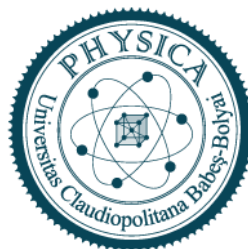


UNIVERSITATEA BABEȘ-BOLYAI CLUJ NAPOCA
FACULTATEA DE FIZICĂ
BIOFIZICĂ ȘI FIZICĂ MEDICALĂ



LUCRARE DE DISERTAȚIE

Coordonator științific

Prof. dr. Nicolae LEOPOLD

dr. Ștefania-Dana IANCU

drd. Ramona-Gabriela COZAN

Absolvent

Giulia-Roberta HADA

2025

UNIVERSITATEA BABEȘ-BOLYAI CLUJ NAPOCA
FACULTATEA DE FIZICĂ
BIOFIZICĂ ȘI FIZICĂ MEDICALĂ



LUCRARE DE DISERTAȚIE

**Optimizarea protocolului de analiză SERS a
biofluidelor în vederea îmbogățirii semnalului detectat**

Coordonator științific

Prof. dr. Nicolae LEOPOLD

dr. Ștefania-Dana IANCU

drd. Ramona-Gabriela COZAN

Absolvent

Giulia-Roberta HADA

2025

CUPRINS

ABSTRACT	4
INTRODUCERE	5
CAPITOLUL I. NOȚIUNI TEORETICE	7
I.1. Spectroscopia Raman	7
I.2. Spectroscopia Raman Amplificată de Suprafață (SERS)	8
I.3 Tehnica SERS în medicină	11
CAPITOLUL II. METODE EXPERIMENTALE	13
II.2. Prepararea soluțiilor de metaboliților purinici	14
II.3. Aparate și materiale	14
II.3.1. Raman Ocean QE Pro portabil	14
II.3.2. Centrifuge 5430 R (Eppendorf)	15
II.3.3. Dynamic light scattering (DLS)	16
II.3.4. Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)	16
CAPITOLUL III. REZULTATE ȘI DISCUȚII	18
III.1. Caracterizarea soluției coloidale de nanoparticule de argint reduse cu hidroxilamină hidrocloridă și citrat de sodiu	18
III.2. Spectrele SERS ale metaboliților purinici	20
III.3. Efectul optimizării suprafeței active de argint asupra spectrului SERS și analiza metaboliților mascați de acidul uric	22
CONCLUZII	45
BIBLIOGRAFIE	46

ABSTRACT

Surface-enhanced Raman spectroscopy is a powerful analytical tool capable of detecting molecules at very low concentrations through signal amplification when analytes are adsorbed onto nanostructured metallic substrates, such as silver colloids. Despite its sensitivity, SERS faces limitations due to the finite availability of active silver surface. In complex biological samples, where numerous molecular species coexist, this constraint leads to competitive adsorption, restricting SERS detection to only a small fraction of biofluid constituents.

This thesis investigates the hypothesis that, under standard conditions, SERS signals from biofluids are predominantly derived from purine metabolites—particularly uric acid—due to their high affinity for silver surfaces. This strong interaction can overshadow other relevant molecular signals. However, by adjusting the concentration of silver nanoparticles in the colloidal solution, it is possible to increase the available surface area, reduce competitive effects, and enhance the diversity of detectable molecules. Such optimization holds promise for improving SERS-based diagnostics.

Silver nanoparticles were synthesized using two methods—hydroxylamine hydrochloride (hya-AgNPs) and citrate reduction (cit-AgNPs)—and characterized via dynamic light scattering (DLS) and nanoparticle tracking analysis (NTA). The resulting hydrodynamic diameters were 62 ± 6 nm for hya-AgNPs and 55 ± 10 nm for cit-AgNPs, with respective particle concentrations of 6×10^{10} and 7×10^{10} NPs/mL.

SERS spectra revealed that uric acid dominates under standard conditions, but increasing the nanoparticle concentration and applying successive centrifugation steps allowed the removal of uric acid from solution, enabling the detection of additional purine metabolites such as hypoxanthine and xanthine. Notably, under optimized conditions—including the use of 18×10^{10} NPs/mL to ensure complete uric acid adsorption—signals corresponding to 2-hydroxyglutaric acid, a clinically relevant oncometabolite, were also observed. This highlights the ability of the method to uncover less dominant but biologically important components.

In conclusion, this work introduces an effective strategy for improving spectral resolution in complex biological mixtures by addressing competitive surface adsorption. The results demonstrate that fine-tuning the concentration of silver nanoparticles can significantly enhance the molecular coverage of SERS analysis, reinforcing its promise as a non-invasive, portable, and sensitive diagnostic tool for biomedical applications.

INTRODUCERE

Spectroscopia Raman amplificată de suprafață (SERS) este o tehnică analitică de înaltă sensibilitate, capabilă să detecteze compuși chimici chiar și în concentrații extrem de mici, oferind informații structurale relevante despre moleculele investigate. Aplicațiile sale în domeniul medical s-au extins semnificativ în ultimele decenii, în special în analiza biofluidelor (urină, salivă, sânge), unde detectarea precoce și non-invazivă a biomarkerilor specifici este esențială pentru îmbunătățirea diagnosticului precoce.

Lucrarea de față are ca scop optimizarea protocolului de analiză SERS aplicat biofluidelor, în vederea îmbunătățirii metodei de detecție a metaboliților purinici (acid uric, hipoxantină, xantină). În mod particular, se urmărește înțelegerea modului în care adsorbția competitivă la suprafața nanoparticulelor de argint influențează semnalul SERS al moleculelor de interes și cum poate fi ajustată suprafața activă pentru a permite detecția simultană a mai multor metaboliți din amestecuri complexe.

Capitolul I oferă o prezentare teoretică a efectului Raman și a principiilor spectroscopiei SERS. Sunt descrise cele două mecanisme fundamentale care stau la baza amplificării semnalului Raman – efectul electromagnetic și cel chimic – precum și aplicabilitatea metodei în domeniul medical, în special pentru analiza biofluidelor și identificarea precoce a markerilor asociați cu diferite boli, precum cancerul.

Capitolul II este dedicat metodelor experimentale. Sunt descrise în detaliu procedurile de sinteză a substratelor de nanoparticule de argint prin reducere cu hidroxilamină hidrocloridă (hya-AgNPs) și citrat (cit-AgNPs), prepararea soluțiilor de metaboliți purinici și instrumentele utilizate pentru caracterizare: spectroscop Raman portabil, DLS și Nanoparticle Tracking Analysis (NTA).

Capitolul III prezintă rezultatele experimentale și analiza acestora. În prima parte sunt caracterizate substraturile SERS utilizate, iar spectrele obținute pentru metaboliții purinici sunt discutate atât în formă individuală, cât și în diverse combinații și concentrații. Pentru a înțelege mai bine comportamentul de adsorbție competitivă, au fost înregistrate serii succesive de spectre SERS ale amestecurilor de metaboliți și nanoparticule, înainte și după etapele de centrifugare. Aceste măsurători au evidențiat posibilitatea separării treptate a metaboliților în funcție de afinitatea lor pentru suprafața metalică. În plus, a fost evaluat efectul concentrației nanoparticulelor de argint asupra eficienței adsorbției și asupra calității semnalului SERS. Rezultatele au condus la definirea unui protocol optimizat care permite detecția selectivă și sensibilă a metaboliților în sisteme biologice complexe.

Concluziile studiului evidențiază faptul că, prin ajustarea concentrației substratului de nanoparticule, se poate controla selectivitatea metaboliților purinici atunci când se achiziționează spectre SERS din matrici biologice complexe, precum biofluidele. Metoda propusă în acest studiu permite identificarea și a compușilor moleculari din amestecurile cu afinitate slabă față de suprafața nanoparticulelor și ale căror semnale SERS sunt de obicei dominate de prezența acidului uric. Rezultatele obținute susțin ideea că metoda poate fi aplicată în contexte medicale reale, deschizând perspective pentru dezvoltarea unor protocoale portabile, rapide și neinvazive pentru caracterizarea biofluidelor și identificarea de potențiali biomarkeri.

CAPITOLUL I. NOȚIUNI TEORETICE

I.1. Spectroscopia Raman

Spectroscopia studiază procesele ce apar la interacțiunea dintre materie și radiația electromagnetică în funcție de energia/lungimea de undă/ frecvența radiației electromagnetice.. Există diferite tipuri de spectroscopii optice definite în funcție de procesul fizic fundamental care apare în urma interacțiunii materiei cu radiația electromagnetică (absorbție, emisie sau împrăștiere de radiație electromagnetică).

În cazul moleculelor, modul de interacțiune cu radiația electromagnetică este în strânsă legătură cu structura lor internă, mai exact cu nivelurile de energie specifice, precum și cu gradele lor de libertate. Aceste grade de libertate sunt asociate fie cu mișcarea electronilor între diferite niveluri electronice de energie, fie cu mișcarea internă a atomilor din moleculă, corespunzătoare nivelurile de energie de vibrație, de rotație sau de translație. [2]

Spectroscopia este o metodă eficientă pentru determinarea cantitativă și calitativă a compoziției chimice a materiei. Fiecare moleculă prezintă un set unic de niveluri vibraționale, rotaționale și electronice. Astfel, analiza tranzițiilor electronice între aceste niveluri, induse de interacțiunea radiației electromagnetice cu materia, oferă informații relevante despre compoziția chimică a probei analizate. [2]

Spectroscopia Raman este cea mai des utilizată metodă dintre toate spectroscopiile, pentru a analiza structura chimică a probei. Efectul Raman a fost observat inițial cu ajutorul unor instrumente optice rudimentare, utilizând radiația electromagnetică solară ca sursă de radiație și filtre colorate. Efectul este observat în urma detecției a unei radiații care are o energie mai mare decât fotonii incidenti (efect care a fost denumit ulterior anti-Stokes). Fenomenul de „conversie ascendentă” Raman este observat în diferite lichide organice care presupune un proces de împrăștierea inelastică a radiației electromagnetice. Ulterior, analiza și interpretarea semnalelor (fotoni) rezultate în urma efectul Raman este denumită spectroscopie Raman. În prezent, spectroscopia Raman este larg utilizată pentru caracterizarea diverselor materiale biologice, oferind informații biochimice și structurale într-un mod rapid, neinvaziv și cu rezoluție spectrală înaltă. [1,3]

Împrăștierea Raman constă, în termeni simpli, în interacțiuni elastice și inelastice între fotonii incidenti și moleculele din probă. În cazul împrăștierii elastice, fotonii împrăștiați au

aceeași energie ($h\nu_1$) ca cei incidenti, iar molecula revine în starea inițială. Acest proces, cunoscut sub denumirea de împrăștiere Rayleigh, este cel mai frecvent, însă nu furnizează informații spectroscopice utile despre structură moleculară. [1]

Informațiile relevante sunt obținute prin împrăștierea inelastică, în care fotonii incidenti transferă o parte din energia lor moleculei sau, dimpotrivă, preiau energie de la aceasta. Dacă energia fotonului împrăștiat este mai mică decât cea a fotonului incident, are loc împrăștierea de tip Stokes; dacă energia este mai mare, vorbim despre împrăștierea anti-Stokes. (**Figura I.1.2**).

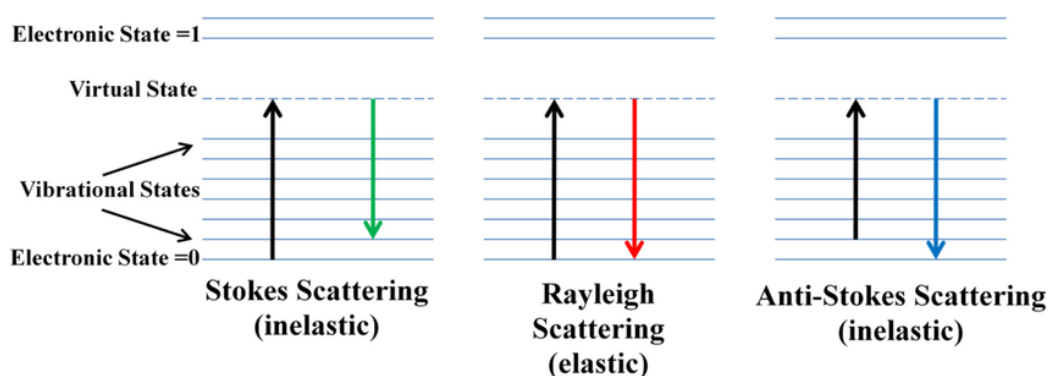


Figura I.1.2. Nivele de energie din spectroscopia Raman [3]

Împrăștierea Raman are loc doar atunci când vibrația unei legături moleculare este însoțită de o variație nenulă a polarizabilității moleculei. Polarizabilitatea reprezintă capacitatea norului electronic de a fi deformat sub influența câmpului electric al radiației incidente și este dependentă de structura moleculară. [4-5]

Efectul Raman, ca proces de împrăștiere inelastică, este slab — doar aproximativ 1 din 10^6 fotoni sunt împrăștiți inelastic de către probă. Din acest motiv, sensibilitatea spectroscopiei Raman este relativ scăzută în absența unor metode de amplificare. Pentru detectarea unor concentrații foarte mici de molecule, se utilizează tehnici avansate de intensificare a semnalului Raman, precum: Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS), Tip-Enhanced Raman Scattering (TERS), Surface Plasmon Polariton-Enhanced Raman Scattering (SPPERS) și Surface-Enhanced Resonance Raman Spectroscopy (SERRS). [4-5]

I.2. Spectroscopia Raman Amplificată de Suprafață (SERS)

Spectroscopia Raman amplificată de suprafață (SERS) este o tehnică Raman care duce la detectarea de semnal Raman mult îmbunătățit de la moleculele active Raman.. Factorul de îmbunătățire poate ajunge până la $10^{10} - 10^{11}$, ceea ce înseamnă că se pot detecta chiar și molecule individuale. Acest efect de amplificare este atribuit unei creșteri a câmpului

electromagnetic local generat de excitația de rezonanță a plasmonilor de suprafață, care are loc atunci când frecvența radiației excitatoare corespunde cu frecvența naturală de oscilație a electronilor de suprafață (rezonanță plasmonică).

Efectul SERS presupune ca molecula să fie adsorbită pe o nanostructură metalică. Cele mai frecvent utilizate nanostructuri care asigură cele mai mari efecte de amplificare a semnalului Raman sunt particulele coloidale de argint sau aur, cu dimensiuni cuprinse între 10 și 100 nm. Alte substraturi eficiente includ electrozi cu suprafețe rugoase din aur sau argint, precum și pelicule insulare obținute prin evaporarea acestor metale. Aceste structuri sunt cunoscute sub denumirea de substraturi SERS. [4-8]

Efectul SERS a fost descoperit pentru prima dată de către Fleischman alături de colaboratorii săi în anul 1974. Aceștia au semnalat amplificarea semnificativă a semnalului Raman pentru compusul chimic C_5H_5N (piridina) care a fost adsorbită pe suprafața metalică a unui electrod tratat electrochimic. Cercetătorii au descoperit că acest fenomen este rezultatul excitării de plasmoni de suprafață, dar și zona de contact sporită a electrozilor ceea ce a admis să se adsoarbă un număr mai mare de particule moleculare din piridină. După trei ani, în anul 1977, cele două grupări de cercetători (Jeanmarie & Van Duyne și Albrecht & Creighton) descoperă cauza pentru care a fost observat această amplificare, mai exact se constată legătura dintre semnalul intens al piridinei adsorbite pe suprafața metalică și eficiența îmbogățită a împrăștierii Raman, denumindu-l astfel efectul SERS. [9]

Spectrele SERS oferă detalii despre configurația moleculară a particulelor moleculare adsorbite pe substratul metalic. Informațiile obținute pot fi observate și în spectroscopia Raman, însă mult mai slab.

Efectul SERS poate fi explicat prin două teorii: teoria chimică și teoria electromagnetică. Teoria chimică presupune interacțiunea directă dintre moleculă și suprafața metalică prin stabilirea unei structuri complexe metal-moleculă. În această teorie se discută despre transferul de sarcină dintre substrat și moleculă, intensificând în mod selectiv anumite moduri de vibrație. Ipoteza este dependentă de compoziția chimică a moleculei și se desfășoară la scale de ordinul a câțiva Angstromi. Teoria electromagnetică explică amplificarea care apare din cauza câmpului intens produs la suprafața nanoparticulelor metalice, în momentul în care radiația electromagnetică realizează o interacțiune cu plasmonii de suprafață. Acest efect este independent de tipul de moleculă și are nevoie doar de apropierea acesteia la nivelul suprafeței metalice(1-10 nm).– **Figura I.2.**

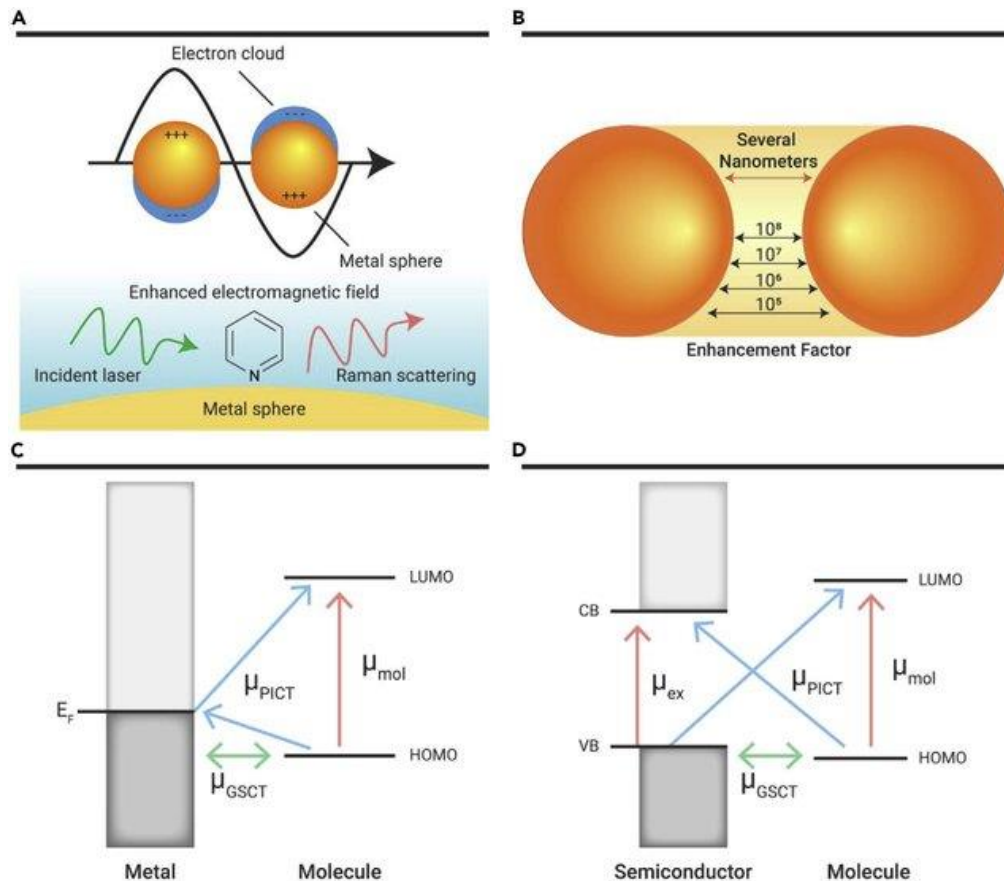


Figura 1.2. Reprezentarea schematică a diferenței dintre efectul electromagnetic (A,C) și efectul chimic (B,D) [10]

Pentru a înțelege mai bine amplificarea electromagnetică, Kerker cu ajutorul colaboratorilor săi au sugerat un model în care molecula adsorbită pe suprafața unei structuri sferice să fie considerată ca un dipol electric clasic. Molecula este stimulată de către un câmp format din interacțiunea câmpului incident și celui împrăștiat în regim de proximitate, emisia fiind reprezentată de câmpul dipolar și cel împrăștiat. [11]

Împrăștierea Raman detectată în acest protocol are două componente:

- un dipol oscilant indus p_1 , corespunzător frecvenței Raman ω
- un dipol oscilant indus p_2 , sub aceeași frecvență Raman ω

În regiunea de propagare a radiației, câmpul Raman înregistrat are contribuție de la câmpul creat de p_1 , adăugat în concordanță cu cel produs de p_2 . Pătratul sumei dintre cele două câmpuri este direct proporțional cu puterea totală, iar pentru a analiza factorul de amplificare, se raportează la puterea unei molecule p_M în lipsa sferei metalice. [12]

$$EF = \frac{|p_1 + p_2|^2}{|p_M|^2}$$

Factorul de amplificare exclude componenta de amplificare chimică înregistrată în proximitatea moleculă – metal, însă contribuția determinată are o valoare redusă în raport cu amplificarea cumulativă.

Efectul are nevoie ca molecula să fie adsorbită chimic pe suprafața metalică și să formeze un ansamblu care modifică tensorul ce descrie polarizabilitatea Raman al adsorbantului prin metoda de transfer de sarcină electrică. Există trei metode de transfer de sarcină: [13]

- Dacă absorbantul nu este legat covalent între atomii metalici, acționează sub forma unei perturbări asupra structurii electronice a probei analizate și determină o modificare la nivelul distribuției electronice și polarizabilității.
- Dacă molecula formează alături de metal un complex de suprafață care aparține unui ion electrolitic sau prin legarea covalentă, se provoacă modificarea semnificativă a polarizabilității moleculei.
- Transferul fotoindus de sarcină poate să aibă loc dacă discrepanța energetică între nivelul Fermi al metalului și HOMO/LUMO este egală cu energia laserului.

Ambele teorii – atât cea electromagnetică, cât și cea chimică – au fost confirmate experimental, însă sunt dificil de diferențiat în practică. Mecanismul chimic se limitează la acoperirea primului strat molecular, iar cel electromagnetic scade în intensitate proporțional cu $1/r^3$, pe măsură ce distanța față de suprafața substratului crește. Prin urmare, indiferent de teorie, cele mai semnificative amplificări ale semnalului Raman apar în zona imediat adiacentă suprafeței metalice, implicând în principal moleculele din primul strat.

I.3 Tehnica SERS în medicină

Tehnica SERS a fost introdusă în ultimele decenii în diferite aplicații biomedicale, predominant în detectarea biomarkerilor canceroși regăsiți în fluide biologice. Metoda a fost implementată în ramura biomedicinii începând cu anii 1980-1990 în același timp cu detecția de acizi nucleici [14] și moleculei de hemoglobină [15]. Având în vedere limita scăzută de detecție, viteză de aplicare, Capacitatea tehnicii de a analiza simultan multiple ținte și sensibilitate ridicată a tehnicii, s-a înregistrat o creștere rapidă a volumului de aplicații spectroscopice SERS în cercetare biomedicală, cu precăderea în diagnosticul medical.

Biopsia lichidă SERS s-a dovedit folositoare în diagnosticarea numeroaselor boli, prin detectarea a trei categorii principale de molecule : metaboliți purinici, proteine și caratenoide care oferă informații importante referitoare la inflamații, viteza de regenerare celulară și activitatea antioxidantă, procese afectate în majoritatea bolilor.

Pentru detectarea cancerului prin tehnica SERS este evidențiată o acuratețe peste 85% a depistării cancerului din fluide biologice. Detecția de anomalii maligne obținută prin analiza de ARN sau ADN al celulei sau prin monitorizarea modificărilor de concentrație a metaboliților purinici (acid uric, xantină și hipoxantină) care se secretă în cantitate mare în cadrul proceselor maligne. Sunt studii în care diferențierea s-a efectuat pe baza modificării concentrațiilor și a semnalului SERS achiziționat pentru metaboliții purinici din urină între pacienții diagnosticați cu cancer mamar și pacienți control cu o rată de succes de 88%. [16]

Pentru a obține un semnal SERS optim este foarte importantă selecția substratelor sau nanoparticulelor metalice. Detecția moleculelor biologice se poate realiza prin utilizarea unor substraturi metalice funcționalizate care leagă specific molecula țintă sau prin adsorbția moleculelor pe suprafața metalică. Nanoparticulele metalice cel mai frecvent utilizate în majoritatea aplicațiilor biomedicale ale efectului SERS sunt nanoparticulele de argint (AgNPs).

De asemenea, un aspect esențial evidențiat în studiile recente este adsorbția selectivă moleculelor pe suprafața nanoparticulelor de argint în optimizarea semnalului SERS. În mod particular, acidul uric domină spectrul SERS al biofluidelor datorită afinității sale ridicate pentru suprafața metalică. În situația în care suprafața activă a nanoparticulelor este limitată, are loc o competiție între diferitele molecule din biofluid pentru adsorbție, ceea ce face ca acidul uric să se fixeze preferențial determinând estomparea semnalelor provenite de la alte molecule cu relevanță diagnostică. Pentru a depăși această limitare, strategia propusă în acest studiu implică creșterea concentrației de nanoparticule de argint, asigurând astfel adsorbția completă a acidului uric și permitând analiza ulterioară a moleculelor neadsorbite care rămân libere în soluție. Această metodă contribuie la îmbogățirea informației spectrale, sporind relevanța și acuratețea analizei SERS în aplicabilitatea sa medicală.

CAPITOLUL II. METODE EXPERIMENTALE

II.1. Sinteza substratelor metalice SERS

Pentru a sintetiza nanoparticulele de argint s-a aplicat metoda Leopold-Lendl. Această metodă prezintă avantajul unei sinteze rapide, la temperatura camerei, cu posibilitate de utilizare imediată. [17] Metoda presupune utilizarea a 0,0170 g de AgNO_3 dizolvat în 90 mL de apă ultrapură și 0,0170 g de hidroxilamină hidrocloridă dizolvată în 8,8 mL de apă ultrapură. Soluția a fost completată cu 1800 μL de NaOH 1%. Pentru a asigura o corectitudine riguroasă, soluția de NaOH 1% a fost preparată din nou, prin dizolvarea a 0,1 g NaOH în 10 mL de apă ultrapură. După două zile de la sinteză pH-ul soluție s-a stabilizat la pH 7. [17]

De asemenea, pentru a obține sinteza nanoparticulelor de argint s-a utilizat metoda Lee-Meisel de reducere chimică a argintului folosind citratul (cit-AgNPs) ca agent de reducere și stabilizare. S-a ales această sinteză pentru a analiza molecule negative prezente în biofluide, pentru care surfactantul hya-AgNPs, respectiv Cl-, ar fi blocat adsorbția. În acest caz sinteza a fost realizată după cum urmează: 0,0170 mg AgNO_3 dizolvați în 98 mL apă. ultrapură sub agitare continuă și a fost încălzită la 100 °C. În soluția finală realizată după fierbere s-a adăugat 2 mL citrat de sodiu 1 %, sinteza a fost continua timp de 15 minute. Figura II.1 [18]

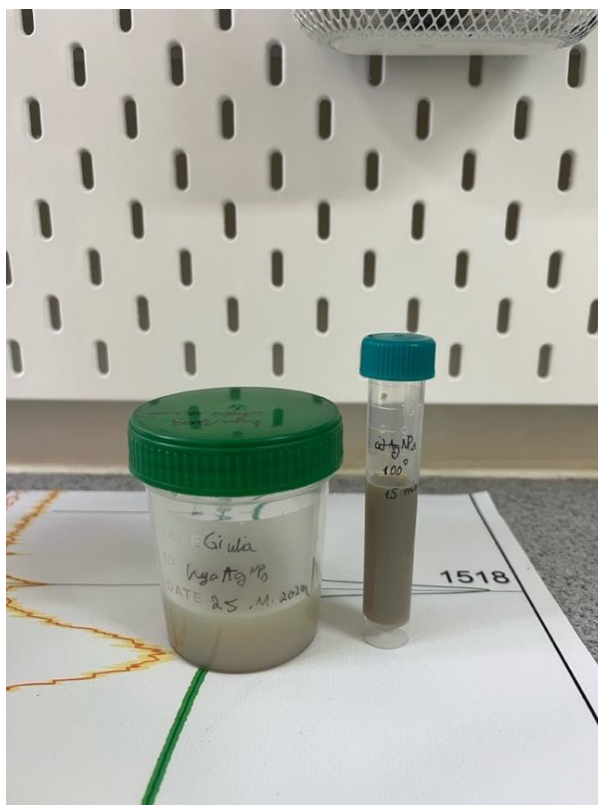


Figura II.1. Nanoparticule de argint coloidal (hya-AgNPs) observate în partea stângă în imagine și nanoparticule de argint acoperite cu citrat (cit-AgNPs) observate în partea dreaptă în imagine.

II.2. Prepararea soluțiilor de metaboliților purinici

Pentru a analiza soluții cât mai apropiate de biofluide, am investigat coccntrațiile metaboliților purinici din ser și urină. În ceea ce privește serul uman filtrat și deproteinizat, valorile lor fiziologice obișnuite sunt următoarele:

- Acidul uric se regăsește, în general, în concentrații cuprinse între 150 și 400 $\mu\text{mol/L}$ la adulții sănătoși, cu variații influențate de sex, dietă și starea metabolică. Nivelurile crescute pot semnaliza afecțiuni precum hiperuricemia, guta sau anumite sindroame metabolice. [19-20]
- Xantina este prezentă în concentrații mult mai scăzute, de aproximativ $3 \pm 1,4 \mu\text{mol/L}$ în ser, dar aceste valori pot crește în cazul unor disfuncții enzimaticе, cum ar fi deficitul de xantin oxidază. [21-22]
- Hipoxantina se regăsește în ser în intervalul mediu $12,7 \pm 6,6 \mu\text{mol/L}$, cu posibilitatea creșterii concentrației în condiții patologice, cum ar fi hipoxia sau stresul oxidativ. [21-22]

Astfel, pentru amestecurile analizate în acest studiu, am utilizat concentrații similare cu cele din biofluide. Amestecul de metaboliți purinici a fost preparat din 900 μL acid uric (10^{-5} M), 100 μL xantină (10^{-4} M) și 100 μL hipoxantină (10^{-4} M), rezultând un amestec cu concentrații egale de 10^{-5} M format din acid uric, hipoxantină și xantină .

Ulterior, a fost testată influența suprafeței de argint în detecția SERS a oncometabolitului D-2HGA. În acest sens, au fost preparate două soluții. Prima soluție a conținut 900 μL acid uric (10^{-5} M), 100 μL hipoxantină (10^{-4} M), și 100 μL D-2HGA (concentrația finală de $5 \times 10^{-5} \text{ M}$) . A doua soluție a fost preparată în condiții identice, singura diferență constând în creșterea concentrației de D-2HGA la $5 \times 10^{-4} \text{ M}$ concentrație finală.

II.3. Aparatе și materiale

II.3.1. Raman Ocean QE Pro portabil

Pentru achiziționarea spectrelor SERS s-a utilizat spectrometrul Raman Ocean QE Pro portabil cu o linie laser 638 nm. Spectrele SERS au fost achiziționate pe un domeniu de 100-3800 cm^{-1} cu o rezoluție spectrală de 12 cm^{-1} . S-a utilizat un cap de probă Raman cu focalizare fixă la o distanță de 8 mm – Figura. II.3.1.

Protocolul experimental a presupus utilizarea unui amestec standardizat pentru fiecare probă analizată, compus din 850 μL soluție de nanoparticule de argint stabilizate cu hidroxilamină (hyaAgNPs), 100 μL soluție de metabolit (fie individual, fie amestec), și 50 μL soluție de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$. Prezența ionilor de calciu a fost introdusă în scopul favorizării agregării nanoparticulelor și, implicit, al creșterii eficienței efectului de amplificare SERS.

Pentru fiecare probă, spectrele SERS au fost achiziționate în trei repetări succesive, cu un timp de integrare de 5 secunde per achiziție, utilizând o sursă laser cu lungimea de undă de 638 nm. Spectrul final aferent fiecărei probe a fost reprezentat de media celor trei achiziții.



Figura II.3.1. Spectrometru QE Pro cu laser la 638 nm

II.3.2. Centrifuge 5430 R (Eppendorf)

Pentru obținerea unor soluții cât mai clare și omogene, adecvate analizei spectroscopice, a fost necesară centrifugarea substratelor. Acest pas a avut ca scop separarea particulelor solide în exces de nanoparticulele dispersate, prevenind interferențele optice în timpul achiziției spectrelor. Substratele au fost centrifugate cu ajutorul Centrifuge 5430 R (Eppendorf), timp de 15 minute la 7300 xg , la o temperatură controlată de 25 $^{\circ}\text{C}$. În unele cazuri, a fost aplicată o

centrifugare suplimentară de 5 minute la 3100 xg, la aceeași temperatură, pentru a asigura o claritate optimă a probei înainte de măsurători.

II.3.3. Dynamic light scattering (DLS)

Răspândirea dinamică a radiației electromagnetice (DLS) reprezintă o metodă spectroscopică utilizată pentru a determina dimensiunea particulelor. O rază de radiație electromagnetică monocromatică (laser) este aplicată în soluția cu particule care se află în mișcare browniană.

Deci, pentru caracterizarea dimensiunii diferitelor particule precum proteine, miceli, polimeri și nanoparticule se utilizează DLS (**Figura II.3.2.**). Lungimea de undă a laserului este modificată și, prin urmare, provoacă o deplasare Doppler. Dimensiunea particulei este determinată de această schimbare.



Figura II.3.2. Împrăștierea dinamică a radiației electromagnetice (DLS) a fost utilizată pentru a obține date suplimentare.

II.3.4. Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)

Analiza prin urmărirea nanoparticulelor (Nanoparticle Tracking Analysis – NTA) este o tehnică optică utilizată pentru caracterizarea suspensiilor coloidale de nanoparticule, oferind informații despre distribuția dimensională și concentrația numerică a particulelor individuale

aflate în suspensie. Principiul de funcționare al acestei metode se bazează pe înregistrarea și analiza mișcării browniene a particulelor, care este dependentă de dimensiunea lor hidrodinamică.

În cadrul experimentului, s-a utilizat un sistem NanoSight NS400 (Malvern Instruments), echipat cu o sursă laser cu emisia la 440 nm și o cameră video cu sensibilitate ridicată, care captează mișcarea particulelor aflate în suspensie. Proba de nanoparticule de argint a fost diluată de 1000 de ori pentru a se încadra în intervalul optim de concentrație recomandat de producător (10^7 – 10^9 particule/mL), evitând astfel suprapunerea traiectoriilor și obținând o statistică relevantă.

Nanoparticulele suspendate sunt iluminate cu un fascicul laser, iar radiația electromagnetică împrăștiată este captată la un unghi de 90° , permițând observarea traiectoriilor individuale ale fiecărei particule. Software-ul asociat identifică și urmărește fiecare particulă în timp, calculând coeficientul de difuzie translational. Pe baza acestuia și a ecuației Stokes-Einstein, se determină dimensiunea hidrodinamică a fiecărei particule. În paralel, numărul de particule detectate într-un volum cunoscut de suspensie permite estimarea concentrației numerice absolute a nanoparticulelor.

Această metodă este deosebit de utilă pentru caracterizarea coloidului de argint, oferind o imagine detaliată asupra stabilității coloidale, a gradului de agregare și a eficienței procesului de sinteză.

CAPITOLUL III. REZULTATE ȘI DISCUȚII

Scopul principal al acestui studiu este evidențierea rolului esențial al adsorbției moleculelor pe suprafața nanoparticulelor de argint pentru obținerea unui semnal SERS optim. În analiza SERS a biofluidelor, semnalul predominant este atribuit acidului uric, datorită afinității ridicate a acestuia pentru suprafața de argint. În condițiile în care suprafața activă a nanoparticulelor este limitată, are loc un proces de adsorbție competitivă între diferitele componente ale biofluidului. Astfel, moleculele cu cea mai mare afinitate — în special acidul uric — se fixează preferențial pe suprafața de argint, ceea ce conduce la un spectru SERS dominat de benzile caracteristice acestuia și la mascarea altor semnale de interes diagnostic.

Pentru a depăși această limitare, studiul de față propune o strategie bazată pe ajustarea suprafeței active a nanoparticulelor de argint. Prin creșterea concentrației de nanoparticule, se asigură adsorbția completă a acidului uric într-o primă etapă, permițând ulterior analiza SERS a moleculelor neadsorbite, rămase libere în soluție pentru obținerea semnalelor SERS și ale altor molecule prezente în biofluide. Această abordare permite îmbogățirea informației spectrale relevante în contextul aplicațiilor de diagnostic medical.

III.1. Caracterizarea soluției coloidale de nanoparticule de argint reduse cu hidroxilamină hidrocloridă și citrat de sodiu.

Pentru a construi o metodologie solidă de identificare și diferențiere a metaboliților din biofluide prin spectroscopie Raman amplificată de suprafață (SERS), am dorit să utilizăm un substrat reproductibil și stabil în timp. Astfel, am utilizat nanoparticule de argint stabilizate cu hidroxilamină hidrocloridă (hya-AgNPs), acestea reprezentând unele dintre cele mai utilizate substraturi de amplificare SERS pentru aplicații medicale. Totodată, am utilizat și nanoparticule de argint stabilizate cu citrat de sodiu, iar întelezele soluțiilor coloidale sunt descrie în capitolul II.

Având în vedere că studiul urmărește determinarea suprafeței de argint necesare pentru a adsorbi tot acidul uric pe suprafața de argint, a fost necesară determinarea diametrului nanoparticulelor de argint și concentrația acestora. Am determinat concentrația de nanoparticule hya-AgNps și cit-AgNPs folosind Nanotracking analysis ca fiind 6×10^{10} NPs/ml pentru hya-AgNPs, iar pentru cit-AgNPs ca fiind 7×10^{10} NPs/ml.

Diametrul nanoparticulelor a fost analizat folosind DLS (dynamic light scattering).

Pentru a obține o valoare precisă a diametrului hidrodinamic pentru cit-AgNPs și hya-AgNPs, a fost pregătită o diluție de 1:100 în apă ultrapură filtrată cu un filtru de 20 nm. Indicele de refracție utilizat (0,14) al materialului și indicele de absorbție (3,99) au fost valori din literatura de specialitate pentru nanoparticulele de argint. Măsurătorile au fost repetate de trei ori, iar rezultatele sunt prezentate în **Figura III.1.1.** și **Figura III.1.2.**

Rezultatele distribuției diametrului hidrodinamic al hya-AgNPs sunt prezentate în **Figura III.1.1.** respectiv **III.1.2.** Diametrul hidrodinamic mediu atinge o valoare de 62 ± 6 nm pentru hya-AgNPs și de 55 ± 10 nm pentru cit-AgNPs. Indicele de polidispersie este suficient de scăzut ($< 0,5$) pentru a spune că există o distribuție mai îngustă a diametrelor pentru hya-AgNPs. și cit-AgNPs. Un singur peak este observat la 110,7 nm în toate cele trei măsurători.

	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 102.7	Peak 1: 62.72	100.0	6.527
PdI: 0.137	Peak 2: 0.000	0.0	0.000
Intercept: 0.880	Peak 3: 0.000	0.0	0.000
Result quality : Refer to quality report			

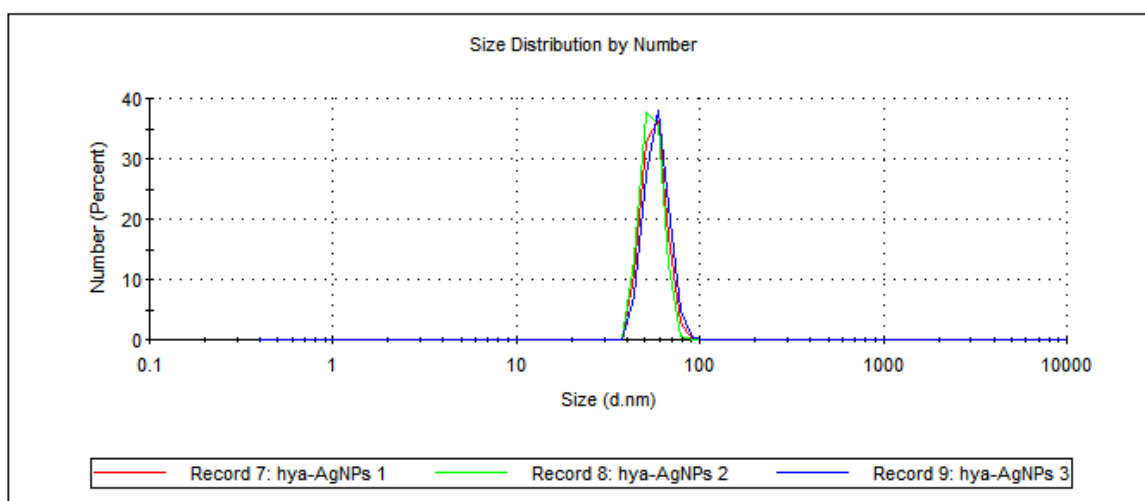


Figura III.1.1. Diametrul hidrodinamic nanoparticulelor de argint stabilizate cu hidroxilamină hidrocloridă (hya-AgNPs), obținută prin DLS. Majoritatea nanoparticulelor au diametrul în jur de $\sim 62,7$ nm și un indice de polidispersie scăzut ($PdI = 0,137$), indicând o distribuție uniformă a dimensiunilor.

		Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 40.55	Peak 1:	55.62	85.5	10.38
Pdl: 0.400	Peak 2:	7.693	14.5	0.7521
Intercept: 0.876	Peak 3:	0.000	0.0	0.000
Result quality : Refer to quality report				

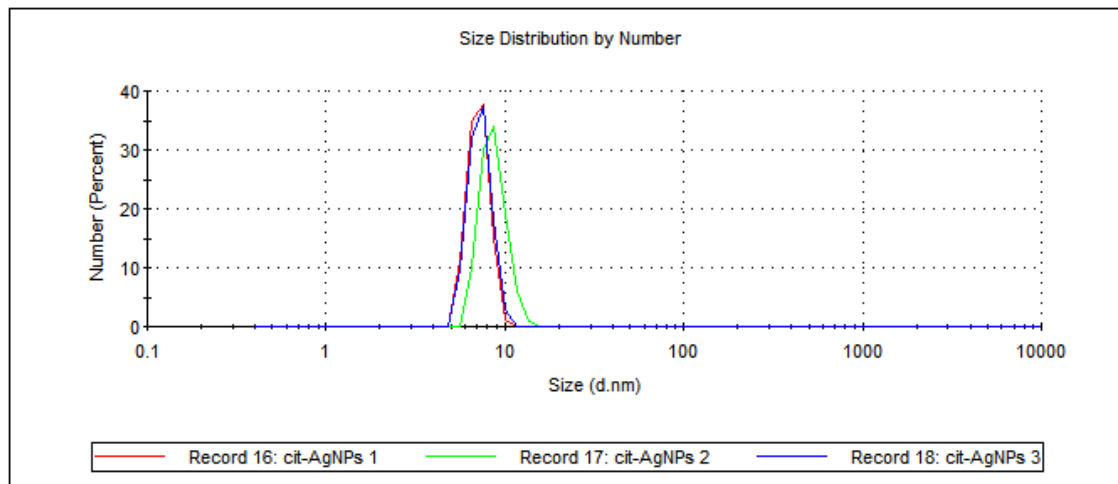


Figura III.1.2. Diametrul hidrodinamic al nanoparticulelor de argint stabilizate cu citrat de sodiu (cit-AgNPs), obținută prin DLS. Majoritatea nanoparticulelor au diametrul în jur de $\sim 55,6$ nm și un indice de polidispersie scăzut ($PdI = 0,400$), indicând o distribuție uniformă a dimensiunilor.

III.2. Spectrele SERS ale metaboliților purinici

Am achiziționat spectrele SERS ale metaboliților purinici regăsiți în majoritatea biofluidelor din corp: acid uric 10^{-5} M, hipoxantină 10^{-5} M, xantină 10^{-5} M, concentrațiile alese pentru aceste soluții au fost stabilite astfel încât să se încadreze în domeniul de concentrații regăsit în serul uman.

Pentru a obține semnalul SERS al acestor analiți am utilizat ca substrat de amplificare nanoparticulele de argint reduse cu hidroxilamină hidrocloridă (hya-AgNPs). Pentru a facilita adsorbția metaboliților purinici pe suprafața nanoparticulelor de argint am folosit Ca^{2+} , adăugat sub formă de $Ca(NO_3)_2$, în concentrație finală de 5×10^{-3} M.

În **Figura III.2.1.** sunt prezentate spectrele SERS obținute pentru trei metaboliți purinici – acid uric, xantină și hipoxantină – precum și pentru un amestec al acestora, în prezența nanoparticulelor de argint reduse cu hidroxilamină hidrocloridă (hya-AgNPs) și 5×10^{-4} M $Ca(NO_3)_2$. Această etapă a permis observarea modului în care hya-AgNPs interacționează cu fiecare metabolit în parte, oferind informații preliminare asupra potențialelor efecte de suprapunere a semnalului în amestec.

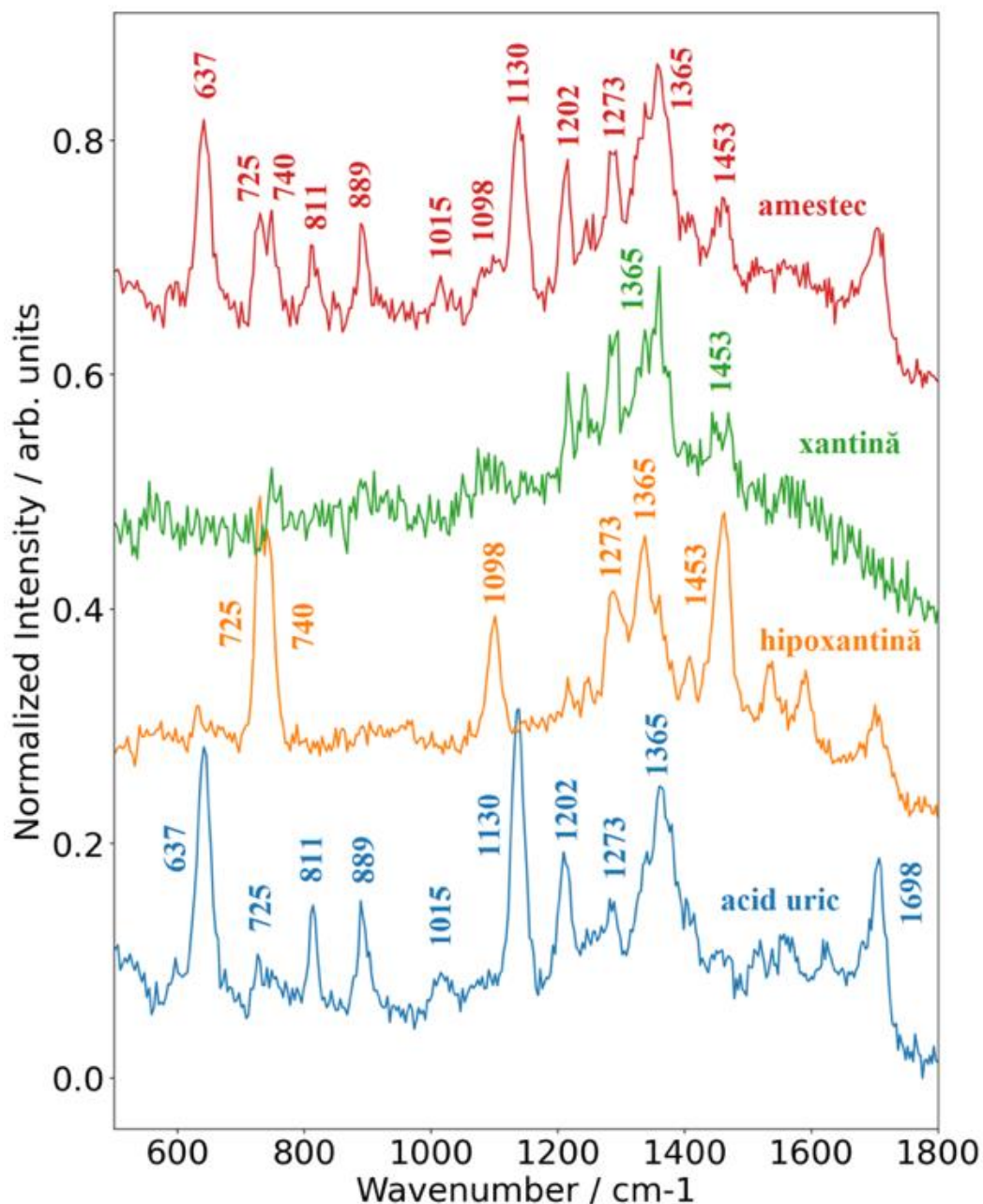


Figura III.2.1. Spectrele SERS ale metabolitilor individuali: acid uric (10^{-5} M), hipoxantină (10^{-5} M), xantină (10^{-5} M) și al amestecului acestora (concentrația fiecărui metabolit în amestec este 10^{-5} M) folosind ca substrat de amplificare nanoparticule de argint reduse cu hidroxilamină hidrocloridă și $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (5×10^{-4} M).

Spectrele SERS conțin benzi caracteristice în intervalul $500\text{--}1800\text{ cm}^{-1}$, corespunzătoare vibrațiilor moleculare specifice fiecărui compus. Spectrul acidului uric prezintă o serie de benzi intense, printre care se remarcă cele situate la 637, 725, 811, 889, 1015, 1130, 1202, 1273, 1365

și 1698 cm^{-1} . În cazul hipoxantinei și al xantinei, spectrele evidențiază similarități semnificative, în acord cu apropierea structurală dintre cele două molecule, fiind observate benzi localizate în jurul valorilor de 725 , 740 , 1098 , 1273 , 1365 și 1453 cm^{-1} . Spectrul amestecului conține toate benzile caracteristice acidului uric și hipoxantinei. Deși concentrația moleculelor este egală, se observă că intensitatea benzilor acidului uric este mai crescută decât cea caracteristică hipoxantinei pentru benzile 637 , 811 , 889 , 1015 , 1130 , 1202 și 1698 cm^{-1} . De asemenea, semnalul xantinei este greu de determinat, chiar dacă structura moleculară a xantinei este similară cu cea a hipoxantinei și acidului uric.

Rezultatele indică faptul că acidul uric are cea mai mare afinitate pentru suprafața AgNPs, generând semnale intense, ceea ce poate influența semnificativ detecția simultană a altor metaboliți în amestec. Prezența xantinei și hipoxantinei este dificil de evidențiat în amestec, ceea ce sugerează fie o competiție redusă pentru adsorbție, fie o afinitate mai slabă față de suprafața nanoparticulelor a acestor molecule. Această observație este importantă în contextul detectării analiților într-un mediu complex, unde interferențele structurale pot afecta semnificativ rezultatele SERS.

III.3. Efectul optimizării suprafeței active de argint asupra spectrului SERS și analiza metaboliților mascați de acidul uric

În spectrul SERS caracteristic amestecului celor trei metaboliți purinici – acid uric, xantină și hipoxantină – s-a observat, conform rezultatelor prezentate anterior, că acidul uric prezintă o afinitate mai mare față de suprafața nanoparticulelor de argint, fiind astfel predominant în spectrul SERS. Pentru a determina dacă absența semnalului SERS al celorlalți doi metaboliți se datorează suprapunerii cu semnalul acidului uric sau blocării adsorbției lor din cauza competiției la suprafața nanoparticulelor de argint, am modificat suprafața activă de argint. Scopul a fost observarea eventualelor modificări ale semnalului SERS în urma acestei ajustări. Rezultatele corespunzătoare acestor experimente sunt prezentate în **Figura III.2.2.** și vor fi analizate și discutate în detaliu în secțiunea următoare, sub denumirile de **proba 2A**, **proba 2B**, **proba 2C** și **proba 2D**.

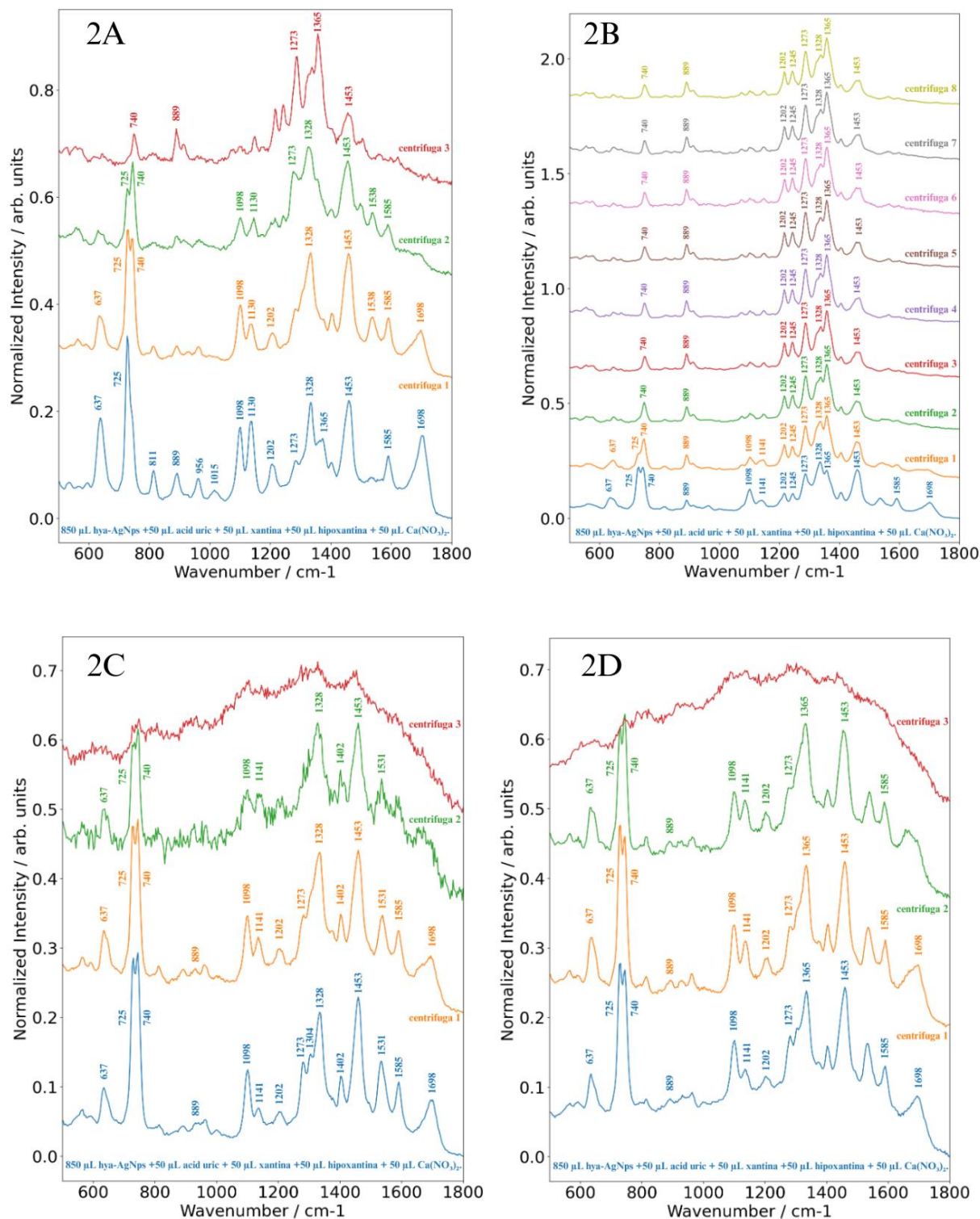


Figura III.2.2. (2A) Spectrele SERS ale unui amestec de acid uric (5×10^{-6} M), hipoxantină (5×10^{-6} M), xantină (5×10^{-6} M) achiziționat folosind hya-AgNPs ca substrat de amplificare și Ca^{2+} (5×10^{-4} M) pentru a ajuta la adsorbția moleculelor pe suprafața nanoparticulelor (spectrul albastru). Soluția a fost centrifugată, iar supernatantul reprezentând moleculele libere neadsorbite a fost din nou analizat SERS (spectrul portocaliu). Procedul a fost repetat până la disparițiile semnalului SERS prin centrifugări multiple. Subfigurile 2B, 2C, 2D reprezintă repetiții ale procedurii pe probe identice.

Astfel, pentru **proba 2A (Figura III.2.2)**, am adăugat succesiv 50 μL de acid uric (concentrație finală 5×10^{-6} M), hipoxantină (concentrație finală 10^{-5} M), xantină (concentrație finală 10^{-5} M) și ioni Ca^{2+} (5×10^{-4} M) într-o soluție de 850 μL de hya-AgNPs. Spectrul SERS obținut pentru prim amestec (spectrul albastru, **Figura III.2.2. proba 2A**) este dominat de benzile caracteristice acidului uric: 636, 811, 889, 1015, 1202, 1273 și 1698 cm^{-1} . Ulterior, soluția a fost centrifugată timp de 15 minute, la 25 $^{\circ}\text{C}$ și 7200 xg, pentru a separa supernatantul, care conține moleculele neadsorbite.

Supernatantul rezultat a fost reamestecat cu o soluție de hya-AgNPs și ioni Ca^{2+} . Apariția semnalului SERS (spectrul portocaliu, **Figura III.2.2. proba 2A**) indică faptul că, în etapa inițială, nu toate moleculele au fost adsorbite pe suprafața de argint. Compararea acestui spectru cu cel inițial relevă faptul că semnalul acidului uric este încă prezent (benzile la 636, 811, 889, 1130, 1202 și 1698 cm^{-1}), confirmând că o parte din acidul uric a rămas liber în soluție după prima interacțiune. Totuși, intensitatea redusă a acestor benzi semnalează o concentrație mai mică de acid uric adsorbit în această etapă, față de amestecul inițial.

În plus, spectrul supernatantului este dominat de benzi SERS specifice hipoxantinei (725, 740, 1098, 1365, 1453, 1538, 1585 cm^{-1}), sugerând că, odată cu scăderea concentrației de acid uric rămas liber în soluție după primul pas, ceilalți metaboliți au reușit să adsoarbă la suprafața nanoparticulelor. Aceste observații confirmă că acidul uric, prin concentrația ridicată și afinitatea mare față de suprafața de argint, poate împiedica adsorbția altor molecule, care rămân libere în soluție.

Pentru a verifica dacă mai există molecule neadsorbite după a doua etapă, soluția a fost din nou centrifugată, iar supernatantul rezultat a fost amestecat cu hya-AgNPs și Ca^{2+} . Spectrul SERS obținut (spectrul verde, **Figura III.2.2. proba 2A**) a arătat o diminuare semnificativă a benzilor caracteristice acidului uric, ceea ce indică faptul că majoritatea moleculelor acestuia au fost adsorbite în primele două etape. În acest stadiu, spectrul este dominat de benzi SERS caracteristice hipoxantinei (725, 740, 1098, 1273, 1365, 1453, 1538, 1585 cm^{-1}).

Procedura a fost repetată încă o dată, iar spectrul obținut (spectrul roșu, **Figura III.2.2 proba 2A**) a evidențiat o scădere suplimentară a intensității benzilor hipoxantinei, fiind prezente doar 740, 1273, 1365 și 1453 cm^{-1} , împreună cu o singură bandă caracteristică acidului uric la 889 cm^{-1} . Aceste rezultate sugerează că acidul uric a fost adsorbit aproape complet, permițând astfel adsorbția hipoxantinei la suprafața nanoparticulelor. Mai mult, scăderea intensității semnalului SERS a hipoxantinei în acest pas indică faptul că în pasul doi și trei aproape majoritatea moleculelor de hipoxantină au fost deja adsorbite.

Pentru a evalua reproductibilitatea procesului de adsorbție competitivă, procedura descrisă mai sus a fost repetată de trei ori folosind aceleași concentrații, rezultatele fiind prezentate în **Figura III.2.2. proba 2B, 2C și 2D**. Se observă variații în numărul de centrifugări necesare pentru a îndepărta complet moleculele din soluție. În cazul prezentat în **Figura III.2.2 proba 2A**, sunt necesare trei centrifugări, însă semnalul nu este complet eliminat. În **Figura III.2.2 proba 2B**, sunt necesare opt centrifugări, dar și în acest caz semnalul persistă. În schimb, pentru cazurile ilustrate în **Figura III.2.2 proba 2C și 2D**, două centrifugări sunt suficiente pentru ca în a treia să nu mai fie detectabil niciun semnal SERS, indicând o adsorbție completă a metaboliților.

În continuarea experimentului ilustrat în **Figura III.2.2. proba 2B**, a fost reluat protocolul de adsorbție competitivă a celor trei metaboliți purinici – acid uric (5×10^{-6} M), hipoxantină (5×10^{-6} M), și xantină (5×10^{-6} M), – pe suprafața nanoparticulelor de argint stabilizate cu hidroxilamina hidrocloridă (hya-AgNPs), în prezența ionilor de calciu (Ca^{2+}) la concentrația de 5×10^{-4} M, cu scopul de a evalua reproductibilitatea fenomenului observat anterior. Astfel, proba a fost preparată prin adăugarea succesivă a celor trei metaboliți în soluția de nanoparticule, urmată de introducerea Ca^{2+} , pentru a facilita adsorbția la suprafață. Spectrul SERS colectat după prima interacțiune (spectrul albastru, **Figura III.2.2 proba 2B**) a fost dominat de benzile caracteristice acidului uric (637, 725, 889, 1202, 1273, 1365, și 1698 cm^{-1}), confirmând o afinitate mai mare a acestuia pentru suprafața de argint în comparație cu ceilalți metaboliți.

După o primă centrifugare, supernatantul – care conține moleculele neadsorbite – a fost amestecat cu hya-AgNPs și Ca^{2+} . Spectrul SERS rezultat (portocaliu, **Figura III.2.2 proba 2B**) a indicat o diminuare a intensității benzilor acidului uric, dar și apariția benzilor caracteristice hipoxantinei (725, 740, 1098, 1365, 1453, 1538 și 1585 cm^{-1}), ceea ce sugerează că, pe măsură ce acidul uric este treptat îndepărtat prin adsorbție, ceilalți metaboliți au acces la suprafața activă a nanoparticulelor.

Procedura a fost repetată pentru a doua oară, printr-o nouă centrifugare a soluției și adăugarea nanoparticulelor de argint cu Ca^{2+} , spectrul obținut fiind redat cu verde în **Figura III.2.2 proba 2B**. În acest caz, intensitatea benzilor SERS caracteristice acidului uric a scăzut semnificativ, indicând faptul că majoritatea moleculelor de acid uric fuseseră deja adsorbite în etapele anterioare. În schimb, spectrul verde (**Figura III.2.2 proba 2B**) este dominat de semnalele asociate hipoxantinei ($740, 1202, 1273, 1365, 1453 \text{ cm}^{-1}$), evidențiind o adsorbție sporită a acesteia în absența competiției din partea acidului uric.

Aceste rezultate confirmă că acidul uric, prin afinitatea puternică față de suprafața de argint, limitează accesul celorlalți metaboliți la suprafața activă. Pe măsură ce moleculele de acid uric sunt progresiv îndepărtate prin adsorbție și separare, ceilalți compuși pot adera la suprafața nanoparticulelor, devenind astfel detectabili prin spectroscopie SERS. Se remarcă persistența benzilor la 889 cm^{-1} și 1202 cm^{-1} , caracteristice acidului uric. Această observație sugerează că, deși o mare parte a acidului uric a fost deja adsorbit în etapele anterioare, totuși au rămas și molecule neadsorbite, detectate ulterior.

Procesul a fost repetat succesiv, prin centrifugări și reamestecări, pentru un total de 8 cicluri, observându-se o diminuare treptată a benzilor acidului uric și o creștere relativă a intensității benzilor hipoxantinei și xantinei. Chiar și după cele 8 centrifugări, spectrul rezultat încă prezintă unele benzi de acid uric, ceea ce indică o adsorbție incompletă, dar progresivă, care favorizează în etapele accesul altor metaboliți la suprafața activă.

Această observație susține ideea unui proces de adsorbție competitivă dependent de concentrație și de afinitatea individuală a fiecărei molecule față de nanoparticulele de argint. Totodată, se evidențiază faptul că, în anumite cazuri, sunt necesare un număr mai mare de cicluri de centrifugare pentru a permite eliberarea completă a suprafeței de acid uric și, implicit, pentru a facilita detecția altor compuși prin SERS.

Astfel, în continuare am preparat o soluție de $850\text{ }\mu\text{L}$ hya-AgNPs în care am adăugat, pe rând, cei 3 metaboliți: în ordinea acid uric ($5 \times 10^{-6}\text{ M}$), hipoxantină ($5 \times 10^{-6}\text{ M}$) și xantină ($5 \times 10^{-6}\text{ M}$) și ioni Ca^{2+} ($5 \times 10^{-4}\text{ M}$). În cadrul experimentului corespunzător **Figurii III.2.2. proba 2C**, s-a urmat același protocol. Spectrul SERS obținut pentru acest amestec inițial (spectrul albastru, **Figura III.2.2 proba 2C**) este dominat, similar cazurilor anterioare, de benzile caracteristice acidului uric ($637, 889, 1202, 1273$ și 1698 cm^{-1}), confirmând din nou afinitatea ridicată a acestuia față de suprafața de argint. În continuarea experimentului, s-a urmat același protocol descris anterior, respectiv centrifugarea probei. Spectrul SERS obținut în această etapă (spectrul portocaliu, **Figura III.2.2 proba 2C**) a evidențiat o scădere semnificativă a intensității semnalului, motiv pentru care soluția rezultată a fost supusă unei noi centrifugări. Ulterior, s-a achiziționat spectrul verde (**Figura III.2.2 proba 2C**), în care semnalele caracteristice hipoxantinei și xantinei devin predominante, în timp ce benzile acidului uric s-au diminuat considerabil. Acest comportament indică faptul că moleculele de acid uric nu au fost complet adsorbite în etapele anterioare, însă procesul a permis accesul treptat al celorlalți doi metaboliți la suprafața de argint. După a treia centrifugare, spectrul obținut a prezentat o pierdere completă

a semnalului, sugerând că toate moleculele – acid uric, hipoxantină și xantină – au fost eliminate din soluție prin adsorbție succesivă.

În continuare, am preparat o soluție de 850 μL hya-AgNPs, în care am adăugat succesiv cei trei metaboliți – acid uric (5×10^{-6} M), hipoxantină (5×10^{-6} M) și xantină (5×10^{-6} M) – precum și ionii Ca^{2+} la concentrația de 5×10^{-4} M. Spectrul obținut (spectrul albastru) din **Figura III.2.2. proba 2D** este similar celui din **Figura III.2.2 proba 2C**, fiind dominat de benzile caracteristice acidului uric (637, 889, 1202, 1273, 1698 cm^{-1}), fapt ce confirmă o afinitate ridicată a acestuia față de suprafața de argint. Spectrul portocaliu (**Figura III.2.2 proba 2D**) obținut prezintă, la rândul său, benzi similare cu cele din **proba 2C**. O diferență notabilă constă în faptul că intensitatea benzii de la 725 cm^{-1} este mai mare decât cea de la 740 cm^{-1} , în contrast cu distribuția inversă observată în figura anterioară. Acest aspect sugerează variații minore în distribuția competitivă a hipoxantinei și xantinei pe suprafața activă.

Spectrul obținut în urma următoarei etape (spectrul verde, **Figura III.2.2 proba 2D**) evidențiază prezența benzilor specifice hipoxantinei și xantinei la 725, 740, 1098, 1402 și 1453 cm^{-1} . Aceste rezultate indică faptul că, în ciuda afinității mai mari a acidului uric pentru suprafața de argint, ceilalți doi metaboliți au reușit să adsoarbă pe substratul metalic odată ce acidul uric a fost parțial îndepărtat.

Pentru a verifica dacă mai persistă urme de acid uric pe suprafața activă, soluția a fost supusă unei ultime centrifugări. Spectrul obținut ulterior (spectrul roșu, **Figura III.2.2 proba 2D**) nu a mai prezentat semnale detectabile, ceea ce indică eliminarea completă a tuturor moleculelor din soluție, fie prin adsorbție, fie prin separare eficientă în urma ciclurilor repetate de centrifugare.

În urma celor patru repetiții de măsurători SERS (**proba 2A, 2B, 2C și 2D**), păstrând constante volumul și concentrațiile soluțiilor, au fost observate diferențe notabile privind eficiența procesului de adsorbție. Astfel, în prima serie (**proba 2A**) au fost necesare trei cicluri de centrifugare, iar semnalul SERS al metaboliților era încă detectabil. În a doua serie (**proba 2B**), deși s-au realizat opt centrifugări, persistența semnalului a indicat o adsorbție incompletă. În schimb, în seriile reprezentate în **proba 2C și 2D** – caracterizate printr-un comportament foarte asemănător – eliminarea completă a semnalului a fost obținută după doar trei cicluri, ceea ce sugerează o eficiență crescută a adsorbției în aceste condiții.

O posibilă explicație pentru aceste variații o reprezintă modul de adăugare a celor trei metaboliți purinici. În amestecurile corespunzătoare spectrelor SERS din **Figurs III.2.2**, metaboliții au fost adăugați succesiv, dar nu la intervale de timp strict controlate, ceea ce poate fi

considerat o sursă de eroare experimentală. Pentru a reduce aceste variații și a asigura un protocol reproductibil, s-a decis utilizarea unui amestec predefinit de metaboliți, în care cei trei compuși sunt combinați înainte de introducerea în soluția de nanoparticule. Astfel, mixul a fost preparat din 900 μL de acid uric (10^{-6} M), 100 μL de xantină (10^{-6} M) și 100 μL de hipoxantină (10^{-6} M). Ulterior 150 μL din amestec a fost introdus în 850 μL soluție coloidală hya-AgNPs, permițând o distribuție simultană și uniformă a metaboliților (**Figura III.2.3**).

Pentru evaluarea influenței concentrației nanoparticulelor de argint asupra comportamentului de adsorbție competitivă a metaboliților purinici, au fost pregătite patru probe experimentale (3A–D), fiecare utilizând o concentrație diferită de hya-AgNPs. Prin creșterea numărului de nanoparticule de argint de la $2,4 \times 10^{10}$ la 27×10^{10} , s-au observat modificări semnificative ale intensității benzilor SERS ale acidului uric după prima centrifugare, precum și o scădere a numărului de cicluri de centrifugare necesare pentru obținerea spectrelor distincte ale tuturor metaboliților. Astfel, o concentrație mai mare de AgNPs conduce nu doar la o amplificare mai eficientă a semnalului Raman, ci și la o separare mai rapidă și clară a compușilor înregistrați în sistemele analizate. Rezultatele obținute în urma acestor experimente sunt ilustrate în **Figura III.2.3**, și vor fi analizate în detaliu în secțiunea următoare, sub denumirile de **probele 3A, 3B, 3C și 3D**.

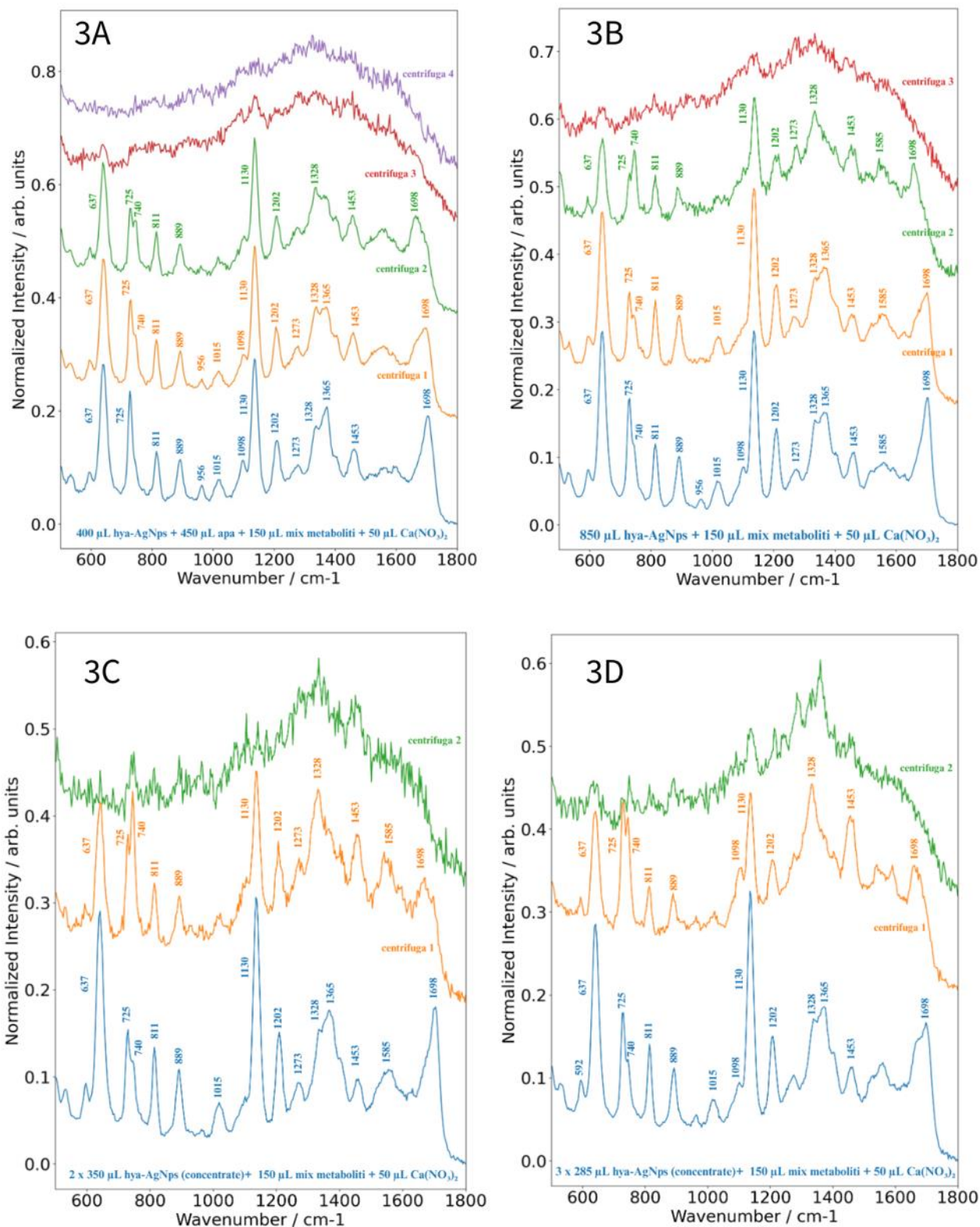


Figura III.2.3. Spectrele SERS ale amestecului de acid uric, hipoxantină, xantină (5×10^{-6} M) achiziționate folosind Ca^{2+} 5×10^{-4} M și hya-AgNPs ca substrat de amplificare în concentrație de (A) $2,4 \times 10^{10}$ NP, (B) $5,1 \times 10^{10}$ NP, (C) 18×10^{10} NP, (D) 27×10^{10} NP

Proba 3A (Figura III.2.3.) a fost preparată utilizând un volum de 400 μL de nanoparticule de argint în concentrație 2.4×10^{10} NP stabilizate cu hidroxilamină hidrocloridă (hya-AgNPs), în scopul evaluării eficienței adsorbției în condiții de suprafață activă redusă. La acest volum de nanoparticule s-au adăugat 450 μL apă ultra-pură, 150 μL din amestecul de metaboliți purinici (acid uric, hipoxantină, xantină fiecare la 5×10^{-6} M concentrație finală) și 50 μL de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (5×10^{-4} M). Spectrul SERS inițial al amestecului (albastru **Figura III.2.3 proba 3A**) este dominat de benzile caracteristice acidului uric (637, 811, 889, 1015, 1130, 1202, 1365 și 1698 cm^{-1}), indicând o afinitate ridicată a acestuia față de suprafața de argint, similar experimentelor anterioare. Cu toate acestea, după centrifugarea amestecului la 7200 rotații și reamestecarea supernatantului cu hya-AgNPs și $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, spectrul SERS obținut (portocaliu **Figura III.2.3. proba 3A**) conține benzi caracteristice hipoxantinei (725, 740, 1098, 1273, 1365, 1453 cm^{-1}), ceea ce sugerează că moleculele de acid uric au fost parțial eliminate, permițând accesul hipoxantinei la suprafața metalică.

După cea de-a doua centrifugare, a fost înregistrat spectrul verde (**Figura III.2.3. proba 3A**), în care se observă o creștere semnificativă a intensității benzii de la 740 cm^{-1} – specifică hipoxantinei – sugerând o adsorbție sporită a acesteia. Celelalte benzi au înregistrat fie o ușoară scădere, fie o menținere a intensității, fără modificări majore. Ulterior, a fost realizată o a treia centrifugare, iar spectrul rezultat (roșu, **Figura III.2.3. proba 3A**) a prezentat un semnal aproape inexistent, ceea ce indică faptul că toate moleculele prezente în soluție au fost complet îndepărtate sau adsorbite. Pentru a confirma această observație, a fost făcută o ultimă centrifugare și achiziționat un ultim spectru (mov, **Figura III.2.3. proba 3A**), care a arătat, de asemenea, absența completă a semnalului SERS.

Aceste rezultate sugerează că reducerea concentrației de nanoparticule de argint determină o scădere a suprafeței active disponibile pentru adsorbție, limitând astfel detecția la moleculele aflate în imediata vecinătate a substratului metalic. Întrucât un număr mai mic de nanoparticule implică implicit și un număr mai mic de molecule capabile să genereze un semnal detectabil, sensibilitatea metodei SERS în aceste condiții devine insuficientă pentru detecția concentrațiilor mici ale metaboliților purinici. În concluzie, s-a constatat că această concentrație redusă de hya-AgNPs nu oferă o eficiență optimă, motiv pentru care s-a decis revenirea la concentrația inițială de 850 μL de nanoparticule de argint, în vederea repetării experimentului pentru a treia oară, în condiții standardizate.

Pentru **Figura III.2.3. proba 3B**, s-a crescut concentrația de nanoparticule de argint la 850 μL hya-AgNPs ($5,1 \times 10^{10}$ NP), păstrând constanți ceilalți parametri: 150 μL mix de

metaboliți (fiecare metabolit având concentrația finală de 5×10^{-6} M) și $50 \mu\text{L Ca}(\text{NO}_3)_2$ (5×10^{-4} M). Această configurație a servit drept punct de referință, fiind considerată condiția standardizată pentru compararea eficienței adsorbției și detecției SERS.

În spectrul SERS inițial (spectrul albastru, **Figura III.2.3. proba 3B**), se observă, similar experimentelor anterioare, benzi predominante caracteristice acidului uric ($637, 811, 889, 1015, 1130, 1202$ și 1698 cm^{-1}). Acest rezultat era de așteptat, având în vedere afinitatea ridicată a acidului uric față de suprafața nanoparticulelor de argint. Astfel, a fost efectuată prima centrifugare, urmată de achiziția spectrului portocaliu (**Figura III.2.3. proba 3B**). Se remarcă o scădere lentă a intensității benzilor caracteristice acidului uric, fără apariția unor benzi noi care să indice adsorbția xantinei sau a hipoxantinei. Totuși, la benzile SERS 725 și 740 cm^{-1} se poate observa o ușoară tendință de formare a benzilor specifice hipoxantinei, deși acidul uric domină încă spectrul.

După efectuarea celei de-a doua centrifugări, spectrul verde (**Figura III.2.3. proba 3B**) obținut relevă o inhibare mai accentuată a intensității generale, dar fără eliminarea completă a semnalului. Se observă o inversare a intensității benzilor de la 725 și 740 cm^{-1} , ceea ce sugerează o redistribuire a moleculelor adsorbite la suprafață și posibil începutul procesului de adsorbție al hipoxantinei în detrimentul acidului uric. Această inversare poate indica o schimbare a preferinței de adsorbție pe suprafața metalică sau o competiție între metaboliți în condiții de suprafață limitată. În urma celei de-a treia centrifugări, a fost colectat spectrul roșu (**Figura III.2.3. proba 3B**), în care semnalul SERS este complet eliminat. Acest rezultat confirmă faptul că toate moleculele din soluție au fost fie complet adsorbite, fie îndepărtate prin centrifugare, semnalând finalizarea procesului de purificare a suprafeței.

Compararea rezultatelor din **Figura III.2.3. proba 3A** și **proba 3B** evidențiază o mică diferență în raportul benzilor SERS ale acidului uric și hipoxantinei ($725, 740 \text{ cm}^{-1}$) după a doua centrifugare. Acest lucru arată că, folosind o concentrație mică de hya-AgNPs ($5,1 \times 10^{10}$ NP și $2,4 \times 10^{10}$ NP) acidul uric este metabolitul care adsorbe pe suprafața hya-AgNPs. După o primă centrifugare nu se observă modificări majore indiferent de concentrația nanoparticulelor. Totuși, după a doua centrifugare în cazul $2,4 \times 10^{10}$ NPs acidul uric încă predomină spectrul, însă prin creșterea concentrației de nanoparticule la $5,1 \times 10^{10}$ NPs se modifică raportul benzilor $725/740 \text{ cm}^{-1}$ indicând o modificare a concentrației acidului uric și hipoxantinei la suprafața de argint.

Proba 3C (Figura III.2.3) a fost preparată prin aplicarea unei etape suplimentare de concentrare a nanoparticulelor de argint (18×10^{10} NP) hya-AgNPs, în vederea creșterii densității coloidale și, implicit, a suprafeței active disponibile pentru adsorbție. Două recipiente, fiecare conținând $1500 \mu\text{L}$ de hya-AgNPs, au fost centrifugate timp de 5 minute la 3100 xg și 25°C .

Ulterior, din fiecare recipient au fost eliminați 1150 μL de supernatant obținându-se câte 350 μL de nanoparticule concentrate. Cele două volume reziduale au fost apoi combinate, rezultând un total de 700 μL de nanoparticule concentrate, corespunzând la aproximativ 18×10^{10} particule. Peste această suspensie coloidală au fost adăugați 150 μL din amestecul de metaboliți purinici (acid uric, hipoxantină, xantină fiecare la 5×10^{-6} M) și 50 μL de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (5×10^{-4} M), rezultând proba finală utilizată pentru înregistrarea spectrului SERS. A fost achiziționat spectrul SERS inițial spectrul albastru (**Figura III.2.3. proba 3C**), în care se evidențiază clar prezența acidului uric, prin benzile caracteristice de la 637, 811, 889, 1015, 1130, 1202 și 1698 cm^{-1} , dar și prezența hipoxantinei, prin benzile de la 725, 740, 1273, 1365 și 1453 cm^{-1} . Semnalul SERS obținut în această condiție este considerabil amplificat și mai clar definit comparativ cu rezultatele experimentale anterioare. Creșterea suprafeței disponibile de nanoparticule de argint contribuie semnificativ atât la îmbunătățirea semnalului obținut. Mai mult după prima centrifugare se observă diminuarea semnificativă a semnalului SERS a acidului uric, ceea ce indică că prin creșterea numărului de nanoparticule mai multe molecule de acid uric au putut fi adsorbite. Astfel, suprafața de argint corespunzătoare 18×10^{10} NPs poate adsorbit mai multe molecule de acid uric comparativ cu $5,1 \times 10^{10}$. Cu toate acestea, nici această suprafață nu reușește să adsoarbă întreaga cantitate de acid uric, având în vedere faptul că după prima centrifugă (spectrul portocaliu **Figura III.2.3. proba 3C**), deși mai slab, benzile SERS caracteristice acidului uric sunt încă prezente. Se remarcă o inversare a raportului de intensitate între benzile de la 725 și 740 cm^{-1} , comparativ cu spectrul inițial, semnalând o reorganizare a moleculelor la suprafață. Experimentul a continuat cu a doua etapă de centrifugare, în urma căreia a fost achiziționat spectrul verde (**Figura III.2.3. proba 3C**). Acesta nu mai prezintă niciun semnal semnificativ, indicând faptul că toate moleculele au fost complet îndepărtate din soluție sau adsorbite în totalitate.

Se poate concluziona că, în aceste condiții experimentale, este necesară o singură centrifugare pentru obținerea unui rezultat optim, obținerea unui spectru SERS clar, stabil și bine definit, în care semnalul metaboliților de interes este puternic amplificat, iar interferențele generate de alți compuși – în special acidul uric – sunt complet sau aproape complet eliminate încă din prima etapă. Parametrul esențial care a condus la această eficiență a fost concentrația crescută a nanoparticulelor de argint, stabilită la o valoare optimă de 18×10^{10} NPs, ceea ce a permis o adsorbție completă și rapidă a metaboliților purinici, respectiv o detecție SERS eficientă și reproductibilă.

Proba 3D (Figura III.2.3.) a fost preparată în vederea testării influenței unei concentrații ridicate de nanoparticule (27×10^{10} NP) asupra eficienței procesului de adsorbție și a semnalului

SERS, reprezentând varianta cu cea mai mare densitate coloidală utilizată în acest studiu. Astfel, s-au utilizat trei recipiente, fiecare conținând câte 1500 μL de hya-AgNPs, care au fost supuse unui proces de centrifugare timp de 5 minute, la 3100 xg și 25 $^{\circ}\text{C}$. Din fiecare recipient au fost eliminați 1215 μL de supernatant, rezultând un volum rezidual de 285 μL per recipient. Cele trei porțiuni concentrate au fost combinate, obținându-se un total de 855 μL de nanoparticule concentrate, echivalent cu aproximativ 27×10^{10} NPs. Peste această suspensie s-au adăugat, similar probelor anterioare, 150 μL din amestecul de metaboliți purinici (acid uric, hipoxantină, xantină fiecare la 5×10^{-6} M) și 50 μL de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (5×10^{-4} M), compoziția finală fiind destinată evaluării performanțelor SERS în condiții de maximă suprafață activă disponibilă. A fost achiziționat spectrul SERS inițial (spectrul albastru, **Figura III.2.3. proba 3D**), în care se identifică clar benzile caracteristice acidului uric la 637, 811, 889, 1015, 1130, 1202 și 1698 cm^{-1} , dar și benzile hipoxantinei la 725, 740, 1098, 1273, 1365 și 1454 cm^{-1} .

A fost efectuată prima centrifugare, în aceleași condiții, și a fost înregistrat spectrul portocaliu (**Figura III.2.3. proba 3D**). Se observă o scădere semnificativă a intensității majorității benzilor SERS. În mod particular, se remarcă o amplificare a semnalului la banda de 740 cm^{-1} , specifică hipoxantinei, ceea ce sugerează că moleculele de acid uric au fost îndepărtate, permițând astfel moleculelor de hipoxantină să se adsorbă mai eficient la suprafața nanoparticulelor de argint. Ulterior, s-a realizat a doua centrifugare, iar spectrul verde (**Figura III.2.3. proba 3D**) obținut nu mai prezintă semnal SERS detectabil, indicând faptul că toate moleculele au fost complet eliminate din soluție.

Rezultatul obținut este similar cu cel din **proba 3C (Figura III.2.3.)**, unde eliminarea completă a semnalului s-a realizat tot după prima centrifugare. Acest aspect confirmă eficiența ridicată a metodei în condițiile utilizării unei concentrații mari de nanoparticule de argint, facilitând adsorbția completă a acidului uric 5×10^{-6} M într-un timp scurt și într-un singur pas de centrifugare. Pentru **proba 3C și 3D** nu au fost observate modificări semnificative. Ca urmare, am considerat **proba 3C** ca fiind optimă.

În **Figura III.2.2**, metaboliții purinici au fost adăugați pe rând, ceea ce a favorizat adsorbția preferențială a acidului uric și a necesitat două centrifugări pentru eliminarea completă a semnalului SERS. Concentrația nanoparticulelor a fost de $5,1 \times 10^{10}$ NP/mL, suficientă dar mai puțin eficientă în detecția simultană a tuturor metaboliților. În schimb, în **Figura III.2.3**, metaboliții au fost adăugați simultan ca mix, iar concentrația a fost crescută la 18×10^{10} NP/mL, ceea ce a dus la o adsorbție mai echilibrată și un semnal SERS amplificat. Astfel, o singură centrifugare a fost suficientă pentru eliminarea completă a semnalului. Metoda cu metaboliți

amestecați și concentrație mai mare de nanoparticule este mai eficientă deoarece oferă o suprafață activă mai extinsă pentru adsorbție simultană, reducând competiția secvențială între molecule și permițând detecția mai rapidă și completă a tuturor metaboliților din soluție

Pentru a verifica reproductibilitatea și consistența rezultatelor obținute în condiții experimentale optimizate, au fost realizate trei repetiții independente ale probei utilizând o concentrație de 18×10^{10} NP/mL (**proba 3C**) și aplicând două cicluri de centrifugare pentru fiecare.

Figura III.2.4. ilustrează rezultatele experimentale aferente acestor probe, care vor fi discutate pe larg în secțiunea următoare, sub denumirile de **proba 4A, 4B și 4C** fiind **proba 3C** descrisa anterior. Aceste repetiții au avut ca scop evaluarea fiabilității metodei SERS în detectarea diferențiată a metaboliților purinici, în contextul unui protocol optimizat pentru adsorbție competitivă și detecție selectivă.

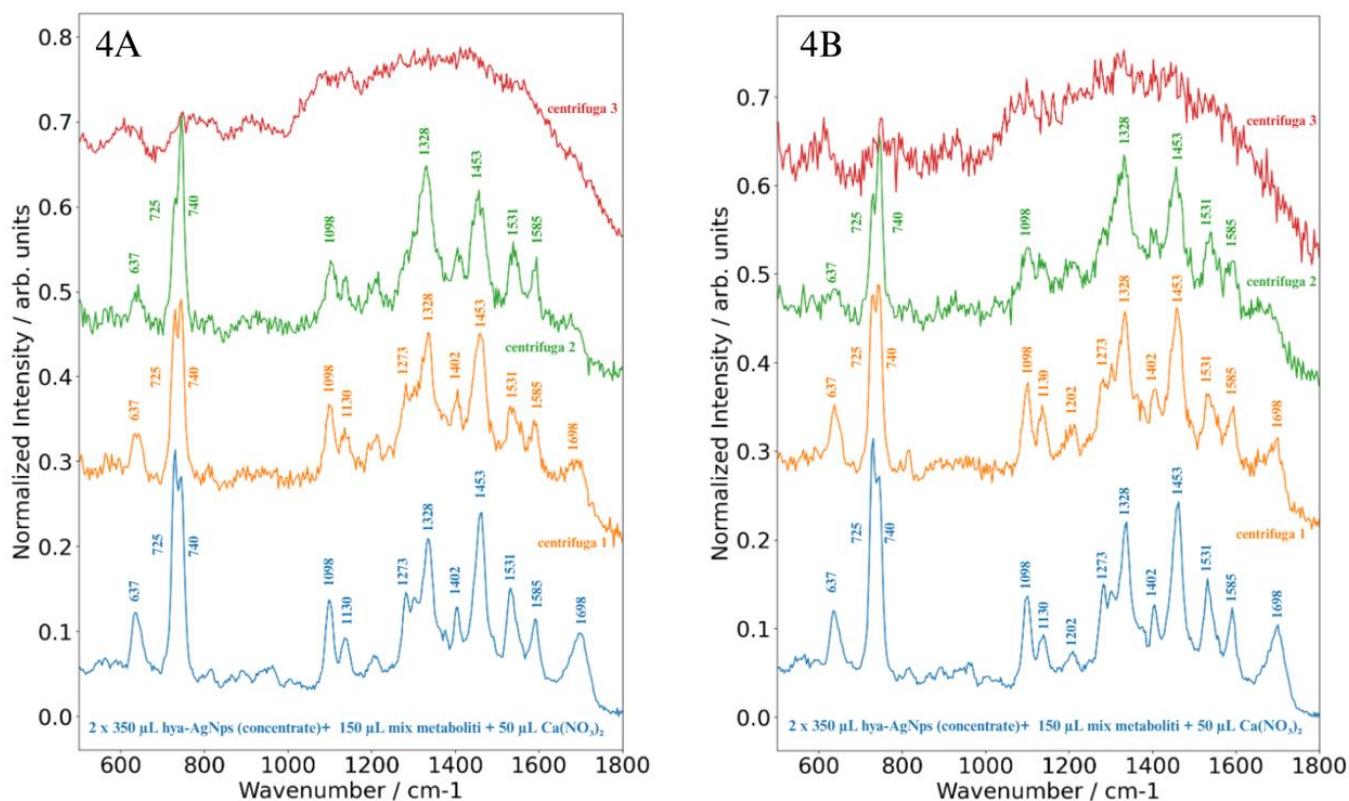


Figura III.2.4. (4A) Spectrele SERS ale unui amestec de acid uric, xantina și hipoxantină 5×10^{-6} M, achiziționat folosind hya-AgNPs ca substrat metallic de amplificare în concentrația de 18×10^{10} NP și Ca^{2+} 5×10^{-4} M. Subfigura (4B) reprezintă repetiția experimentului, pe probe de concentrații identice, pentru a verifica reproductibilitatea rezultatelor.

Proba 4A (Figura III.2.4.) a fost realizată în condiții identice de preparare cu probele a căror spectre sunt redată în **Figura. III.2.3. proba 3C**. Proba a fost obținută prin concentrarea a

3000 μL de hya-AgNPs ($2 \times 1500 \mu\text{L}$), centrifugați 5 minute la 3100 xg și 25 $^{\circ}\text{C}$. După eliminarea a câte 1150 μL de supernatant, au rămas $2 \times 350 \mu\text{L}$, combinate într-un singur volum de 700 μL cu o densitate finală de aproximativ 18×10^{10} nanoparticule. Peste această suspensie s-au adăugat 150 μL din amestecul de metaboliți (acid uric, hipoxantină și xantină, fiecare la 10^{-6} M) și 50 μL de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (5×10^{-3} M), obținându-se proba finală pentru măsurătorile SERS.

Spectrul SERS inițial (albastru **Figura III.2.4. proba 4A**) evidențiază o predominanță a benzilor caracteristice hipoxantinei (725, 740, 1098, 1273, 1365, 1453 cm^{-1}), în timp ce semnalul acidului uric, specific benzilor 637, 1130 și 1698 cm^{-1} , este semnificativ mai redus. Acest comportament contrazice observațiile anterioare discutate anterior, pe baza **Figura. III.2.3. proba 3C**, unde spectrul era dominat de semnalul acidului uric. Această discrepanță ridică întrebări privind posibile variații în adsorbția competitivă a metaboliților purinici și factori experimentali subtili care pot influența comportamentul sistemului, deși s-au folosit aceleași soluții și aceleași condiții de preparare. Este posibil ca distribuția moleculelor pe suprafața nanoparticulelor sau starea lor de agregare să varieze de la o probă la alta, afectând afinitatea pentru suprafața de argint.

Ulterior, s-a efectuat prima centrifugare, iar din supernatant s-a obținut spectrul SERS portocaliu (**Figura III.2.4. proba 4A**). În acest caz, se observă o scădere generală a intensității semnalului, iar în regiunea 725–740 cm^{-1} se remarcă o echilibrare a intensităților, spre deosebire de spectrul inițial în care semnalul de la 725 cm^{-1} era dominant. Această variație poate sugera fie o redistribuire a moleculelor la suprafață în urma agitării și centrifugării, fie o suprapunere a semnalelor hipoxantinei și xantinei care devin mai dificil de separat în această etapă.

Procesul de centrifugare a fost repetat, iar spectrul rezultat (verde, **Figura III.2.4. proba 4A**) indică menținerea semnalului SERS, ceea ce, din nou, contrazice comportamentul observat în cazul anterior (**Figura. III.2.3. proba 3C**), unde semnalul dispărea complet după a doua centrifugare. Persistența semnalului, în special diminuarea semnificativă a benzii de la 725 cm^{-1} (caracteristică hipoxantinei), poate fi explicată printr-un proces lent de adsorbție sau o competiție încă activă între molecule pentru suprafața de argint, ori printr-un dezechilibru în interacțiunile electrostatice influențate de prezența ionilor Ca^{2+} . În urma celei de-a treia centrifugări, s-a achiziționat spectrul roșu (**Figura III.2.4. proba 4A**), unde se constată dispariția completă a semnalului SERS, indicând epuizarea moleculelor adsorbabile din soluție și finalizarea procesului de adsorbție. Cu toate acestea, persistă o diferență notabilă între comportamentul din **Figura. III.2.3. proba 3C** și cel din **Figura. III.2.4. proba 4A**: în primul caz, pierderea completă a semnalului se obținea după două centrifugări, în timp ce în cazul actual sunt necesare trei. Acest lucru indică o posibilă variabilitate în procesul de adsorbție competitivă care, deși

dificil de explicat pe baza parametrilor controlați, ar putea fi influențată de factori precum diferențe subtile în starea coloidală a soluției, agregarea parțială a nanoparticulelor, ușoare variații de pH, sau ordinele de amestecare microscopice neuniforme.

Pentru a evalua reproductibilitatea metodei experimentale aplicate în condiții optimizate, protocolul a fost repetat încă o dată, iar rezultatele sunt prezentate în **Figura III.2.4. proba 4B**. Spectrele obținute au prezentat o suprapunere remarcabilă, indicând o bună consistență între repetiții. Spectrul inițial (albastru **Figura III.2.4. proba 4B**) a evidențiat aceleași benzi specifice hipoxantinei și acidului uric, în ambele cazuri. După prima centrifugare (spectrul portocaliu **Figura III.2.4. proba 4B**), s-a observat o scădere similară a intensității benzilor acidului uric și o menținere a hipoxantinei ca semnal dominant. După a doua centrifugare (spectrul verde **Figura III.2.4. proba 4B**), în ambele probe s-a remarcat o inversare constantă a intensităților benzilor de la 725 și 740 cm^{-1} , sugerând o rearanjare a hipoxantinei pe suprafața nanoparticulelor. În final, după a treia centrifugare, ambele probe au generat spectre fără semnal, confirmând reproducerea fidelă a comportamentului de adsorbție și eficiența metodei în separarea completă a metaboliților.

Pentru a evalua aplicabilitatea metodei în condiții mai complexe, am testat amestecarea metaboliților purinici cu acid 2-hidroxi-glutaric (2HGA). Prezența sa, în special în concentrația crescută, are un efect semnificativ asupra semnalelor SERS, ceea ce indică concurența pentru adsorbția nanoparticulelor la suprafață. Alegerea moleculei D-2HGA a fost motivată de rolul său biologic în metabolismul celular, precum și de interesul pentru detecția sa în medii biologice complexe. În plus, prezența grupărilor carboxil și hidroxil în structura sa sugerează un potențial de interacțiune cu suprafața nanoparticulelor de argint, similar cu ceilalți metaboliți analizați.

În urma acestor observații, am aplicat aceste observații în investigarea prin analiză SERS a unui amestec format din acid uric (5×10^{-6} M), hipoxantină (5×10^{-6} M) și D-2HGA la concentrații de 10^{-3} M și 10^{-4} M.

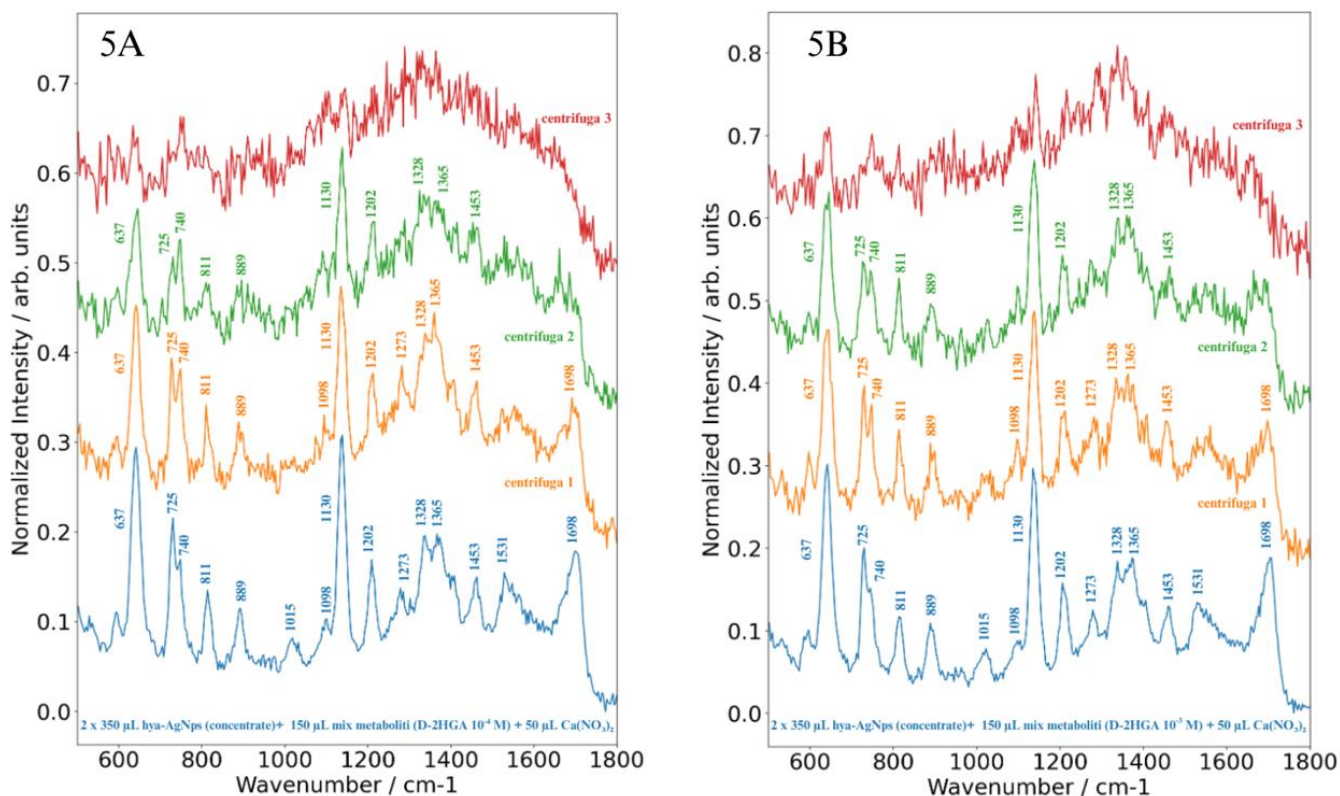


Figura III.2.5. Spectrele SERS ale amestecului de acid uric 5×10^{-6} , hipoxantina 5×10^{-6} și D-2HGA la concentrația (A) 10^{-4} M, (B) 10^{-3} M achiziționate folosind hya-AgNPs ca substrat metallic de amplificare în concentrația de 18×10^{10} NP și Ca^{2+} 5×10^{-4} M.

În spectrul SERS inițial (albastru **Figura III.2.5. proba 5A**) al amestecului metaboliților cu D-2HGA 10^{-4} M se remarcă un semnal SERS puternic corespunzător acidului uric, identificabil prin benzile caracteristice situate la 637, 811, 889, 1015, 1130, 1202, 1273, 1365 și 1698 cm^{-1} . De asemenea, sunt prezente benzi asociate hipoxantinei la 725, 740 și 1453 cm^{-1} .

Totuși, nu se observă nicio bandă atribuibilă moleculei D-2HGA, ceea ce indică faptul că aceasta nu a fost adsorbită pe suprafața nanoparticulelor de argint în condițiile date. S-a continuat protocolul experimental cu centrifugarea probei și achiziția spectrului portocaliu (**Figura III.2.5. proba 5A**). Spectrul obținut păstrează același profil spectral, cu predominanța semnalului acidului uric și al hipoxantinei, dar fără apariția benzilor caracteristice D-2HGA.

După a doua centrifugare s-a achiziționat spectrul verde (**Figura III.2.5. proba 5A**) care prezintă o intensitate mai redusă, dar cu aceleași caracteristici spectrale ca în spectrul portocaliu (**Figura III.2.5. proba 5A**). Persistența exclusivă a semnalelor acidului uric și hipoxantinei sugerează că D-2HGA nu a adsorbit nici după îndepărtarea progresivă a celorlalte molecule. În urma celei de-a treia centrifugări, spectrul roșu (**Figura III.2.5. proba 5A**) indică pierderea

completă a semnalului, ceea ce confirmă eliminarea tuturor moleculelor din soluție. Cu toate acestea, semnalul SERS al D-2HGA nu a putut fi observat. O explicație posibilă pentru această absență este faptul că grupările funcționale ale D-2HGA nu prezintă o afinitate suficientă față de suprafața nanoparticulelor stabilizate cu Cl⁻ (provenite din sinteză), ceea ce împiedică adsorbția moleculei și, implicit, detecția sa prin efectul SERS.

Pentru a testa dacă detecția este posibilă la concentrații mai mari, s-a realizat un al doilea experiment cu concentrația D-2HGA crescută la 10⁻³ M (**Figura III.2.5. proba 5B**). Motivul creșterii concentrației a fost acela de a încerca forțarea adsorbției moleculei pe suprafața nanoparticulelor, în ipoteza în care interacțiunea este slabă, dar nu inexistentă. Totuși, spectrul SERS inițial (albastru **Figura III.2.5. proba 5B**) a prezentat din nou predominanța benzilor acidului uric (637, 811, 889, 1015, 1130, 1202, 1273, 1365 și 1698 cm⁻¹), alături de semnalul hipoxantinei (725, 740 și 1453 cm⁻¹), fără benzi caracteristice D-2HGA. Etapele ulterioare de centrifugare au dus la obținerea spectrelor portocaliu și verde (**Figura III.2.5. proba 5B**), care au arătat o similitudine ridicată cu spectrele SERS din Fig (**Figura III.2.5. proba 5A**) înregistrate în aceleași condiții, confirmând faptul că nici la concentrații crescute D-2HGA nu poate fi detectat în acest amestec. Spectrul final (roșu **Figura III.2.5. proba 5B**), achiziționat după a treia centrifugare, indică pierderea completă a semnalului, ceea ce sugerează eliminarea tuturor moleculelor.

Indiferent de concentrația utilizată, D-2HGA nu a putut fi detectat prin metoda SERS utilizând nanoparticule de argint sintetizate cu hidroxilamină hidrocloridă (Hya-AgNPs). Motivul probabil constă în faptul că nanoparticulele sunt stabilizate cu ioni de Cl⁻ proveniți din sinteză, care prezintă o afinitate mare față de suprafața de argint. Pe lângă acest aspect, D-2HGA nu are în structură o grupare funcțională cu afinitate ridicată pentru suprafața nanoparticulelor, prin urmare s-a decis schimbarea substratului SERS pentru acest experiment.

A fost ales în continuare ca substrat nanoparticule de argint sintetizate cu citrat de sodiu (Cit-AgNPs), care oferă o suprafață de adsorbție mai liberă, deoarece nu este saturată cu stabilizatori puternic legați, cum ar fi ionii de clor, permițând astfel o interacțiune mai eficientă cu moleculele analizate. Această modificare este esențială pentru a permite interacțiunea directă a D-2HGA cu suprafața metalică și, implicit, obținerea unui semnal SERS detectabil.

În **Figura III.2.6** este ilustrat spectrul SERS al D-2HGA-ului obținut în prezența Cit-AgNPs și a unei soluții de Ca(NO₃)₂. Compoziția probei a fost: 90 μL soluție de nanoparticule

Cit-AgNPs, 10 μL soluție de D-2HGA (concentrație 5×10^{-4} M) și 5 μL soluție de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (concentrație 5×10^{-4} M).

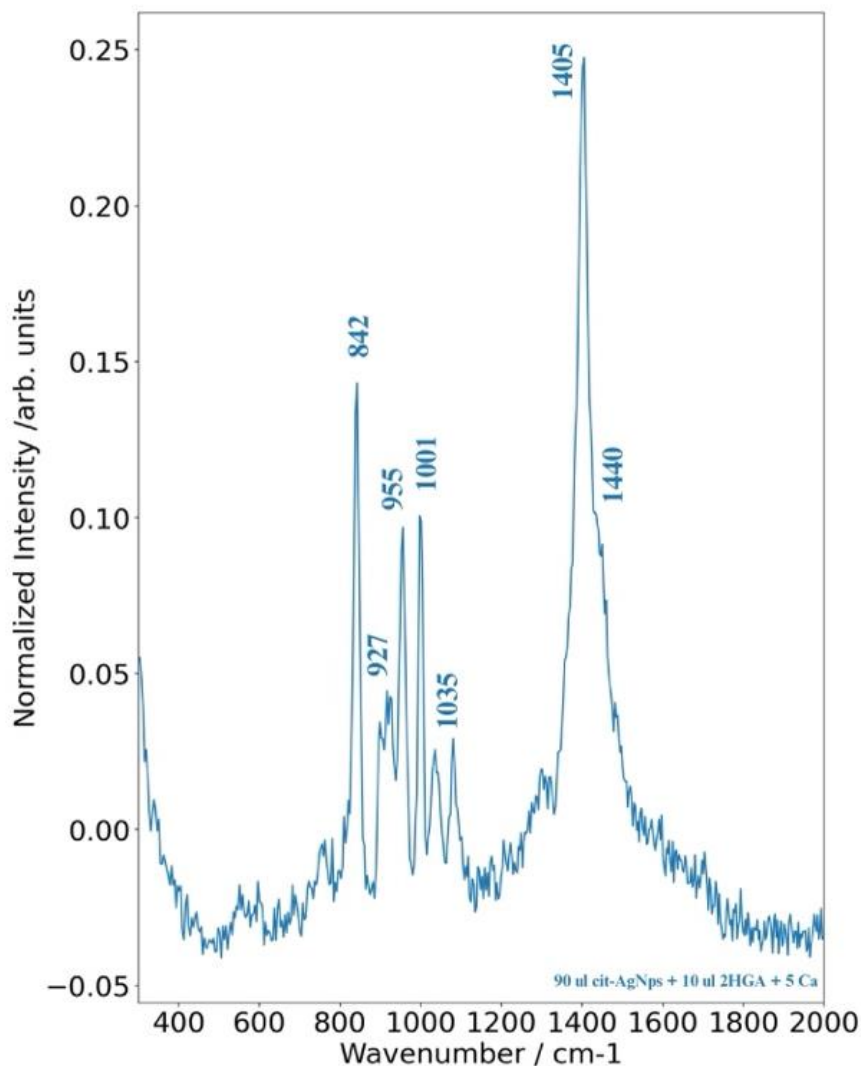


Figura III.2.6. Spectrul SERS al acidului D-2HGA la concentrația 5×10^{-4} M, folosind ca substrat de amplificare nanoparticule de argint reduse cu citrat și $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 5×10^{-4} M.

Spectrul SERS rezultat evidențiază apariția unor benzi clare și bine definite în intervalul $300\text{--}20000$ cm^{-1} , corespunzătoare vibrațiilor moleculare specifice structurii D-2HGA. Dintre acestea, se remarcă benzile la 842, 927, 955, 1001, 1035, 1405 și 1440 cm^{-1} . Prezența acestor benzi confirmă interacțiunea directă a moleculelor de D-2HGA cu suprafața Cit-AgNPs și demonstrează eficiența acestui tip de substrat în detectarea metabolitului, spre deosebire de rezultatele obținute cu nanoparticulele stabilizate cu hidroxilamină hidrocloridă, unde nu s-a observat niciun semnal SERS specific.

În continuare, scopul studiului a fost de a îmbunătăți detecția selectivă a D-2HGA în prezența metaboliților purinici (acid uric și hipoxantină). Obiectivul principal a fost identificarea unei concentrații optime de nanoparticule care să permită adsorbția completă a acidului uric din amestec în urma unei singure centrifugări, facilitând astfel detecția specifică a D-2HGA.

În **Figura III.2.7.** sunt prezentate spectrele SERS obținute pentru amestecul de acid uric, hipoxantină și D-2HGA (5×10^{-4} M), în aceleași concentrații ca în experimentul din **Figura III.2.5 proba 5B.** Pentru acest experiment au fost preparate trei soluții folosind cit-AgNPs ca substrat de amplificare în concentrație de (A) 2.4×10^{10} NP, (B) $5,1 \times 10^{10}$ NP, (C) 18×10^{10} NP și $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 5×10^{-3} M.

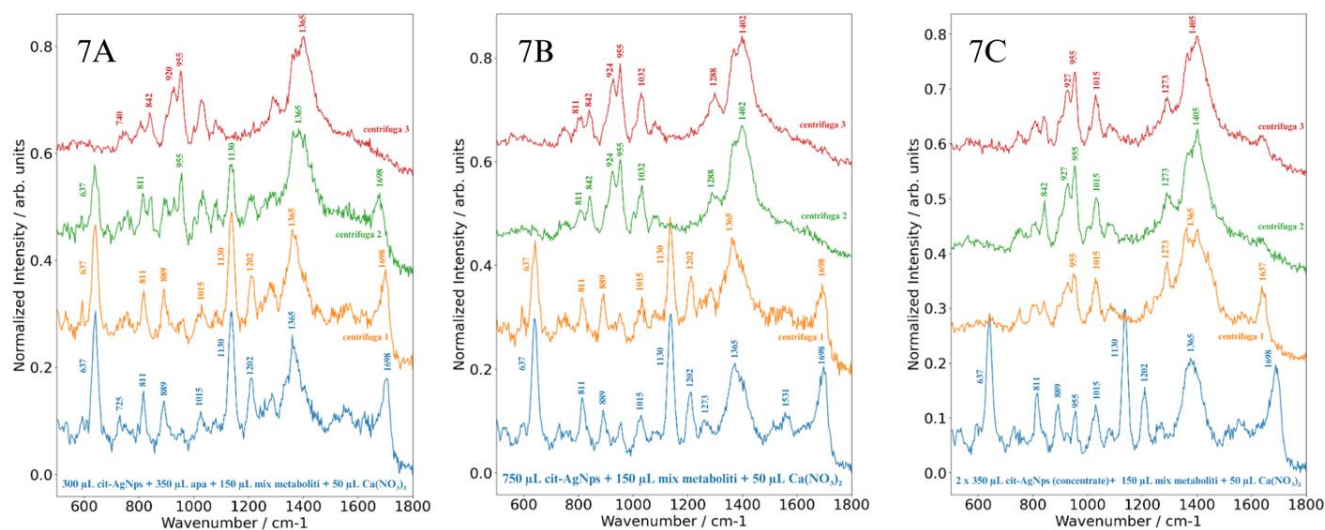


Figura III.2.7. Spectrele SERS ale amestecului de acid uric 5×10^{-6} M, hipoxantină 5×10^{-6} M, D-2HGA 5×10^{-4} M achiziționat folosind cit-AgNPs ca substrat de amplificare în concentrație de (A) 2.4×10^{10} NP, (B) $5,1 \times 10^{10}$ NP, (C) 18×10^{10} NP și $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 5×10^{-3} M.

În cadrul experimentului reprezentat în **Figura III.2.7 proba 7A**, s-a utilizat o concentrație redusă de nanoparticule, compoziția probei fiind următoarea: 300 μL Cit-AgNPs, 350 μL apă ultrapură, 150 μL amestec de metaboliți (D-2HGA în concentrație de 5×10^{-4} M, acid uric 5×10^{-6} M și hipoxantină 5×10^{-6} M) și 50 μL soluție de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (5×10^{-4} M). Spectrul inițial (albastru **Figura III.2.7. proba 7A**) evidențiază semnalul caracteristic acidului uric, reflectat prin prezența benzilor SERS caracteristice la: 637, 725, 811, 889, 1015, 1130, 1202, 1273, 1365 și 1698 cm^{-1} . Aceste benzi confirmă faptul că, inițial, acidul uric este predominant adsorbit pe suprafața nanoparticulelor. Spectrul portocaliu (**Figura III.2.7. proba 7A**), obținut după prima

centrifugare, arată o menținere a semnalului SERS specific acidului uric, cu o ușoară scădere în intensitate, indicând o parțială eliminare a moleculelor de acid uric din soluție.

După a doua centrifugare, spectrul verde (**Figura III.2.7. proba 7A**) relevă apariția unor benzi suplimentare la 842, 955 și 1402 cm^{-1} , care pot fi atribuite D-2HGA, în timp ce semnalul acidului uric persistă, deși cu o intensitate vizibil redusă, la 637, 811 și 1698 cm^{-1} . Aceste observații indică faptul că, în condițiile de față, acidul uric nu a fost complet îndepărtat după două cicluri de centrifugare, afectând potențial acuratețea detecției D-2HGA. Spectrul roșu (**Figura III.2.7. proba 7A**), achiziționat după a treia centrifugare, arată prezența exclusivă a benzilor caracteristice D-2HGA la 842, 920, 955 și 1365 cm^{-1} , în absența totală a semnalului SERS specific acidului uric. Această evoluție demonstrează că trei cicluri de centrifugare sunt necesare, în aceste condiții, pentru eliminarea completă a interferenței produse de acidul uric și obținerea unor benzi caracteristice D-2HGA.

Pentru a reduce numărul de pași necesari și a simplifica protocolul experimental, s-a decis creșterea concentrației de Cit-AgNPs în etapa următoare. Această decizie este justificată de ipoteza conform căreia un număr mai mare de situsuri active disponibile pe suprafața nanoparticulelor ar permite o adsorbție mai eficientă și mai rapidă a acidului uric înainte de prima centrifugare, favorizând astfel eliberarea completă a suprafeței pentru detecția D-2HGA. Astfel, am pregătit o nouă probă utilizând 750 μL Cit-AgNPs la concentrația $5,1 \times 10^{10}$ NP (**Figura III.2.7 proba 7B**), cu scopul de a facilita o adsorbție mai eficientă a acidului uric și, implicit, o detecție mai rapidă a D-2HGA. Compoziția probei a fost ajustată corespunzător, restul volumului fiind completat cu amestecul de metaboliți și $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, conform protocolului standard. Spectrul inițial (albastru **Figura III.2.7. proba 7B**) evidențiază, similar cu experimentul anterior, un semnal SERS intens al acidului uric, cu benzi caracteristice la 637, 811, 889, 1015, 1130, 1202, 1273, 1365 și 1698 cm^{-1} , indicând o adsorbție eficientă a acestei molecule pe suprafața nanoparticulelor. După prima centrifugare, spectrul portocaliu (**Figura III.2.7. proba 7B**) arată în continuare prezența acidului uric, însă cu o scădere clară a intensității benzilor, sugerând o îndepărtare parțială a moleculelor din soluție, comportament consistent cu rezultatele obținute în **Figura III.2.7. proba 7A**.

O diferență semnificativă apare însă în spectrul verde (**Figura III.2.7. proba 7B**), obținut după a doua centrifugare: în acest caz, acidul uric nu mai este detectat, iar spectrul SERS obținut este dominat exclusiv de benzile caracteristice D-2HGA, identificate la 842, 924, 955, 1032, 1288 și 1402 cm^{-1} . Această observație indică faptul că, la concentrația crescută de Cit-AgNPs, eliminarea acidului uric este completă după doar două centrifugări, spre deosebire de cazul

anterior, unde au fost necesare trei etape pentru același rezultat. Astfel, se poate concluziona că eficiența separării este semnificativ îmbunătățită prin creșterea cantității de nanoparticule. Spectrul roșu (**Figura III.2.7. proba 7B**), înregistrat după a treia centrifugare, nu aduce modificări suplimentare față de cel precedent, confirmând stabilitatea semnalului D-2HGA și absența altor interferențe moleculare..

În continuare, pentru **Figura III.2.7. proba 7C** am crescut din nou concentrația nanoparticulelor (18×10^{10} NP). Au fost utilizate două recipiente, fiecare conținând 1500 μL de nanoparticule de argint reduse cu citrat (Cit-AgNPs). Probele au fost centrifugate timp de 5 minute la 3100 $\times g$ și 25°C, iar din fiecare recipient au fost extrași 1150 μL de surfactant, rezultând un volum final de 350 μL de nanoparticule concentrate per recipient. Ulterior, cele 350 μL de nanoparticule au fost amestecate cu 150 μL din soluția de metaboliți (conținând acid uric, hipoxantină și D-2HGA) și 50 μL de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, conform procedurii deja validate anterior. Spectrul SERS obținut inițial (spectrul albastru **Figura III.2.7. proba 7C**) a evidențiat prezența acidului uric, cu benzi caracteristice intense la 637, 811, 889, 1015, 1130, 1202, 1273, 1365 și 1698 cm^{-1} , indicând o adsorbție predominantă a acestei molecule pe suprafața nanoparticulelor.

După prima centrifugare, spectrul portocaliu (**Figura III.2.7. proba 7C**) a arătat o modificare semnificativă a profilului spectral, semn că acidul uric a fost în mare parte îndepărtat din soluție. Astfel, moleculele de D-2HGA au avut posibilitatea de a adsorbi pe suprafața Cit-AgNPs, acest fapt fiind evidențiat prin apariția benzilor caracteristice la 955, 1032, 1288 și 1402 cm^{-1} . Deși majoritatea semnalului SERS al acidului uric a fost eliminat, se remarcă prezența reziduală a acestuia prin benzile 1365 și 1698 cm^{-1} . Pentru o separare completă, s-a efectuat o a doua centrifugare, iar spectrul verde (**Figura III.2.7. proba 7C**) a demonstrat eliminarea completă a acidului uric, spectrul obținut prezentând exclusiv semnalul D-2HGA, cu benzi intense la 842, 924, 955, 1032, 1288 și 1402 cm^{-1} . Acest rezultat confirmă că, după două etape de centrifugare, nanoparticulele oferă o suprafață suficientă pentru adsorbția selectivă a D-2HGA, fără interferențe semnificative din partea celorlalți metaboliți. Spectrul final, spectrul roșu (**Figura III.2.7. proba 7C**), obținut după a treia centrifugare, nu a prezentat modificări față de cel precedent, ceea ce confirmă stabilitatea semnalului și reproducerea fidelă a spectrului specific D-2HGA.

În concluzie, protocolul utilizat pentru înregistrarea spectrelor SERS din **Figura III.2.7. proba C** reflectă cea mai eficientă strategie experimentală dintre toate condițiile testate. Această metodă permite detecția clară a D-2HGA chiar după prima centrifugare și eliminarea completă a interferenței acidului uric după a doua centrifugare, demonstrând astfel potențialul său ca metodă

de referință în analiza complexă a amestecurilor de metaboliți. Pe baza acestor rezultate, s-a decis continuarea experimentelor pentru evaluarea reproductibilității metodei utilizând o concentrație de nanoparticule de aproximativ 18×10^{10} NP.

Pentru validarea reproductibilității metodei optimizate, s-a realizat o nouă serie de experimente identice, ilustrate în **Figura III.2.8. Figura III.2.8. proba 8A** este aceeași cu **Figura III.2.7. proba 7C**, fiind inclusă în această secțiune ca punct de referință în compararea ulterioară a rezultatelor.

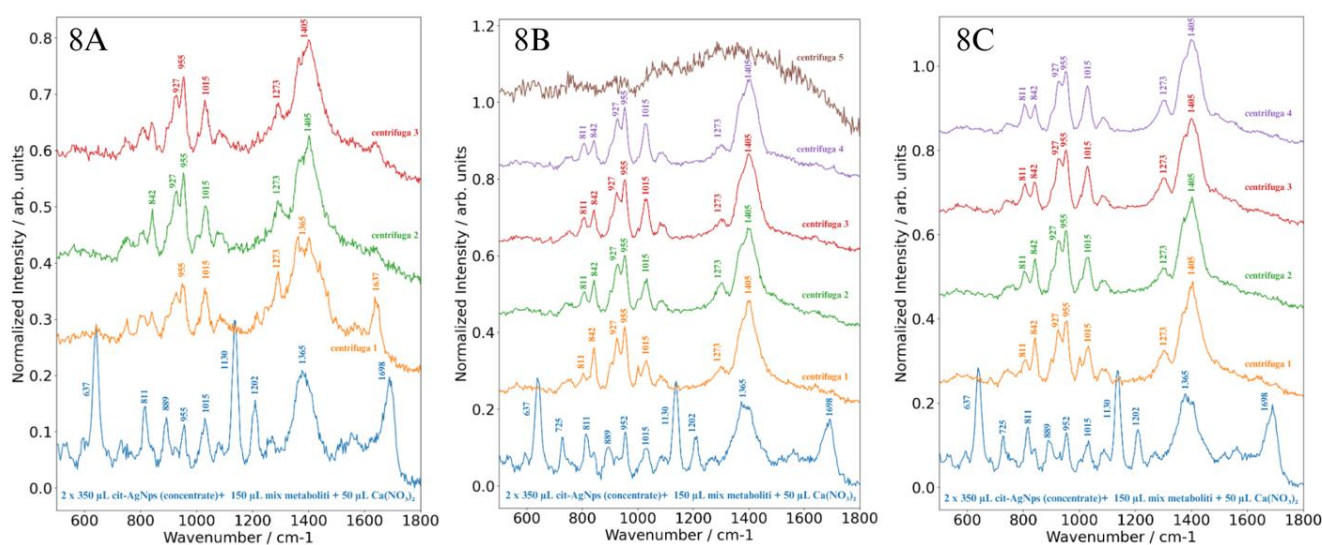


Figura III.2.8. (A) Spectrele SERS ale unui amestec de acid uric (5×10^{-6} M), hipoxantină (5×10^{-6} M) și D-2HGA concentrație 5×10^{-4} M, achiziționat folosind cit-AgNPs ca substrat metalic de amplificare în concentrația de 18×10^{10} NP și Ca^{2+} 5×10^{-4} M. Subfigurile 8B și 8C reprezintă repetiția procedurii în amestecuri identice.

În cazul **proba 8B (Figura III.2.8)**, s-a aplicat același protocol experimental: utilizarea a 350 μL de nanoparticule Cit-AgNPs centrifugate, amestecate cu 150 μL din soluția de metaboliți și 50 μL $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$. În spectrul SERS inițial (spectrul albastru **Figura III.2.8. proba 8B**) se observă prezența majoritară a acidului uric, cu benzi caracteristice la 637, 725, 811, 889, 1015, 1130, 1202, 1365 și 1698 cm^{-1} , confirmând comportamentul de adsorbție preferențială inițială a acestei molecule pe suprafața nanoparticulelor. În plus, s-a observat și un semnal slab pentru D-2HGA, prin apariția unei benzi la 955 cm^{-1} , semn al unei adsorbții inițiale parțiale. După prima centrifugare, spectrul obținut (spectrul portocaliu **Figura III.2.8. proba 8B**) a fost dominat de prezența citratului, ca rezultat al eliberării surfactantului de pe nanoparticule. Totuși, s-au

remarcat și benzi asociate D-2HGA, în special la 1001 și 1390 cm^{-1} . Aceste benzi pot fi explicate prin eliberarea unei părți din suprafața nanoparticulelor ocupate anterior de acidul uric și surfactant, oferind astfel acces moleculei de D-2HGA la suprafața activă a nanoparticulelor. De asemenea, se observă prezența benzilor SERS caracteritice citratului, surfactantul nanoparticulelor la 927, 955, 1365 cm^{-1} .

În continuare, spectrele verde, roșu și mov (**Figura III.2.8 proba 8B**) au prezentat profiluri identice, caracterizate prin benzi clare D-2HGA, ceea ce sugerează o adsorbție stabilă și reproductibilă a acestei molecule după prima etapă de purificare. Consistența acestor spectre confirmă stabilitatea semnalului SERS al D-2HGA în condițiile experimentale stabilite. În final, spectrul maro (**Figura III.2.8. proba 8B**), obținut după o a cincea centrifugare, a indicat pierdere totală a semnalului SERS, semnificând că toate moleculele au fost eliminate din suspensie sau nu mai sunt în concentrație detectabilă. Această observație întărește validitatea protocolului, demonstrând că există o limită clară de purificare și detecție, după care semnalul dispare complet.

Acest comportament, identic cu cel observat în **proba 8A (Figura III.2.8)**, confirmă reproductibilitatea experimentului – aplicarea aceleiași metode produce rezultate similare în ceea ce privește atât profilul spectral, cât și numărul de centrifugări necesar pentru obținerea unui semnal specific D-2HGA.

În **proba 8C (Figura III.2.8)**, s-a repetat încă o dată același protocol experimental. Rezultatele obținute au fost perfect suprapozabile cu cele din **proba 8B (Figura III.2.8)**, evidențiind același spectru SERS al acidului uric în stadiul inițial, urmat de semnalul D-2HGA după purificare, și eliminarea completă a acidului uric în etapele finale. Astfel, reproductibilitatea metodei a fost demonstrată de trei ori consecutiv, consolidând robustețea și fiabilitatea abordării experimentale propuse.

Spectrele SERS ale amestecului format din acid uric (5×10^{-6} M), hipoxantină (5×10^{-6} M) și D-2HGA (5×10^{-4} M), în prezența substratului cit-AgNPs (18×10^{10} NPs) și a ionilor Ca^{2+} (5×10^{-4} M), au demonstrat că detecția moleculei D-2HGA este posibilă doar atunci când sunt utilizate nanoparticule sintetizate prin reducerea cu citrat. Acest comportament se explică prin prezența ionilor de clor în substraturile obținute cu hidroxilamină, care prezintă o afinitate crescută pentru suprafața de argint și blochează adsorbția moleculei. Prin urmare, compoziția chimică a mediului de sinteză influențează direct sensibilitatea și specificitatea substraturilor SERS utilizate pentru detecția D-2HGA în amestecuri complexe.

CONCLUZII

Un prim rezultat important al studiului a fost evidențierea comportamentului competitiv de adsorbție al metaboliților purinici față de suprafața substratului metalic de argint. Dintre compușii analizați, acidul uric prezintă cea mai mare afinitate pentru suprafața nanoparticulelor de argint, fapt reflectat prin apariția constantă a benzilor sale caracteristice în spectrele SERS indiferent de surfactantul utilizat pentru stabilizarea nanoparticulelor de argint. Această afinitate ridicată a condus la inhibarea adsorbției hipoxantinei și xantinei, care nu au putut fi detectate decât după una sau mai multe centrifugări, în urma îndepărtării parțiale a acidului uric din soluție prin adsorbția lui pe nanoparticulele de argint ce au fost separate ulterior de supernatant.

Un al doilea aspect evidențiat în această lucrare este importanța centrifugării repetate ca metodă de filtrare a moleculelor cu afinitate mare pentru suprafața de argint, precum acidul uric, în vederea detecției SERS a altor metaboliți din biofluide. S-a demonstrat că sunt necesare cel puțin două sau trei cicluri de centrifugare pentru ca acidul uric să fie eliminat în proporție suficientă, permițând astfel evidențierea semnalelor SERS specifice xantinei și hipoxantinei. Concentrația optimă de nanoparticule de argint este $1,8 \times 10^{11}$ NP/mL.

În ceea ce privește molecula de D-2HGA, s-a constatat că aceasta poate fi detectată în prezența substratului obținut prin reducerea cu citrat. Acest comportament este atribuit influenței ionilor de clor rezultați în urma sintezei nanoparticulelor cu hidroxilamină hidrocloridă, care interacționează puternic cu suprafața de argint și inhibă adsorbția moleculei de D-2HGA. Astfel, natura chimică a mediului de sinteză influențează decisiv sensibilitatea și specificitatea substratului SERS.

Un alt rezultat relevant este identificarea unei concentrații optime de nanoparticule de argint reduse cu citrat, de $1,8 \times 10^{11}$ NP/mL în vederea adsorbției acidului uric pe suprafața de argint într-un pas, urmat de detecția SERS ulterioară a D-2HGA.

Fiabilitatea metodei propuse este susținută de reproductibilitatea experimentului. Protocolul a fost repetat de trei ori în aceleași condiții experimentale, utilizând amestecuri identice de metaboliți (la concentrații constante) și aceiași parametri fizico-chimici (tipul și concentrația nanoparticulelor, precum și prezența ionilor de Ca^{2+} ca facilitator al interacțiunii nanoparticule-analit).

Aceste rezultate validează eficiența și reproductibilitatea metodei dezvoltate pentru analiza competitivă a metaboliților purinici într-un amestec complex. Totodată, ele evidențiază importanța stabilirii parametrilor experimentali – tipul substratului, numărul de centrifugări și condițiile de sinteză – în optimizarea detecției SERS pentru compuși biologici de interes.

BIBLIOGRAFIE

1. Ru EL, Etchegoin P, Principles of Surface-Enhanced Raman Spectroscopy: and Related Plasmonic Effects. Elsevier, 2008
2. Gardiner DJ, Graves PR, Practical Raman Spectroscopy. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 1989
3. https://www.researchgate.net/publication/275274523_Evaluating_Lignocellulosic_Biomass_Its_Derivatives_and_Downstream_Products_with_Raman_Spectroscopy
4. Simion Astilean, Metode și Tehnici Moderne de Spectroscopie Optica-Spectroscopia IR și Raman, Casa Cartii de Stiinta, Cluj Napoca, 2002
5. Onuc Cozar, Teoria Grupurilor în Fizica Atomului și Moleculei, Litografia Universitatii Babes-Bolyai, Cluj Napoca, 1986
6. W. Demtroder, Laser Spectroscopy: Basic Concepts and Instrumentation, Springer, 1955
7. B. Schader, Infrared and Raman Spectroscopy-Methods and Applications, Wiley-VCH, 1998
8. T. Iliescu, Spectroscopie Optica Moleculara, Casa Cartii de Stiinta, Cluj Napoca, 2000
9. Jan Krajezewski, Karol Kolataj, Andrzej Kudelski, Plasmonic nanoparticles in chemical analysis, RSC Advances, 7, 17559-17576, 2017
10. [S. Cong, X. Liu, Y. Jiang, W. Zang, Z. Zhao, Surface Enhanced Raman Scattering Revealed by Interfacial Charge – Transfer Transitions, The Innovation 1, 100051, 3, 2020](#)
11. Milton Kerker, Dau-Sing Wang, H. Chew, Surface enhanced Raman scattering (SERS) by molecules adsorbed at spherical particles: errata, Applied Optics, 19, 4159-4174, 1980
12. Ricardo Aroca, Surface-Enhanced Vibrational Spectroscopy, John Wiley and Sons, 2006
13. Eric C. Le Ru, Pablo G. Etchegoin, Principles of Surface-Enhanced Raman Spectroscopy and related plasmonic effects, Elsevier, 2009
14. Ferraro, J.R., K. Nakamoto, and C.W. Brown, *Chapter 1 - Basic Theory*, in *Introductory Raman Spectroscopy (Second Edition)*, Editors, Academic Press: San Diego. p. 1-94, 2003
15. Avram, L., et al., *SERS-Based Liquid Biopsy of Gastrointestinal Tumors Using a Portable Raman Device Operating in a Clinical Environment*. **9**(1): p. 212, 2020
16. Moisoiu, V., et al., *Breast Cancer Diagnosis by Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) of Urine*. Applied Sciences, **9**(4): p. 806, 2019

17. Leopold N., Lendl B., A New Method for Fast Preparation of Highly Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) Active Silver Colloids at Room Temperature by Reduction of Silver Nitrate with Hydroxylamine Hydrochloride, *J. Phys. Chem. B.*, 107(24): 5723–5727, 2003
18. P.C. Lee, D. Meisel, Adsorption and surface-enhanced Raman of dyes on silver and gold sols, *J. Phys. Chem.*, 86, 2291-2295, 1982
19. Kock, R., Delvoux, B., Sigmund, M., & Greiling, H. A comparative study of the concentrations of hypoxanthine, xanthine, uric acid and allantoin in the peripheral blood of normals and patients with acute myocardial infarction and other ischaemic diseases. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 32(11), 837-842, 1994
20. Shi Zheng, Liu Jian, Shentu Jian-zhong, & Wang Jian-ping. Quantification of uric acid, xanthine and hypoxanthine in human serum by HPLC. *Chinese Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 18(5), 532–536, 2013
21. Cooper, N., Khosravan, R., Erdmann, C., Fiene, J., & Lee, J. W. Quantification of uric acid, xanthine and hypoxanthine in human serum by HPLC for pharmacodynamic studies. *Journal of Chromatography B*, 837(1–2), 1–10, 2006
22. Boulieu, R., Bory, C., Baltassat, P., & Gonnet, C. A high-performance liquid chromatographic method for the determination of hypoxanthine, xanthine, uric acid and allantoin in serum. *Journal of Chromatography*, 233, 131–140, 1982

Anexa 2

DECLARAȚIE PE PROPRIE RĂSPUNDERE

Subsemnatul, Hada Giulia Roberta, declar că Lucrarea de licență/diplomă/disertație pe care o voi prezenta în cadrul examenului de finalizare a studiilor la Facultatea de Fizică, din cadrul Universității Babeș-Bolyai, în sesiunea Iulie 2025, sub îndrumarea lui Leopold Nicolae, 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,

26.06.2025

Nume,

Hada Giulia Roberta

Semnătură

