

Universitatea Babeş-Bolyai

Facultatea de Fizică

Şcoala Doctorală de Fizică

**Contribuții la sinteza și aplicațiile biomedicale ale
unor noi nanoclusteri și nanoparticule de metal nobile**

Hada Alexandru-Milentie

Profesor coordonator

Prof.dr. Aștilean Simion

Cluj-Napoca

2023

Cuprins

Motivație și obiective.....	6
Capitolul 1. Prezentare generală asupra nanoclusterilor și nanoparticulelor de metal nobil	9
1.1. Introducere în nanotehnologie	9
1.2. Nanoclusteri de metal nobil	9
1.2.1. Metode de sinteză	9
1.2.2. Proprietățile nanoclusterilor	10
1.2.3. Aplicațiile nanoclusterilor.....	10
1.3. Nanoparticule de metal nobil.....	11
1.3.1. Metode de sinteză	11
1.3.2. Proprietățile nanoparticulelor.....	11
1.3.3. Aplicațiile nanoparticulelor	12
Partea I. Contribuții la sinteza de noi nanoclusteri de aur și aplicațiile lor în imagistică și detecție.....	13
Capitolul 2. Nanoclusteri de aur stabilizați de albumină serică bovină pentru aplicații de imagistică de fluorescență	14
2.1. Introducere	14
2.2. Sinteza de BSA-AuNCs.....	14
2.3. Caracterizarea BSA-AuNCs	15
2.4. Funcționalizarea cu acid folic a BSA-AuNCs.....	16
2.5. Biocompatibilitatea BSA-AuNCs.....	16
2.6. Performanța BSA-AuNCs ca agenți de contrast fluorescenți.....	17
2.6.1. în celule.....	17
2.6.2. în materiale care imită proprietățile țesutului	17
2.7. Concluzii	19
Capitolul 3. Nanoclusteri de aur stabilizați de glutatone ca emițători de lumină în infraroșu apropiat pentru aplicații de imagistică de fluorescență confocală	20

3.1. Introducere	20
3.2. Sinteza de GSH-AuNCs.....	20
3.3. Caracterizarea GSH-AuNCs	21
3.4. Performanța GSH-AuNCs ca agenți de contrast în interiorul materialelor imitatoare de țesut	22
3.5. Concluzii	23
Capitolul 4. Platforme portabile pe bază de hârtie impregnate cu nanoclusteri de aur pentru detecția eficientă a ionilor de metale grele.....	24
4.1. Introducere	24
4.2. Nanoclusteri de aur stabilizați de BSA pentru detecția selectivă și cuantificarea ionilor de cupru	24
4.2.1. Sinteza de BSA-AuNCs.....	24
4.2.2. Caracterizarea BSA-AuNCs	25
4.2.3. Performanța BSA-AuNCs ca senzor coloidal	25
4.2.4. Detecția de ioni de cupru folosind platforma pe bază de hârtie impregnată cu BSA- AuNCs	26
4.2.5. Concluzii.....	27
4.3. Nanoclusteri de aur stabilizați de histidină (His-AuNCs) pentru detecția selectivă și cuantificarea ionilor de fier	28
4.3.1. Sinteza de His-AuNCs.....	28
4.3.2. Caracterizarea His-AuNCs	28
4.3.3. Performanța His-AuNCs ca senzor coloidal.....	28
4.3.4. Detecția de ioni de fier folosind platforma pe bază de hârtie impregnată cu His- AuNCs	29
4.3.5. Concluzii.....	31
Partea a II-a. Contribuții la sinteza de noi nanoparticule de metal nobil pentru aplicații ca agenți de contrast SERS, nanoantibiotice și platforme de detecție	32
Capitolul 5. Nanoparticule bimetalice de tip miez@coajă aur@argint stabilizate de β-ciclodextrină polimerică ca agenți de contrast SERS și nanoantibiotice.....	33

5.1. Introducere	33
5.2. Sinteza de nanoparticule bimetalice de tip miez@coajă aur@argint stabilizate de β -ciclodextrină polimerică (PolyCD-Au@AgNPs).....	33
5.3. Caracterizarea PolyCD-Au@AgNPs.....	34
5.4. PolyCD-Au@AgNPs ca nanoantibiotic	35
5.5. PolyCD-Au@AgNPs ca agenți de contrast SERS	36
5.6. Concluzii.....	37
Capitolul 6. Nanoparticule de aur funcționalizate cu aptamer pentru detecția colorimetrică a proteinei C reactive.....	38
6.1. Introducere	38
6.2. Sinteza de Cit-AuNPs	38
6.3. Caracterizarea Cit-AuNPs.....	39
6.4. Funcționalizarea Cit-AuNPs cu un aptamer specific proteinei CRP.....	39
6.5. Detecția colorimetrică a proteinei CRP	39
6.6. Concluzii	41
Capitolul 7. Concluzii finale și perspective.....	42
Concluzii finale.....	42
Perspective	43
Diseminări rezultate	44
Lista de publicații încadrate în teză	44
Lista de publicații ISI	44
Manuscrise în preparare.....	45
Alte publicații.....	45
Participări conferințe	47
Prezentări orale	47
Prezentări poster.....	47
Contribuții la conferințe.....	48
Premii.....	49
Activitate didactică.....	49

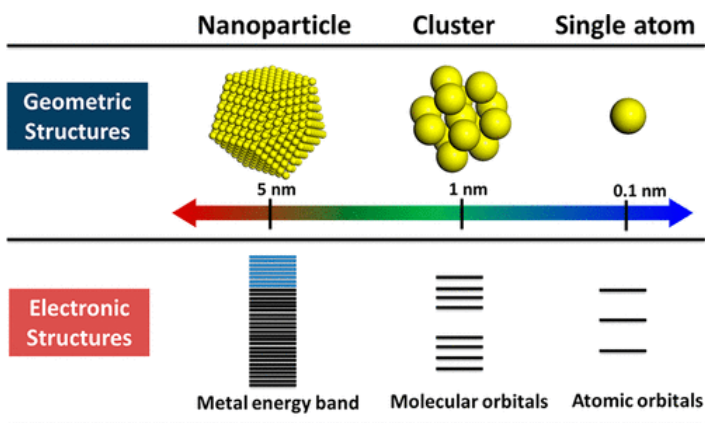
Cursuri de specializare	49
Finanțare și granturi.....	49
Referințe	50

Cuvinte cheie: nanoclusteri de aur; nanoparticule de metal nobil; fotoluminescență intrinsecă; rezonanța plasmonilor de suprafață localizată; imagistică; senzorială.

Motivație și obiective

Situată la intersecția dintre știință, inginerie și inovație, nanotehnologia reprezintă o soluție accesibilă și eficientă pentru problemele biomedicale ale societății din zilele noastre. Operând la nivelul nanometric, un domeniu în care atomii și moleculele colaborează dând naștere unor materiale noi, acest domeniu prezintă un potențial uriaș de a revoluționa chiar industriile actuale. În centrul nanotehnologiei stau nanoparticulele și nanoclusterii de metal nobil. Aceste structuri mici, posedă proprietăți chimice, dar în special fizice care sunt total diferite de cele ale materialelor de tip bulk. Astfel, acestea pot fi exploatate pentru a realiza noi mecanisme precise de detecție a bolilor, senzori cu o sensibilitate ridicată și abordări antimicrobiene inovatoare, toate la îndemână omenerii prin utilizarea strategică a nanoparticulelor și nanoclusterilor de metal nobile.

Parametrul cheie care definește proprietățile acestor nanomateriale (nanoclusteri și nanoparticule) este dimensiunea lor. Efectele dimensiunii asupra structurii geometrice și electronice a nanomaterialelor din metal nobil reprezintă una dintre cele mai intens studiate aspecte în acest domeniu. Totul a început de la specii metalice formate dintr-un singur atom, a căror structură electronică depinde în mare măsură de mediul local înconjurător (solvent și ligand), iar structura electronică a acestora a ajuns foarte bine cunoscută datorită simulărilor teoretice. Cu toate acestea, când vine vorba de specii metalice formate din mai mulți atomi, de dimensiuni mici (nanoclusteri) sau mari (nanoparticule), structura lor electronică devine mult mai complexă (**Schema 1**).



Schema 1. Structura geometrică și electronică în funcție de dimensiunea nanomaterialelor.

Figură reprodușă din [1].

Ca exemplu pentru speciile de aur (Au), diferența de energie dintre ultimul orbital molecular ocupat (HOMO) și primul orbital molecular liber (LUMO) depinde foarte mult de dimensiunea acestor specii. Mai exact, pe măsură ce dimensiunea nanomaterialelor crește, diferența de energie dintre HOMO și LUMO scade până când, în cazul nanomaterialelor cu o dimensiune care depășește 5 nm, cei doi orbitali se suprapun și formează o bandă de energie continuă. Datorită acestor efecte de dimensiune, proprietățile optice ale nanomaterialelor variază semnificativ în funcție de dimensiunea lor. Prin urmare, obiectivul acestei lucrări este de a aprofunda proprietățile fizico-chimice atât a nanoclusterilor, cât și a nanoparticulelor, și să exploateze proprietățile acestora pentru a dezvolta noi agenți de contrast, platforme de detecție și platforme antimicrobiene pentru a soluționa nevoile societății de astăzi.

Capitolul 1. Prezentare generală asupra nanoclusterilor și nanoparticulelor de metal nobil

1.1. Introducere în nanotehnologie

Un parametru cheie care definește proprietățile optice ale NPs este dimensiunea lor, clasificându-le în (i) NPs plasmonice (peste 5 nm) și nanoclusteri (NCs - sub 5 nm), fiecare dintre ele având proprietăți optice diferite. Spre exemplu, atunci când dimensiunea NPs depășește 5 nm, NPs prezintă un fenomen optic unic numit rezonanță plasmonică de suprafață localizată (LSPR), o oscilație colectivă a electronilor liberi din banda de conducție după interacțiunea NP cu un câmp electromagnetic (lumină) [2]. Cu toate acestea, dacă dimensiunea scade sub 5 nm, ele pierd această proprietate, în schimb NCs prezintă o fotoluminescență intrinsecă tunabilă, cu fotostabilitate excelentă și deplasare Stokes mare [3]. Ambele tipuri de nanomateriale sunt de mare interes în zilele noastre, prin urmare în următoarele secțiuni ale acestui capitol sunt prezentate mai multe detalii despre sinteza, proprietățile și aplicațiile lor.

1.2. Nanoclusteri de metal nobil

1.2.1. Metode de sinteză

În ultimul deceniu, au fost raportate multiple sinteze de NCs, exploatare atâr abordările de tip bottom-up, cât și cele top-down în căutarea celui mai simplu și mai rapid mod de a obține NCs cu puritate și reproductibilitate ridicate. Dintre acestea, cea mai utilizată este metoda de sinteză directă. Folosind această abordare, sarea de metal nobil este redusă în prezența unui agent reducător și stabilizată de un ligand pe bază de tiol prezent din abundență în soluția de sinteză, rezultând formarea de NCs. Cu toate acestea, există liganzi care joacă atâr rolul de agent reducător, cât și de agent de stabilizare în timpul procedurii de sinteză, cum ar fi proteine [3], peptide [4], aminoacizi [5], etc., strategie care este cunoscută și sub denumirea de sinteză asistată de un șablon. Problema principală a acestei proceduri este că acestea necesită timp, fiind nevoie uneori chiar de zile pentru a obține NCs, ceea ce a fost cazul NCs stabilizați cu albumină serică bovină sintetizați în această lucrare.

Metoda de sinteză asistată de microunde poate reduce considerabil timpul de sinteză până la câteva minute. Această abordare vine cu multe alte avantaje, cum ar fi încălzirea uniformă, un consum redus de energie fiind în același timp ecologică [6]. Mai mult, procedura prezintă un control ridicat asupra dispersității nanocristalelor sintetizate. Această strategie a fost utilizată în această teză pentru a sintetiza cu succes NCs stabilizate de glutation și histidină.

1.2.2. Proprietățile nanoclusterilor

Cea mai atractivă proprietate a NCs este fotoluminiscenta lor intrinsecă. Emisia NCs poate fi influențată de diverși factori, de la structura NCs până la pH sau temperatura soluției. Până în prezent, mecanismul de emisie a NCs este necunoscut comunității de cercetare. Totuși, efectul de izolare cuantică este acceptat. Mai exact, nanomaterialele de dimensiuni mari prezintă o bandă de energie continuă, totuși, atunci când dimensiunea nanomaterialului devine comparabilă cu lungimea de undă Fermi (~ 2 nm), banda de energie continuă se împarte în nivele de energie discrete [7], oferind NCs proprietăți moleculare, precum fotoluminiscentă.

1.2.3. Aplicațiile nanoclusterilor

Datorită proprietăților lor fizico-chimice unice, cum ar fi biocompatibilitatea, biopermeabilitatea excelentă și suprafața ușor de modificat, NCs sunt exploatați în multiple aplicații. Dintre toate, NCs sunt exploatați cel mai mult ca platforme de detecție, deoarece fotoluminiscenta lor este foarte sensibilă. După interacțiunea cu analitul dorit intensitatea fotoluminiscentei variază în două moduri posibile: (i) stingerea sau (ii) amplificarea emisiei. Imagistica celulară și tisulară este o altă aplicație în care NCs sunt extrem de exploatați. Datorită dimensiunilor lor mici, NCs pot pătrunde cu ușurință prin membrana celulară, prezentând în același timp o stabilitate chimică și foto-chimică ridicată, biocompatibilitate ridicată dată de agentul de stabilizare, astfel fiind candidați excelenți ca agenți de contrast fluorescenți pentru aplicații de bioimagică [8].

Chiar dacă aplicațiile menționate mai sus sunt cele mai exploatate, NCs au fost raportați ca excelenți agenți antimicrobieni [9], emițători de lumină albă [10] sau catalizatori [11]. În cadrul

acestei teze de doctorat, NCs sintetizați vor fi exploatați în cele două aplicații principale: detecție și imagistică.

1.3. Nanoparticule de metal nobil

1.3.1. Metode de sinteză

Sinteza NPs precum cea a NCs poate fi realizată urmând una dintre cele două strategii principale: abordarea bottom-up sau cea top-down. Abordările de tip top-down implică ruperea materialului bulk în NPs mici printr-un proces fizic sau chimic. Pentru această abordare, există mai multe strategii raportate în literatură, cum ar fi piroliza, termoliza, nanolitografia și sintezele asistate de radiații. Cu toate acestea, majoritatea strategiilor de tip top-down au ca rezultat formarea de NPs cu imperfecțiuni pe suprafață care le afectează atât proprietățile fizice, cât și cele chimice [12]. NPs sintetizate folosind strategiile de tip bottom-up sunt considerate în general superioare datorită posibilității de a controla compoziția, dimensiunea și forma NPs rezultate. Abordările de tip bottom-up sunt sinteze chimice, sonochimice, electrochimice și ecologice. Reducerea ionilor metalici în soluție reprezintă cea mai exploatată strategie de tip bottom-up și implică reducerea ionilor de metal nobil din sărurile corespunzătoare folosind diferiți compuși chimici ca agenți reducători în prezența unui agent de stabilizare adecvat. Mai mult, strategiile ecologice implică utilizarea de microorganisme, biopolimeri și extracte de plante pentru a fi utilizate ca agenți stabilizatori și uneori chiar agenți reducători [13]. În această lucrare, strategia de sinteză verde a fost singura exploatată pentru a sintetiza NPs.

1.3.2. Proprietățile nanoparticulelor

Pentru a înțelege semnificația fizică a plasmonilor de suprafață, NPs metalice ar trebui approximate ca o rețea de ioni pozitivi în interiorul căreia electronii din banda de conducție se mișcă liber [2]. După interacțiunea NPs cu lumina, câmpul electromagnetic exercită o forță asupra electronilor care se mișcă liber, împingându-i spre suprafața NPs. Mișcarea electronilor de conducție va duce la o separare a sarcinii, creând astfel un dipol electric. În acest moment, dipolul electric va genera un câmp electric opus, care va obliga electronii să se întoarcă la punctul lor de

echilibru. Prin urmare, electronii de conducție vor începe să oscileze în jurul punctului lor de echilibru cu o frecvență cunoscută și sub denumirea de frecvență plasmonică. Oscilația electronilor din banda conducție după excitarea lor cu lumină poartă denumirea de plasmonii de suprafață [14]. Mai mult, dacă frecvența câmpului electromagnetic are aceeași valoare cu frecvența plasmonică, electronii de conducție vor oscila la amplitudine maximă rezultând cel mai important fenomen al NPs, rezonanța plasmonilor de suprafață. În plus, dacă NPs sunt realizate din metal, rezonanța plasmonilor de suprafață este localizată pe suprafața NPs, ceea ce reprezintă fenomenul cunoscut sub numele de LSPR [15]. Fenomenul LSPR poate fi observat folosind spectroscopia UV-Vis ca o bandă de absorbție.

1.3.3. Aplicațiile nanoparticulelor

Datorită proprietăților fizice și chimice unice, NPs din metal nobil au fost exploatate în diverse aplicații ca platforme de detectare, agenți de contrast, agenți antimicrobieni, agenți terapeutici pentru cancer, platformă de livrare a medicamentelor, etc. Dintre toate, NPs au fost utilizate pe scară largă pentru a detecta selectiv un analit dorit. Cele mai multe dintre strategiile de detecție raportate se bazează pe agregarea NPs după interacțiunea cu molecula țintă, rezultând o schimbare a culorii soluției coloidale, detecție colorimetrică. Imagistica este o altă aplicație în care NPs de metal nobil sunt foarte eficiente. Chiar dacă NPs pot juca singure rolul agenților de contrast pentru imagistica în câmp întunecat [16], totuși, această tehnică implică lumină de mare intensitate pentru a excita celulele sau țesuturile tratate cu NPs, care le poate afecta. Prin urmare, NPs sunt funcționalizate cu o moleculă reporter Raman sau un fluorofor pentru a forma agenți de contrast pentru imagistica de împrăștiere Raman amplificată de suprafață (SERS) [17] sau imagistica de fluorescență [18]. În această teză, NPs sintetizate au fost exploatate ca platforme de detecție colorimetrice, agenți de contrast SERS și agenți antimicrobieni.

Luând în considerare diferențele dintre NCs și NPs din punct de vedere optic, în cele ce urmează, teza de doctorat va fi împărțită în două părți (I) „Contribuții la sinteza de noi nanoclusteri de aur și aplicațiile lor în imagistică și detecție”, concentrându-se pe sinteza, caracterizarea și aplicațiile de imagistică și detecție ale NC și (II) „Contribuții la sinteza de noi nanoparticule de metal nobil pentru aplicații ca agenți de contrast SERS, nanoantibiotice și platforme de detectare” concentrându-se pe sinteza, caracterizarea și aplicațiile imagistice și de detecție a NPs.

Partea I. Contribuții la sinteza de noi nanoclusteri de aur și aplicațiile lor în imagistică și detecție

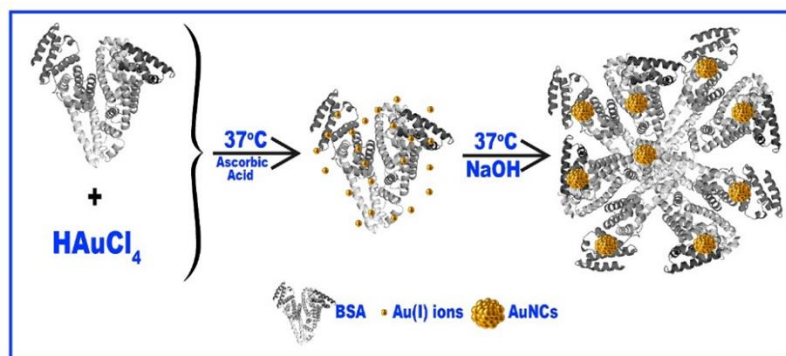
Capitolul 2. Nanoclusteri de aur stabilizați de albumină serică bovină pentru aplicații de imagistică de fluorescență

2.1. Introducere

În ultimele decenii, imagistica de fluorescență s-a dovedit a fi o tehnică puternică pentru diagnosticarea precoce și tratarea anumitor boli, precum și în studiile mecanismelor diferitelor procese biologice, imunologice și neurologice [19,20]. Prin urmare, dezvoltarea agenților de contrast fluorescenți adecvați a devenit o prioritate pentru comunitatea de cercetare [21]. De obicei, un agent de contrast fluorescent este compus dintr-un fluorofor care emite în vizibil sau în infraroșu apropiat (NIR), funcționalizat cu un biomarker care prezintă afinitate mare pentru un receptor din celula sau țesutul de interes. Cu toate acestea, fluoroforii organici obișnuiți prezintă dezavantaje multiple, cum ar fi emisia suprapusă cu autofluorescența biologică, timp de viață scurt de fluorescență, fotostabilitate scăzută, dar pot fi, de asemenea, foarte toxice pentru mediile biologice [22]. Prin urmare, este crucială fabricarea de noi agenți de contrast fluorescenți care sunt capabili să depășească aceste limitări.

2.2. Sinteza de BSA-AuNCs

BSA-AuNCs au fost sintetizați folosind o procedură în doi pași adaptată și optimizată, care a fost raportată anterior [3]. Metoda de sinteză este descrisă pe scurt în **Schema 2.1**.



Schema 2.1. Reprezentare schematică a procedurii de sinteză a BSA-AuNCs. Figură reprodusă din [23]

Într-un flacon Erlenmeyer, 5 mL de BSA (40 mg/mL) au fost amestecați cu 5 mL de HAuCl₄ (10⁻² M) sub agitare magnetică la 37 °C. Apoi, 20 μL de acid ascorbic (10⁻³ M) și 0,5 mL de NaOH (1 M) au fost picurați la o viteză de 4 μL/min și, respectiv, 0,1 mL/min. După 24 de ore, s-au adăugat 0,5 ml de NaOH (1 M) pentru a ajusta pH soluției la unul foarte alcalin, iar soluția a fost agitată magnetic timp de încă 24 de ore la 37 °C. Culoarea soluției s-a schimbat de la galben deschis la maro închis. După procesul de purificare, soluția coloidală a fost păstrată la 4 °C.

2.3. Caracterizarea BSA-AuNCs

În urma sintezei, soluția coloidală de BSA-AuNCs prezintă o culoare maro-închis la lumina ambientală (inset - **Figura 2.1.A**) care devine roșie atunci când este expusă la lumina ultravioletă, indicând faptul că particulele sintetizate posedă fotoluminescență intrinsecă. Mai mult decât atât, soluția coloidală prezintă o absorbție puternică care scade exponențial de la UV la vizibil (**Figura 2.1.A**), în timp ce absența unei benzi LSPR demonstrează absența nanoparticulelor mari.

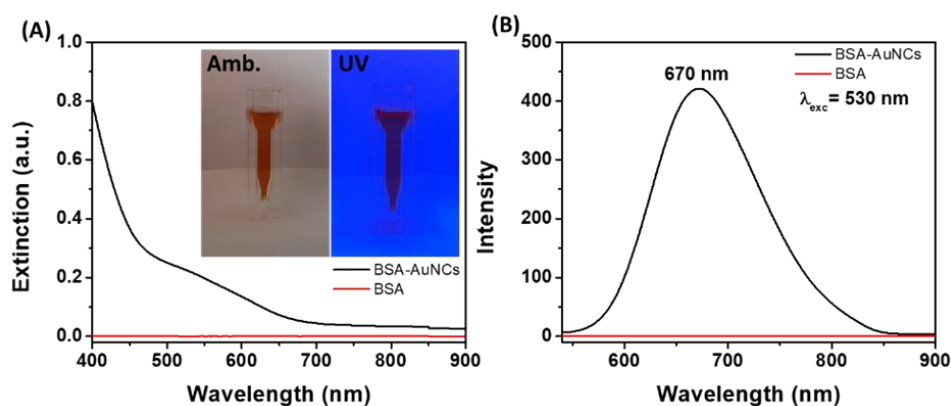


Figura 2.1. (A) Spectrul de extincție și (B) spectrele de fotoluminescență ale BSA-AuNCs (linia neagră) și BSA (linia roșie). Insetul reprezintă soluția coloidală de BSA-AuNCs expusă la lumina ambientală și la lumina UV. Figura adaptată din [23].

Din punct de vedere al emisie, soluția coloidală a BSA-AuNCs prezintă o fotoluminescență în roșu îndepărtat localizată la 670 nm sub excitație de 530 nm (**Figura 2.1. B**). Este demn de menționat că nu a fost observată nicio emisie pentru soluția echivalentă de BSA la aceeași lungime de undă de excitație.

Din punct de vedere morfologic, măsurătorile DLS arată că dimensiunea medie a complexului BSA-AuNC este de 25 ± 12 nm. Luând în considerare faptul că o singură proteină de BSA are dimensiuni de 4 nm x 4 nm x 14 nm, dimensiunea hidrodinamică raportată a BSA-AuNCs indică polimerizarea mai multor lanțuri BSA. Această teorie a fost confirmată de imaginea TEM reprezentativă cu mărire mică. Mai mult, imaginile HRTEM ale unui complex BSA-AuNCs demonstrează prezența nanostructurilor sferice de 2 până la 3 nm în interiorul complexului BSA, în timp ce analiza elementară EDX confirmă în mod clar că nanostructurile sunt realizate din aur. Prin urmare, măsurătorile DLS și TEM demonstrează sinteza cu succes a AuNCs înfășurate într-o coroană de BSA.

2.4. Funcționalizarea cu acid folic a BSA-AuNCs

Celulele de cancer ovarian supraexprimă receptorul folat alfa ($FR\alpha$), în timp ce receptorul abia se găsește în celulele normale sănătoase și, prin urmare, funcționalizarea cu acid folic ar permite țintirea celulelor de cancer ovarian de către BSA-AuNCs. Astfel, în urma funcționalizării cu acid folic a BSA-AuNCs (FA-BSA-AuNCs), soluția coloidală a fost investigată folosind spectroscopia IR, observându-se apariția a două noi benzi atribuite noii legături covalente C-N formate, între gruparea carboxil a acidului folic și gruparea amino a BSA. În plus, dimensiunea hidrodinamică a crescut cu 3 nm indicând restructurarea complexului, iar potențialul zeta a soluției coloidale prezintă o valoare cu 10 mV mai ridicată. În plus, emisia de fluorescență a BSA-AuNCs a scăzut în intensitate și a shiftat spre albastru cu 12 nm în urma incubării cu acid folic. Toate aceste rezultate demonstrează că BSA-AuNCs au fost funcționalizați cu succes cu acid folic.

2.5. Biocompatibilitatea BSA-AuNCs

În continuare, viabilitatea celulelor de cancer ovarian NIH:OVCAR-3, o linie celulară cu $FR\alpha$ supraexprimat, a fost testată în prezența BSA-AuNCs și FA-BSA-AuNC folosind teste MTT. Ambele probe, BSA-AuNCs și FA-BSA-AuNCs, nu prezintă vreun efect toxic asupra viabilității liniei celulare NIH:OVCAR-3 la nicio concentrație testată.

2.6. Performanța BSA-AuNCs ca agenți de contrast fluorescenți

2.6.1. în celule

În continuare, a fost evaluat potențialul BSA-AuNCs ca agenți de contrast fotoluminescenți pentru vizualizarea țintită a celulelor de cancer ovarian NIH-OVCAR-3 folosind microscopia de fluorescență rezolvată temporal (FLIM). Imaginile FLIM înregistrate pe celulele netratate și cele tratate cu BSA-AuNCs și, respectiv, FA-BSA-AuNCs sunt prezentate în **Figura 2.2 A-C**. Imaginile FLIM demonstrează internalizarea celulară îmbunătățită a FA-BSA-AuNCs în comparație cu BSA-AuNCs, superioritate care este oferită de acidul folic. AuNCs sunt în mare parte situate în jurul nucleului, evidențiind citoplasma celulară, în timp ce, celulele netratate nu prezintă niciun semnal sub aceeași excitație de 520 nm. Mai mult, imaginile FLIM achiziționate pe celulele NIH-OVCAR-3 tratate cu FA-BSA-AuNCs la diferite adâncimi (**Figura 2.2. z1-5**) confirmă distribuția uniformă a AuNCs în interiorul întregii celule.

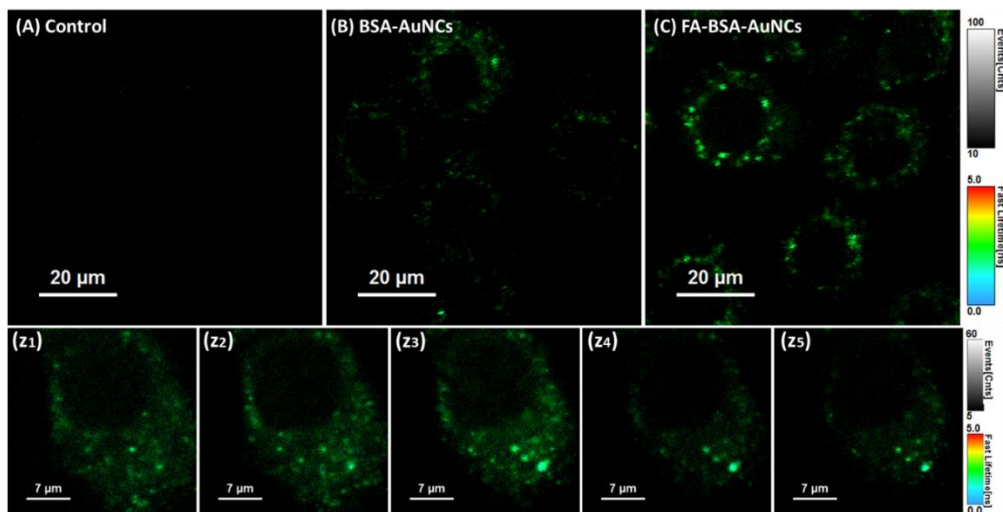


Figura 2.2. Imagini FLIM confocale a celulelor NIH:OVCAR-3 (A) netratate, (B) tratate cu BSA-AuNCs și (C) cu FA-BSA-AuNCs. (z1-5) Imagini FLIM ale aceleiași celule NIH:OVCAR-3 tratate cu FA-BSA-AuNCs înregistrate la diferite adâncimi z. Toate imaginile au fost achiziționate sub excitație cu fotoni în pulsuri la 520 nm. Figura reprodușă din [23].

2.6.2. în materiale care imită proprietățile țesutului

Din păcate, majoritatea studiilor imagistice se opresc la nivel celular, cu toate acestea, trebuie efectuate studii suplimentare pe medii biologice mai complexe pentru a evalua fezabilitatea

unui nanomaterial pentru a fi utilizat ca agent de contrast. Prin urmare, diferite concentrații de BSA-AuNCs au fost internalizate în materiale care imită proprietățile țesutului (phantom) și eficiența lor ca agenți de contrast fotoluminiscenti a fost evaluată sub excitație cu doi fotoni în NIR. Imaginile FLIM înregistrate sunt prezentate în **Figura 2.3**. Imaginile FLIM ale materiale care imită țesutul tratate cu 20-50% BSA-AuNCs prezintă o fotoluminescență omogenă, în timp ce, nu a fost detectat niciun semnal de la materialul de tip phantom control care nu a fost tratat cu AuNCs. Mai exact, delimitarea precisă a regiunilor din materialul de tip phantom care a fost tratat cu BSA-AuNCs de cele netratate demonstrează capacitatea lor de a colora materialele de tip phantom. În plus, chiar dacă intensitatea fotoluminescenței crește odată cu concentrația de BSA-AuNCs, în interiorul materialului de tip phantom de agaroză tratată cu 50% BSA-AuNCs au fost găsite regiuni cu agregare ridicată. Luând în considerare faptul că NC-urile și proteinele agregate prezintă toxicitate ridicată pentru orice celulă sau țesut, materialul de tip phantom tratat cu 30% BSA-AuNC a fost ales pentru a fi utilizată în experimente viitoare.

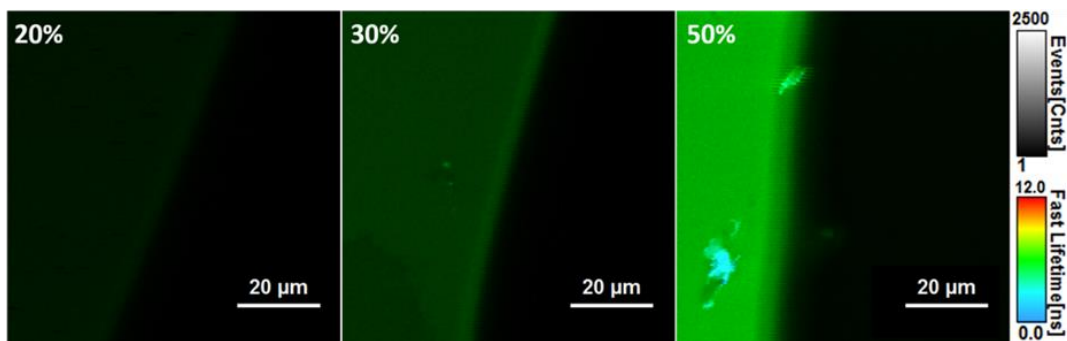


Figura 2.3. Imagini FLIM ale materialelor imitatoare de țesut tratate cu diferite concentrații de BSA-AuNCs (20, 30 și 50%) înregistrate sub excitație cu doi fotoni de 820 nm. Imagine reprodusă din [24].

Adâncimi mari de penetrare, fototoxicitatea redusă, excitația localizată sunt doar câteva dintre avantajele excitației cu doi fotoni față de un foton. În timp ce pentru excitație cu un foton, se poate observa o dependență liniară între intensitatea emisiei și puterea excitației, pentru excitație cu doi fotoni ar trebui observată o dependență neliniară. Astfel, au fost extrase spectrele de fluorescență a materialului de tip phantom tratat cu 30% BSA-AuNCs sub excitație cu doi fotoni de 820 nm cu o putere de excitație variind între 5 și 20 mW. În primul rând, informațiile spectrale ale materialelor de tip phantom tratate cu 30% BSA-AuNCs se potrivesc cu cele ale BSA-AuNCs

în soluție cu un maxim localizat la 670 nm, demonstrând că proprietățile lor de emisie sunt menținute în interiorul materialului care imită țesutul. În al doilea rând, intensitatea fotoluminescenței depinde în mod pătratic de puterea de excitație utilizată, demonstrând fără îndoială că emisia este rezultatul unui proces în urma unei excitări cu doi fotoni. Prin urmare, BSA-AuNCs pot fi folosiți ca agenți de contrast fotoluminescenți pentru viitoare aplicații de imagistică FLIM *in vivo*.

2.7. Concluzii

În acest capitol am demonstrat capacitatea BSA-AuNCs de a fi folosiți ca agenți de contrast fotoluminescenți atât pentru imagistica intracelulară, cât și pentru imagistica simulată *ex vivo*, folosind microscopia FLIM sub excitație cu un foton și, respectiv, doi fotoni. După sinteza în două etape, soluția coloidală de BSA-AuNCs a prezentat o emisie de un roșu aprins localizată la 670 nm sub excitație de 530 nm, care este stabilă în timp și sub iradiere continuă. Apoi, BSA-AuNCs au fost funcționalizate cu succes cu acid folic și biocompatibilitatea lor ridicată a fost dovedită prin teste MTT efectuate pe celulele de cancer ovarian NIH:OVCAR-3. În continuare, imagistica prin microscopie de fluorescență a demonstrat capacitatea excelentă a BSA-AuNCs ca agenți de contrast fluorescenți intracelular. În cele din urmă, BSA-AuNCs au fost internalizate în interiorul materialelor care imită țesutul pentru a le evalua abilitățile de imagistică într-un mediu simulat *ex vivo*. Un semnal puternic a fost obținut în cazul materialului de tip phantom tratat cu 30% BSA-AuNCs sub excitație cu doi fotoni de 820 nm, în timp ce dependența pătratică a fotoluminescenței de puterea de excitație a confirmat că emisia este datorată unei excitări cu doi fotoni. Prin urmare, BSA-AuNCs sunt candidați promițători pentru viitoarele aplicații de imagistică *in vivo*.

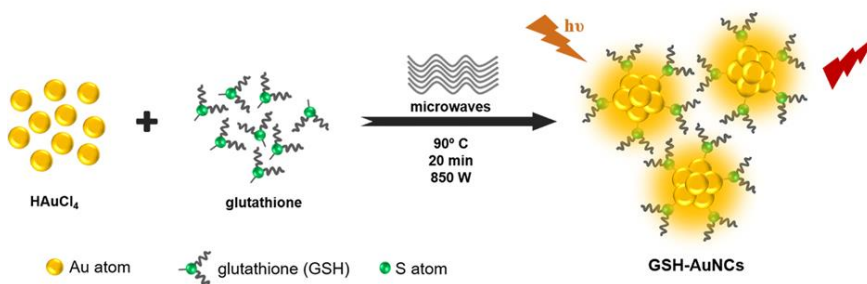
Capitolul 3. Nanoclusteri de aur stabilizați de glutathion ca emițători de lumină în infraroșu apropiat pentru aplicații de imagistică de fluorescență confocală

3.1. Introducere

Agenții de contrast care emit în infraroșu apropiat (NIR) reprezintă o clasă de nanomateriale biocompatibile și fluorescente care s-au dovedit a fi instrumente excelente pentru imagistica neinvazivă a țesuturilor. Având atât lungimi de undă de excitare, cât și de emisie în prima fereastră biologică, agenții de contrast care emit în NIR pot fi urmăriți în interiorul țesutului până la o adâncime de 1 cm, făcându-i candidați excelenți pentru aplicații de imagistică *in vivo* [25]. Până în prezent, unii fluorofori aprobați de FDA care emit în NIR au fost deja exploatați pentru ghidarea în timp real a intervențiilor chirurgicale [26,27], cu toate acestea, ei prezintă dezavantaje semnificative precum stabilitate temporală scăzută, deplasare Stokes mică și timp de viață a fluorescenței care se suprapune cu cea a autofluorescenței țesuturilor. Prin urmare, dezvoltarea de noi agenți de contrast biocompatibili care emit în NIR este necesară și critică pentru evoluția chirurgiei ghidate de imagini bazate pe fluorescență.

3.2. Sinteza de GSH-AuNCs

Mai multe tipuri de GSH-AuNCs au fost sintetizați printr-o nouă procedură asistată de microunde, care este prezentată în **Schema 3.1**.



Schema 3.1. Reprezentare schematică a sintezei asistate de microunde a GSH-AuNCs. Figură reprodusă din [28].

Într-un vas al unui reactor de microunde G10, s-a adăugat o soluție de GSH (3 mL, 5 mM) și volume cuprinse între 1,0 și 1,3 mL de HAuCl₄ (10 mM). Ulterior, vasele au fost iradiate cu microunde de 850 W timp de 20 de minute la 90 °C.

3.3. Caracterizarea GSH-AuNCs

În primul rând, au fost sintetizate mai multe loturi de GSH-AuNC utilizând procedura prezentată în **Schema 3.1**. Față de alte proceduri raportate, noutatea abordării prezentate în acest capitol constă în utilizarea iradierii cu microunde pentru reducerea controlată a ionilor de aur, timp de sinteză considerabil mai rapizi (20 min) și controlul ridicat al proprietăților optice ale acestora prin modificarea raportului molar GSH:HAuCl₄, rezultând o procedură verde, rapidă și simplă. Toate loturile de GSH-AuNCs prezintă două benzi de emisie de fluorescență sub excitație cu 405 nm (**Figura 3.1**): o fotoluminescență localizată la 610 nm și una situată la 800 nm. Dubla fotoluminescență a GSH-AuNCs se datorează celor două conformații diferite pe care GSH le poate avea pe suprafața AuNCs împreună cu gradul diferit de acoperire a suprafeței pe care GSH îl asigură [29].

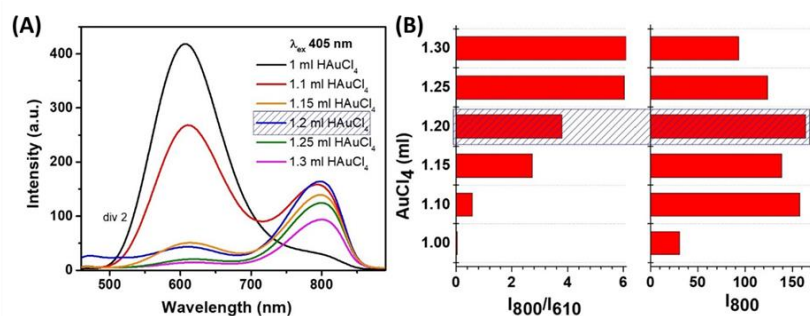


Figura 3.1. Spectrele de fotoluminescență ale tuturor loturilor de GSH-AuNC sintetizate prin varierea volumului de HAuCl₄ sub excitație de 405 nm. (B) Dependența raportului de intensitate a fotoluminescenței (I_{800}/I_{610}) împreună cu dependența intensității de emisie a fotoluminescenței de la 800 nm de volumul utilizat de HAuCl₄. Figura reprodușă din [28]

Având în vedere că acest capitol este axat pe sinteza agenților de contrast fotoluminescenți care emit în NIR, după o analiză atentă a raportului de intensitate dintre emisiile în roșu și emisiile în NIR corelate cu intensitatea emisieii în NIR (**Figura 3.1.B**), GSH- AuNCs sintetizați cu 1.2 ml de HAuCl₄ au fost aleși pentru investigații ulterioare. GSH-AuNCs selectați prezintă o de absorbție

tipică NCs. Soluția coloidală de GSH-AuNCs prezintă o culoare verde-gălbuie care devine roșie la expunerea la UV, o confirmare vizuală a fotoluminiscenței lor intrinseci. Spectrul de excitație evidențiază gama largă de lungimi de undă la care pot fi excitați GSH-AuNCs. Randamentul cuantic a emisiei în NIR a fost calculat ca fiind 9.9%. În plus, timpul de viața a emisiei în roșu s-a obținut ca fiind 407 ns, și de 1821 ns în cazul emisiei în NIR, ambele având valori mult mai mari decât cea a autofluorescenței mediului biologic de 2-3 ns, demonstrând astfel fezabilitatea GSH-AuNCs de a fi utilizați ca agenți de contrast care emit în NIR pentru aplicații de imagistică.

3.4. Performanța GSH-AuNCs ca agenți de contrast în interiorul materialelor imitatoare de țesut

Ținând cont de faptul că biocompatibilitatea ridicată a GSH-AuNCs a fost raportată anterior în mai multe studii, GSH-AuNCs au fost internalizați în interiorul unui material de tip phantom pentru a evalua eficiența lor ca agenți de contrast care emit în NIR folosind microscopia de fluorescență confocală de tip re-scanare (RCM) și FLIM sub excitație de 640 nm. Imaginile FLIM obținute (**Figura 3.2.A**) prezintă un semnal fotoluminescent de intensitate mare sub excitație la 640 nm, în timp ce materialul de tip phantom netratat (control) nu prezintă niciun semnal, demonstrând că semnalul înregistrat provine de la GSH-AuNCs. Mai mult, spectrul de fotoluminescență înregistrat de la materialul de tip phantom tratat cu GSH-AuNCs sub excitație cu 640 nm, prezintă o deplasare spre albastru de 25 nm în comparație cu spectrul obținut în soluție (Figura . Această schimbare a fost cauzată cel mai probabil de aglomerarea NCs, aglomerare care are loc după internalizarea GSH-AuNCs în interiorul materialului de tip phantom care imită țesutul. Nu în ultimul rând, imaginile RCM ale materialelor de tip phantom tratate cu GSH-AuNCs, obținute după reconstrucția mai multor imagini 2D confocale de la diferite adâncimi, confirmă distribuția GSH-AuNCs în întreaga masă a materialului, care sunt în acord direct cu imaginile FLIM prezentate mai sus. Având în vedere că majoritatea agenților de contrast fotoluminescenți sunt testați doar pe celule, în acest capitol, s-a demonstrat că GSH-AuNCs având un timp de viață lung și o emisie în NIR sunt capabili să funcționeze ca agenți de contrast fotoluminescenți în interiorul materialelor de tip phantom și, prin urmare, demonstrează potențialul lor de a fi utilizați în viitoare aplicații de bioimagistică *ex vivo* și chiar *in vivo*.

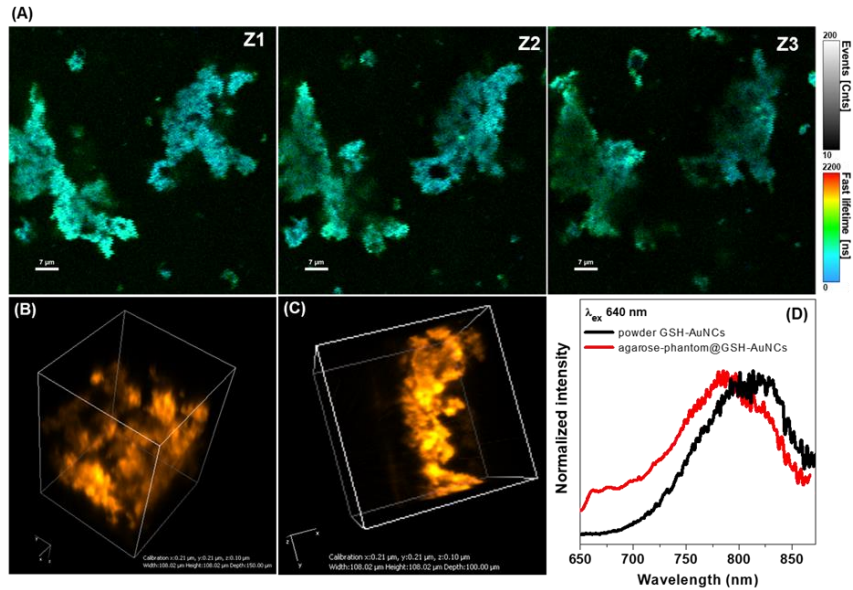


Figura 3.2. (A) Imagini FLIM ale materialelor de tip phantom tratate cu GSH-AuNCs înregistrate la diferite adâncimi (Z1-Z3) sub excitație de 640 nm. (B) și (C) Imagini RCM ale materialelor de tip phantom tratate cu GSH-AuNCs achiziționate sub excitație de 640 nm. (D) Spectrele de fotoluminescență ale GSH-AuNCs în soluție în comparație cu cea înregistrată în interiorul materialelor de tip phantom. Figura reprodușă din [28].

3.5. Concluzii

În cadrul acestui capitol, am sintetizat GSH-AuNCs folosind o procedură nouă și am dovedit că au capacitatea de a funcționa ca agenți de contrast care emit în NIR folosind microscopii confocale de fluorescență de tip RCM și FLIM. GSH-AuNCs care prezintă o emisie fotostabilă au fost sintetizați printr-o abordare asistată de microunde. NCs obținuți prezintă două emisii: una în roșu situată la 610 nm și una în NIR localizată la 800 nm cu un randament cuantic de 9,9%. Am constatat că timpul de viață de fluorescență a celor două emisii este de 407 ns pentru emisia în roșu și 1821 ns pentru cea în NIR. În plus, am dovedit că GSH-AuNC prezintă o emisie în NIR fotostabilă sub o gamă largă de lungimi de undă de excitație, inclusiv 640 nm, făcându-le potrivite pentru aplicații de bioimagnostică. Prin urmare, GSH-AuNCs au fost internalizați în materialelor de tip phantom și am demonstrat capacitatea lor de a fi folosiți ca agenți de contrast folosind două tehnici complementare RCM și FLIM.

Capitolul 4. Platforme portabile pe bază de hârtie impregnate cu nanoclusteri de aur pentru detecția eficientă a ionilor de metale grele.

4.1. Introducere

În ultimele decenii, poluarea cu ioni de metale grele s-a dovedit a fi o sursă majoră de îngrijorare pentru mediu și sănătatea umană datorită toxicității acestora ridicată și proprietăților nebiodegradabile [30,31]. De exemplu, concentrația mare de ioni de cupru (Cu^{2+}) poate provoca insuficiență hepatică sau renală [32], dar poate fi și mortală pentru viața subacvatică [33], în timp ce ionii de fier (Fe) pot induce tulburări precum Parkinson, Alzheimer sau chiar tensiune arterială scăzută. [34]. În zilele noastre, sunt utilizate mai multe moduri pentru a determina concentrația ionilor de metale grele din probele de apă, cum ar fi spectroscopie de absorbție atomică, spectroscopie Raman amplificată de suprafață, cromatografia, metode electrochimice, etc. . Cu toate acestea, tehnicile de detecție menționate mai sus prezintă dezavantaje: sunt costisitoare și consumatoare de timp, deoarece probele trebuie trimise la laboratoare sau instituții specializate, unde personal calificat efectuează analiza folosind echipamente grele și costisitoare. Prin urmare, există o necesitate mare de a dezvolta metode noi, mai rapide și mai accesibile de detecție sensibilă și selectivă a ionului de metal greu țintă.

4.2. Nanoclusteri de aur stabilizați de BSA pentru detecția selectivă și cuantificarea ionilor de cupru

4.2.1. Sinteza de BSA-AuNCs

BSA-AuNCs au fost sintetizați folosind o procedură similară descrisă în secțiunea 2.2. În detaliu, temperatura de sinteză a fost crescută la 50 °C, ceea ce a îmbunătățit timpul procedurii cu 24 de ore. Mai mult, adăugarea de NaOH (0,5 ml, 1 M) pentru a doua oară nu a mai fost necesară, deoarece sinteza a fost finalizată după numai 24 de ore.

4.2.2. Caracterizarea BSA-AuNCs

După sintetizarea BSA-AuNCs printr-o procedură optimizată în comparație cu cea utilizată în Capitolul 2, NCs au fost caracterizate atât spectroscopic, cât și morfologic. Spectrul UV-Vis prezintă o absorbție tipică NCs, neobservându-se apariția unei benzi LSPR în regiunea vizibilă. Emisia BSA-AuNCs a fost evaluată folosind un spectrofluorometru portabil echipat cu excitație pe bază de LED. Fotoluminiscența BSA-AuNCs afișează un vârf situat la 670 nm sub excitația de 502 nm, acesta fiind cel mai potrivit LED pentru a maximiza emisia de fotoluminiscență. Mai mult, imaginile HR-TEM, achiziționate folosind un microscop Hitachi, expun AuNCs cu o dimensiune medie de 3 nm care sunt încorporate în interiorul unei coroane de BSA. Atât caracterizarea spectroscopică, cât și morfologică demonstrează formarea cu succes a BSA-AuNCs.

4.2.3. Performanța BSA-AuNCs ca senzor coloidal

Testele de sensibilitate și selectivitate în cadrul acestui capitol au fost efectuate utilizând un spectrofluorimetru ieftin cu o configurație portabilă, care poate fi dus direct la locul de prelevare și poate cuantifica analitul dorit. În urma interacțiunii soluției coloidale de BSA-AuNCs cu ioni metalici comuni s-a observat că ionii de Cu induc o stingere de 53% a intensității de emisie a BSA-AuNCs, demonstrând astfel selectivitatea ridicată a BSA-AuNCs față de ionii de Cu. În continuare, am evaluat sensibilitatea senzorului coloidal față de detecția ionilor de Cu în soluție, obținându-se o stingere din ce în ce mai mare o dată cu creșterea concentrației de ioni de Cu (**Figura 4.1.A**).

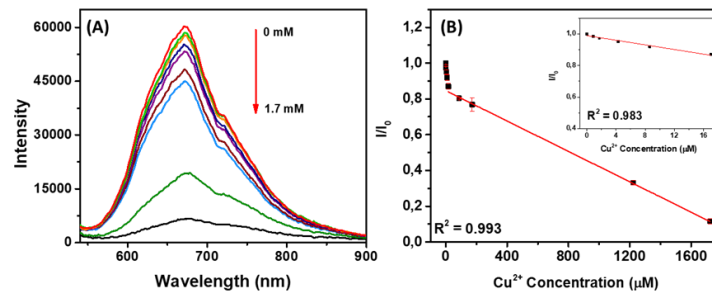


Figura 4.1. (A) Spectrele de fotoluminiscență ale BSA-AuNCs sub excitație de 502 nm în prezența a concentrații diferite de Cu^{2+} . (B) Testul de sensibilitate prezentat ca dependență de raportului de intensitate al fotoluminescenței BSA-AuNCs (I/I_0) de concentrația de Cu^{2+} . Figura adaptată din [35].

În urma plotării efectului de stingere a fotoluminescenței în raport cu concentrația de Cu^{2+} testată s-a obținut două zone liniare de detecție: una pentru concentrații mici ($0\text{-}17\ \mu\text{M}$) și una pentru concentrații mari ($17\text{-}1724\ \mu\text{M}$) ambele cu coeficienți de corelare foarte buni (**Figura 4.1.B**). Limita de detecție a acestui senzor a fost calculată ca fiind $0.83\ \mu\text{M}$ ceea ce este o valoare mult mai mică decât nivelul maxim de Fe acceptat în apa de băut de către Agenția de protecție a mediului de $20\ \mu\text{M}$.

4.2.4. Detecția de ioni de cupru folosind platforma pe bază de hârtie impregnată cu BSA-AuNCs

4.2.4.1. în condiții de laborator

În zilele noastre, dezvoltarea unor metode noi de detecție ieftine și ușor de utilizat, care pot depăși dezavantajele abordărilor complicate și consumatoare de timp reprezintă obiectivul numărul unu al acestui domeniu. Prin urmare, ca dovadă conceptuală, proprietățile excelente ale hârtiei de filtru au fost combinate cu capacitatea de detecție a BSA-AuNCs pentru a dezvolta un senzor ieftin, portabil, calitativ și semi-cantitativ pentru detecția specifică a ionilor de Cu. Astfel, concentrații cuprinse între 0 și $250\ \mu\text{M}$ de ioni de Cu au fost picurate peste hârtia impregnată cu BSA-AuNCs și a fost evaluat efectul de stingere al fotoluminescenței (**Figura 4.2**).

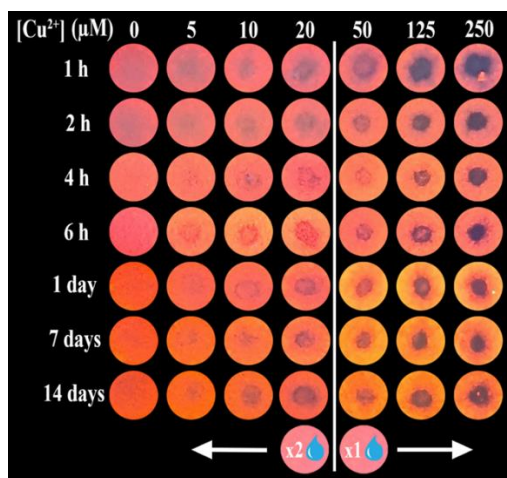


Figura 4.2. Imagini fotografice ale senzorului pe bază de hârtie impregnată cu BSA-AuNCs achiziționate sub lumină UV, la o oră după incubarea cu ioni de Cu la concentrații cuprinse între 0 și $250\ \mu\text{M}$. Zonele

impregnate cu BSA-AuNCs au fost lăsate în prealabil să se usuce pentru diferite perioade de timp, de la 1 oră la 14 zile. Figura reprodusă din [35].

În comparație cu punctele control incubate doar cu apă ultrapură (coloana din stânga din **Figura 4.2**), modificări de culoare au fost observate în mijlocul zonelor de detecție care au fost incubate cu o soluție care conține diferite concentrații de Cu^{2+} . Acest fenomen are loc datorită efectului de stingere al fotoluminescenței BSA-AuNCs, fenomen activat de interacțiunea lor cu ionii de Cu în interiorul hârtiei de filtru. Comportamentul diferit al sensorului pe hârtie pe două intervale de concentrație (de la 5 la 20 μM și peste 50 μM) este în concordanță cu cele două intervale liniare de detecție obținute în cazul sensorului coloidal. Limita de detecție a sensorului bazat pe hârtie impregnată cu BSA-AuNCs am calculat-o ca fiind de 5 μM .

4.2.4.2. din probe reale

Următorul pas a fost evaluarea capacității sensorului bazat pe hârtie impregnată cu BSA-AuNCs de a detecta ionii de Cu din probe reale de apă. Probele de apă reale testate nu conțin concentrații detectabile de ioni de Cu. Prin urmare, probelor le-au fost adăugate concentrații de Cu de 5, 10, 20, 157 și, respectiv, 188 μM și au fost testate din nou. În urma unei examinări vizuale a zonelor de detecție, am demonstrat că platforma de detecție pe bază de hârtie impregnată cu BSA-AuNCs este capabilă să detecteze concentrații de până la 5 μM din probele reale de apă. Chiar dacă această concentrație este inofensivă pentru corpul uman, poate ucide peștii după expunere pentru doar câteva ore.

4.2.5. Concluzii

În concluzie, rezultate obținute demonstrează că platforma de detecție pe bază de hârtie impregnată cu BSA-AuNCs poate fi utilizată cu succes într-unul din următoarele două moduri: (1) atunci când este exploatată pentru testele de apă potabilă, stingerea produsă de o picătură de apă de 5 μL indică faptul că conține concentrații de ioni de Cu care depășesc nivelul de 50 μM și (2) atunci când sunt exploatate pentru mediul subacvatic, detectarea vizuală a Cu după două picături de 5 μL confirmă că proba de apă este mortală pentru pești și orice altă viețuitoare subacvatică.

Prin urmare, senzorul pe bază de hârtie impregnată cu BSA-AuNCs reprezintă o platformă promițătoare pentru detectarea ușoară, rapidă și ieftină a Cu^{2+} din probele de apă reale.

4.3. Nanoclusteri de aur stabilizați de histidină (His-AuNCs) pentru detecția selectivă și cuantificarea ionilor de fier

4.3.1. Sinteza de His-AuNCs

His-AuNCs au fost sintetizați printr-o metodă asistată de microunde. Într-un vas de microunde G10, s-au adăugat 3 mL de His (0,1 M) peste 1,5 mL de HAuCl_4 (10 mM) și amestecul a fost introdus în reactorul de microunde. Ulterior, a fost iradiat cu microunde la 850 W timp de 30 de minute la 90°C și 1200 rpm. His-AuNCs obținute au fost purificate într-un concentrator centrifugal de 10 kDa de la Satorious pentru a elimina reactivii nereacționați.

4.3.2. Caracterizarea His-AuNCs

În urma sintezei, culoarea soluției coloidale de His-AuNCs a fost verde-pal, iar sub excitație cu lumină UV, aceasta a devenit albastră, dovedind vizual că His-AuNCs au fotoluminescență intrinsecă. În urma unor investigații folosind spectroscopia de fluorescență, soluția coloidală de His-AuNCs prezintă un vârf de excitație situat la 380 nm și o fotoluminescență localizată la 471 nm. În plus, în comparație cu fotoluminescența His-AuNCs preparați folosind o procedură din literatură [35], sinteza propusă în acest capitol a dus la obținerea de His-AuNCs care prezintă o fotoluminescență îmbunătățită de patru ori sub aceeași excitație de 380 nm. De asemenea, fotoluminescența His-AuNCs s-a menținut la peste 91% din intensitatea sa inițială sub timp de 15 minute iradiere continuă la 380 nm, demonstrând fotostabilitatea acestora ridicată.

4.3.3. Performanța His-AuNCs ca senzor coloidal

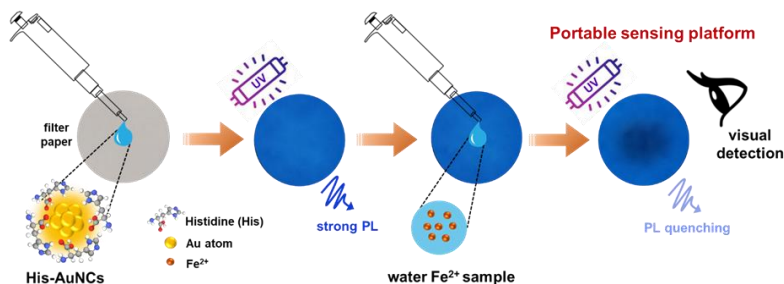
În urma testelor de selectivitate în prezența a diferiți ioni metalici, s-a observat o stingere selectivă a fotoluminescenței His-AuNCs în urma interacțiunii cu ioni de Fe. Mecanismul care explică efectul de stingere a fotoluminescenței ar putea fi legat de agregarea indusă de ionii de Fe

asupra NCs. Agregarea poate avea loc datorită unui fenomen de cross-linking între gruparea carboxil și amino a histidinei alimentată de ionii de Fe. Mai mult, a fost investigată sensibilitatea senzorului coloidal față de detecția ionilor de Fe prin incubarea soluției coloidale de His-AuNCs cu concentrații crescătoare de ioni de Fe de la 0 la 44 mM. În urma proceselor de fitare a efectului de stingere a fotoluminescenței în funcție de concentrația testată s-a obținut o zonă liniară de detecție între 0.022 și 4.4 mM și o limită de detecție de doar 0.2 μM . Având în vedere că concentrația maximă acceptată de ioni de Fe în apă conform Organizației Mondiale a Sănătății este de 35 μM , senzorul coloidal este potrivit pentru a preveni nivelele periculase de ioni de Fe din apa potabilă.

4.3.4. Detectia de ioni de fier folosind platforma pe bază de hârtie impregnată cu His-AuNCs

4.3.4.1. în condiții de laborator

După cum a fost demonstrat mai sus, performanța soluției coloidale de His-AuNCs ca platformă de detecție este remarcabilă. Cu toate acestea, această abordare prezintă unele dezavantaje, cum ar fi accesibilitatea scăzută, portabilitatea scăzută, este consumatoare de timp și este obligatoriu să fie efectuată de personal instruit. Prin urmare, His-AuNCs au fost impregnați pe hârtie de filtru Whatman pentru a dezvolta o platformă de detecție ieftină, rapidă și portabilă pentru identificarea și cuantificarea selectivă a ionilor de Fe din apă, așa cum este prezentat pe scurt în **Schema 4.1**.



Schema 4.1. Reprezentare schematică a fabricării senzorului pe bază de hârtie impregnată cu His-AuNCs și a modului de detecție vizuală a ionilor Fe folosind această platformă. Schema reproduce din [36].

Dupa impreganare hârtiei de filtru cu His-AuNCs, platforma a fost lăsată să se usuce pentru o zi, iar apoi au fost picurate soluții care conțin concentrații crescătoare de ioni de Fe peste zonele active de detecție (**Figura 4.3**)

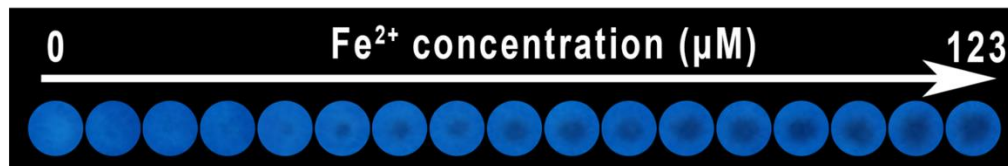


Figura 4.3. *Fotografiile ale platformei de detecție pe bază de hârtie impregnată cu His-AuNCs achiziționate sub lumină UV, la 15 minute după incubarea sensorului cu ioni de Fe (0-123 μM). Figura adaptată din [36].*

Zona de detecție testată cu proba control (conține doar apă ultrapură), nu suferă modificări de intensitate sau culoare (primul punct de detecție în **Figura 4.3**). Cu toate acestea, zonele de detecție care au fost contaminate cu o concentrație crescătoare de ioni de Fe prezintă o schimbare de culoare detectabilă vizual indusă de interacțiunea dintre ionii de Fe și His-AuNCs impregnați. În mod explicit, culoarea din mijlocul zonei de detecție se schimbă de la albastru la gri-negricios, deoarece platforma de detecție interacționează cu concentrații mai mari de ioni de Fe, demonstrând că sensorul pe bază de hârtie impregnată cu His-AuNCs este capabil să detecteze ionii de Fe. Mai mult, pata întunecată crește în diametru pe măsură ce crește concentrația ionilor de Fe, dovedind că sensorul este și sensibil la detecția ionilor de Fe din apă. Prin urmare, intensitatea albastră a zonelor de detecție contaminate cu Fe a fost extrasă folosind ImageJ și a fost reprezentată grafic în comparație cu intensitatea albastră a controlului (I/I_0) față de concentrația de ioni de Fe de la 0 la 123 μM . În urma proceselor de fitare s-a obținut o zonă liniară de detecție între 9 și 97 μM și o limită de detecție de 3.2 μM , demonstrând că sensorul bazat pe hârtie impregnată cu His-AuNCs este relevant pentru detectarea nivelelor periculoase de ioni de Fe.

4.3.4.2. din probe reale

Odată demonstrată capacitatea platformei bazată hârtie impregnată cu His-AuNCs de a detecta selectiv și sensibil ionii de Fe în condiții de laborator, următorul pas a fost evaluarea capacității acestora de a detecta și cuantifica ionii de Fe din probe reale de apă. Pentru aceste

experimente, probele de apă au fost colectate din surse locale cum ar fi apă de izvor, râu și apă de la robinet și au fost testate pe senzorul propus. Pentru apele locale testate, nu au fost descoperite urme de ioni de Fe de către senzorul pe hârtie, prin urmare, probelor s-au adăugat $35 \mu\text{M}$ de ioni de Fe și testele au fost efectuate din nou. După o investigație vizuală, s-a observat o stingere a fotoluminescenței His-AuNCs impregnați, similară cu cea obținută în condiții de laborator cu aceeași concentrație. În plus, intensitatea de albastru a fost extrasă în cazul fiecărei probe și folosind zona liniară de detecție obținută în condiții de laborator a fost calculată concentrația de Fe din proba reală, obținându-se valori între 35.7 și $36.9 \mu\text{M}$, demonstrând astfel acuratețea ridicată a senzorului portabil propus.

4.3.5. Concluzii

În concluzie, a fost dezvoltată o platformă nouă, rapidă și ieftină pe bază de hârtie impregnată cu His-AuNCs pentru detecția selectivă și cuantificarea concentrațiilor periculoase de ioni de Fe din probele reale de apă. His-AuNC-urile au fost sintetizate printr-o nouă metodă asistată de microunde, rezultând AuNCs cu o fotoluminescență intrinsecă albastră situată la 471 nm sub excitație la 380 nm . În plus, a fost dovedită selectivitatea soluției coloidale His-AuNCs față de detectarea ionilor de Fe, în timp ce testele de sensibilitate au expus zonă liniară de detecție de la $0,022$ la $4,4 \text{ mM}$ împreună cu o limită de detecție de $0,2 \mu\text{M}$. Apoi, His-AuNC-urile au fost impregnați pe hârtie de filtru Whatman pentru a fabrica un dispozitiv de detecție accesibil, ușor de utilizat și portabil pentru cuantificarea precisă a ionilor Fe din probe de apă. Senzorul bazat pe hârtie impregnată cu His-AuNCs prezintă o zonă liniară de detecție între 9 și $97 \mu\text{M}$ și o limită de detecție de $3.2 \mu\text{M}$. În final, acuratețea ridicată a senzorului a fost demonstrată în urma testelor pe probe reale. Prin urmare, senzorul pe bază de hârtie impregnată cu His-AuNCs reprezintă un candidat promițător ca dispozitiv de tip lab-on-a-chip pentru detecția rapidă și ieftină a concentrațiilor dăunătoare de ioni de Fe din probe reale de apă.

Partea a II-a. Contribuții la sinteza de noi nanoparticule de metal nobil pentru aplicații ca agenți de contrast SERS, nanoantibiotice și platforme de detecție

Capitolul 5. Nanoparticule bimetalice de tip miez@coajă aur@argint stabilizate de β -ciclodextrină polimerică ca agenți de contrast SERS și nanoantibiotice

5.1. Introducere

Nanoparticulele bimetalice reprezintă o nouă clasă de nanoobiecte care îmbină proprietățile a două metale diferite într-o singură NP. În ultimul deceniu, NPs bimetalice au generat un interes imens datorită capacității lor de a fi utilizate în aplicații multiple, cum ar fi nanomedicină, senzorică, împrăștiere Raman amplificată de suprafață (SERS), imagistică și cataliză [37–40]. Cu toate acestea, proprietățile lor fizico-chimice împreună cu proprietățile lor biologice nu au fost încă pe deplin explorate [41]. Prin combinarea a două metale, este indusă o modificare a densității lor electronice, prin urmare, datorită caracteristicilor lor optice, electronice, termice și catalitice unice, NPs bimetalice au fost raportate a fi superioare NPs monometalice [42]. Mai mult, raportul metalelor, timpul și temperatura sunt parametri care pot influența distribuția internă a NPs bimetalice și pot fi obținute structuri precum aliaje omogene, miez-coajă sau ceva intermediar. Cu toate acestea, momentul reducerii este parametrul cheie în controlul structurii interne a NPs bimetalice, deoarece ambii ioni metalici sunt reduși simultan, se va obține un aliaj, în timp ce dacă aceștia sunt reduși în două etape diferite, se va obține o structură miez-coajă.

5.2. Sinteza de nanoparticule bimetalice de tip miez@coajă aur@argint stabilizate de β -ciclodextrină polimerică (PolyCD-Au@AgNPs)

PolyCD-Au@AgNPs au fost sintetizate folosind o procedură în două etape: (1) sinteza miezului de aur - prin amestecarea a 1,5 ml de HAuCl_4 (10^{-3} M) cu 9 ml de β -ciclodextrină polimerică (PolyCD soluție apoasă - 2 mg/mL) sub agitare magnetică la 70 °C, obținându-se NPs de aur stabilizate de PolyCD (PolyCD-AuNPs); și (2) depunerea coajei de argint – la 5 mL de PolyCD-AuNP s-au adăugat 30 μL de acid ascorbic (0,1 M) și 10 μL de AgNO_3 (0,1 M) sub agitare magnetică timp de 1 oră și adăugarea a fost repetată încă două ori, rezultând o soluție coloidală portocalie care conține PolyCD-Au@AgNPs.

5.3. Caracterizarea PolyCD-Au@AgNPs

NPs de tip miez@coajă Au@Ag stabilizate de PolyCD au fost sintetizate printr-o procedură în două etape. Mai întâi, AuNPs au fost preparate conform procedurii prezentate în secțiunea 5.2, după care culoarea soluției coloidale a devenit violet și o bandă LSPR localizată la 527 nm a fost observată în spectrul UV-Vis care este tipică pentru AuNPs (**Figura 5.1**)

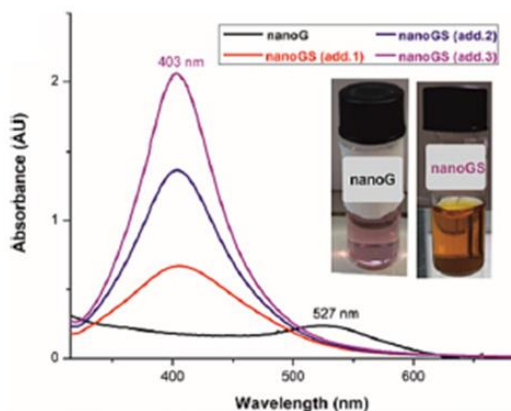


Figura 5.1. Spectrele UV-Vis ale PolyCD-AuNPs (nanoG) și PolyCD-Au-AgNPs (nanoGS) după fiecare adăugare de AgNO_3 (inset - fotografie a soluțiilor coloidale de PolyCD-AuNPs și PolyCD-Au-AgNPs).

Figura adaptată din [43].

În continuare, au fost efectuate trei adăugări succesive de AgNO_3 și culoarea soluției coloidale a devenit portocaliu-maronie, în timp ce spectrul UV-Vis s-a lărgit și a crescut în intensitate. Mai mult decât atât, banda LSPR s-a deplasat la 403 nm, ceea ce a fost observat anterior pentru Au@AgNPs de tip miez@coajă și se datorează noului tip de rezonanță plasmonică care apare pentru electronii care oscilează la interfața dintre nucleul de Au și coaja de Ag [53]. Mai mult, morfologia noilor nanostructuri de Au și Au@Ag a fost evaluată folosind tehnica TEM. PolyCD-AuNPs prezintă o formă sferică cu o dimensiune medie de 8 ± 3 nm, calculată după măsurarea a mai mult de 300 NPs. Mai mult, după adăugarea finală de AgNO_3 , a fost observată în imaginile TEM apariția unei coaje de Ag. În mod specific, miezul Au observat mai întunecat poate fi ușor distins de învelișul Ag mai strălucitor, care s-a format uniform în jurul miezului. Diferența de nuanță a nucleului de Au și a coajei de Ag se datorează diferențelor de densitate electronică dintre cele două elemente. Dimensiunea medie a PolyCD-Au@AgNPs a fost calculată ca fiind de 11 ± 3 nm, demonstrând că grosimea medie a învelișului de Ag este de aproximativ 1,5 nm

5.4. PolyCD-Au@AgNPs ca nanoantibiotic

În urma unor teste inițiale, PolyCD-Au@AgNPs prezintă efecte antimicrobiene față de toate tulpinile de bacterii testate (*S. aureus*, *E. coli*, *P. Aeruginosa*), pe când pentru PolyCD și PolyCD-AuNPs nu au fost observate efecte antimicrobiene. Astfel pentru a îmbunătăți activitatea antimicrobiana a acestora, PolyCD-Au@AgNPs au fost conjugate cu Linezolid (Lz), un antibiotic comercial cunoscut pentru activitatea sa împotriva tulpinilor Gram-pozitive. Noile PolyCD-Au@AgNPs conjugate cu Lz (nanoGS-Lz) au fost preparate prin hidratarea unui film organic de Lz cu o soluție coloidală de PolyCD-Au@AgNPs la un raport molar între ciclodextrină și Lz de 1:1, 1:0,5 și 1:0,25 (nanoGS-Lz1, nanoGS-Lz2, nanoGS-Lz-3). Apoi, profilul activității antimicrobiene a noilor complexi formați a fost evaluat împotriva tulpinilor Gram-negative precum *E. coli* și *P. aeruginosa* împreună cu tulpini Gram-pozitive precum *S. Aureus* și forma sa rezistentă la metilicilină (MRSA).

Antibioticul Lz are o activitate bacteriostatică, așa cum era de așteptat, împotriva tulpinilor Gram-pozitive (*S. aureus* și tulpina MRSA de *S. aureus*) cu o concentrație minimă inhibitorie (CMI) calculată la 0,97 $\mu\text{g/mL}$ și, respectiv, 1,95 $\mu\text{g/mL}$. Noii complexi nanoGS-Lz au prezentat o activitate antibacteriană mai largă în comparație cu PolyCD-Au@AgNPs singure, în timp ce complexii Lz1 și Lz2 s-au dovedit a fi cei mai eficienți. Ultimii menționați au prezentat o activitate antibacteriană excelentă împotriva tuturor tulpinilor Gram-pozitive și Gram-negative testate. În special, toți complexii nanoGS-Lz au fost bactericizi împotriva tulpinilor Gram-negative (*E. coli* și *P. aeruginosa*), în timp ce împotriva tulpinilor Gram-pozitive (*S. Aureus* împreună cu forma MRSA) a fost observată activitate bactericidă numai pentru complexii cu un raport molar Lz/Ag mai mare (nanoGS-Lz1 și nanoGS-Lz2). Eficiența lor împotriva tulpinilor de *S. aureus* și MRSA depinde strict de concentrația de Lz, deoarece nu s-a observat o scădere a CMI odată cu creșterea concentrației de Ag. Mai mult, conjugarea Lz cu PolyCD-Au@AgNPs a dus la o creștere a CMI față de *S. aureus* și tulpinile de MRSA în comparație cu Lz singur datorită eliberării mai lente a Lz care este captată în cavitatea ciclodextrinei. În general, testele antibacteriene au dovedit rolul crucial al ciclodextrinei încărcate pozitiv în activitatea antibacteriană a PolyCD-Au@AgNPs. Mai exact, PolyCD îmbunătățește adsorbția NPs pe peretele bacterian prin atracție electrostatică. În plus, ionii de argint eliberați de PolyCD-Au@AgNPs au produs o funcționare defectuoasă a

peretelui bacteriilor Gram-negative ucidentu-l în cele din urmă, în timp ce conjugarea cu Lz a PolyCD-Au@AgNPs a fost crucială pentru uciderea bacteriilor Gram-pozitive.

5.5. PolyCD-Au@AgNPs ca agenți de contrast SERS

Pentru a înțelege mai bine zona intracelulară de internalizare a NPs, PolyCD-Au@AgNPs au fost funcționalizate cu o moleculă reporter Raman pentru a fi urmărite printr-un microscop Raman confocal. După confirmarea biocompatibilității ridicate a noului agent de contrast format (SERS-nanoTag), următorul pas a fost să investigăm internalizarea acestora în celule, distribuția lor și localizarea noilor SERS-nanoTag în interiorul celulelor vii de cancer ovarian (NIH:OVCAR-3) folosind microscopia Raman confocală sub excitație la 532 nm (**Figura 5.2**).

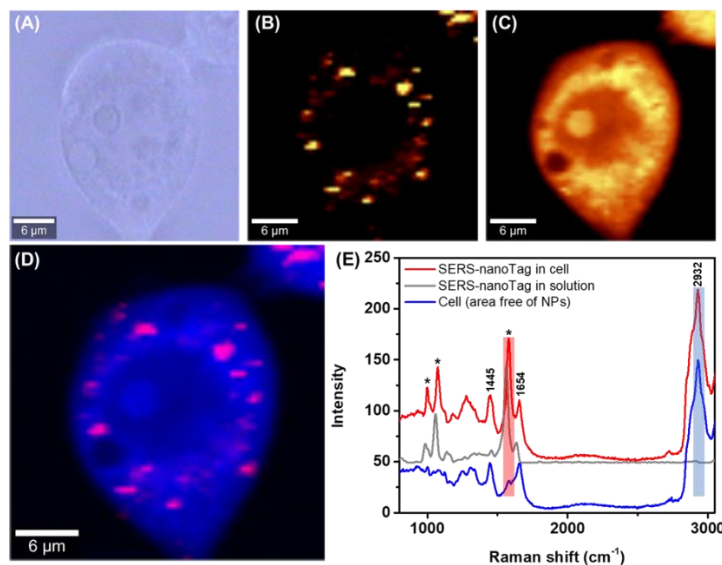


Figura 5.2. (A) Imaginea optică în câmp luminos a celulei de cancer ovarian NIH:OVCAR-3 incubată cu SERS-nanoTag. Hărțile Raman ale aceleiași celule care au fost generate prin mapare grafică a intensității vârfurilor de la (B) 1574 cm^{-1} și (C) 2800-3100 cm^{-1} (D) O imagine suprapusă a hărților Raman din imaginea (B) și (C). (E) Spectrele Raman extrase dintr-o zonă a celulei care conține SERS-nanoTags (linia roșie) și care nu conține SERS-nanoTags (linia albastră) în comparație cu spectrul SERS al SERS-nanoTags în soluție coloidală sub excitație de 532 nm. Figura reprodușă din [43].

Structura celulei a fost reprezentată prin maparea grafică a intensității vârfului de la 2800-3100 cm^{-1} atribuit vibrațiilor de întindere a lipidelor C-H (**Figura 5.2.C**), în timp ce distribuția și

localizarea SERS-nanoTag în aceeași celulă a fost obținută prin maparea intensității vârfului de la 1574 cm^{-1} , cel mai intens vârf al semnalului amprentă al SERS-nanoTags (**Figura 5.2.B**). Prin suprapunerea celor două hărți Raman generate (**Figura 5.2.D**), a fost observată o internalizare intracelulară ridicată a SERS-nanoTags (zonă roșie) în interiorul celulei scanate (zona albastră). PolyCD-Au@AgNPs sunt bine distribuite în interiorul citoplasmei celulei, mai ales în jurul nucleului, dar nu penetrează membrana acestuia. În plus, spectrul SERS extras din zona celulei cu SERS-nanoTags (zona roșie) ilustrează atât semnalul Raman tipic al celulei, cât și amprenta SERS a MPBA (**Figura 5.2.E**). Rezultatele menționate mai sus demonstrează că PolyCD-Au@AgNPs funcționalizate cu MPBA sunt candidați promițători ca agenți de contrast SERS pentru aplicații de imagistică intracelulară.

5.6. Concluzii

În acest capitol, au fost sintetizate NPs de tip miez@coajă Au@Ag stabilizate cu PolyCD folosind o abordare în două etape prin exploatarea caracteristicilor unice ale polimerului cationic de ciclodextrină. Analiza spectroscopică și morfologică a confirmat sinteza reușită a unei structuri miez@coajă, oferind în același timp informații esențiale privind răspunsul plasmonic, dimensiunea și stabilitatea coloidală. În mod specific, măsurătorile de spectroscopie UV-Vis efectuate pe PolyCD-AuNPs prezintă o bandă LSPR situată la 527 nm , în timp ce după adăugarea de AgNO_3 , a fost observată o bandă LSPR localizată la 408 nm , indicând formarea de PolyCD-Au@AgNPs. Structura sferică miez@coajă a NPs sintetizate a fost confirmată utilizând măsurători TEM, în timp ce histograma de dimensiune a evidențiat un nucleu de Au de 8 nm și o coajă de Ag de $1,5\text{ nm}$. În plus, un nou nanoantibiotic a fost realizat prin complexarea Lz cu PolyCD-Au@AgNPs care prezintă o activitate antibacteriană excelentă împotriva tuturor tulpinilor Gram-pozitive și Gram-negative testate, inclusiv MRSA. Noul complex nanoantibiotic pe bază de Lz a îmbunătățit activitatea antimicrobiană a fiecărui component în parte aplicat singur. Mai mult, PolyCD-Au@AgNPs prezintă o biocompatibilitate excelentă împotriva celulelor NIH:OVCAR-3 de cancer ovarian, prin urmare, au fost funcționalizate cu o moleculă reporter Raman, MPBA și capacitatea noilor SERS-nanoTags de a funcționa ca agenți de contrast a fost dovedită prin testele de imagistică celulară folosind microscopia Raman confocală.

Capitolul 6. Nanoparticule de aur funcționalizate cu aptamer pentru detecția colorimetrică a proteinei C reactive

6.1. Introducere

Deoarece morbiditatea și mortalitatea cauzată de o infecție a unui organ au crescut în ultimele decenii, diagnosticul precoce este crucial pentru a preveni inflamația sau pentru a gestiona bolile cauzate de infecțiile inflamatorii. În ultimul timp, prognosticul, diagnosticul și chiar tratamentul infecțiilor inflamatorii sau a inflamației sunt corelate cu biomarkerii din probe biologice care sunt măsurabile. Proteina C-reactivă umană (CRP) este considerată un marker clinic timpuriu care indică prezența unor afecțiuni inflamatorii sau infecțioase corelate cu diferite tipuri de boli sau stări patologice, cum ar fi infecții virale și bacteriene, sepsis, boli cardiovasculare etc. [44]. Prin urmare, serul din sânge uman care conține concentrații de CRP mai mici de 10 $\mu\text{g/mL}$ indică lipsa de inflamație, dacă omul are o infecție virală, nivelul de CRP crește între 10 și 40 $\mu\text{g/mL}$, pentru o infecție bacteriană nivelul de CRP se situează între 40 și 200 $\mu\text{g/mL}$, în timp ce în cazul nefericit al sepsisului CRP crește peste 200 $\mu\text{g/mL}$ [45]. În plus, oamenii care prezintă un nivel cronic scăzut de CRP (sub 5 $\mu\text{g/mL}$) prezintă riscuri mari de a dezvolta boli coronariene, infarct miocardic acut și chiar accident vascular cerebral ischemic, prin urmare, analiza CRP joacă un rol crucial în prevenirea acestor boli. Cu toate acestea, metodele actuale pentru detectarea precisă a CRP, cum ar fi ELISA, testul chemiluminiscent sau testul imunoturbidimetric, sunt complexe, consumatoare de timp, extrem de costisitoare, necesită personal cu înaltă pregătire, ceea ce le face inadecvate pentru diagnosticul clinic la punctul de îngrijire. Prin urmare, există o mare necesitate de a dezvolta metode mai noi, mai rapide și mai ieftine pentru a detecta proteina CRP din serul uman.

6.2. Sinteza de Cit-AuNPs

Nanoparticulele de aur au fost sintetizate folosind abordarea Turkevich-Frens bazată pe reducerea ionilor de Au de către citratul de sodiu. Pe scurt, 100 mL de HAuCl_4 (10^{-3} M) s-au adus la punctul de fierbere sub agitare magnetică, moment în care s-au adăugat 12 mL de citrat de sodiu ($38,8 \times 10^{-3}$ M) și s-au lăsat 15 minute să se agite cu căldură pornită și 15 minute cu căldura oprită.

6.3. Caracterizarea Cit-AuNPs

AuNPs stabilizate cu citrat au fost sintetizate folosind procedura Turkevich-Frens. Cit-AuNPs prezintă o bandă LSPR îngustă situată la 520 nm, un răspuns optic tipic al AuNPs sferice. Ulterior, proprietățile morfologice ale Cit-AuNPs au fost investigate folosind microscopia TEM, iar imaginea reprezentativă dezvăluie NPs cu o formă sferică și o dimensiune medie de 15 ± 1 nm, demonstrând că Cit-AuNP-urile sunt foarte monodisperse.

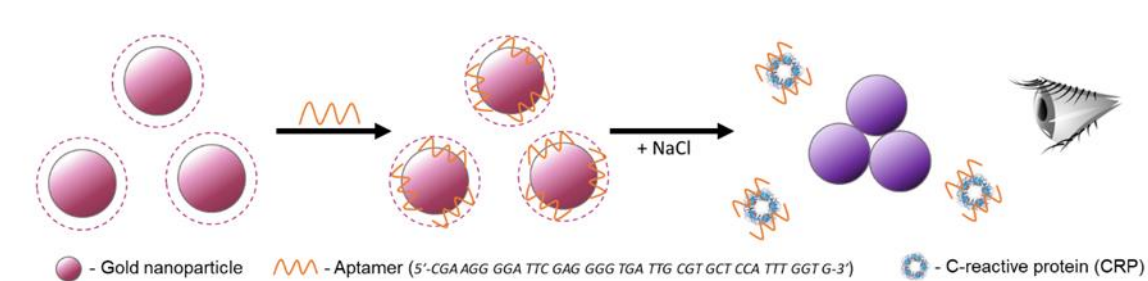
6.4. Funcționalizarea Cit-AuNPs cu un aptamer specific proteinei CRP

Aptamerul cu o afinitate mare față de CRP este de fapt o oligonucleotidă cu următoarea secvență 5'-CGA AGG GGA TTC GAG GGG TGA TTG CGT GCT CCA TTT GGT G-3'. În absența proteinei țintă, aptamerul, o secvență de ADN monocatenar, interacționează cu citratul de pe suprafața AuNPs. Astfel, pentru a obține o platformă de detecție cu afinitate mare față de CRP, Cit-AuNPs au fost incubate cu aptamer la 20 °C într-un vortex orbital. După 10 minute de incubare cu aptamer, nu s-a observat nicio modificare a răspunsului LSPR al Cit-AuNPs, demonstrând că stabilitatea lor a fost păstrată după interacțiunea cu aptamerul. Mai mult, banda de absorbție specifică aptamerului localizată la 260 nm a fost observată în spectrul UV-Vis după incubare. În plus, pentru a valida funcționalizarea Cit-AuNPs cu aptamerul specific CRP, a fost efectuat un test de stabilitate în prezența PBS și NaCl a soluției coloidale. În cazul Cit-AuNPs care nu au fost incubate cu aptamer, s-a observat o agregare semnificativă în spectrul UV-Vis prin absorbția în creștere a soluției coloidale în intervalul de lungimi de undă 600-900 nm. Cu toate acestea, apta-Cit-AuNPs nu prezintă modificări semnificative în răspunsul lor LSPR în prezența PBS și NaCl, demonstrând stabilitatea lor ridicată și, prin urmare, funcționalizarea cu succes a Cit-AuNPs cu un aptamer care prezintă o afinitate mare față de proteina CRP.

6.5. Detecția colorimetrică a proteinei CRP

Atunci când proteina CRP este adăugată în soluția coloidală a Cit-AuNPs în prezența unei soluții saline, aptamerul se desprinde de pe suprafața NPs și interacționează preferențial cu

proteina CRP, lăsând NPs expuse la sare, ducând la agregarea NPs și modificarea culorii soluției coloidale (Schema 6.1).



Schema 6.1. *Reprezentarea schematică a mecanismului colorimetric de detectare a CRP folosind apta-Cit-AuNPs.*

Urmând strategia menționată mai sus, soluției coloidale de apta-Cit-AuNP s-a adăugat diferite concentrații de CRP cuprinse între 1 și 100 $\mu\text{g/mL}$ în prezența unei concentrații mari de NaCl. În primul rând, pe măsură ce concentrația incubată de CRP a crescut, a fost observată o schimbare treptată a culorii soluției coloidale de la roșu vișiniu la violet deschis (**Figura 6.1.A**), demonstrând capacitatea apta-Cit-AuNPs de a funcționa ca senzor colorimetric pentru detectarea proteinei CRP.

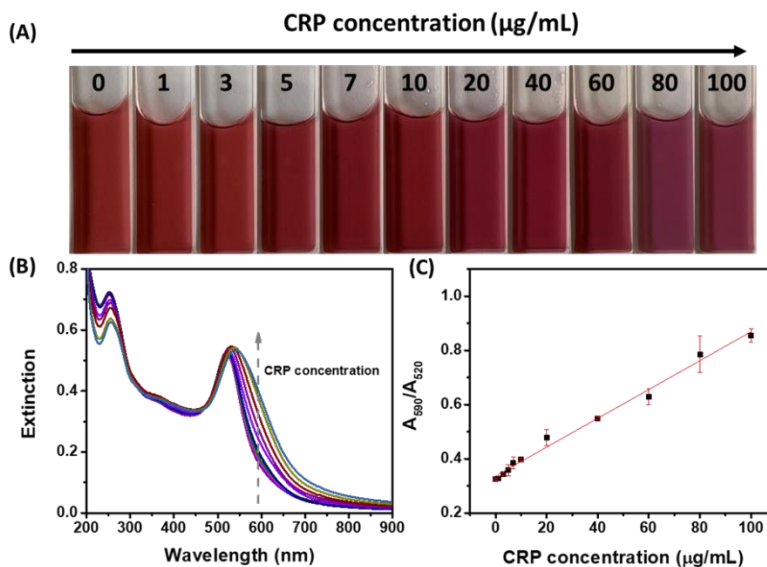


Figura 6.1. (A) Imagini fotografice și (B) spectrele de extincție corespunzătoare ale soluțiilor coloidale de apta-Cit-AuNPs incubate cu concentrații diferite de CRP. (C) Raportul de absorbție dintre banda LSPR la 590 nm (NPs agregate) și 520 nm (NPs individuale) în funcție de concentrația CRP

În continuare, soluțiile coloidale de apta-Cit-AuNPs incubate cu CRP au fost analizate folosind spectroscopia UV-Vis (**Figura 6.1.B**), observându-se o agregare treptată a Cit-AuNPs odata cu creșterea concentrației de CRP incubate. Mai mult, raportul de absorbție dintre banda LSPR situată la 590 nm (atribuită NPs agregate) și cea localizată la 520 nm (specifică NPs individuale) a fost reprezentată în funcție de concentrația corespunzătoare de CRP, dezvăluind o zonă liniară de detecție între 1 și 100 $\mu\text{g/mL}$ și o limită de detecție de 2.64 $\mu\text{g/mL}$. Procedura bazată pe agregarea apta-Cit-AuNPs este capabilă să detecteze atât concentrații mici, cât și mari de CRP, integrând atât analiza CRP standard, cât și analiza CRP de înaltă sensibilitate într-o singură procedură de detecție.

În final teste de selectivitate au fost realizate în prezența a diferite substanțe care se află în mod normal în serul uman precum albumină serică umană, acid ascorbic, urea, mioglobină, glutamină și CRP, precum și substanțe care simulează serul uman ca și fluid biologic simulat. Agregarea indusă de NaCl a fost observată doar în cazul interacțiunii cu CRP demonstrând astfel selectivitatea ridicată a senzorului față de proteina CRP.

6.6. Concluzii

În acest capitol, a fost dezvoltată o procedură de detecție colorimetrică simplă, rapidă și ieftină pentru cuantificarea selectivă a proteinei CRP, bazată pe efectele de agregare induse de sare a Cit-AuNPs funcționalizate cu aptamer. Cit-AuNPs sintetizate folosind metoda Turkevitch-Frency au fost funcționalizate cu un aptamer specific proteinei CRP pentru detectarea rapidă (10 min) și selectivă a CRP pe o gamă largă de concentrații folosind echipamente relativ ieftine (spectrometru UV-Vis). Cuantificarea CRP a fost obținută prin reprezentarea și fitarea raportului de intensitate între benzile LSPR a NPs agregate (590 nm) și cele individuale (520 nm) față de concentrațiile corespunzătoare de CRP. Pe lângă timpii mai rapizi de analiză și prețul scăzut, prin această abordare am reușit să detectez atât concentrații mici, cât și mari de CRP, integrând atât analiza CRP standard, cât și analiza CRP de înaltă sensibilitate într-o singură procedură de detecție.

Capitolul 7. Concluzii finale și perspective

Scopul acestei teze a fost de a investiga fezabilitatea NCs și NPs din metal nobil de a fi integrate cu succes în dezvoltarea agenților de contrast, a platformelor de detecție și implementarea acestora în diverse aplicații medicale și de mediu.

Concluzii finale

Concluziile finale a tezei mele de doctorat sunt următoarele:

1) AuNCs stabilizați de o coroană de albumină serică bovină cu o dimensiune medie de 3 nm și o fotoluminescență intrinsecă în roșu au fost sintetizate folosind o procedură adaptată. Ulterior, funcționalizarea lor cu acid folic le-a crescut biocompatibilitatea dându-le în același timp capacitatea de a ținti celulele cu receptorul FR α supraexprimat. În cele din urmă, capacitatea BSA-AuNCs de a funcționa ca agenți de contrast fluorescenți în interiorul materialelor care imită țesutul, a fost demonstrată prin microscopia FLIM sub excitație cu doi fotoni în NIR.

2) AuNCs stabilizați cu glutation au fost sintetizați cu succes folosind o nouă procedură asistată de microunde. Spectroscopia de fluorescență a dezvăluit o emisie dublă: o fotoluminescență în roșu la 610 nm și una în NIR la 800 nm sub excitație de 405 nm. Mai mult, am dovedit că GSH-AuNC prezintă o emisie fotostabilă și intensă sub excitație cu 640 nm care se află în prima fereastră biologică, făcându-le potrivite pentru aplicații de imagistică. În cele din urmă, testele FLIM efectuate pe GSH-AuNCs încorporate în materiale care imită țesutul, au dovedit că GSH-AuNCs sunt candidați promițători ca agenți de contrast care emit în NIR pentru viitoare aplicații de imagistică *ex vivo* și *in vivo*.

3) AuNCs încorporați pe hârtie de filtru Whatman am dovedit că sunt o platformă excelentă pentru detectarea ieftină, rapidă și selectivă a ionilor de metale grele, cum ar fi ionii de Cu și Fe din probele reale de apă. În primul rând, am dovedit că fotoluminescența BSA-AuNCs suferă o stingere selectivă în prezența ionilor de Cu. Ulterior, senzorul coloidal transferat pe hârtie de filtru Whatman a fost expus la diferite concentrații de ioni de Cu, dezvăluind capacitatea noii platforme de a funcționa ca senzor pentru detectarea ionilor de Cu. În al doilea rând, AuNCs stabilizați cu histidină au fost impregnați pe hârtie de filtru și expuși la diferiți ioni de metale grele, au dezvăluit o stingere selectivă a fotoluminescenței His-AuNCs în prezența ionilor de Fe. Mai

mult, prin analiza folosind ImageJ a imaginilor fotografice ale senzorului expus la diferite concentrații de ioni de Fe, am realizat o cuantificare precisă.

4) Au@AgNPs stabilizate de ciclodextrină polimerică am dovedit ca pot fi nanoantibiotice eficiente și agenți de contrast SERS fiabili. NPs au fost sintetizate cu succes printr-o procedură în două etape, obținând un nucleu de Au de 8 nm înconjurat de un înveliș de Ag de 1,5 nm. Stabilizarea lor cu PolyCD i-a împuternicit cu capacitatea de a încapsula, în cavitatea lor de ciclodextrină, medicamente sau antibiotice precum Linezolid. Complexarea cu LZ a PolyCD-Au@AgNPs a dus la extinderea activității lor antimicrobiene împotriva atât tulpinilor Gram- pozitive, cât și Gram-negative. Mai mult, prin funcționalizarea cu acid 4-mercaptobenilboronic, PolyCD-Au@AgNPs au putut fi urmărite în interiorul celulelor vii de cancer ovarian prin microscopie Raman confocală.

5) Detectarea colorimetrică a proteinei C reactive, un marker cardiovascular și de inflamație, a fost realizată folosind AuNPs stabilizate cu citrat și funcționalizate cu un aptamer specific CRP. În primul rând, Cit-AuNPs au fost funcționalizate cu aptamer care le-a oferit o stabilitate ridicată împotriva concentrațiilor mari de NaCl. Cu toate acestea, după adăugarea de CRP, aptamerul a interacționat preferențial cu proteina CRP, detașându-se de NPs. NPs fără aptamer expuse la sare au agregat, ceea ce a dus la o schimbare a culorii soluției lor coloidale. Expunerea apta-Cit-AuNPs la o concentrație mai mare de CRP a dus la un nivel mai ridicat de aglomerare. Prin urmare, analizând nivelul de agregare al soluției coloidale prin spectroscopie UV-Vis, am evidențiat intervalul liniar de detecție liniară între 1 și 100 $\mu\text{g/mL}$.

Perspective

Având în vedere munca depusă în această teză, în viitorul apropiat aș dori să:

o investighez potențialul BSA-AuNCs și GSH-AuNCs ca agenți de contrast fotoluminiscenti pentru aplicații de imagistică *in vivo*;

o dezvolt un senzor rapid, ieftin și precis pe bază de hârtie impregnată cu NCs pentru cuantificarea selectivă a pesticidelor din fructe și legume;

o investighez potențialului NCs ca agenți antimicrobieni;

o studiez interacțiunii dintre NCs și NPs pentru o emisie de fluorescență amplificată de metal;

o testez acuratețea detecție de CRP a senzorului apta-Cit-AuNPs din probe umane;

Diseminări rezultate

Lista de publicații încadrate în teză

Lista de publicații ISI

- 1) Folic acid functionalized gold nanoclusters for enabling targeted fluorescence imaging of human ovarian cancer cells, **A.-M. Hada**, A.-M. Craciun, M. Focsan, R. Borlan, O. Soritau, S. Astilean, **Talanta** 225 (2021) 121960-121968 (IF 6.556, AIS 0.765), 35 Citări (Google Scholar);
- 2) Intrinsic photoluminescence of solid-state gold nanoclusters: towards fluorescence lifetime imaging of tissue-like phantoms under two-photon near-infrared excitation, **A.-M. Hada**, A.-M. Craciun, A. Simion, **Frontiers in Chemistry** 9 (2021) 761711 (IF 5.545, AIS 0.937), 4 Citări (Google Scholar);
- 3) Gold nanoclusters performing as contrast agents for non-invasive imaging of tissue-like phantoms via two-photon excited fluorescence lifetime imaging, **A.-M. Hada**, A.-M. Craciun, A. Simion, **Analyst** 146 (2021) 7126-7130 (IF 5.227, AIS 0.778), 3 Citări (Google Scholar);
- 4) Glutathione-capped gold nanoclusters as near-infrared-emitting efficient contrast agents for confocal fluorescence imaging of tissue-mimicking phantoms, **A.-M. Hada**, A.-M. Craciun, M. Focsan, A. Vulpoi, E.-L. Borcan, S. Astilean, **Microchimica Acta** 189 (2022) 337 (IF 5.7, AIS 0.739), 2 Citări (Google Scholar);
- 5) Novel paper-based sensing platform using photoluminescent gold nanoclusters for easy, sensitive and selective naked-eye detection of Cu^{2+} , **A.-M. Hada**, M. Zetes, M. Focsan, T. Nagy-Simon, A. M. Craciun, **Journal of Molecular Structure**, 1244 (2021) 130990 (IF 3.841, AIS 0.315), 11 Citări (Google Scholar);
- 6) Photoluminescent Histidine-Stabilized Gold Nanoclusters as Efficient Sensors for Fast and Easy Visual Detection of Fe Ions in Water Using Paper-Based Portable Platform, **A.-M.**

Hada, M. Zetes, M. Focsan, S. Astilean, A.-M. Craciun, **International Journal Molecular Sciences** 23 (2022) 12410 (IF 5.6, AIS 1.028), 1 Citare (Google Scholar);

- 7) Recent advances on the development of plasmon-assisted biosensors for detection of C-reactive protein, T. Nagy-Simon, **A.-M. Hada**, S. Suarasan, M. Potara, **Journal of Molecular Structure** 1246 (2021) 131178 (IF 3.841, AIS 0.315), 7 Citări (Google Scholar);
- 8) Linezolid nanoAntibiotics and SERS-nanoTags based on polymeric cyclodextrin bimetallic core-shell nanoarchitectures, **A.-M. Hada**, M. Potara, S. Astilean, A. Cordaro, G. Neri, M. Malanga, A. Nostro, A. Mazzaglia, A. Scala, A. Piperno, **Carbohydrate Polymers** 293 (2022) 119736 (IF 11.2, AIS 1.238), 8 Citări (Google Scholar);

Manuscrite în preparare

- 1) Aptamer-functionalized gold nanoparticles for the highly-sensitive dual-detection of C-reactive protein, **A.-M. Hada**, S. Suarasan, M. Potara, S. Astilean;

Alte publicații

- 1) Fabrication of gold-silver core-shell nanoparticles for performing as ultrabright SERS-nanotags inside human ovarian cancer cells, **A.-M. Hada**, M. Potara, S. Suarasan, A. Vulpoi, T. Nagy-Simon, E. Licarete, S. Astilean, **Nanotechnology** 30 (2019) 315701-315711 (IF 3.5, AIS), 25 Citări (Google Scholar);
- 2) Marine bacterial exopolymers-mediated green synthesis of noble metal nanoparticles with antimicrobial properties, A. Scala, A. Piperno, **A.-M. Hada**, S. Astilean, A. Vulpoi, G. Ginestra, A. Marino, A. Nostro, V. Zammuto, C. Gugliandolo, **Polymers** 11 (2019) 1157-1167 (IF 3.4), 31 Citări (Google Scholar);

- 3) Dopamine Photochemical Behaviour under UV Irradiation, A. Falamas, A. Petran, **A.-M. Hada**, A. Bende, **International Journal Molecular Sciences** 23 (2022) 5483 (IF 5.6, AIS 1.028), 4 Citări (Google Scholar)
- 4) Probing polyvinylpyrrolidone-passivated graphene oxide nanoflakes as contrast agents inside tissue-like phantoms via multimodal confocal microscopy, M. Potara, S. Suarasan, A.-M. Craciun, M. Focsan, **A.-M. Hada**, S. Astilean, **Talanta** 247 (2022) 123581 (IF 6.1, AIS 0.793);
- 5) Supramolecular assembly of pentamidine and polymeric cyclodextrin bimetallic core-shell nanoarchitectures, **A.-M. Hada**, N. Burduja, M. Abbate, C. Stagno, G. Caljon, L. Maes, N. Micale, M. Cordaro, A. Scala, A. Mazzaglia, A. Piperno, **Beilstein Journal of Nanotechnology** 13 (2022) 1361 (IF 3.1, AIS 0.475);
- 6) Controlling the optical and morphological stability of 4-mercaptopbenzoic acid-modified triangular silver nanoplates in saline environments, S. Suarasan, **A.-M. Hada**, M. Muntean, A. Vulpoi, M. Potara, S. Astilean, **Applied Surface Science** 638 (2023) 158126 (IF 6.7, AIS 0.865); (prim-autor cu contribuții egale)
- 7) Albumin nanoparticles with tunable ultraviolet-to-red autofluorescence for label-free cell imaging and selective biosensing of copper ion, R. Borlan, O. Soritau, D. Maniu, **A.-M. Hada**, A. Florea, S. Astilean, M. Focsan, **International Journal of Biological Macromolecules** 242 (2023) 125129 (IF 8.2, AIS 0.918);

Participări conferințe

Prezentări orale

- 1) Investigation of protein-stabilized gold nanoclusters with applicability in cellular imaging, **A.-M. Hada**, A.-M. Craciun, M. Focsan, O. Soritau, S. Astilean, **National Conference of Physics' PhD students 2020**, Iasi, Romania;
- 2) Novel paper-based sensing platform using photoluminescent gold nanoclusters for easy, sensitive and selective naked-eye detection of Cu^{2+} , **A.-M. Hada**, M. Zetes, M. Focsan, T. Nagy-Simon, A. M. Craciun, **Nanotexnology 2021**, Thessaloniki, Grecia;

Prezentări poster

- 1) Novel paper-based sensing platform using photoluminescent gold nanoclusters for easy, sensitive and selective naked-eye detection of Cu^{2+} , **A.-M. Hada**, M. Zetes, M. Focsan, T. Nagy-Simon, A. M. Craciun, **International Summer School on Nanosciences & Nanotechnologies, Organic Electronics & Nanomedicine 2021**, Thessaloniki, Grecia;
- 2) Colorimetric detection of C-reactive protein using aptamer-modified gold-silver core-shell nanoparticles, A.-M. Hada, T. Nagy-Simon, S. Suarasan, S. Astilean, M. Potara, **The 15th International Conference on Physics of Advanced Materials (ICPAM-15) 2021**, Sant Feliu de Guixols, Spania;
- 3) Intrinsic photoluminescent protein-stabilized gold nanoclusters: towards fluorescence imaging applications, A.-M. Hada, A.-M. Craciun, M. Focsan, O. Soritau, S. Astilean, **The 15th International Conference on Physics of Advanced Materials (ICPAM-15)**, Sant Feliu de Guixols, Spania;
- 4) Highly-sensitive C-reactive protein detection based on the selective aggregation of aptamer-conjugated silver nanoparticles, **A.-M. Hada**, S. Suarasan, T. Nagy-Simon, A. Vulpoi, S. Astilean, M. Potara, **The 7th Nanoinnovation 2022**, Rome, Italia;

- 5) Cationic Cyclodextrin Polymer vs Chitosan for SERS-nanoTags fabrication, **A.-M. Hada**, M. Potara, S. Astilean, A. Cordaro, G. Neri, M. Malanga, A. Mazzaglia, A. Scala, A. Piperno, **20th International Cyclodextrin Symposium (20th ICS) 2022**, Giardini Naxos, Italia;
- 6) Aptamer-functionalized gold nanoparticles for the highly-sensitive dual-detection of C-reactive protein, **A.-M. Hada**, S. Suarasan, V. Moldovan, S. Astilean, M. Potara, **Molecular Plasmonics 2023**, Jena, Germania;

Contribuții la conferințe

- 1) Aptamer-modified citrate-capped gold nanoparticles for sensitive visual detection of C-reactive Protein, V.-A. Moldovan, A.-M. Hada, S. Suarasan, T. Nagy-Simon, A. Vulpoi, S. Astilean, M. Potara, **The 6th International Conference of Analytical and Nanoanalytical Methods for Biomedical and Environmental Sciences (IC-ANMBES 2022)**, Brasov, Romania – prezentare poster;
- 2) Synthesis and characterization of novel histidine-stabilized gold nanoclusters for the sensitive and selective detection of Fe from water samples, M. Zetes, **A.-M. Hada**, M. Focsan, S. Astilean, A.-M. Craciun, **The 6th International Conference on Analytical and Nanoanalytical Methods for Biomedical and Environmental Sciences (IC-ANMBES 2022)**, Brasov, Romania – prezentare poster (Premiu pentru cel mai bun poster);
- 3) Colorimetric and thermoplasmonic dual-mode detection of C-reactive protein based on aptamer conjugated gold nanoparticles, S. Suarasan, **A.-M. Hada**, V.-A. Moldovan, S. Astilean, M. Potara, **The 6th International Conference on Materials: Advanced and Emerging Materials (ICM 2022)**, Barcelona, Spain – prezentare poster;
- 4) Portable paper sensing platform using novel histidine-stabilized gold nanoclusters for fast naked-eye detection of Fe ions from water, M. Zetes, A.-M. Hada, M. Focsan, S. Astilean, A.-M. Craciun, **The 9th IUPAC International Conference on Green Chemistry 2022**, Athene, Greece – prezentare poster;

Premii

PREMIUL CYCLONET ACRI Young Investigator Training Program 2019 – Associazione Casse di Risparmio Italiane - premiu 3000 € pentru a face cercetare cel puțin o lună într-un laborator italian. Am ales să-mi fac mobilitatea în echipa de cercetare a Prof. Anna Piperno de la Departamentul CHIBIOFARAM, Universitatea din Messina, cu care am avut și am în continuare o colaborare multidisciplinară care a dus la două publicații și o prezentare poster și probabil multe altele pe viitor.

Activitate didactică

Am predat laboratoarele și seminariile pentru cursul „Metode spectroscopice de analiză” la Facultatea de Biologie și Geologie din Universitatea Babeș-Bolyai timp de un semestru.

Cursuri de specializare

Am participat la cel de-al 18-lea curs internațional de principii și aplicații ale spectroscopiei de fluorescență rezolvată temporal 2021

Finanțare și granturi

Pe parcursul doctoratului am fost membru în 3 Proiect Naționale de Cercetare și aș dori să mulțumesc UEFISCDI pentru sprijinul financiar și directorilor de proiectelor de cercetare pentru că mi-au oferit oportunitatea de a lucra în proiectele lor în care am avut următoarele funcții:

1) Asistent de cercetare în cadrul Proiectului Național de Cercetare din România denumit „New targeted optical imaging nanoprobe for near-infrared (NIR) real-time (RT) image-guided surgery of ovarian cancer”, cod proiect: PN-III-P4-IDPCCF- 2016-0142;

2) Asistent de cercetare în cadrul Proiectului național de cercetare denumit „Direct, sensitive and selective fluorescence “turn-off” detection of metallic contaminants from water using photoluminescent gold nanoclusters”, cod proiect: PN-III-P1-1.1-TE-2019- 0700;

3) Asistent de cercetare în Proiectul Național de Cercetare din România denumit „Designing new plasmonic aptasensors for detection and monitoring of infections” cod proiect: PN-III-P4-ID-PCE-2020-1592;

Am câștigat și o bursă națională în ultimul an de doctorat, bursa POCU 153310 - „Dezvoltarea competențelor de cercetare avansată și aplicată în logica STEAM + Health” și aș dori să mulțumesc Universității Babeș-Bolyai pentru că mi-a încredințat oportunitatea și pentru sprijinul financiar.

Referințe

- [1] L. Liu, A. Corma, Metal Catalysts for Heterogeneous Catalysis: From Single Atoms to Nanoclusters and Nanoparticles, *Chem. Rev.* 118 (2018) 4981–5079. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00776>.
- [2] M.A. Garcia, Surface plasmons in metallic nanoparticles: fundamentals and applications, *J. Phys. D: Appl. Phys.* 44 (2011) 283001. <https://doi.org/10.1088/0022-3727/44/28/283001>.
- [3] J. Xie, Y. Zheng, J.Y. Ying, Protein-Directed Synthesis of Highly Fluorescent Gold Nanoclusters, *J. Am. Chem. Soc.* 131 (2009) 888–889. <https://doi.org/10.1021/ja806804u>.
- [4] D.-Y. Fu, Y.-R. Xue, Y. Guo, Z. Qu, H.-W. Li, H. Wu, Y. Wu, Strong red-emitting gold nanoclusters protected by glutathione *S*-transferase, *Nanoscale*. 10 (2018) 23141–23148. <https://doi.org/10.1039/C8NR05691A>.
- [5] H. Pezhhan, M. Akhond, M. Shamsipur, Histidine capped-gold nanoclusters mediated fluorescence detection of glucose and hydrogen peroxide based on glucose oxidase-mimicking property of gold nanoparticles via an inner filter effect mechanism, *Journal of Luminescence*. 228 (2020) 117604. <https://doi.org/10.1016/j.jlumin.2020.117604>.
- [6] R.J. Giguere, T.L. Bray, S.M. Duncan, G. Majetich, Application of commercial microwave ovens to organic synthesis., *Tetrahedron Letters*. 27 (1986) 4945–4948. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)85103-5](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)85103-5).
- [7] A.P. Alivisatos, Semiconductor Clusters, Nanocrystals, and Quantum Dots, *Science*. 271 (1996) 933–937. <https://doi.org/10.1126/science.271.5251.933>.

- [8] S. Zhu, X. Wang, Y. Cong, L. Li, Regulating the Optical Properties of Gold Nanoclusters for Biological Applications, *ACS Omega*. 5 (2020) 22702–22707. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c03218>.
- [9] H. Fakhouri, M.P. Bakulić, I. Zhang, H. Yuan, D. Bain, F. Rondepierre, P.-F. Brevet, Ž.S. Maršić, R. Antoine, V. Bonačić-Koutecký, D. Maysinger, Ligand impact on reactive oxygen species generation of Au₁₀ and Au₂₅ nanoclusters upon one- and two-photon excitation, *Commun Chem*. 6 (2023) 97. <https://doi.org/10.1038/s42004-023-00895-5>.
- [10] S. Zhou, S. Zhang, H. Li, D. Sun, J. Zhang, X. Xin, Solvent-Induced Self-Assembly of Copper Nanoclusters for White Light Emitting Diodes, *ACS Appl. Nano Mater*. 4 (2021) 10911–10920. <https://doi.org/10.1021/acsanm.1c02374>.
- [11] Y. Du, H. Sheng, D. Astruc, M. Zhu, Atomically Precise Noble Metal Nanoclusters as Efficient Catalysts: A Bridge between Structure and Properties, *Chem. Rev*. 120 (2020) 526–622. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00726>.
- [12] S. Anu Mary Ealia, M.P. Saravanakumar, A review on the classification, characterisation, synthesis of nanoparticles and their application, *IOP Conf. Ser.: Mater. Sci. Eng*. 263 (2017) 032019. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/263/3/032019>.
- [13] K.S. Siddiqi, A. Husen, R.A.K. Rao, A review on biosynthesis of silver nanoparticles and their biocidal properties, *J Nanobiotechnol*. 16 (2018) 14. <https://doi.org/10.1186/s12951-018-0334-5>.
- [14] Y. Tang, X. Zeng, J. Liang, Surface Plasmon Resonance: An Introduction to a Surface Spectroscopy Technique, *J. Chem. Educ*. 87 (2010) 742–746. <https://doi.org/10.1021/ed100186y>.
- [15] K.A. Willets, R.P. Van Duyne, Localized Surface Plasmon Resonance Spectroscopy and Sensing, *Annu. Rev. Phys. Chem*. 58 (2007) 267–297. <https://doi.org/10.1146/annurev.physchem.58.032806.104607>.
- [16] Y. Liu, E. Naumenko, F. Akhatova, Q. Zou, R. Fakhruddin, X. Yan, Self-assembled peptide nanoparticles for enhanced dark-field hyperspectral imaging at the cellular and invertebrate level, *Chemical Engineering Journal*. 424 (2021) 130348. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2021.130348>.
- [17] A.-M. Hada, M. Potara, S. Suarasan, A. Vulpoi, T. Nagy-Simon, E. Licarete, S. Astilean, Fabrication of gold–silver core–shell nanoparticles for performing as ultrabright SERS-

- nanotags inside human ovarian cancer cells, *Nanotechnology*. 30 (2019) 315701. <https://doi.org/10.1088/1361-6528/ab1857>.
- [18] X. He, K. Wang, Z. Cheng, *In vivo* near-infrared fluorescence imaging of cancer with nanoparticle-based probes: *In vivo* near-infrared fluorescence imaging, *WIREs Nanomed Nanobiotechnol.* 2 (2010) 349–366. <https://doi.org/10.1002/wnan.85>.
- [19] X. Du, W. Wang, C. Wu, B. Jia, W. Li, L. Qiu, P. Jiang, J. Wang, Y.-Q. Li, Enzyme-responsive turn-on nanoprobe for *in situ* fluorescence imaging and localized photothermal treatment of multidrug-resistant bacterial infections, *J. Mater. Chem. B.* (2020) 10.1039.D0TB00750A. <https://doi.org/10.1039/D0TB00750A>.
- [20] H. Kobayashi, M. Ogawa, R. Alford, P.L. Choyke, Y. Urano, New Strategies for Fluorescent Probe Design in Medical Diagnostic Imaging, *Chem. Rev.* 110 (2010) 2620–2640. <https://doi.org/10.1021/cr900263j>.
- [21] S. Zaiba, F. Lerouge, A.-M. Gabudean, M. Focsan, J. Lermé, T. Gallavardin, O. Maury, C. Andraud, S. Parola, P.L. Baldeck, Transparent Plasmonic Nanocontainers Protect Organic Fluorophores against Photobleaching, *Nano Lett.* 11 (2011) 2043–2047. <https://doi.org/10.1021/nl2004847>.
- [22] L. Zhou, Q. Wang, Y. Tan, M.J. Lang, H. Sun, X. Liu, Rational Development of Near-Infrared Fluorophores with Large Stokes Shifts, Bright One-Photon, and Two-Photon Emissions for Bioimaging and Biosensing Applications, *Chem. Eur. J.* 23 (2017) 8736–8740. <https://doi.org/10.1002/chem.201701365>.
- [23] A.-M. Hada, A.-M. Craciun, M. Focsan, R. Borlan, O. Soritau, M. Todea, S. Astilean, Folic acid functionalized gold nanoclusters for enabling targeted fluorescence imaging of human ovarian cancer cells, *Talanta.* 225 (2021) 121960. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121960>.
- [24] A.-M. Hada, A.-M. Craciun, S. Astilean, Gold nanoclusters performing as contrast agents for non-invasive imaging of tissue-like phantoms *via* two-photon excited fluorescence lifetime imaging, *Analyst.* 146 (2021) 7126–7130. <https://doi.org/10.1039/D1AN01394G>.
- [25] J.C. Widen, M. Tholen, J.J. Yim, M. Bogyo, Methods for analysis of near-infrared (NIR) quenched-fluorescent contrast agents in mouse models of cancer, in: *Methods in Enzymology*, Elsevier, 2020: pp. 141–166. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2020.04.012>.

- [26] K. Purich, J.T. Dang, A. Poonja, W.Y.L. Sun, D. Bigam, D. Birch, S. Karmali, Intraoperative fluorescence imaging with indocyanine green in hepatic resection for malignancy: a systematic review and meta-analysis of diagnostic test accuracy studies, *Surg Endosc.* 34 (2020) 2891–2903. <https://doi.org/10.1007/s00464-020-07543-2>.
- [27] C. Zhang, D. Jiang, B. Huang, C. Wang, L. Zhao, X. Xie, Z. Zhang, K. Wang, J. Tian, Y. Luo, Methylene Blue–Based Near-Infrared Fluorescence Imaging for Breast Cancer Visualization in Resected Human Tissues, *Technol Cancer Res Treat.* 18 (2019) 153303381989433. <https://doi.org/10.1177/1533033819894331>.
- [28] A.-M. Hada, A.-M. Craciun, M. Focsan, A. Vulpoi, E.-L. Borcan, S. Astilean, Glutathione-capped gold nanoclusters as near-infrared-emitting efficient contrast agents for confocal fluorescence imaging of tissue-mimicking phantoms, *Microchim Acta.* 189 (2022) 337. <https://doi.org/10.1007/s00604-022-05440-0>.
- [29] J. Liu, P.N. Duchesne, M. Yu, X. Jiang, X. Ning, R.D. Vinluan, P. Zhang, J. Zheng, Luminescent Gold Nanoparticles with Size-Independent Emission, *Angew. Chem. Int. Ed.* 55 (2016) 8894–8898. <https://doi.org/10.1002/anie.201602795>.
- [30] R. Dai, W. Deng, P. Hu, C. You, L. Yang, X. Jiang, X. Xiong, K. Huang, One-pot synthesis of bovine serum albumin protected gold/silver bimetallic nanoclusters for ratiometric and visual detection of mercury, *Microchemical Journal.* 139 (2018) 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2018.02.010>.
- [31] Y. Qi, J. Zhao, G. Weng, J. Li, J. Zhu, J. Zhao, Modification-free colorimetric and visual detection of Hg²⁺ based on the etching from core-shell structural Au-Ag nanorods to nanorices, *Sensors and Actuators B: Chemical.* 267 (2018) 181–190. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.04.042>.
- [32] P. Ferenci, T. Litwin, J. Seniow, A. Czlonkowska, Encephalopathy in Wilson Disease: Copper Toxicity or Liver Failure?, *Journal of Clinical and Experimental Hepatology.* 5 (2015) S88–S95. <https://doi.org/10.1016/j.jceh.2014.09.002>.
- [33] N. Malhotra, T.-R. Ger, B. Uapipatanakul, J.-C. Huang, K.H.-C. Chen, C.-D. Hsiao, Review of Copper and Copper Nanoparticle Toxicity in Fish, *Nanomaterials.* 10 (2020) 1126. <https://doi.org/10.3390/nano10061126>.

- [34] M. Zheng, H. Tan, Z. Xie, L. Zhang, X. Jing, Z. Sun, Fast Response and High Sensitivity Europium Metal Organic Framework Fluorescent Probe with Chelating Terpyridine Sites for Fe³⁺, *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 5 (2013) 1078–1083. <https://doi.org/10.1021/am302862k>.
- [35] A.-M. Hada, M. Zetes, M. Focsan, T. Nagy-Simon, A.-M. Craciun, Novel paper-based sensing platform using photoluminescent gold nanoclusters for easy, sensitive and selective naked-eye detection of Cu²⁺, *Journal of Molecular Structure*. 1244 (2021) 130990. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2021.130990>.
- [36] A.-M. Hada, M. Zetes, M. Focsan, S. Astilean, A.-M. Craciun, Photoluminescent Histidine-Stabilized Gold Nanoclusters as Efficient Sensors for Fast and Easy Visual Detection of Fe Ions in Water Using Paper-Based Portable Platform, *IJMS*. 23 (2022) 12410. <https://doi.org/10.3390/ijms232012410>.
- [37] G. Barbillon, Latest Novelties on Plasmonic and Non-Plasmonic Nanomaterials for SERS Sensing, *Nanomaterials*. 10 (2020) 1200. <https://doi.org/10.3390/nano10061200>.
- [38] P. Bhatia, S.S. Verma, M.M. Sinha, Magneto-plasmonic Co@M (M = Au/Ag/Au-Ag) core-shell nanoparticles for biological imaging and therapeutics, *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer*. 251 (2020) 107095. <https://doi.org/10.1016/j.jqsrt.2020.107095>.
- [39] V. Prabhawathi, P.M. Sivakumar, T. Boobalan, C.M. Manohar, M. Doble, Design of antimicrobial polycaprolactam nanocomposite by immobilizing subtilisin conjugated Au/Ag core-shell nanoparticles for biomedical applications, *Materials Science and Engineering: C*. 94 (2019) 656–665. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.10.020>.
- [40] S. Zhou, M. Zhao, T.-H. Yang, Y. Xia, Decahedral nanocrystals of noble metals: Synthesis, characterization, and applications, *Materials Today*. 22 (2019) 108–131. <https://doi.org/10.1016/j.mattod.2018.04.003>.
- [41] R. Kotha, G. Fernandes, A.N. Nikam, S. Kulkarni, A. Pandey, S. Pandey, S. Mutalik, Surface engineered bimetallic nanoparticles based therapeutic and imaging platform: recent advancements and future perspective, *Materials Science and Technology*. 36 (2020) 1729–1748. <https://doi.org/10.1080/02670836.2020.1832323>.
- [42] A. Scala, G. Neri, N. Micale, M. Cordaro, A. Piperno, State of the Art on Green Route Synthesis of Gold/Silver Bimetallic Nanoparticles, *Molecules*. 27 (2022) 1134. <https://doi.org/10.3390/molecules27031134>.

- [43] A.-M. Hada, M. Potara, S. Astilean, A. Cordaro, G. Neri, M. Malanga, A. Nostro, A. Mazzaglia, A. Scala, A. Piperno, Linezolid nanoAntibiotics and SERS-nanoTags based on polymeric cyclodextrin bimetallic core-shell nanoarchitectures, *Carbohydrate Polymers*. 293 (2022) 119736. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.119736>.
- [44] W. Ansar, S. Ghosh, C-reactive protein and the biology of disease, *Immunol Res*. 56 (2013) 131–142. <https://doi.org/10.1007/s12026-013-8384-0>.
- [45] B. Clyne, J.S. Olshaker, The C-reactive protein, *The Journal of Emergency Medicine*. 17 (1999) 1019–1025. [https://doi.org/10.1016/S0736-4679\(99\)00135-3](https://doi.org/10.1016/S0736-4679(99)00135-3).