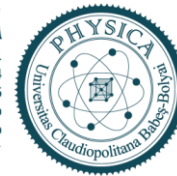




UNIVERSITATEA BABEȘ-BOLYAI  
BABEȘ-BOLYAI TUDOMÁNYEGYETEM  
BABEȘ-BOLYAI UNIVERSITÄT  
BABEȘ-BOLYAI UNIVERSITY  
TRADITIO ET EXCELLENTIA

FACULTATEA DE FIZICĂ  
Str. Mihail Kogălniceanu nr.1  
Cluj-Napoca, RO-400084  
Tel: +4(0)264-405300 | FAX: +4(0)264-591906  
secretariat.phys@ubbcluj.ro  
www.phys.ubbcluj.ro



UNIVERSITATEA “BABEȘ-BOLYAI” CLUJ-NAPOCA

FACULTATEA DE FIZICĂ

SPECIALIZAREA FIZICĂ MEDICALĂ

## LUCRARE DE LICENȚĂ

Coordonatori științifici

Lect. Dr. Gabriela Știuțiu

Prof. Dr. Rareș Știuțiu (UMF Cluj-Napoca)

Absolvent

Bianca – Maria Lazorec

[2022]



UNIVERSITATEA BABEȘ-BOLYAI  
BABEȘ-BOLYAI TUDOMÁNYEGYETEM  
BABEȘ-BOLYAI UNIVERSITÄT  
BABEȘ-BOLYAI UNIVERSITY  
TRADITIO ET EXCELLENTIA

FACULTATEA DE FIZICĂ  
Str. Mihail Kogălniceanu nr.1  
Cluj-Napoca, RO-400084  
Tel: +4(0)264-405300 | FAX: +4(0)264-591906  
secretariat.phys@ubbcluj.ro  
www.phys.ubbcluj.ro



UNIVERSITATEA “BABEȘ-BOLYAI” CLUJ-NAPOCA

FACULTATEA DE FIZICĂ

SPECIALIZAREA FIZICĂ MEDICALĂ

## LUCRARE DE LICENȚĂ

### INVESTIGAREA INTERACȚIUNILOR NANOPARTICULELOR PLASMONICE DE AUR CU MEDIILE CELULARE FOLOSIND MICROSCOPIE HIPERSPECTRALĂ

Coordonatori științifici

Lect. Dr. Gabriela Știufiuc

Prof. Dr. Rareș Știufiuc (UMF Cluj-Napoca)

Absolvent

Bianca – Maria Lazorec

[2022]



## Abstract

Gold nanoparticles have been extensively used for a wide range of biomedical applications due to their unique physicochemical properties. Over the time, various methods of synthesis and functionalization have been developed. In this regard, polyethylene glycol (PEG) coatings are the most used biopolymers, increasing stability and biocompatibility of nanostructures. This study proposes a facile synthesis method of PEGylated gold nanoparticles (AuNPs) and describes their interactions with biological samples. AuNPs were synthesized using PEG1000 as a stabilizing and reducing agent. The nanoparticles were purified and concentrated through Tangential Flow Filtration procedure and followed a rigorous characterization. Transmission Electron Microscopy revealed a mean diameter of 20nm, 3-4nm representing the thickness of PEG coating. UV-Vis spectrophotometry measurements indicated a maximum absorbance at the wavelength of 525nm. The presence of PEG1000 at the surface of AuNPs was also confirmed by Nanoparticle Tracking Analysis showing a zeta potential of -20.4mV. After characterization, the cytotoxicity of PEGAuNPs was evaluated on two cell lines: a normal cell line (LX2) and a hepatocarcinoma cell line (SK-HEP-1). By performing MTT assays, it was observed that cellular viability slowly decreases over time, meaning that PEG functionalized AuNPs possess a reduced cytotoxic effect. Dark field microscopy allowed the assessment of nanoparticles cellular internalization, evidencing their distribution around the nucleus. Finally, spectral profile modifications of AuNPs were analyzed by means of hyperspectral imaging. These investigations suggested that AuNPs spectral behavior depends on their localization site in the cellular medium. The occurring of such phenomenon plays a significant role in biomedical applications, especially imaging techniques.

# Cuprins

Introducere .....	5
I. Sinteza și caracterizarea nanoparticulelor plasmonice de aur .....	6
I.1. Perspectivă istorică .....	6
I.2. Proprietățile nanoparticulelor plasmonice de aur .....	7
I.2.1. Rezonanța plasmonică de suprafață localizată.....	7
I.2.2. Proprietăți generale și avantaje .....	8
I.2.3. Dimensiunea și forma AuNPs.....	9
I.3. Sinteza AuNPs .....	11
I.3.1. Metoda Turkevich.....	11
I.3.2. Metoda Brust-Schiffrin.....	13
I.3.3. Metoda Xia.....	14
I.3.4. Metoda Zhong .....	16
I.4. Tehnici de caracterizare a nanoparticulelor .....	18
I.4.1. Spectroscopia de absorbție UV-vis .....	19
I.4.2. Spectroscopie în infraroșu cu transformată Fourier (FTIR) .....	19
I.4.3. Difracția de raze X (XRD).....	20
I.4.4. Microscopia electronică.....	21
I.4.5. Împrăștierea dinamică a luminii.....	22
I.4.6. Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) .....	22
I.4.6. Enhanced Darkfield Hyperspectral Microscopy .....	23
II. Materiale și metode.....	26
II.1. Prepararea AuNPs .....	26
II.2. Filtrarea în flux tangențial (TFF – Tangential Flow Filtration) .....	27
II.3. Caracterizarea AuNPs.....	28
II.3.1 Spectrofotometrie UV-vis .....	28
II.3.2. Microscopie electronică în transmisie.....	28
II.3.3. Nanoparticle Tracking Analysis .....	29

II.4. Experimentele in vitro pe culturi celulare.....	29
II.4.1. Evaluarea efectului AuNPs asupra viabilității celulare.....	30
II.4.2. Monitorizarea internalizării AuNPs prin microscopie hiperspectrală și în câmp întunecat.....	31
III. Rezultate și discuții.....	33
III.1. Rolul NaOH în sinteza AuNPs .....	33
III.2. Măsurătorile UV-vis.....	33
III.3. Măsurătorile TEM.....	34
III.4. Nanoparticle Tracking Analysis.....	35
III.5. Analiza efectului AuNPs asupra viabilității celulare cu ajutorul testului MTT .....	36
III.6. Evaluarea internalizării AuNPs prin microscopie hiperspectrală și în câmp întunecat ....	38
IV. Aplicații .....	42
Concluzii.....	44
Anexa 1 .....	45
Anexa 2 .....	46
Bibliografie .....	47

## Introducere

Coloizii de aur, folosiți încă din vremuri antice în scop decorativ și medical, au devenit un subiect important al cercetării științifice în ultimele decenii. Popularitatea lor în domeniul biomedical se datorează proprietăților fizice și chimice deosebite, cum ar fi rezonanța plasmonică de suprafață, hidrofilia, posibilitatea de control a formei și dimensiunii lor în domeniul nano și funcționalizarea suprafeței. În contextul aplicațiilor biomedicale, polietilenglicolul (PEG) este unul dintre cei mai utilizați biopolimeri, fiind componenta principală în diferite clase de compuși terapeutici aflați deja în uz clinic.

Lucrarea de față are ca principal scop sinteza de nanoparticule de aur (AuNPs) folosind PEG1000 ca și agent reducător și stabilizator și testarea interacțiunii lor cu diferite medii celulare. În vederea determinării proprietăților optice, morfologice și a potențialului de suprafață, coloidul astfel preparat a fost caracterizat prin trei metode diferite și anume : spectroscopie de absorbție UV-vis, microscopie electronică în transmisie (TEM) și Nanoparticle Tracking Analysis (NTA). Studiul a continuat cu evaluarea biocompatibilității lor prin evaluarea viabilității a două linii celulare, LX2 și SK-HEP-1, în urma expunerii lor la tratamente cu AuNPs folosind testul MTT. Monitorizarea internalizării celulare a nanoparticulelor s-a realizat prin microscopie hiperspectrală și în camp întunecat. Aceasta a avut ca scop punerea în evidență a diferențelor legate de internalizarea AuNPs în cele două linii celulare, precum și analiza modificărilor profilului spectral al AuNPs în funcție de localizarea lor în mediul intracelular.

## I. Sinteza și caracterizarea nanoparticulelor plasmonice de aur

### I.1. Perspectivă istorică

Soluțiile de aur coloidal au fost menționate pentru prima dată în jurul secolului V î.Hr în literatura egipteană și chineză. Aurul și argintul coloidal au fost folosite încă din vremurile Romei Antice în scopul colorării sticlei în nuanțe de roșu, mov sau galben, aceste culori fiind influențate de concentrația celor două metale în soluție. Un exemplu în acest sens este Cupa Lycurgus (Figura 1.1) care datează din secolul IV d.Hr. [1].

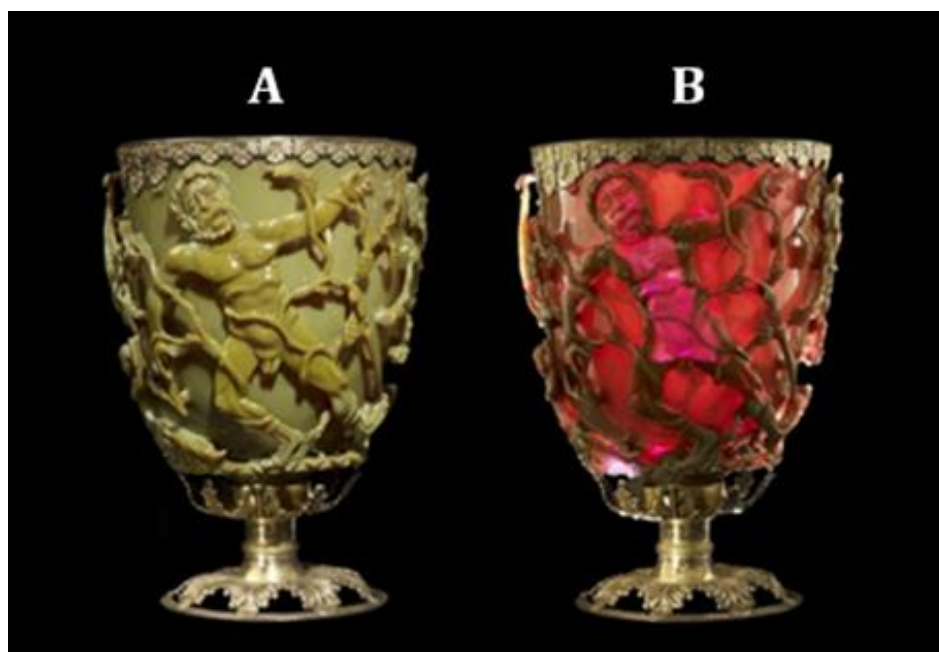


Figura 1.1. Cupa Lycurgus în lumină reflectată (A) și în lumina transmisă (B) [2].

Cupa Lycurgus este un exemplu de sticlă dicroică ce își schimbă culoarea în funcție de iluminare, aparținând perioadei Romei Antice. În compoziția sticlei se regăsesc nanoparticule de aur și argint. Diferența de culoare dintre o sticlă rubinie obișnuită și Cupa Lycurgus se poate explica pe baza gradelor diferite de absorbție și împrăștiere a luminii. Particulele care se regăsesc în soluțiile coloidale de aur, precum și în sticla rubinie, sunt de dimensiuni care permit o absorbție ridicată și o împrăștiere scăzută a radiației luminoase. Transmisia luminii induce fenomenul de colorare substractivă – culoarea sticlei va fi dată de culoarea albă din care este substrasă culoarea absorbită de particulele coloidale. În cazul în care sticla este analizată în lumină reflectată, ea va apărea întunecată întrucât lumina este absorbită la intrarea în solid și doar o mică parte din ea se întoarce către ochi [3].

Până în Evul Mediu, aurul solubil a fost considerat ca având proprietăți curative pentru diverse patologii cum ar fi cele de natură cardiacă, epilepsia sau diferitele tumori. Aurul era utilizat chiar și pentru diagnosticul sifilisului [4].

În anul 1857, Michael Farady a menționat pentru prima dată aurul coloidal în literatura științifică. El credea că nuanța roșie a soluției coloidale de aur se datorează interacțiunii particulelor de aur cu lumina, interacțiunea fiind diferită față de cea cu aurul metalic (macroscopic) [5].

La începutul secolului XX s-au dezvoltat mai multe metode de sinteză a soluțiilor coloidale metalice. În jurul anului 1951, cercetătorul Turkevich a dezvoltat o metodă originală de sinteză a nanoparticulelor de aur sferice, cunoscută sub numele de metoda Turkevich [1]. Mai târziu, această metoda a suferit diverse modificări, iar în anul 1973 G. Frens a îmbunătățit-o, ea devenind metoda Turkevich-Frens. În prezent, metodele de sinteză de tip Turkevitch-Frens sunt printre cele mai utilizate în sinteza nanoparticulelor de aur, micile modificări fiind determinate de domeniul de aplicabilitate ale nanoparticulelor sintetizate [6].

## I.2. Proprietățile nanoparticulelor plasmonice de aur

### I.2.1. Rezonanța plasmonică de suprafață localizată

Plasmonul reprezintă oscilația colectivă a electronilor dintr-un metal nobile atunci când ei sunt excitați ca urmare a interacțiunii cu o radiație luminoasă. Rezonanța plasmonică reprezintă o bandă de absorbție care apare în momentul în care frecvența fotonului incident este în rezonanță cu oscilația colectivă a electronilor conductori. Odată cu pătrunderea în interiorul metalului, perturbația indusă de unda electromagnetică incidentă scade rapid. Prin urmare, rezonanța se manifestă cel mai adesea la suprafața metalului, fenomen cunoscut sub denumirea de rezonanță plasmonică de suprafață (Surface Plasmon Resonance – SPR). Rezonanța plasmonică de suprafață localizată (LSPR) are loc atunci când SPR se reduce la volume mici cum ar fi cele ale nanoparticulelor, ale căror dimensiuni sunt comparabile cu lungimea de undă a radiației incidente (Figura 1.2). Apariția fenomenului LSPR în cazul nanoparticulelor de aur conduce la efecte importante cum ar fi un efect de intensificare locală a câmpului electromagnetic și apariția unui coeficient de extincție [7].



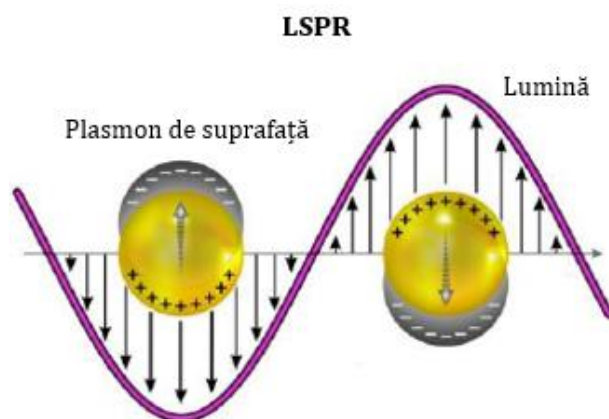


Figura 1.2. Rezonanța plasmonică de suprafață localizată [8].

La apariția LSPR, câmpul electromagnetic din apropierea suprafeței nanoparticulelor de aur (AuNPs) poate fi amplificat cu mai multe ordine de mărime. Cea mai mare amplificare are loc în zonele cu cea mai mare curbură locală (regiuni cunoscute sub denumirea de hot spots – puncte fierbinți). Extincția optică a AuNPs poate crește cu mai mult de trei ordine de mărime în comparație cu moleculele organice obișnuite, crescând astfel eficiența conversiei fototermale, conversia fotochimică și absorbția de energie luminoasă a AuNPs [7].

### 1.2.2. Proprietăți generale și avantaje

Datorită efectelor care apar în urma modificării formei, dimensiunii și a compoziției lor, AuNPs prezintă o capacitate ridicată de ajustare a proprietăților lor optice față de coloranții convenționali, cum ar fi obținerea unor secțiuni transversale de absorbție și împrăștiere mult mai bune. Secțiunea transversală de absorbție a AuNPs este cu patru până la cinci ordine de mărime mai mare decât cea a moleculelor cu cea mai puternică absorbție (de exemplu Rodamina 6G - R6G). Împrăștierea luminii dată de AuNPs sferice cu diametru de 80nm este  $10^5$  ori mai mare decât emisia de lumină a moleculelor de fluoresceină. În plus, spre deosebire de fluoroforii moleculari, grav afectați de fenomenul de photobleaching și greu de detectat prin tehnici experimentale, AuNPs nu sunt sensibile la acest fenomen. Mai mult decât atât, sondele pe bază de AuNPs depășesc unele limitări ale coloranților organici convenționali, cum ar fi: hidrofilia și fotosensibilitatea slabe, randamentul cuantic și sensibilitatea detecției scăzute, stabilitatea insuficientă în sistemele biologice și capacitatea de multiplexare slabă [9].

### 1.2.3. Dimensiunea și forma AuNPs

Dimensiunea și forma AuNPs au o influență semnificativă asupra proprietăților intrinseci ale acestora (Tabelul 1.1), fapt ce a condus la cercetări ample în vederea dezvoltării unor tehnici eficiente de sinteză pentru obținerea de AuNPs de forme și dimensiuni specifice [10].

<b>Dimensiunea nanoparticulelor sferice de aur [nm]</b>	<b>Peak-ul SPR [nm]</b>
5	515-520
10	515-520
20	524
30	526
40	530
50	535
60	540
80	553
100	572

*Tabelul 1.1. Dependența valorii SPR-ului în funcție de dimensiunea nanoparticulelor sferice de Au [10].*

Așa cum se poate observa în Figura 1.3, frecvența (lungimea de undă) a LSPR-ului depinde atât de dimensiunea și forma particulelor, cât și de proprietățile dielectrice ale mediului. AuNPs sunt adesea caracterizate de o culoare roșie deschisă sau violetă (Figura 1.3.A) și de o absorbție maximă în intervalul 517 – 575nm pentru particule cu un diametru cuprins între 9 și 99nm (Figura 1.3.B). Particulele cu dimensiuni mai mici de 2nm nu generează o bandă LSPR. În timp ce LSPR-ul AuNPs sferice are o dependență slabă în funcție de dimensiune, LSPR-ul depinde în mare măsură de forma nanoparticulelor. Spre exemplu, AuNPs în formă de bastonașe, sau „nanorods”, sunt caracterizate de două benzi LSPR : o oscilație transversală cu o rezonanță vizibilă care corespunde cu cea a unei sfere de dimensiune analogă și o oscilație longitudinală, care prezintă o rezonanță în domeniul infra-roșu apropiat (eng. Near InfraRed – NIR) și care se deplasează către lungimi de undă mai mari și intensități mai puternice pe măsură ce raportul aspectului crește (Figura 1.3C) [11].

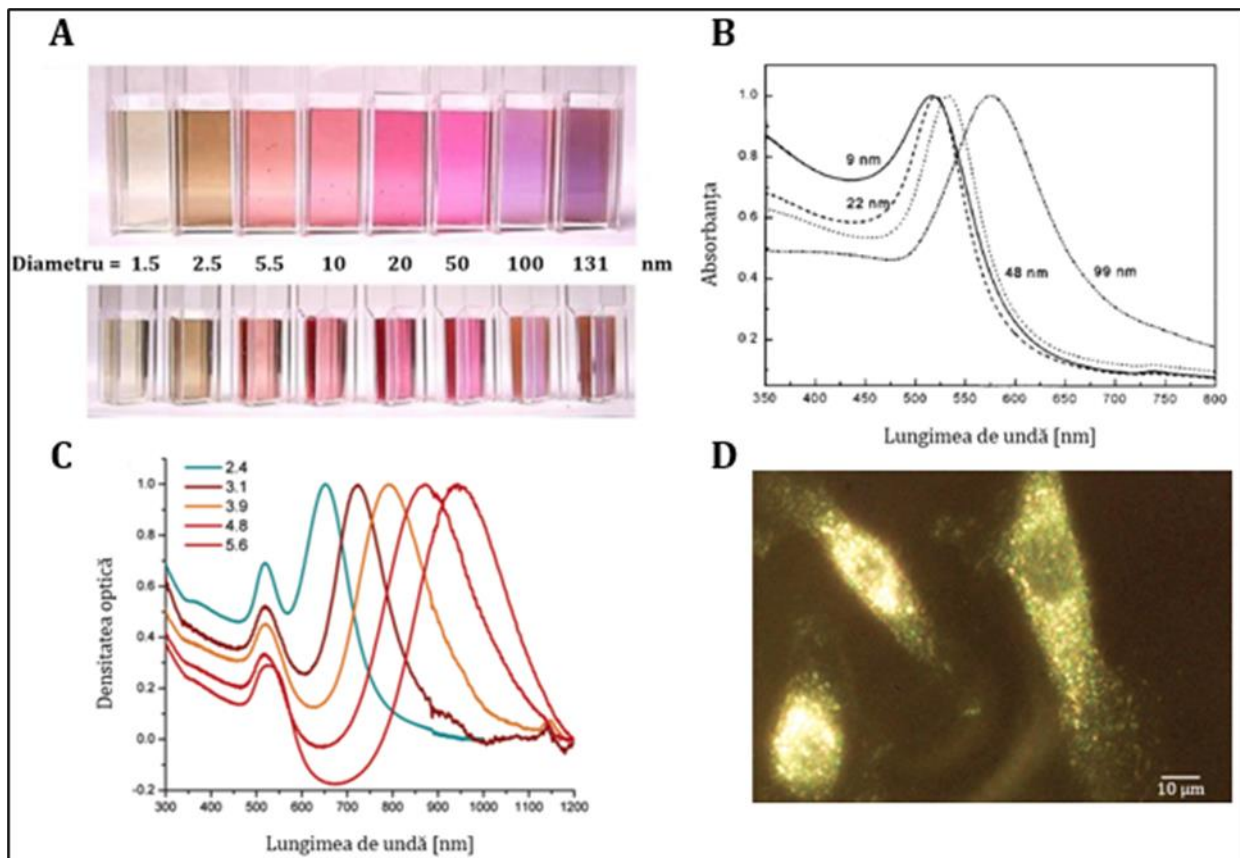


Figura 1.3. Caracteristicile optice ale AuNPs. (A) Imagine a AuNPs de diferite dimensiuni stabilizate cu PEG [10]. (B) Frecvența LSPR a AuNPs de 9, 22, 48 și 99nm [12]. (C) Lungimea de undă a benzilor LSPR a nanorodurilor de Au cu diferite rapoarte de aspect [13]. (D) Imagini de microscopie în câmp întunecat ale celulelor stem canceroase umane conținând AuNPs conjugate cu diferiți anticorpi [14].

Pe lângă forma sferică des întâlnită, AuNPs au fost, de asemenea, sintetizate într-o varietate de alte forme (Figura 1.4).

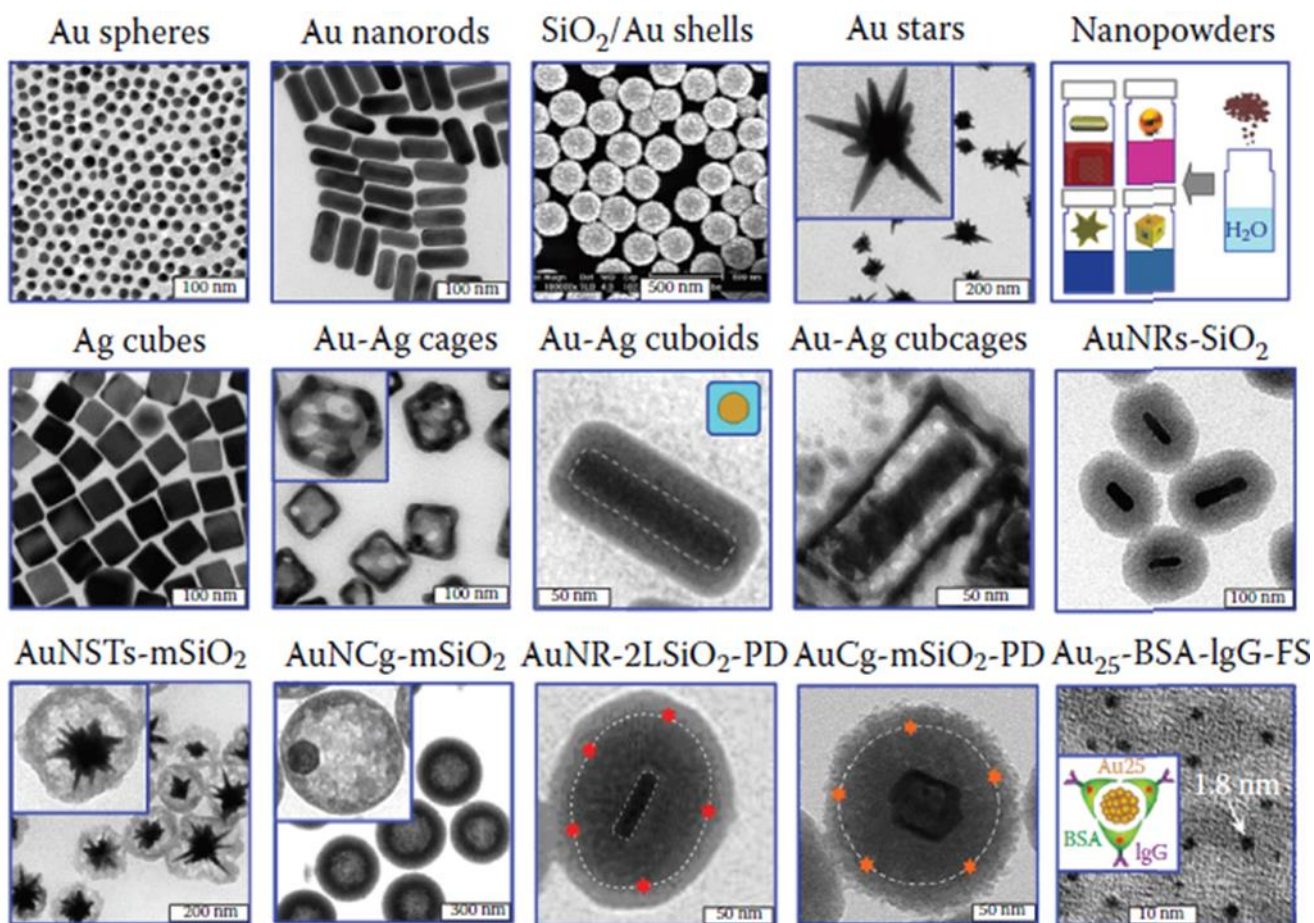


Figura 1.4. Exemple de nanoparticule plasmonice de aur și de nanocompozite hibride [15].

Prin variația mai multor parametri (concentrația reactanților, condițiile de reacție și natura solvenților) și folosind metode variate de sinteză, se pot obține forme diverse de AuNPs.

### I.3. Sinteza AuNPs

#### II.3.1. Metoda Turkevich

Prima și poate cea mai importantă metodă de sinteză a fost propusă de Turkevich în anul 1951. Metoda presupune utilizarea agenților reducători, cum ar fi citratul de sodiu, pentru prepararea soluțiilor coloidale de aur monodisperse. Această metodă permite sinteza de nanoparticule sferice cu un diametru cuprins între 5 și 40nm. Ulterior, această metodă a fost folosită pentru prepararea nanoparticulelor de argint pentru care, însă, s-au obținut nanoparticule cu dimensiunea cuprinsă între 60 și 200nm. Sinteza se bazează pe disoluția acidului cloroauric în apă distilată până la obținerea unei soluții diluate de concentrație molară  $2.5 \times 10^4$  M. După ce aceasta este adusă la fierbere, se adaugă 1mL de soluție de citrat de sodiu de concentrație 0.5% și se menține o temperatură constantă de 100°C până la observarea unei modificări a culorii. În Figura 1.5 este

reprezentat mecanismul de formare a nanoparticulelor coloidale prin reducere în mediu apos-organic [16].

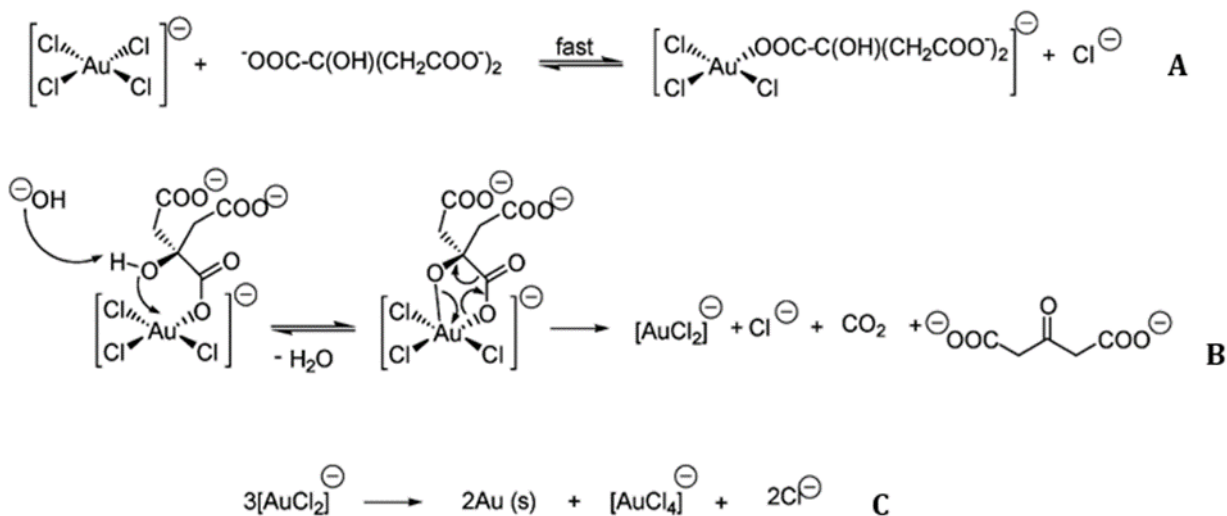


Figura 1.5. Mecanismul de reducere a aurului. Reacția de schimb a liganzilor (A), decarboxilarea și reducerea speciilor Au(III) (B) și disproporționarea speciilor auroase și formarea ulterioară a atomilor de Au (O) (C) [16].

Astfel se formează nanoparticulele de aur, pe suprafața cărora sunt absorbite diferite specii ionice. Sarcina negativă a particulelor coloidale este determinată de  $[\text{AuCl}_4]^{-}$ , care formează stratul interior al bistratului electric. Formula chimică a sistemului coloidal este redată în Figura 1.6.

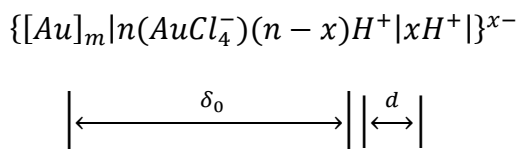


Figura 1.6. Formula chimică a sistemului coloidal.  $[\text{Au}]_m$ —miezul de metal,  $m$ —numărul de atomi constituenți,  $n$  - numărul de ioni  $\text{AuCl}_4^{-}$  absorbiți,  $n < m$ ,  $\delta_0$  grosimea stratului de absorbție,  $d$  grosimea stratului de difuzie [16].

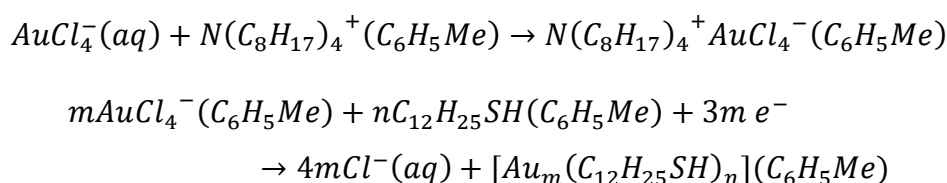
Un dezavantaj al acestei metode constă în faptul că anionul citrat se comportă atât ca un stabilizator, cât și ca agent reducător. Acest lucru complică selecția unui raport optim de citrat  $:\text{H}[\text{AuCl}_4]$  și are o influență considerabilă asupra proceselor de nucleație și creștere a particulelor. Mai mult decât atât, poate avea loc o absorbție a produșilor de oxidare pe suprafața particulelor. Pentru depășirea acestor inconveniente, alte substanțe chimice au fost folosite cu succes ca și agenți reducători în procesul de sinteză a nanoparticulelor: peroxidul de hidrogen, borohidruza de sodiu sau acidul ascorbic [17].



### I.3.2. Metoda Brust-Schiffin

Publicată în anul 1994, metoda Brust-Schiffin a permis sinteza facilă a nanoparticulelor de aur cu grad redus de dispersie, stabile din punct de vedere termic și atmosferic, precum și controlul pentru prima dată al dimensiunii (diametru cuprins între 1.5 și 5.2nm). Aceste nanoparticule de aur pot fi redizolvate și izolate în mod repetat fără a avea loc o dispersie sau agregare ireversibilă, și pot fi manipulate și funcționalizate cu ușurință cu diferiți compuși organici și moleculari. Metoda utilizează liganzii tiolici care leagă puternic aurul datorită caracterului moale atât al Au cât și al S, fiind inspirată de sistemul bifazic al lui Faraday.  $AuCl_4^-$  este transferat în toluen folosind bromură de tetraoctilamoniu ca reactiv de transfer de fază și redus cu  $NaBH_4$  în prezența dodecanetioliului [4].

Faza organică își schimbă culoarea de la portocaliu la maro intens în câteva secunde după adăugarea  $NaBH_4$ , conform reacțiilor de mai jos :



Imaginile TEM au indicat obținerea unor nanoparticule cu diametre cuprinse în intervalul 1-3nm, un maxim al distribuției dimensiunii particulelor la 2 – 2.5nm și o preponderență a structurilor cuboctaedrice și icosaedrice. Raporturile molare tiol:aur ridicate conduc la obținerea unor dimensiuni medii mai mici ale miezului, iar adăugarea rapidă a agentului reducător și scăderea temperaturii de sinteză au produs particule mai mici, monodisperse. O abundență mai mare de dimensiuni mici ale miezului ( $\leq 2nm$ ) este obținută prin stingerea reacției imediat după reducere sau prin utilizarea unor liganzi sterici. Brust și colab. au extins această sinteză la AuNPs stabilizate cu p-mercaptofenol într-un sistem monofazat, ceea ce a deschis o cale către sinteza AuNPs stabilizate cu o varietate de liganzi tiolici funcționali. Proporția tiol: $AuCl_4^-$  utilizată în sinteză controlează dimensiunea nanoparticulelor (de exemplu, un raport de 1:6 conduce la un diametru mediu maxim al miezului de 5.2nm, adică aproximativ 2951 atomi de Au și aproximativ 371

liganzi tiolat; dispersitatea diametrului miezului fiind de  $\sim \pm 10\%$ ). Murray și colab. au raportat și studiat schimbarea poziției în cazul unei proporții controlate de liganzi tiolici de către diverși tioli funcționali (Figura 1.7) și reacțiile ulterioare ale acestor AuNPs funcționale [4].

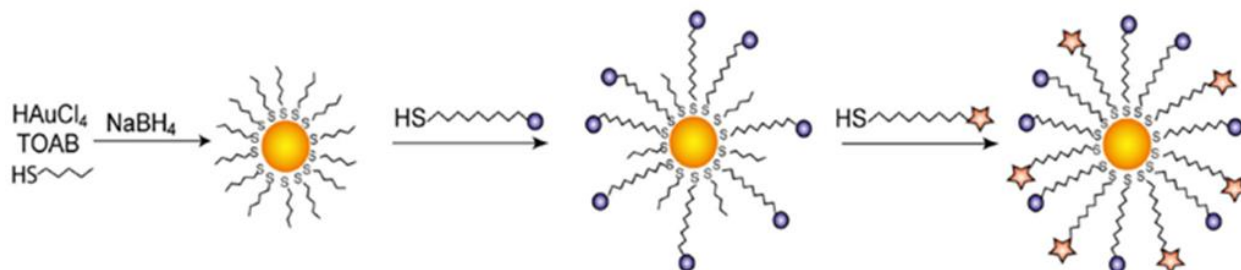


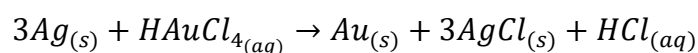
Figura 1.7. Sinteza în două faze a AuNPs prin reducerea  $HAuCl_4$  în prezența alcantiolilor ca liganzi stabilizatori și a  $NaBH_4$  ca agent reducător. Reacția de schimb pentru AuNPs funcționalizate cu alcanetioli poate fi apoi efectuată cu tioli funcționali [18].

Schiffirin a raportat purificarea AuNPs stabilizate cu dodecanetiol de impuritățile de tetraoctilamoniu prin extracția Soxhlet. Influența surfactantului anionic Tween 20 [polyoxoethylene (20) sorbitan monolaurate (Tween 20)] asupra modificării suprafeței AuNPs a fost studiată cu ajutorul acizilor mercaptoalcanoici. Maturarea digestivă (încălzirea unei suspensii coloidale în apropierea punctului de fierbere în prezența alcanetiolilor), a redus semnificativ dimensiunea medie a particulelor și polidispersitatea într-un mod convenabil și eficient [4].

### 1.3.3. Metoda Xia

Xia și colab. au introdus un nou protocol bazat pe înlocuirea galvanică a ionilor de argint prin reducerea atomilor de aur [15]. Înlocuirea galvanică este un fenomen prin care ionii de metal nobil (Au, Pt) oxidează spontan atomii de suprafață ai unui metal mai puțin nobil (Ag, Cu) cu reducerea concomitentă a metalului mai nobil [9]. Această abordare poate produce particule cu o varietate mare de forme și structuri, de la cuburi de argint până la „cuști” (nanocages) de aur.

Diferența de potențial electrochimic dintre două metale (unul servind drept catod și celălalt drept anod) generează reacția. În ceea ce privește sinteza nanocage-urilor de Au, potențialul de reducere al  $AuCl_4^-/Au$  este mai pozitiv decât cel al  $AgCl/Ag$ . Astfel, nanocuburile de Ag pot servi ca matriță pentru reacție, fiind oxidate de  $HAuCl_4$  conform următoarei reacții :



Reacția de înlocuire galvanică se desfășoară ca o titrare, soluția de  $\text{HAuCl}_4$  (pentru nanocuburi pe bază de Au) fiind adăugată în mod controlat peste o suspensie fierbinte de nanocuburi de Ag.

După reacția nanocuburilor de Ag cu colțuri ascuțite (Figura 1.8.A) cu o cantitate mică de soluție de  $\text{H[AuCl}_4]$ , pe una dintre cele șase fețe ale fiecărui cub se observă un orificiu (Figura 1.8.B), indicând faptul că reacția este inițiată local într-un punct de energie ridicată (spre exemplu, treaptă de suprafață, defect punctual sau gaură în stratul superficial) mai degrabă decât pe întreaga suprafață a cubului. Pe parcursul reacției, acest orificiu servește drept anod, unde Ag este oxidat și electronii sunt îndepărtați. Electronii eliberați migrează către fețele nanocuburilor și sunt capturați de  $\text{AuCl}_4^-$ , generând atomi de Au care cresc epitaxial pe nanocub. Pe măsură ce stratul de Au se formează, orificiul inițial servește ca loc pentru dizolvarea Ag, facilitând conversia nanocubului într-o nanocutie (nanobox) (Figura 1.8.B, sus). În etapele ulterioare ale reacției, orificiul se închide (Figura 1.8.C), prin procese de difuzie în masă și/sau depunere directă de Au lângă orificiu. Imaginea TEM a unei astfel de probe indică interiorul gol al nanoboxului (inset-ul din Figura 1.8.C).

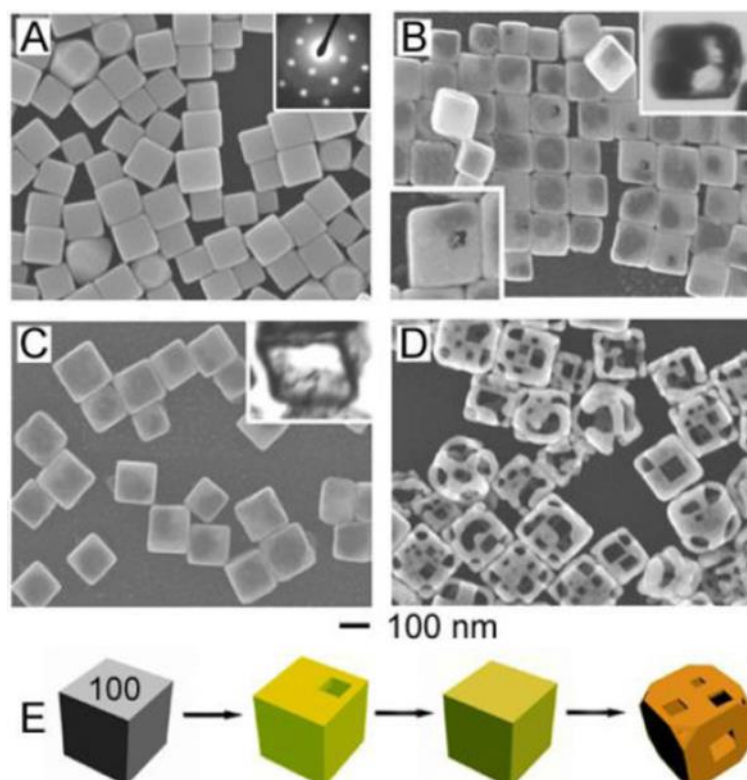


Figura 1.8. (A) Imagini SEM ale nanocuburilor de Ag. Inset : difracția electronilor indică faptul că sunt monocristale. (B) Imagini SEM ale produsului de reacție după adăugarea a 0.30mL de soluție  $\text{H[AuCl}_4]$  1mM peste o suspensie de nanocuburi de Ag (5mL, 0.8mM); se observă o



*gaură (stânga jos) pe fața expusă la aproximativ 1 din 6 nanocuburi. Partea superioară: Imaginea TEM a unei probe microtomizate care indică golirea timpurie. (C) Imagine SEM a produsului de reacție după adăugarea a 0.50mL de soluție de H[AuCl<sub>4</sub>]. Inset: Imagine TEM a unei probe microtomizate care indică interiorul gol al nanoboxului. (D) Imagine SEM a produsului de reacție după adaugarea a 2.25mL de soluție de H[AuCl<sub>4</sub>]. (E) Rezumat al modificărilor morfologice. Colorarea indică conversia unui nanocub de Ag într-un nanobox Au/Ag, apoi într-un nanocage predominant de Au [19].*

Odată cu adăugarea unei cantități mai mari de soluție de H[AuCl<sub>4</sub>], se observă fenomenul de corodare, care conduce la formarea de nanocage-uri de Au/Ag. Aceste structuri poroase sunt denumite în mod obișnuit ca nanocage-uri de Au (Figura 1.8.D), iar procesul general este reprezentat în Figura 1.8.E. Transformarea completă într-o nanostructură de Au are ca rezultat fragmentarea cage-ului [19].

#### 1.3.4. Metoda Zhong

Metoda Zhong permite sinteza de nanoparticule sferice de aur, solubile în apă, de aproape orice diametru din intervalul 10 - 100nm, cu o dispersie de până la 5%. Reacția are loc în două etape și implică sinteza seed-urilor de aur urmată de un proces de creștere a acestora în soluții apoase folosind acrilat de sodiu ca agent reductor și de acoperire. În prima etapă, similară cu cea a metodei Turkevich, precursorii de aur (H[AuCl<sub>4</sub>]) sunt reduși cu acrilat de sodiu la temperatura de 100°C, rezultând astfel seed-uri de aur cu diametrul de 1.5nm. Principalii produși secundari de reacție rezultați în urma oxidării acrilatului de sodiu (reacția Wacker), vor fi acidul piruvic (CH<sub>3</sub>COCO<sub>2</sub>H) și acidul 3-oxopropanoic (CHOCH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H).

Al doilea pas implică un mecanism de creștere a seed-urilor preparate în prealabil. Creșterea particulelor de dimensiuni mai mari și monodispersivitate ridicată rezultă din reducerea Au(III) de pe suprafața seed-urilor de Au de către un amestec de acid acrilic și acrilat de sodiu. Reacția menționată anterior are loc la temperatura camerei (20 ± 0.5 °C) în aproximativ trei zile sub controlul pH-ului și al temperaturii de reacție. Dispersia dimensiunilor și uniformitatea formei sunt controlate cu ajutorul fenomenului cunoscut sub denumirea de Ostwald ripening (Figura 1.9), un mecanism adesea considerat ca fiind responsabil pentru creșterea în dimensiune a particulelor. În cadrul ripening-ului Ostwald, particulele mai mici se dizolvă, iar cristalizarea ulterioară a particulelor mai mari va declanșa creșterea dimensiunilor acestora [16].



Figura 1.9. Ilustrare a mecanismului de creștere controlată a nanoparticulelor de aur. În imaginea centrală este prezentată coalescența particulelor mai mici pe particula mai mare [16].

Considerând AuNPs de formă sferică, o rază inițială a seed-urilor  $r$  (cm) și o grosime de creștere  $d$  (cm), pentru a produce particule cu raza totală  $r + d$  (cm), echilibrul de masă dintre seed-uri și concentrația  $C$  de  $AuCl_4^-$  (mM) este dată de relația :

$$N \times \left[ \frac{4\pi}{3} (r + d)^3 - \frac{4\pi}{3} r^3 \right] \times \rho = C \times V \times M \quad (1)$$

unde  $N$  este numărul de nanoparticule de Au din volumul total,  $\rho$  este densitatea aurului (18.9 g/cm<sup>3</sup>),  $M$  este masa moleculară a Au (197 g/mol),  $C$  este concentrația precursorului de Au (mol/L), iar  $V$  este volumul total de reacție. Din ecuația (1) se poate extrage raportul  $d/r$  ca fiind :

$$\frac{d}{r} = \sqrt[3]{1 + 2,49 \times \frac{C \times V}{N \times r^3}} \quad (2)$$

Ecuația (2) permite controlarea fină a raportului molar al reactanților pentru obținerea nanosferelelor de aur monodisperse dorite. Pe scurt, metoda Zhong prezintă patru caracteristici principale: i) dispersivitate a dimensiunilor foarte mică, ii) viteza ridicată de producere a unei cantități mari de coloid, iii) reproductibilitate și iv) un bun control al formei sferice a AuNPs. Cu toate acestea, reacția este de lungă durată și necesită prezența constantă a operatorului pentru reglarea și controlul precis al temperaturii [16].

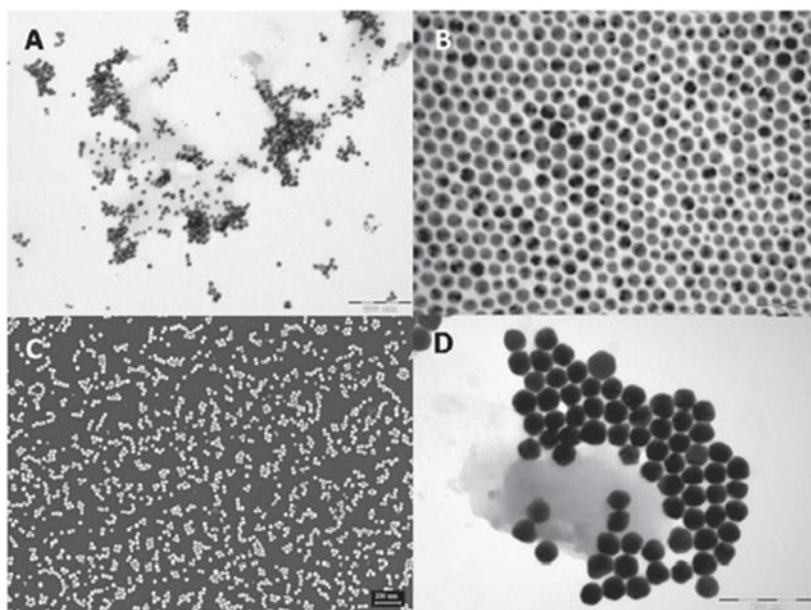


Figura 1.10. a) Imagine obținută prin microscopie electronică în transmisie (TEM) a unor nanosfere de aur sintetizate prin metoda Turkevich. Diametrul mediu al unei sfere este de 20nm, (scala este de 200nm). B) Imagine TEM a nanosferelor de aur sintetizate prin metoda Brust. Diametrul mediu al unei sfere este de 10nm (scala este de 50nm). C) Imagine obținută prin microscopie de scanare electronică (SEM) a nanosferelor de aur sintetizate prin metoda Xia. Diametrul mediu al unei sfere este de 15nm, pe o scală de 200nm. D) Imagine TEM a unor nanosfere de aur sintetizate prin metoda Zhong. Diametrul mediu al unei sfere este de 30nm (scala este de 200nm) [16].

#### I.4. Tehnici de caracterizare a nanoparticulelor

Caracterizarea nanoparticulelor este deosebit de importantă pentru evaluarea proprietăților lor. Caracterizarea AuNPs poate fi efectuată folosind microscopia electronică în transmisie sau prin scanare (TEM, SEM), spectroscopia de absorbție UV-Vis, spectroscopia fotoelectronică cu raze X (XPS), microscopia de forță atomică (AFM), împrăștierea dinamică a luminii (DLS), difracția de raze X (XRD) și spectroscopia vibrațională în infraroșu cu transformată Fourier (FTIR).

Aceste tehnici sunt utilizate pentru determinarea diferitelor proprietăți, cum ar fi dimensiunea, geometria, forma, cristalinitatea și caracteristicile suprafeței. De exemplu, morfologia și dimensiunea nanoparticulelor pot fi evidențiate prin TEM și SEM. Înălțimea și volumul particulelor pot fi măsurate folosind imagini tridimensionale obținute prin AFM. Determinarea dimensiunii particulelor se poate face prin împrăștiere dinamică a luminii (DLS). Cristalinitatea se

poate studia prin difracție de raze X, în timp ce spectroscopia de absorbție UV-Vis este utilizată pentru determinarea valorii rezonanței plasmonice [20].

#### 1.4.1. Spectroscopia de absorbție UV-vis

Spectroscopia de absorbție ultraviolet-vizibilă (UV-Vis) este o tehnică fundamentală utilizată pentru caracterizarea nanoparticulelor, în special a celor de metal nobile, deoarece acestea dau o colorație intensă și prezintă maxime de absorbție datorate oscilațiilor plasmonilor de suprafață. Aceste nanoparticule posedă un coeficient de extincție ridicat, iar caracteristicile plasmonilor de suprafață sunt dependente de dimensiune și formă. Conform legii lui Beer, absorbanta (**A**) este dată de ecuația (3) :

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l \quad (3)$$

unde  $\varepsilon$  este coeficientul de extincție, **c** este concentrația de nanoparticule și **l** este lungimea drumului optic. Astfel pot fi obținute informații cantitative despre soluția de nanoparticule.

Analiza UV-Vis poate fi efectuată pe nanoparticule metalice dispersate într-un solvent sau încorporate într-o matrice izolatoare. În astfel de cazuri, absorbția radiațiilor incidente are loc datorită rezonanței plasmonice de suprafață (SPR) a nanoparticulelor metalice [21]. Trebuie luat în considerare faptul că banda SPR este caracteristică nanoparticulelor metalice, nefiind observată în spectrul omologilor lor macroscopici.

Poziția benzii de rezonanță a plasmonilor de suprafață depinde de mai mulți factori, cum ar fi dimensiunea și forma nanoparticulelor, natura agentului de stabilizare, temperatura, gradul de agregare, prezența moleculelor adsorbite pe suprafața nanoparticulelor, precum și natura mediului în care se află [22]. Banda de rezonanță a plasmonilor de suprafață manifestă o deplasare spre roșu a poziției sale pe măsură ce dimensiunea particulelor crește [23]. Culoarea nanoparticulelor de aur se modifică de la roșu rubiniu la violet și în cele din urmă la albastru odată cu creșterea dimensiunii. Când distanțele dintre particule devin mai mici decât diametrul lor mediu, particulele formează un agregat, astfel încât rezonanța plasmonică a fiecărei perechi de particule și absorbanta lor este deplasată spre roșu. Dependența de dimensiune a rezonanței plasmonilor este un fenomen cu importanță deosebită pentru aplicațiile din domeniul biodetecției.

#### 1.4.2. Spectroscopie în infraroșu cu transformată Fourier (FTIR)

FTIR este o tehnică ce se bazează pe vibrațiile atomilor dintr-o moleculă. Spectrul infraroșu al unei probe este obținut prin pătrunderea radiațiilor infraroșii în probă și prin determinarea cantității de radiație incidentă absorbită la o anumită frecvență. Legăturile chimice dintr-o moleculă aflată

în diferite medii absorb radiația incidentă la o lungime de undă bine definită. Astfel, spectroscopia IR presupune colectarea informațiilor legate de absorbția radiației incidente și analizarea acestora sub forma unui spectru. În acest spectru, frecvențele radiației infraroșii absorbite (peakurile) pot fi direct corelate cu legăturile chimice existente în molecula investigată. Deoarece fiecare legătură interatomică poate vibra în mai multe moduri (stretching, bending, etc.), legăturile individuale pot absorbi la mai multe frecvențe IR. Vibrațiile de întindere produc peak-uri mai intense decât cele de îndoire.

Un avantaj major al spectroscopiei IR este posibilitatea examinării unei game largi tipuri de probe (solide, lichide, gaze, pulberi, fibre și filme).

Chimia suprafeței nanoparticulelor poate fi examinată folosind măsurători FTIR. Agenții de stabilizare sau de acoperire atașați la suprafața nanoparticulelor metalice prezintă un spectru IR care este diferit de cel al grupărilor libere. Prin urmare, FTIR oferă informații legate de chimia suprafeței nanomaterialelor [24].

### 1.4.3. Difracția de raze X (XRD)

Difracția cu raze X este o tehnică non-distructivă utilizată pentru identificarea structurii cristaline a nanoparticulelor. Când razele X interacționează cu un cristal, se produce un model de difracție ca rezultat al interacțiunii dintre razele X incidente și structura atomică a solidului. Fiecare solid cristalin are o structură atomică unică generând un model de difracție de raze X specific. Aceste modele pot fi folosite ca "amprente" pentru identificarea structurii cristaline a probei. Proba sub formă de pulbere este plasată pe un suport și apoi iradiată cu raze X de o lungime de undă bine definită, măsurându-se apoi intensitatea radiației reflectate. Aceste date sunt analizate în funcție de unghiul lor de reflexie pentru a calcula distanța interatomică ( $d$ ), utilizând ecuația Bragg (4) :

$$n\lambda = 2d \sin \theta \quad (4)$$

Unde  $n$  este un număr întreg (1, 2, 3, .....  $n$ ),  $\lambda$  este lungimea de undă a razelor X,  $d$  este distanța dintre planurile atomice și  $\theta$  este unghiul de incidență al fasciculului de raze X. Spectrul XRD al nanoparticulelor metalice prezintă peak-uri intense de difracție. Prin compararea standardelor de referință cu modelul de difracție obținut pentru proba analizată este posibilă identificarea structurii cristaline a nanoparticulelor. Analiza XRD oferă de asemenea informații legate de dimensiunea cristalitului, folosind ecuația Debye-Scherrer (5):

$$d = K\lambda / \beta \cos \theta \quad (5)$$

unde  $d$  este dimensiunea medie a cristalului,  $K$  este constanta Scherrer,  $\lambda$  este lungimea de undă a razelor X,  $\beta$  este lățimea la jumătatea maximului iar  $\theta$  este unghiul Bragg [25].

#### 1.4.4. Microscopia electronică

În microscopia electronică în transmisie (TEM), soluțiile coloidale conținând nanoparticule de aur sunt dispersate pe un substrat relativ transparent pentru electroni (de ex. o micro-rețea subțire acoperită cu carbon), diferența mare de densități electronice oferind un bun contrast între atomii de metal și liganzii sau polimerii organici. Tehnica TEM de înaltă rezoluție (HRTEM) oferă o rezoluție de ordinul angstromilor și furnizează informații legate de modul de asamblare al atomilor de metal și nu neapărat de morfologia globală a particulelor metalice. Folosind microscopia electronică în transmisie prin scanare (STEM - scanning transmission electron microscopy), fasciculul de electroni este proiectat pe probă, oferind astfel informații structurale suplimentare. Atunci când tehnica este combinată cu un câmp întunecat inelar de unghi înalt (HAADF - high-angle annular dark field), se pot distinge diferite modele structurale ale nanoparticulelor metalice de aliaj, mai ales dacă metalele componente au numere atomice semnificativ diferite. În microscopia electronică prin scanare (SEM), imaginea apare în urma emisiei de electroni secundari care au fost excitați de un fasciculul de electroni. Rezoluția SEM este mai mică decât cea a TEM-ului, dar SEM-ul este mai eficient atât în imagistica probelor macroscopice, cât și în crearea unei profunzimi vizuale mai bune. Această proprietate conduce la obținerea unor imagini 3D mai fiabile.

În 1977, Horisberger și Rosset au demonstrat că particulele coloidale de aur au o dimensiune potrivită care să le permită utilizarea ca markeri denși de electroni pentru structurile biologice investigate prin microscopie electronică în transmisie și microscopie electronică prin scanare. Soluțiile coloidale de aur au fost preparate folosind granule de aur marcate cu un monostrat de macromolecule specifice. Metoda dezvoltată de ei s-a dovedit a fi simplă și rapidă întrucât granulele de aur au fost marcate cu polizaharide și proteine. Mai mult, metoda este potrivită și pentru experimente de marcarea dublă deoarece prin intermediul ei se pot genera populații omogene de granule de aur de dimensiuni diferite. Această tehnică este posibilă prin localizarea polizaharidelor și a glicoproteinelor pe pereții celulelor de drojdie și pe membranele eritrocitelor folosind microscopia electronică în transmisie și pe celulele de drojdie și eritrocite intacte folosind microscopia electronică prin scanare. În toate cazurile s-a obținut o rezoluție spațială bună. Metoda este potrivită și pentru marcarea secțiunilor subțiri [26].

### 1.4.5. Împrăștierea dinamică a luminii

Împrăștierea dinamică a luminii (DLS - Dynamic Light Scattering) este o tehnică ce măsoară intensitatea luminii reflectate de particulele dintr-o soluție coloidală. Intensitatea luminii reflectate se va modifica pe măsură ce particulele efectuează o mișcare browniană și se vor îndepărta de pozițiile lor inițiale. Viteza acestui proces depinde de raza hidrodinamică a particulelor (presupunând că particulele sunt sferice) [27].

Măsurătorile DLS oferă de obicei două tipuri de informații: unele legate de dimensiunea particulelor, iar altele de potențialul lor zeta ( $\zeta$ ). În ambele cazuri este analizată lumina împrăștiată a unui laser ca urmare a interacțiunii sale cu particulele din soluție. Pentru măsurarea dimensiunii particulelor, lumina împrăștiată este colectată de obicei la un unghi de  $13^\circ$  sau de  $173^\circ$ , determinându-se fluctuațiile în intensitate datorate mișcării browniene. Pe măsură ce particulele se mișcă, interferența constructivă și distructivă a luminii împrăștiată va genera fluctuații ale intensității radiației împrăștiată. Prin analiza corelată în timp a fluctuațiilor de intensitate, este posibilă obținerea distribuției dimensiunii nanoparticulelor existente în soluția coloidală [16].

Potențialul  $\zeta$  este o măsură a sarcinii electrice a nanoparticulelor; el poate fi considerat ca reprezentând diferența de potențial dintre mediul de dispersie și partea externă a stratului staționar de fluid complexat în jurul nanoparticulei. Această valoare oferă o indicație legată de stabilitatea sistemului coloidal (în mod normal, soluțiile coloidale cu valori mai mari de +30 mV respectiv mai mici de -30 mV sunt considerate stabile). Ea este de obicei dependentă de pH-ul soluției. Potențialul  $\zeta$  se calculează determinând mobilitatea electroforetică și aplicând apoi ecuația lui Henry. Mobilitatea electroforetică se obține prin efectuarea unui experiment de electroforeză pe o probă lichidă într-o cuvă capilară standard, măsurând viteza particulelor folosind metoda laser Doppler (LDV). În general, un LDV colectează lumina împrăștiată la  $17^\circ$  și o combină cu fasciculul de referință. Acest proces generează un semnal fluctuant de intensitate. Rata de fluctuație este proporțională cu viteza particulelor și cu valoarea potențialului  $\zeta$  (conform ecuației lui Henry). O modificare a moleculelor aflate pe suprafața metalului influențează sarcina totală și/sau raza hidrodinamică a unei nanoparticule, astfel fiind posibilă obținerea și de informații legate de modificările apărute la suprafața nanoparticulelor [16].

### 1.4.6. Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)

Dezvoltarea recentă a tehnicii de analiză de urmărire a nanoparticulelor (NTA) oferă capacitatea de a vizualiza și contoriza în mod direct nanoparticulele aflate într-o suspensie lichidă. Datorită



faptului că această tehnică poate analiza simultan și individual o populație de nanoparticule, ea este ideală pentru analiza în timp real a sistemelor polidisperse cu dimensiuni cuprinse între 10-20 nm și 1-2 micrometri (în funcție de tipul particulelor). Parametrii și măsurătorile suplimentare permit utilizatorilor să obțină informații despre concentrația de nanoparticule, potențialul zeta, intensitatea relativă a luminii împrăștiată și, de asemenea, să vizualizeze și să analizeze particulele marcate fluorescent [28].

Fiecare particulă este vizualizată și analizată separat, iar estimarea dimensiunii particulelor și a distribuției mărimii lor nu este condiționată de existența unei distribuții medii z ponderate în funcție de intensitate. Capacitatea NTA de a măsura simultan dimensiunea și intensitatea împrăștierii luminii de către acestea permite analiza amestecurilor eterogene de particule și estimarea directă a concentrației de particule. Profilul de distribuție a dimensiunii particulelor astfel obținut reprezintă o distribuție directă număr/frecvență [29].

Particulele din suspensia lichidă sunt încărcate într-o cameră de probă, care este iluminată de un fascicul laser. Particulele din calea fasciculului împrăștie lumina laser care este colectată de obiectivul microscopului și este apoi vizualizată cu o cameră digitală. Camera surprinde un videoclip cu particulele care se mișcă sub acțiunea mișcării browniene. Software-ul echipamentului analizează atât individual cât și simultan (particulă cu particulă) particulele. Pe baza ecuației Stokes Einstein, aparatul va calcula diametrele hidrodinamice ale acestora [30].

#### 1.4.6. Enhanced Darkfield Hyperspectral Microscopy

Un microscop hiperspectral este unic prin capacitatea sa de a capta date spectrale optice în fiecare pixel al imaginii specimenului microscopic. Microscopul hiperspectral permite evaluarea spectrală comparativă, cartografierea spectrală și alte analize ale diferitelor elemente dintr-o probă. Aceste probe pot include materiale fluorescente, plasmonice sau alte materiale care împrăștie lumina cum ar fi celulele și țesuturile vii [31].

Microscopia în câmp întunecat care permite achiziția de imagini hiperspectrale (HSI - Hyperspectral Imagery) este o abordare optică nouă, cu un mare potențial aplicativ în disciplinele biologice, deoarece ea permite identificarea și determinarea cantitativă a componentelor specifice din mediul biologic. Microscopia în câmp întunecat ia în considerare doar lumina reflectată de la probă, eliminând astfel zgomotul de fundal. Microscopia în câmp întunecat oferă un contrast ridicat care permite vizualizarea probelor cu contrast redus. Se bazează pe iluminarea indirectă a specimenului și, ca urmare a interacțiunii cu proba, colectează doar lumina reflectată sau împrăștiată elastic. Un disc de dimensiuni speciale blochează iluminarea astfel încât numai razele



oblice lovesc proba, permițând astfel vizualizarea distinctă a obiectelor cu indici de refracție similari cu fundalul. Această ultimă caracteristică este de interes în special pentru examinarea microscopică a probelor biologice care nu sunt marcate cu substanțe de contrast [32].

HEDFM (Hyperspectral-Enhanced Dark Field Microscopy) este o tehnică cu rezoluție ridicată care permite evaluarea optică in situ și o caracterizare spectrală a unei game largi de nanomateriale, deoarece acestea interacționează atât cu matricele biologice, cât și cu cele nonbiologice. Interacțiunea unică dintre lumină și materie generează profile caracteristice de lumină împrăștiată, care pot servi drept semnături spectrale pentru fiecare țintă. Iluminarea câmpului întunecat, bazată pe un condensator cardioid inelar și o lumină puternic colimată în unghiuri oblice pe probă, generează imagini cu contrast îmbunătățit și raport semnal-zgomot de până la zece ori mai mare decât optica convențională de câmp întunecat. Sistemul constă dintr-un spectrofotometru vizibil în infraroșu apropiat (NIR - Near Infrared) atașat la o cameră CCD, conectată la microscop. Figura 1.11 oferă o schemă generalizată a sistemului și a dispozitivului de achiziție de date. Această tehnologie folosește iluminarea de la o sursă de lumină cu tungsten-halogen capabilă să funcționeze într-un interval spectral cuprins între 400nm și 1000nm,  $\Delta\lambda < 4.69$  nm și o rezoluție spațială limitată de condiția de difracție atingând o dimensiune a pixelului de câțiva nanometri (pentru obiectivul 100X). Colecția de imagini împreună cu software-ul de analiză oferă dovezi ale existenței nanoparticulelor prin colectarea tuturor datelor spectrale în infraroșu apropiat din fiecare pixel al zonei scanate, stocând semnăturile spectrale unice ale elementelor selectate și permițând astfel formarea unei baze de date. În cele din urmă, semnăturile spectrale din baza de date a bibliotecii pot fi urmărite pe probele recent scanate, permițând astfel identificarea de înaltă precizie a elementului [32].

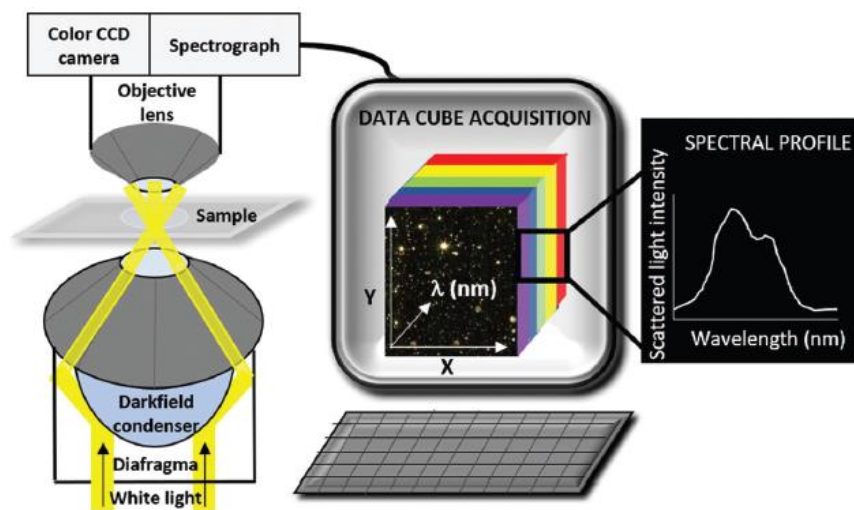


Figura 1.11. Diagrama generalizată a sistemului HEDFM. Ilustrare schematică a configurației experimentale bazată pe optica câmpului întunecat cuplată cu spectrograf (stânga), și pe achiziția cubului de date hiperspectrale pentru analiză (dreapta). Fiecare pixel din câmpul vizual oferă informații spectrale complete în fereastra optică, de la 400nm până la 1000nm [32].

## II. Materiale și metode

### II.1. Prepararea AuNPs

Sinteza nanoparticulelor de aur s-a realizat folosind metoda Turkevich . Astfel, într-un borcan Duran rezistent la presiune s-au dizolvat 1.4g PEG 1000 și 1.5mL NaOH 1% într-un volum de 48mL de apă ultrapură (Figura 2.1). După omogenizarea soluției, s-au adăugat 550μL H[AuCl<sub>4</sub>] de concentrație 128mM.

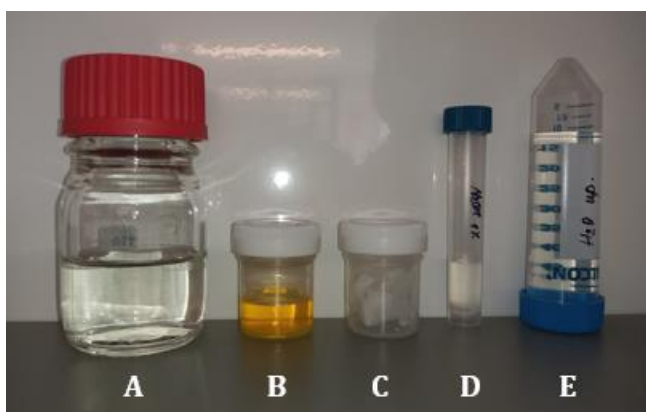


Figura 2.1. A – borcan Duran rezistent la presiune, B – soluție H[AuCl<sub>4</sub>] 128 mM, C – PEG 1000, D – soluție NaOH 1%, E – apă ultrapură.

La scurt timp, amestecul rezultat a fost introdus într-un cuptor cu microunde (Biowave Pro +, 750W, PELCO ®) la temperatura de 50°C, timp de două minute (Figura 2.2). După aproximativ 90 de secunde, soluția transparentă a căpătat o culoare roșu rubiniu, ceea ce indică sinteza cu succes a coloidului de aur [33].

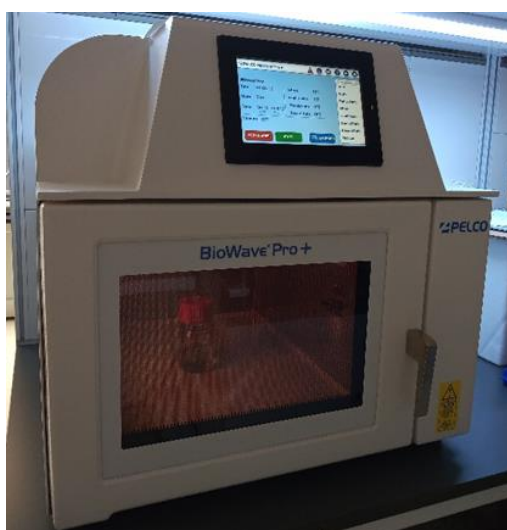


Figura 2.2. Sinteza nanoparticulelor de aur cu ajutorul cuptorului cu microunde.

În vederea obținerii unui volum total de 100mL de soluție coloidală, procesul descris mai sus s-a efectuat de două ori (Figura 2.3).



Figura 2.3. Soluția de nanoparticule de aur obținută.

## II.2. Filtrarea în flux tangențial (TFF – Tangential Flow Filtration)

Filtrarea în flux tangențial s-a realizat în vederea eliminării impurităților și a produșilor nereacționați, precum și pentru concentrarea soluției coloidale de nanoparticule de aur.

Cei 100mL de soluție au fost trecuți printr-un filtru de 10kD cu membrană de celuloză, obținându-se astfel o soluție concentrată de 10 ori. Ciclul de filtrare s-a repetat de încă două ori prin adăugarea a câte 90mL de apă la fiecare ciclu.



Figura 2.4. Filtrarea în flux tangențial la viteza de 80 de rotații/secundă. Permeatul a fost colectat într-un pahar Berzelius.



Figura 2.5. Soluția AuPEG 1000 rezultată în urma filtrării.

## II.3. Caracterizarea AuNPs

AuNPs obținute au fost caracterizate morfologic în vederea determinării formei și dimensiunii. Au fost evaluate și potențialul de suprafață respectiv proprietățile optice cu ajutorul următoarelor metode :

1. Spectrofotometrie UV-Vis ;
2. TEM (Microscopie electronică în transmisie (TEM)) ;
3. NTA (Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)).

### II.3.1 Spectrofotometrie UV-vis

#### **Materiale**

- Consumabile: cuvete de quartz pentru măsurarea fluorescenței (Hellma), pipete de 100 și 1000 $\mu$ L (Eppendorf), vârfuri de 100 și 1000 $\mu$ L (Eppendorf);
- Echipament: spectrofotometru Duetta (HORIBA Scientific, Kyoto, Japonia).

#### **Metode**

În vederea determinării spectrului de absorbție al AuNPs, ca probă control s-a folosit un volum de 3500 $\mu$ L apă ultrapură, iar pentru măsurarea probei s-au folosit 20 $\mu$ L de AuNPs diluate în același volum de apă ultrapură. Pentru înregistrarea absorbanței s-a utilizat spectrofotometrul Duetta (HORIBA Scientific, Kyoto, Japonia).

### II.3.2. Microscopie electronică în transmisie

#### **Materiale**

- Consumabile: griduri TEM tip B mesh 400, pipeta de 10 $\mu$ L (Eppendorf), vârfuri de 10 $\mu$ L (Eppendorf);
- Echipament: microscop electronic în transmisie Hitachi HT 7000 ( Hitachi Ltd. Tokyo, Japonia).

#### **Metode**

Pentru examinarea TEM, s-au pipetat picături de 5 $\mu$ L de soluție coloidală conținând AuNPs pe griduri de cupru învelite cu un strat subțire de carbon cu mesh de 400. După 15 minute, excesul de apă a fost îndepărtat folosind hârtie de filtru, iar proba a fost lăsată să se usuce la temperatura

camerei. Imaginile au fost achiziționate folosind un microscop electronic în transmisie Hitachi HT 7000 ( Hitachi Ltd. Tokyo, Japonia), 100kV, echipat cu o cameră CCD de 8 megapixeli de înaltă rezoluție.

### II.3.3. Nanoparticle Tracking Analysis

#### **Materiale**

- Consumabile: tuburi conice de 50mL (Nerbe), pipetă de 10 $\mu$ L (Eppendorf), vârfuri de 10  $\mu$ L (Eppendorf);
- Reactivi: nanoparticule latex standard pentru ZetaView® NTA (Particle Metrix, DE);
- Echipament: sistem ZetaView® NTA (Particle Metrix, DE).

#### **Metode**

Evaluarea concentrației, dimensiunii și a potențialului zeta al AuNPs s-a realizat cu ajutorul Nanoparticle Tracking Analysis (ZetaView® NTA, Particle Metrix, DE). Proba de nanoparticule s-a obținut prin diluarea soluției de nanoparticule cu un factor de 50000 în apă ultrapură.

## II.4. Experimentele *in vitro* pe culturi celulare

#### **Materiale**

- Linii celulare : LX2, SK-HEP-1 (ATCC) ;
- Medii de cultură și suplimente: DMEM HG (Dulbecco's Modified Eagle Medium High Glucose), MEM (Minimum Essential Media), FBS (ser fetal bovin), glutamină (Gibco, ThermoFisherScientific);
- Reactivi: PBS (Tampon fosfat salin), PFA (paraformaldehidă) (ThermoFisherScientific), DMSO (dimetilsulfoxid) (Sigma) ;
- Consumabile: plăci de 96 de godeuri (Eppendorf), chamberslide – plăci 8 godeuri (Ibidi), pipetă multicanal : 20 – 200 $\mu$ L, pipetă 1000 $\mu$ L (Eppendorf), vârfuri cu filtru 200 $\mu$ L, 1000  $\mu$ L (Eppendorf);
- Echipamente: cititor de microplăci (Tecan Spark 10m, Agilent), microscop hiperspectral Cytoviva Hyperspectral Imaging System.

#### **Metode**

Studiile experimentale *in vitro* s-au realizat pe două linii celulare: o linie normală (sănătoasă) - LX2 – celule hepatice stelate, respectiv o linie tumorală – SK-HEP-1 – celule epiteliale de adenocarcinom hepatic.

Pentru linia celulară LX2 s-a utilizat mediul de cultură DMEM cu o concentrație crescută de glucoză (DMEM HG), 10% FBS suplimentat cu 1% glutamină. Pentru linia celulară SK-HEP-1 s-a utilizat mediul de cultură MEM și 10% FBS. Ambele linii celulare au fost păstrate în condiții de 37°C și în atmosferă de CO<sub>2</sub> în incubator.

#### II.4.1. Evaluarea efectului AuNPs asupra viabilității celulare

Ambele linii celulare au fost însămânțate în plăci de 96 de godeuri, cu 10 000 celule/godeu, în volum de 200μL. Celulele au fost incubate la 37°C peste noapte, iar ziua următoare s-au adăugat tratamentele. AuNPs au fost diluate cu mediul de cultură specific fiecărei linii celulare, în godeuri adăugându-se AuNPs în concentrații de la  $3.9 \times 10^9$  –  $10^{11}$  NP/mL (Figura 2.6). Testele de viabilitate s-au efectuat la trei timpi: 24h, 48h și 72h.



Figura 2.6. Tratamentul cu AuNPs. De la dreapta la stânga - concentrații crescânde de AuNPs.

##### II.4.1.1. Protocol test de viabilitate celulară

Mediul de cultură a fost îndepărtat, iar peste celule s-au adăugat 200μL MTT 1mg/mL urmând o etapă de incubare timp de 3h la 37°C. După 3h soluția MTT ( 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) s-a îndepărtat și s-au adăugat 100μL DMSO. Plăcile au fost acoperite cu folie de aluminiu și apoi incubate cu agitare pentru 5 minute la 37°C. În continuare s-a măsurat absorbanta la 570nm cu ajutorul cititorului de microplăci (Tecan Spark 10m, Agilent). Rezultatele se prelucrează cu softul GraphPad Prism 6. În figura 2.7 sunt reprezentate etapele protocolului MTT.



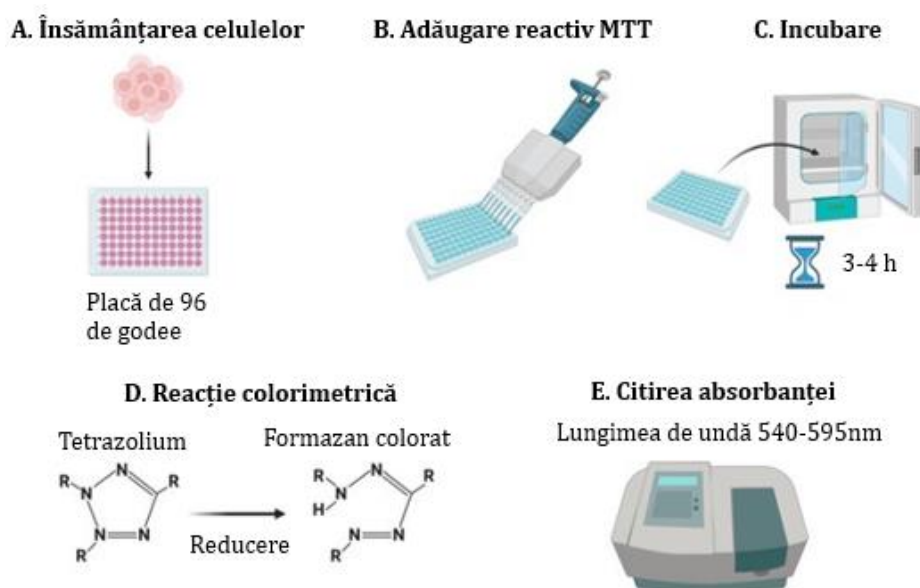


Figura 2.7. Prezentare schematică a protocolului test MTT [34].

#### II.4.2. Monitorizarea internalizării AuNPs prin microscopie hiperspectrală și în câmp întunecat

##### Pregătirea probelor

În plăcile de 8 godeuri s-au însămânțat câte 10 000 celule/godeu, iar în următoarea zi s-au adăugat AuNPs la următoarele concentrații :  $3.9 \times 10^3$  ,  $3.9 \times 10^5$  ,  $3.9 \times 10^7$  NPs/godeu pentru primul set de probe (Figura 2.8), respectiv  $3.9 \times 10^9$  ,  $15 \times 10^9$  ,  $62.5 \times 10^9$  NPs/godeu pentru al doilea set de probe.

A



B

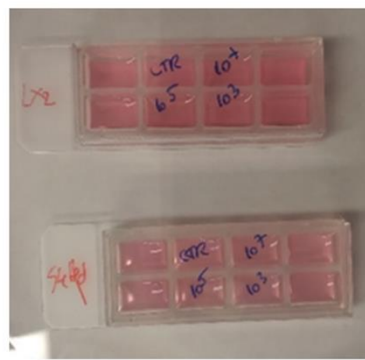


Figura 2.8. Pregătirea unei probe. (A) Soluțiile diluate de AuNPs. (B) Plăcile de 8 godeuri - sus, linia LX2 ; jos, linia SK-HEP-1.

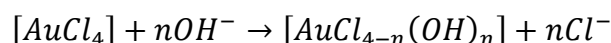


După 48h celulele au fost fixate chimic cu paraformaldehidă de concentrație 4%. S-a îndepărtat mediul de cultură, s-au realizat 3 spălări cu PBS1X, după care s-au adăugat 100 $\mu$ L PFA, iar celulele s-au lăsat la incubat timp de 15 minute la temperatura camerei. PFA în exces s-a îndepărtat prin 3 spălări succesive cu PBS la finalul timpului de incubare. Ulterior, s-au îndepărtat inserturile de silicon și peste probă s-a montat o lamelă folosind o soluție de glicerol. Proba astfel pregătită a fost analizată imagistic la microscopul hiperspectral Cytoviva Hyperspectral Imaging System.

### III. Rezultate și discuții

#### III.1. Rolul NaOH în sinteza AuNPs

Înainte de introducerea amestecului reactant în cuptorul cu microunde, s-a observat că nuanța galben pal a soluției diluate de acid tetracloroauric (III) a devenit instantaneu incoloră după adăugarea soluției de NaOH. Conform unor studii anterioare [35–37], aceasta este o dovadă a faptului că a avut loc o reacție de schimb de liganzi, reacție care implică ionul tetracloroaurat (III). Pe scurt, unul sau mai mulți ioni de clorură din complexul tetracloroaurat au fost înlocuiți de ionii de hidroxid conform reacției:



([36]), conducând la o scădere a intensității fenomenului de tranziție a transferului de sarcină ligand la metal respectiv la pierderea culorii galbene a complexului, fapt observat și în spectrele de absorbție [35–37]. Având în vedere faptul că derivații hidroxi-aur(III) au potențiale de reducere mai mari comparativ cu ionii de tetracloroaurat(III) [38] și că excesul de ioni de hidroxid ar putea favoriza deprotonarea mai multor intermediari de reacție cu o schimbare consecutivă a echilibrului chimic către formarea produșilor de oxidare, se poate concluziona faptul că mediul de reacție alcalină induce oxidarea moleculei PEG 1000 relativ stabilă. Ca o dovadă suplimentară a acestei concluzii, s-a observat că sinteza PEG-AuNPs poate avea loc numai după adăugarea de NaOH în amestecul de reacție. Mai mult decât atât, în absența PEG, reducerea H  $[AuCl_4]$  nu are loc [33].

#### III.2. Măsurătorile UV-vis

Spectrul de absorbție UV-Vis al AuNPs coloidale preparate prezintă o bandă de absorbție îngustă și bine definită, având maximum de absorbție în jurul valorii de 525nm, ceea ce indică o distribuție îngustă a dimensiunii și formei AuNPs imediat după sinteză (Figura 3.1). Valoarea maximumului de absorbție a rezonanței plasmonilor de suprafață (SPR) este specifică AuNPs sferice fiind generată de interacțiunea dintre lumina incidentă și electronii de conducție ai nanoparticulei metalice sferice [39].

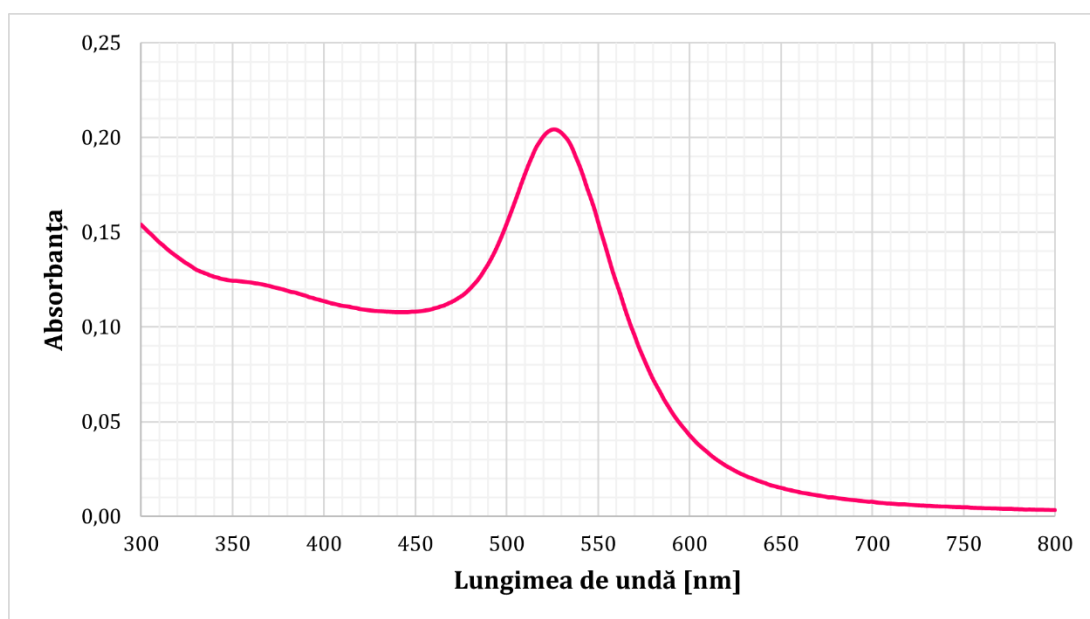


Figura 3.1. Spectrul de absorbție al AuPEG1000.

### III.3. Măsurătorile TEM

Imaginile TEM ale coloidului indică prezența unor nanoparticule de aur sferice bine definite (Figura 3.2 A), confirmând faptul că metoda de sinteză utilizată poate genera într-o perioadă foarte scurtă de timp nanoparticule sferice de aur acoperite cu o peliculă uniformă de molecule de PEG1000 având o grosime de 3 - 4nm (Figura 3.2 B). Analiza statistică reflectă o distribuție a dimensiunilor AuNPs situată în jurul valorii medii de 20nm (Figura 3.3).

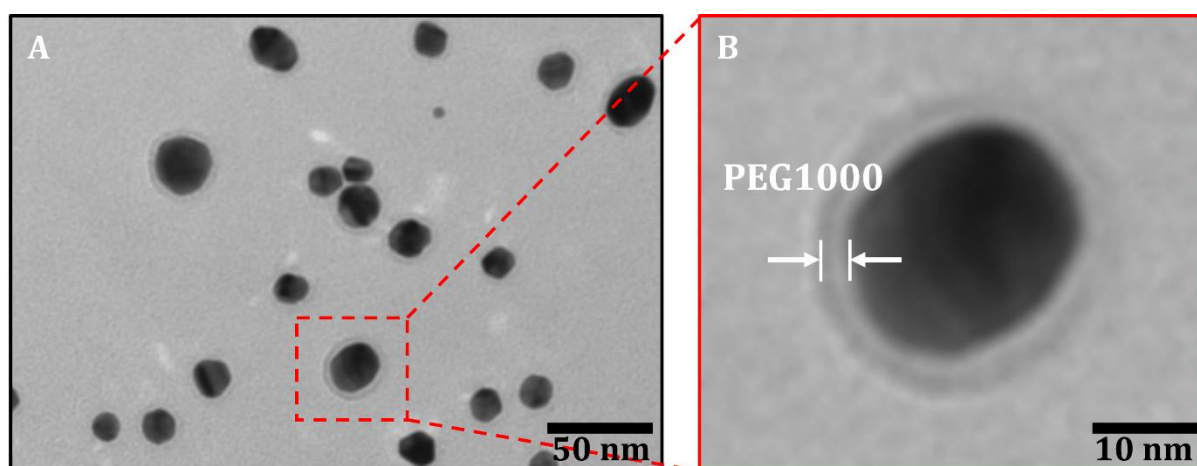


Figura 3.2.(A) Imagine TEM a coloidului de aur. (B) Imagine TEM a unei nanoparticule de aur individuale.

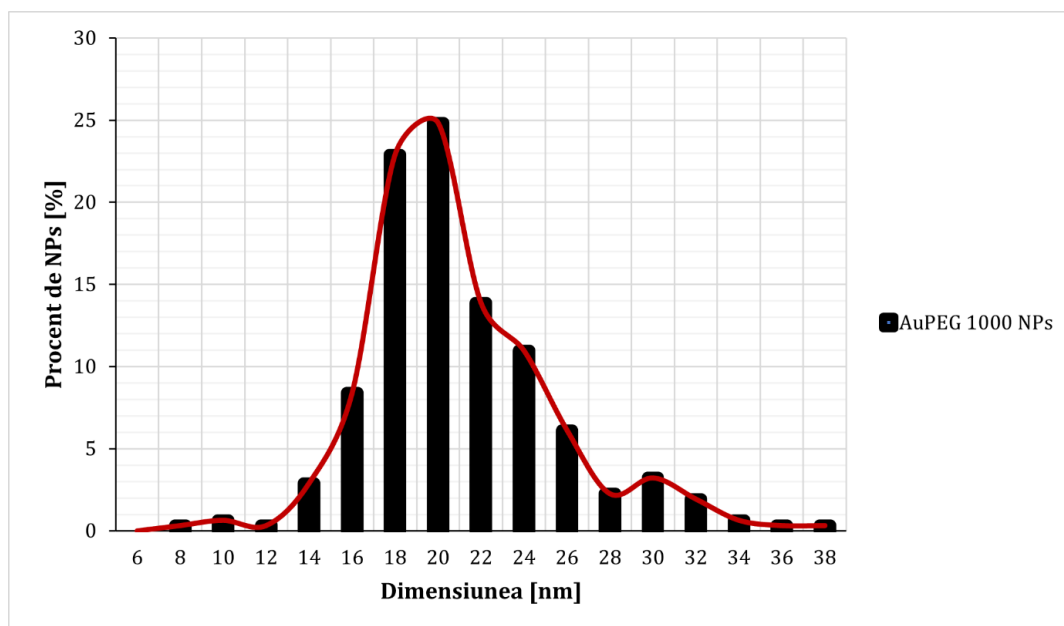


Figura 3.3. Distribuția dimensiunilor nanoparticulelor de aur obținută din analiza statistică a imaginilor TEM.

### III.4. Nanoparticle Tracking Analysis

Măsurătorile NTA au indicat un diametru hidrodinamic al AuNPs de circa 53 nm în proporție de 69,3% și unul de 102,4nm în proporție de 30,6%. Diferențele față de măsurătorile TEM sunt date de prezența unui înveliș molecular pe suprafața exterioară a PEG-AuNPs, slab vizibil, dar totuși detectabil în imaginea TEM a unei nanoparticule individuale (Figura 3.2 (B)). Prezența unui înveliș de suprafață a fost confirmată și de măsurătorile potențialului zeta. Rezultatele obținute au indicat un potențial zeta negativ cu o valoare medie de -20,4 mV.

Diametru [nm]	Procent [%]
53.1	69.3
102.4	30.6

Tabelul 3.1. Distribuția diametrului PEG-AuNPs (conform Anexei 1).

Potențial Zeta [mV]	Procent [%]
-20.4	46.4
-13.9	19.7
-7.5	14.4
0.5	12
-37.3	7.5

Tabelul 3.2. Potențialul Zeta al PEG-AuNPs (conform Anexei 2).

### III.5. Analiza efectului AuNPs asupra viabilității celulare cu ajutorul testului MTT

Testul MTT s-a realizat cu scopul de a monitoriza citotoxicitatea, viabilitatea și rata de proliferare a celulelor pe durata expunerii la tratamentul cu AuNPs. Acest test este frecvent utilizat pentru a caracteriza activitatea metabolică a celulelor în diferite condiții. Din punct de vedere chimic, testul reflectă capacitatea oxireductazelor NAD (P) – H dependente de a reduce MTT la formazan, un compus insolubil de culoare violet (Figura 3.3).

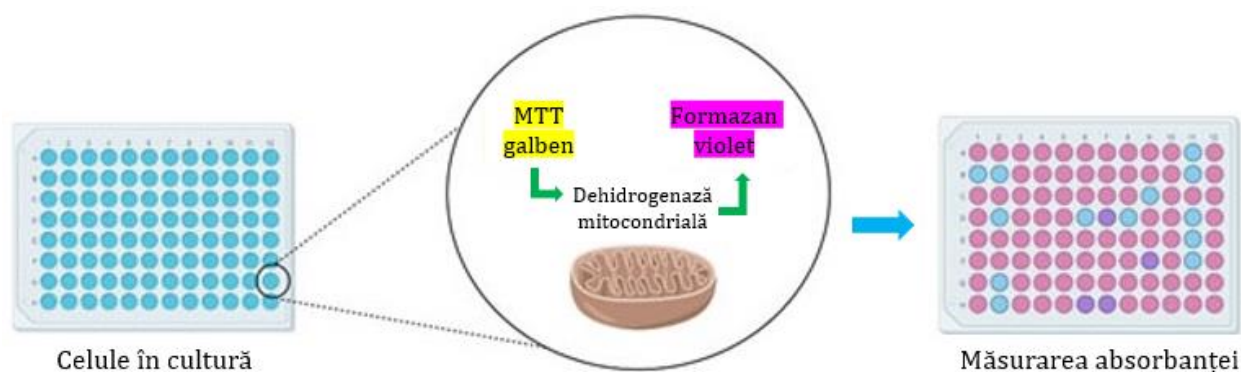


Figura 3.4. Mecanismul testului MTT [34].

Rezultatele testelor MTT la cei trei timpi sunt prezentate în figurile 3.5 – 3.7. Graficele indică o ușoară scădere a viabilității celulelor din ambele linii pe măsura creșterii timpului de expunere la tratamentul cu AuNPs. Deși diferențele observate între evoluția în timp a viabilității liniei LX2 și cea a liniei SK-HEP-1 nu sunt majore, ele reflectă o rezistență mai mare la tratament a celulelor tumorale față de celulele sănătoase.

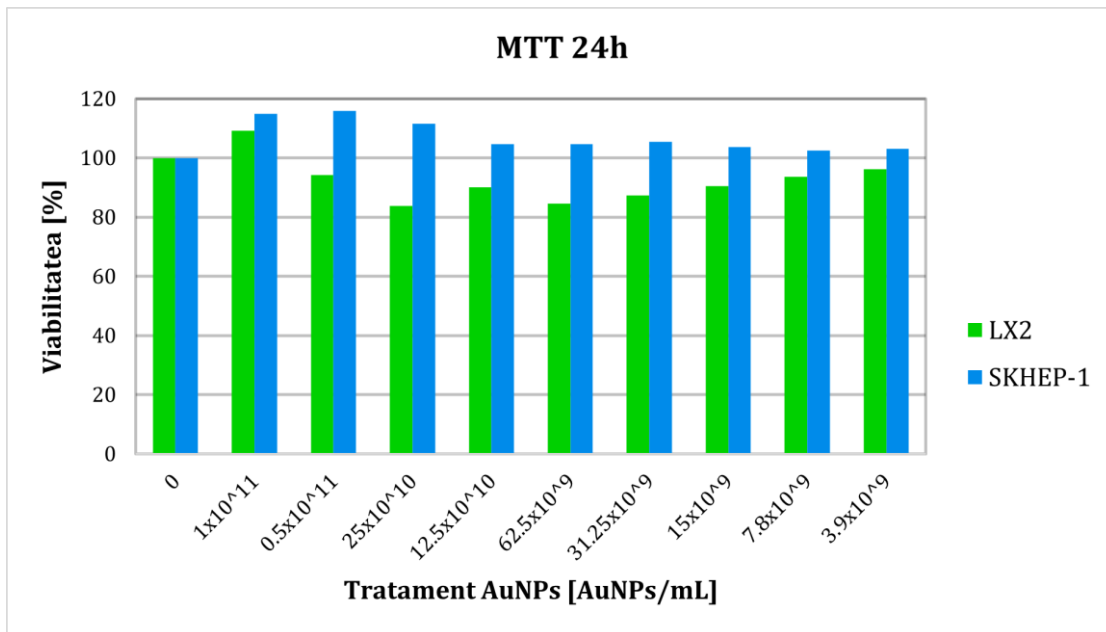


Figura 3.5. Viabilitatea celulară la 24h.

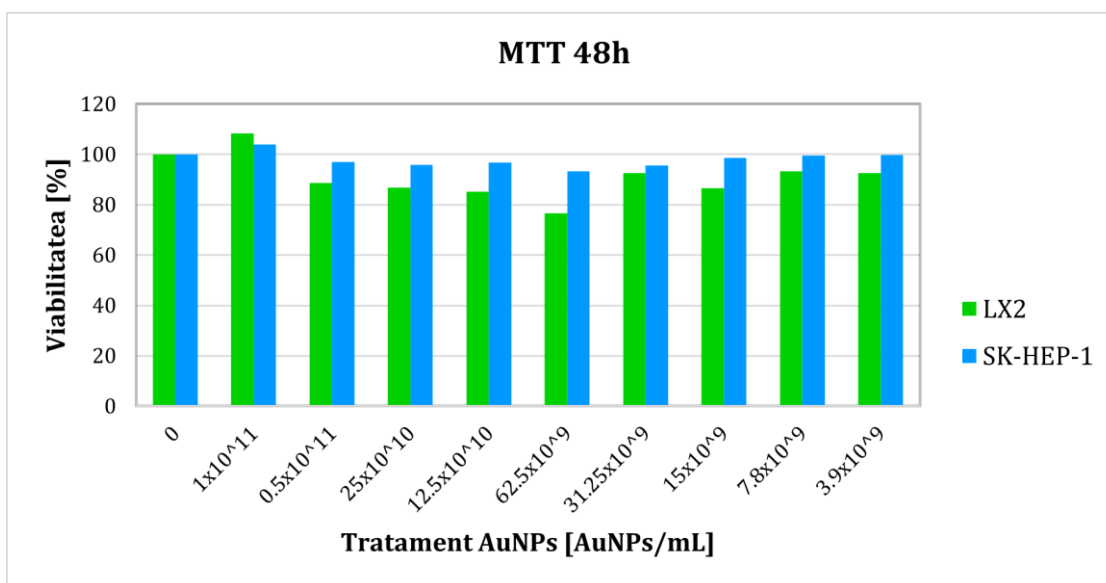


Figura 3.6. Viabilitatea celulară la 48h.

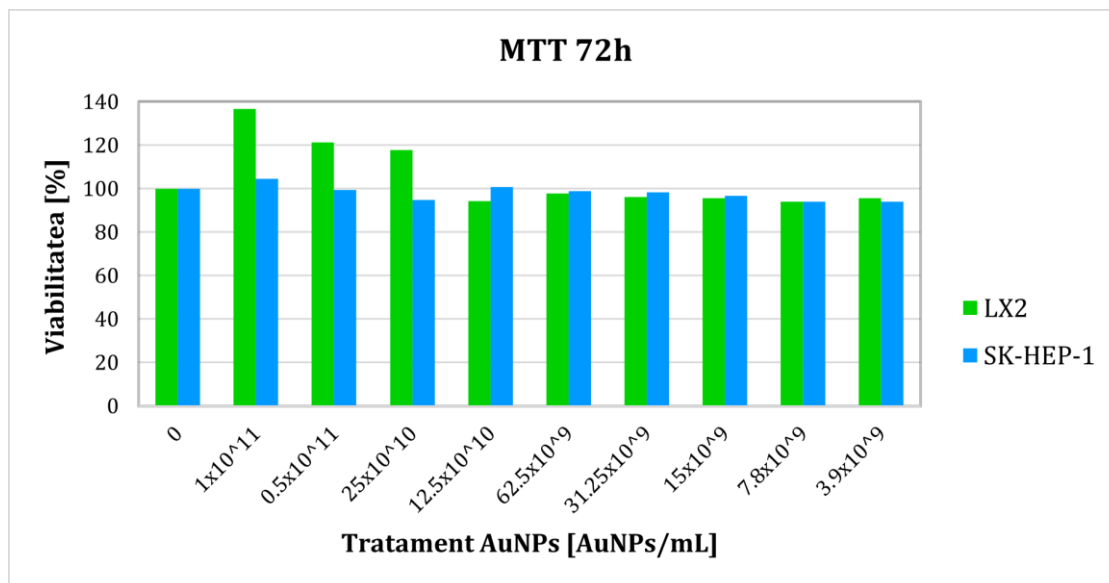


Figura 3.7. Viabilitatea celulară la 72h.

### III.6. Evaluarea internalizării AuNPs prin microscopie hiperspectrală și în câmp întunecat

Mediile celulare prezintă o variație a compoziției chimice datorată structurilor celulare diferite. Figura 3.8 ilustrează comportamentul AuNPs în mediul extracelular, iar figurile 3.9 și 3.10 pe cel în mediul intracelular. Profilul spectral al celulelor diferă în mod apreciabil față de cel al nanoparticulelor, permițând astfel diferențierea optică și spectrală între cele două.

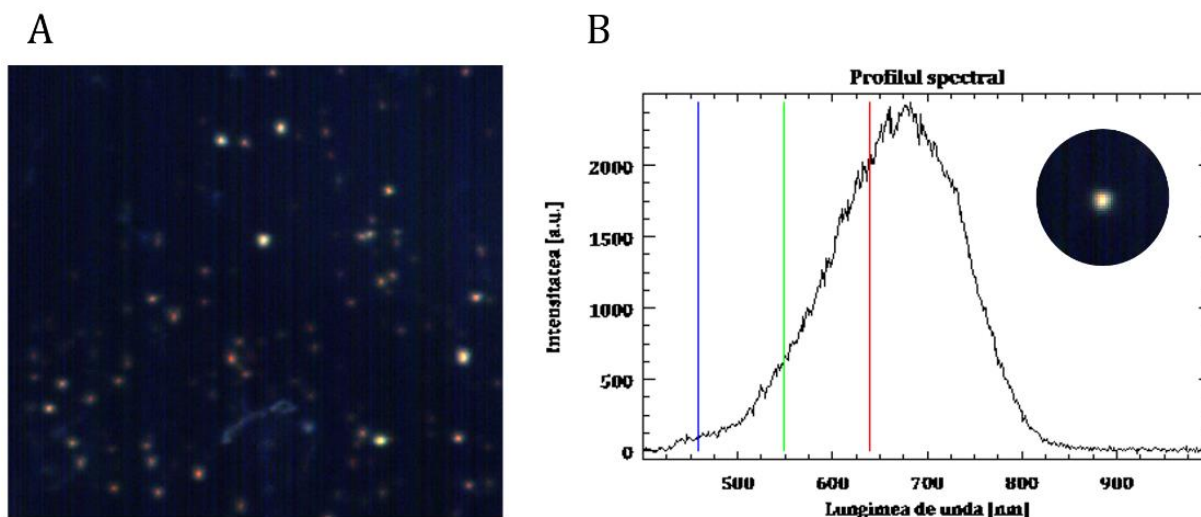


Figura 3.8. (A) Imagine hiperspectrală a AuNPs în mediu extracelular. (B) Profilul spectral al unei nanoparticule selectate aleator.

Profilul spectral al AuNPs în mediul extracelular al liniei LX2 indică o bandă cu maximum situat la valoarea de 682nm (Figura 3.8B), în timp ce spectrul celulei prezintă o bandă largă peste

domeniul vis-NIR (Figura 3.9B). Răspunsurile optice ale AuNPs în diferite regiuni ale celulei sunt influențate de localizarea acestora în urma internalizării. Astfel, se pot observa deplasări spectrale ale benzii de maxim la valorile de 660nm (Figura 3.9C) și 613nm (Figura 3.9D) față de valoarea maximă de 682nm a particulelor din mediul extracelular.

Nu s-au observat diferențe substanțiale în profilul spectral al AuNPs din linia celulară SK-HEP-1 față de linia LX2.

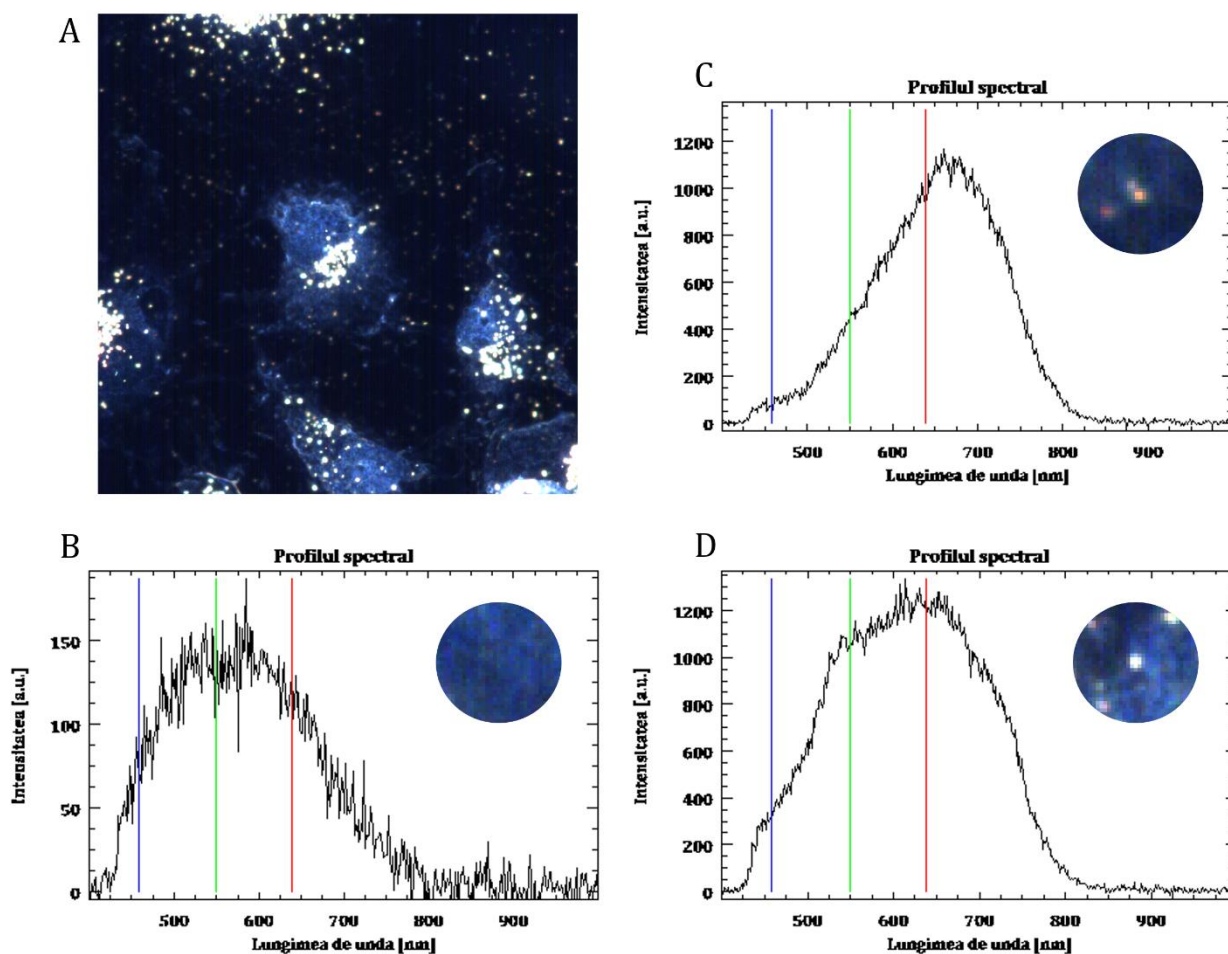


Figura 3.9. Comportamentul spectral al AuNPs în mediul intracelular al liniei LX2. (A) Imagine hiperspectrală a celulelor expuse la tratament cu AuNPs. (B) Semnătura spectrală a membranei nucleare. (C) - (D) Răspunsuri spectrale diferite ale AuNPs în mediul intracelular. Imaginile hiperspectrale au fost achiziționate cu sistemul CytoViva și procesate cu software-ul ENVI 4.8.



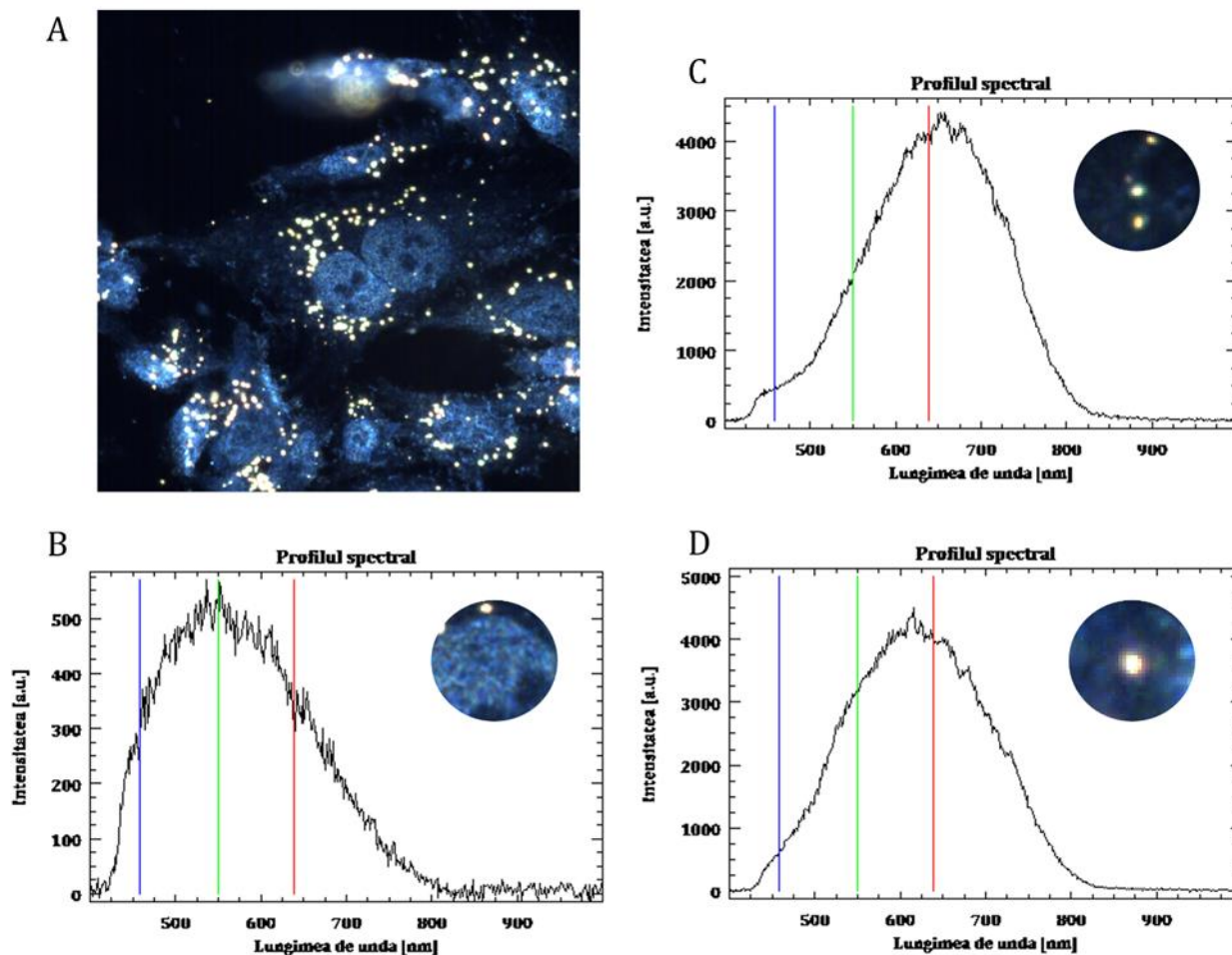


Figura 3.10. Comportamentul spectral al AuNPs în mediul intracelular al liniei SK-HEP-1. (A) Imagine hiperspectrală a celulelor expuse la tratament cu AuNPs. (B) Semnătura spectrală a membranei nucleare. (C) - (D) Răspunsuri spectrale diferite ale AuNPs în mediul intracelular. Imaginile hiperspectrale au fost achiziționate cu sistemul CytoViva și procesate cu software-ul ENVI 4.8.

Analiza imagistică prin microscopie în câmp întunecat a pus în evidență diferențele privind internalizarea AuNPs în cele două linii celulare. Imaginile arată că la tratamente de aceeași concentrație de nanoparticule, linia LX2 prezintă o internalizare ușor ridicată față de linia SK-HEP-1 (Figura 3.11). Acest fapt este confirmat și de rezultatele testului de viabilitate MTT : celulele tumorale sunt mai viabile la tratament datorită internalizării scăzute a AuNPs.

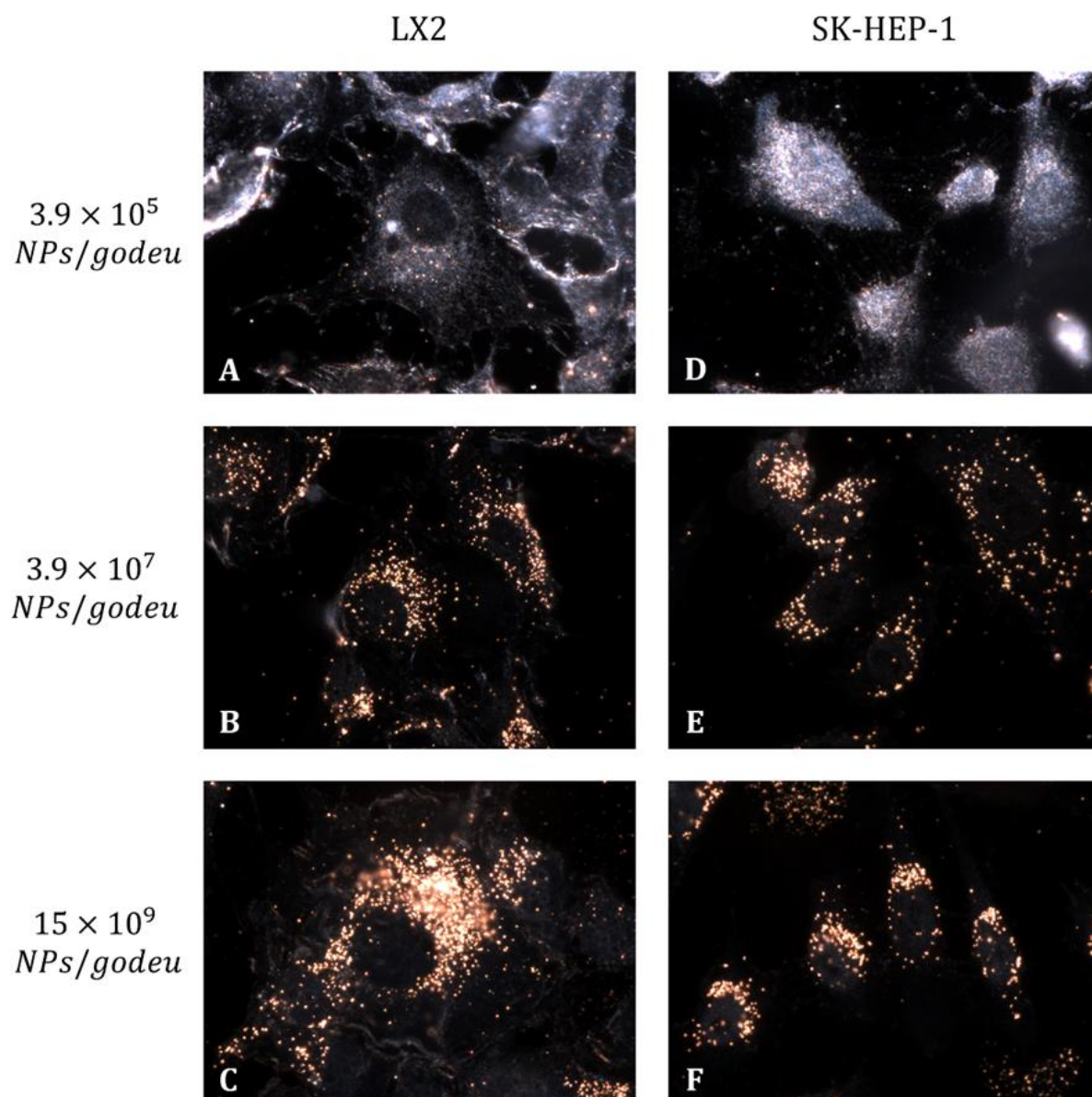


Figura 3.11. Internalizarea celulară a AuNPs la concentrații crescânde ale tratamentului. (A) - (C) linia normală, (D) - (F) linia tumorală.

## IV. Aplicații

În ultimii ani s-a constatat un progres extraordinar în dezvoltarea și caracterizarea nanostructurilor de metal nobile în vederea utilizării lor în diverse aplicații biomedicale. Nanoparticulele plasmonice de aur în particular prezintă proprietăți deosebite cum ar fi : fotostabilitatea, solubilitatea în apă, biocompatibilitatea in vitro și in vivo [40] și capacitatea de conjugare a medicamentelor și a liganzilor de țintire (targetare) pe suprafața lor [41]. Aceste proprietăți permit utilizarea AuNPs pe scară largă în aplicații biochimice și biomedicale, printre care se numără detectarea de analiți chimici și biologici, transportul (livrarea) și eliberarea controlată de medicamente și material genetic în zone specifice [42], imagistica celulelor și a țesuturilor respectiv tratamentul cancerului [40].

AuNPs pot fi sintetizate în forme diverse folosind diferite concentrații de surfactant care direcționează creșterea (*growth-directing surfactant*). Aceste nanoparticule prezintă spectre de absorbție UV-vis variate, astfel încât cea mai mică diferență de formă poate conduce la schimbarea culorii în soluție apoasă. Datorită proprietăților specifice ale aurului, este posibilă formarea de legături stabile cu grupările tiol prin interacțiunea metal moale-ligand moale în prezența altor grupări funcționale. Astfel, funcționalizarea AuNPs cu diferite specii moleculare se poate realiza cu ușurință în vederea utilizării lor pentru numeroase aplicații biomedicale [43].

Funcționalizarea permite sinteza de AuNPs cu funcții diverse pentru diagnosticarea și terapia diferitelor boli și/sau pentru livrarea materialului genetic în celule. Polietilenglicolul este învelișul cel mai adesea folosit pentru funcționalizarea suprafeței nanoparticulelor de aur cu scopul a îmbunătăți stabilitatea lor in vivo și pentru a evita eliminarea lor de către sistemul endotelial reticular [42]. AuNPs PEGilate interacționează diferit cu celulele comparativ cu AuNPs simple datorită prezenței lanțurilor polimerice pe suprafața lor care conduc la apariția unei sarcini de suprafață diferită. S-a demonstrat faptul că stratul de PEG reduce adsorbția proteinelor serice, și are și un impact asupra compoziției coroanei proteice a nanoparticulei, ceea ce influențează locul în care aceasta este transportată în interiorul celulei. În comparație cu AuNP-urile simple, s-a demonstrat că AuNP-urile PEGilate prezintă o absorbție celulară scăzută și modele distincte de distribuție și aglomerare intracelulară [44].

Sinteza de AuNPs se poate face astfel încât acestea să poată absorbi lumina în domeniul infraroșu apropiat (700 - 1100nm, NIR). Astfel AuNPs posedă capacitatea de a converti energia luminoasă în căldură, ceea ce permite utilizarea lor ca și agenți fototermici în aplicații de hipertermie.

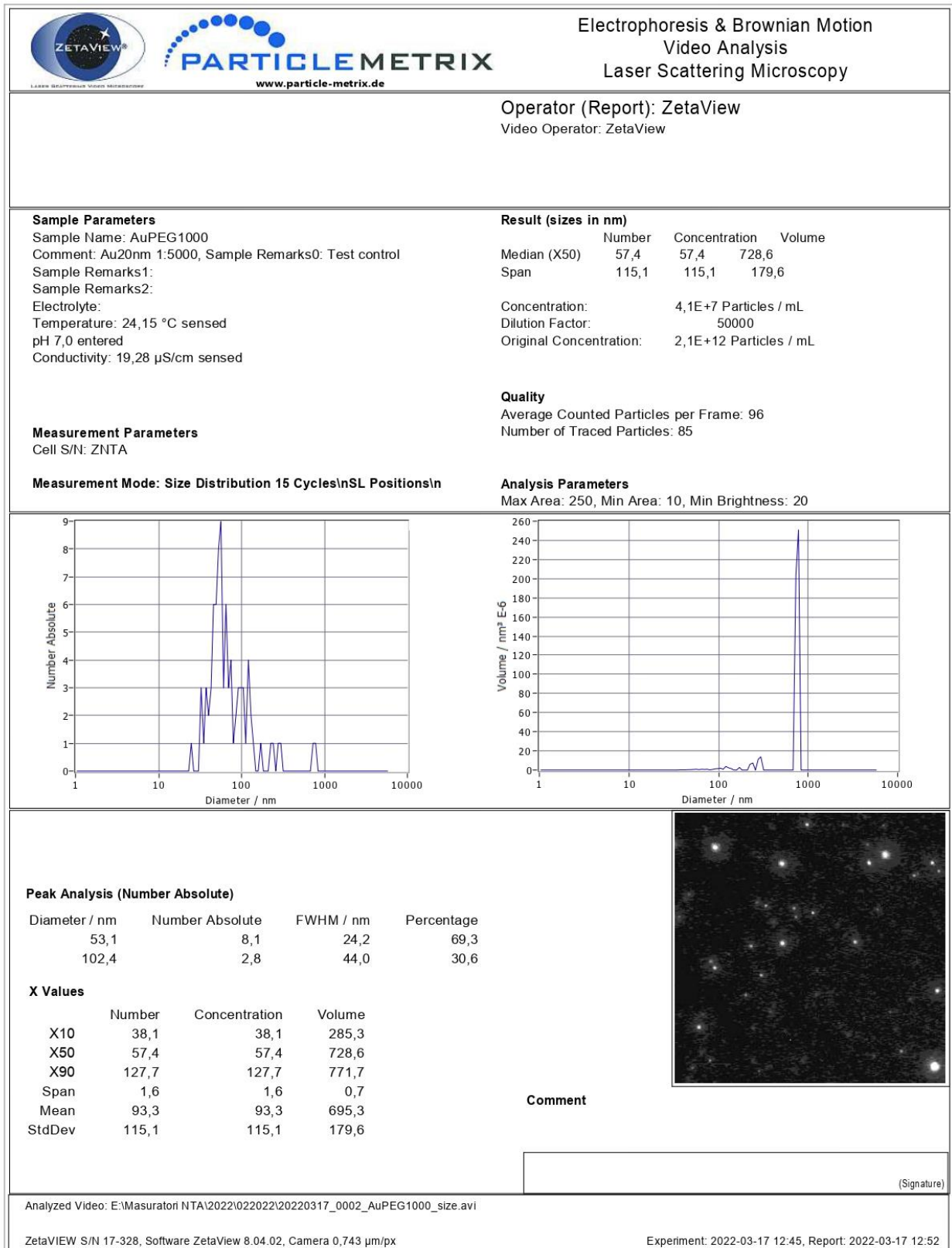
Hipertermia induce moartea celulelor prin creșterea temperaturii în zone specifice prin iradierea cu radiație laser, de microunde, de radiofrecvență sau ultrasunete focalizate. Recent, au existat încercări de implementare a hipertermiei mediate de AuNPs în terapia noninvazivă a cancerului. Când AuNPs sunt iradiate, energia termică este generată datorită excitării și relaxării electronilor, iar căldura degajată induce moartea celulelor prin apoptoză. Posibilele ținte pentru acest tip de abordare sunt tumorile localizate în apropierea pielii care pot fi tratate cu un laser din domeniul infraroșu apropiat (NIR), întrucât NIR poate pătrunde până la 10cm în țesuturile moi respectiv 4cm în țesuturile dure [43].

Proprietățile de împrăștiere a luminii pe care AuNPs le posedă permit utilizarea lor ca și agent (substanță) de contrast pentru mai multe tehnici imagistice cum ar fi imagistica cu raze X, cea prin rezonanță magnetică sau imagistica fotoacustică [43]. S-a demonstrat faptul că AuNP a căror diametre sunt cuprinse în intervalul 3–50 nm posedă o capacitate mai mare de contrast CT și o perturbare (*disruption*) radioactivă superioară iar aceste proprietăți le fac atractive pentru aplicații de radioterapie [41]. În cazul nanoparticulelor cu dimensiuni de ~13 nm creșterea contrastului a fost mai mare decât în cazul celorlalte dimensiuni.

## Concluzii


Acest studiu a pus în evidență posibilitatea sintezei facile de AuNPs cu biocompatibilitate ridicată folosind moleculele de PEG ca și agent reducător și stabilizator. Rezultatele testului MTT au indicat o scădere foarte mică a viabilității celulare în urma tratamentelor cu AuNPs. Acest rezultat ne permite să afirmăm că nanoparticulele de aur sintetizate conform metodei propuse posedă o citotoxicitate redusă. Imagistica prin microscopie hiperspectrală și în câmp întunecat a permis evaluarea diferențelor legate de modul de internalizare a AuNPs în cazul a două linii celulare care au fost expuse la tratament. Mai mult decât atât, microscopia hiperspectrală s-a dovedit a fi o tehnică excelentă care să permită evaluarea zonei celulare în care nanoparticulele au fost internalizate pe baza analizei modificărilor profilului spectral al nanoparticulelor.

Anexa 1





Anexa 2



www.particle-metrix.de

Electrophoresis & Brownian Motion  
Video Analysis  
Laser Scattering Microscopy

---

**Operator (Report):** ZetaView  
Video Operator: ZetaView

---

**Sample Parameters**

Sample Name: AuPEG1000ZETA  
 Comment: Au20nm 1:5000, Sample Remarks0: Test control  
 Sample Remarks1:  
 Sample Remarks2:  
 Electrolyte:  
 Temperature: 24,71 °C sensed  
 pH 7,0 entered  
 Conductivity: 15,01 µS/cm sensed

**Result**

Mobility: -1,41 FWHM 0,28 µm/sec/V/cm, @ 25°C: -1,42 µm/sec/V/cm  
 ZP Factor: 12,9 (Smoluchowski)  
 Zeta Potential @ 25 °C: -18,19 FWHM 10,13 mV  
 Concentration: 4,4E+7 Particles / mL  
 Dilution Factor: 50000  
 Original Concentration: 2,2E+12 Particles / mL

---

**Measurement Parameters**

Cell S/N: ZNTA  
 Sensed Electric Field: 3,04 V/cm (continuous)  
**Measurement Mode: Stationary 10 Cycles**

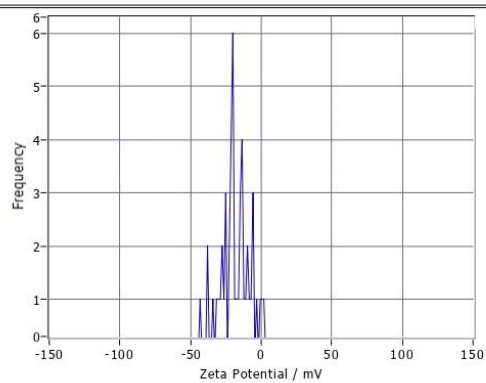
**Quality**

Average Counted Particles per Frame: 102  
 Number of Traced Particles: 48  
 ΔSL: 75,26 mV

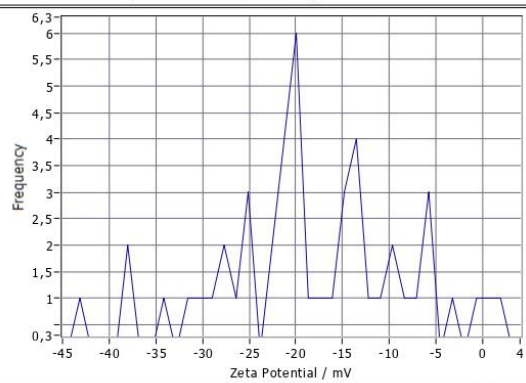
**Analysis Parameters**

Max Area: 250, Min Area: 10, Min Brightness: 20

---



Frequency vs Zeta Potential / mV



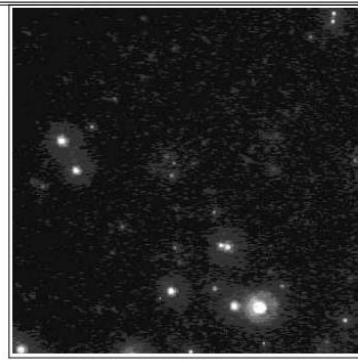
Frequency vs Zeta Potential / mV

---

Stationary Layers	Rel. Position
SL1	0,149
SL2	0,851

Peak Analysis (25 °C)			
Zeta Potential / mV	Frequency	FWHM / mV	Percentage
-20,4	4,6	3,6	46,4
-13,9	3,2	3,1	19,7
-7,5	1,7	5,1	14,4
0,5	1,1	3,4	12,0
-37,3	1,0	10,4	7,5



---

**Comment**

(Signature)

---

Analyzed Video: E:\Masuratori NTA\2022\022022\20220317\_0003\_AuPEG1000ZETA\_SL.avi

ZetaVIEW S/N 17-328, Software ZetaView 8.04.02, Camera 0,743 µm/px

Experiment: 2022-03-17 12:54, Report: 2022-03-17 13:03

46



## Bibliografie

- [1] V. Amendola, *Synthesis of silver and gold nanoparticles for photonic applications*, University of Padova, 2008.
- [2] [https://www.britishmuseum.org/collection/object/H\\_1958-1202-1](https://www.britishmuseum.org/collection/object/H_1958-1202-1) (accesat la data de 16.03.2021)
- [3] R. J. D. Tilley, *Colour and the Optical Properties of Materials*, Second edition, West Sussex: Library of Congress Cataloging-in-Publication Data, 2011.
- [4] M. C. Daniel & D. Astruc, *Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size-Related Properties, and Applications Toward Biology, Catalysis, and Nanotechnology*, *Chemical Reviews*, **104**, 293–346, 2004. <https://doi.org/10.1021/cr030698+>.
- [5] K. Kaur, *Optical Biosensing Using Localized Surface Plasmon Resonance of Gold Nanoparticles*, University of Waterloo, 2011.
- [6] G. FRENS, *Controlled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in Monodisperse Gold Suspensions*, *Nature Physical Science*, **241**, 20–22, 1973.
- [7] X. Bai, Y. Wang, Z. Song, Y. Feng, Y. Chen, D. Zhang, & L. Feng, *The basic properties of gold nanoparticles and their applications in tumor diagnosis and treatment*, *International Journal of Molecular Sciences*, **21**, 2020.
- [8] J. F. Masson, *Portable and field-deployed surface plasmon resonance and plasmonic sensors*, *Analyst*, **145**, 3776–3800, 2020.
- [9] M. Üçüncü, *Synthesis, physicochemical characterization, and biosensing applications of gold nanoparticles*, İzmir Institute of Technology, 2018.
- [10] M. Shah, V. Badwaik, Y. Kherde, H. K. Waghwan, T. Modi, Z. P. Aguilar, H. Rodgers, W. Hamilton, T. Marutharaj, C. Webb, M. B. Lawrenz, & R. Dakshinamurthy, *Gold nanoparticles: Various methods of synthesis and antibacterial applications*, *Frontiers in Bioscience - Landmark*, **19**, 1320–1344, 2014.
- [11] K. E. Sapsford, W. R. Algar, L. Berti, K. B. Gemmill, B. J. Casey, E. Oh, M. H. Stewart, &

- I. L. Medintz, *Functionalizing nanoparticles with biological molecules: Developing chemistries that facilitate nanotechnology*, Chemical Reviews, **113**, 1904–2074, 2013.
- [12] S. Link & M. A. El-Sayed, *Size and temperature dependence of the plasmon absorption of colloidal gold nanoparticles*, Journal of Physical Chemistry B, **103**, 4212–4217, 1999.
- [13] X. Huang, I. H. El-Sayed, W. Qian, & M. A. El-Sayed, *Cancer Cell Imaging and Photothermal Therapy in the Near-Infrared Region by Using Gold Nanorods*, Journal of the American Chemical Society, **128**, 2115–2120, 2006.
- [14] I. H. El-Sayed, X. Huang, & M. A. El-Sayed, *Surface plasmon resonance scattering and absorption of anti-EGFR antibody conjugated gold nanoparticles in cancer diagnostics: Applications in oral cancer*, Nano Letters, **5**, 829–834, 2005.
- [15] L. Dykman & N. Khlebtsov, *Gold Nanoparticles in Biomedical Applications*, Boca Raton, US: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2018.
- [16] V. Voliani, *Update on Gold Nanoparticles*, Shawbury, UK: Smithers Rapra, 2013.
- [17] P. Slepíčka, N. S. Kasálková, J. Siegel, Z. Kolská, & V. Švorčík, *Methods of gold and silver nanoparticles preparation*, Materials, **13**, 1, 2020.
- [18] Y.-C. Yeh, B. Creran, & V. M. Rotello, *Gold nanoparticles: preparation, properties, and applications in bionanotechnology*, Nanoscale, **4**, 1871–1880, 2012.
- [19] S. E. Skrabalak, J. Chen, Y. Sun, X. Lu, L. Au, C. M. Cobley, & Y. Xia, *Gold Nanocages: Synthesis, Properties, and Applications*, Accounts of Chemical Research, **41**, 1587–1595, 2008.
- [20] K. Alaqad & T. A. Saleh, *Gold and Silver Nanoparticles: Synthesis Methods, Characterization Routes and Applications towards Drugs*, Journal of Environmental & Analytical Toxicology, **6**, 2016.
- [21] W. L. Barnes, A. Dereux, & T. W. Ebbesen, *Surface plasmon subwavelength optics*, Nature, **424**, 824–830, 2003.
- [22] J. A. Creighton & D. G. Eadon, *Ultraviolet-visible absorption spectra of the colloidal metallic elements*, Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions, **87**, 3881–3891,

1991.

- [23] S. Link & M. A. El-Sayed, *Shape and size dependence of radiative, non-radiative and photothermal properties of gold nanocrystals*, *Int . Reviews in Physical Chemistry*, **19**, 409-453, 2000.
- [24] M. J. Hostetler, J. J. Stokes, & R. W. Murray, *Infrared spectroscopy of three-dimensional self-assembled monolayers: N-alkanethiolate monolayers on gold cluster compounds*, *Langmuir*, **12**, 3604–3612, 1996.
- [25] B. D. Hall, D. Zanchet, & D. Ugarte, *Estimating nanoparticle size from diffraction measurements*, *Journal of Applied Crystallography*, **33**, 1335–1341, 2000.
- [26] D. M. P. Mingos, *Gold Clusters, Colloids and Nanoparticles I*, Springer, 2014.
- [27] O. Hedkvist, *Synthesis and Characterization of Gold Nanoparticles*, 2014.
- [28] B. Carr & M. D. Wright, *Nanoparticle Tracking Analysis. A Review of Applications and Usage 2010 – 2012*, London: NanoSight Ltd, 2013.
- [29] B. Carr & M. D. Wright, *Nanoparticle Tracking Analysis. A Review of Applications and Usage in the Analysis of Exosomes and Microvesicles*, London: NanoSight Ltd, 2013.
- [30] <https://www.malvernpanalytical.com/en/products/technology/light-scattering/nanoparticle-tracking-analysis> (accesat la date de 09.09.2021).
- [31] <https://www.cytoviva.com/> (accesat la date de 10.09.2021).
- [32] P. Zamora-Perez, D. Tsoutsis, R. Xu, & P. Rivera\_Gil, *Hyperspectral-Enhanced Dark Field Microscopy for Single and Collective Nanoparticle Characterization in Biological Environments*, *Materials*, **11**, 243, 2018.
- [33] S. Nițica, A. I. Moldovan, V. Toma, C. S. Moldovan, I. Berindan-Neagoe, G. Știufiuc, C. M. Lucaciu, & R. Știufiuc, *PEGylated gold nanoparticles with interesting plasmonic properties synthesized using an original, rapid, and easy-to-implement procedure*, *Journal of Nanomaterials*, **2018**, 2018.
- [34] <https://researchtweet.com/mtt-assay-protocol-for-cell-viability/> (accesat la date de 14.05.2022)

- [35] J. A. Peck, C. D. Tait, B. I. Swanson, & G. E. Brown, *Speciation of aqueous gold(III) chlorides from ultraviolet/visible absorption and Raman/resonance Raman spectroscopies*, *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **55**, 671–676, 1991.
- [36] I. Ojea-Jiménez & J. M. Campanera, *Molecular modeling of the reduction mechanism in the citrate-mediated synthesis of gold nanoparticles*, *Journal of Physical Chemistry C*, **116**, 23682–23691, 2012.
- [37] F. Farges, J. A. Sharps, & G. E. Brown, *Local environment around gold (III) in aqueous chloride solutions: An EXAFS spectroscopy study*, *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **57**, 1243–1252, 1993.
- [38] W. M. Haynes, *CRC Handbook of Chemistry and Physics, 95th Edition*, 95th ed, Hoboken: CRC Press, 2014.
- [39] R. Stiuftuc, C. Iacovita, R. Nicoara, G. Stiuftuc, A. Florea, M. Achim, & C. M. Lucaciu, *One-Step Synthesis of PEGylated Gold Nanoparticles with Tunable Surface Charge*, *J. Nanomater.*, **2013**, 1–7, 2013.
- [40] S. Patskovsky, E. Bergeron, & M. Meunier, *Hyperspectral darkfield microscopy of PEGylated gold nanoparticles targeting CD44-expressing cancer cells*, *Journal of Biophotonics*, **8**, 162–167, 2015.
- [41] N. S. Aminabad, M. Farshbaf, & A. Akbarzadeh, *Recent Advances of Gold Nanoparticles in Biomedical Applications: State of the Art*, *Cell Biochemistry and Biophysics*, **77**, 123–137, 2019.
- [42] J. Manson, D. Kumar, B. J. Meenan, & D. Dixon, *Polyethylene glycol functionalized gold nanoparticles: The influence of capping density on stability in various media*, *Gold Bulletin*, **44**, 99–105, 2011.
- [43] Y. Arai, S. Y. Jee, S. M. Kim, Y. Kwon, & W. Jang, *Biomedical applications and safety issues of gold nanoparticles*, *Toxicology and Environmental Health Sciences*, **4**, 1–8, 2012.
- [44] A. L. Chen, M. A. Jackson, A. Y. Lin, E. R. Figueroa, Y. S. Hu, E. R. Evans, V. Asthana, J. K. Young, & R. A. Drezek, *Changes in Optical Properties of Plasmonic Nanoparticles in Cellular Environments are Modulated by Nanoparticle PEGylation and Serum*

Bianca – Maria Lazorec

Investigarea interacțiunilor nanoparticulelor  
plasmonice de aur cu mediile celulare  
folosind microscopie hiperspectrală

*Conditions*, Nanoscale Research Letters, **11**, 2016.