



**Facultatea de Fizica  
Universitatea Babeș-Bolyai**

**Rezumatul Tezei Doctorale**

Obținerea de noi nanoparticule  
plasmonice și de molecule fotoactive  
pentru bioimagistica și terapia  
cancerului

**Sanda Cosmina Boca**

**Coordonator Științific  
Prof. Dr. Simion Astilean**

**CLUJ-NAPOCA  
2011**

## Cuprins

Introducere.....	3
CAPITOLUL 1.....	4
1.1 Strategii utilizate in diagnosticul si tratamentul cancerului .....	4
1.1.1 Metode conventionale utilizate in diagnosticul si tratamentul cancerului.....	4
1.1.2 Metode neconventionale de tratament al cancerului utilizate in aceasta teza .....	4
1.2 Nanoparticulele de aur si proprietatile acestora .....	5
1.2.1 Absorbția si imprastierea plasmonica a nanoparticulelor de aur .....	5
1.2.2 Amplificarea campului electromagnetic in vecinatatea nanoparticulelor de aur.....	6
1.2.3 Aplicatii ale nanoparticulelor de aur plasmonice in senzoriala, imagistica si detectie SERS.....	6
CAPITOLUL 2.....	7
2.1 Sinteza de nanosfere de aur si conjugarea acestora cu biopolimerul chitosan .....	7
2.1.1 Sinteza de nanoparticule sferice si biofuncționalizarea acestora cu chitosan.....	7
2.1.2 Caracterizarea nanosferelor de aur invelite in chitosan.....	7
2.2 Sinteza de nanoflori de aur si biofuncționalizarea acestora cu mPEG-SH .....	8
2.2.1 Sinteza nanoflorilor de aur.....	8
2.2.2 Caracterizarea morfologica a nanoflorilor de aur.....	8
2.2.3 Caracterizarea spectroscopica a nanoflorilor de aur.....	8
2.3 Sinteza de nanobastonase de aur, detoxifierea si biocompatibilizarea acestora cu mPEG- SH.....	10
2.3.1 Sinteza si PEGylarea nanobastonaselor de aur .....	10
2.3.2 Caracterizarea nanobastonaselor de aur invelite in mPEG-SH .....	10
CAPITOLUL 3.....	11
3.1 Testarea interactiunii ADN-nanoparticule de aur prin detectie spectroscopica colorimetrica.....	11
3.1.1 Prepararea conjugatelor de ADN-nanoparticule de aur.....	11
3.1.2 Detectia spectroscopica a interactiunii AND-nanoparticule de aur prin teste colorimetrice.....	12
3.2 Nanosfere de aur pentru detectie spectroscopica Raman amplificata de suprafata (SERS) .....	13
CAPITOLUL 4.....	16
4.1 Nanoflori codate cu coloranti ca si markeri SERS.....	16
4.1.1 Prepararea markerilor SERS.....	16
4.1.2 Masuratori de stabilitate a nanoparticulelor codate SERS.....	16
4.1.3 Nanoflori de aur codate cu coloranti ca si markeri SERS.....	17
4.1.4 Detectie SERS intracelulara utilizand nanoparticulelele de aur codate SERS.....	18
CAPITOLUL 5.....	19
5.1 Studii de internalizare a nanoparticulelor de aur si transport celular .....	19
5.2 Studii de viabilitate celulara in prezenta nanoparticulelor.....	19
CAPITOLUL 6.....	22
6.1 Terapia fototermica a celulelor tumorale utilizand nanoparticule de metal nobil .....	22
6.2 Terapia fotodinamica a celulelor tumorale utilizand complexi de Ru(II) decorati cu TEG.....	24
Concluzii .....	26
Referinte .....	27

## Introducere

Scopul principal al tezei de fata este de a obtine conjugate de nanoparticule de aur- (bio)polimeri ce pot servi detectiei intracelulare si sunt capabile sa asiste in terapia cancerului prin incalzire plasmonica. Primul capitol prezinta o scurta examinare a literaturii stiintifice cu privire la aplicatiile biomedicale ale nanotehnologiei. Este prezentata interactiunea nanoparticulelor cu celulele vii, urmata de descrierea strategiilor curente utilizate in diagnosticul si tratamentul cancerului in general, cu implicarea nanoparticulelor de metal nobil in particular.

In cel de-al doilea capitol sunt detaliate metodele folosite pentru sinteza nanoparticulelor de aur de forme distincte (sfere, flori, basonase) si procedurile utilizate pentru biocompatibilizarea acestora cu (bio)polimeri (chitosan si metoxi-poli(etilen) glicol tiolat (mPEG-SH)). Sunt investigate proprietatile optice, morfologice si spectroscopice ale particulelor utilizand o serie de tehnici experimentale: spectroscopie optica, microscopie electronica si spectroscopie Raman amplificata de suprafata (SERS).

Capitolul trei studiaza interactiunea dintre nanoparticulele de aur si o serie de oligonucleotide mono si dublu-catenare prin detectie colorimetrica bazata pe rezonante plasmonice de suprafata localizate (LSPR). In cea de-a doua parte a capitolului este demonstrata aplicabilitatea nanoparticulelor de aur auto-asamblate pe substrat solide pentru detectie Raman amplificata de suprafata (SERS) utilizandu-se ca molecula test p-aminotiofenolul (p-ATP).

In cel de-al patrulea capitol sunt utilizate nanoparticule coloidale individuale (nanobastonase si "nanoflora" de aur) ca si substrat SERS si transportori pentru diferite molecule reporteri Raman. Este demonstrata obtinerea de markeri activi SERS, prezentand inalta stabilitate si detectabilitate in interiorul unei linii de celule epiteliale retinale umane. In capitolul cinci este evaluat *in vitro* impactul biologic al nanoparticulelor preparate pe o serie de celule sanatoase si cancerigene, in functie de chimia suprafetei nanoparticulelor.

Capitolul sase reprezinta obiectivul cheie al tezei de fata: demonstrarea aplicabilitatii nanoparticulelor preparate in tratamentul cancerului. Este demonstrata aplicabilitatea nanobastonaselor PEG-ilate si a nanotriunghiurilor de argint functionalizate cu Chitosan (Chit-AgNTs) in tratamentul tumorilor prin incalzire asistata plasmonic. In paralel este demonstrata aplicabilitatea unor noi specii de complexi de Ru(II) ca si molecule fotoactive in tratamentul gliomelor prin terapie fotodinamica prin absorbtie de unul si doi fotoni. In ultima parte sunt prezentate concluziile si o selectie de apendice.

**Cuvinte cheie:** nanoparticule de metal nobil, plasmoni de suprafata, terapia cancerului

## **Capitolul 1**

### **1.1 Strategii utilizate in diagnosticul si tratamentul cancerului**

#### **1.1.1. Metode conventionale utilizate in diagnosticul si tratamentul cancerului**

Cancerul este suspectat pe baza unor simptome, iar ulterior in urma unor examinari fizice. Pentru a confirma prezenta cancerului sunt necesare teste mai detaliate (teste clinice de diagnostic). Diagnosticul conventional al cancerului depinde de patologia celulara (citopatologia) cum este biopsia tesutului, endoscopia si imagistica, metode ce investigheaza morfologia celulara microscopica [1]. Dintre acestea, cea mai precisa este biopsia, implicand prelevarea unei probe de tesut din regiunea tumorala sau uneori a intregii tumori, urmata de examinarea citopatologica a probei. Alte metode utilizate in diagnosticul cancerului sunt endoscopia, razele X, tomografia computerizata (CT), ultrasonografia sau imagistica prin rezonanta magnetica (MRI). Tratamentul traditional al cancerului se bazeaza pe diferite tehnici cum sunt chirurgia, radiatia, terapia hormonala si mai recent chimioterapia, imunoterapia sau combinarea acestora [2].

#### **1.1.2. Metode neconventionale de tratament al cancerului utilizate in acesta teza**

##### **1.1.2.1 Terapia fotodinamica**

Terapia fotodinamica (PDT) este o metoda de tratament in doi pasi ce utilizeaza un fotosensibilizator endocitizat care, in urma stimulării cu lumina vizibila, produce oxigen singlet reactiv ( $^1O_2$ ) (reactie de tip II). Acest agent citotoxic este responsabil de inducerea unor alterari membranare ce duc in final la citoliza. Doua mecanisme aditionale sunt responsabile pentru distrugerea celulei prin terapie fotodinamica: distrugerea vasculaturii tumorale si inducerea unor reactii inflamatoare si imunologice antitumorale [3].

##### **1.1.2.2 Terapia fototermica asistata plasmonic**

Terapia fototermica (PTT) reprezinta o metoda noua de tratament al cancerului ce utilizeaza radiatie electromagnetica (de obicei din domeniul vizibil) si agenti de contrast injectati ca de exemplu anumite tipuri de coloranti slab emittori [4] ce convertesc fotoenergia in energie termica. Acesta incalzire determina lezarea celulelor cancerigene prin denaturare proteica, cauzand apoptoza sau necroza celulara. Modelul de baza al terapiei fototermice deriva in parte din terapia fotodinamica (PDT) [5]. Spre deosebire de PDT, PTT nu necesita prezenta oxigenului pentru a interactiona cu celulele vizate. PPT

este de asemenea capabila sa utilizeze radiatie de lungime de unda mai mare, mai slab energetica si drept urmare mai putin daunatoare celulelor sanatoase din jur.

### **1.1.2.3 Nanoparticulele de metal nobil in imagistica si terapia cancer asistata plasmonic**

In terapia fototermica temperatura tesutului iradiat poate deseori ajunge la 46°C, ducand la inactivarea proceselor celulare normale (apoptoza), in timp ce la peste 46°C, are loc o necroza extensiva. Hipertermia terapeutica in prezenta agentilor fototermici poate fi indusa fie prin aplicarea unui camp magnetic sau de radiofrecventa alternativ, sau prin iradiere laser, de obicei cu radiatie in domeniul infrarosu apropiat (NIR) [6]. Incalzirea nanoparticulelor de metal nobil indusa de catre radiatia electromagnetica in rezonanta cu banda plasmonica pare a fi cea mai eficienta intrucat, spre deosebire de incalzirea nanoparticulelor magnetice, necesita o cantitate mai mica de energie. In plus, banda plasmonica a nanoparticulelor de metal nobil poate fi ajustata din regiunea vizibila in infrarosu apropiat (820 nm) unde transmisia optica a tesuturilor este optima, permitand astfel aplicarea tratamentului in profunzime (~1 cm). Cateva exemple ce utilizeaza aceasta procedura terapeutica implica folosirea nanobastonaselor de aur sau a altor nanoparticule de metal nobil anizotrope, de obicei invelite intr-un strat polimeric biocompatibil.

## **1.2 Nanoparticulele de aur si proprietatile acestora**

Nanoparticulele de aur sunt definite in general ca si particule avand dimensiuni intre 1-100 nm, de obicei fiind suspendate intr-un fluid (aur coloidal). Cunoscuta ca si *nanogold*, suspensia de aur coloidal prezinta de obicei culoarea rosu burgund (pentru nanoparticule de aur sferice mai mici de 100 nm), sau o culoare galben-brun (pentru nanoparticule mai mari) [7].

### **1.2.1 Absorbția si imprastierea plasmonica a nanoparticulelor de aur**

Datorita dimensiunii reduse la scala nanometrica, nanoparticulele de metal nobil (NPs) prezinta proprietati fizice si chimice foarte interesante [8]. Cel mai interesant fenomen intalnit la aceste nanoparticule sunt rezonantele electromagnetice datorate oscilatiei colective a electronilor din banda de conductie, induse de catre campul electromagnetic (ex. laser), numite *rezonante plasmonice*. Aceste rezonante plasmonice sunt responsabile de o puternica absorbtie si imprastiere selectiva a luminii de catre nanoparticule.

### **1.2.2. Amplificarea campului electromagnetic in vecinatatea nanoparticulelor de aur**

O alta consecinta importanta a excitarii plasmonice este crearea unor campuri electromagnetice puternice la suprafata nanoparticulelor, fenomen utilizat in amplificarea senzitivitatii spectroscopiei Raman in detectia (bio)moleculara. A fost demonstrat faptul ca imprastierea Raman cauzata de vibratiile moleculare (in general foarte slaba) este amplificata cu cateva ordine de marime in prezenta metalelor (cupru, argint, aur) avand rugozitati nanometrice. Acest fenomen a dat nastere unei noi tehnici de analiza, si anume spectroscopia prin imprastiere Raman amplificata de suprafata (SERS), utilizata pentru determinarea amprentelor chimice ale moleculelor adsorbite pe sau in vecinatatea substratelor metalice [9]. O alta metoda recunoscuta pentru identificarea moleculelor din apropierea suprafetelor nanostructurilor metalice este fluorescenta amplificata de suprafete sau metal-amplificata (MEF) [10].

### **1.2.3 Aplicatii ale nanoparticulelor de aur plasmonice in senzoristica, imagistica si detectie SERS**

Benzile SPR intense ale nanoparticulelor metalice au permis implementarea acestora in numeroase domenii. De exemplu, senzitivitatea benzilor SPR la mediul local din vecinatatea particulelor a determinat aplicabilitatea acestor nanoparticule metalice ca senzori colorimetrici pentru o serie de analiti cum sunt ADN-ul, ioni ai metalelor, anticorpi, biomolecule sau alte bioconjugate [11]. Cu toate ca a fost mai putin exploatarea decat probele colorimetrice bazate pe raspunsul plasmonic al NPs descrise mai sus, biosenzoristica bazata pe proprietatile de imprastiere ale nanoparticulelor plasmonice este privita ca si o metoda de analiza potential mai puternica. Un tip de tehnica ce exploateaza proprietatile optice de imprastiere ale nanoparticulelor de metal nobil este microscopia optica in camp intunecat. Permitand vizualizarea nanoparticulelor individuale [12], microscopia in camp intunecat a fost folosita extensiv in imagistica si detectia nanoparticulelor de aur in interiorul celulelor vii, sau in combinatie cu metoda LSPR pentru a produce *biochip-uri* pentru detectie analitica *bazate pe imprastierea luminii*.

## Capitolul 2

### 2.1 Sinteza de nanosfere de aur si conjugarea acestora cu biopolimerul chitosan

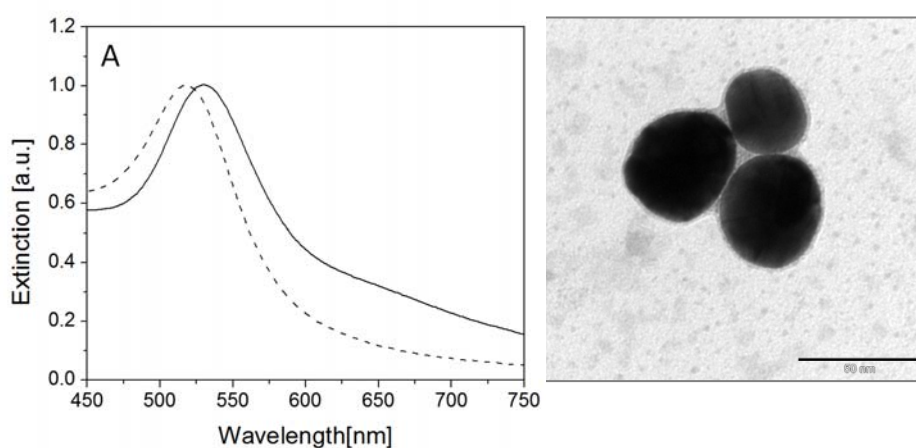
#### 2.1.1 Sinteza de nanoparticule de aur sferice si biofunctionalizarea acestora cu chitosan

Nanoparticulele de aur de forma sferica au fost sintetizate printr-o metoda ecologica ce utilizeaza L- acidul ascorbic ca si agent reductor al ionilor de aur la temperatura camerei. Pentru a creste stabilitatea AuNPs, am utilizat biopolimerul chitosan, cunoscut pentru capacitatea sa in procesele de stabilizare a nanoparticulelor de aur ce implica hindranta sterica in locul stabilizarii electrostatice conventionale [13].

#### 2.1.2 Caracterizarea nanosferelor de aur invelite in chitosan

##### 2.1.2.1 Caracterizarea morfologica si spectroscopica

Un prim indiciu al formarii nanoparticulelor de aur invelite in chitosan a fost culoarea rosietica a solutiei coloidale, cauzata de excitarea rezonantelor plasmonice ale nanoparticulelor si a fost verificata prin masuratori spectroscopice de extinctie UV-Vis. Spectrul de extinctie al AuNPs invelite in chitosan este ilustrat in figura 2-1A (linie continua) si prezinta un maxim la 530 nm. In mod tipic, nanosferele de aur de 18 nm obtinute prin metoda reducerii cu citrat in solutie apoasa, prezinta o singura banda de extinctie in regiunea spectrala vizibila la 520 nm [14] (figura 2-1A linie punctata).



**Fig. 2-1** A) Spectrul de extinctie Vis al nanoparticulelor de aur de 50 nm invelite in chitosan (linie continua) comparat cu cel al nanosferelor de aur de 20 nm. B) Imaginea TEM a nanoparticulelor de aur de aproximativ 50 nm, invelite intr-un strat polimeric de chitosan de 3 nm. Scala 50 nm.

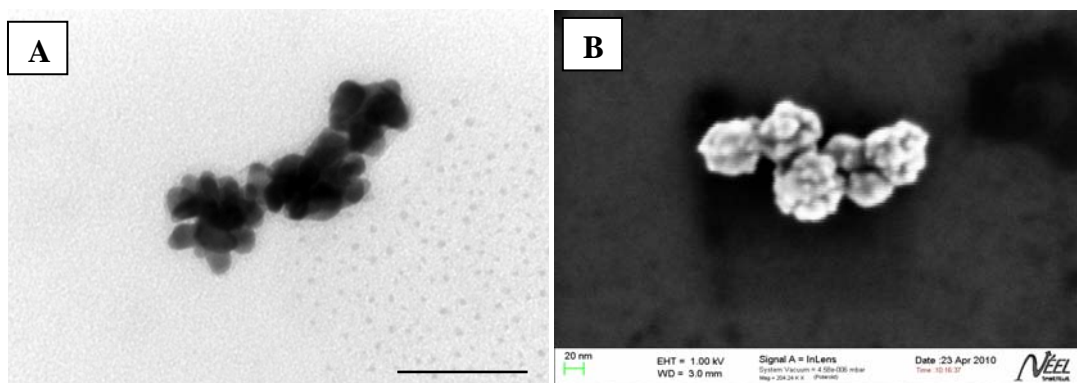
## 2.2 Sinteza de nanoflori de aur si biofunctionalizarea acestora cu mPEG-SH

### 2.2.1 Sinteza nanoflorilor de aur

Ajustand parametrii sintezei si pastrand aceiasi reactanti (L- acidul ascorbic, avand rol de reductor al sarii de aur si acidul tetracloroauric ( $\text{HAuCl}_4$ ) utilizat ca si initiator in formarea nanoparticulelor), am fabricat nanoparticule de forma anizotropa, asemanatoare unor flori.

### 2.2.2 Caracterizarea morfologica a nanoflorilor de aur

Morfologia si distributia de marimi a nanoparticulelor au fost determinate prin microscopie electronica de transmisie (TEM) si microscopie electronica de baleiaj (SEM). Figura 2-2A ilustreaza imaginile TEM ale nanoparticulelor asemanatoare unor flori. Imaginea SEM in figura 2-2B ilustreaza clar structura morfologica a nanoparticulelor. Observam ca acestea constau dintr-un miez solid de aproximativ 40 nm cu multe protuberante ("petale") scurte, neregulate, avand dimensiuni medii de 10 nm.



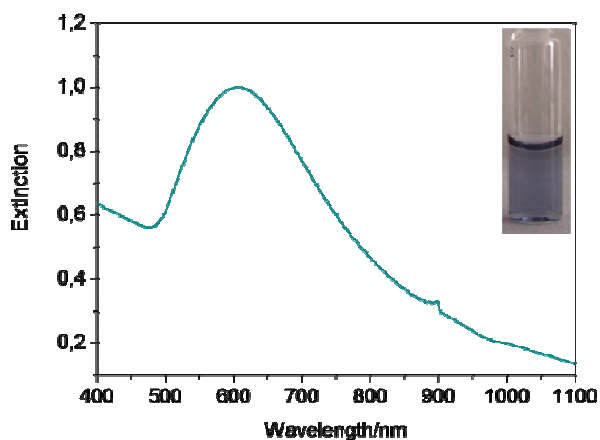
**Fig.2-2** Imagini TEM (A) si SEM (B) ale nanoparticulelor de aur de forma florala. Scala 50 nm si respectiv 20 nm.

### 2.2.3 Caracterizarea spectroscopica a nanoflorilor de aur

Proprietatile optice ale nanoparticulelor de aur de forma florala au fost investigate prin masuratori spectroscopice de extinctie Vis-NIR la sfarsitul procesului de sinteza. Spectrul de extinctie al solutiei coloidale albastre este ilustrat in figura 2-3. Banda plasmonica a nanoparticulelor situata la 605 nm este relativ larga si asimetrica inspre regiunea spectrala NIR, fiind consecventa cu exemple anterioare din literatura [15]. Nanoparticulele sferice de 50 nm au banda LSPR la 530 nm in timp ce nanoparticulele stelare cu varfuri de 30 nm prezinta de obicei doua benzi, una in jurul valorii de 500 nm



si o alta banda situata la 700 nm. Pozitia spectrala a benzii LSPR a nanoflorilor de aur se extinde intre cea a particulelor sferice si a celor stelare, astfel acest tip de particule pot fi privite ca si hibride ale nanoparticulelor sferice si stelare.



**Fig.2-3** Spectrul de extinctie al nanoflorilor de aur (GNFs) in solutie apoasa normalat la unitate.

#### **2.2.4 Conjugarea nanoflorilor de aur cu Poli(etilen) glicol**

Majoritatea coloizilor preparati prin reducerea acidului tetracloroauric in solutie apoasa sunt stabili datorita fortelor ionice repulsive. Cu toate acestea, o astfel de stabilizare electrostatica nu este intotdeauna suficient de eficienta, necesitand adaugarea unor specii protective suplimentare solutiei coloidale. In modelul utilizat de noi, am ales polimerul Poli(etilen) glicol tiolat (mPEG-SH) pentru a imbunatati stabilitatea nanoparticulelor.

Spectrele de extinctie ale nanoflorilor de aur ca atare (linie punctata) si PEGylate (linie continua) sunt ilustrate in figura 2-4A. A fost observata o deplasare cu 11 nm inspre lungimi de unda mari (deplasare spre rosu) insotita de o largire usoara a benzii plasmonice pentru nanoparticulele PEGylate. Acesta deplasare a benzii poate fi explicata printr-o crestere a indicelui de refractie din jurul nanoparticulelor in timpul atasarii lanturilor polimerice de PEG de suprafata acestora. Invelirea efectiva a nanoparticulelor cu PEG a fost confirmata de imaginile TEM (figura 2-4B), ce ilustreaza un strat polimeric in jurul particulelor avand o grosime de aproximativ 5 nm. Am testat stabilitatea nanoflorilor de aur invelite de stratul polimeric masurand spectre de extinctie ale nanoparticulelor in solutie salina, ce imita compozitia chimica a fluidelor biologice. In urma

masuratorilor efectuate am demonstrat stabilitatea nanoparticulelor PEGylate, proprietate importanta ce permite utilizarea acestora in aplicatii intracelulare.

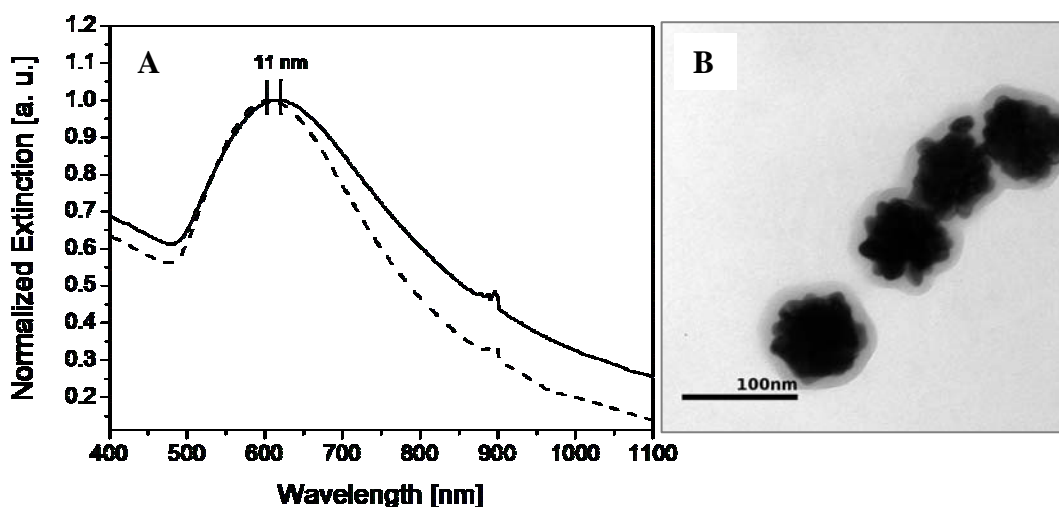


Fig.2-4 A) Spectrul de extinctie normalat la unitate al nanoparticulelor de aur ca atare (linie punctata) si invelite in PEG (linie continua) in solutie apoasa. B) Imagini TEM ale catorva nanoflori invelite intr-un strat de 5 nm de polimer.

## 2.3 Sinteza de nanobastonase de aur, detoxifierea si biocompatibilizarea acestora cu mPEG-SH

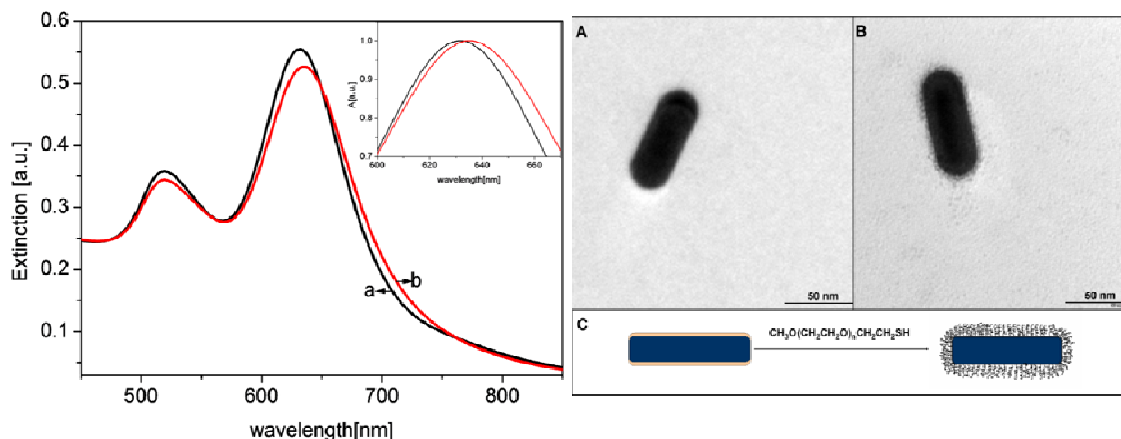
### 2.3.1 Sinteza si PEGylarea nanobastonaselor de aur

Exista o serie de metode de sinteza pentru a prepara nanobastonase metalice cum sunt metode electrochimice, fotochimice, prin incalzire cu microunde sau cele mediate de germeni de crestere. In acesta teza, am utilizat metoda ce implica germeni de crestere la temperatura camerei dezvoltata de Jana *et al* [16] pentru a sintetiza nanobastonase de aur cu rapoarte de aspect (lungime/grosime) de pana la 3.7. Pentru PEGylarea nanobastonaselor de aur, a fost mai intai preparata o solutie de mPEG-SH in ddH<sub>2</sub>O. Cativa  $\mu$ L de solutie polimerica au fost adaugati unui volum prestabilit de nanobastonase de aur coloidale. Proba a fost mentinuta peste noapte la temperatura camerei pentru a permite legarea eficienta a polimerului de suprafata nanoparticulelor, ulterior fiind supusa unui nou proces de centrifugare. Nanobastonasele au fost resuspendate in ddH<sub>2</sub>O, ramanand stabile timp de cateva luni la temperatura camerei.

### 2.3.2 Caracterizarea nanobastonaselor de aur invelite in mPEG-SH

Detoxifierea și funcționalizarea nanobastonaselor a fost monitorizată utilizând trei tehnici experimentale diferite: extincție optică, imagistică TEM și SERS. Pentru funcționalizarea nanobastonaselor am selectat particulele cu cel mai mic raport de aspect (de 2.5- 80 nm/32 nm), întrucât această dimensiune (<100 nm) este apropiată de dimensiunea biomacromoleculilor, contribuind astfel la o mai bună internalizare intracelulară a acestora. Spectrul de extincție al nanobastonaselor prezintă două benzi, situate la lungimile de undă de 519 nm și 632 nm pentru modurile plasmonice transversal și respectiv longitudinal. Adăugarea polimerului mPEG-SH în soluția de nanobastonase nu a afectat major proprietățile optice ale acestora. Totuși, a fost observată o deplasare cu 3 nm spre roșu pentru particulele PEGylate, însoțită de o scădere ușoară a intensității extincției (figura 2-5A).

Prezența polimerului în jurul particulelor a fost confirmată de imaginile TEM. Figura 2-5B prezintă un nanobastonas selectat din soluția inițială și o particulă PEGylată pentru comparație. Pentru particulele învelite, polimerul apare în mod clar ca și un strat transparent uniform de aproximativ 4 nm în jurul nanobastonasului [17].



**Fig.2-5** Spectrele de extincție UV-Vis-NIR ale nanobastonaselor cu raport de aspect 2.5: (a) GNRs ca atare; (b) GNRs conjugate cu mPEG-SH.

## Capitolul 3

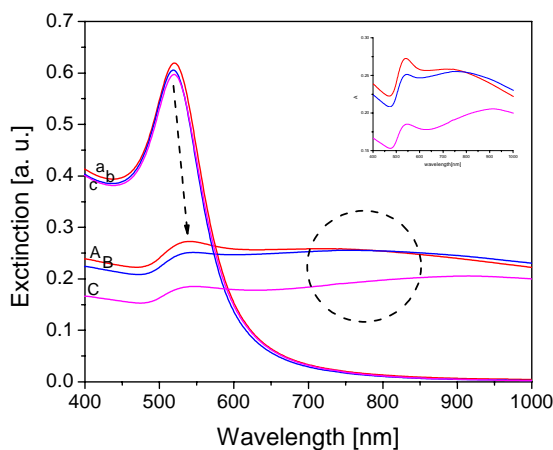
### 3.1 Testarea interacțiunii ADN-nanoparticule de aur prin detecție spectroscopică colorimetrică

#### 3.1.1 Prepararea conjugatelor ADN-nanoparticule de aur

Nanoparticulele de aur (Au) de aproximativ 20 nm au fost sintetizate prin metoda Turkevich. Stabilizarea nanoparticulelor de aur a fost realizata prin adaugarea unei solutii de ssDNA cu urmatoarea secventa: 5'-GGA CTC GAG TTA CTC TTT TAT GTT CCA CTTC-3' in solutia coloidala de aur. Probele au fost pastrate timp de 10 minute la temperatura camerei. Pentru testele de agregare, a fost introdusa o solutie de NaCl in cuvele continand amestecurile de coloizi de aur si oligomeri. Solutiile preparate au fost pastrate la temperatura camerei timp de trei zile, ulterior masurandu-se spectrele de absorbtie ale acestora.

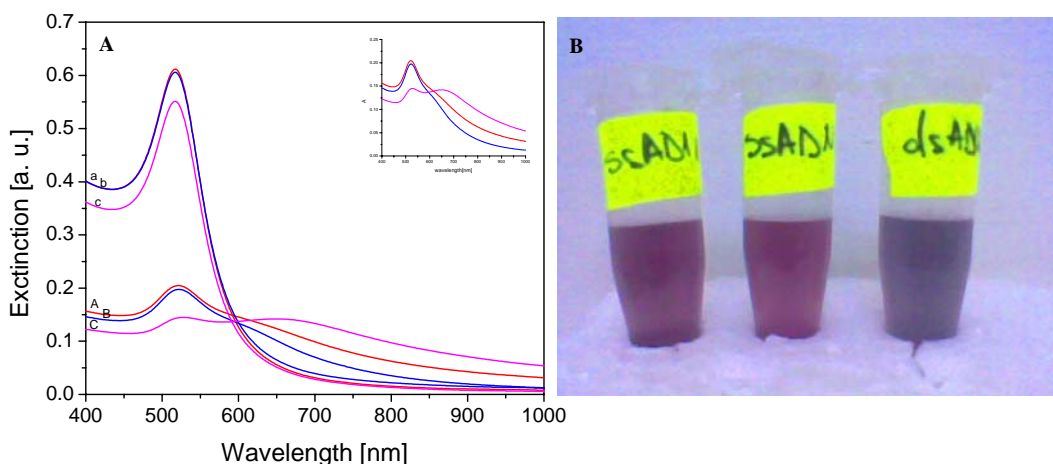
### 3.1.2 Detectia spectroscopica a interactiunii ADN-nanoparticule de aur prin teste colorimetrice

In primul experiment s-a amestecat solutia coloidala cu ADN-ul mono si dublu catenar. Amestecul obtinut s-a pastrat timp de 10 minute la temperatura camerei. Dupa aceasta perioada s-a adaugat solutia salina pentru a se testa stabilitatea nanoparticulelor. O prima observatie ochiometrica a fost modificarea culorii probelor din rosu in alblu, imediat dupa adaugarea solutiei de NaCl, indicand agregarea nanoparticulelor. Acest fapt a fost confirmat prin masuratori de extinctie UV-Vis.



**Fig.3-1** Spectre de extinctie ale coloizilor de aur incubati cu: a- ssDNA; A-ssDNA cu solutie de NaCl; b-ssDNAc; B- ssDNAc cu NaCl; c- dsDNA; C- dsDNA cu NaCl; solutiile au fost pastrate timp de 10 minute.

Tinand cont de rezultatele obtinute in experimentul anterior, in cel de-al doilea experiment am modificat timpul de incubare al solutiilor de la zece minute la trei zile, mentinand restul parametrilor experimentali identici. S-au obtinut rezultate diferite pentru esantioanele incubate cu ssDNA [18].



**Fig.3-2** A) Spectre de absorbtie ale coloizilor de aur incubati cu: a ssDNA; A-ssDNA cu solutie de NaCl; b-ssDNAc; B- ssDNAc cu NaCl; c- dsDNA; C- dsDNA cu NaCl; solutiile au fost incubate timp de 3 zile B) Imagini fotografice ale amestecurilor de coloizi de aur cu (de la stanga la dreapta): ssDNA, ssDNAc si dsDNA dupa incubare cu solutie de NaCl.

In acest caz, solutia coloidala si-a mentinut culoarea rosie specifica dupa adaugarea sarii. Aceasta a demonstrat o stabilizare eficienta a probelor prin atasarea secventelor de ADN monocatenar de suprafata nanoparticulelor de aur. Proba incubata cu dsDNA si-a schimbat culoarea din rosu in albastru dupa adaugarea sarii, denotand stabilizarea insuficienta a particulelor.

## 3.2 Nanosfere de aur pentru detectie spectroscopica Raman amplificata de suprafata (SERS)

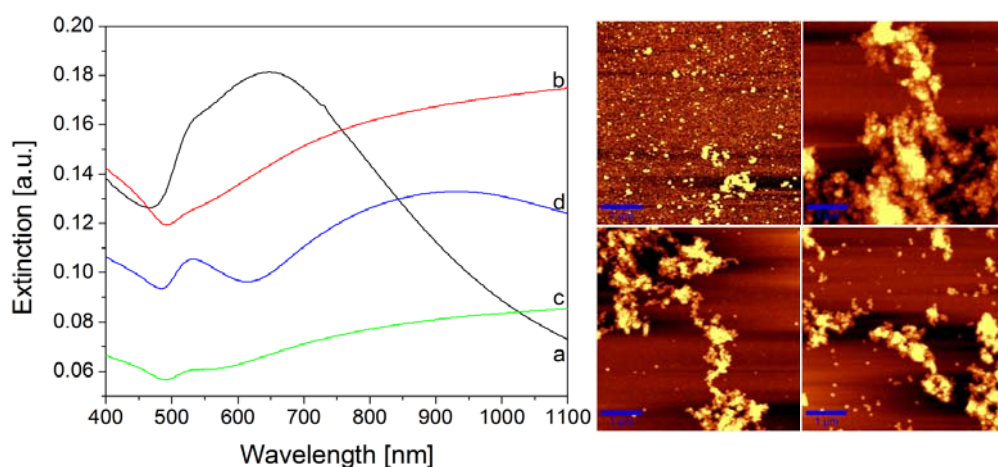
### 3.2.1. Prepararea probelor

Nanoparticulele de aur coloidal de 18 nm au fost sintetizate prin reducerea apoasa a  $\text{HAuCl}_4$  cu trisodiu citrat prin metoda Turkevich. Apoi, nanoparticulele au fost imobilizate pe placute de sticla silanizata in vederea fabricarii de substrate active SERS.

### 3.2.2 Caracterizarea optica si morfologica a substratelor

Nanoparticulele de aur (Au) si clusterii formati s-au adsorbit pe placutele de sticla prin intermediul interactiunilor electrostatice dintre gruparile amino incarcate pozitiv ale moleculelor APS si anionii de citrat prezenti pe suprafata nanoparticulelor. Figura 3-3A

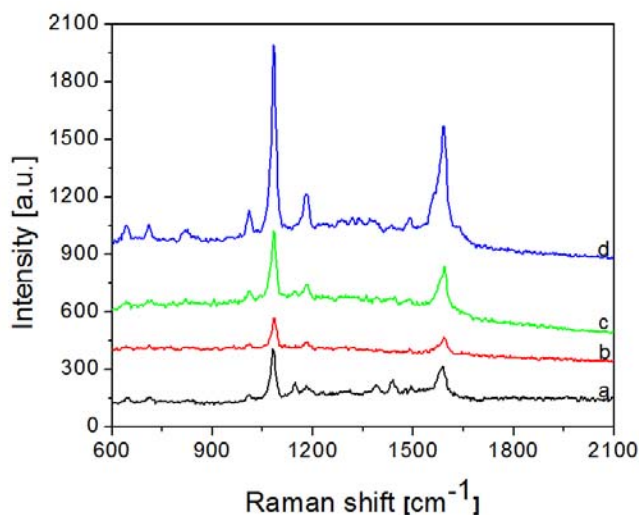
ilustreaza spectrele optice de absorbtie ale substratelor SERS. In timp ce solutia coloidala de nanoparticule prezinta o singura banda plasmonica atribuita particulelor izolate, substratele nanostructurate preparate prezinta in plus o banda larga, la lungimi de unda mai mari, corespunzatoare modurilor plasmonice colective excitate la nivelul agregatelor de nanoparticule. Clusterizarea coloizilor de aur in structuri de agregate, ulterior adsorbite pe substratele de sticla a fost de asemenea verificata prin investigatii AFM. Dupa cum se observa in figura 3-3B nanoparticulele de Au de 18 nm sunt asamblate intr-un monostrat uniform, in timp ce in restul imaginilor se observa o topografie insulara.



**Fig.3-3** spectre de absorbtie UV-Vis ale Au NPs auto-asamblate pe substrata de sticla: nanoparticule de (a) 18 nm, (b) 30 nm, (c) 40 nm si (d) 75 nm pe substrata de sticla silanizate. Imagini AFM ale Au NPs auto-asamblate pe substrata de sticla: (A) 18 nm, (B) 30 nm, (C) 40 nm si (D) 75 nm.

### 3.2.3 Probe coloidale auto-asamblate ca si substrata SERS utilizand molecula p-ATP

S-au inregistrat spectrele optice ale probelor incubate cu p-ATP. Adsorbtiile moleculelor de p-ATP pe filmele de NPs agregate a cauzat modificari spectrale negliabile. Figura 3-4 prezinta un set reprezentativ de spectre SERS ale moleculelor de p-aminotiofenol adsorbite pe filme de nanoparticule de diferite topografii. Intensitatea celor doua moduri vibrationale  $\nu_1$  dominante ale moleculelor de p-ATP situate la numerele de unda de 1078 si respectiv 1588  $\text{cm}^{-1}$  creste simultan cu cresterea dimensiunii NPs formatoare de agregate. S-au colectat serii de spectre SERS din diferite puncte ale fiecarei probe, pozitiile benzilor si intensitatile acestora fiind reproductibile.



**Fig.3-4** Spectre SERS ale moleculelor de p-aminotifenol adsorbite pe probe de AuNPs de diferite dimensiuni: (a) 18 nm, (b) 30 nm, (c) 40 nm si (d) 75 nm.

In urma analizei imaginilor AFM se observa faptul ca atat morfologiile agregatelor cat si numarul de nanoparticule/ agregat sunt similare pentru cele patru probe masurate. Acest fapt implica o scadere a densitatii de nanoparticule pe substrat printr-un factor de aproximativ  $(D_1/D_2)^2$  intre doua probe obtinute prin utilizarea de NPs cu diametre  $D_1$  si respectiv  $D_2$  (daca  $D_1 < D_2$ ). Numarul de molecule per nanoparticula este proportional cu aria suprafetei nanoparticulei si creste printr-un factor de  $(D_2/D_1)^2$  de la proba  $D_1$  la proba  $D_2$ . Drept urmare ambele probe contin aproximativ acelasi numar de molecule pe unitatea de arie a substratului. Recent s-a demonstrat ca semnalele SERS masurate sunt dominate de semnalul unui mic procent ( $<1\%$ ) din moleculele excitate, cel mai probabil aceste molecule fiind localizate in asa numitele *hot-spot*-uri formate in interstitiile dintre NPs. In cazul probelor masurate aceste hot-spot-uri sunt distribuite aleator in structura agregatelor coloidale. Datorita morfologiei similare a agregatelor, este de asteptat faptul ca aceste hot-spot-uri sa aduca o contributie similara spectrelor SERS masurate. In concluzie, amplificari diferite ale semnalului obtinute de la probe diferite studiate pot fi atribuite doar efectelor de dimensiune intrinseci, legate de factori diferiti de amplificare a campului EM pe NPs de diferite dimensiuni [19].

## Capitolul 4

### 4.1 Nanoflori codate cu coloranti ca si markeri SERS

#### 4.1.1 Prepararea markerilor SERS

Nanoparticulele codate SERS s-au realizat folosindu-se ca si molecule reporteri Raman malachitul verde oxalat (MG) si fucsina bazica (BF). Procesul de preparare a markerilor SERS este schematizat in figura 4-1. Concentratia de molecule reporteri Raman si timpul de legare a nanoparticulelor au fost stabilite cu atentie astfel incat sa fie atinsa o densitate suficienta de molecule reporteri Raman/particula fara a cauza o agregare severa a nanoparticulelor.

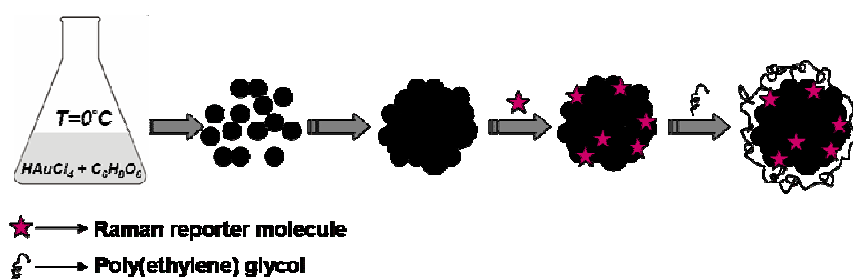
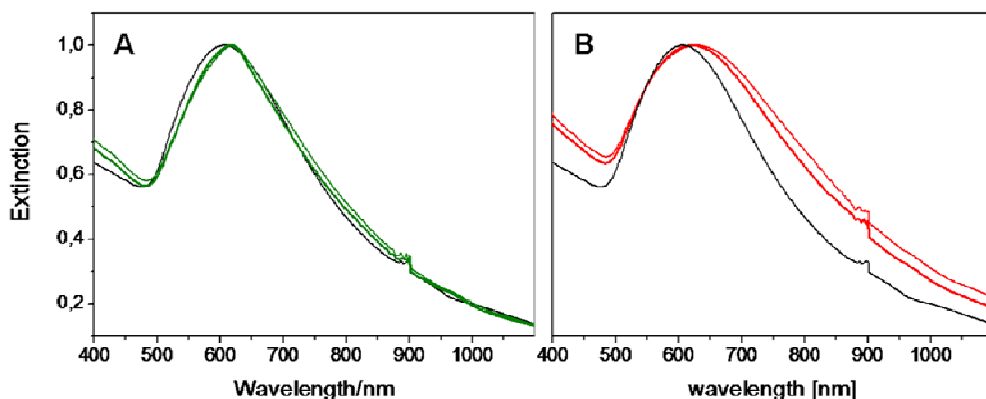


Fig.4-1 Reprezentare a procesului de preparare a markerilor SERS

#### 4.1.2 Masuratori de stabilitate a nanoparticulelor codate SERS

Mai intai s-au comparat spectrele optice de extinctie ale nanoparticulelor de aur in solutie apoasa inregistrate inainte si dupa adaugarea moleculelor reporter. In figura 4-2A cele doua spectre arata aproximativ identic. O deplasare spre rosu cu cativa nm a rezonantelor plasmonice este observata pentru nanoparticulele marcate cu MG, fiind in acord cu o modificare locala a indicelui de refractie datorita interactiunii electrostatice dintre reporterii cationici si nanoparticulele incarcate negativ. S-a observat un efect mult mai pronuntat pentru nanoparticulele de aur marcate cu BF, a caror banda plasmonica a fost vizibil largita si deplasata spre rosu cu 15 nm dupa adaugarea moleculelor reporteri. Cu toate ca atat MG cat si BF poseda tranzitii electronice in aceasta regiune spectrala, benzile lor de absorbtie moleculara nu sunt detectabile la acesta concentratie scazuta (mai mica decat  $10^{-7}$  M), fiind practic mascate de banda de extinctie a nanoparticulelelor plasmonice de Au.

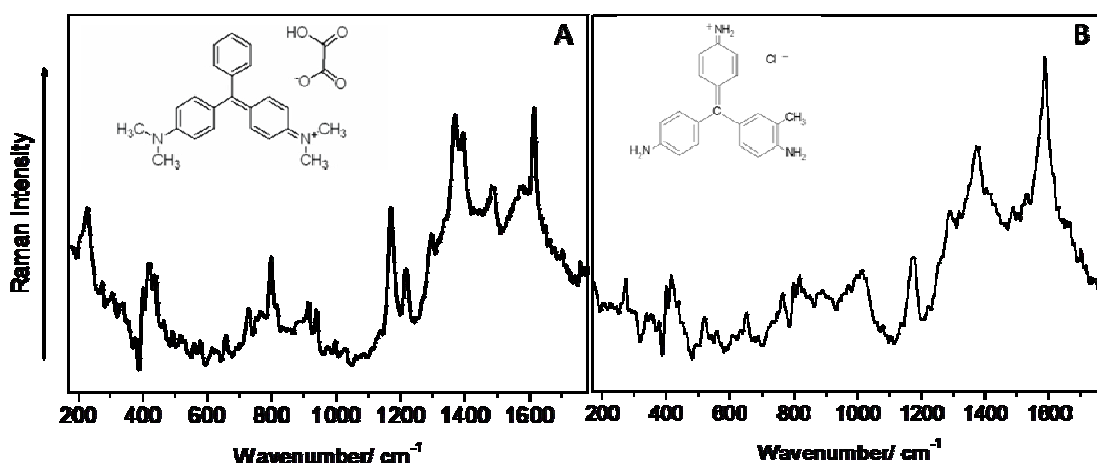




**Fig.4-2** Spectre de extinctie ale nanoflorilor de aur inregistrate in absenta (linii groase) si in prezenta (linii subtiri) solutiei de NaCl. Curbele negre reprezinta nanoparticulele ca atare, nefunctionalizate; curbele colorate (verde pentru MG-GNFs si rosu pentru BF-GNFs) reprezinta particule marcate.

### 4.1.3 Nanoparticule de aur codate cu coloranti ca si markeri SERS

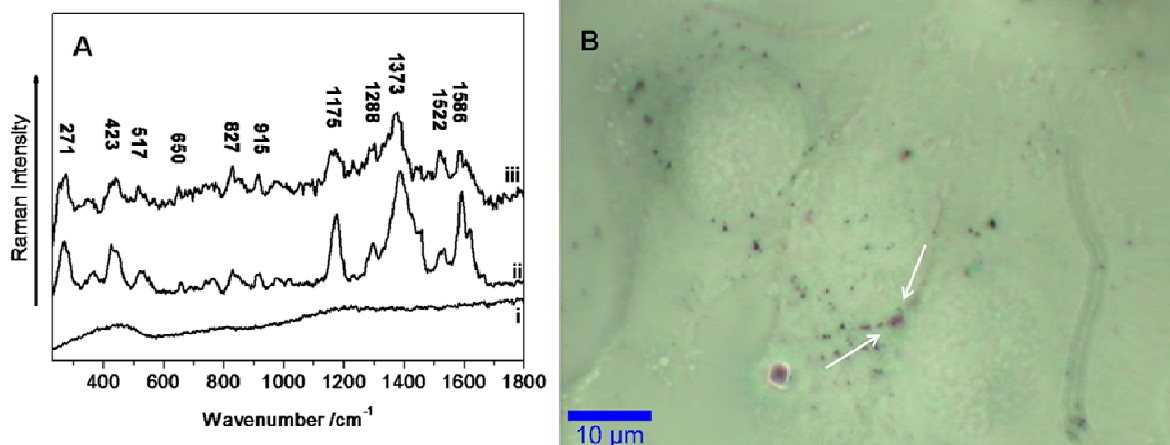
Aplicabilitatea SERS a nanoparticulelor de aur a fost investigata pentru doua tipuri de molecule cu afinitate pentru suprafata incarcata negativ a nanoparticulelor de aur, si anume malachit verde oxalat si fucsina bazica. Figurile 4-3A si 4-3B prezinta spectrele SERS ale nanoflorilor PEGylate marcate cu malachit verde (MG-GNFs) si respectiv fucsina bazica (BF-GNFs), inregistrate in solutie utilizand ca si radiatie excitatoare linia laser de 785 nm. Spectrele SERS prezinta benzi vibrationale distincte, caracteristice celor doua molecule.



**Fig.4-3** Spectrele SERS ale nanoflorilor de aur marcate cu malachite verde (A) si fucsina bazica (B) inregistrate in solutie utilizand ca si radiatie excitatoare linia laser de 785 nm.

#### 4.1.4 Detectie SERS intracelulara utilizand nanoparticule de aur codate SERS

Pentru a demonstra fiabilitatea markerilor SERS realizati, s-au incubat esantioane de celulele D407 in prezenta nanoparticulelor de aur PEGylate si marcate cu BF timp de 24 h. Figura 4-4A ilustreaza spectrul SERS al particulelor marcate ca atare, colectat in solutie apoasa, ca si referinta (spectrul ii) si spectrul nanoparticulelor marcate colectate din interiorul celulelor (marcate in imaginea optica in figura 4-4B). Nu s-a obtinut semnal Raman provenind de la celulele nemarcate sau din regiunile celulare in care nu s-au detectat particule (spectrul i). Aceste rezultate demonstreaza faptul ca nanoparticulele obtinute prezinta stabilitate, conservandu-si identitatea Raman *in vitro*. Aceste caracteristici confera acestui tip de markeri SERS aplicabilitate ca si agenti imagistici in interiorul organismelor vii [20].



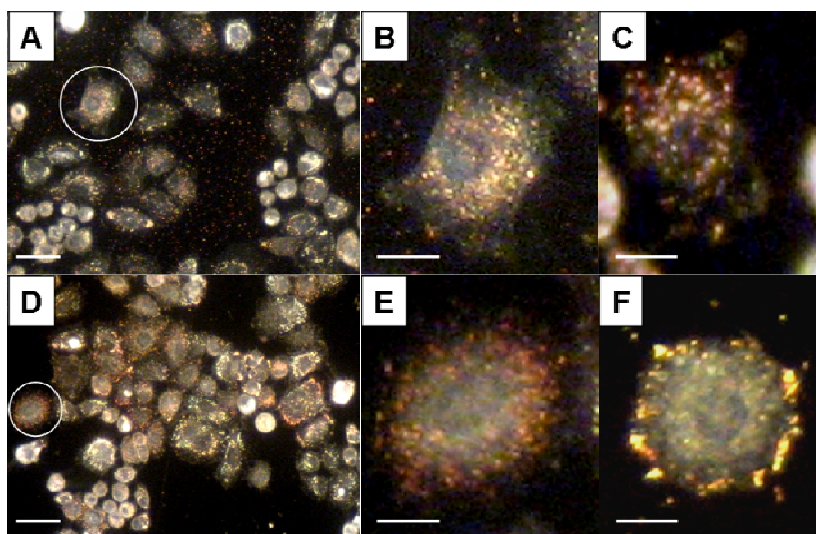
**Fig.4-4** (A) Spectre SERS ale BF-GNFs in solutie apoasa (ii), in interiorul unei regiuni celulare selectate (marcata de sageti- (iii) si spectrele inregistrate pe un esantion de celule nemarcat (i) utilizandu-se ca si radiatie excitatoare linia laser de 633 nm. (B) Imagine de microscopie optica in transmisie a celulelor D407 in prezenta markerilor SERS.

## Capitolul 5

### 5.1 Studii de internalizare a nanoparticulelor de aur si transport celular

#### 5.1.1 Imagistica prin microscopie optica in transmisie si in camp intunecat

In studiul de fata s-a analizat internalizarea nanoparticulelor de catre celule utilizandu-se tehnicile de microscopie optica in trasmisie si in camp intunecat. Figura 5-1 prezinta imaginile in camp intunecat ale nanoparticulelor triunghiulare de argint invelite in chitosan (A) si ale nanobastonaselor compatibilizate cu PEG (B) in interiorul celulelor maligne HTB177. Ambele tipuri de nanoparticule imprastie lumina rosie, datorita rezonantelor plasmonice situate la lungimea de unda de 750 nm. Important, nanoparticulele de metal nobil nu sufera fotodegradare in timp, cum se intampla de obicei cu alte tipuri de agenti imagistici de tipul muloculelor fluorescente sau al nanoparticulelor semiconductoare [21].

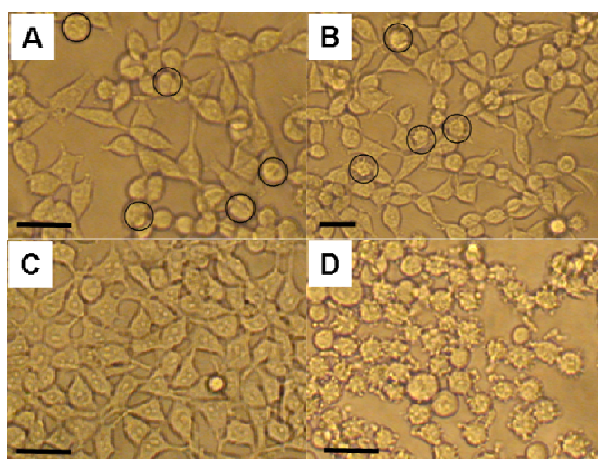


**Fig.5-1** Imagini de microscopie optica in camp intunecat ale celulelor cancerigene HTB177 incubate cu Chit-AgNTs (A, B, C) si PEG-AuNRs (D, E, F). Imaginile magnificate corespunzatoare unei celule selectate vizualizate dupa 2 ore (B, E), respectiv 24 de ore (C), (F) de incubare in prezenta particulelor. Scala 20 nm (A, D) si 10 nm (B, C, E, si F).

## 5.2 Studii de viabilitate celulara in prezenta nanoparticulelor

### 5.2.1.1 Evaluarea viabilitatii celulare in prezenta nanobastonasele invelite in PEG si a Chit-AgNTs

S-au efectuat studii comparative pentru a testa impactul nanobastonaselor PEGylate si al ChitAgNTs asupra diferitelor tipuri de celule. In acest sens s-au utilizat doua linii celulare: o linie de celule sanatoase embrionare din rinichiul uman (HEK) si o linie de celule din carcinom pulmonar uman (HTB177). S-au efectuat teste preliminarii prin incubarea celulelor in prezenta unor concentratii similare de nanoparticule si observarea ulterioara a modificarilor morfologice bazandu-ne pe studii de viabilitate celulara recent raportate [22]. S-au folosit doua probe suplimentare ca si control pozitiv (celule fara nanoparticule) si negativ (celule cu CTAB-AuNRs toxice).

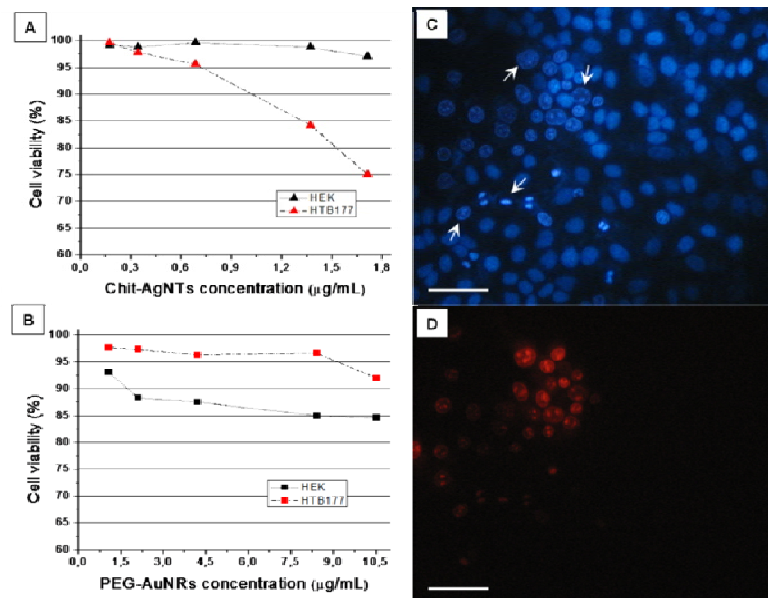


**Fig.5-2** Imagini de microscopie optica in contrast de faza ale celulelor HEK dupa 24 h de incubare cu Chit-AgNTs (A) si PEG-AuNRs (B). Imaginile (C) si (D) reprezinta probe de control pozitiv (celule fara particule) si negativ (celule cu CTAB -AuNRs). Scala 20  $\mu$ m.

### 5.2.2 Excluziune colorimetrica prin microscopie de fluorescenta

S-au efectuat studii de viabilitate celulara mai precise utilizand tehnica de dubla-colorare Hoechst-IP. Prin aceasata metoda am urmarit sa determinam limita de toxicitate pentru fiecare tip de nanoparticule. Colorarea nucleara celulara a demonstrat faptul ca, pentru concentratiile utilizate, nanotriunghiurile de argint invelite in chitosan prezinta cea mai mare biocompatibilitate pentru celulele sanatoase HEK in comparatie cu PEG-AuNRs, din moment ce un procent mai mare de 95% din totalul de celule a ramas viabil dupa 24 h de incubare in prezenta celei mai mari concentratii de nanoparticule utilizate (figura 5-3A). Dimpotriva, a fost observat un efect diferit in momentul in care s-a testat

biocompatibilitatea nanoparticulelor pe celulele cancerigene, pentru care Chit-AgNTs au demonstrat un fenomen interesant de usoara toxicitate (figura 5-3B). In acest caz, graficile indicatoare ale viabilitatii celulare prezinta caracteristici similare pentru cele doua tipuri de nanoparticule pana la atingerea unei concentratii critice de 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de Chit-AgNTs, incepand de la care, procentul de celule viabile a demonstrat o descrestere abrupta de pana la 75%. Acest rezultat confirma o serie de studii similare raportate in literatura privind natura citotoxica a nanoparticulelor de argint asupra celulelor cancerigene. In studiul de fata efectele citotoxice sunt vizibile de la o concentratie mult mai mica de nanoparticule, ce poate fi cauzata de un efect sinergic dintre argint si polimerul chitosan.



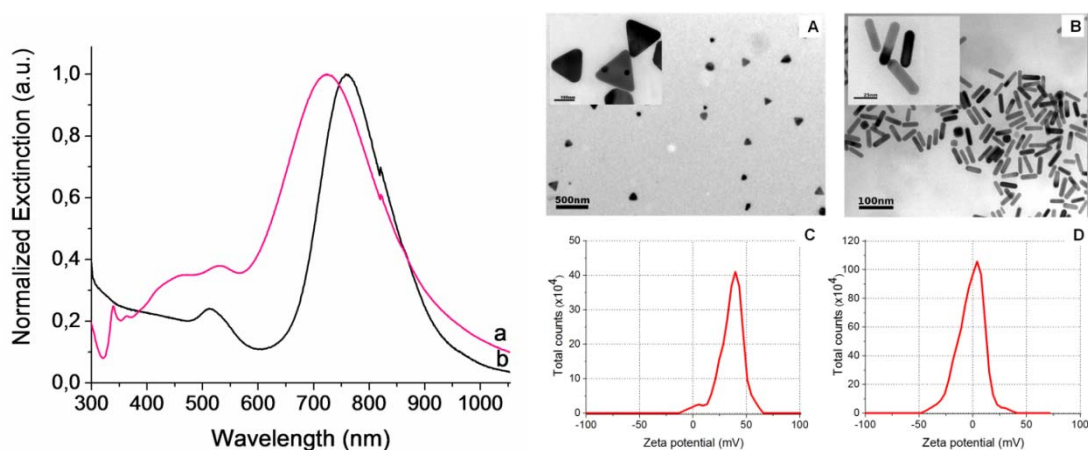
**Fig.5-3** Profilele citotoxice ale Chit-AgNTs (A) si PEG-AuNRs (B) asupra celulelor HEK (simboluri negre) si NCI-H460 (simboluri rosii). Viabilitatea celulara este exprimata in functie de concentratia de nanoparticule. Celule cancerigene viabile colorate cu Hoechst NCI-H460 (C) si celule cancerigene nonviabile colorate cu Iodura de Propidiu NCI-H460 (D) din acelasi esantion tratat cu Chit-AgNTs. Sagetile indica nuclee condensate si fragmentate tipice nanoparticulelor apoptotice.

## Capitolul 6

### 6.1 Terapia fototermica a celulelor tumorale utilizand nanoparticule de metal nobil

#### 6.1.1 Caracterizarea nanoparticulelor invelite in polimeri

Spectrul de extinctie al nanoparticulelor de argint invelite in chitosan in Figura 6-1, curba (a) prezinta patru benzi LSPR caracteristice diferitelor moduri de excitare plasmonica ale nanoparticulelor de argint triunghiulare: doua rezonante plasmonice dipolare la 724 nm (in-plane) si 449 nm (out-of-plane) si doua rezonante plasmonice cuadrupolare la 529 nm (in-plane) si 339 nm (out-of-plane). Proba de referinta (Figura 6-1, curba (b)) prezinta doua benzi LSPR caracteristice nanobastonaselor de aur, si anume o banda corespunzatoare modului de oscilatie electronic pe directia transversala (la 519 nm) si longitudinala (la 758 nm). Este relevant de subliniat faptul ca ambele nanoparticule sunt active optic in NIR prin cele doua rezonante plasmonice individuale puternice situate la lungimile de unda de 724 si respectiv 758 nm, nefiind necesara o agregare prealabila a nanoparticulelor pentru excitarea in NIR, cum este cazul nanoparticulelor sferice.

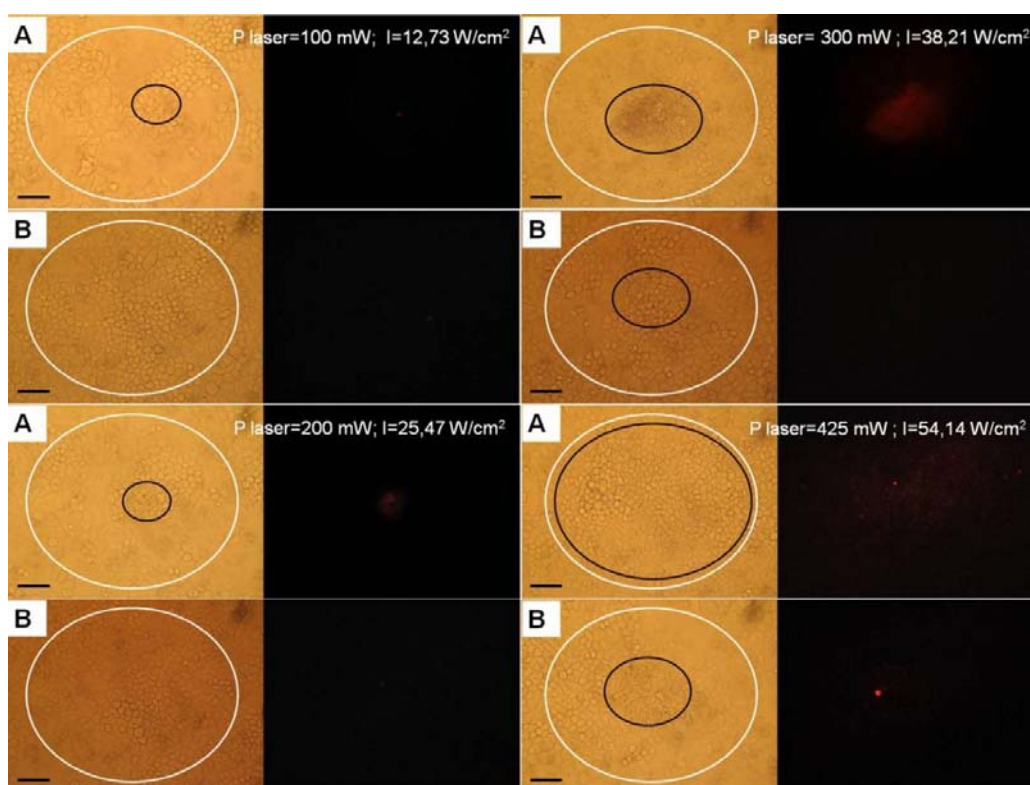


**Fig.6-1** Spectrele de extinctie UV-Vis-NIR normate la unitate ale Chit-AgNTs (spectrul a) si PEG-AuNRs (spectrul b) in solutie apoasa. Imagini de microscopie electronica de transmisie ale Chit-AgNTs (A) si PEG-AuNRs (B) si distributia corespunzatoare de sarcina de suprafata determinata prin masuratori de  $\zeta$ -potential (images C and D).



### 6.1.2 Terapia fototermica asistata plasmonic

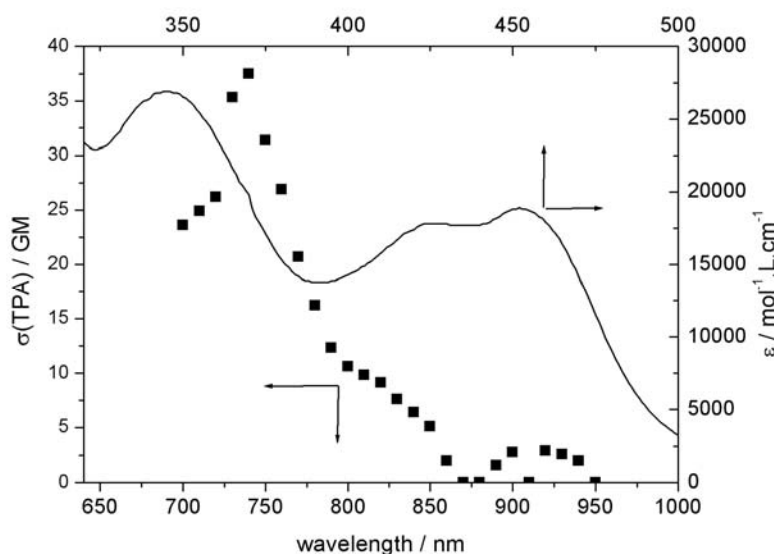
Pentru a determina daca nanoparticulele preparate pot induce moarte celulara, s-a realizat incubarea celulelor tumorale in prezenta Chit-AgNTs si PEG-AuNRs, si ulterior s-au iradiat probele cu radiatie laser in rezonanta cu banda plasmonica a nanoparticulelor. S-a iradiat o proba control, de celule fara nanoparticule internalizate, pastrandu-se conditii experimentale identice. Figura 6-2 prezinta imaginile de microscopie optica in contrast de faza si imaginile corespunzatoare de fluorescenta ale celulelor tumorale HTB 177 incarcate cu Chit-AgNTs (A) si PEG-AuNRs (B) si iradiate cu lumina laser NIR de 800 nm in unda continua la diferite intensitati laser intre 12 si 54 W/cm<sup>2</sup> timp de 10 minute. S-a observat o dependenta a mortalitatii celulare de energia laser utilizata pentru ambele tipuri de probe, aria regiunii de celule apoptotice crescand o data cu intensitatea laser (regiunile indicate in figura 6-2).



**Fig.6-2** Imagini de contrast de faza si imagini de fluorescenta ale celulelor tumorale HTB177 incarcate cu Chit-AgNTs (A) si PEG-AuNRs (B) si iradiate cu lumina laser in unda continua de 800 nm la diferite intensitati laser. Conturul alb marcheaza spotul de iradiere in timp ce conturul negru marcheaza zona de celule distruse. Scala 100  $\mu$ m.

## 6.2 Terapia fotodinamica a celulelor tumorale utilizand complexi de Ru(II) decorati cu TEG

Spectrul de absorbtie UV-Vis al complexului RuPFPEG (Fig. 6-3) prezinta trei benzi, o banda situata intre 250-300 nm atribuita tranzitiilor  $\pi-\pi^*$  ale ligandului 1,10 fenantrolina, o a doua banda in jurul valorii de 330-350 nm ce poate fi atribuita benzii de absorbtie centrate oligofluorenei si o a treia banda la lungimea de unda de 450 nm, corespunzatoare starilor excitate de transfer de sarcina metalo-ligand (MLCT), responsabile pentru generarea oxigenului singlet.

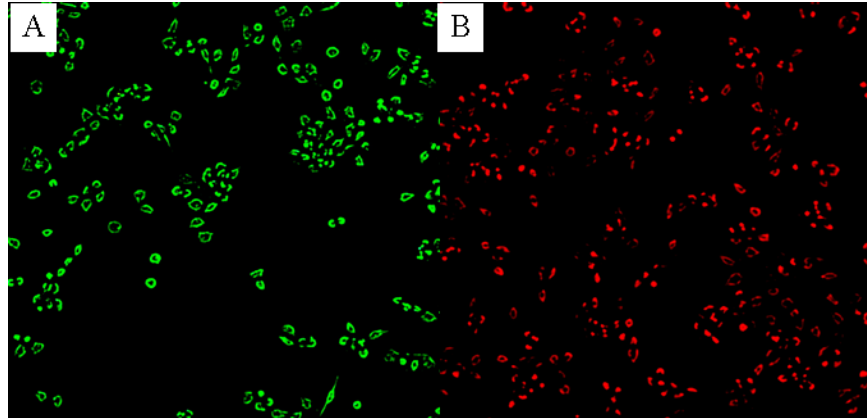


**Fig.6-3** Spectrul de absorbtie UV-Vis si spectrul de excitare la doi fotoni ale complexului RuL1TEG in  $\text{CHCl}_3$  si respectiv  $\text{CH}_3\text{Cl}_3$

### 6.2.1 Imagistica de fluorescenta in vitro

Pentru a induce PDT, un prim pas a fost de a demonstra permeabilitatea complexului RuPFPEG fata de membranele celulare. In acest sens s-au efectuat o serie de studii imagistice de fluorescenta pentru a vizualiza in mod noninvaziv internalizarea complexului RuPFPEG in interiorul veziculelor citoplasmatic. In studiile de microscopie de fluorescenta, celulele gliale F98 au fost incubate timp de cateva minute cu diferite concentratii de RuPFPEG prestabilite, mediul celular fiind ulterior inlocuit cu solutie de PBS. Imaginile de fluorescenta au fost obtinute utilizandu-se atat excitatia de 450 nm cat si de 546 nm. In primul caz, fluorescenta verde cu un maxim de emisie la 550 nm, corespunde ligandului protonat in timp ce in cel de-al doilea caz fluorescenta rosie de la 640 nm corespunde intregului complex.

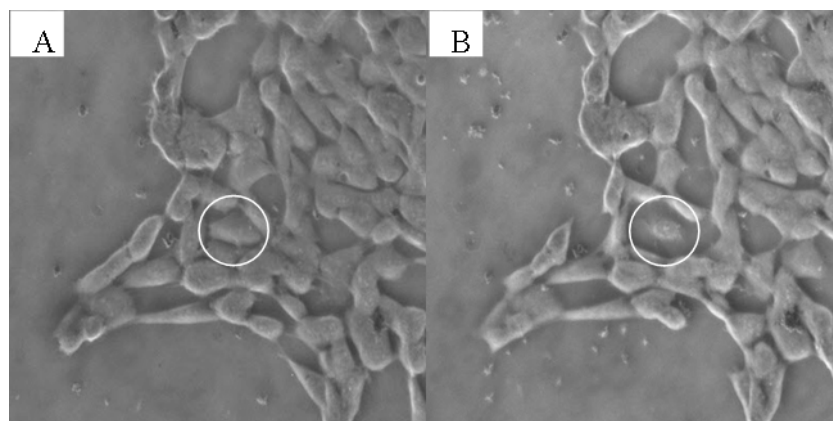




**Fig.6-4** Imagini de fluorescență ale celulelor F98 încărcate cu complexul RuL1TEG. Lungimea de undă excitatoare/ de emisie: (A) 450/490 nm și (B) 546/640 nm.

### 6.2.2 Complexul RuPFPEG utilizat ca și agent fototoxic pentru celulele tumorale prin absorbție de doi fotoni

Complexul RuPFPEG a fost astfel sintetizat încât să prezinte coeficient mare de absorbție la doi fotoni, în vederea utilizării acestuia în terapia fotodinamică prin iradiere cu radiație NIR, transparentă țesutului biologic. În figura 6-5B este indicată o celulă selectată, iradiată timp de 5 minute cu radiație laser în impulsuri la lungimea de undă de 740 nm și putere de 300 mW. S-a observat faptul că forma celulelor prezintă o modificare dramatică față de cea a celulelor neiradiate (figura 6-5A). Acest rezultat reprezintă o demonstrație clară a denaturării membranei celulare și mortalității celulei vizate în prezența  $^1\text{O}_2$  citotoxic [23].



**Fig.6-5** Imagini de contrast de fază ale unei celule gliale F98 selectate înainte (A) și după 5 minute de iradiere cu lumina laser de 740 nm (B).

## **Concluzii**

In aceasta teza am preparat, caracterizat, studiat proprietatile optice si demonstrat aplicabilitatea unor conjugate de nanoparticule de aur-polimeri in detectie si imagistica intracelulara si in tratamentul cancerului prin incalzire asistata plasmonic. Suplimentar, am demonstrat utilitatea unor molecule fotoactive sintetizate recent (in cazul de fata complexi de Ru(II)) in imagistica si terapia fotodinamica a cancerului.

- 1. S-au obtinut nanoparticule de aur de forme (sfere, flori, bastonase) si dimensiuni (20-80 nm) distincte si bine-definite.**
- 2. Am demonstrat conjugarea nanoparticulelor preparate cu (bio)polimeri (Chitosan, Poli(etilen) glicol-tiol) in vedera biocompatibilizarii lor.**
- 3. S-a testat aplicabilitatea nanoparticulelor de aur in biosenzoristica si detectie spectroscopica (LSPR si SERS).**
- 4. Am obtinut si caracterizat o clasa de nanoparticule de aur anizotrope codate spectroscopic ce pot servi detectiei SERS intracelulare.**
- 5. Am studiat internalizarea si toxicitatea nanoparticulelor pe diferite tipuri de celule, sanatoase si tumorale.**
- 6. Am demonstrat eficienta nanoparticulelor de aur in tratamentul cancerului prin Terapie Fototermica Asistata Plasmonic si a unor molecule fotoactive in Terapie Fotodinamica.**

## Referinte

- [1] Bair, F. E. Cancer Sourcebook: Basic Information on Cancer Types, Symptoms, Diagnostic Methods, and Treatments, Including Statistics on Cancer Occurrences World (Health Reference Series), Vol. 1, Omnigraphics, 1990.
- [2] Miller, A. B.; Hoogstraten, B.; Staquet, M.; Winkler, A. *Cancer* 1981, 47(1), 207.
- [3] T. J. Dougherty, C. J. Gomer, B. W. Henderson, G. Jori, D. Kessel, M. Korbelik, J. Moan, Q. Peng, Photodynamic Therapy, *J. Natl. Cancer Inst.*, 90 (1998) 889-905.
- [4] Chen, W. R.; Adams, R. L.; Carubelic, R.; Nordquist, R. E. *Cancer Letters* 1997, 115, 25.
- [5] McBride, G. J. *Nat. Cancer Inst.* 2002, 94, 1740.
- [6] G. Baronzio, G. Fiorentini, C. R. Cogle, *Cancer Microenvironment and Therapeutic Implications*, Springer Science+Business Media B.V. 2009
- [7] <http://encyclopedia.thefreedictionary.com/Colloidal+gold>
- [8] K. Lance Kelly, Eduardo Coronado, Lin Lin Zhao, and George C. Schatz, *J. Phys. Chem. B* 2003, 107, 668.
- [9] J. Kimling, M. Maier, B. Okenve, V. Kotaidis, H. Ballot, A. Plech, *J. Phys. Chem. B* 110 (2006) 15700.
- [10] Peter Johansson, Hongxing Xu, Mikael Kall, *Phys. Rev. B* 72, 035427 (2005).
- [11] R.G. Rayavarapu, W. Petersen, C. Ungureanu, J. N. Post, T. G. van Leeuwen, S. Manohar, *International Journal of Biomedical imaging*, 2007, Article ID 29817.
- [12] Stefan A Maier, *Plasmonics: Fundamentals and Applications*, 2007 Springer Science+Business Media LLC
- [13] Esumi K, Takei N and Yoshimura T, *Colloids Surf. B* 32 (2003) 117.
- [14] P. K. Jain, K. S. Lee, I. H. El-Sayed, M. A. El-Sayed, *J. Phys. Chem. B* 110 (2006) 7238.
- [15] K. Yu, K. L. Kelly, N. Sakai, T. Tatsuma, *Langmuir* 2008 ; 24, 5849.
- [16] Jana N R, Gearheart L, Murphy C J 2001 *J. Phys. Chem. B* 105 4065–4067
- [17] Boca SC, Astilean S., *Nanotechnology* (2010) 21 Article number: 235601
- [18] S. Boca, I. Lupan, O. Popescu, S. Astilean, *Studia Universitatis Babeş Bolyai, Physica*, 1 (2008) 87.
- [19] S. C. Boca, C. Farcau, S. Astilean, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research: B* , 267 (2009) 406
- [20] Sanda Boca, Dumitrita Rugina, Adela Pinteau, Lucian Barbu-Tudoran and Simion Astilean, *Nanotechnology* 22 (2011) Article number 055702
- [21] Rui Hu, Ken-Tye Yong, Indrajit Roy, Hong Ding, Sailing He, and Paras N. Prasad, *J. Phys. Chem. C*, 2009, 113 (7), pp 2676–2684.
- [22] Sanda C. Boca, Monica Potara, Felicia Toderas, Olivier Stephan, Patrice L. Baldeck, Simion Astilean, *Mat. Sci. Eng. C.*, 31 (2011), 184.
- [23] Sanda C. Boca, Mickael Four, Adeline Bonne, Boudewijn van der Sanden, Simion Astilean, Patrice L. Baldeck, Gilles Lemercier, *Chemical Communication* 30 (2009) 4590.