

UNIVERSITATEA “BABEȘ-BOLYAI” CLUJ-NAPOCA
FACULTATEA DE FIZICĂ
SPECIALIZAREA FIZICĂ MEDICALĂ

LUCRARE DE LICENȚĂ

Coordonator științific
Prof. dr. Nicolae Leopold
Dr. Ștefania-Dana Iancu

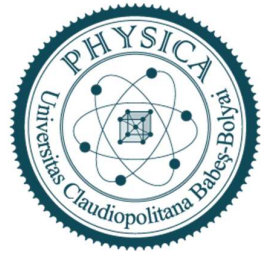
Absolvent
Georgiana Ion



UNIVERSITATEA "BABEŞ-BOLYAI" CLUJ-NAPOCA

FACULTATEA DE FIZICĂ

SPECIALIZAREA FIZICĂ MEDICALĂ



LUCRARE DE LICENŢĂ

**EVALUAREA AMPLIFICĂRII SEMNALULUI RAMAN AL CAROTENOIDELOR
ÎN MATRICEA SERULUI PRIN ADSORBŢIA LA NANOPARTICULE METALICE**

Coordonator științific

Prof. dr. Nicolae Leopold

Dr. Ștefania-Dana Iancu

Absolvent

Georgiana Ion

2023

Cuprins

Abstract	3
Introducere	5
1 Noțiuni teoretice	9
1.1 Structura carotenoidelor	9
1.2 Efectul Raman	9
1.3 Spectroscopia de fluorescență	16
1.4 Spectroscopia de absorbție UV-Vis	17
1.5 Metode de caracterizare a nanoparticulelor metalice	19
2 Materiale și metode	23
2.1 Sinteza și caracterizarea nanoparticulelor metalice	23
2.2 Prepararea și caracterizarea soluțiilor de carotenoide	24
2.3 Pregătirea probelor de ser bovin	24
2.4 Măsurători de fluorescență	25
2.5 Măsurători Raman și SERS	26
3 Rezultate și discuții	29
3.1 Caracterizarea nanoparticulelor metalice	29
3.2 Caracterizarea carotenoidelor	31
3.3 Monitorizarea adsorbției prin fluorescență	32
3.4 Amplificarea Raman a semnalului carotenoidelor	34
3.4.1 Carotenoide hidrosolubile	34
3.4.2 Influența albuminei și a metaboliților purinici	36
3.4.3 Ser bovin	38

Abstract

Carotenoid levels have been identified as SERS liquid biopsy markers in various diseases, but their characteristic bands have been interpreted as either resulting from Resonance Raman (RR) or SERS effects. Literature studies suggest that hydrophilic carotenoids have a greater affinity for metallic nanoparticles, leading thus to SERS enhancement in this case. In contrast, the vibration of the hydrophobic carotenoids that are not expected to adsorb onto metallic nanoparticles will not be enhanced. Our study aimed to systematically assess the nature of the water-soluble carotenoid signal in the presence of metallic nanoparticles (NPs).

The first chapter presents the theoretical background of my study that explains the structure of carotenoids, the Raman and associated effects and fluorescence spectroscopy which are employed in the study of carotenoids. The first chapter also explains methods used to characterize the NPs, such as Dynamic Light Scattering and UV-Vis spectroscopy.

The second chapter presents the materials and step-by-step methods for NPs synthesis and characterization, and also the materials and methods for SERS measurements and for fluorescence measurements. I used norbixin and a water-soluble analogue of nature-identical beta-carotene (E 160a(i)) and acquired Raman spectra of the carotenoid solutions using silver nanoparticles (AgNPs), in the resonance domain of the carotenoids and gold nanoparticles (AuNPs) out of resonance. I also monitored the adsorption of beta-carotene using fluorescence spectroscopy. Solutions of colloidal AuNPs with different NP concentrations ($0 - 2.26 \times 10^{11}$ particles/ml) were prepared for identical beta-carotene concentrations, and the fluorescence signal from carotenoid in the supernatant was measured after removing nanoparticles through centrifugation.

In the third chapter I present the measurement results for NPs characterisation, RR and SERS measurements and the adsorption curve monitored through fluorescence measurements. Resonance Raman spectra of carotenoids in solution were acquired first to detect the characteristic vibration bands of carotenoids. The addition of the metallic nanostructures enhanced the spectra of water-soluble analogue of beta-carotene, in both the resonance and out of resonance excitation regimes. Using an excitation wavelength at 532 nm that fits both the resonance condition of beta-carotene and the surface plasmon resonance (SPR) of AgNPs, an enhanced Raman signal of beta-carotene was observed. On the other hand, exciting only the SPR of AuNPs using a 633 nm laser line resulted in a lower enhancement of beta-carotene bands. In addition, under norbixin resonance conditions, SERS enhancement was observed.

when using AgNPs. However, exciting only the SPR of AuNPs did not result in any enhancement of norbixin signal. Therefore, when the SPR of NPs does not fit the absorbance domain of carotenoids, a lower enhancement was observed showing the significant contribution of RR to the enhancement of the signal.

To determine if the carotenoids are adsorbed onto NPs, I employed fluorescence measurements, measuring the amount of free, unbound beta-carotene when NPs are added. The observed effect was an increased adsorption of beta-carotene to NPs with the increase of the metallic surface area.

In this study I also presented the influence of purine metabolites and albumin on the SERRS signal of the beta-carotene analogue. Purine metabolites and albumin are components found in serum and are frequently identified alongside carotenoids through Raman or SERS measurements. The total absence of the beta-carotene SERRS signal was observed in the presence of albumin and a partial decrease of the signal in the presence of purine metabolites. I also studied the presence of carotenoids in bovine serum before and after different filtration methods.

Concluding, the enhancement of norbixin and water-soluble beta-carotene bands resulted from the SERS effect occurred in the presence of metallic nanoparticles. In addition, the fluorescence measurements also suggested the carotenoid adsorption to the metallic nanoparticles. The Raman measurements of bovine serum suggest the absence of carotenoids in serum after deproteinization.

Introducere

În dezvoltarea unei metode non-invazive, rapide și precise de diagnostic, SERS (spectroscopie Raman ultrasenzitivă) a prezentat, în numeroasele studii realizate, un potențial imens de a fi implementată în mediul clinic. Biopsia lichidă SERS se bazează pe analiza biofluidelor prin spectroscopie Raman amplificată de suprafață, și a fost aplicată pentru detecția diferitelor patologii precum: cancer – inclusiv discriminarea între mai multe tipuri de cancer, osteoartrită, sindrom Sjögren.[1],[2],[3] Avantajul biopsiei prin SERS este detecția ultrasenzitivă chiar și a concentrațiilor extrem de scăzute de analiți, posibilă prin adsorbția moleculelor de interes la suprafața nanoparticulelor metalice și amplificarea semnalului Raman ca urmare a adsorbției.

Printre moleculele prezente în biofluide și cu rol în analiza SERS se numără și carotenoidele, compuși ce au fost detectați în cadrul studiilor atât în serul uman, cât și în lichidul sinovial și care au un rol important în acuratețea de clasificare a probelor. În probele de ser analizate prin SERS folosind laser din domeniul 400-530 nm (ce emite în banda de absorbție a carotenoidelor), s-au observat benzi Raman intense ale carotenoidelor, însă asupra mecanismului de amplificare nu există un consens. Majoritatea studiilor atribuie benzile Raman ca fiind un efect pur de împrăștiere Raman Rezonant (RR).[4] Pe de altă parte, anumite studii au observat benzi Raman și în spectre SERS ale serului deproteinizat. [3]

Efectul de împrăștiere inelastică a luminii, Raman poate fi utilizat în identificarea simultană a mai multor analiți dintr-un amestec, întrucât fiecare grupare moleculară are o amprentă Raman specifică. Cu toate acestea, efectul Raman este un efect slab, apare doar la $1/10^7$ din fotonii ce ajung pe probă. Pentru a depăși această limitare, au fost dezvoltate metode de amplificare a semnalului.

Cromoforii (molecule care absorb în domeniul vizibil, spre exemplu pigmenții) pot prezenta efectul Raman rezonant (RR). Carotenoidele fac parte din această categorie, iar RR este una dintre principalele modalități de caracterizare a acestora. Carotenoidele absorb cu precădere lumina din domeniul 400-530 nm (lumina albastră și verde). La excitarea cu lumină laser din acest domeniu, moleculele trec pe un nivel electronic excitat (efect de rezonanță), iar probabilitatea împrăștierii Raman crește. Laserul cel mai adesea utilizat în măsurători SERS pe biofluide este laserul cu lungimea de undă de 532 nm sau 514 nm, care îndeplinește condiția de rezonanță pentru carotenoide.

Un alt efect de amplificare al semnalului Raman este spectroscopia Raman amplificată de suprafață (SERS). În acest caz, este amplificat doar semnalul Raman al moleculelor care au adsorbit la suprafața nanoparticulelor. A doua condiție necesară pentru ca efectul SERS să aibă loc este ca lumina laser incidentă să aibă frecvența în domeniul rezonanței plasmonilor de suprafață (localized surface plasmon resonance – LSPR) al nanoparticulelor utilizate. În multe studii, lungimea de undă laser aleasă pentru a îndeplini condiția de LSPR necesară efectului SERS îndeplinește în același timp condiția de rezonanță electronică a carotenoidelor. Acesta este un caz special, în care carotenoidele, chiar și fără adsorbția la suprafața nanoparticulelor, ar putea da un semnal amplificat datorită efectului RR.

Un al treilea efect de amplificare reprezintă o suprapunere asupra celor două efecte, Raman rezonant și amplificare dată de substrat, numit SERRS. Pentru apariția efectului SERRS în cazul unei anumite molecule studiate, trebuie îndeplinite cele trei condiții menționate: ca molecula de interes să fie adsorbită pe substratul metalic, și ca lumina laser incidentă să cadă atât în domeniul de absorbție al moleculei, cât și în banda de rezonanță plasmonică a nanoparticulelor.

Studiile SERS asupra serului au raportat diferite rezultate legate de prezența benzilor carotenoidelor pentru serul deproteinizat, respectiv nedeproteinizat. Într-un studiu serul nedeproteinizat adăugat la coloid metalic și excitat cu lungimea de undă în rezonanța carotenoidelor, au fost observate benzi caracteristice acestora la 1520, 1155 și 1000 cm^{-1} . Când aceleași probe au fost excitate cu laser în afara rezonanței carotenoidelor, benzile caracteristice nu au mai putut fi observate. [4]

Carotenoidele sunt, în general, molecule hidrofobe cu o foarte slabă afinitate pentru suprafața metalică. Acest lucru conduce la o amplificare SERS scăzută, mai puțin în cazul modificării moleculei prin atașarea unui capăt polar [5].

O înțelegere mai clară a mecanismului de amplificare a semnalului carotenoidelor în analiza biofluidelor prin SERS poate duce la o îmbunătățire a detecției acestor analiți în matricea biofluidică și în consecință a îmbunătățirii clasificării probelor analizate prin această metodă.

Astfel, lucrarea de față este un studiu sistematic ce are ca scop atribuirea semnalului carotenoidelor în matricea biofluidică, cu precădere în înțelegerea mecanismului de amplificare observat la analiza serului, biofluidul de interes în majoritatea studiilor pentru biopsia lichidă SERS.

Primul obiectiv al lucrării este atribuirea unui efect SERS, RR sau SERRS pentru semnalul unor carotenoide hidrosolubile, respectiv a complexului proteină-carotenoidă din matricea serului. Al doilea obiectiv este studiul influenței principalilor analiți din ser (metaboliții purinici și albumina) asupra semnalului carotenoidelor hidrosolubile. Nu în ultimul rând, lucrarea mai are ca obiectiv compararea semnalului Raman/SERS al carotenoidelor serice prin mai multe metode de filtrare: ser nefiltrat, ser deproteinizat prin filtrare mecanică, respectiv ser deproteinizat prin precipitare cu metanol.

În primul capitol sunt descrise aspectele teoretice legate de adsorbția moleculelor la suprafața metalică a nanoparticulelor în coloid, dar și aspecte particulare ale posibilității adsorbției carotenoidelor la nanoparticulele metalice. Sunt de asemenea descrise principiile metodelor experimentale utilizate: împrăștierea Raman și metoda SERS, spectroscopia de fluorescență, spectroscopia de absorbție UV-Vis, dar și metode specifice caracterizării nanoparticulelor utilizate – NTA, DLS.

În al doilea capitol sunt prezentate materialele și metodele pentru sintetizarea nanoparticulelor, protocolul pentru măsurătorile prin spectroscopie Raman, măsurătorile de fluorescență și măsurătorile de absorbție UV-Vis, dar și pentru măsurătorile realizate pe nanoparticule (NTA, DLS).

Capitolul trei conține un rezumat al rezultatelor obținute și interpretarea acestora, și nu în ultimul rând, sunt formulate concluzii asupra rezultatelor lucrării.

Rezultate originale descrise în lucrarea de față au fost prezentate la următoarele conferințe:

Prezentare poster: **G Ion**, SD Iancu, N Leopold, *Raman-related effects on carotenoids: a systematic study*, la 18th European Student Colloid Conference, 26-30 Iunie 2022, Szeged, Ungaria;

Prezentare orală: **G Ion**, SD Iancu, N Leopold, *Assessment of Raman enhancement of water soluble analogue of beta-carotene by metal nanoparticles*, la conferința națională dedicată studenților, „Pentagonul Facultăților de Fizică” 24-26 Iulie 2022, București;

Prezentare poster: **G Ion**, SD Iancu, N Leopold, *Assessment of Raman enhancement of water soluble analogue of beta-carotene by metal nanoparticles*, la 17th National Conference of Biophysics with International Participation, 23-25 Septembrie 2022, Târgu Mureș;

Prezentare poster: **G Ion**, SD Iancu, N Leopold, *Assessment of Raman enhancement of water soluble carotenoids by metal nanoparticles*, la 19th International Conference „Students for Students”, 26-30 Aprilie 2023, Cluj-Napoca.

1 Noțiuni teoretice

1.1 Structura carotenoidelor

Carotenoidele, numite și tetraterpenoide, sunt o clasă de pigmenți naturali, care se găsesc în majoritatea fructelor și legumelor, acestea acumulându-se în organismul uman în ficat, de unde sunt transportate prin intermediul lipoproteinelor în circulația sangvină, iar mai departe depozitate în majoritatea tipurilor de țesuturi. Carotenoidele cu cea mai mare concentrație în sânge sunt β -carotenul, luteina și licopenul [6].

Nivelul scăzut de carotenoide în sânge este corelat cu un risc crescut de apariție a cancerului, a bolilor cardiovasculare și a artritei [7], [8]. Un rol important al carotenoidelor este protecția împotriva stresului oxidativ al structurilor biologice.

Carotenoidele sunt la bază formate din 8 molecule isoprene (C_5), și pot fi liniare sau neliniare, ori pot avea la capete grupări funcționale ciclice sau neciclice. Carotenoidele se împart în două categorii: hidrocarburi pure (carotene) sau ce conțin oxigen (xantofile). Datorită legăturilor π conjugate, electronii sunt delocalizați și absorb lumină în domeniul vizibil.

În stare pură, majoritatea carotenoidelor sunt molecule nepolare, lipofile – se solvează numai în anumiți solvenți organici și sunt practic insolubile în apă. O excepție o reprezintă norbixina, care este solubilă în apă alcalină. Carotenoidele care ajung în sânge formează complecși cu alte molecule, de obicei cu lipoproteine pentru a putea fi transportate. Parker arată că, în plasma umană, toate carotenoidele sunt încorporate în lipoproteine. [10]

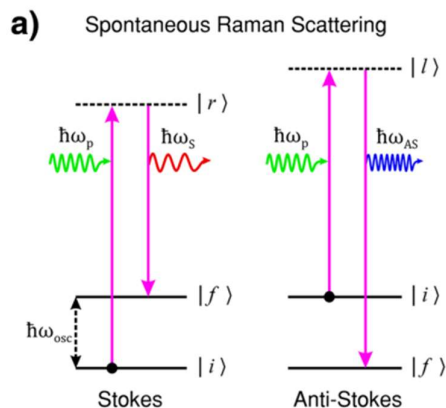
S-a observat că adsorbția pe suprafața nanoparticulelor metalice apare doar în cazul carotenoidelor cu un capăt hidrofil. Altfel, afinitatea carotenoidelor pentru suprafața metalică este scăzută și pentru a obține semnal SERS fie se funcționează substratul metalic, fie se adaugă o grupare funcțională carotenoidului, precum o grupare tiol. [5]

1.2 Efectul Raman

Spectroscopia Raman

Interacțiunea luminii din domeniul vizibil cu materia duce la diverse efecte la nivel molecular, iar unul dintre aceste efecte este împrăștierea luminii. Pentru sursa de lumină ce nu îndeplinește

condițiile de rezonanță a nivelelor electronice ale moleculei, pot apărea următoarele efecte de împrăștiere [Figură 1-1] : împrăștiere elastică a luminii (Rayleigh) și împrăștiere inelastică Stokes, respectiv anti-Stokes.



Figură 1-1 Diagramă a efectelor de împrăștiere Raman Stokes și a efectului Raman Anti-Stokes, unde $|i\rangle$ reprezintă nivelul energetic inițial în care se află molecula, $|f\rangle$ reprezintă nivelul energetic final pe care se află molecula, iar $|r\rangle$ respectiv $|l\rangle$ sunt nivele energetice virtuale. $\hbar\omega_{osc}$ reprezintă diferența energetică dintre nivelul vibrațional inițial și nivelul vibrațional final, $\hbar\omega_p$ reprezintă energia fotonului incident iar $\hbar\omega_s$ reprezintă energia fotonului împrăștiat prin Raman Stokes, respectiv $\hbar\omega_{AS}$ reprezintă energia fotonului împrăștiat prin efect Raman anti-Stokes. Diagramă preluată din Jones, R.R., Hooper, D.C., Zhang, L. et al. *Raman Techniques: Fundamentals and Frontiers*. *Nanoscale Res Lett* **14**, 231 (2019).

Pentru a defini energia fotonului incident, energia fotonului împrăștiat și energia tranziției între niveluri vibraționale a moleculei, vom exprima energia după formula $E = \hbar\omega$, unde \hbar este constanta lui Planck redusă ($\hbar = h/(2\pi) \approx 1.0546 \times 10^{-34} \text{ J s}^{-1}$) iar ω reprezintă viteza unghiulară și se măsoară în rad/s.

(a) Împrăștiere Rayleigh: este împrăștierea elastică, modelată prin trecerea moleculei din stare fundamentală într-o stare excitată virtuală, și dezexcitarea pe nivelul electronic fundamental fără vreo modificare energetică. În urma împrăștierii Rayleigh, fotonul împrăștiat și fotonul incident au aceeași energie. Este fenomenul de împrăștiere cel mai frecvent, pe care îl suferă majoritatea moleculelor dintr-o probă.

Matematic, despre energia fotonului se poate scrie relația:

$$\hbar\omega_{incident} = \hbar\omega_{Rayleigh} \quad (1)$$

unde $\hbar\omega_{incident}$ este energia fotonului incident iar $\hbar\omega_{Rayleigh}$ energia fotonului împrăștiat Rayleigh (împrăștiere elastică).

(b) Împrăștiere Raman Stokes: descrie un tip de împrăștiere inelastică, în care molecula aflată inițial pe nivelul electronic fundamental trece pe un nivel virtual, iar la dezexcitare ajunge

pe nivelul electronic fundamental, dar pe un nivel vibrațional superior ($\Delta v=+1$). Astfel, fotonul împrăștiat va avea energie mai mică decât cel incident ($\hbar\omega_s < \hbar\omega_{incident}$). Se poate deci scrie relația:

$$\hbar\omega_{Stokes} = \hbar\omega_{incident} - \hbar\omega_v \quad (2)$$

Unde $\hbar\omega_{Stokes}$ este energia fotonului împrăștiat Stokes, $\hbar\omega_{incident}$ este energia fotonului incident iar $\hbar\omega_v$ este diferența energetică dintre nivelul vibrațional din starea inițială și nivelul vibrațional din starea finală a moleculei.

(c) Împrăștiere Raman Anti-Stokes: descrie împrăștierea inelastică, în care fotonul împrăștiat câștigă energie față de fotonul incident. Procesul este invers față de Stokes: molecula se află pe o stare vibrațională excitată, iar în stare finală ajunge pe un nivel vibrațional inferior ($\Delta v=-1$). Astfel, fotonul împrăștiat va avea energie mai mare decât cel incident ($\hbar\omega_{AS} > \hbar\omega_p$). Deci:

$$\hbar\omega_{Anti-Stokes} = \hbar\omega_{incident} + \hbar\omega_v \quad (3)$$

Unde $\hbar\omega_{Anti-Stokes}$ este energia fotonului împrăștiat anti-Stokes, $\hbar\omega_{incident}$ este energia fotonului incident iar $\hbar\omega_v$ este diferența energetică dintre nivelul vibrațional din starea inițială și nivelul vibrațional din starea finală a moleculei.

În realitate, probabilitatea împrăștierii anti-Stokes nu este egală cu probabilitatea efectului de împrăștiere Stokes. Acest lucru se întâmplă datorită legii de distribuție a lui Boltzmann, care ne spune că la temperatura T, molecule sistemului au următoarea distribuție de ocupare a stărilor energetice: $N=N_0 e^{-\hbar\omega/(kT)}$ unde k este constanta lui Boltzmann ($1.380649 \times 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$) N – nivelul de ocupare al stării vibraționale excitate și N_0 – ocuparea nivelului vibrațional fundamental. Legea de distribuție ne spune că numărul de molecule ce ocupă o anumită stare energetică scade exponențial cu creșterea diferenței de energie dintre cele două stări. Deoarece la temperatura camerei, majoritatea moleculelor ocupă nivelul vibrațional fundamental, pentru multe aplicații ale spectroscopiei Raman numai efectul Stokes este luat în calcul.

În spectroscopia vibrațională Raman, care se bazează pe efectul de împrăștiere inelastică a luminii mai sus descris, proba este iradiată cu lumină monocromatică, în general din domeniul vizibil, și este detectată lumina cu frecvență diferită față de cea incidentă, care corespunde împrăștierii inelastice.

Lumina incidentă, ca undă electromagnetică are o componentă de câmp electric ce variază în timp după relația:

$$E = E_0 \cos(2\pi\nu_0 t) \quad (4)$$

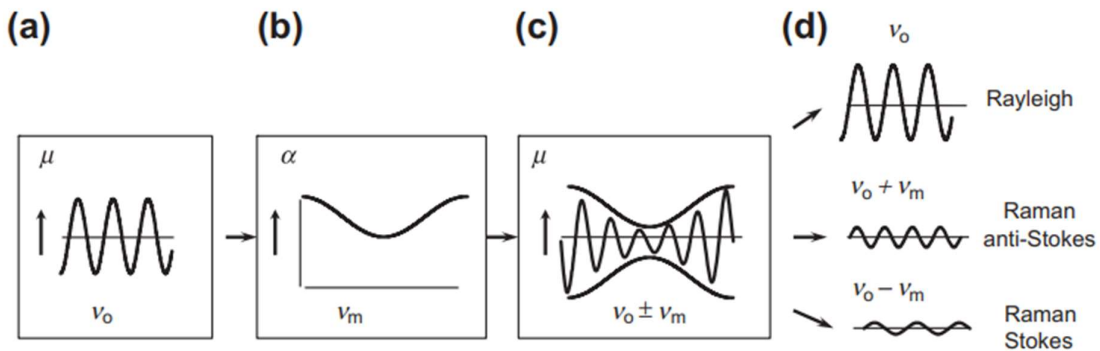
unde E este intensitatea câmpului la momentul t , E_0 amplitudinea maximă, iar ν_0 este frecvența luminii (undă electromagnetică monocromatică).

Câmpul electric oscilant produce un dipol oscilant indus în moleculă, conform relației:

$$\mu = \alpha E = \alpha E_0 \cos(2\pi\nu_0 t) \quad (5)$$

unde μ este momentul de dipol indus, iar α este polarizabilitatea moleculei, care descrie măsura în care norul electronic va fi deformat în prezența unui câmp electric extern.

Polarizabilitatea poate varia în timp datorită unei vibrații moleculare, și prin urmare, frecvența oscilației momentului de dipol va fi modulată de un factor suplimentar dat de variația polarizabilității moleculei în timp (Figură 1-2.). În acest caz, fotonul împrăștiat (Raman) va avea o frecvență diferită față de cea incidentă. [12]



Figură 1-2 Explicarea modulării momentului de dipol prin variația polarizabilității moleculei care duce la modificarea energiei luminii împrăștiate în efectul Raman. Preluată din *Infrared and Raman Spectroscopy (Second Edition)*, edited by P. J. Larkin, pag. 18

Condiția ca un mod vibrațional să fie activ Raman este ca, la modificarea stării vibraționale să existe și o modificare a polarizabilității norului electronic, iar această condiție apare și expresia intensității radiației împrăștiate Raman:

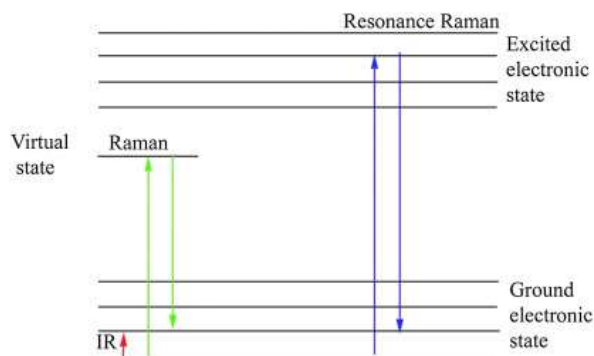
$$I \propto \nu^4 I_0 N \left(\frac{\partial \alpha}{\partial Q}\right)^2 \quad (6) [12]$$

unde I este intensitatea luminii împrăștiată Raman, I_0 este intensitatea luminii incidente, N reprezintă numărul de molecule ce au suferit procesul de împrăștiere, ν reprezintă frecvența radiației laser incidente, iar termenul $\frac{\partial \alpha}{\partial Q}$ reprezintă variația polarizabilității α în funcție de Q , care este amplitudinea unei vibrații.

Din formula (6) reiese că, dacă variația polarizabilității la modificarea stării vibraționale este nulă, nu apare efect Raman.

Efectul Raman rezonant (RR)

Dezavantajul efectului Raman este probabilitatea scăzută de apariție: în general, numai $1/10^7$ molecule din probă vor împrăști inelastic lumina. O metodă de amplificare este RR, care poate amplifica vibrația anumitor grupări de 10^3 până la 10^5 ori. [13]



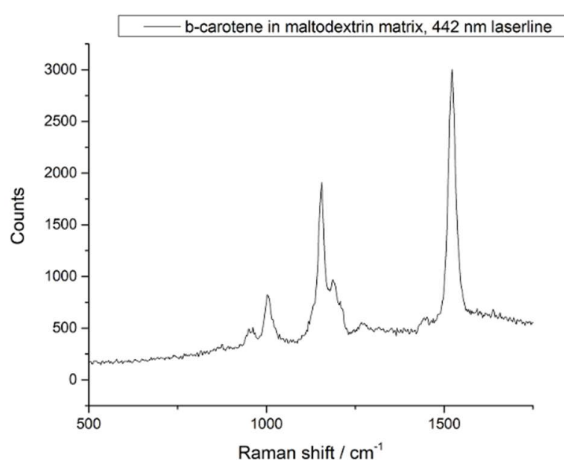
Figură 1-3 Diagramă a efectului Raman în comparație cu Raman rezonant. Preluată din Nebu John, Sony George, in *Spectroscopic Methods for Nanomaterials Characterization, 2017*

Molecule cu grupări cromofore (care absorb în domeniul vizibil) pot efectua o tranziție electronică reală în timpul împrăștierii Raman, dacă este îndeplinită condiția de rezonanță (Figură 1-3) Dacă ν_0 este frecvența luminii incidente iar ν_{mn} este diferența dintre nivelul vibrațional incident (m) și cel final (n) a stării electronice fundamentale, intensitatea Raman corespunzătoare respectivei vibrații va fi:

$$I \propto (\nu_0 - \nu_{mn})^4 I_0 \sum |\alpha_{p\sigma(mn)}|^2 \quad (7)$$

unde I_0 este intensitatea radiației incidente, iar termenul de sub sumă, $\alpha_{p\sigma(mn)}$, reprezintă variația în polarizabilitate datorată tranziției între nivelul inițial (m), nivelul electronic excitat și nivelul final (n).

Efectul Raman rezonant este de importanță în studiul carotenoidelor, care efectuează tranziții electronice prin absorbția luminii în domeniul vizibil. În Figură 1-4 se pot observa vibrațiile active Raman ale carotenoidelor. Dintre acestea, 3 au fost de asemenea utilizate în această lucrare pentru identificarea carotenoidelor prin RR: deformarea grupării metil la 1000 – 1010 cm^{-1} , întinderea C – C la 1145-1165 cm^{-1} și întindere C=C la 1500-1535 cm^{-1} . [14]



Figură 1-4 Vibrațiile active Raman caracteristice carotenoidelor. Spectru Raman rezonant realizat în laborator, al unui analog solubil în apă al beta-carotenului într-o matrice de maltodextrină.

Spectroscopie Raman amplificată de suprafață (SERS)

O metodă utilizată pe scală largă este spectroscopia Raman amplificată de suprafață (SERS). Elementul adițional necesar pentru măsurători SERS este substratul metalic cu rugozități de dimensiuni nanometrice (spre exemplu, nanoparticule de aur sau argint aflate în coloid). Legătura dintre adsorbția moleculelor pe un substrat metalic și apariția amplificării SERS a fost raportată pentru prima dată în 1977 de Jeanmare și Van Duyne, respectiv Albrecht și Creighton, cu o intensitate de $10^5 - 10^6$ ori amplificată față de moleculele neadsorbite.

Efectul SERS apare a urmare a două contribuții: efectul electromagnetic și efectul chimic.

Efectul electromagnetic explică amplificarea radiației Raman ca fiind datorată câmpurilor electromagnetice ce apar datorită excitării rezonanței plasmonice a nanoparticulelor.

Prin excitarea rezonanței plasmonilor de suprafață (oscilații colective ale electronilor la suprafața nanostructurilor metalice), câmpul electric din jurul moleculei adsorbite este amplificat [15]:

$$\mathbf{E}_{loc}(\omega_0, \mathbf{r}_m) = g_1(\omega_0, \mathbf{r}_m)\mathbf{E}_0(\omega_0) \quad (8) \quad [15]$$

unde \mathbf{E}_{loc} reprezintă intensitatea câmpului electric local al moleculei la poziția \mathbf{r}_m , de frecvență ω_0 , g_1 reprezintă factorul de amplificare al câmpului electromagnetic, iar $\mathbf{E}_0(\omega_0)$ reprezintă intensitatea câmpului electric al radiației incidente.

Câmpul electric astfel amplificat va duce la o amplificare a dipolului electric oscilant al moleculei.

Pentru simplitate, se consideră o nanoparticulă sferică asupra căreia s-a aplicat un câmp electric incident. Ca urmare, câmpul amplificat, la distanța \mathbf{r} de nanoparticulă va depinde de câmpul incident \mathbf{E}_0 , de factorul de amplificare \mathbf{g} , de cosinusul unghiului θ și de raza sferei – \mathbf{a} :

$$E_r = E_0 \cos\theta + g \frac{a^3}{r^3} E_0 \cos\theta \quad (9)$$

De unde deducem că intensitatea câmpului electric va fi mai mare pentru moleculele situate mai aproape de nanoparticulă. Deci pentru o moleculă adsorbită pe suprafața nanoparticulei va exista cea mai mare amplificare, așa cum a fost determinat și experimental. Termenul g depinde de constantele dielectrice ale mediului și a nanoparticulei și atinge maximum atunci când este îndeplinită condiția de rezonanță plasmonică. [13]

Pe de altă parte, efectul chimic implică existența unui transfer de sarcină de la nanoparticulă la moleculă, sau formarea unei legături (hibridizarea metalului și a orbitalilor moleculari). De obicei vibrația acestei legături este vizibilă și în spectrul SERS.

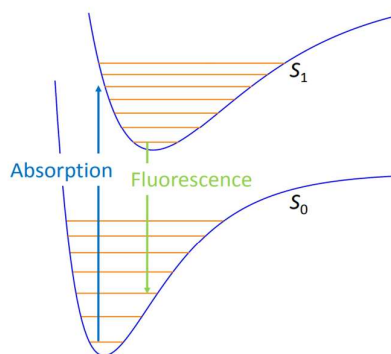
După studierea proceselor care duc la amplificarea SERS pot fi extrase câteva condiții care vor îmbunătăți sau facilita apariția semnalului:

- (a) Condiția de rezonanță pentru plasmonii localizați de suprafață, în vederea obținerii amplificării SERS maxime;
- (b) Adsorbția moleculei de interes pe substratul metalic.

Cele două efecte de amplificare, RR și SERS se pot suprapune atunci când lumina incidentă are lungimea de undă potrivită pentru a îndeplini atât condiția de rezonanță a moleculei cât și condiția de rezonanță a plasmonilor de suprafață. Efectul este denumit SERRS.

1.3 Spectroscopia de fluorescență

Fluorescența reprezintă absorbția unui foton urmată de emisia unui alt foton de energie mai mică decât cel incident. Efectul necesită o sursă de lumină cu energie egală cu diferența energetică dintre nivelul electronic fundamental al moleculei (S_0) și primul nivel electronic excitat (S_1). Fluorescența are loc în trei pași (Figură 1-5).



Figură 1-5 Diagrama ce descrie fenomenul de fluorescență. Preluată din https://www.chem.uzh.ch/dam/jcr:571775eb-8b0e-4930-8aa4-ad0da5c11aec/FluorescenceQuenching_HS16.pdf

Primul pas este absorbția. În cazul fluorescenței, fotonul absorbit trebuie să aibă o lungime de undă potrivită pentru a excita molecula de pe S_0 , pe S_1 . Energia fotonului trebuie să cadă în domeniul de absorbție al moleculei pentru ca efectul de fluorescență să aibă loc. Majoritatea fluoroforilor au domeniul de absorbție în domeniul UV – vizibil.

Al doilea pas este dezexcitarea neradiativă. Molecule se dezexcită mai întâi pe cel mai jos nivel vibrațional al primului nivel electronic excitat ($S_1, v=0$). Pentru a efectua o tranziție până pe nivelul $v=0$ al stării S_1 , acesta se va dezexcita neradiativ prin una dintre următoarele căi:

- Relaxare vibrațională: energia vibrațională este transformată în energie cinetică/termică;
- Conversia internă: atunci când nivelele vibraționale a două stări electronice cu multiplicități diferite sunt suprapuse, molecula poate trece de pe un nivel vibrațional al unei stări electronice pe un nivel vibrațional al altei stări electronice.

Al treilea pas este emisia de fluorescență (relaxarea radiativă). Pentru a efectua o tranziție între nivele electronice, este necesară emisia unui foton. Deoarece o parte din energia fotonului incident a fost pierdută în procese neradiative, fotonul emis va avea energie mai mică decât cel

incident. Diferența între energia electronului incident și a electronului emis se numește deplasare Stokes și poate fi exprimată în funcție de lungimi de undă ($\lambda = hc/E$) care la măsurătorile de fluorescență iau valori de ordinul sutelor de nanometri (nm):

$$\Delta\lambda_{\text{Stokes}} = \lambda_{\text{absorbită}} - \lambda_{\text{fluorescență}} \quad (10)$$

Deplasarea Stokes este deplasarea dintre maximum spectrului de absorbție și maximum spectrului de emisie.

Intensitatea emisie fluorescențe depinde de asemenea de concentrația fluoroforului, iar pentru probe diluate este valabilă relația

$$I_F = Q \times I_0 \times (2,303 \times E \times c \times l) \quad (11)$$

Unde I_F este intensitatea luminii emise prin fluorescență, Q este randamentul cuantic al fluoroforului, E este coeficientul de extincție moleculară, I_0 intensitatea luminii incidente, l este drumul optic iar c este concentrația în gm mol/L.

Din relația de mai sus rezultă că există o directă proporționalitate între concentrația fluoroforului și a emisie fluorescențe detectate. [16] Din acest motiv, spectroscopia de fluorescență poate fi utilizată pentru cuantificarea concentrației unui fluorofor într-o soluție diluată.

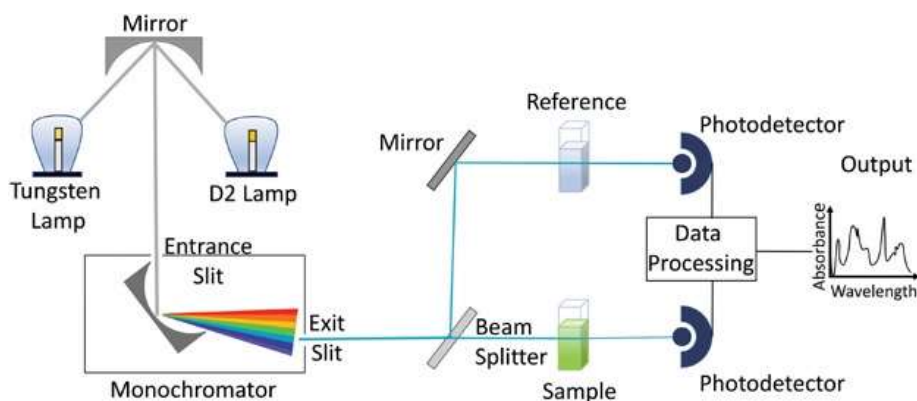
Fluorescența este de menționat și în măsurătorile Raman Rezonant, spre exemplu asupra carotenoidelor. [17] Grupările cromofore, la absorbția luminii incidente care îndeplinește condiția de rezonanță între 2 nivele electronice are o probabilitate de emisie fluorescentă dată de randamentul cuantic al fluoroforului. Spectrele Raman ale acestor compuși vor prezenta un fundal de fluorescență care poate fi redus dacă lungimea de undă a luminii incidente se îndepărtează de maximum de absorbție al grupărilor cromofore.

1.4 Spectroscopia de absorbție UV-Vis

Spectroscopia de absorbție UV-Vis este frecvent utilizată pentru caracterizarea structurii unui compus, în special pentru evidențierea tranzițiilor vibronice (electronice și vibraționale) care are loc prin absorbția luminii în domeniul UV-vizibil pentru majoritatea moleculelor.

Modul de funcționare a unui spectrometru UV-Vis poate fi văzut în Figură 1-6. Lumina incidentă provine de la o lampă (sau mai multe lămpi, combinate) care emit lumină în tot domeniul UV-

Vis. Fiecare lungime de undă a luminii va fi selectată printr-un sistem numit monocromator, care poate fi o rețea de difracție sau o prismă. Lumina este direcționată printr-un sistem de oglinzi pentru a ajunge la 2 cuve: una dintre cuve este „referința”, care este necesară pentru a scădea din spectrul final spectrul de absorbție al solventului, iar în cealaltă cuvă este analitul de interes aflat într-o soluție diluată. O parte din lumină este absorbită sau împrăștiată de către analit, iar restul luminii va trece prin cuvă și va ajunge la detector.



Figură 1-6 Schema de bază a unui spectrofotometru. Preluată din *Experimental methods in chemical engineering: Ultraviolet visible spectroscopy—UV-Vis*, F. S. Rocha, A. J. Gomes, C. N. Lunardi, S. Kaliaguine and G. S. Patience

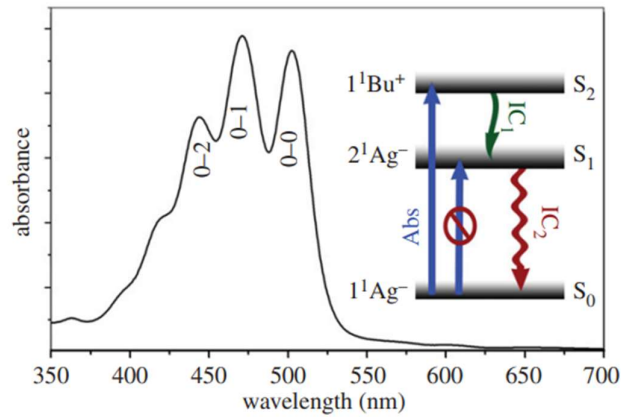
Intensitatea luminii absorbite va depinde conform legii Beer-Lambert:

$$I_a = I_0 e^{-acx} \quad (12)$$

Unde I_0 este intensitatea radiației incidente, a este coeficientul de extincție molar, c este concentrația molară iar x este drumul optic parcurs (adică lungimea cuvei).

Spectroscopia de absorbție poate fi utilizată pentru caracterizarea carotenoidelor (Figură 1-7). Carotenoidele sunt renumite pentru absorbția în domeniul vizibil (între 400-550 nm), fapt ce le oferă culoarea portocaliu-roșiatică distinctă. Carotenoidele sunt caracterizate de un maxim central împreună cu alte 2 maxime secundare, uneori prezente sub forma unor umeri mai degrabă decât maxime propriu-zise. Absorbția corespunde tranziției de pe nivelul S_0 fundamental pe al doilea nivel electronic excitat S_2 . Cele trei maxime corespund tranzițiilor

vibronice (tranziții ale nivelelor vibraționale împreună cu tranziția electronică, care va corespunde unor energii diferite).

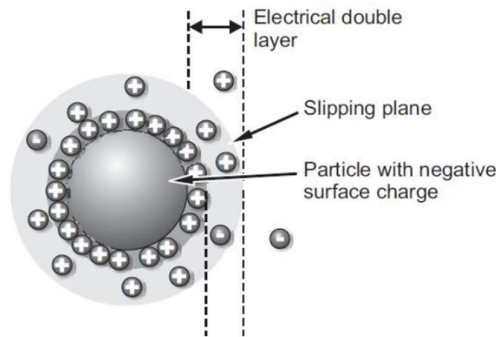


Figură 1-7 Spectrul de absorbție al carotenoidelor împreună cu tranzițiile electronice permise, interzise. Preluată din *Electronic and vibrational properties of carotenoids: from in vitro to in vivo*, Manuel J. Llansola-Portoles, Andrew A. Pascal and Bruno Robert

1.5 Metode de caracterizare a nanoparticulelor metalice

Potențial ζ

În știința coloizilor, o metodă bună de verificare a stabilității unor particule după sintetizare o reprezintă măsurarea potențialului Zeta.

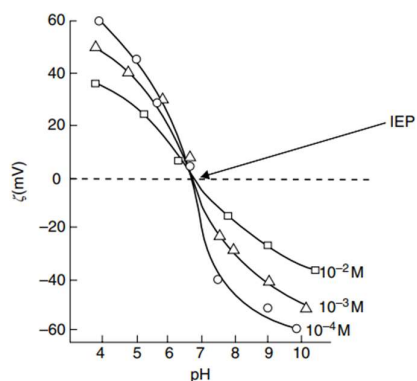


Figură 1-8 Ilustrație a unei particule în soluție, împreună cu diametrul real, stratul Stern (stratul electric dublu), urmat de stratul difuz Gouy-Chapman. Preluată din <https://nanocomposix.com/pages/zeta-potential-measurements>

Nanoparticulele sunt structuri stabile în soluție datorită moleculelor de surfactant încărcate negativ, precum anioni de citrat în cazul nanoparticulelor de aur (cit-AuNPs). Acest lucru le oferă un potențial de suprafață negativ, care se referă la lucrul mecanic ce ar fi necesar pentru aducerea unei sarcini de probă de la o zonă cu potențial 0 (adică de la infinit față de nanoparticulă) la o anumită distanță în câmpul nanoparticulei.

Evenimentele la nivel molecular ce au loc într-un coloid sunt complexe, dar la echilibru termodinamic au fost descrise prin modelul Gouy-Chapman-Stern. [18] La interfața nanoparticulei se află un strat uniform de particule încărcate, urmat de stratul Stern (stratul electric dublu), iar apoi de un strat difuz (Figură 1-8).

Potențialul nanoparticulei va scădea cu distanța. Potențialul Zeta al nanoparticulei este definit ca potențialul la suprafața unde se încheie primul strat de ioni în jurul nanoparticulei. De obicei, termenii de potențial Zeta și potențial Stern sunt interschimbabili deoarece sunt foarte apropiate, la aproximativ 0,5 nm de suprafața nanoparticulei (Goodwin, 2009).



Figură 1-9 Influența pH-ului soluției asupra potențialului Zeta; la 0, punctul izoelectric. Preluată din *Introduction to Applied Colloid and Surface Chemistry*, 2016

Experimental, potențialul Zeta se măsoară prin intermediul unor electrozi. În câmp electric, viteza nanoparticulelor este măsurată și se poate calcula mobilitatea, conform relației:

$$\mu = \frac{v}{E} \quad (13)$$

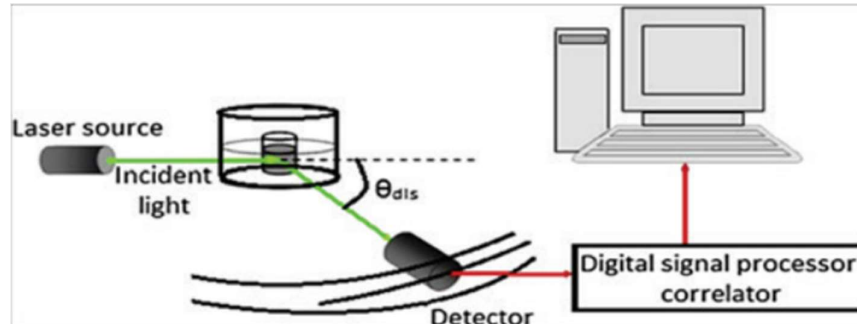
unde μ este mobilitatea, v este viteza particulelor iar E este intensitatea câmpului electric.

Cunoscând mobilitatea particulelor, constanta dielectrică relativă și vâscozitatea mediului se poate calcula potențialul Zeta al particulelor. În general, un potențial Zeta mai mare în modul decât ± 30 mV este considerat un indicator al stabilității coloidului. [19]

Figură 1-9 prezintă variația potențialului Zeta cu pH-ul soluției.

Dynamic Light Scattering (DLS)

În practică, atât dimensiunea nanoparticulelor (mai exact, diametrul hidrodinamic) cât și potențialul Zeta pot fi măsurate prin intermediul tehnicii DLS.



Figură 1-10 Setup-ul pentru DLS. Preluată din *Dynamic light scattering (DLS) technique, principle, theoretical considerations and applications*, R. Sandhu, N. Singh, J. Dhankhar, K. Gandhi and R. Sharma

Tehnica se bazează pe împrăștierea luminii incidente (de obicei o sursă laser) de către o nanoparticulă în soluție și detecția luminii împrăștiată printr-un detector. (Figură 1-10) Lumina împrăștiată de particula în mișcare va suferi o „lărgire Doppler”, care va rezulta fie în interferență distructivă, fie în interferență constructivă care ajunge la detector și este transformată în semnal. [20]

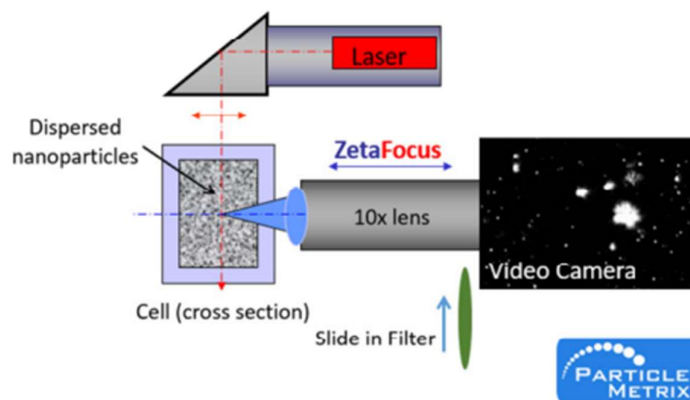
Prin determinarea vitezei particulei se poate determina și diametrul hidrodinamic al nanoparticulei (diametrul fizic al nanoparticulei + double-layerul de apă), conform ecuației Stokes-Einstein: [21]

$$D_H = kT / 6\eta\pi D$$

unde D_H este diametrul hidrodinamic al nanoparticulei, k – constanta Boltzmann, T – temperatura în grade K, iar D coeficientul de difuzie.

Nanoparticle tracking analysis (NTA)

După determinarea stabilității în soluție și a diametrului hidrodinamic, se dorește a fi determinată și concentrația de nanoparticule. Acest proces poate fi realizat automat prin intermediul tehnicii NTA.



Figură 1-11 Setup-ul pentru NTA. Preluată din <https://analytik.co.uk/wp-content/uploads/2016/12/whitepaper-nanoparticle-tracking-analysis.pdf>

Particulele dintr-o probă sunt corespunzător diluate și trecute printr-o celulă cu grosime mică ce permite vizualizarea tuturor particulelor în planul focal. Proba este iluminată cu un laser, iar lumina împrăștiată de particule trece prin obiectiv și este detectată cu o cameră CCD sau CMOS, la 90°. Imagini suprapuse înregistrate pot urmări deplasarea particulelor în timp la trecerea soluției prin celulă. Diametrul particulelor este determinat tot prin intermediul ecuației Stokes-Einstein. [22]

Cunoscând numărul de nanoparticule (determinat automat de software) și volumul total, se poate afla concentrația de nanoparticule din volumul de soluție circulat prin celulă.

2 Materiale și metode

2.1 Sinteza și caracterizarea nanoparticulelor metalice

Pentru măsurătorile SERS și pentru verificarea adsorbției pe nanoparticule prin măsurători de fluorescență, au fost sintetizate două tipuri de coloizi de nanoparticule metalice. Toate măsurătorile au fost realizate utilizând același batch de coloid, pentru a reduce variabilitatea în măsurători datorată diferențelor morfologice ale nanoparticulelor ce pot apărea între două sinteze.

Primul este coloidul de aur redus prin citrat de sodiu. Metoda de sinteză a fost adaptată după metoda Lee-Meisel.[23] S-a preparat o soluție de acid cloroauric de concentrație 23 mM. Din această soluție, 1 ml au fost dizolvați în 100 ml de apă ultrapurificată, în timpul amestecării continue prin intermediul unui agitator magnetic. După ce amestecul a atins temperatura de 100 °C, au fost adăugați 2 ml de soluție de citrat de sodiu (Na) de concentrație 1%. Gura recipientului a fost acoperită cu o folie de aluminiu și soluția a fost menținută la temperatura de 100 °C pentru încă 25 de minute. La câteva minute după adăugarea citratului, soluția a căpătat o culoare închisă, purpuriu spre negru, după care s-a modificat treptat până a devenit roșie și translucidă. Soluția a fost lăsată să ajungă la temperatura camerei.

Al doilea este coloidul de argint redus prin hidroxilamină hidrocloridă (hya-AgNPs). Metoda de sinteză a fost adaptată după Leopold și Lendl. [24] 17 mg de hidroxilamină hidrocloridă au fost dizolvați în 90 ml de apă ultrapurificată, în timpul amestecării continue prin intermediul unui agitator magnetic. De asemenea, într-un alt recipient, 17mg de hidroxilamină hidrocloridă au fost dizolvați în 8,8 ml de apă ultrapurificată, după care au fost adăugați 1,2 ml de NaOH. Soluția ce conține hidroxilamina a fost apoi turnată peste soluția de azotat de argint în timpul amestecării continue, la temperatura camerei. Soluția și-a schimbat instant culoarea, devenit aproape opacă, și având o culoare gri-gălbuie.

Ambilor coloizi le-a fost testat pH-ul (Tabel 2-1).

Tabel 2-1 Valoarea pH-ului pentru cei doi coloizi utilizați

	cit-AuNPs	hya-AgNPs
pH	5	9

Nanoparticulele sintetizate au fost caracterizate prin patru metode.

Pentru a determina stabilitatea coloizilor au fost făcute măsurători de potențial Zeta, iar pentru a determina diametrul nanoparticulelor și polidispersivitatea acestora a fost utilizată metoda DLS. Atât potențialul Zeta cât și diametrul nanoparticulelor au fost determinate cu ajutorul Zetasizer Nano ZS (Malvern), echipat cu un laser He-Ne, 4 mW, cu emisie la 633 nm.

Concentrația de nanoparticule a fost determinată prin intermediul metodei NTA. Pentru a achiziționa spectre de extincție a nanoparticulelor a fost utilizat spectrofotometrul UV-Vis V-630, Jasco.

Pentru toate măsurătorile de mai sus, nanoparticulele coloidale au fost diluate de 10^3 ori în apă ultrapură și apoi filtrate adițional printr-un filtru de 0.2 μm .

2.2 Prepararea și caracterizarea soluțiilor de carotenoide

Pentru a testa posibilitatea adsorbției carotenoidelor, respectiv apariția semnalului SERS au fost utilizate două tipuri de carotenoide, ambele hidrosolubile.

Prima substanță este un analog sintetic al beta-carotenului identic cu cel natural (BC-1-WS-P, Chr. Hansen Holding A/S) încapsulat într-o matrice de maltodextrină pentru a-i oferi hidrosolubilitate. 5 mg de pudră de beta-caroten a fost diluate în 5 ml de apă ultrapură.

A doua substanță utilizată este norbixina (Chr. Hansen Holding A/S) obținută prin extracția și uscarea pigmentului annatto din semințe de *Bixa orella L.*

Cele două carotenoide au fost caracterizate prin intermediul spectroscopiei de absorbție UV-Vis.

2.3 Pregătirea probelor de ser bovin

Pentru măsurătorile pe ser a fost utilizat ser de la o bovină adultă, nedeproteinizat, păstrat la congelator.

Proteinele din ser au fost filtrate prin două metode diferite.

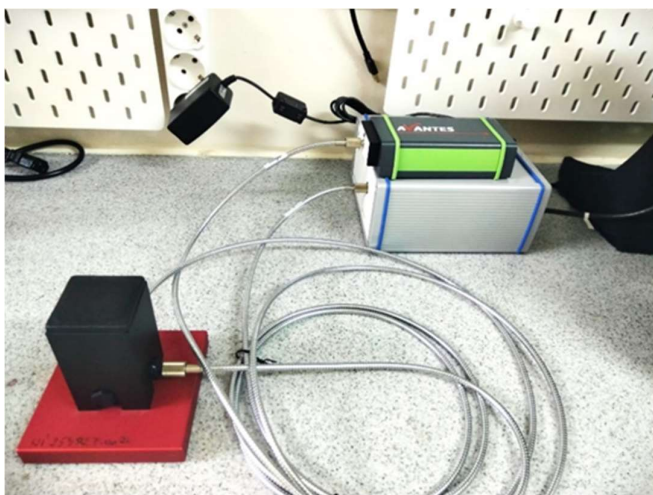
Prima metodă este deproteinizarea prin precipitare cu metanol. A fost utilizat protocolul standard. [25] La 900 de μl de metanol au fost adăugați 100 de μl de ser, iar agregarea proteinelor a fost observată instant. Pentru filtrare, trei probe astfel preparate au fost

centrifugate timp de 15 minute la 7300g. Proteinele, agregate, s-au depus sub formă de precipitat pe fundul recipientelor, iar supernatantul a fost prelevat și introdus în alt recipient.

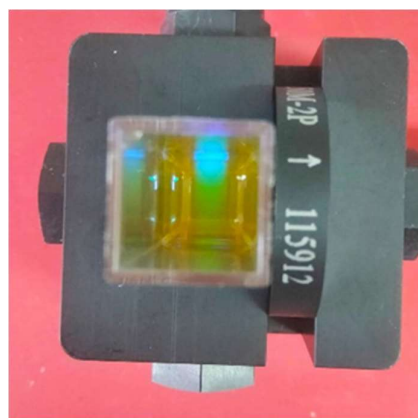
A doua metodă este filtrarea proteinelor utilizând recipientul Vivaspin® 5000 MWCO. În recipient au fost introduși 2 ml de ser. Serul a fost centrifugat timp de 25 de minute la 7300 rpm. În urma filtrării, proteinele au rămas blocate în filtru, iar substanța filtrată a fost turnată într-un alt recipient.

2.4 Măsurători de fluorescență

Monitorizarea adsorbției carotenoidelor la nanoparticule s-a realizat prin intermediul măsurătorilor de fluorescență cu ajutorul unui fluorimetru optic Avantes cu domeniu spectral 200-900 nm (Figură 2-2).



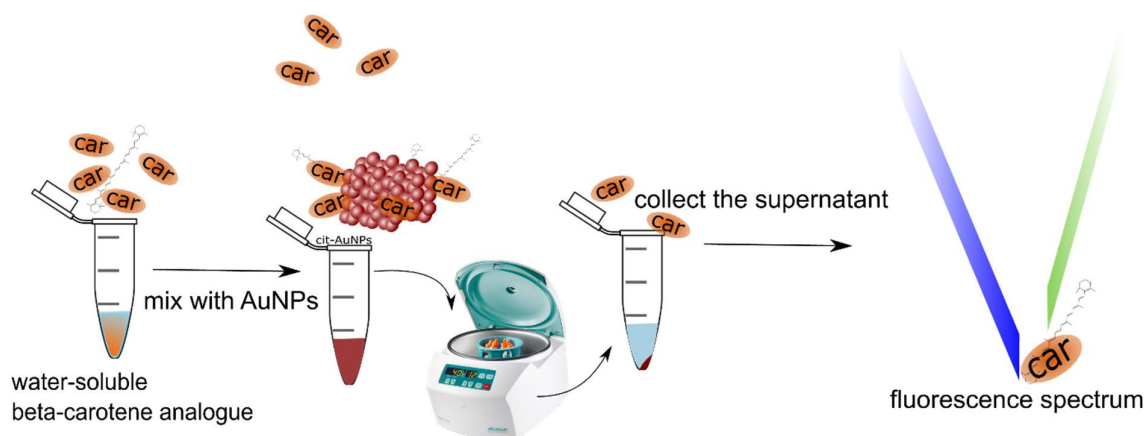
Figură 2-2 Setup-ul experimental pentru măsurarea fluorescenței. În imagine se pot vedea sursa LED, detectorul, fibra optică și suportul de probă



Figură 2-1 Cuvă pentru măsurători, ce conține soluție a analogului de beta-caroten diluat în apă. Se poate observa filtrul band-pass (dreapta), fasciculul sursei LED albastre venind de sus, fasciculul fluorescent (verde).

Mai exact, adsorbția analogului beta-carotenului a fost testată utilizând ca sursă de iluminare un LED cu maximul la 470 nm (Figură 2-1). Pentru a filtra lumina provenită de la sursă și a detecta numai semnalul fluorescent s-a utilizat un filtru bandpass cu domeniul transmitanței de 535 ± 25 nm.

2 μ l de soluție de beta-caroten de concentrație masică 500 μ g/ml au fost adăugați la 18 μ l de coloid cit-AuNPs de diferite concentrații. Soluțiile au fost centrifugate timp de 35 de minute la 11000 g, pentru filtrarea nanoparticulelor. După centrifugare, s-a prelevat supernatantul și s-a determinat prin măsurători de fluorescență concentrația de beta-caroten rămas în supernatant (neadsorbit). (Figură 2-3)



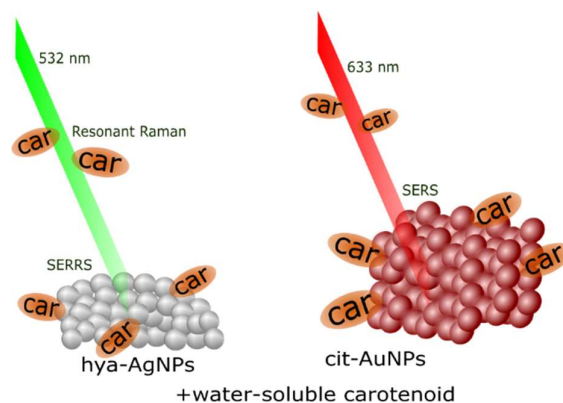
Figură 2-3 Schematizare a pașilor utilizați pentru măsurarea variației concentrației de beta-caroten liber cu modificarea numărului de nanoparticule din soluția inițială

2.5 Măsurători Raman și SERS

Specetrele Raman pentru beta-caroten au fost achiziționate cu ajutorul unui spectrometru InVia Raman Renishaw, cuplat la un obiectiv Leica, mărire 5x, în picătură de 10 μ l.

Pentru a determina posibilitatea amplificării de tip SERS/SERRS, au fost achiziționate spectre Raman Rezonant (cu o diodă laser, emisie la 532 nm) ale carotenoidelor dizolvate în apă, scăzând treptat concentrația până la atingerea concentrației limită de detecție prin Raman (la această concentrație, benzile Raman au intensitate atât de mică, încât sunt ușor de confundat cu fundalul).

S-au adăugat 90 μ l de coloid hya-AgNPs, respectiv cit-AuNPs la 10 μ l de soluție de beta-caroten, respectiv norbixină, astfel încât concentrația finală a celor două carotenoide să coincidă cu cea găsită ca limită de detecție. Spectrele au fost achiziționate cu linia laser cu emisie la 532 nm pentru coloidul de argint, respectiv cu linia laser cu emisie la 633 nm (laser He-Ne) pentru coloidul de aur. Pentru soluția cu nanoparticule de aur, s-au achiziționat spectre și cu laserul cu emisie de 532 nm pentru a verifica amplificarea în afara rezonanței plasmonice a nanoparticulelor. (Figură 2-4)



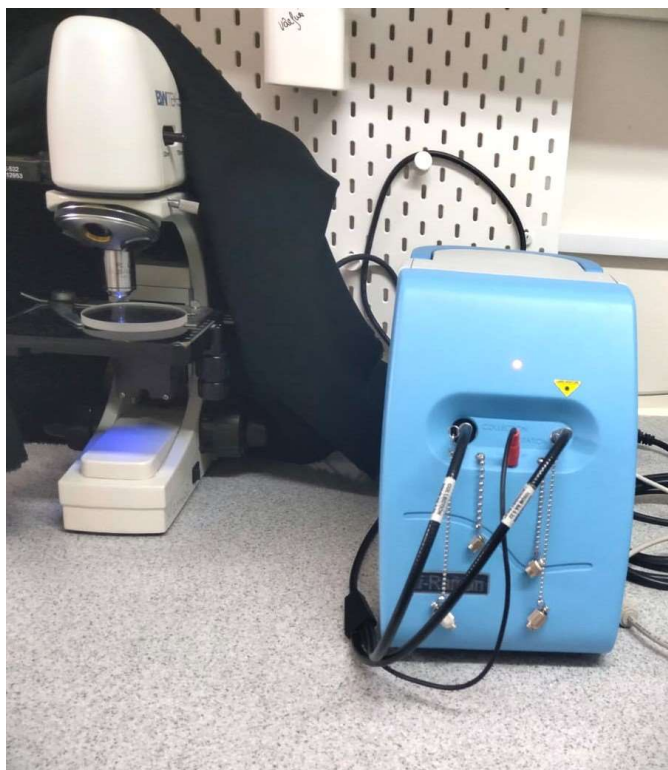
Figură 2-4 Schematizare a măsurătorilor efectuate pentru a analiza efectele Raman Rezonant/SER(R)S în cazul carotenoidelor utilizate. Apariția efectului RR este posibilă numai în cazul laserului 532 nm, dintre cele 2 cazuri.

Pentru a recrea condițiile din ser, la soluțiile precedente de beta-caroten și nanoparticule hya-AgNPs, s-a adăugat mai întâi soluție de albumine din ser bovin (BSA) de concentrație finală 0,1 mg/ml, respectiv un mix de metaboliți purinici în următoarele concentrații: 10^{-4} M pentru xantină, hipoxantină, uree și 10^{-5} M pentru acid uric.

La măsurarea norbixinei și a serului bovin s-a utilizat un spectrometru portabil i-Raman BWTek cu linie laser 532 nm, cuplat cu un microscop optic cu obiectiv de mărire 20x. (Figură 2-5).

Pentru cuantificarea semnalului RR/SERRS în cazul serului bovin s-au achiziționat spectre în paralel pentru cele trei tipuri de soluții: ser nedeprinizat, ser deprinizat prin filtrare Vivaspin® și ser deprinizat prin precipitare cu metanol.

Cele trei tipuri de soluții au fost mai întâi diluate de 10 ori în apă și s-a testat semnalul Raman, după care 5 μ l din soluții au fost adăugate la 45 μ l de coloid hya-AgNPs. Adicional, serul deprinizat prin precipitare cu metanol a fost testat adăugând 5 μ l la 45 μ l hya-AgNPs și 5 μ l de soluție cu ioni Ca^{2+} de concentrație 5×10^{-3} M pentru a obține spectru SERS asupra compușilor din ser.

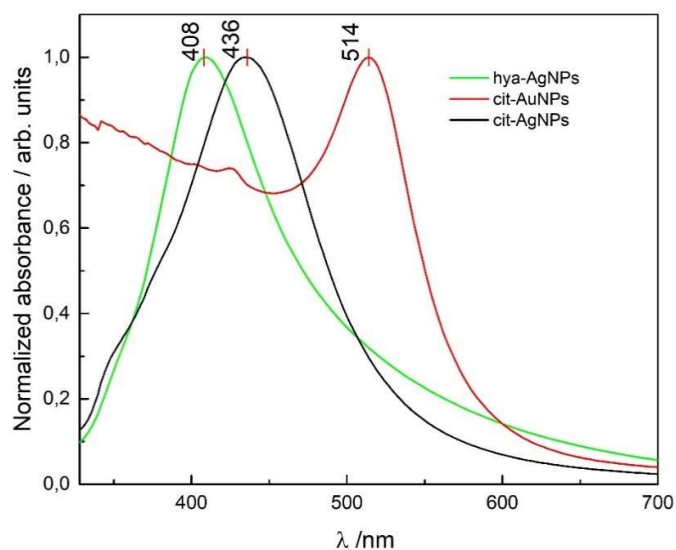


Figură 2-5 Montajul experimental utilizat pentru măsurătorile spectroscopice Raman. Se poate observa detectorul împreună cu sursa de iluminare laser, ce au fost incorporate în spectrometru (dreapta), și microscopul optic, cu un obiectiv 20x utilizat pentru a focaliza fasciculul laser pe probă (stânga).

3 Rezultate și discuții

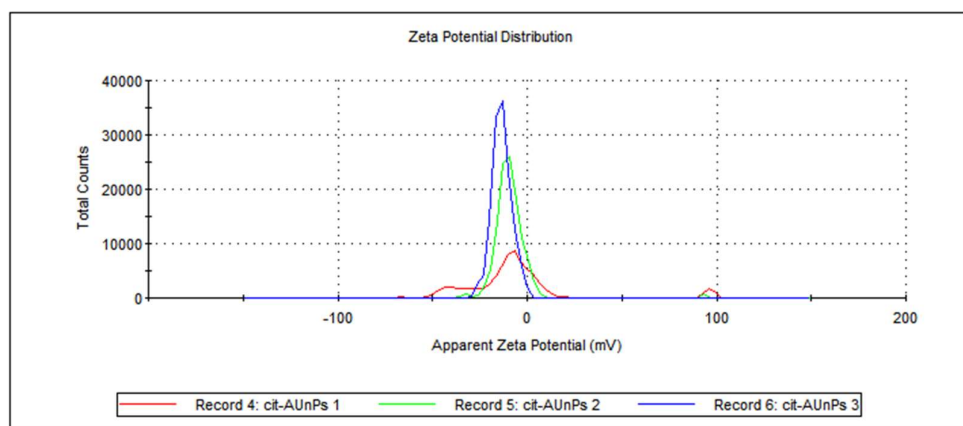
3.1 Caracterizarea nanoparticulelor metalice

Coloizii sintetizați au fost analizați prin spectroscopie UV-Vis (Figură 3-1). S-a observat un maxim al rezonanței plasmonice la 408 nm pentru hya-AgNPs. De asemenea, în cazul cit-AuNPs a fost observată banda de rezonanță plasmonică cu un maxim la 514 nm.

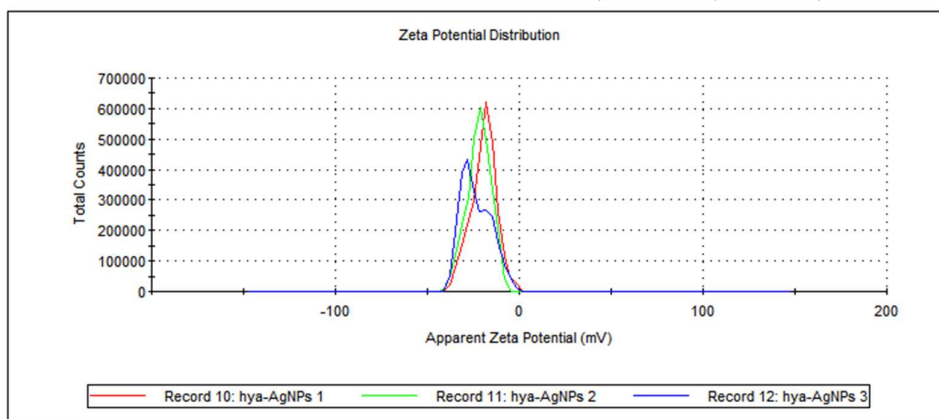


Figură 3-1 Spectrul de extincție UV-Vis pentru coloizii metalici

Măsurătorile de potențial Zeta indică, pentru hya-AgNPs un potențial de $-23,5$ mV, respectiv $-13,4$ mV pentru cit-AuNPs ceea ce indică o stabilitate bună a nanoparticulelor sintetizate (Figură 3-2, Figură 3-3).

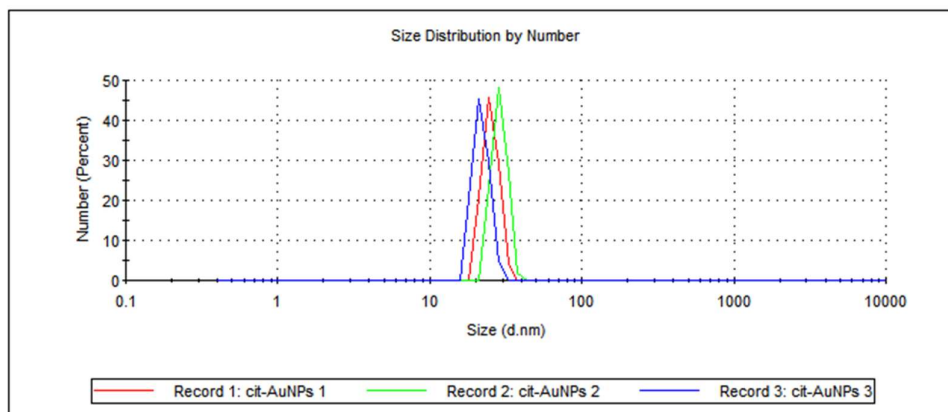


Figură 3-2 Distribuția potențialului Zeta pentru cit-AuNPs

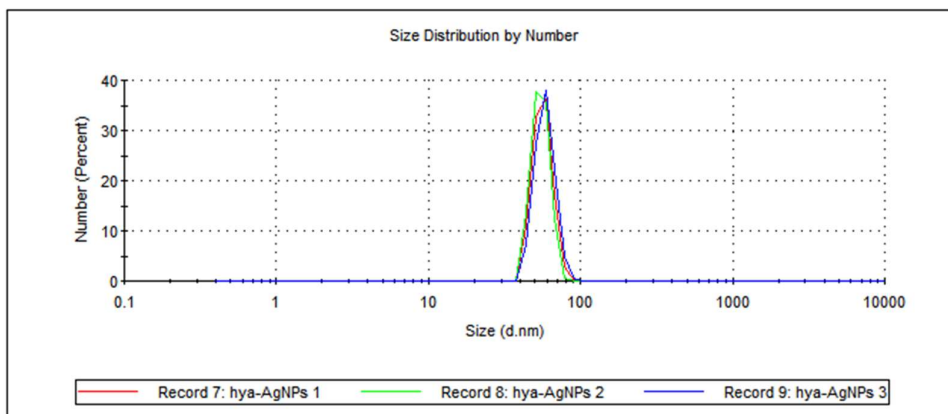


Figură 3-3 Distribuția potențialului Zeta pentru hya-AgNPs

Diametrul hidrodinamic al NPs a fost măsurat prin metoda DLS. Rezultatele măsurătorii diametrului hidrodinamic prin DLS ale cit-AuNPs prezintă un maxim la 22.23 nm și o deviație standard de 1.596 nm (Figură 3-4). Nanoparticulele de argint prezintă un singur peak, având diametrul de 62.72 nm și o deviație standard de 6.527 nm (Figură 3-5).



Figură 3-4 Distribuția diametrului hidrodinamic pentru cit-AuNPs prin DLS

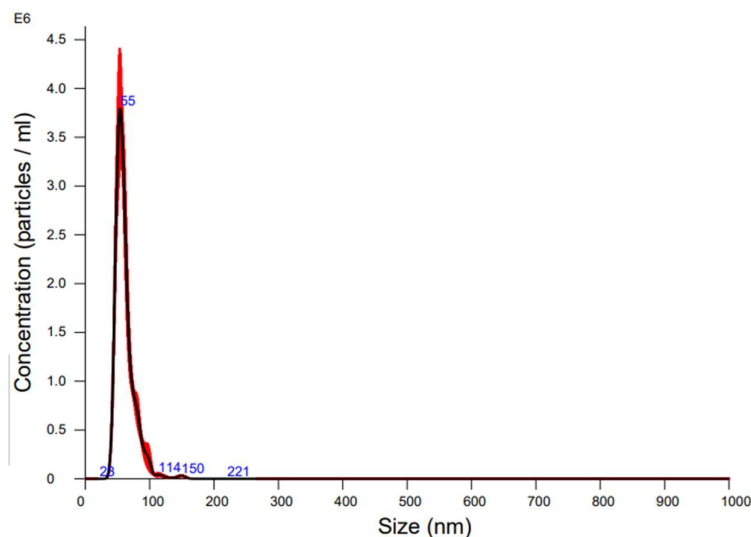


Figură 3-5 Distribuția diametrului hidrodinamic pentru hya-AgNPs prin DLS

În urma analizei NTA s-a calculat o concentrație medie a nanoparticulelor care poate fi citită în Tabel 3-1. Măsurătorile NTA au oferit și măsurători asupra distribuției de diametru al nanoparticulelor. În Figură 3-6 se poate observa un peak la 55 nm pentru hya-AgNPs, care este diametrul hidrodinamic pentru majoritatea nanoparticulelor măsurate (peak-ul principal)

Tabel 3-1 Concentrația nanoparticulelor, măsurată prin metoda NTA (după diluare de 10^3 ori)

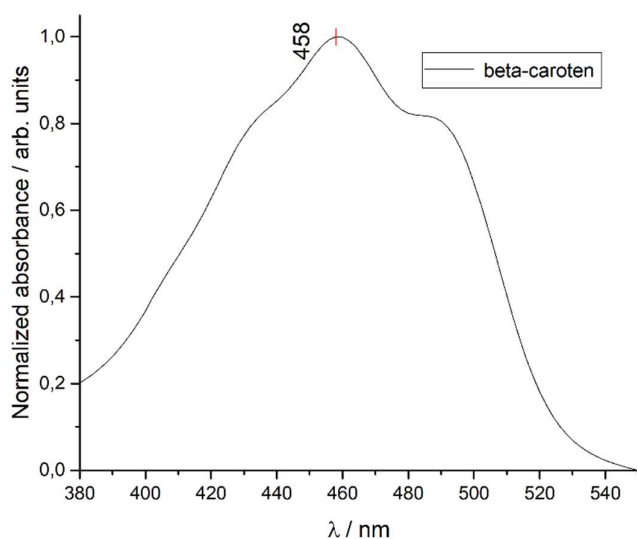
Tip nanoparticule	Concentrație medie (diluție 10^3 x)
hya-AgNPs	$9.25e+007 \pm 1.65e+006$ particles/ml
cit-AuNPs	$2.82e+008 \pm 1.30e+007$ particles/ml



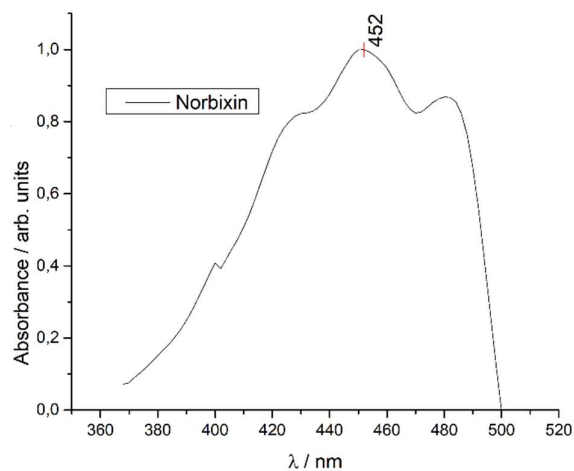
Figură 3-6 Distribuția diametrului hidrodinamic pentru hya-AgNPs prin metoda NTA

3.2 Caracterizarea carotenoidelor

Pentru caracterizarea carotenoidelor au fost achiziționate spectre de absorbție UV-Vis. Spectrele de absorbție (Figură 3-7, Figură 3-8) prezintă domeniul tipic de absorbție al carotenoidelor (între 400 și 500 nm) împreună cu un maxim central (care diferă în funcție de tipul de carotenoidă respectiv de solvent, împreună cu doi umeri în stânga și în dreapta maximului. Așa cum am prezentat în secțiunea 1.4, aceste trei maxime de absorbție corespund celor trei vibrații ale aceleiași tranziții electronice de pe nivelul electronic fundamental pe al doilea nivel excitat. Ușoare variații în poziția maximului apar datorită influenței solventului și al pH-ului soluției.



Figură 3-7 Spectrul de absorbție UV-Vis al analogului hidrosolubil al beta-carotenului



Figură 3-8 Spectrul de absorbție UV-Vis al norbixinei

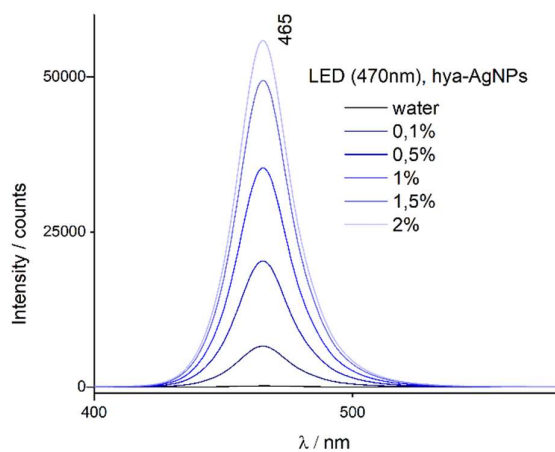
3.3 Monitorizarea adsorbției prin fluorescență

Soluțiile de beta-caroten au prezentat spectru de fluorescență la excitarea cu lumină la 470 nm.. Toate măsurătorile au prezentat un maxim al emisie fluorescente la 519 nm (Figură 3-10).

Fluorescența, fiind o metodă sensibilă de detecție a concentrației unei substanțe în soluție a fost utilizată pentru a determina cantitatea de beta-caroten rămasă în supernatant, adică beta-carotenul

liber ce nu a adsorbit pe suprafața nanoparticulelor. Nanoparticulele metalice interacționează cu lumina din domeniul vizibil așa cum am arătat în secțiunea 3.1, iar prezența nanoparticulelor în probă poate duce la deflecția luminii din calea detectorului și, în consecință poate interfera cu măsurătorile de fluorescență. Pentru măsurători precise este deci necesară îndepărtarea nanoparticulelor, împreună cu moleculele adsorbite pe acestea și măsurarea fluorescenței datorată fracției libere de beta-caroten din soluție. Acest lucru a fost realizat prin centrifugare și măsurarea supernatantului.

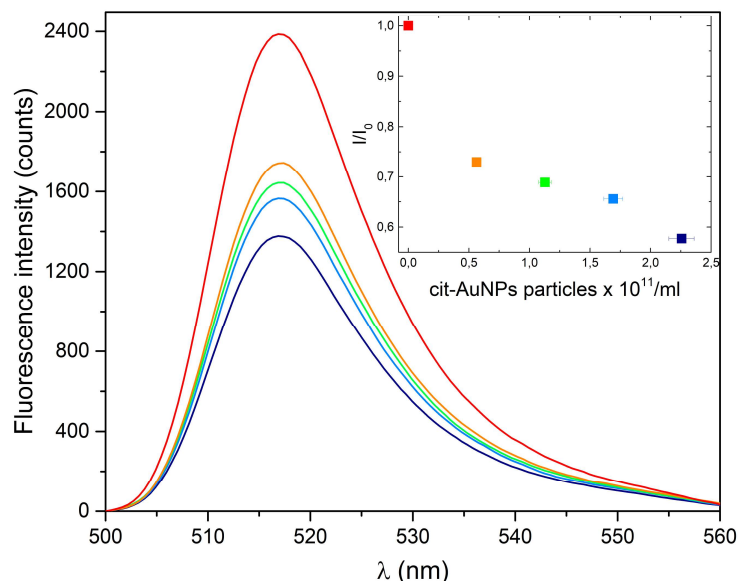
În ciuda centrifugării cu timpi îndelungați și viteze mari, cantități mici de nanoparticule rămân în supernatant. În cazul nanoparticulelor de aur, acest lucru nu interferă cu măsurătorile de fluorescență deoarece nanoparticulele de aur interacționează slab cu LED-ul de 470 nm. În schimb, nanoparticulele de argint, cu un maxim de extincție la 408 nm împrăștie puternic lumina sursei LED și s-a constatat o creștere în intensitate și o lățire a spectrului sursei datorate sursei LED chiar și la concentrații foarte mici de nanoparticule de argint prezente în soluție (Figură 3-9). Acest aspect face ca hya-AgNPs să fie nepotrivite pentru experimentul nostru.



Figură 3-9 Spectrul sursei LED prin detectorul fluorimetruului la diferite concentrații de coloid hya-AgNPs dispersat în apă. Se poate observa o creștere semnificativă a semnalului la concentrații foarte mici de coloid. Procentele reprezintă fracția de coloid față de volumul total de apă.

Așadar, determinarea adsorbției beta-carotenului pe NPs a fost monitorizată prin fluorescență doar pentru AuNPs. S-a măsurat intensitatea fluorescenței pentru supernatantul celor 5 soluții cu concentrații diferite de nanoparticule și s-a constatat că există o corelare negativă între intensitatea semnalului fluorescent și concentrația de nanoparticule din soluția inițială (Figură 3-10). Metoda verifică ipoteza că, odată cu creșterea concentrației de nanoparticule și astfel a suprafeței

adsorbentului, există și o creștere a numărului de molecule adsorbite și prin urmare apare o scădere a concentrației moleculelor în soluția de la care se măsoară semnalul fluorescent.



Figură 3-10 Spectrul de emisie fluorescentă al beta-carotenului din supernatant la diferite concentrații de nanoparticule. Dreapta-sus: raportul intensității la maximul emisiei de 519 nm (I) față de valoarea inițială (I_0), în funcție de concentrația de nanoparticule adăugate arată clar o scădere a semnalului fluorescent cu creșterea concentrației de nanoparticule, adică a suprafeței de adsorbție valabilă

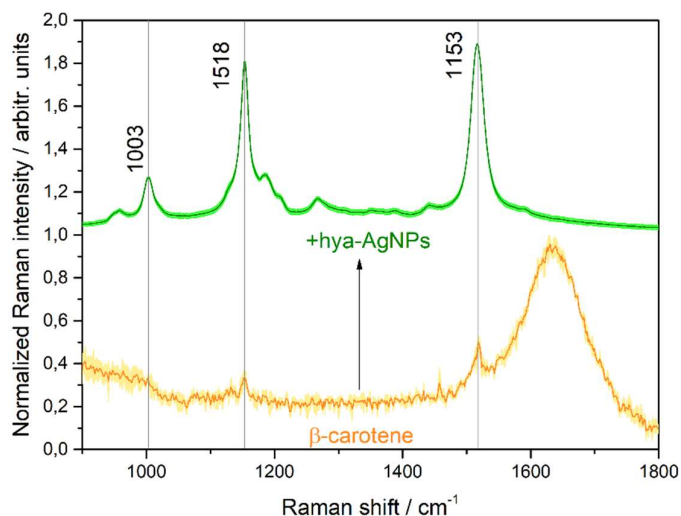
3.4 Amplificarea Raman a semnalului carotenoidelor

3.4.1 Carotenoide hidrosolubile

Caracterizarea semnalului carotenoidelor s-a realizat prin intermediul celor trei deplasări Raman Stokes specifice acestora. În cazul beta-carotenului, cele trei benzi au fost identificate la 1000, 1152, 1523 cm^{-1} în coloidul de aur, respectiv 1003, 1153, 1518 cm^{-1} în cazul coloidului de argint. Mici shift-uri în poziția benzilor pot apărea datorită adsorbției moleculei pe suprafața nanoparticulei. Pentru norbixină, cele trei benzi se află la 1010, 1154 și 1520 cm^{-1} .

Posibilitatea amplificării semnalului de la beta-caroten a fost mai întâi testat prin amestecarea acestuia la coloid hya-AgNPs. La concentrația-limită de detecție prin Raman Rezonant, două dintre cele trei benzi caracteristice carotenoidei încă mai pot fi observate, având însă o intensitate slabă față de banda apei aflată la $\approx 1645 \text{ cm}^{-1}$ (Figură 3-11). Acest fapt indică prezența semnalului Raman Rezonant al beta-carotenului la limita sa inferioară. După amestecarea cu coloidul de argint, s-a constatat o creștere a semnalului carotenoidei de ordinul 10^4 , fără adăugarea de adioni

în soluție. Datorită suprapunerii efectului de Rezonanță Raman cât și a excitării în banda plasmonică a nanoparticulelor, apare combinarea celor două efecte (SERRS). Se subliniază faptul că, acest rezultat a fost obținut pentru analogul hidrosolubil al beta-carotenului.

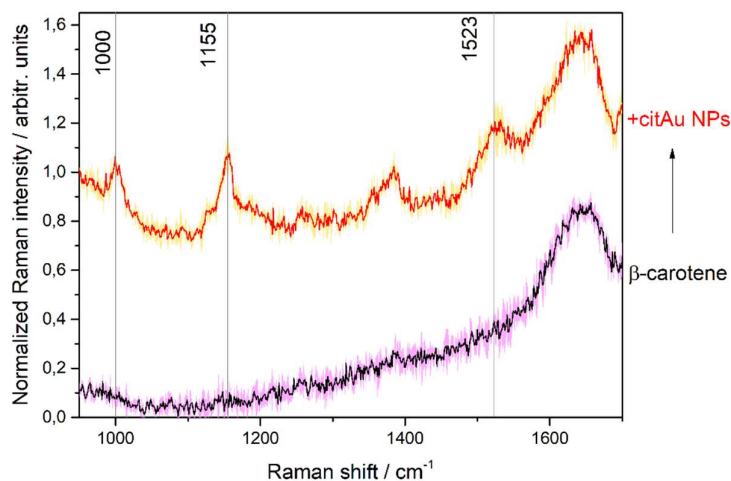


Figură 3-11 Jos: Spectrul Raman al beta-carotenului în soluție apoasă la limita de detecție. Sus: spectrul SERS al beta-carotenului la aceeași concentrație, în coloid hya-AgNPs (verde, sus), împreună cu deviațiile standard. Linie laser utilizată: 532 nm. Spectrele au fost normalizate la unitate.

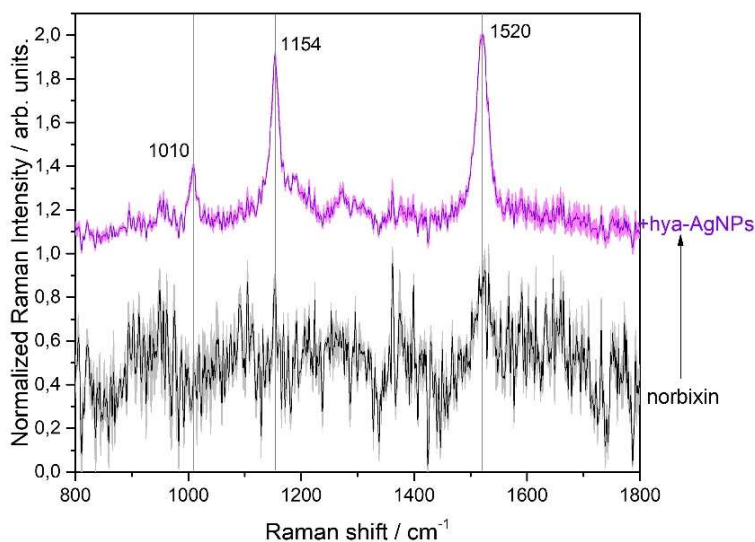
În continuare s-a testat posibilitatea ca semnalul analogului beta-carotenului să fie amplificat prin substratul metalic și în afara domeniului de rezonanță al moleculei (SERS). Măsurătorile în coloid cit-AuNPs și cu sursa laser de 633 nm (în LSPR a nanoparticulelor) au demonstrat o amplificare a benzilor carotenoidelor, care la aceeași concentrație, prin Raman, nu au putut fi detectate (Figură 3-12)

Spectrul SERS al beta-carotenului în prezența AuNPs a fost achiziționat și folosind ca sursă de excitare laserul de 532 nm (în afara LSPR a nanoparticulelor însă în rezonanță cu carotenoida). În acest caz s-a constatat o lipsă a benzilor carotenoidelor. Acest fapt confirmă apariția efectului SERS, deoarece benzile carotenoidelor nu au putut fi amplificate decât îndeplinind condiția de rezonanță plasmonică. Amplificarea în cazul coloidului de aur este însă scăzută în comparație cu cea a coloidului de argint, iar efectul se datorează și absenței rezonanței Raman a carotenoidelor, care contribuie adițional la amplificarea observată în (Figură 3-12).

Același protocol a fost repetat și în cazul norbixinei, un carotenoid solubil în apă. În cazul hya-AgNPs, excitate cu 532 nm (atât în banda de rezonanță a nanoparticulelor, cât și în rezonanță cu carotenoida) s-a obținut amplificare SERRS pentru cele trei benzi caracteristice. În schimb, măsurătorile asupra norbixinei în coloid cit-AuNPs nu au prezentat amplificare SERS la excitarea cu 633 nm (Figură 3-12).



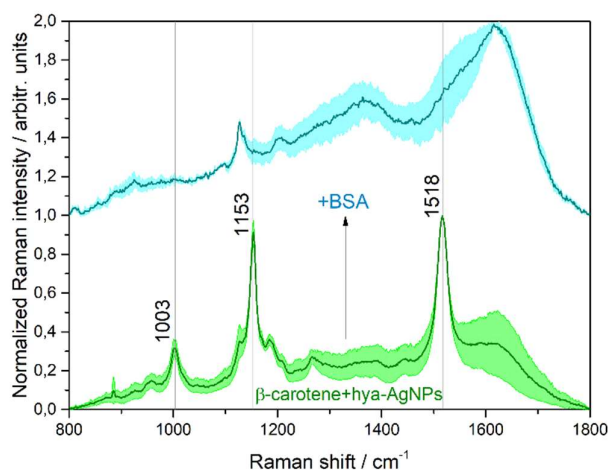
Figură 3-12 Jos: spectrul Raman al beta-carotenului în soluție apoasă la limita de detecție. Sus: spectrul SERS al beta-carotenului la aceeași concentrație, în coloid cit-AuNPs (roșu, sus), împreună cu deviațiile standard. Linie laser utilizată: 632,8 nm. Spectrele au fost normalizate la unitate.



Figură 3-13 Jos: spectrul Raman al norbixinei în soluție apoasă la limita de detecție. Sus: spectrul SERS al norbixinei la aceeași concentrație, în coloid hya-AgNPs (violet, sus), împreună cu deviațiile standard. Linie laser utilizată: 532 nm. Spectrele au fost normalizate la unitate.

3.4.2 Influența albuminei și a metaboliților purinici

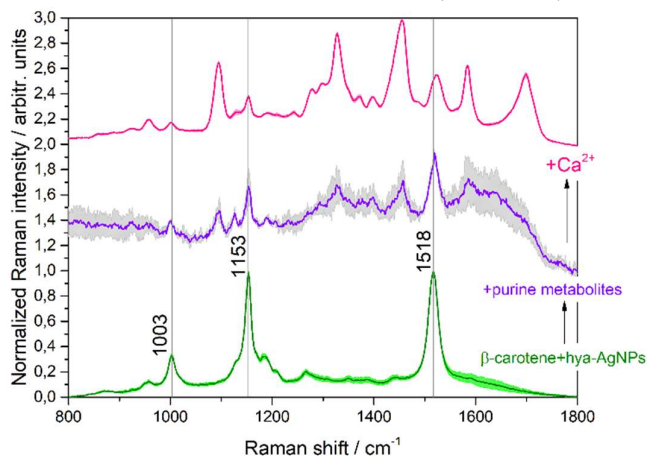
La adăugarea albuminei la soluția cu beta-caroten și nanoparticule, benzile SERS ale carotenoidelor nu au mai putut fi detectate (Figură 3-14). Este cunoscut faptul că albuminele pot crea o „coroană de proteine” (*protein corona*) în jurul nanoparticulelor, împiedicând adsorbția analogului solubil al beta-carotenului la nanoparticulă. [26]



Figură 3-14 Jos: spectrul SERS al beta-carotenului în coloid hya-AgNPs. Sus: spectrul unei soluții identice după adăugarea de BSA, 0,1 mg/ml, împreună cu deviațiile standard. Linie laser utilizată: 532 nm. Spectrele au fost normalizate la unitate.

În schimb, la adăugarea de metaboliți purinici la soluția de nanoparticule cu beta-caroten (xantină, hipoxantină, acid uric și uree în concentrații comparabile cu cele din serul uman), s-au observat atât benzi datorate metaboliților purinici cât și benzi datorate metaboliților purinici (Figură 3-15), benzile carotenoidelor având însă cea mai mare intensitate, indicând afinitate ridicată față de suprafața nanoparticulei.

În studii anterioare, semnalul SERS al metaboliților purinici a fost facilitat de adăugarea ionilor de Ca²⁺ [27]. La adăugarea calciului, raportul dintre benzile metaboliților purinici și benzile beta-carotenului s-a inversat, indicând că atât metaboliții purinici cât și beta-carotenul a adsorbit la suprafața nanoparticulelor.

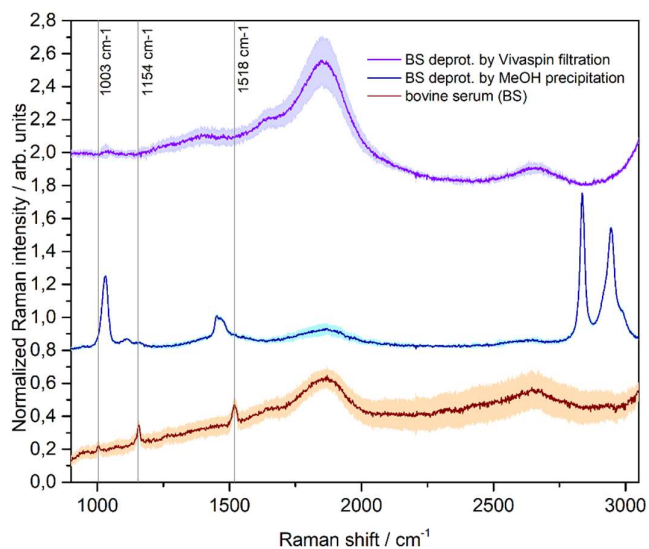


Figură 3-15 Jos: spectrul SERS al beta-carotenului în coloid hya-AgNPs. Mijloc: spectrul unei soluții identice după adăugarea unui mix de metaboliți purinici. Sus: spectrul unei soluții identice cu cea din mijloc după adăugarea de ioni Ca^{2+} , împreună cu deviațiile standard. Linie laser utilizată: 532 nm. Spectrele au fost normalizate la unitate.

3.4.3 Ser bovin

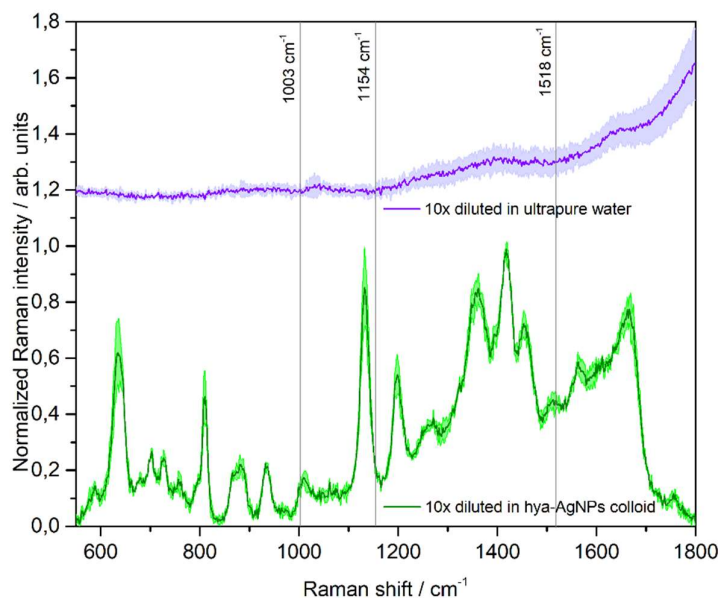
Pentru serul bovin, serul deproteinizat prin precipitare cu metanol respectiv serul filtrat cu Vivaspin s-a măsurat spectrul Raman cu laserul de 532 nm, pentru a identifica benzile Raman Rezonante ale carotenoidelor.

În cazul serului nedeproteinizat, s-au observat cele trei vibrații specifice carotenoidelor, la 1003, 1154 respectiv 1518 cm^{-1} , indicând prezența carotenoidelor. În cazul serului deproteinizat, indiferent de metoda folosită, benzile carotenoidelor nu au mai putut fi detectate (Figură 3-16). Acest fapt confirmă că, în cazul serului bovin analizat, metodele de deproteinizare au avut de asemenea ca rezultat îndepărtarea carotenoidelor împreună cu proteinele serice. Același rezultat a fost observat pentru probe de ser bovin diferite. Rezultatul măsurătorilor Raman nu exclude însă posibilitatea ca serul filtrat să conțină totuși carotenoide, însă cu o concentrație sub limita de detecție Raman Rezonant.



Figură 3-16 Jos: Spectrul Raman din ser bovin, diluat de 10x în apă. Mijloc: spectrul Raman al serului de bovină după deproteinizare prin precipitare cu metanol. Sus: spectrul Raman al serului de bovină după filtrarea prin centrifugare în Vivaspin, diluat de 10x în apă. Linie laser utilizată: 532 nm. Spectrele au fost normalizate la unitate.

Serul deproteinizat prin filtrare cu Vivaspin a fost amestecat cu coloid hya-AgNPs pentru a măsura semnalul SERS. Au fost identificate benzi caracteristice principalilor metaboliți purinici detectabili în ser prin SERS, însă benzi caracteristice carotenoidelor nu au putut fi detectate (Figură 3-17).



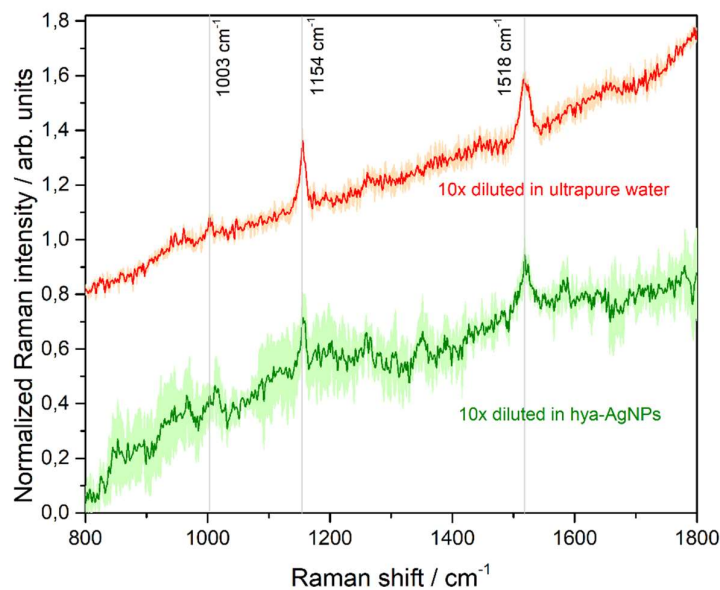
Figură 3-17 Sus: spectrul Raman al serului de bovină deproteinizat prin filtrare cu Vivaspin. Jos: spectrul SERS al serului deproteinizat prin filtrare cu Vivaspin în coloid hya-AgNPs. Linie laser utilizată: 532 nm. Spectrele au fost normalizate la unitate.

Rezultatele măsurătorilor SERS pentru cele două tipuri de deproteinizări conduce la următoarele constatări:

- (1) După deproteinizare, carotenoidele fie sunt complet filtrate împreună cu proteinele, fie rămân în ser într-o concentrație prea mică pentru a putea fi detectată;
- (2) Semnal de la carotenoide nu a putut fi detectat prin Raman Rezonant sau SERS în rezonanța carotenoidelor, pentru serul deproteinizat.

Aceste rezultate sunt în concordanță cu numeroase surse din literatură, unde se raportează faptul că toate carotenoidele, fiind molecule nepolare, sunt transportate în sânge prin intermediul lipoproteinelor.[10] De asemenea, despre metanol, se cunoaște că este un solvent slab pentru carotenoidele serice față de alți solvenți organici precum hexanul[28].

S-au realizat, de asemenea, măsurători asupra serului nedeproteinizat, la care s-a adăugat coloid de argint. Nici măsurătorile serului nedeproteinizat nu indică o amplificare SERS a benzilor carotenoidelor (Figură 3-18). Acest lucru are loc deoarece carotenoidele, înglobate în lipoproteine, nu adsorb spontan la suprafața nanoparticulelor. [29]



Figură 3-18 Sus: spectrul Raman al serului bovin. Jos: spectrul SERS al serului deproteinizat prin filtrare cu Vivaspin în coloid hya-AgNPs. Linie laser utilizată: 532 nm. Spectrele au fost normalizate la unitate.

Concluzii

În concluzie, lucrarea de față reprezintă o analiză sistematică a efectelor implicate în spectroscopia SERS asupra carotenoidelor, cu aplicații în analiza serului, biofluid în care prezența carotenoidelor este de interes pentru biopsia lichidă SERS.

Studiul de față indică apariția efectului SERRS pentru două carotenoide hidrosolubile, la excitare cu laser 532 nm, linie laser care se potrivește atât cu domeniul de absorbție al carotenoidelor și duce la Raman Rezonant, cât și cu domeniul de rezonanță al nanoparticulelor, care duce la amplificarea dată de substratul metalic pentru moleculele adsorbite. La limita de detecție a semnalului prin Raman Rezonant, carotenoidele au prezentat amplificare SERRS la adăugarea de nanoparticule de argint.

În cazul beta-carotenului hidrosolubil, s-a detectat o amplificare SERS la adăugarea nanoparticulelor de aur și excitare cu laser la 633 nm, care îndeplinește numai condiția de rezonanță a nanoparticulelor și se află în afara benzii de absorbție a carotenoidelor. Efectul de amplificare a fost de aproximativ 10 ori mai slab decât efectul SERRS în prezența nanoparticulelor de argint.

Măsurătorile de fluorescență au indicat o scădere a concentrației de beta-caroten liber corelată cu creșterea numărului de nanoparticule din soluția inițială, ceea ce duce la concluzia creșterii numărului de carotenoide adsorbite la suprafața nanoparticulelor.

Au fost studiate de asemenea efectele cauzate de principalii analiți prezenți în ser asupra semnalului SERRS al beta-carotenului hidrosolubil. S-a constatat o dispariție totală a semnalului în prezența BSA, și o scădere în prezența metaboliților purinici, care au adsorbit pe nanoparticule, dislocuind numai parțial beta-carotenul.

S-a testat de asemenea semnalul provenit de la carotenoide pentru probe de ser bovin. S-a observat o prezență a carotenoidelor în serul nedeprotenizat, însă acest semnal nu a fost amplificat în prezența nanoparticulelor, indicând lipsa adsorbției spontane. În serul deproteinizat prin precipitare cu metanol, respectiv prin filtrare cu Vivaspin, carotenoidele nu au putut fi detectate prin Raman Rezonant sau SERRS, indicând o filtrare a carotenoidelor împreună cu proteinele serice, de care acestea sunt legate.

Bibliografie

- [1] A. Stefancu, M. Badarinza, V. Moisoiu, S.D. Iancu, O. Serban, N. Leopold, D. Fodor, SERS-based liquid biopsy of saliva and serum from patients with Sjogren's syndrome, *Anal Bioanal Chem*, 411 (2019) 5877-5883.
- [2] D.C. Bocsa, C. Socaciu, S.D. Iancu, M.A. Pelea, R.I. Gutiu, N. Leopold, D. Fodor, Stage related metabolic profile of the synovial fluid in patients with acute flares of knee osteoarthritis, *Med Pharm Rep*, 95 (2022) 438-445.
- [3] T. Moisoiu, S.D. Iancu, D. Burghelea, M.P. Dragomir, G. Iacob, A. Stefancu, R.G. Cozan, O. Antal, Z. Balint, V. Muntean, R.I. Badea, E. Licarete, N. Leopold, F.I. Elec, SERS Liquid Biopsy Profiling of Serum for the Diagnosis of Kidney Cancer, *Biomedicines*, 10 (2022).
- [4] A. Bonifacio, S. Dalla Marta, R. Spizzo, S. Cervo, A. Steffan, A. Colombatti, V. Sergio, Surface-enhanced Raman spectroscopy of blood plasma and serum using Ag and Au nanoparticles: a systematic study, *Anal Bioanal Chem*, 406 (2014) 2355-2365.
- [5] M. Guhlke, Z. Heiner, J. Kneipp, Surface-Enhanced Raman and Surface-Enhanced Hyper-Raman Scattering of Thiol-Functionalized Carotene, *J Phys Chem C Nanomater Interfaces*, 120 (2016) 20702-20709.
- [6] V. Bohm, G. Lietz, B. Olmedilla-Alonso, D. Phelan, E. Reboul, D. Banati, P. Borel, J. Corte-Real, A.R. de Lera, C. Desmarchelier, J. Dulinska-Litewka, J.F. Landrier, I. Milisav, J. Nolan, M. Porrini, P. Riso, J.M. Roob, E. Valanou, A. Wawrzyniak, B.M. Winklhofer-Roob, R. Ruhl, T. Bohn, From carotenoid intake to carotenoid blood and tissue concentrations - implications for dietary intake recommendations, *Nutr Rev*, 79 (2021) 544-573.
- [7] R. Fujii, Y. Tsuboi, K. Maeda, Y. Ishihara, K. Suzuki, Analysis of Repeated Measurements of Serum Carotenoid Levels and All-Cause and Cause-Specific Mortality in Japan, *JAMA Netw Open*, 4 (2021) e2113369.
- [8] T. Bohn, Carotenoids and Markers of Oxidative Stress in Human Observational Studies and Intervention Trials: Implications for Chronic Diseases, *Antioxidants (Basel)*, 8 (2019).
- [9] J. Freeland-Graves, T. Milani, *Modern Chromatographic Analysis of Vitamins*. 3rd Edition, Revised and Expanded Edited by Andre P. De Leenheer, Willy E. Lambert, and Jan F. Van Bocxlaer (University of Ghent, Belgium). , *Journal of the American Chemical Society*, 123 (2001) 191-191.
- [10] R.S. Parker, Absorption, metabolism, and transport of carotenoids, *FASEB J*, 10 (1996) 542-551.
- [11] in: E.C. Le Ru, P.G. Etchegoin (Eds.) *Principles of Surface-Enhanced Raman Spectroscopy*, Elsevier, Amsterdam, 2009, pp. 655-663.
- [12] P.J. Larkin, Chapter 2 - Basic Principles, in: P.J. Larkin (Ed.) *Infrared and Raman Spectroscopy (Second Edition)*, Elsevier 2018, pp. 7-28.
- [13] J.R. Ferraro, K. Nakamoto, C.W. Brown, *Introductory Raman spectroscopy*, 2nd ed., Academic Press, Amsterdam ; Boston, 2003.
- [14] M.J. Llansola-Portoles, A.A. Pascal, B. Robert, Electronic and vibrational properties of carotenoids: from in vitro to in vivo, *J R Soc Interface*, 14 (2017).
- [15] S.Y. Ding, E.M. You, Z.Q. Tian, M. Moskovits, Electromagnetic theories of surface-enhanced Raman spectroscopy, *Chem Soc Rev*, 46 (2017) 4042-4076.
- [16] An Introduction to

Fluorescence

Spectroscopy, PerkinElmer, Inc,

<https://www.chem.uci.edu/~dmitryf/manuals/Fundamentals/Fluorescence%20Spectroscopy.pdf>.

- [17] L. Lu, L. Shi, J. Secor, R. Alfano, Resonance Raman scattering of β -carotene solution excited by visible laser beams into second singlet state, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 179 (2018) 18-22.
- [18] A. Allagui, H. Benaoum, O. Olendski, On the Gouy–Chapman–Stern model of the electrical double-layer structure with a generalized Boltzmann factor, *Physica A: Statistical Mechanics and its Applications*, 582 (2021) 126252.
- [19] Intermolecular and Interparticle Forces, *Introduction to Applied Colloid and Surface Chemistry* 2016, pp. 11-33.
- [20] <https://www.nottingham.ac.uk/ncmh/documents/papers/paper208.pdf>.
- [21] R. Sandhu, N. Singh, J. Dhankhar, K. Gandhi, R. Sharma, Dynamic light scattering (DLS) technique, principle, theoretical considerations and applications, 2018, pp. 135-137.
- [22] <https://analytik.co.uk/wp-content/uploads/2016/12/whitepaper-nanoparticle-tracking-analysis.pdf>.
- [23] P.C. Lee, D. Meisel, Adsorption and surface-enhanced Raman of dyes on silver and gold sols, *The Journal of Physical Chemistry*, 86 (1982) 3391-3395.
- [24] N. Leopold, B. Lendl, A New Method for Fast Preparation of Highly Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) Active Silver Colloids at Room Temperature by Reduction of Silver Nitrate with Hydroxylamine Hydrochloride, *Journal of Physical Chemistry B - J PHYS CHEM B*, 107 (2003).
- [25] <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6731838/>.
- [26] L. Treuel, D. Docter, M. Maskos, R.H. Stauber, Protein corona – from molecular adsorption to physiological complexity, *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 6 (2015) 857-873.
- [27] V. Moisoiu, S.D. Iancu, A. Stefancu, T. Moisoiu, B. Pardini, M.P. Dragomir, N. Crisan, L. Avram, D. Crisan, I. Andras, D. Fodor, L.F. Leopold, C. Socaciu, Z. Balint, C. Tomuleasa, F. Elec, N. Leopold, SERS liquid biopsy: An emerging tool for medical diagnosis, *Colloids Surf B Biointerfaces*, 208 (2021) 112064.
- [28] K.J. McGraw, E.A. Tourville, M.W. Butler, A quantitative comparison of the commonly used methods for extracting carotenoids from avian plasma, *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 62 (2008) 1991-2002.
- [29] S. Lin, L. Quaroni, W.S. White, T. Cotton, G. Chumanov, Localization of carotenoids in plasma low-density lipoproteins studied by surface-enhanced resonance Raman spectroscopy, *Biopolymers*, 57 (2000) 249-256.

Anexa 2**DECLARAȚIE PE PROPRIE RĂSPUNDERE**

Subsemnata, **Ion Georgiana**, declar că **Lucrearea de licență** pe care o voi prezenta în cadrul examenului de finalizare a studiilor la **Facultatea de Fizică**, din cadrul Universității Babeș-Bolyai, în sesiunea **iulie 2023**, sub îndrumarea **prof. dr. Nicolae Leopold**, reprezintă o operă personală. Menționez că nu am plagiat o altă lucrare publicată, prezentată public sau un fișier postat pe Internet. Pentru realizarea lucrării am folosit exclusiv bibliografia prezentată și nu am ascuns nici o altă sursă bibliografică sau fișier electronic pe care să le fi folosit la redactarea lucrării.

Prezenta declarație este parte a lucrării și se anexează la aceasta.

Data,

19.06.2023

Nume,

Ion Georgiana

Semnătură

