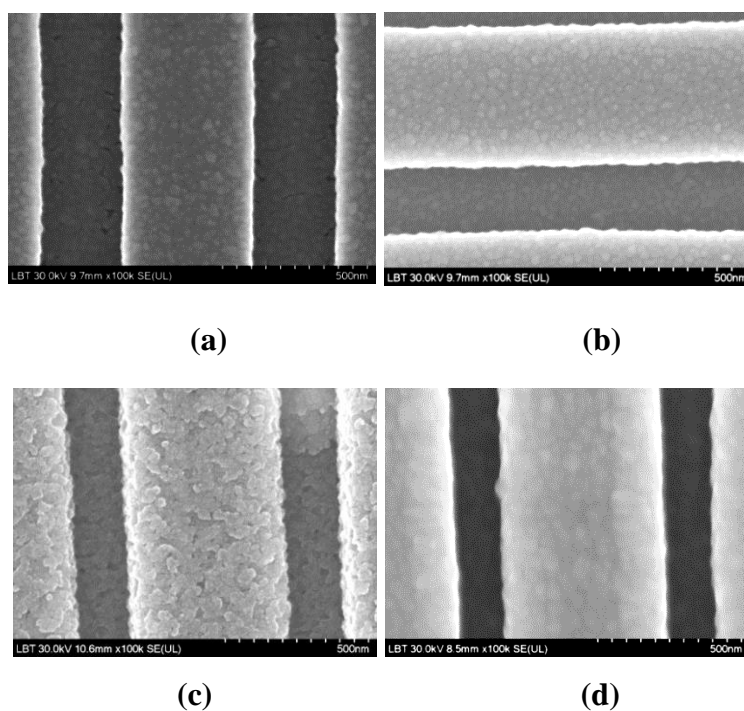
**Figura 3.1** Protocol schematic, pe etape, de fabricare a substratului imprimat și utilizarea ulterioară a acestuia pentru măsurători SERS (Reprodus din A. Colniță, D. Marconi, N. E. Dina, I. Brezeștean, D. Bogdan, I. Turcu, Volume 276, /doi.org/10.1016/j.saa.2022.121232, Spectrochimica Acta Part A ) <sup>74</sup>.

Procesul de fabricare implicat, folosind NIL termic, același echipament și același substrat, a fost prezentat în alt studiu <sup>75</sup>. Pe scurt, substratul IPS® este încălzit la o temperatură de 155 °C pentru a face substratul polimeric moale. **Figura 3.2** ilustrează o imagine de microscopie electronică cu baleiaj (SEM) a matriței cu tiparul de nanostraturi și a arhitecturii sale imprimate pe un substrat IPS®. După răcirea substratelor imprimate, Ag a fost depus pe plasticul modelat cu ajutorul unui echipament de depunere Q150R PLUS (Quorum Technologies Ltd., Lewes, Regatul Unit) de pe o țintă de Ag de tip disc (57 mm diametru, 0,1 mm grosime).



**Figura 3.2.** a) Imagine SEM a matriței cu model periodic de nanotrenches utilizat în tehnica de imprimare NIL (prin intermediul NIL Technology ApS); b) Imagine SEM a unui substrat IPS® imprimat (Reprodus din A. Colniță, D. Marconi, N. E. Dina, I. Brezeștean, D. Bogdan, I. Turcu, Volume 276, /doi.org/10.1016/j.saa.2022.121232, Spectrochimica Acta Part A ) <sup>74</sup>

Morfologia celor patru probe de diferite grosimi de Ag a fost evaluată prin măsurători SEM, iar micrografiile reprezentative sunt prezentate în **Figura 3.3**. Este remarcabil faptul că, pentru toate probele, atomii de Ag au format pelicule uniforme și granulare, nanoclusterii de Ag fiind distribuiți uniform pe substratul de plastic nanostructurat și imprimat. În cazul probei cu grosimea Ag de 10 nm (**Figura 3.3a**) se formează un film neregulat cu zone posibil discontinue. Dimensiunea granulelor a fost estimată din imaginea SEM ca fiind de  $\approx 20$  nm. Aspectul granular domină suprafața *nanotrenches*-urilor și spațiile dintre ele. O grosime a peliculei de 25 nm (**Figura 3.3b**) oferă șansa ca nanoclusterii de Ag să se conecteze și să formeze un substrat metalic foarte subțire și dur, cu o dimensiune medie a acestora de 30 nm estimată din imaginile SEM, care poate contribui în mod echitabil la îmbunătățirea SERS. O grosime suplimentară de Ag crescută la 50 nm (**Figura 3.3c**) contribuie la reducerea distanței dintre nanoclusteri, la creșterea rugozității și la creșterea dimensiunii nanoclusterilor de Ag până la 35 nm. Distribuția uniformă pe partea superioară și inferioară a granulelor de Ag strâns împachetate (așa cum s-a demonstrat în continuare prin măsurătorile AFM) conduce la o creștere a raportului suprafață-volum al nanostructurilor plasmonice, așa cum s-a demonstrat<sup>76</sup>.

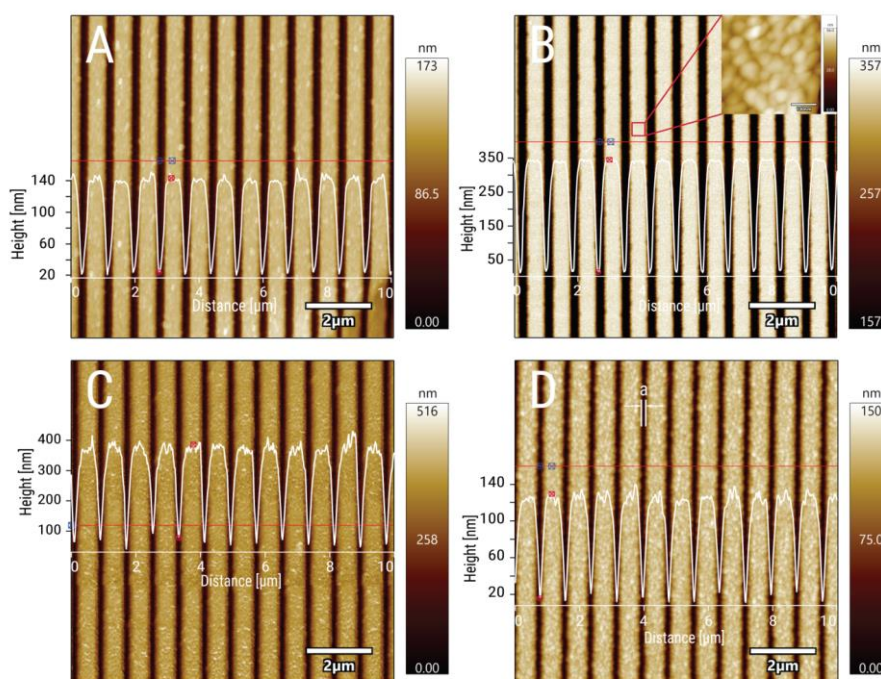


**Figura 3.3** Imagini SEM reprezentative ale *nanotrenches*-urilor acoperite cu Ag cu filme de: (a) 10 nm; (b) 25 nm; (c) 50 nm și, respectiv, (d) 100 nm grosime ((Reprodus din A. Colniță, D. Marconi, N. E. Dina, I. Brezeștean, D. Bogdan, I. Turcu, Volume 276, /doi.org/10.1016/j.saa.2022.121232, Spectrochimica Acta Part A )<sup>74</sup>.

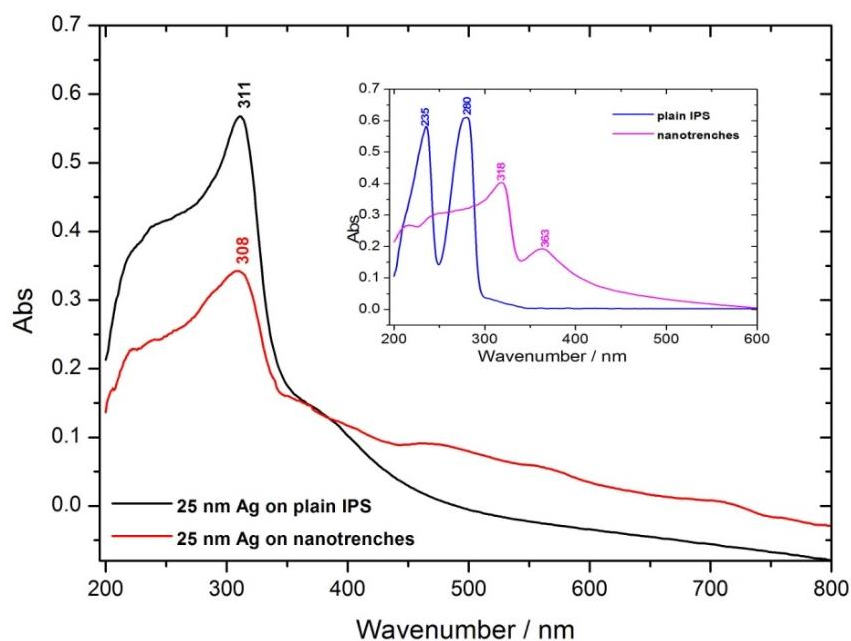
Pentru a demonstra potențialul de amplificare SERS al substratului nanoimprinat acoperit cu Ag, am determinat mai întâi o limită de detecție pentru analiza Raman a CV. Pentru aceasta, am utilizat doar substratul de plastic, fără model sau film de Ag depus pe suprafața acestuia.

#### Caracterizarea AFM a nanoplatformelor ordonate acoperite cu Ag

**Figura 3.4** prezintă imagini AFM ale celor patru probe după depunerea Ag. Stratul este continuu și uniform distribuit pe *nanotrenches*. Pasul a fost evaluat din profilele de secțiune și este constant (800 nm) pentru toate cele patru probe. Dimpotrivă, distanța dintre două muchii consecutive (indicată ca distanță  $a$  în **Figura 3.4D**) scade de la aproximativ 390 nm (pentru depunerea de Ag de 10 nm) la aproximativ 310 nm (pentru depunerea de Ag de 100 nm), din cauza grosimii crescute a stratului metalic. Morfologia stratului de Ag a fost evaluată pe o suprafață de șanț de 400 nm și indică un strat continuu format din grăunțe suprapuse cu dimensiuni de zeci de nanometri, mai exact cu diametrul de aproximativ 30 nm pentru grosimea de 25 nm a Ag (inserați în **Figura 3.4B**).



**Figura 3.4.** Imagini AFM 2D (dimensiune de scanare 10  $\mu\text{m}$ ) ale șanțurilor periodice după depunerea a 10 nm (A), 25 nm (B), 50 nm (C) și, respectiv, 100 nm (D) de Ag, care arată un strat continuu care acoperă substratul. Inserția din B indică morfologia (dimensiunea de scanare de 400 nm) a suprafeței tranșelor. Profilurile secțiunii corespund liniilor roșii evidențiate în imaginile 2D (Reprodus din A. Colniță, D. Marconi, N. E. Dina, I. Brezeștean, D. Bogdan, I. Turcu, Volume 276, /doi.org/10.1016/j.saa.2022.121232, Spectrochimica Acta Part A )<sup>74</sup>.



**Figura 3.5.** Spectre UV-Vis pe IPS® simplu și imprimat cu 25 nm Ag, cu un inset care ilustrează spectrele UV-Vis pe substrat IPS® simplu și imprimat (Reprodus din A. Colniță, D. Marconi, N. E. Dina, I. Brezeștean, D. Bogdan, I. Turcu, Volume 276, /doi.org/10.1016/j.saa.2022.121232, Spectrochimica Acta Part A )<sup>74</sup>.

Analiza UV-Vis a eșantioanelor de IPS® simple și a celor imprimat cu rețeaua de *nanotrenches* este prezentată în **Figura 3.5**. Spectrul UV-Vis arată un efect minim al zonei nanostructurate în comparație cu substratul de plastic acoperit cu un film subțire de Ag cu o grosime de 25 nm. Astfel, are loc o deplasare în albastru de la 311 nm la 308 nm și are loc o lărgire a benzii de absorbție. Așa cum se arată în această figură, se poate identifica efectul hipocromic, așa cum a fost sugerat și în<sup>77</sup>; ținând cont de faptul că ambele substraturi IPS® au suferit un tratament termic în timpul procesului de imprimare, înainte de depunerea Ag, se poate concluziona că scăderea absorbției se datorează prezenței *nanotrenches*-urilor ordonate. Insetul din **Figura 3.5** prezintă spectrele UV-Vis ale plasticului simplu și ale celui imprimat cu rețeaua de *nanotrenches*-urilor. Spectrul UV-Vis al IPS® simplu are 2 benzi puternice la 235 nm și 280 nm. Spectrul UV-Vis al zonei care conține *nanotrenches*-uri ordonate este destul de asemănător cu celelalte două spectre UV-Vis ale probelor pe bază de Ag și are 2 peak-uri la 318 nm și 363 nm.

Constatările noastre sugerează că filmul de argint de 25 nm care acoperă *nanotrenches*-urile imprimat prin NIL în plastic este cea mai promițătoare dintre cele 4 grosimi diferite ale filmului de Ag care au fost testate. AEF final obținut în acest caz a fost de  $1.7 \times 10^7$ , cu o contribuție a filmului de argint de numai un ordin de mărime.

Substratele SERS produse care conțin un film de Ag de 25 nm depus pe *nanotrenches*-urile imprimante au prezentat o suprafață plasmonică considerabil îmbunătățită și mult mai uniformă decât alte filme, de grosime mai mare. În mod specific, substratele SERS cu agregate de argint au permis o sensibilitate SERS pentru detectarea CV până la o concentrație limită de 10 pM. În plus, au fost estimați factori de amplificare între  $2.3 \times 10^5$  și  $1.7 \times 10^7$  atunci când s-au luat în considerare alte 4 benzi marker SERS ca referință. Scopul nostru final este de a utiliza aceste substrate SERS pentru a dezvolta biosenzori optici pentru detectarea moleculelor de specifice bacteriilor cu impact ridicat în *quorum sensing*.

### III.2 Detectia cianotoxinei Nodularin

Cianobacteriile, cunoscute și sub numele de alge verzi-albastre, deși, strict vorbind, nu sunt alge, ele reprezintă până la 70% din întreaga biomasă fitoplanctonică și se crede că sunt primele microorganisme fotosintetice oxigenate de pe Pământ<sup>78,79</sup>. Acestea populează aproape toate mediile marine și de apă dulce și utilizează lumina solară ca sursă de energie pentru a produce biomasă din dioxid de carbon (CO<sub>2</sub>). În lipsa unor strategii eficiente de atenuare a creșterii lor excesive în condiții de eutrofizare (înfloririle masive de cianobacterii) poate fi afectată calitatea apei, prin inducerea toxicității în mediile de apă dulce și marine<sup>273</sup>. Mai mult, înmulțirea necontrolată a cianobacteriilor pot induce la eliberarea de toxine cauzatoare de boli hepatice, digestive și neurologice prin ingestia de către organismele vii<sup>80-83</sup>. Cianobacteriile produc toxine puternice, cum ar fi microcistinele hepatotoxice (MC) și nodularinele (NOD)<sup>84-86</sup>. MCs și NODs sunt hepta- și pentapeptide cu structuri foarte asemănătoare, care s-au dovedit că provoacă hepatotoxicitate prin inhibarea proteinelor fosfat 1A și 2A (PP1 și PP2A) care conduc la utilizarea intensivă a proteinelor celulare vitale. După ingestie, aceste toxine sunt absorbite din ileon în fluxul sanguin și procesate de ficat prin intermediul unor transportatori de anioni organici transmembranari multispecifici<sup>87</sup>.

NOD sunt produse de cianobacteria filamentoasă *Nodularia spumigena*<sup>88</sup> și de specia bentonică *Nodularia sphaerocarpa* PCC7804<sup>89-91</sup>. Biosinteza lor este reglată de gene și se realizează în mod non-ribosomal, conform unui mecanism similar implicat în producerea MC-urilor<sup>92</sup>. În prezent, sunt cunoscute zece variante structurale ale NOD-urilor<sup>93</sup>. Aceste tipuri de MC legate de proteine nu au fost detectate cu ajutorul abordărilor analitice bine cunoscute, astfel încât conținutul real de MC din floarea cianobacteriană a fost subestimat<sup>94</sup>.

În zilele noastre, se utilizează trei tipuri de metode analitice pentru detectarea MC: biologice, biochimice (testul imunoenzimatic - ELISA) și chimice (cromatografie lichidă de

înalță performanță - HPLC, cromatografie lichidă-spectrometrie de masă - LC-MS, electroforeză capilară de înalță performanță - HPCE și cromatografie în fază gazoasă - GC)<sup>95</sup>. Metodele biologice au limitări serioase, cum ar fi: lipsa sensibilității, nu sunt adecvate pentru cuantificare sau pentru teste de rutină și la scară largă, necesită un număr mare de cobai<sup>96,97</sup>.

Biosenzorii pe bază de SERS pentru detectarea MCs s-au dovedit a fi rapizi, foarte sensibili, nedistructivi și ușor de utilizat. Recent, a fost raportat un nou imunosenzor SERS pentru detectarea și cuantificarea toxinei MC-LR în medii acvatice<sup>98</sup> cu o limită de detecție de 0,014 μg/L, în timp ce același grup a dezvoltat ulterior un aptasenzor sensibil și selectiv pentru detectarea cu modul dual fluorescență-SERS a toxinelor MC-LR<sup>99</sup>.

În acest studiu, raportăm utilizarea a două tehnici spectroscopice foarte sensitive, DCDR și SERS pentru detectarea NOD și atribuirea completă a modurilor sale vibraționale, în combinație cu calculele DFT. Pentru analiza DCDR am ales o lamelă comercială cunoscută sub numele de Tienta SpectRIM™, care oferă o limită de detecție de până la 10<sup>-4</sup> M. Prin utilizarea unui substrat comercial cu nanopateriale cu gropi pătrate piramidale periodice (Klarite™), s-a obținut o limită de detecție SERS (LOD) de 10<sup>-7</sup> M. În casă, fabricate prin NIL, *nanotrenches*-uri periodice, au fost testate, de asemenea, filme nanostructurate de argint (Ag) cu grosimi de 25 nm obținute prin depunere cu curent continuu (DC). Atunci când s-a utilizat un sol de Ag obișnuit pentru analiza SERS, s-a atins un LOD de 58 pM. Din cunoștințele noastre, acesta este primul studiu SERS pe NOD ca piesă centrală raportat până în prezent.

### III.2.1. Analiza Raman a cianotoxinei Nodularin prin DCDR (Drop Coating Raman Deposition)

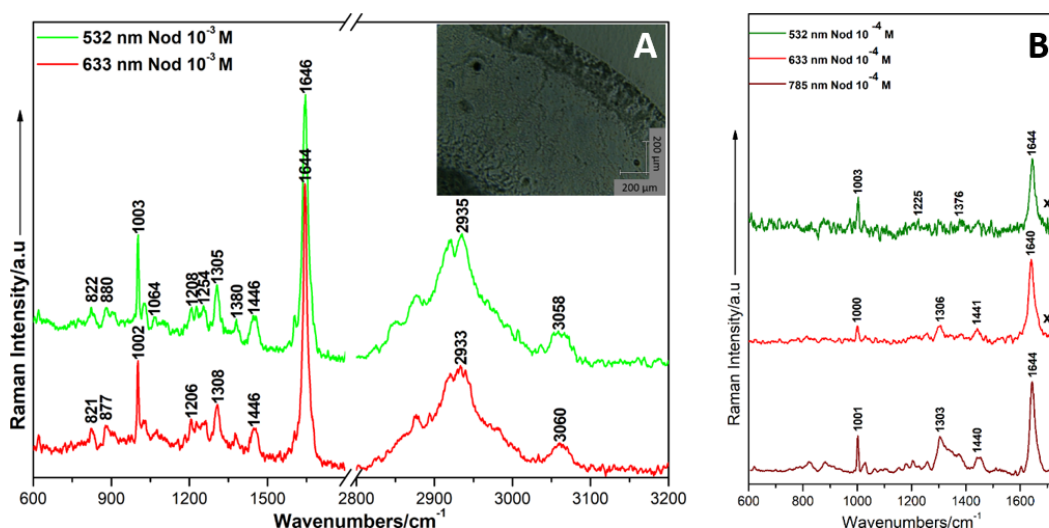
După cum s-a demonstrat în studii anterioare<sup>100</sup>, analiza DCDR a demonstrat o sensibilitate de detecție superioară prin tehnica Raman convențională a moleculelor biologice mici, cum ar fi acidul acetilsalicilic, riboflavina și contaminanții<sup>101,102</sup> până la o limită de detecție de 10<sup>-8</sup> M. Printre avantajele analizei DCDR se numără utilizarea probei uscate, preconcentrate, într-un volum mic de probă, lipsa interferențelor cauzate de solvenți și capacitatea de a segrega orice impuritate existentă<sup>103</sup>. Prin urmare, atunci când achiziția semnalului are loc de la marginea exterioară a picăturii în formă de inel de cafea uscată pe o suprafață hidrofobă, se detectează un semnal Raman semnificativ îmbunătățit.

**Figura 3.6** prezintă spectrele DCD Raman obținute prin utilizarea diferitelor linii laser ca surse de excitație pe un substrat Tienta®. Benzile marker sunt în bună concordanță cu profilul Raman NOD raportat în literatura de specialitate<sup>100</sup> și prezintă o reproductibilitate ridicată, independent de linia laser. Cele mai intense benzi Raman sunt atribuite aminoacidului

fenilalanină -Phe ( $1003\text{ cm}^{-1}$ , cea mai puternică bandă din regiunea numerelor de undă joase,  $823\text{ cm}^{-1}$ ,  $1208\text{ cm}^{-1}$ ) sau grupului Adda, comun tuturor microcistinelor ( $1208\text{ cm}^{-1}$ ,  $1304\text{ cm}^{-1}$ ,  $1375\text{ cm}^{-1}$ ,  $1452\text{ cm}^{-1}$ ,  $1645\text{ cm}^{-1}$ ), așa cum au arătat și Halvorson *et al*<sup>100</sup>.

Benzile Raman observate la  $1645\text{ cm}^{-1}$  sunt caracteristice amidei I, iar în jurul valorii de  $1003\text{ cm}^{-1}$  sunt atribuite inelului fenil din reziduu Adda. Alte benzi marker prezente pentru molecula de NOD și raportate anterior în literatura de specialitate se găsesc în intervalul  $1200 - 1300\text{ cm}^{-1}$  și sunt caracteristice Amidei III. Spre deosebire de studiile raportate anterior<sup>100</sup>, în această lucrare se descriu caracteristicile spectrale găsite în intervalul  $2700 - 3200\text{ cm}^{-1}$ . Am putut identifica benzi intense în intervalul  $2880 - 3060\text{ cm}^{-1}$ , fiind caracteristice vibrațiilor CH simetrice. În acest caz, a fost atinsă o limită de detecție de numai  $10^{-3}\text{ M}$ , astfel că am investigat alte substraturi cu performanțe de detecție mai mari.

Astfel, **Figura 3.6A** dezvăluie spectrul NOD pe substratul comercial hidrofob Tienta SpectRIM<sup>TM</sup>, un slide hidrofob. Proba de  $2\text{ }\mu\text{l}$  a fost depusă și lăsată să se usuce la aer, apoi iradiată pentru achiziția semnalului Raman. Spectrele Raman obținute pentru NOD înregistrate prin utilizarea a trei linii laser sunt aproape identice cu cele obținute pe substratul hidrofob Tienta®. **Figura 3.6B** prezintă spectrul Raman al NOD la o concentrație de  $10^{-4}\text{ M}$ . Prin scăderea concentrației, benzile marker ale NOD pot fi în continuare observate clar la  $1003\text{ cm}^{-1}$ ,  $1376\text{ cm}^{-1}$  și cea mai intensă bandă la  $1644\text{ cm}^{-1}$ . În plus, am încercat să obținem o limită de detecție mai mică prin trecerea de la substraturile comerciale hidrofobe la substraturile mai performante SERS.



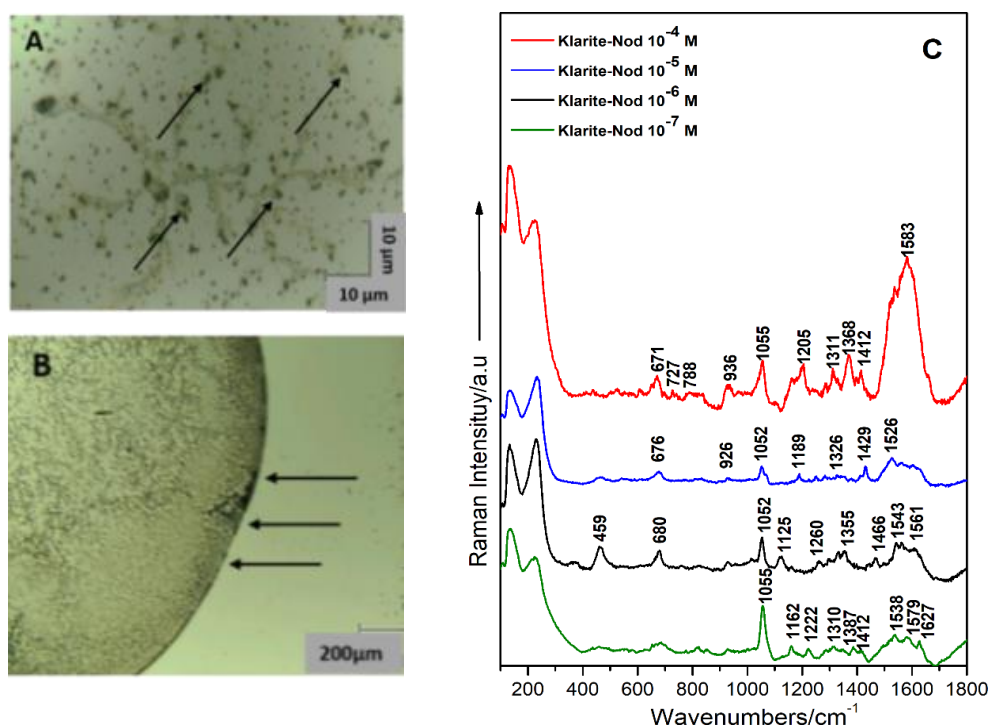
**Figura 3.6** Spectre DCDR ale NOD înregistrate pe substratul Tienta SpectRIM<sup>TM</sup> pentru NOD în etanol cu o concentrație finală de  $10^{-3}\text{ M}$  (A) și, respectiv,  $10^{-4}\text{ M}$  (B), utilizând liniile laser de 785 nm, 532 nm și 633 nm.

Inset cu imaginea optică prin utilizarea obiectivului de  $20\times$ .

### III.2.2 Detecția SERS a cianotoxinei Nodularin

**Figura 3.7 C** arată spectrul NOD pe substratul SERS comercial Klarite la diferite concentrații, până la  $10^{-7}$  M. Substratul Klarite a fost utilizat anterior cu succes pentru detectarea fără etichetă a bacteriilor  $10^4$ , evidențiind aspectele sale cheie de performanță SERS, cum ar fi un semnal SERS puternic în condiții ambientale și ușurința de a depune proba pe suprafața sa. Am utilizat aceeași depunere prin picurare pe acest substrat și am urmărit să obținem o limită de detecție sub  $10^{-4}$  M. În **Figura 3.7 A** și **B** ilustrăm imagini optice reprezentative ale clusterelor de probe formate după evaporarea etanolului. Am investigat în principal marginile "inelului de cafea", unde sunt acumulate microcristale vizibile de NOD; prin urmare, se așteaptă un semnal Raman amplificat.

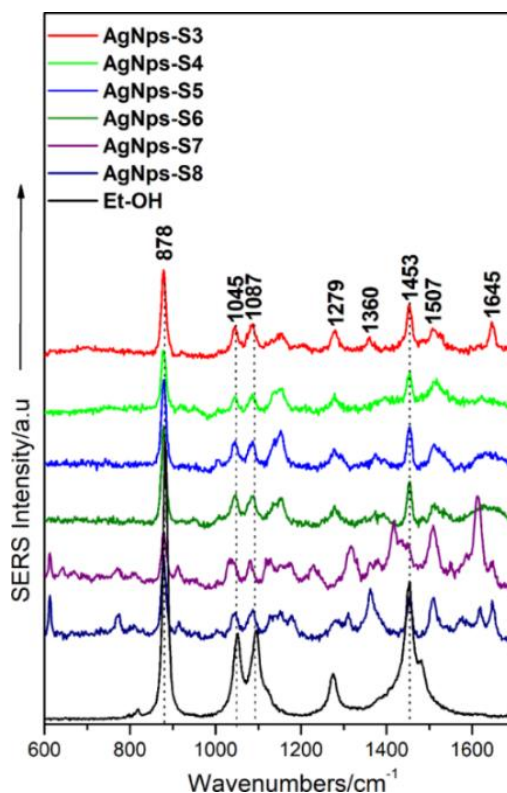
O bandă SERS de intensitate medie spre intensă este prezentă la toate concentrațiile testate la  $1055\text{ cm}^{-1}$ . Această caracteristică spectrală este observată în special în spectrele SERS înregistrate pe substratul Klarite. Este posibil ca piramidele periodice inversate imprimat pe acest substrat să fi forțat moleculele NOD să se acumuleze în cavitățile lor în diferite configurații geometrice și, astfel, adsorbția moleculară ar fi putut fi realizată în mai multe orientări față de suprafața de argint.



**Figure 3.7.** Optical images showing samples for Nodularin on Klarite substrate using  $100\times$  (A) and  $20\times$  (B) magnification. Arrows show selected spots for laser irradiation. SERS spectra recorded on Klarite substrate for Nodularin in ethanol at different concentrations using the 532 nm laser line (C).



**Figura 3.8** prezintă un proces de detectare sistematică a NOD prin utilizarea AgNPs la diferite concentrații de până la  $10^{-12}$  M. La concentrații mici, spectrele SERS prezintă benzi specifice etanolului:  $878\text{ cm}^{-1}$ ,  $1045\text{ cm}^{-1}$ ,  $1087\text{ cm}^{-1}$  și, respectiv,  $1453\text{ cm}^{-1}$ . În ciuda acestui fapt, începând cu concentrația de  $10^{-12}$  M, caracteristicile spectrale specifice NOD sunt din ce în ce mai vizibile. Banda din jurul valorii de  $1365\text{--}1375\text{ cm}^{-1}$  crește în intensitate mai ales pentru cea mai mică LOD. Intervalul spectral cuprins între  $1500\text{ cm}^{-1}$  și  $1650\text{ cm}^{-1}$  este, de asemenea, foarte abundent în caracteristici, în special banda marker pentru NOD găsită la  $1645\text{ cm}^{-1}$  devine din ce în ce mai dominantă în această regiune.



**Figura 3.8.** Spectrele SERS ale probelor de NOD/etanol la diferite concentrații, utilizând linia laser de  $532\text{ nm}$  și AgNPs sintetizate de Lee-Meisel.

Se observă o bandă SERS surprinzător de intensă și vizibilă, în comparație cu măsurarea în picături uscate, realizată pe substrate solide, la  $1507\text{ cm}^{-1}$ . Mai mult, în analiza Raman această bandă nu este prezentă în mod semnificativ. Aceasta ar putea fi explicată prin poziția înclinată a moleculei în raport cu suprafața metalică a AgNPs.

Acest studiu se concentrează pe detectarea și caracterizarea cianotoxinei NOD prin utilizarea unor abordări îmbunătățite de suprafață bazate pe microspectroscopia Raman. Prin DCDR a fost evaluată pentru NOD și a fost detectat cu un LOD de  $10^{-4}$  M. Analiza SERS a fost efectuată pentru detectarea NOD chiar și la un nivel de  $10^{-12}$  M cu ajutorul de AgNPs. Am

corelat benzile marker SERS în ceea ce privește intensitatea și poziția cu semnalul DCDR specific NOD obținut la concentrații mai mari. Utilizând diferite linii laser ca surse de excitație, am reușit să detectăm NOD cu benzi marker ușor deplasate, dar cu modificări semnificative ale intensității. Experimentele noastre arată că, pentru detectarea fără etichetă, fizisorbția singură, chiar dacă este facilitată prin preconcentrarea probei sau prin utilizarea unor substraturi solide performante SERS, nu este suficientă. Prin adsorbția NOD pe suprafața de argint și interacțiunea chimică prin intermediul grupărilor cheie N, regimul SERS este pe deplin atins și se obține o amplificare suplimentară de cel puțin un ordin de mărime.

### III.3 Nanoparticule de argint coloidal autoasamblate pe substraturi solide

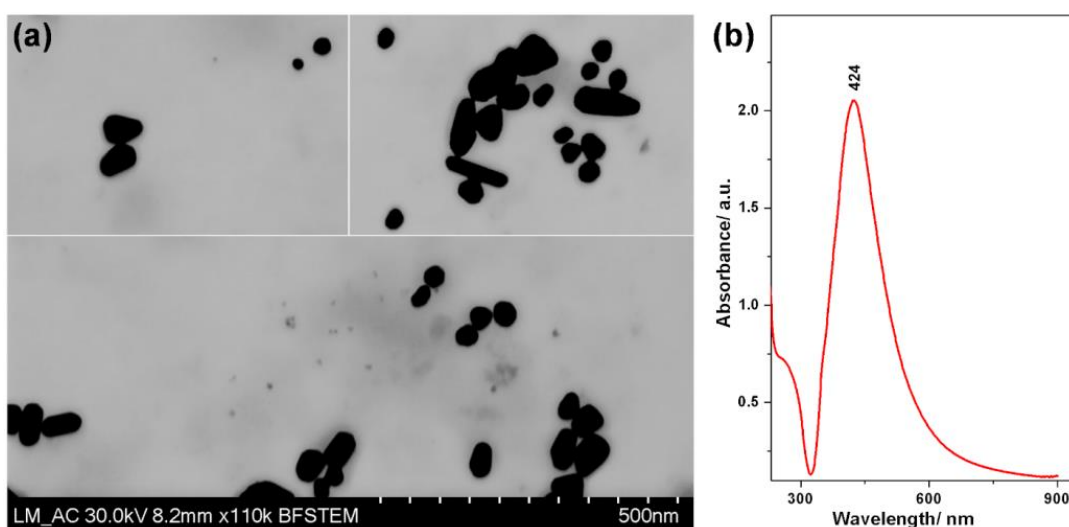
Pesticidele se numără printre cele mai periculoase substanțe chimice care dăunează mediului și necesită o monitorizare strictă <sup>105</sup>. Substraturile SERS solide fabricate prin metode avansate de nanolitografie, cum ar fi EBL, sunt excelente în ceea ce privește controlul asupra morfologiei nanostructurii și versatilitatea proprietăților optice, necesare pentru amplificare SERS. AuNPs și AgNPs, care au în general diametre cuprinse între 10 și 200 nm, sunt ușor de sintetizat și pot fi utilizate pentru detectarea reziduurilor de pesticide și a biotoxinelor <sup>106,107</sup>.

Tiabendazolul (TBZ), un derivat de benzimidazol, este unul dintre pesticidele utilizate pe scară largă, care este, de asemenea, folosit ca fungicid pentru a preveni mucegaiul, putregaiul și arsura fructelor. Deși TBZ are o toxicitate scăzută în comparație cu alte pesticide, este asociat cu efecte adverse, inclusiv nefrotoxicitate, hepatotoxicitate, carcinogenitate și teratogenitate <sup>108</sup>. Pentru a măsura reziduurile de TBZ în probele de alimente <sup>109</sup>, a fost propusă o metodă SERS combinată cu un substrat omogen și reutilizabil de tip "gold nanorod array" (GNR) <sup>108</sup>. SERS a fost, de asemenea, aplicat ca tehnică analitică pentru a detecta tiabendazolul (TBZ) la concentrații mici, utilizând coloidul Ag <sup>109,110</sup>.

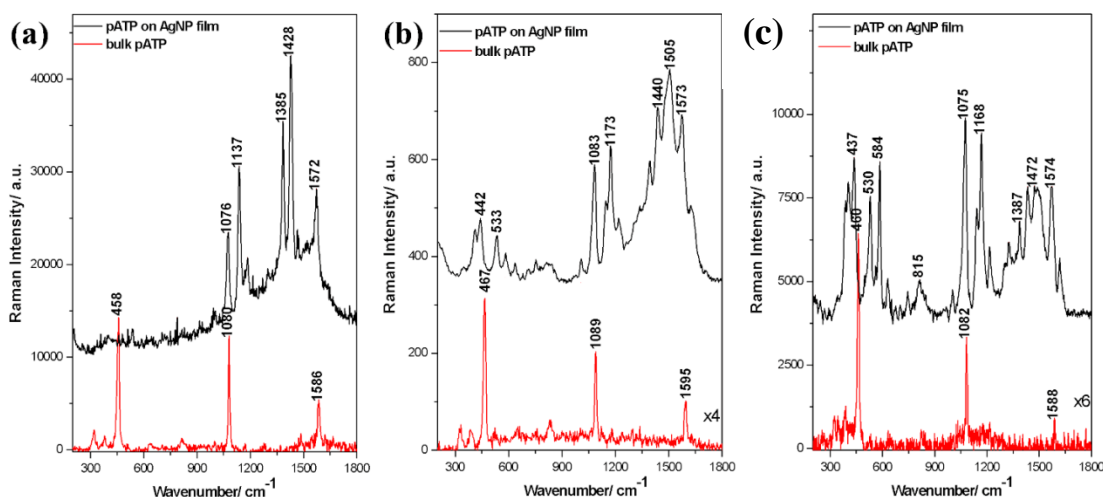
Endosulfanul - (ES) este un pesticid organoclorurat cu spectru larg care a fost utilizat pe cereale, fructe, legume și bumbac încă din anii 1950 <sup>111,112</sup> și este, de asemenea, una dintre cele mai stabile substanțe detectate în mediu la nivel mondial. Acesta face parte din categoria poluanților organici persistenti (POP) <sup>113</sup> din cauza bioacumulării sale, a rezistenței sale la transportul pe distanțe lungi și a efectelor sale negative asupra sănătății umane, a ecosistemelor și a sistemelor acvatice <sup>114,115</sup>. În plus, pesticidul organoclorurat ES a fost detectat pentru prima dată cu ajutorul SERS la concentrații scăzute <sup>116</sup>. Detectarea pesticidelor organoclorurate reprezintă încă o mare provocare, din cauza afinității scăzute față de suprafețele metalice.

În cele ce urmează raportăm fabricarea filmelor de Ag prin autoasamblarea convectivă (CSA) de AgNPs sintetizate prin metoda Lee și Meisel <sup>117</sup>. După o caracterizare morfologică prin SEM, filmele sunt evaluate ca substrat SERS cu moleculă de para-aminotiofenol (pATP), utilizând trei linii laser de excitație. Ulterior, este explorată posibilitatea de a utiliza filmele AgNP fabricate ca substrate pentru caracterizarea SERS a două tipuri de pesticide, tiabendazol (TBZ) și  $\alpha$ -endosulfan ( $\alpha$ -ES). Au fost optimizate filme de AgNP pentru funcționalizarea suprafeței și pentru o mai bună ancorare a pesticidelor la suprafața metalică.

În mod specific, două tipuri de molecule de tiol, hexanetiol (HT) și octanetiol (OT), au fost utilizate în încercarea de a îmbunătăți interacțiunea dintre  $\alpha$ -ES și suprafața metalică. În plus, am observat că semnalele SERS ale HT și OT înregistrate pe filmele de AgNPs oferă diferențe spectrale clare, utile pentru diferențierea lor, în ciuda similitudinii acestor două molecule. Imaginile TEM ale AgNPs coloidale preparate sunt prezentate în **Figura 3.9(a)**. Pe lângă particulele de formă sferică, multe dintre ele posedau o formă asimetrică asemănătoare unei tije. Histograma dimensiunilor a indicat o distribuție bimodală a dimensiunilor, majoritatea particulelor având dimensiuni de aproximativ 40 nm, cu o populație suplimentară cu dimensiuni de aproximativ 60 nm. Spectrul de extincție UV/VIS a prezentat banda caracteristică atribuită rezonanței plasmonului de suprafață localizat, cu un maxim la 424 nm.



**Figura 3.9** (a) Imagini TEM ale nanoparticulelor de Ag. (b) Spectrul de extincție al suspensiei coloidale de nanoparticule de Ag sintetizate.



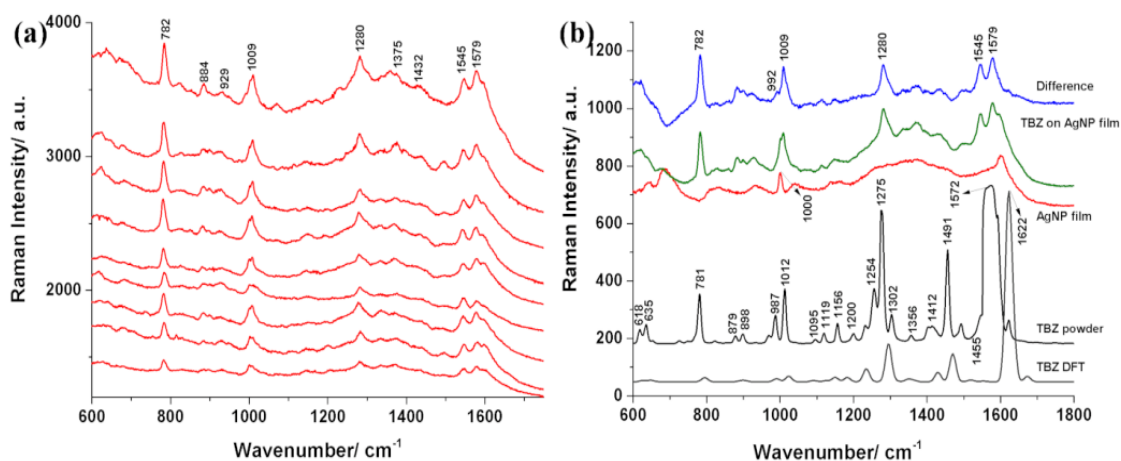
**Figura 3.10** Spectrele SERS ale p-ATP adsorbit pe filmele de AgNP și spectrele Raman ale pulberii de p-ATP, obținute la diferite excitații laser: (a) 532 nm, (b) 633 nm, (c) 785 nm.

**Figura 3.10** prezintă spectrele SERS tipice ale moleculei de p-ATP pe filmele AgNP înregistrate la trei linii laser diferite utilizate în mod obișnuit, împreună cu spectrele Raman corespunzătoare ale p-ATP.

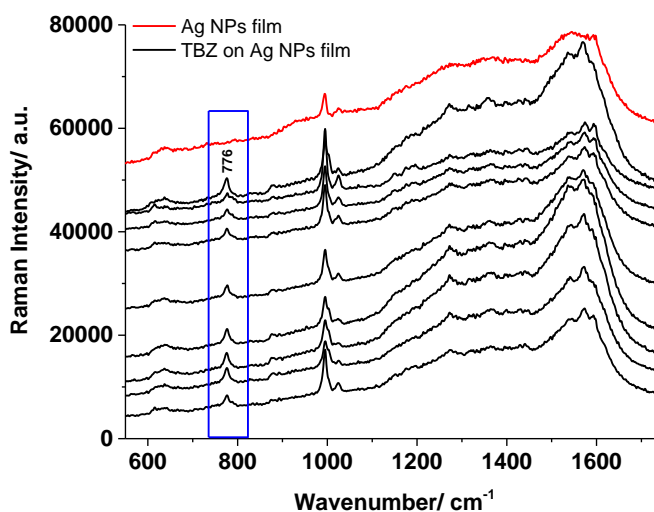
### III.3.1 Detecția SERS a fungicidului tiabendazol

Filmele AgNPs au fost utilizate ulterior pentru identificarea și caracterizarea SERS a pesticidului TBZ. Spectrele au fost achiziționate din diferite puncte de pe suprafața probelor și sunt prezentate în **Figura 3.11**. Caracteristicile spectrale observate au fost foarte asemănătoare în toate spectrele, subliniind buna reproductibilitate asigurată de substratul dezvoltat. Principalele benzi identificate sunt localizate la 782, 884, 929, 1009, 1280, 1375, 1432, 1545 și 1579  $\text{cm}^{-1}$ . Am calculat spectrele SERS medii caracteristice filmului de AgNP imersate în TBZ, respectiv filmului de AgNPs și am calculat spectrul diferențial al acestora (**Figura 3.11b**) pentru a identifica în mod clar caracteristicile spectrale ale TBZ. În plus, spectrul diferențial este comparat cu spectrul Raman obținut din pulbere și cu spectrul TBZ calculat prin DFT. De exemplu, în urma sustragerii, banda de 1000  $\text{cm}^{-1}$  caracteristică substratului de polistiren a fost eliminată în mod corespunzător și au fost evidențiate benzile de amprentă ale TBZ situate în jurul valorii de 992 și 1009  $\text{cm}^{-1}$ . Analiza spectrală vibrațională a fost efectuată în continuare pe baza datelor experimentale și a calculelor DFT. Numerele de undă vibraționale calculate și activitățile Raman au fost utilizate pentru a identifica în mod explicit modurile vibraționale. În consecință, benzile principale caracteristice TBZ pot fi detectate în spectrele SERS și atribuite unor vibrații specifice. Principalele benzi identificate aici sunt localizate la 782, 1009, 1280,

1545 și 1579  $\text{cm}^{-1}$ . Alte benzi Raman intense, cum ar fi cele de 987 și 1491  $\text{cm}^{-1}$  au apărut diminuate în spectrele SERS. Cea de 987  $\text{cm}^{-1}$  a fost vizibilă ca un umăr, în principal în spectrul diferențial calculat, în timp ce cea de 1491  $\text{cm}^{-1}$ , care corespunde vibrațiilor de întindere C - N din inelul tiazolic, s-a deplasat în albastru la 1432  $\text{cm}^{-1}$ , iar intensitatea sa relativă a fost redusă substanțial. Analizând benzile SERS de intensitate principală, putem presupune că moleculele de TBZ sunt adsorbite pe suprafața de argint prin intermediul electronilor  $\pi$  ai inelului benzenic, similar cu alte investigații anterioare<sup>118</sup>.



**Figura 3.11** (a) Spectrele SERS ale TBZ pe filmul de AgNPs colectate din diferite locații de pe substrat. Excitație 785 nm. (b) Spectrul Raman al pulberii de TBZ și spectrul Raman calculat prin DFT în comparație cu spectrul Raman al filmului de AgNPs, spectrul SERS al TBZ pe filme și spectrul diferențial calculat al acestora.



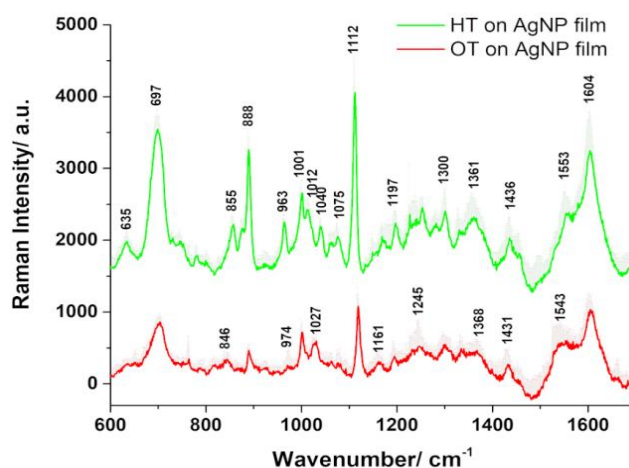
**Figura 3.12** Spectrele SERS ale TBZ înregistrate pe filmul de AgNP și ale filmului AgNP, utilizând un spectrometru Raman portabil (532 nm)

Scopul acestui experiment a fost de a determina dacă filmele de AgNPs pot fi utilizate pentru viitoarele experimente la fața locului. În astfel de aplicații, trebuie utilizate sisteme Raman compacte și portabile, care nu sunt la fel de performante ca spectrometrele Raman. În **Figura 3.12** sunt prezentate mai multe spectre obținute de la TBZ adsorbit pe filmul de AgNP. Linia laser utilizată pentru excitație a fost de 532 nm și chiar dacă filmele de AgNP au prezentat cel mai mic factor de amplificare pentru această lungime de undă de excitație, TBZ a putut fi detectat. Banda marker TBZ la  $776\text{ cm}^{-1}$  a fost observată în toate spectrele colectate din diferite locații ale filmului de AgNP. În plus, se poate observa o bună reproductibilitate a spectrelor SERS. Alte benzi caracteristice TBZ identificate în spectre sunt localizate la 1271, 1449 și  $1572\text{ cm}^{-1}$ . În plus, sunt detectate două benzi slabe la  $985$  și  $1003\text{ cm}^{-1}$ , atribuite inelului tiazolic care respiră, respectiv, întinderea C - C a inelului benzenic. Cu toate acestea, identificarea lor lipsită de ambiguitate este îngreunată din cauza suprapunerilor cauzate de benzile de  $995$  și  $1024\text{ cm}^{-1}$  observate și pe film. După cum am văzut din măsurătorile la 785 nm, aceste benzi sunt caracteristice substratului suport de polistiren. Prin urmare, o mai bună identificare a celor două benzi TBZ localizate în această regiune spectrală se obține în urma sustragerii filmului de AgNP din spectrul filmului imersat în soluția de TBZ. Buna reproductibilitate a spectrelor SERS caracteristice TBZ adsorbit pe filme de AgNPs obținute în acest studiu sugerează că aceste filme pot fi utilizate pentru detectarea acestuia chiar și în condiții de excitare cu linia laser de 532 nm, în ciuda amplificării mai mici prezentate de substrate în aceste condiții. Mai mult, se sugerează că filmele de AgNP ar putea fi utilizate pentru a detecta pesticidul TBZ pe teren, în posibile locuri contaminate.

### III.3.2 Detecția SERS a insecticidului endosulfan

Endosulfanul (ES) este un pesticid organoclorurat care are o afinitate slabă față de suprafețele metalice. Prin urmare, au fost explorate diverse abordări pentru captarea ES în apropierea suprafeței metalice prin funcționalizarea chimică a substratelor SERS <sup>119</sup>. Sistemele de monostraturi autoasamblate cu alcani tioli oferă o metodă versatilă de modificare a suprafețelor metalice pentru a crea “*buzunare*” moleculare între lanțurile alchilice și suprafața plasmonică <sup>120</sup>. Prin urmare, moleculele de pesticide ES ar putea fi prinse în apropierea suprafeței substratului plasmonic prin interacțiunea lor hidrofobă cu tiolii alcani, ceea ce ar permite detectarea lor prin SERS <sup>121</sup>. Senzitivitatea SERS este, în general, influențată de lungimea lanțului de alcanotioli <sup>122</sup>. Astfel, în această lucrare au fost folosiți tioli alcanici cu lanțuri de diferite lungimi, cum ar fi tioli hexanici (C6, HT) și tioli octanici (C8, OT). Funcționalizarea

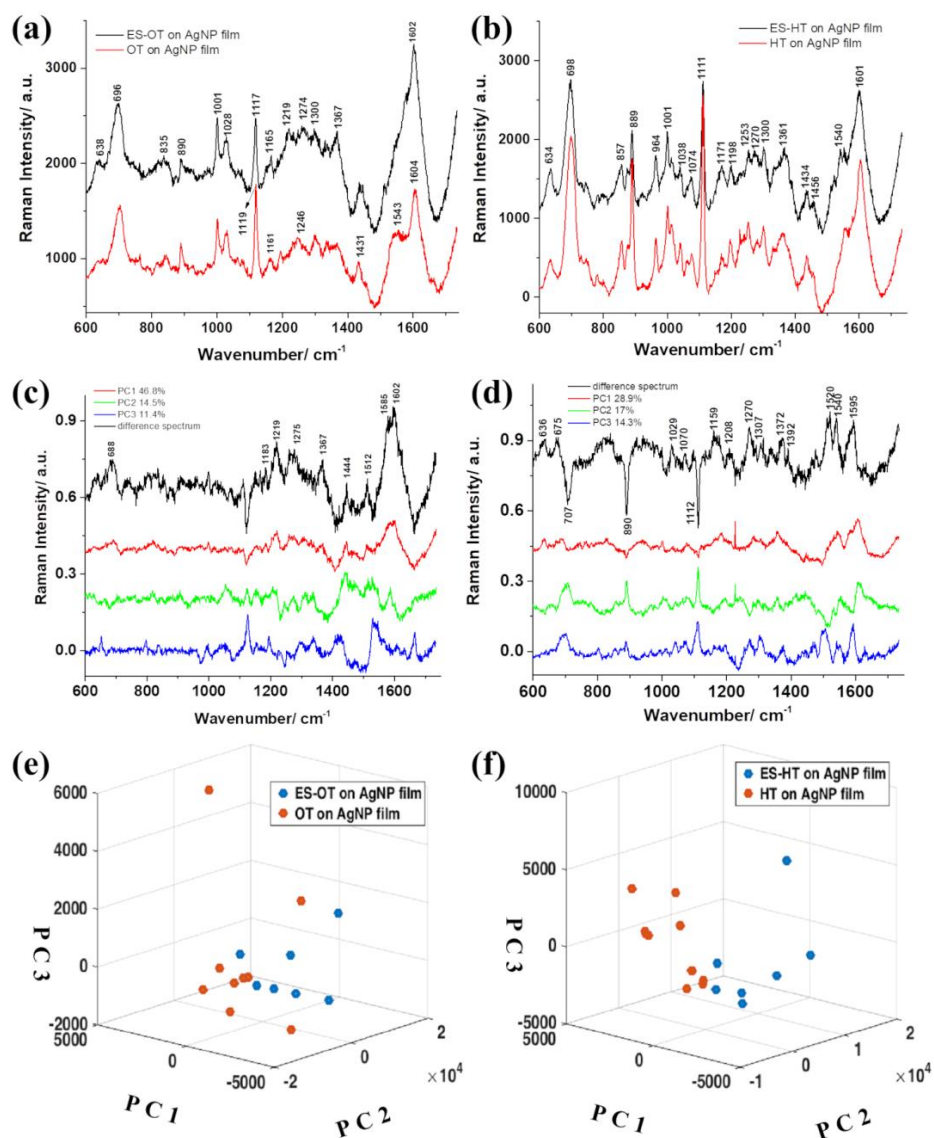
substratului AgNP cu HT și OT a fost confirmată de spectrele SERS **Figura 3.13**, iar spectrele Raman corespunzătoare <sup>122,123</sup> au fost utilizate pentru comparație în această lucrare<sup>124</sup>. La adsorbția HT și OT pe suprafața filmului AgNP, dovada chimisorbției lor se bazează pe lipsa vibrației S - H de întindere ( $\nu$ ) la aproximativ  $2575\text{ cm}^{-1}$  <sup>120</sup>. Dovada legăturii tiolat-Ag este evidențiată de comportamentul vibrațional în regiunea spectrală  $\nu(\text{C-S})$ , alături de cele  $\nu(\text{C-C})$  și  $\nu(\text{C-H})$ . Cele două benzi  $\nu(\text{C-S})$  atât pentru HT cât și pentru OT la adsorbția pe suprafața Ag au fost observate în regiunea de frecvențe  $600\text{-}750\text{ cm}^{-1}$ , fiind deplasate spre frecvențe mult mai joase decât cele din tiolii alcani puri <sup>125</sup>. Aceste vibrații sunt atribuite conformărilor "gauche" (G) și "trans" (T) în jurul celor doi atomi de carbon adiacenți atomului S (grup tiolat orientat spre suprafața Ag). Banda de la  $635\text{ cm}^{-1}$  corespunde conformerilor G  $\nu(\text{C-S})$  și cea de la  $700\text{ cm}^{-1}$  conformerilor T  $\nu(\text{C-S})$  atât pentru HT, cât și pentru OT, banda de frecvență joasă fiind bine definită doar în cazul tiolaților de alcan cu lanț mic, cum ar fi HT <sup>123</sup>.



**Figura 3.13.** Spectrele SERS medii ale filmelor de AgNP funcționalizate cu HT și OT, reprezentate împreună cu deviațiile lor standard pozitive, obținute sub excitație la  $633\text{ nm}$ .

Vibrațiile de balansare și de deformare ale metilenului au apărut în regiunea spectrală a numerelor de undă de peste  $1300\text{ cm}^{-1}$ . Vibrațiile C-H prezintă o corelație pătratică cu numărul de atomi de carbon din coloana vertebrală <sup>122</sup>. De exemplu, în cazul filmului funcționalizat cu OT, vibrațiile de balansare  $\text{CH}_3$  au prezentat un raport mai mic de intensitate relativă a benzii de  $888\text{ cm}^{-1}$  față de cea de  $857\text{ cm}^{-1}$  în comparație cu cazul HT, în corelație directă cu influența lungimii mai mari a lanțului alkyl și a interacțiunilor hidrofobe dintre lanțuri.

Pesticidul ES este o moleculă asimetrică care conține o unitate rigidă de norbornenă conectată printr-o punte  $\text{HC}_5\text{-C}_6\text{H}$  la o unitate de inel alifatic flexibil cu șapte membri (**Figura 3.14**), în care numai cele două grupări metilen ( $\text{CH}_2$ ) și gruparea sulfat ( $\text{SO}_3$ ) pot induce modificări ale conformației sale <sup>126</sup>.



**Figura 3.14** Spectrele Raman medii reprezentate pentru (a) ES-OT, respectiv OT pe film de AgNPs și (b) ES-HT, respectiv HT pe film de AgNPs. Loadings primelor trei PC și spectrele de diferență calculate corespunzătoare liganzilor (c) OT, respectiv (d) HT. Reprezentare 3D a celor două grupuri de spectre pentru (e) OT, respectiv (f) cazul HT.

Spectrul SERS al ES nu poate fi observat pe AgNP, cel mai probabil din cauza afinității scăzute a ES față de suprafața aspră a Ag. Astfel, izomerul  $\alpha$  al ES a fost analizat în forma sa pură sub formă solidă și apoi s-a depus prin imersarea filmului de AgNP funcționalizat cu monoalcanetoli, și anume HT și OT. Au fost analizate peliculele de AgNP funcționalizate cu endosulfan-octan-thiol (ES-OT) sau endosulfan-hexan-thiol (ES-HT), iar rezultatele sunt prezentate în **Figura 3.14**.

Spectrele SERS prezentate pe filmele funcționalizate cu ES-OT, respectiv ES-HT au apărut similare cu cele prezentate pe filmele funcționalizate doar cu moleculele de tiol



respective. La o privire mai atentă, totuși, pot fi identificate ușoare diferențe. Datele spectrale SERS pentru filmele acoperite cu ES au indicat slăbirea unor benzi asociate cu monotioli legați de Ag, precum și apariția mai multor benzi care pot fi asociate cu ES. Atribuirea vibrațiilor ES atât în stare solidă, cât și pe filmele subțiri de AgNPs funcționalizate cu HT/OT a fost realizată pe baza datelor generale publicate<sup>112,116,127</sup>, precum și a calculelor teoretice efectuate în acest studiu.

Interferențele de fond provenite de la filmele de AgNPs funcționalizate cu HT, respectiv OT, au fost sustrate din spectrul AgNPs imersate în ES, ceea ce a condus la apariția unor benzi negative în anumite regiuni ale spectrelor.

Analizând spectrele SERS achiziționate din filmul ES-HT AgNPs în comparație cu filmul HT-AgNPs, s-au putut observa mai multe atenuări ale intensității benzilor.

PCA a fost aplicată pe setul de date format din spectrele Raman obținute din filmele de AgNP ES-OT și OT funcționalizate. Primele trei PC au reprezentat o varianță de 72,8 %, iar încărcările sunt prezentate în **Figura 3.14 c**. PC-urile au fost utilizate pentru a diferenția cele două filme, iar diagrama 3D care arată separarea și gruparea spectrelor este prezentată în **Figura 3.14 e**. Separarea a fost obținută folosind în principal PC1, însă PC2 a arătat, de asemenea, o bună capacitate de separare. Loading PC1, care a reprezentat o variație de 46,8 % în setul de date, a prezentat caracteristici similare cu spectrul de diferență calculat prin scăderea spectrului mediu Raman al filmului AgNP funcționalizat cu OT din spectrul mediu Raman caracteristic filmului AgNP funcționalizat cu ES-OT. Caracteristicile principale au inclus următoarele benzi Raman: 630, 690, 857, 1070, 1147, 1147, 1183, 1219, 1259, 1275, 1367, 1444, 1512, 1585 și 1602  $\text{cm}^{-1}$ .

Rezultatele noastre indică faptul că lanțurile alcanice mai lungi ale OT au permis o captare mai eficientă a moleculelor ES în comparație cu lanțurile HT mai scurte, ceea ce a condus la un răspuns SERS mai bun. Datorită interacțiunii slabe dintre lanțurile alcanice din monostraturile de tiol, ansamblul lor este mai degrabă compact, reducând posibilitatea unei interacțiuni directe a pesticidului cu suprafața metalică. Cu toate acestea, HT adsorbit ar trebui să prezinte o structură mai dezordonată în comparație cu OT, care are un lanț mai lung și favorizează o creștere a ordinii lanțului alifatic<sup>120</sup>. Filmele de OT mai aranjate ar putea duce la o mai bună ancorare a moleculelor ES în apropierea substratului SERS.

## Concluzii finale

Această lucrare și-a propus implementarea spectroscopiilor Raman și SERS în detecția specifică și cuantitativă a unor biomolecule de interes în aplicații de monitorizare a mediului. În urma studiilor efectuate, s-au concluzionat următoarele concluzii principale:

- ✓ Am raportat amprentele Raman și FT-IR atribuite speciilor de monozaharide găsite în diferite proporții ca alcătuind HePS purificate din culturi de *A. platensis*, identificate ca fiind ramnoza, D(+)-glucoza și D(+)-galactoza. În cazul analizelor convenționale, fiecare compus trebuie extras, purificat și cuantificat separat. Astfel, microscopia Raman oferă o reducere substanțială a timpului și muncii, păstrând informațiile privind raporturile relative ale compuşilor biochimici la nivelul celulelor individuale. ***Scopul final al acestui studiu a fost atins prin identificarea bioresurselor exploatabile care ar putea fi valorificate în continuare ca element de bază de calitate industrială.***
- ✓ ***Analizele SERS ale apelor minerale naturale*** au dezvăluit capacitatea tehnicii de a evalua atât componentele organice, cât și cele anorganice, fiind astfel potrivită pentru implementarea unui management durabil a apelor de izvor carbogazoase. Apele minerale au indus agregarea AgNPs și au furnizat o amprentă SERS caracteristică beta-carotenului.
- ✓ ***Semnalul SERS al celulelor individuale și ale diatomeelor (C. closterium)*** cu AgNPs adsorbite a permis evidențierea semnalelor polimerice extracelulare. Benzile tipice au fost atribuite grăsimilor polinesaturate, împreună cu o contribuție SERS specifică de carotenoizi și clorofile. Cele trei tipuri de AgNPs utilizate au prezentat interacțiune distinctă cu celulele diatomeelor. Echipamentul Raman compact și portabil a oferit o bună reproductibilitate pentru evaluarea conținutului de carotenoizi în diatomee, în culturi în lot prin împrăștiere Raman normală.
- ✓ ***Cuantificarea rapidă și rentabilă a fucoxantinei*** în soluții este bine susținută fie în spectroscopia Raman Rezonantă, fie în SERRS, în funcție de intervalul de concentrație de fucoxantină de detectat.
- ✓ ***Creșterea rapidă a concentrației sau acumularea anumitor specii de alge microscopice generează modificări fizico-chimice și biologice drastice ale ecosistemelor acvatice reale,*** iar aceste modificări sunt de așteptat să fie măsurabile prin tehnica SERS. Prin urmare, contribuția speciilor individuale la semnalul SERS global este esențială.
- ✓ În această secțiune, au fost dezvoltate ***substrate 3D SERS - active prin depunerea de filme de Ag pe substrate de plastic nanopaternate, fabricate prin NIL.*** A fost determinată

contribuția atât a filmului de Ag, cât și a structurilor nanopaternate în AEF final obținut. Efectul nanoclusterelor de Ag induse prin depunere în DC, oferă doar o îmbunătățire de cel mult  $10^2$ . În cazul în care filmele de Ag sunt depuse pe substratul nanopaternat, efectul sinergic de ***amplificare este de 7 ordine de mărime***. Constatările noastre sugerează că filmul de argint de 25 nm care acoperă *nanotrenches*-urile imprintate prin NIL în plastic este cea mai promițătoare dintre cele 4 grosimi diferite ale filmului de Ag care au fost testate. AEF final obținut în acest caz a fost de  $1.7 \times 10^7$ , cu o contribuție a filmului de argint de numai un ordin de mărime.

- ✓ A doua parte a capitolului se concentrează pe ***detectarea și caracterizarea cianotoxinei NOD prin utilizarea microspectroscopia Raman și a SERS***. Prin DCDR NOD a fost detectat cu un LOD de  $10^{-4}$  M. Analiza SERS a fost efectuată pentru detectarea NOD chiar și la un nivel de  $10^{-12}$  M cu ajutorul de AgNPs.
- ✓ ***Substratele SERS fabricate prin CSA a AgNPs pe substrate plane solide au fost evaluate privind activitatea lor SERS*** pentru molecula pATP, utilizând mai multe linii laser de excitație (532 nm, 633 nm, 785 nm). Filmele prezintă cei mai buni factori de amplificare SERS pentru 785 nm, atingând valori mai mari de  $10^5$ . S-a demonstrat apoi utilitatea acestor filme AgNP pentru detecția SERS a două tipuri de pesticide, ***fungicidul tiabendazol și insecticidul  $\alpha$ -endosulfan***. Aceste rezultate constituie un pas spre dezvoltarea senzorilor pe bază de SERS pentru detectarea, identificarea și monitorizarea pesticidelor.

## Bibliografie

- (1) Lee, P. C.; Meisel, D. Adsorption and Surface-Enhanced Raman of Dyes on Silver and Gold Sols. *J. Phys. Chem.* **1982**, *86* (17), 3391–3395. <https://doi.org/10.1021/j100214a025>.
- (2) Leopold, N.; Lendl, B. A New Method for Fast Preparation of Highly Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) Active Silver Colloids at Room Temperature by Reduction of Silver Nitrate with Hydroxylamine Hydrochloride. *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107* (24), 5723–5727. <https://doi.org/10.1021/jp027460u>.
- (3) Lai, K.; Zhang, Y.; Du, R.; Zhai, F.; Rasco, B. A.; Huang, Y. Determination of Chloramphenicol and Crystal Violet with Surface Enhanced Raman Spectroscopy. *Sens. & Instrumen. Food Qual.* **2011**, *5* (1), 19–24. <https://doi.org/10.1007/s11694-011-9106-8>.
- (4) Tahir, M. A.; Dina, N. E.; Cheng, H.; Valev, V. K.; Zhang, L. Surface-Enhanced Raman Spectroscopy for Bioanalysis and Diagnosis. *Nanoscale* **2021**, *13* (27), 11593–11634. <https://doi.org/10.1039/D1NR00708D>.
- (5) Ortiz, C.; Zhang, D.; Xie, Y.; Ribbe, A. E.; Ben-Amotz, D. Validation of the Drop Coating Deposition Raman Method for Protein Analysis. *Analytical Biochemistry* **2006**, *353* (2), 157–166. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2006.03.025>.
- (6) Al-Otaibi, J. S.; Albrycht, P.; Mary, Y. S.; Mary, Y. S.; Książopolska-Gocalska, M. Concentration-Dependent SERS Profile of Olanzapine on Silver and Silver-Gold Metallic Substrates. *Chem. Pap.* **2021**, *75* (11), 6059–6072. <https://doi.org/10.1007/s11696-021-01783-9>.
- (7) Mosier-Boss, P. Review of SERS Substrates for Chemical Sensing. *Nanomaterials* **2017**, *7* (6), 142. <https://doi.org/10.3390/nano7060142>.
- (8) Mosier-Boss, P. Review on SERS of Bacteria. *Biosensors* **2017**, *7* (4), 51. <https://doi.org/10.3390/bios7040051>.
- (9) Freitas, F.; Alves, V. D.; Reis, M. A. M. Advances in Bacterial Exopolysaccharides: From Production to Biotechnological Applications. *Trends in Biotechnology* **2011**, *29* (8), 388–398. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.03.008>.
- (10) Nešić, A.; Cabrera-Barjas, G.; Dimitrijević-Branković, S.; Davidović, S.; Radovanović, N.; Delattre, C. Prospect of Polysaccharide-Based Materials as Advanced Food Packaging. *Molecules* **2019**, *25* (1), 135. <https://doi.org/10.3390/molecules25010135>.
- (11) Wang, J.; Hu, S.; Nie, S.; Yu, Q.; Xie, M. Reviews on Mechanisms of *In Vitro* Antioxidant Activity of Polysaccharides. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2016**, *2016*, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2016/5692852>.
- (12) Laurienzo, P. Marine Polysaccharides in Pharmaceutical Applications: An Overview. *Marine Drugs* **2010**, *8* (9), 2435–2465. <https://doi.org/10.3390/md8092435>.
- (13) Rahbar Saadat, Y.; Yari Khosroushahi, A.; Pourghassem Gargari, B. A Comprehensive Review of Anticancer, Immunomodulatory and Health Beneficial Effects of the Lactic Acid Bacteria Exopolysaccharides. *Carbohydrate Polymers* **2019**, *217*, 79–89. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.04.025>.
- (14) Xu, J.; Yue, R.-Q.; Liu, J.; Ho, H.-M.; Yi, T.; Chen, H.-B.; Han, Q.-B. Structural Diversity Requires Individual Optimization of Ethanol Concentration in Polysaccharide Precipitation. *International Journal of Biological Macromolecules* **2014**, *67*, 205–209. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.03.036>.
- (15) Dina, N. E.; Leş, A.; Baricz, A.; Szöke-Nagy, T.; Leopold, N.; Sârbu, C.; Banciu, H. L. Discrimination of Haloarchaeal Genera Using Raman Spectroscopy and Robust Methods for Multivariate Data Analysis: Discrimination of Haloarchaeal Genera. *J. Raman Spectrosc.* **2017**, *48* (8), 1122–1126. <https://doi.org/10.1002/jrs.5187>.

- (16) McEwen, G. D.; Wu, Y.; Zhou, A. Probing Nanostructures of Bacterial Extracellular Polymeric Substances versus Culture Time by Raman Microspectroscopy and Atomic Force Microscopy. *Biopolymers* **2010**, *93* (2), 171–177. <https://doi.org/10.1002/bip.21315>.
- (17) Noack, K.; Eskofier, B.; Kiefer, J.; Dilk, C.; Bilow, G.; Schirmer, M.; Buchholz, R.; Leipertz, A. Combined Shifted-Excitation Raman Difference Spectroscopy and Support Vector Regression for Monitoring the Algal Production of Complex Polysaccharides. *Analyst* **2013**, *138* (19), 5639. <https://doi.org/10.1039/c3an01158e>.
- (18) Brezeştean, I.; Bocăneală, M.; Gherman, A. M. R.; Porav, S. A.; Kacsó, I.; Rakosy-Tican, E.; Dina, N. E. Spectroscopic Investigation of Exopolysaccharides Purified from *Arthrospira Platensis* Cultures as Potential Bioresources. *Journal of Molecular Structure* **2021**, *1246*, 131228. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2021.131228>.
- (19) De Gelder, J.; De Gussem, K.; Vandenabeele, P.; Moens, L. Reference Database of Raman Spectra of Biological Molecules. *J. Raman Spectrosc.* **2007**, *38* (9), 1133–1147. <https://doi.org/10.1002/jrs.1734>.
- (20) Verrier, S.; Notingher, I.; Polak, J. M.; Hench, L. L. In Situ Monitoring of Cell Death Using Raman Microspectroscopy. *Biopolymers* **2004**, *74* (1–2), 157–162. <https://doi.org/10.1002/bip.20063>.
- (21) Wiercigroch, E.; Szafranec, E.; Czamara, K.; Pacia, M. Z.; Majzner, K.; Kochan, K.; Kaczor, A.; Baranska, M.; Malek, K. Raman and Infrared Spectroscopy of Carbohydrates: A Review. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2017**, *185*, 317–335. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2017.05.045>.
- (22) Sathiyarayanan, G.; Yi, D.-H.; Bhatia, S. K.; Kim, J.-H.; Seo, H. M.; Kim, Y.-G.; Park, S.-H.; Jeong, D.; Jung, S.; Jung, J.-Y.; Lee, Y. K.; Yang, Y.-H. Exopolysaccharide from Psychrotrophic Arctic Glacier Soil Bacterium *Flavobacterium* Sp. ASB 3-3 and Its Potential Applications. *RSC Adv.* **2015**, *5* (103), 84492–84502. <https://doi.org/10.1039/C5RA14978A>.
- (23) Peng, X.-B.; Li, Q.; Ou, L.-N.; Jiang, L.-F.; Zeng, K. GC–MS, FT-IR Analysis of Black Fungus Polysaccharides and Its Inhibition against Skin Aging in Mice. *International Journal of Biological Macromolecules* **2010**, *47* (2), 304–307. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2010.03.018>.
- (24) Xu, H.; Yu, G.; Jiang, H. Investigation on Extracellular Polymeric Substances from Mucilaginous Cyanobacterial Blooms in Eutrophic Freshwater Lakes. *Chemosphere* **2013**, *93* (1), 75–81. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.04.077>.
- (25) Li, W.; Ji, J.; Chen, X.; Jiang, M.; Rui, X.; Dong, M. Structural Elucidation and Antioxidant Activities of Exopolysaccharides from *Lactobacillus Helveticus* MB2-1. *Carbohydrate Polymers* **2014**, *102*, 351–359. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.11.053>.
- (26) Stuart, R. K.; Mayali, X.; Lee, J. Z.; Craig Everroad, R.; Hwang, M.; Bebout, B. M.; Weber, P. K.; Pett-Ridge, J.; Thelen, M. P. Cyanobacterial Reuse of Extracellular Organic Carbon in Microbial Mats. *ISME J* **2016**, *10* (5), 1240–1251. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.180>.
- (27) Sevelsted, T. F.; Herfort, D.; Skibsted, J. <sup>13</sup>C Chemical Shift Anisotropies for Carbonate Ions in Cement Minerals and the Use of <sup>13</sup>C, <sup>27</sup>Al and <sup>29</sup>Si MAS NMR in Studies of Portland Cement Including Limestone Additions. *Cement and Concrete Research* **2013**, *52*, 100–111. <https://doi.org/10.1016/j.cemconres.2013.05.010>.
- (28) Cintă Pinzaru, S.; Müller, Cs.; Tomšić, S.; Venter, M. M.; Cozar, B. I.; Glamuzina, B. New SERS Feature of  $\beta$ -Carotene: Consequences for Quantitative SERS Analysis: New SERS Feature of  $\beta$ -Carotene. *J. Raman Spectrosc.* **2015**, *46* (7), 597–604. <https://doi.org/10.1002/jrs.4713>.
- (29) Rivas, L.; Sanchez-Cortes, S.; García-Ramos, J. V.; Morcillo, G. Mixed Silver/Gold Colloids: A Study of Their Formation, Morphology, and Surface-Enhanced Raman Activity. *Langmuir* **2000**, *16* (25), 9722–9728. <https://doi.org/10.1021/la000557s>.

- (30) Die Forschung Belegt: Heilwasser Wirkt.
- (31) T. Hrstka, J. Dubessy, J. Zacharias,. European Current Research on Fluid Inclusions ECROFI-XXI Abstracts, Montanuniversitaet Leoben, Berichte Der Geologischen Bundesanstalt; Leoben, Austria, 2011.
- (32) Somekawa, T.; Fujita, M. Raman Spectroscopic Measurements of  $\text{CO}_2$  Dissolved in Seawater for Laser Remote Sensing in Water. *EPJ Web of Conferences* **2016**, *119*, 25017. <https://doi.org/10.1051/epjconf/201611925017>.
- (33) S. Cinta Pinzaru, M. Ardeleanu, M. M. Venter, Book of Abstract of The 16th. “Prospects for the 3rd Millennium Agriculture”,; Cluj Napoca, 2017.
- (34) Die Mineralquellen Im Unterengadin.
- (35) Halstensen, M.; Jilvero, H.; Jinadasa, W. N.; Jens, K.-J. Equilibrium Measurements of the  $\text{NH}_3$ - $\text{CO}_2$ - $\text{H}_2\text{O}$  System: Speciation Based on Raman Spectroscopy and Multivariate Modeling. *Journal of Chemistry* **2017**, *2017*, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2017/7590506>.
- (36) Reimann, B. E. F.; Lewin, J. C.; Volcani, B. E. STUDIES ON THE BIOCHEMISTRY AND FINE STRUCTURE OF SILICA SHELL FORMATION IN DIATOMS. *Journal of Cell Biology* **1965**, *24* (1), 39–55. <https://doi.org/10.1083/jcb.24.1.39>.
- (37) Demirel, Z.; Imamoglu, E.; Conk Dalay, M. Fatty Acid Profile and Lipid Content of *Cylindrotheca Closterium* Cultivated in Air-Lift Photobioreactor: Fatty Acid Profile and Lipid Content. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2015**, *90* (12), 2290–2296. <https://doi.org/10.1002/jctb.4687>.
- (38) Liang, Y.; Mai, K.; Sun, S. Differences in Growth, Total Lipid Content and Fatty Acid Composition among 60 Clones of *Cylindrotheca Fusiformis*. *J Appl Phycol* **2005**, *17* (1), 61–65. <https://doi.org/10.1007/s10811-005-5525-4>.
- (39) Hildebrand, M.; Doktycz, M. J.; Allison, D. P. Application of AFM in Understanding Biomineral Formation in Diatoms. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* **2008**, *456* (1), 127–137. <https://doi.org/10.1007/s00424-007-0388-y>.
- (40) Pletikapić, G.; Žutić, V.; Vinković Vrček, I.; Svetličić, V. Atomic Force Microscopy Characterization of Silver Nanoparticles Interactions with Marine Diatom Cells and Extracellular Polymeric Substance: AFM CHARACTERIZATION OF Ag NPs INTERACTIONS WITH MARINE DIATOMS. *J. Mol. Recognit.* **2012**, *25* (5), 309–317. <https://doi.org/10.1002/jmr.2177>.
- (41) Svetličić, V.; Žutić, V.; Pletikapić, G.; Radić, T. Marine Polysaccharide Networks and Diatoms at the Nanometric Scale. *IJMS* **2013**, *14* (10), 20064–20078. <https://doi.org/10.3390/ijms141020064>.
- (42) Tomar, V. Raman Spectroscopy of Algae: A Review. *J Nanomed Nanotechnol* **2012**, *03* (02). <https://doi.org/10.4172/2157-7439.1000131>.
- (43) Huang, Y. Y.; Beal, C. M.; Cai, W. W.; Ruoff, R. S.; Terentjev, E. M. Micro-Raman Spectroscopy of Algae: Composition Analysis and Fluorescence Background Behavior. *Biotechnol. Bioeng.* **2009**, n/a-n/a. <https://doi.org/10.1002/bit.22617>.
- (44) Jehlička, J.; Edwards, H. G. M.; Oren, A. Raman Spectroscopy of Microbial Pigments. *Appl. Environ. Microbiol.* **2014**, *80* (11), 3286–3295. <https://doi.org/10.1128/AEM.00699-14>.
- (45) Pořízka, P.; Prochazková, P.; Prochazka, D.; Sládková, L.; Novotný, J.; Petrilak, M.; Brada, M.; Samek, O.; Pilát, Z.; Zemánek, P.; Adam, V.; Kizek, R.; Novotný, K.; Kaiser, J. Algal Biomass Analysis by Laser-Based Analytical Techniques—A Review. *Sensors* **2014**, *14* (9), 17725–17752. <https://doi.org/10.3390/s140917725>.

- (46) Premvardhan, L.; Bordes, L.; Beer, A.; Büchel, C.; Robert, B. Carotenoid Structures and Environments in Trimeric and Oligomeric Fucoxanthin Chlorophyll *a/c*<sub>2</sub> Proteins from Resonance Raman Spectroscopy. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113* (37), 12565–12574. <https://doi.org/10.1021/jp903029g>.
- (47) Stauber, J. L.; Jeffrey, S. W. PHOTOSYNTHETIC PIGMENTS IN FIFTY-ONE SPECIES OF MARINE DIATOMS. *J. Phycol* **1988**, *24* (2), 158–172. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.1988.tb04230.x>.
- (48) Kuczynska, P.; Jemiola-Rzeminska, M.; Strzalka, K. Photosynthetic Pigments in Diatoms. *Marine Drugs* **2015**, *13* (9), 5847–5881. <https://doi.org/10.3390/md13095847>.
- (49) Grosser, K.; Zedler, L.; Schmitt, M.; Dietzek, B.; Popp, J.; Pohnert, G. Disruption-Free Imaging by Raman Spectroscopy Reveals a Chemical Sphere with Antifouling Metabolites around Macroalgae. *Biofouling* **2012**, *28* (7), 687–696. <https://doi.org/10.1080/08927014.2012.700306>.
- (50) Pinzaru, S. C.; Müller, C.; Tomšić, S.; Venter, M. M.; Brezestean, I.; Ljubimir, S.; Glamuzina, B. Live Diatoms Facing Ag Nanoparticles: Surface Enhanced Raman Scattering of Bulk *Cylindrotheca closterium* Pennate Diatoms and of the Single Cells. *RSC Adv.* **2016**, *6* (49), 42899–42910. <https://doi.org/10.1039/C6RA04255D>.
- (51) Sumper, M.; Kröger, N. Silica Formation in Diatoms: The Function of Long-Chain Polyamines and Silaffins. *J. Mater. Chem.* **2004**, *14* (14), 2059–2065. <https://doi.org/10.1039/B401028K>.
- (52) Pinzaru, S. C.; Pavel, I. E. SERS and Pharmaceuticals. In *Surface Enhanced Raman Spectroscopy*; Schlücker, S., Ed.; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, Germany, 2010; pp 129–154. <https://doi.org/10.1002/9783527632756.ch6>.
- (53) Pinzaru, S. C.; Müller, S.; Tomšić, I.; Ujević, A.; Bratoš, C.; Četinić, B. I.; Cozar, R.; Stiufo, M. M.; Venter and; B. Glamuzina. Noble Metal Nanoparticles in Seawater: Nano Risk Towards Aquatic Organisms Assessed by SERS. In *Proc. ICAVS 8*, ed. B. Lendl, C. Koch, M. Kra, J. Ofner and G. Ramer, Vienna; Viena 2015; pp 106–107.
- (54) Najdek, M.; Blažina, M.; Djakovac, T.; Kraus, R. The Role of the Diatom *Cylindrotheca closterium* in a Mucilage Event in the Northern Adriatic Sea: Coupling with High Salinity Water Intrusions. *Journal of Plankton Research* **2005**, *27* (9), 851–862. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbi057>.
- (55) Suman, K.; Kiran, T.; Devi, U. K.; Sarma, N. S. Culture Medium Optimization and Lipid Profiling of *Cylindrotheca*, a Lipid- and Polyunsaturated Fatty Acid-Rich Pennate Diatom and Potential Source of Eicosapentaenoic Acid. *Botanica Marina* **2012**, *55* (3). <https://doi.org/10.1515/bot-2011-0076>.
- (56) Müller, C.; Glamuzina, B.; Pozniak, I.; Weber, K.; Cialla, D.; Popp, J.; Cîntă Pinzaru, S. Amnesic Shellfish Poisoning Biotxin Detection in Seawater Using Pure or Amino-Functionalized Ag Nanoparticles and SERS. *Talanta* **2014**, *130*, 108–115. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.06.059>.
- (57) Schie, I. W.; Nolte, L.; Pedersen, T. L.; Smith, Z.; Wu, J.; Yahiatène, I.; Newman, J. W.; Huser, T. Direct Comparison of Fatty Acid Ratios in Single Cellular Lipid Droplets as Determined by Comparative Raman Spectroscopy and Gas Chromatography. *Analyst* **2013**, *138* (21), 6662. <https://doi.org/10.1039/c3an00970j>.
- (58) Meksiarun, P.; Spegazzini, N.; Matsui, H.; Nakajima, K.; Matsuda, Y.; Sato, H. In Vivo Study of Lipid Accumulation in the Microalgae Marine Diatom *Thalassiosira pseudonana* Using Raman Spectroscopy. *Appl Spectrosc* **2015**, *69* (1), 45–51. <https://doi.org/10.1366/14-07598>.
- (59) Samek, O.; Zemánek, P.; Jonáš, A.; Telle, H. H. Characterization of Oil-Producing Microalgae Using Raman Spectroscopy. *Laser Phys. Lett.* **2011**, *8* (10), 701–709. <https://doi.org/10.1002/lapl.201110060>.

- (60) Pennington, F.; Guillard, R. R. L.; Liaaen-Jensen, S. Carotenoid Distribution Patterns in Bacillariophyceae (Diatoms). *Biochemical Systematics and Ecology* **1988**, *16* (7–8), 589–592. [https://doi.org/10.1016/0305-1978\(88\)90067-1](https://doi.org/10.1016/0305-1978(88)90067-1).
- (61) Kuczynska, P.; Jemiola-Rzeminska, M. Isolation and Purification of All-Trans Diadinoxanthin and All-Trans Diatoxanthin from Diatom *Phaeodactylum Tricornutum*. *J Appl Phycol* **2017**, *29* (1), 79–87. <https://doi.org/10.1007/s10811-016-0961-x>.
- (62) Ahel, M., i Terzić, S. Pigment Signatures of Phytoplankton Dynamics in the Northern Adriatic'. *Chemica Acta*, *71*(2), str. 199-215. *Preuzeto s* **1998**.
- (63) Vesna Flander-Putrlle. Examples of High Performance Liquid Chromatography (HPLC) Application in Marine Ecology Studies in the Northern Adriatic. *NATURA SLOVENIAE* **2009**, 5–23.
- (64) Leruste, A.; Hatey, E.; Bec, B.; De Wit, R. Selecting an HPLC Method for Chemotaxonomic Analysis of Phytoplankton Community in Mediterranean Coastal Lagoons, 2015. <https://doi.org/10.1285/I1825229XV9N1P20>.
- (65) Cates, N.; Einck, V. J.; Micklow, L.; Morère, J.; Okoroanyanwu, U.; Watkins, J. J.; Furst, S. Roll-to-Roll Nanoimprint Lithography Using a Seamless Cylindrical Mold Nanopatterned with a High-Speed Mastering Process. *Nanotechnology* **2021**, *32* (15), 155301. <https://doi.org/10.1088/1361-6528/abd9f1>.
- (66) Zhang, C.; Yi, P.; Peng, L.; Lai, X.; Chen, J.; Huang, M.; Ni, J. Continuous Fabrication of Nanostructure Arrays for Flexible Surface Enhanced Raman Scattering Substrate. *Sci Rep* **2017**, *7* (1), 39814. <https://doi.org/10.1038/srep39814>.
- (67) Liu, S.; Xu, Z.; Sun, T.; Zhao, W.; Wu, X.; Ma, Z.; Xu, H.; He, J.; Chen, C. Large-Scale Fabrication of Polymer/Ag Core–Shell Nanorod Array as Flexible SERS Substrate by Combining Direct Nanoimprint and Electroless Deposition. *Appl. Phys. A* **2014**, *115* (3), 979–984. <https://doi.org/10.1007/s00339-013-7917-7>.
- (68) Zhang, R.; Lai, Y.; Zhan, J. Enhancing the Activity of Silver Nanowire Membranes by Electrochemical Cyclic Voltammetry as Highly Sensitive Flexible SERS Substrate for On-Site Analysis. *Nanomaterials* **2021**, *11* (3), 672. <https://doi.org/10.3390/nano11030672>.
- (69) Lee, T.; Jung, S.; Kwon, S.; Kim, W.; Park, J.; Lim, H.; Lee, J. Formation of Interstitial Hot-Spots Using the Reduced Gap-Size between Plasmonic Microbeads Pattern for Surface-Enhanced Raman Scattering Analysis. *Sensors* **2019**, *19* (5), 1046. <https://doi.org/10.3390/s19051046>.
- (70) Zhang, M.; Jin, C.; Nie, Y.; Ren, Y.; Hao, N.; Xu, Z.; Dong, L.; Zhang, J. X. J. Silver Nanoparticle on Zinc Oxide Array for Label-Free Detection of Opioids through Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *RSC Adv.* **2021**, *11* (19), 11329–11337. <https://doi.org/10.1039/D1RA00760B>.
- (71) Kneipp, K.; Wang, Y.; Kneipp, H.; Perelman, L. T.; Itzkan, I.; Dasari, R. R.; Feld, M. S. Single Molecule Detection Using Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS). *Phys. Rev. Lett.* **1997**, *78* (9), 1667–1670. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.78.1667>.
- (72) Kleinman, S. L.; Ringe, E.; Valley, N.; Wustholz, K. L.; Phillips, E.; Scheidt, K. A.; Schatz, G. C.; Van Duyne, R. P. Single-Molecule Surface-Enhanced Raman Spectroscopy of Crystal Violet Isotopologues: Theory and Experiment. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133* (11), 4115–4122. <https://doi.org/10.1021/ja110964d>.
- (73) Liu, B.; Jiang, W.; Wang, H.; Yang, X.; Zhang, S.; Yuan, Y.; Wu, T.; Du, Y. A Surface Enhanced Raman Scattering (SERS) Microdroplet Detector for Trace Levels of Crystal Violet. *Microchim Acta* **2013**, *180* (11–12), 997–1004. <https://doi.org/10.1007/s00604-013-1026-3>.



- (74) Colniță, A.; Marconi, D.; Dina, N. E.; Brezeștean, I.; Bogdan, D.; Turcu, I. 3D Silver Metallized Nanotrenches Fabricated by Nanoimprint Lithography as Flexible SERS Detection Platform. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2022**, *276*, 121232. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2022.121232>.
- (75) Farcau, C.; Marconi, D.; Colniță, A.; Brezeștean, I.; Barbu-Tudoran, L. Gold Nanopost-Shell Arrays Fabricated by Nanoimprint Lithography as a Flexible Plasmonic Sensing Platform. *Nanomaterials* **2019**, *9* (11), 1519. <https://doi.org/10.3390/nano9111519>.
- (76) Pimentel, A.; Araújo, A.; Coelho, B.; Nunes, D.; Oliveira, M.; Mendes, M.; Águas, H.; Martins, R.; Fortunato, E. 3D ZnO/Ag Surface-Enhanced Raman Scattering on Disposable and Flexible Cardboard Platforms. *Materials* **2017**, *10* (12), 1351. <https://doi.org/10.3390/ma10121351>.
- (77) Ramohlola, K. E.; Iwuoha, E. I.; Hato, M. J.; Modibane, K. D. Instrumental Techniques for Characterization of Molybdenum Disulphide Nanostructures. *Journal of Analytical Methods in Chemistry* **2020**, *2020*, 1–29. <https://doi.org/10.1155/2020/8896698>.
- (78) Rasmussen, B.; Fletcher, I. R.; Brocks, J. J.; Kilburn, M. R. Reassessing the First Appearance of Eukaryotes and Cyanobacteria. *Nature* **2008**, *455* (7216), 1101–1104. <https://doi.org/10.1038/nature07381>.
- (79) Paerl, H. W.; Fulton, R. S.; Moisaner, P. H.; Dyble, J. Harmful Freshwater Algal Blooms, With an Emphasis on Cyanobacteria. *The Scientific World JOURNAL* **2001**, *1*, 76–113. <https://doi.org/10.1100/tsw.2001.16>.
- (80) Huisman, J.; Codd, G. A.; Paerl, H. W.; Ibelings, B. W.; Verspagen, J. M. H.; Visser, P. M. Cyanobacterial Blooms. *Nat Rev Microbiol* **2018**, *16* (8), 471–483. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0040-1>.
- (81) Merel, S.; Walker, D.; Chicana, R.; Snyder, S.; Baurès, E.; Thomas, O. State of Knowledge and Concerns on Cyanobacterial Blooms and Cyanotoxins. *Environment International* **2013**, *59*, 303–327. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2013.06.013>.
- (82) Cazenave, J.; Wunderlin, D. A.; Bistoni, M. de los Á.; Amé, M. V.; Krause, E.; Pflugmacher, S.; Wiegand, C. Uptake, Tissue Distribution and Accumulation of Microcystin-RR in *Corydoras Paleatus*, *Jenynsia Multidentata* and *Odontesthes Bonariensis*. *Aquatic Toxicology* **2005**, *75* (2), 178–190. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.08.002>.
- (83) Carmichael, W. W. Health Effects of Toxin-Producing Cyanobacteria: “The CyanoHABs.” *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal* **2001**, *7* (5), 1393–1407. <https://doi.org/10.1080/20018091095087>.
- (84) Romanis, C. S.; Pearson, L. A.; Neilan, B. A. Cyanobacterial Blooms in Wastewater Treatment Facilities: Significance and Emerging Monitoring Strategies. *Journal of Microbiological Methods* **2021**, *180*, 106123. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2020.106123>.
- (85) Munoz, M.; Cirés, S.; de Pedro, Z. M.; Colina, J. Á.; Velásquez-Figueroa, Y.; Carmona-Jiménez, J.; Caro-Borrero, A.; Salazar, A.; Santa María Fuster, M.-C.; Contreras, D.; Perona, E.; Quesada, A.; Casas, J. A. Overview of Toxic Cyanobacteria and Cyanotoxins in Ibero-American Freshwaters: Challenges for Risk Management and Opportunities for Removal by Advanced Technologies. *Science of The Total Environment* **2021**, *761*, 143197. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143197>.
- (86) Duy, T. N.; Lam, P. K. S.; Shaw, G. R.; Connell, D. W. Toxicology and Risk Assessment of Freshwater Cyanobacterial (Blue-Green Algal) Toxins in Water. In *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*; Ware, G. W., Ed.; Reviews of Environmental Contamination and Toxicology; Springer New York: New York, NY, 2000; Vol. 163, pp 113–185. [https://doi.org/10.1007/978-1-4757-6429-1\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-4757-6429-1_3).
- (87) Dietrich, D.; Hoeger, S. Guidance Values for Microcystins in Water and Cyanobacterial Supplement Products (Blue-Green Algal Supplements): A Reasonable or Misguided Approach?

- Toxicology and Applied Pharmacology* **2005**, *203* (3), 273–289. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2004.09.005>.
- (88) Lage, S.; Mazur-Marzec, H.; Gorokhova, E. Competitive Interactions as a Mechanism for Chemical Diversity Maintenance in Nodularia Spumigena. *Sci Rep* **2021**, *11* (1), 8970. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-88361-x>.
- (89) Gehringer, M. M.; Adler, L.; Roberts, A. A.; Moffitt, M. C.; Mihali, T. K.; Mills, T. J. T.; Fieker, C.; Neilan, B. A. Nodularin, a Cyanobacterial Toxin, Is Synthesized in Planta by Symbiotic Nostoc Sp. *ISME J* **2012**, *6* (10), 1834–1847. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.25>.
- (90) Moffitt, M. C.; Blackburn, S. I.; Neilan, B. A. rRNA Sequences Reflect the Ecophysiology and Define the Toxic Cyanobacteria of the Genus Nodularia. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **2001**, *51* (2), 505–512. <https://doi.org/10.1099/00207713-51-2-505>.
- (91) Beattie, K. A.; Kaya, K.; Codd, G. A. The Cyanobacterium Nodularia PCC 7804, of Freshwater Origin, Produces [L-Har2]Nodularin. *Phytochemistry* **2000**, *54* (1), 57–61. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)00045-5](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)00045-5).
- (92) Dittmann, E.; Wiegand, C. Cyanobacterial Toxins - Occurrence, Biosynthesis and Impact on Human Affairs. *Mol. Nutr. Food Res.* **2006**, *50* (1), 7–17. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200500162>.
- (93) Jokela, J.; Heinilä, L. M. P.; Shishido, T. K.; Wahlsten, M.; Fewer, D. P.; Fiore, M. F.; Wang, H.; Haapaniemi, E.; Permi, P.; Sivonen, K. Production of High Amounts of Hepatotoxin Nodularin and New Protease Inhibitors Pseudospumigins by the Brazilian Benthic Nostoc Sp. CENA543. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 1963. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01963>.
- (94) Meissner, S.; Fastner, J.; Dittmann, E. Microcystin Production Revisited: Conjugate Formation Makes a Major Contribution: Production of Cyanobacterial Toxins Strongly Underestimated. *Environ Microbiol* **2013**, *15* (6), 1810–1820. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12072>.
- (95) Massey, I. Y.; Wu, P.; Wei, J.; Luo, J.; Ding, P.; Wei, H.; Yang, F. A Mini-Review on Detection Methods of Microcystins. *Toxins* **2020**, *12* (10), 641. <https://doi.org/10.3390/toxins12100641>.
- (96) Forastier, M. E.; Zalocar, Y.; Andrinolo, D.; Domitrovic, H. A. Occurrence and Toxicity of Microcystis Aeruginosa (Cyanobacteria) in the Paraná River, Downstream of the Yacretá Dam (Argentina). *Rev Biol Trop* **2016**, *64* (1), 203–211.
- (97) Vasconcelos, V. M.; Sivonen, K.; Evans, W. R.; Carmichael, W. W.; Namikoshi, M. Hepatotoxic Microcystin Diversity in Cyanobacterial Blooms Collected in Portuguese Freshwaters. *Water Research* **1996**, *30* (10), 2377–2384. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(96\)00152-2](https://doi.org/10.1016/0043-1354(96)00152-2).
- (98) Li, M.; Paidi, S. K.; Sakowski, E.; Preheim, S.; Barman, I. Ultrasensitive Detection of Hepatotoxic Microcystin Production from Cyanobacteria Using Surface-Enhanced Raman Scattering Immunosensor. *ACS Sens.* **2019**, *4* (5), 1203–1210. <https://doi.org/10.1021/acssensors.8b01453>.
- (99) Li, M.; Lin, H.; Paidi, S. K.; Mesyngier, N.; Preheim, S.; Barman, I. A Fluorescence and Surface-Enhanced Raman Spectroscopic Dual-Modal Aptasensor for Sensitive Detection of Cyanotoxins. *ACS Sens.* **2020**, *5* (5), 1419–1426. <https://doi.org/10.1021/acssensors.0c00307>.
- (100) Halvorson, R. A.; Vikesland, P. J. Drop Coating Deposition Raman (DCDR) for Microcystin-LR Identification and Quantitation. *Environ. Sci. Technol.* **2011**, *45* (13), 5644–5651. <https://doi.org/10.1021/es200255y>.
- (101) Kočíšová, E.; Sayedová, S.; Procházka, M. Drop Coating Deposition Raman Scattering of Selected Small Molecules of Biological Importance. *J Raman Spectrosc* **2020**, *51* (5), 871–874. <https://doi.org/10.1002/jrs.5840>.

- (102) Kuižová, A.; Přikryl, M.; Procházka, M.; Kočišová, E. Drop Coating Deposition Raman (DCDR) Spectroscopy of Contaminants. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2021**, *262*, 120109. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2021.120109>.
- (103) Kočišová, E.; Procházka, M.; Vaculčíaková, L. Drop-Coating Deposition Raman (DCDR) Spectroscopy as a Tool for Membrane Interaction Studies: Liposome–Porphyrin Complex. *Appl Spectrosc* **2015**, *69* (8), 939–945. <https://doi.org/10.1366/14-07836>.
- (104) Tahir, M. A.; Zhang, X.; Cheng, H.; Xu, D.; Feng, Y.; Sui, G.; Fu, H.; Valev, V. K.; Zhang, L.; Chen, J. Klarite as a Label-Free SERS-Based Assay: A Promising Approach for Atmospheric Bioaerosol Detection. *Analyst* **2020**, *145* (1), 277–285. <https://doi.org/10.1039/C9AN01715A>.
- (105) *EU Policy for a Sustainable Use of Pesticide: The Story behind the Strategy*; Europäische Kommission, Ed.; Environment; Office for Official Publications of the European Commission: Luxembourg, 2007.
- (106) Chamuah, N.; Bhuyan, N.; Das, P. P.; Ojah, N.; Choudhary, A. J.; Medhi, T.; Nath, P. Gold-Coated Electrospun PVA Nanofibers as SERS Substrate for Detection of Pesticides. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2018**, *273*, 710–717. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.06.079>.
- (107) Zhou, H.; Li, X.; Wang, L.; Liang, Y.; Jialading, A.; Wang, Z.; Zhang, J. Application of SERS Quantitative Analysis Method in Food Safety Detection. *Reviews in Analytical Chemistry* **2021**, *40* (1), 173–186. <https://doi.org/10.1515/revac-2021-0132>.
- (108) Fu, G.; Sun, D.-W.; Pu, H.; Wei, Q. Fabrication of Gold Nanorods for SERS Detection of Thiabendazole in Apple. *Talanta* **2019**, *195*, 841–849. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.11.114>.
- (109) Müller, C.; David, L.; Chiş, V.; Pînzaru, S. C. Detection of Thiabendazole Applied on Citrus Fruits and Bananas Using Surface Enhanced Raman Scattering. *Food Chemistry* **2014**, *145*, 814–820. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.08.136>.
- (110) Oliveira, M. J. S.; Rubira, R. J. G.; Furini, L. N.; Batagin-Neto, A.; Constantino, C. J. L. Detection of Thiabendazole Fungicide/Parasiticide by SERS: Quantitative Analysis and Adsorption Mechanism. *Applied Surface Science* **2020**, *517*, 145786. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2020.145786>.
- (111) Maier-Bode, H. Properties, Effect, Residues and Analytics of the Insecticide Endosulfan. In *Residue Reviews / Rückstands-Berichte*; Gunther, F. A., Ed.; Reviews of Environmental Contamination and Toxicology; Springer US: New York, NY, 1968; Vol. 22, pp 1–44. [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-8434-6\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-8434-6_1).
- (112) Schmidt, W. F.; Hapeman, C. J.; McConnell, L. L.; Mookherji, S.; Rice, C. P.; Nguyen, J. K.; Qin, J.; Lee, H.; Chao, K.; Kim, M. S. Temperature-Dependent Raman Spectroscopic Evidence of and Molecular Mechanism for Irreversible Isomerization of  $\beta$ -Endosulfan to  $\alpha$ -Endosulfan. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62* (9), 2023–2030. <https://doi.org/10.1021/jf404404w>.
- (113) United Nations Targets Widely-Used Pesticide Endosulfan for Phase Out; United Nations Environment Programme: Geneva, 2011.
- (114) Weber, J.; Halsall, C. J.; Muir, D.; Teixeira, C.; Small, J.; Solomon, K.; Hermanson, M.; Hung, H.; Bidleman, T. Endosulfan, a Global Pesticide: A Review of Its Fate in the Environment and Occurrence in the Arctic. *Science of The Total Environment* **2010**, *408* (15), 2966–2984. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.10.077>.
- (115) Becker, L.; Scheringer, M.; Schenker, U.; Hungerbühler, K. Assessment of the Environmental Persistence and Long-Range Transport of Endosulfan. *Environmental Pollution* **2011**, *159* (6), 1737–1743. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.02.012>.
- (116) Guerrini, L.; Aliaga, A. E.; Cárcamo, J.; Gómez-Jeria, J. S.; Sanchez-Cortes, S.; Campos-Valette, M. M.; García-Ramos, J. V. Functionalization of Ag Nanoparticles with the Bis-

- Acridinium Lucigenin as a Chemical Assembler in the Detection of Persistent Organic Pollutants by Surface-Enhanced Raman Scattering. *Analytica Chimica Acta* **2008**, *624* (2), 286–293. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.06.038>.
- (117) Lee, P. C.; Meisel, D. Adsorption and Surface-Enhanced Raman of Dyes on Silver and Gold Sols. *J. Phys. Chem.* **1982**, *86* (17), 3391–3395. <https://doi.org/10.1021/j100214a025>.
- (118) Kim, Min Kyung; Lee, Chul-Jae; Jung, Young Mee; Lee, Mu-Sang. Surface-Enhanced Raman Spectroscopy of Benzimidazolic Fungicides: Benzimidazole and Thiabendazole. *Bulletin of the Korean Chemical Society* **2009**, *30* (12), 2930–2934. <https://doi.org/10.5012/BKCS.2009.30.12.2930>.
- (119) Moldovan, R.; Iacob, B.-C.; Farcău, C.; Bodoki, E.; Oprean, R. Strategies for SERS Detection of Organochlorine Pesticides. *Nanomaterials* **2021**, *11* (2), 304. <https://doi.org/10.3390/nano11020304>.
- (120) Kubackova, J.; Izquierdo-Lorenzo, I.; Jancura, D.; Miskovsky, P.; Sanchez-Cortes, S. Adsorption of Linear Aliphatic  $\alpha,\omega$ -Dithiols on Plasmonic Metal Nanoparticles: A Structural Study Based on Surface-Enhanced Raman Spectra. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2014**, *16* (23), 11461–11470. <https://doi.org/10.1039/C4CP00424H>.
- (121) Jiang, X.; Lai, Y.; Wang, W.; Jiang, W.; Zhan, J. Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Detection of Polybrominated Diphenylethers Using a Portable Raman Spectrometer. *Talanta* **2013**, *116*, 14–17. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.04.056>.
- (122) Kennedy, B. J.; Spaeth, S.; Dickey, M.; Carron, K. T. Determination of the Distance Dependence and Experimental Effects for Modified SERS Substrates Based on Self-Assembled Monolayers Formed Using Alkanethiols. *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103* (18), 3640–3646. <https://doi.org/10.1021/jp984454i>.
- (123) Joo, T. H.; Kim, K.; Kim, M. S. Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) of 1-Propanethiol in Silver Sol. *J. Phys. Chem.* **1986**, *90* (22), 5816–5819. <https://doi.org/10.1021/j100280a069>.
- (124) John Wiley & Sons, Inc. SpectraBase; SpectraBase Compound ID=JyVYUwLwX SpectraBase Spectrum ID=DZu8UBUhp0.
- (125) Bain, C. D.; Troughton, E. B.; Tao, Y. T.; Evall, J.; Whitesides, G. M.; Nuzzo, R. G. Formation of Monolayer Films by the Spontaneous Assembly of Organic Thiols from Solution onto Gold. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111* (1), 321–335. <https://doi.org/10.1021/ja00183a049>.
- (126) Schmidt, W. F.; Hapeman, C. J.; Fettinger, J. C.; Rice, C. P.; Bilbouljian, S. Structure and Asymmetry in the Isomeric Conversion of  $\beta$ - to  $\alpha$ -Endosulfan. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45* (4), 1023–1026. <https://doi.org/10.1021/jf970020t>.
- (127) Hassanain, W. A.; Izake, E. L.; Schmidt, M. S.; Ayoko, G. A. Gold Nanomaterials for the Selective Capturing and SERS Diagnosis of Toxins in Aqueous and Biological Fluids. *Biosensors and Bioelectronics* **2017**, *91*, 664–672. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.01.032>.

## Anexa 1. Diseminarea rezultatelor

---

### Articole publicate pe tema tezei

---

1. **Ioana Brezestean**, Maricel Bocăneală, Ana Maria Raluca Gherman, Sebastian Alin Porav, Irina Kacsó, Elena Rakosy-Tican, Nicoleta Elena Dina, *Spectroscopic investigation of exopolysaccharides purified from *Arthrospira plantensis* cultures as potential bioresources*,

Journal of Molecular Structure, Volume 1246, 2021, ISSN 0022-2860, <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2021.131228>. IF: 3.196 AIS: 0.293

2. Simona Cîntă Pînzaru, Mircea Ardeleanu, **Ioana Brezeștean**, Fran Nekvapil, Monica M. Vențer, *Biogeochemical specificity of natural carbonated spring waters from Swiss Alps revealed by surface enhanced Raman scattering and Raman spectroscopy tools*, Analytical Methods, Issue 6, 2019, <https://doi.org/10.1039/C8AY02580K>. IF: 2.73 AIS: 0.415

3. Simona Cîntă Pînzaru, Csilla Muller, Sanja Tomsic, Monica M. Vențer, **Ioana Brezeștean**, Stijepo Ljubimird, Branko Glamuzina *Live diatoms facing Ag nanoparticles: surface enhanced Raman scattering of bulk cylindrotheca closterium pennate diatoms and of the single cells*, RSC Advances, 2016, 6, 42899, [doi.org/10.1039/C6RA04255D](https://doi.org/10.1039/C6RA04255D) IF: 3.108 AIS: 0.589

4. Fran Nekvapil, **Ioana Brezeștean**, Geza Lazăr, Călin Fîrța, Simona Cîntă Pînzaru, *Resonance Raman and SERRS of fucoxanthin: Prospects for carotenoid quantification in live diatom cells*, Journal of Molecular Structure, Volume 1250, Part 1, 2022, 131608, <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2021.131608> IF: 3.196 AIS: 0.293

5. Alia Colniță, Daniel Marconi, Nicoleta Elena Dina, **Ioana Brezeștean**, Diana Bogdan, Ioan Turcu *3D silver metallized nanotrenches fabricated by nanoimprint lithography as flexible SERS detection platform*, Spectrochimica Acta Part A IF: 4.098 AIS: 0.462

---

*Articole trimise înspre publicare pe tema tezei*

---

1. **Ioana Brezeștean**, Ana Maria Raluca Gherman, Alia Colniță, Nicoleta Elena Dina, Vasile Chiș, Leontin David, Simona Cîntă-Pînzaru *Detection and characterization of nodularin by using label-free surface-enhanced spectroscopic techniques*, Spectrochimica Acta Part A IF: 4.098 AIS: 0.462- Trimis spre publicare

2. **Ioana Brezeștean**, Nicoleta Toșa, Alexandra Fălămaș, Denisa Cuibus, Cristina M. Muntean, Bogdan Cozar, Camelia Groșan, Attila Bende, Cosmin Farcău, *Silver nanoparticle films obtained by convective self-assembly as a platform for surface-enhanced Raman spectroscopy analyses of pesticides*, Frontiers in Chemistry IF: 5.221 AIS: 1.009- Under review

---

*Alte articole publicate în jurnale ISI*

---

1. Fran Nekvapil, **Ioana Brezeștean**, Simona Cîntă Pînzaru, Vasile Chiș, Daniel Barchewitz, Branko Glamuzina; *Citrus fruits freshness assessment using Raman spectroscopy*; Food Chemistry; DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.09.105 IF: AIF
2. Simona Cîntă Pînzaru, Fran Nekvapil, **Ioana Brezeștean**, C. Muller, V. Chiș; *Microsphere packages of carotenoids: intact sea urchin eggs tracked by Raman spectroscopy tools*; DOI:10.1039/C9PP00181

3. **Ioana Brezeștean**, Simona Cîntă Pînzaru, Alina Tantau, Nicole Har, Monica Vențer; *Analytical study of gallstones in patients from Transylvania, Romania* January 2015 Studia Universitatis Babeș-Bolyai Chemia 1(LX 1):29-43.
4. Cosmin Farcau, Daniel Marconi, Alia Colniță , **Ioana Brezeștean**, Lucian Barbu-Tudoran, *Gold Nanopost-Shell Arrays Fabricated by Nanoimprint Lithography as a Flexible Plasmonic Sensing Platform* *Nanomaterials*, (Basel). 2019 Oct 25;9(11):1519. doi: 10.3390/nano9111519
5. Alia Colniță, Daniel Marconi, **Ioana Brezeștean**, Roxana-Diana Pașca, Irina Kacso, Lucian Barbu-Tudoran, Ioan Turcu, *High-Throughput Fabrication of Anti-Counterfeiting Nanopillar-Based Quick Response (QR) Codes Using Nanoimprint Lithography*, *Analytical Letters* 54.1-2 (2021): 302-313, doi.org/10.1080/00032719.2020.1769123
6. Elisabeta Stamate, Octavian Dumitru Pavel, Rodica Zavoianu, **Ioana Brezeștean**, Alexandra Ciorîță, Ruxandra Bîrjega, Katja Neubauer, Angela Köckritz, Ioan-Cezar Marcu, *Ce-Containing MgAl-Layered Double Hydroxide-Graphene Oxide Hybrid Materials as Multifunctional Catalysts for Organic Transformations*, *Materials* **2021**, 14(23), 7457; <https://doi.org/10.3390/ma14237457>
7. Alexandra-Elisabeta Stamate, Rodica Zăvoianu, Octavian Dumitru Pavel, Ruxandra Bîrjega, Andreea Matei, Marius Dumitru, **Ioana Brezeștean**, Mariana Osiac, Ioan-Cezar Marcu, *The influence of the preparation method on the physico-chemical properties and catalytic activities of Ce-modified LDH structures used as catalysts in condensation reactions*, *Molecules* **2021**, 26(20), 6191; <https://doi.org/10.3390/molecules26206191>
8. Adrian Calborean, Alia Colniță, Ioana Grosu, **Ioana Brezeștean**, Roxana-Diana Pașca, Lucian Barbu-Tudoran, Daniel Marconi, *The adhesion of L-methionine amino acid through Dip Pen Nanolithography on silver thin films grown by Molecular Beam Epitaxy technique*, *Journal of Molecular Structure*, Volume 1244, 2021, <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2021.131247>
9. Vlad-Alexandru Toma, Alia Colnita, **Ioana Brezeștean**, Bogdan Dume, Ioana Roman, Ioan Turcu, *STUDIA UBB CHEMIA*, LXVI, 3, 2021 (p. 187-194) DOI:10.24193/subbchem.2021.3.11
10. Laurențiu Stăncioiu, Ana Maria Raluca Gherman, **Ioana Brezeștean**, Nicoleta Elena Dina, *Vibrational spectral analysis of Sorafenib and its molecular docking study compared to other TKIs*, *Journal of Molecular Structure*, Volume 1248, 2022, ISSN 0022-2860, <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2021.131507>. IF: 3.196 AIS: 0.29

1. Niculaescu Carmen, **Ioana Brezeștean**, Lung Claudiu, Todica Mihai, *Fluorescence investigation of some polystyrene samples thermally degraded*, Studia Universitatis Babeș-Bolyai, Physica . Dec2018, Vol. 63 Issue 1/2, p19-26. 8p.
2. Simona Cîntă Pînzaru; Csilla Muller, **Ioana Brezeștean**, Daniel Barchewits, Branko Glamuzina *Cyanobacteria Detection and Raman Spectroscopy Characterization with a Highly Sensitive, High Resolution Fiber Optic Portable Raman System* STUDIA UBB PHYSICA, Vol. 61 (LXI), 1, 2016;
3. **Brezeștean**, S. Cîntă Pînzaru, Fran Nekvapil, Analysis of hypersaline water from Cojocna Balneary Resorts (Romania) using Raman Spectroscopy Techniques; ; ISSN 2067-743X, pp 3-13;