

UNIVERSITATEA BABES-BOLYAI CLUJ-NAPOCA
FACULTATEA DE FIZICA

**Nanostructuri metalice cu aplicații în
detecția unor molecule de interes
biologic**

**-Teză de doctorat-
(rezumat)**

Sorina Garabagiu

**Coordonator științific
Prof. Dr. Simion Aștilean**

Cluj-Napoca, 2011

Comisia de doctorat:

Presedinte: Prof. Dr. Onuc Cozar, decan al Facultatii de Fizica, Universitatea Babes-Bolyai Cluj-Napoca

Conducator stiintific: Prof. Dr. Simion Astilean - Universitatea Babes-Bolyai Cluj-Napoca, Facultatea de Fizica

Referenti: Prof. Dr. Dana Dorohoi, Universitatea Alexandru-Ioan Cuza, Iasi, Facultatea de Fizica

CS I. Dr. Ioan Turcu - INCD pentru Tehnologii Izotopice si Moleculare, Cluj-Napoca

Conf. Dr. Dana Maniu, Universitatea Babes-Bolyai Cluj-Napoca, Facultatea de Fizica

Cuprins

Scopul și motivația tezei	1
--	----------

Capitolul 1: Studiu bibliografic

1.1. Introducere.....	5
1.2. Nanoparticulele de aur	6
1.2.1. Metode de sinteză ale nanoparticulelor de aur	6
1.2.2. Proprietățile optice ale nanoparticulelor de metale nobile	9
1.2.2.1. Fenomenul de rezonanță plasmonică de suprafață	9
1.2.2.2. Efectul nanoparticulelor de aur asupra fluorescenței proteinelor.....	12
1.2.3. Bio-funcționalizarea nanoparticulelor de aur	15
1.2.4. Aplicații ale nanoparticulelor de aur în bio-detectie.....	17
1.3. Nanofire metalice obținute prin metode electrochimice.....	22
1.3.1. Oxidul de aluminiu poros.....	22
1.3.1.1. Generalități.....	22
1.3.1.2. Structura și caracteristicile generale ale AAO	25
1.3.1.3. Aplicațiile oxidului de aluminiu poros	30
1.3.1.3.1. Oxidul de aluminiu poros ca template pentru obținerea de nanofire.....	31
1.3.1.3.2. Alte aplicații	33
1.3.2. Aplicații ale nanofirelor metalice în bio-detectie.....	36

Capitolul 2: Obținerea unor nanostructuri de metale nobile

2.1. Introducere	41
2.2. Sinteza nanoparticulelor de aur	43
2.3. Fabricarea și caracterizarea oxidului de aluminiu poros	45
2.3.1. Tratarea aluminiului	45
2.3.2. Anodizarea aluminiului	46
2.3.3. Caracterizarea oxidului de aluminiu poros	48
2.3.4. Dizolvarea controlată electric a stratului barieră de oxid	51
2.3.4.1 Dizolvarea aluminiului rezidual	51
2.3.4.2 Dizolvarea stratului barieră și subțierea membranei ...	51

2.3.5. Studiul proprietăților optice ale oxidului de aluminiu poros.....	56
2.4. Obținerea nanofirelor metalice în template de oxid de aluminiu poros	64
2.4.1. Fabricarea nanofirelor de cupru, în curent continuu.....	64
2.4.2. Fabricarea nanofirelor de argint, în curent alternativ.....	65
2.4.3. Caracterizarea nanofirelor metalice obținute	67
2.4.4. Obținerea unei rețele de nanofire de argint	72
2.5. Concluzii.....	77

Capitolul 3: Utilizarea nanoparticulelor de aur bio-funcționalizate la detecția unei molecule de interes biologic

3.1. Introducere	80
3.2. Hemoglobina.....	82
3.2.1 Structura hemoglobinei.....	82
3.2.2. Hemoglobina ca proteină redox.....	84
3.3 Bio-funcționalizarea nanoparticulelor de aur utilizând hemoglobină.....	86
3.3.1. Formarea complexului nanoparticule de aur-hemoglobină.....	86
3.3.2. Studii de spectroscopie în UV-Vis	87
3.3.3. Stingerea fluorescenței hemoglobinei de către nanoparticulele de aur	92
3.3.4. Parametrii termodinamici ce caracterizează interacțiunea.....	98
3.4. Detecția electrochimică a acrilamidei utilizând electrozi modificați cu nanoparticule de aur și hemoglobină	101
3.4.1. Acrilamida și formarea aductului hemoglobină-acrilamidă.....	101
3.4.1.1. Acrilamida: substanță neurotoxică și potențial carcinogen	101
3.4.1.2. Formarea aductului hemoglobină-acrilamidă	104
3.4.2. Obținerea și caracterizarea electrozilor modificați cu nanoparticule de aur și hemoglobină.....	105
3.4.3. Detectarea acrilamidei utilizând electrozi modificați cu nanoparticule de aur și hemoglobină	110
3.5. Concluzii	122

Concluzii generale și perspective	124
--	------------

Scopul si motivația tezei

Principalul scop al tezei este acela de a dezvolta noi sisteme de detecție pentru molecule de interes biologic, utilizând nanostructuri metalice bio-funcționalizate.

Teza este structurată în 3 capitole.

În **primul capitol** se face o trecere în revistă a rezultatelor prezentate în literatura de specialitate, cu privire la metodele de sinteză, caracteristicile și posibilitatea de bio-funcționalizare a nanoparticulelor de aur, precum și principalele lor aplicații, în special în domeniul bio-medical. Apoi este prezentat modul general de fabricare și utilizarea oxidului de aluminiu poros, în special în fabricarea unor nanostructuri periodice ordonate, iar în final aplicațiile bio-medice ale acestora.

În **capitolul al doilea** am urmărit obținerea unor nanostructuri metalice (nanoparticule de aur, nanofire de argint, rețea bidimensională de nanofire de argint). Nanoparticulele de aur au fost sintetizate prin metoda lui Turkevich. Nanofirele de argint, precum și rețeaua bidimensională de nanofire de argint au fost fabricate prin depunere electrochimică în porii membranelor de oxid de aluminiu poros. Pentru obținerea rețelei bidimensionale de nanofire de argint, s-a dezvoltat o metodă nouă de dizolvare parțială, cu control electric, a template-ului de oxid poros de aluminiu.

Capitolul al treilea prezintă mai întâi bio-funcționalizarea nanoparticulelor de aur obținute utilizând o proteină cu importante funcții biologice, cu caracter redox, și anume hemoglobina. Apoi, rezultatele obținute cu privire la stabilitatea complexului hemoglobină-nanoparticule de aur sunt valorificate prin depunerea pe un substrat, optic transparent și conductor, a nanoparticulelor de aur, și apoi a moleculelor de hemoglobină, pentru detectarea unui compus neurotoxic (acrilamida). Limita de detecție obținută prin metode electrochimice simple este de $0,1\mu\text{M}$, sistemul fiind potrivit pentru detectarea concentrațiilor de acrilamidă din produse alimentare.

Ultima parte a tezei este reprezentată de concluziile generale, principalele rezultate originale obținute, și perspectivele viitoarelor activități de cercetare din domeniu.

Cuvinte cheie: Nanostructuri metalice, nanoparticule de aur, oxid de aluminiu poros, bio-funcționalizare, hemoglobină, acrilamidă, metode electrochimice de detecție

Capitolul 1: Studiu bibliografic

1.2.1. Metode de sinteză ale nanoparticulelor de aur

Cea mai populară metodă de obținere a nanoparticulelor de aur se realizează prin reducerea sării de aur, HAuCl_4 , cu citratul de sodiu. A fost prezentată de Turkevich¹ în 1951. Prin această metodă se obțin nanoparticule de aur de formă sferică monodisperse suspendate în apă având diametrul de 10-20 nm. Prima semnătură a formării nanoparticulelor sferice de aur este culoarea roșie a soluției. Citratul de sodiu adăugat are rolul de a reduce aurul din sarea de aur la aur metallic. Totodată, prin modificarea raportului între sarea de aur și citratul de sodiu se pot obține nanoparticule de diferite dimensiuni. Cu cât raportul este mai mare, cu atât dimensiunea nanoparticulelor formate este mai mică. Caracteristica principală a soluției coloidale de aur este dată de banda plasmonică care apare în jurul valorii de 520 nm în spectrul de absorbție UV-Vis pentru particulele sferice. Poziția benzii plasmonice în spectrul de absorbție depinde de dimensiunea și forma nanoparticulelor².

Prin metode chimice pot fi obținute nanoparticule de aur de diferite forme, în funcție de substanțele folosite la preparare. Astfel prin reducerea soluției de clorură aurică cu extract de lămâiță se obțin nanoparticule de forma unor prisme triunghiulare³. Nanotriunghiuri de aur pot fi obținute prin folosirea unui extract de aloe vera⁴ sau de muscata⁵. Dimensiunea particulelor și forma lor se determină cu ajutorul microscopiei de transmisie electronică (TEM) (Figura 1-1).

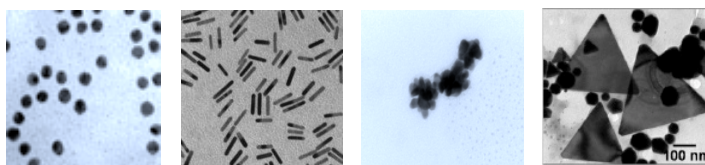


Figura 1-1: Imagini TEM cu nanoparticule de aur, obținute prin metode diferite (nanosfere, nanobastonase, nano-„flori”, nanotriunghiuri)

¹ Turkevich J., P. C. Stevenson, J. Hillier - *Discuss. Faraday.Soc.* 11 (1951), 55-75

² Xie Huan – *Preparation, Characterization and Intracellular Targeting of Biomolecule-Gold Nanoparticle Complexes* (Doctoral Thesis), 2004

³ Rai A., Singh A., Ahmad A., Sastry M. – *Langmuir*, 22 (2006), 736-741

⁴ Prathap S., Chandran, Chaudhary M., Pasricha R., Ahmad A., Sastry M. - *Biotechnol. Prog.*, 22(2006), 5775583

⁵ Iosin M., Toderas F., Baldeck P., Astilean S. - *Journal of Optoelectronics and Advanced Materials*, 10(9) (2008), 2285-2288

1.2.2.2. Efectul nanoparticulelor de aur asupra fluorescenței proteinelor

Este cunoscut faptul că nanoparticulele modifică spectrul de emisie a substanțelor fluorofore din vecinătatea lor⁶. Aplicații sunt din cele mai diverse, în special în domenii precum biologie moleculară, chimie, știința materialelor, fonică, medicină. În special fenomenul de amplificare al fluorescenței este intens studiat datorită potențialelor aplicații în dezvoltarea unor sisteme de detecție bazate pe fluorescență moleculară.

Fluorescența moleculelor este influențată de către rezonanțele plasmonice ale nanoparticulelor metalice prin mai multe mecanisme:

- Prin amplificarea câmpului electromagnetic incident astfel: la lungimea de undă de rezonanță, în urma interacției dintre lumină și nanoparticulele de metal nobile, rezonanțele plasmonice sunt amplificate⁷;
- Prin stingerea fluorescenței moleculelor, datorată transferului de energie la metal (efect de quenching)⁸;
- Prin creșterea ratei de dezexcitare a moleculei fluorescente, datorită existenței unui mediu cu o densitate mai mare de stări optice⁹.

Unul din efectele cel mai des întâlnite în cazul legării nanoparticulelor de molecule fluorescente îl constituie efectul de stingere a fluorescenței moleculei fluorofor. De-a lungul timpului, s-au realizat numeroase studii ale efectului de stingere a fluorescenței în prezența nanoparticulelor. În 1999, Murray și colaboratorii au realizat studii de stingere a fluorescenței fluoresceinei în prezența nanoparticulelor de aur stabilizate cu tiopronină¹⁰. Același grup de cercetători a demonstrat că transferul de energie între nanoparticulă și fluorofor este mai eficient dacă molecula ce stabilizează nanoparticula are lanțul mai scurt. Prin urmare, efectele de quenching sunt dependente de distanța dintre fluorofor și nanoparticula de aur. Studii similare au demonstrat că efectul de quenching se datorează creșterii ratei de dezexcitare a moleculei fluorescente, prin cuplajul electronic a moleculelor excitate cu nanoparticula⁹.

⁶ Tam F., Goodrich G.P., Johnson B.R., Halas N.J.- *Nano.Lett.*, 7 (2007), 496-501

⁷ Dulkeith E., Morteani A.C., Niedereichholz T., Klar T.A., Feldmann J., Levi S.A., van Veggel F.C., Reinhoudt D.N., Möller M., Gittins D.I. - *Phys. Rev. Lett.*, 89 (2002), 203002

⁸ Kitson S.C., Barnes W.L., Sambles J.R.- *Phys. Rev. B: Condens. Matter*, 52 (1995), 11441-11445

⁹ Szmecinski H., Lakowicz J.R., Johnson M.L.- *Methods Enzymol.*, 240 (1994), 723-748

¹⁰ Templeton A.C., Cliffl D.E., Murray R.W.- *J.A.C.S.*, 121(1999), 7081-7089

Stingerea fluorescenței de către nanoparticulele de aur, constantele de legare, și respectiv parametrii termodinamici ai proceselor au fost studiați în cazul unor proteine (albumina serică bovină¹¹), sau molecule de colorant, precum rodamina B¹². Studii anterioare realizate de grupul nostru au demonstrat stingerea fluorescenței porfirinelor în prezența nanoparticulelor de aur¹³.

1.2.3. Bio-funcționalizarea nanoparticulelor de aur

Nanoparticulele pot fi fabricate având o mare varietate de grupări funcționale la suprafața lor, prin bio-funcționalizare. Pentru a introduce anumite grupări funcționale pe suprafața nanoparticulelor, cel mai simplu mod este acela de a substitui agentul stabilizator al nanoparticulei cu liganzi cu funcționalitate asemănătoare, spre exemplu cu tioli sau grupări di-sulfid, în cazul nanoparticulelor de aur și argint.

O modalitate nouă de atașare a unor bio-molecule pe suprafața nanoparticulelor presupune activarea selectivă a anumitor grupări funcționale (tioli) de pe suprafața particulelor, folosind laseri de precizie, aceste grupări permițând atașarea ulterioară a unor molecule de interes, cu posibilitatea de a atașa mai multe, cu funcționalități diferite, pe suprafața aceleiași particule¹⁴.

Adsorbția bio-moleculelor pe suprafața nanoparticulelor este un subiect de actualitate, fiind studiată în special bio-funcționalizarea nanoparticulelor utilizând peptide¹⁵, proteine¹⁶ și acizi nucleici¹⁷. În cazul nanoparticulelor stabilizate cu liganzi anionici (precum citratul de sodiu), proteinele de cele mai multe ori se adsorb pe suprafața nanoparticulelor prin interacțiuni necovalente, electrostatice¹⁵. Spre exemplu, nanoparticulele de aur au fost bio-funcționalizate utilizând ca proteine: imunoglobulina G (IgG)¹⁸, albumina serică bovină (BSA)¹⁹, citocromul C, pH-ul soluțiilor fiind ajustat la

¹¹ Iosin Monica, Canpean V., Astilean S. - *J. Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 217 (2011), 395-401

¹² Zhang H., Wang L. Jiang W. - *Talanta*, 85 (2011), 725-729

¹³ Mihăilescu G., Olenic L, Garabagiu S., Blanita G., Fagadar Cosma E., Biris A.S. - *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 10 (2010), 2527-2530

¹⁴ Duroux M., Duroux L., Neves-Petersen M.T., Skovsen E., Petersen S.B. - *Applied Surface Science* 253 (2007) 8125-8129

¹⁵ Tullman J.A., Finney W.F., Lin Y.J., Whaley Bishnoi S. - *Plasmonics* 2, (2007) 119-127

¹⁶ Tkachenko A.G., Xie H., Coleman D., Glomm W., Ryan J., Anderson M.F., Franzen S., Feldheim D.L. - *J.A.C.S.*, 125 (2003), 4700-4701

¹⁷ Daniel M.C., Astruc D. - *Chem. Rev.*, 104 (2004), 293-346

¹⁸ Li-Mei AO, Feng GAO, Bi-Feng PAN, Da-Xiang CUI, Hong-Chen GU - *Chinese Journal of Chemistry*, 24 (2006), 253-256

¹⁹ Iosin M., Toderas F., Baldeck P. L., Astilean S. - *Journal of Molecular Structure*, 924-926 (2009), 196-200

valoare puțin mai mare decât punctul izoelectric al ligandului (proteinei), înainte de interacțiune. Aceasta permite legarea prin interacțiuni electrostatice a aminoacizilor încărcăți pozitiv de pe suprafața proteinei de grupările citrat, negative, ce stabilizează nanoparticulele. Au fost raportate studii cu privire la adsorbția proteinelor pe suprafața nanoparticulelor de aur, prin intermediul interacțiunilor columbiene între grupări NH₂ ale lizinei sau SH ale cisteinei din structura proteinelor și nanoparticulele respective. Avantajul adsorbției fizice, în detrimentul legăturilor covalente, este acela că astfel nanoparticulele de aur nu afectează structura macro-moleculilor, menținându-se caracterul nativ al ligandului, și specificitatea interacțiunilor cu alte molecule de interes bio-medical²⁰.

1.2.4. Aplicații ale nanoparticulelor de aur în bio-detectie

Asamblarea organizată a particulelor de dimensiuni nanometrice prezintă interes pentru o anumită clasă de nanomateriale care oferă un potențial deosebit în realizarea structurilor unidimensionale, bidimensionale și tridimensionale pentru o varietate largă de aplicații²¹.

Nanoparticulele metalice se folosesc ca și « blocuri de construcție » în designul diferitelor dispozitive. Legarea nano-materialelor cu suporturi biologice, utilizând specificitatea structurală a materialelor biologice și proprietățile electronice și optice ale nanomaterialelor permit realizarea structurilor biologice cu caracteristici noi, distincte de cele obișnuite²². Posibilitatea de a lega de particulele metalice molecule organice a generat un vast domeniu pentru designul nanoparticulelor funcționalizate^{23, 24}.

Reacțiile de recunoaștere moleculară dintre macromolecule și suprafețe create artificial (nanoparticule bio-funcționalizate) pot fi folosite în controlul proceselor celulare și extracelulare, pentru aplicații terapeutice, oferind noi posibilități de diagnostic și dezvoltarea unor noi sisteme de detecție.

Nanoparticulele de aur bio-funcționalizate pot fi utilizate pentru detectarea diferitelor clase de macromolecule, dintre care cele mai importante sunt proteinele și acizii nucleici. Principiul care stă la baza procedeelelor de detecție este specificitatea mare

²⁰ Dykman L.A., Bogatyrev V.A. - *Russian Chemical Reviews*, 76 (2007) 181 - 194

²¹ Daniel M.C., Astruc D. - *Chem. Rev.*, 104 (2004), 293-346

²² Liu W.T. - *J. Bioscience Bioengineering*, 102 (2006), 1-7

²³ Glomm W.R. - *Preparation and characterization of Nanosized Structures with Applications in Bioscience and Materials* (Doctoral Thesis), 2004

²⁴ Feldheim D.L., A. Foss Colby Jr. - *Metal Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Applications*, Marcel Dekker, 2002

dintre diferite bio-moleculă și apariția unor modificări în spectrele optice ale nanoparticulelor de aur bio-funcționalizate în urma complexării.

O altă abordare a bio-senzorilor optici cu nanoparticule de aur o reprezintă detecția SERS, câmpul electromagnetic intens din vecinătatea nanoparticulei ducând la amplificarea semnalului Raman pentru moleculele aflate în apropierea nanoparticulelor, obținându-se astfel sensibilitate de detecție ridicată. Bio-senzori colorimetrici se obțin prin realizarea unor teste de agregare.

Nanoparticulele de aur pot fi utilizate pentru creșterea sensibilității unor senzori electrochimici. Sunt utilizate în construcția senzorilor fie prin atașarea nanoparticulelor pe suprafața electrodului de lucru, fie prin funcționalizarea lor cu receptori, precum enzime, anticorpi, oligonucleotide¹⁷. Atașate pe un electrod plan, nanoparticulele de aur măresc considerabil suprafața activă a electrodului, sistemul fiind astfel sensibil la variații foarte mici ale curenților sau tensiunii.

Nanoparticulele pot fi asamblate pe o varietate largă de substrate, unele prin mijloace foarte ingenioase, dar tehnica nanoingineriei solicită controlul pe scară nanometrică, și anume controlul asupra morfologiei aranjării nanoparticulelor la suprafață. Substratele pot fi de sticlă: conductoare (de exemplu sticlă ITO – având la suprafața un strat de oxid de indiu și staniu) sau neconductoare (cuarț, sticlă cu carbonat de sodiu). Toate aceste substrate sunt caracterizate de transparență și de posibilitatea funcționalizării la suprafață a grupării OH. Substratele de sticlă permit caracterizarea filmelor subțiri obținute, utilizând metode spectroscopice și de microscopie electronică.

Îmbunătățirea semnalului redox de către nanoparticule se datorează reducerii distanței dintre centru activ, redox, al proteinei, și suprafața electrodului plan, astfel se îmbunătățește transferul de sarcină de la electrolit la electrod. Mai mult decât atât, proteinele atașate pe suprafața nanoparticulelor de aur își păstrează funcția biologică specifică²⁰.

Dintre cei mai utilizați biosenzori electrochimici cu nanoparticule de aur, se numără senzorii enzimatici, imunosenzorii, aptasenzorii, în funcție de substanța activă a sensorului²⁵. În cazul senzorilor enzimatici, semnalul electric provine de la o reacție enzimatică, în cazul imunosenzorilor, acest semnal apare în urma reacției specifice anticorp-antigen, iar în cazul senzorilor cu ADN (aptasenzori), semnalul se datorează în principal complementarității bazelor azotate din macromolecula de ADN.

²⁵ Guo S., Wang E. - *Analytica Chimica Acta*, 598 (2007), 181–192

Biosenzorii electrochimici cu nanoparticule de aur pot fi utilizați pentru detecția unor clase de substanțe: proteine^{26,27}, secvențe de nucleotide^{28,29}, substanțe cu potențial toxic, cu utilizări în creșterea calității vieții. O componentă importantă a biosenzorilor cu nanoparticule de aur o reprezintă interacțiunea specifică anticorp-antigen (de exemplu: biotină-streptavidină³⁰, albumină-imunoglobulină). În acest caz, pe un substrat solid se auto-asamblează un strat de nanoparticule de aur biofuncționalizate cu anticorpul. În prezența antigenului dintr-o soluție, se modifică semnalul electrochimic primit de la substratul bio-funcționalizat, astfel realizându-se detecția substanțelor de interes.

Au fost creați senzori electrochimici cu nanoparticule de aur, bio-funcționalizate cu enzime (tirozinază) pentru detecția bisfenolului A, utilizând voltametria ciclică. Tirozinaza este atașată pe nanoparticule prin intermediul glutaraldehidei, iar semnalul este diminuat în urma atașării pe suprafața electrodului a bisfenolului A³¹. Un alt senzor ce utilizează complexul nanoparticule de aur/(clorură de poli-dialil-dimetilamoniu)/nanotuburi de carbon este folosit pentru detecția colesterolului, prin intermediul enzimei colesterol-oxidază, limita de detecție fiind de ordinul milimolilor³².

Nanoparticulele de aur îmbunătățesc transferul de sarcină în cazul detecției glucozei, prin intermediul glucoz-oxidazei, detecția realizându-se prin măsurători de voltametrie ciclică și spectroscopie de impedanță³³.

Numeroși senzori electrochimici cu nanoparticule de aur se bazează pe activitatea electrocatalitică a peroxidului de hidrogen (apa oxigenată). Prin depunerea nanoparticulelor de aur pe un electrod de platină, acoperit cu un strat de polivinil ferocen (PVF) se realizează detecția amperometrică a unor xantine, răspunsul electrochimic fiind dat, în acest caz, de activitatea electrocatalitică a H₂O₂ ce se formează în urma oxidării analitului³⁴.

²⁶ Zhu S.L., Zhang J.B., Yue L.Y.L., Hartono D., Liu A.Q. - *Advanced Materials Research*, 74 (2009), 95-98

²⁷ Park T.J., Lee S.Y., Lee S.J., Park J.P., Yang K.S., Lee K.-B., Ko S., Park J.B., Kim T., Kim S.K., Shin Y.B., Chung B.H., Ku S.-J., Kim D.H., Choi I.S. - *Anal. Chem.* 78 (2006), 7197-7205

²⁸ Elghanian R., Storhoff J.J., Mucic R.C., Letsinger R.L., Mirkin C.A - *Science*, 277 (1997), 1078-1081

²⁹ Baeissa A., Dave N., Smith B.D., Liu J. - *ACS Applied Materials and Interfaces*, 2 (2010), 3594-3600

³⁰ Hu Y., Song Y., Wang Y., Di, J. - *Thin Solid Films*, 519 (2011), 6605-6609

³¹ Alkasir R., Ganesana M., Won Y.-H., Stanciu L., Andreescu S. - *Biosensors and Bioelectronics* 26 (2010) 43-49

³² Eguilaz M., Villalonga R., Agui L., Yanez-Sedeno P., Pingarron J.M. - *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 661, (2011), 171-178

³³ Suxia Zhang, Nü Wang, Yaming Niu, Changqing Sun - *Sensors and Actuators B: Chemical*, 109 (2005), 367-374

³⁴ Bas S.Z., Gulce H., Yildiz S., Gulce A. - *Talanta*, 87 (2011), 189-196

1.3. Nanofire metalice obținute prin metode electrochimice

1.3.1.3. Aplicațiile oxidului de aluminiu poros

1.3.1.3.1. Oxidul de aluminiu poros ca template pentru obținerea de nanofire

Oxidul de aluminiu poros este folosit ca template în obținerea de nanofire metalice, în general, datorită faptului că are o structură foarte ordonată, periodică, și poate fi controlată dimensiunea porilor.

O mare varietate de materiale (metale, semiconductori, materiale izolatoare, nanotuburi de carbon, polimeri) pot fi fabricate în structura poroasă de oxid de aluminiu, cu o mare acuratețe, prin procedee simple și necostisitoare. Acestea se clasifică în:

- nanodot-uri, nanofire, bastonașe și nanotuburi metalice;
- nanodot-uri, nanofire și nanotuburi ale oxizilor metalici;
- rețele de nanodot-uri, nanofire, și nanopori;
- nanofire și nanotuburi semiconductoare, organice, anorganice, polimerice;
- nanotuburi de carbon;
- cristale fotonice;

Obținerea nanofirelor se face pe cale chimică sau electrochimică, ele pot fi eliberate în soluție prin dizolvarea template-ului înconjurător. Obținerea unor materiale nanostructurate prin depunere într-un template (oxid de aluminiu poros) se realizează în prezența, sau absența unui câmp electric^{35, 36}.

Electrodepunerea metalului în pori se poate face atât în curent continuu, cât și în pulsuri, sau curent alternativ, însă nu poate fi controlată cu precizie lungimea nanofirelor obținute.

1.3.2. Aplicații ale nanofirelor metalice în bio-detectie

Proprietățile unice ale nanofirelor conferă acestora posibilitatea de a intercepta diferite evenimente de natură biologică și de a traduce semnalul primit într-un semnal electronic prin intermediul unui senzor bio-electronic. Datorită suprafeței specifice foarte mari comparativ cu materialele în stare masivă și datorită proprietăților de transport

³⁵ Martin C.R. – *ACC. Chem. Res.*, 28 (1995), 61-68

³⁶ Martin C.R. – *Science*, 266 (1994), 1961-1966

electronic ale nanofirelor, conductanța acestora este puternic influențată de perturbații minore ale suprafeței acestora.

Legarea de biomolecule “țintă” pe suprafața nanofirelor funcționalizate duce la modificarea purtătorilor de sarcină din structura firelor, astfel modificându-se conductivitatea structurii. Spre deosebire de filmele plane, în cazul nanostructurilor efectele de suprafață sunt mult mai pronunțate, deoarece o fracție mult mai mare a atomilor constituenți sunt atomi de suprafață.

Datorită suprafeței foarte mari, comparativ cu un electrod plan, aceste materiale nanostructurate bidimensionale sunt utilizate pentru obținerea unor sisteme de biosenzori electrochimici^{37,38}. Aceștia pot fi senzori enzimatici (combină proprietățile catalitice ale enzimelor cu proprietățile nanofirelor), aptasenzori (implică interacțiunea dintre nanofire și acizii nucleici), imunosenzori (bazați pe interacțiunea cu un grad mare de specificitate anticorp-antigen), cu aplicații în detecția unor proteine³⁹.

În cazul senzorilor electrochimici cu nanofire de aur, aceștia prezintă avantaje față de cei cu nanoparticule de aur atât datorită raportului mai mare dintre suprafață și volum, ceea ce permite atașarea de aceștia a unei cantități mai mari de biomolecule, cât și datorită transportului electronic.

Bio-funcționalizarea nanofirelor metalice are loc cu ușurință, în special în cazul nanofirelor de metale nobile (aur, argint), datorită interacțiunii puternice ce apare între grupările tiol sau amino și aceste metale. Dintre moleculele de interes biologic care sunt utilizate pentru funcționalizarea nanofirelor, cele mai importante sunt enzimele, diferiți anticorpi, acizi nucleici. Există multiple metode de funcționalizare, cele mai des utilizate fiind legarea directă de nanofire (prin intermediul grupărilor aminice sau tiolice) sau prin intermediul unor molecule-linker.

Nanofirele multi-segment obținute prin electrodepunere în template (oxid de aluminiu poros) pot fi funcționalizate diferit, datorită proprietăților chimice de suprafață a fiecărui segment în parte⁴⁰. Utilizând metoda de depunere în template, există posibilitatea ca nanofirele să fie biofuncționalizate selectiv doar la capete (prin pasivarea suprafeței

³⁷ Cusma A., Curulli A., Zane D., Kaciulis S., Padeletti G. - *Materials Science and Engineering C*, 27 (2007) 1158–1161

³⁸ Guo S., Wen D., Dong S., Wang E. – *Talanta*, 77 (2009), 1510–1517

³⁹ Wang Joseph - *Chem.Phys.Chem.*, 10 (2009), 1748 – 1755

⁴⁰ Tanase, M., Bauer, L.A., Hultgren, A., Silevitch, D.M., Sun, L., Reich, D.H., Searson, P.C., Meyer, G.J. – *Nano.Lett.*, 1 (2001), 155-158

laterale⁴¹), în scopul creării unor ansambluri de nanofire așezate cap-la-cap (“nano-necklace”), cu diverse aplicații³⁹.

Sistemul de nanofire bicomponent, cu unul din componente având proprietăți magnetice poate fi folosit pentru a crea un comutator (“switch”), astfel având posibilitatea de a pasiviza suprafața activă (componenta non magnetică, bio+funcționalizată) prin manipulare magnetică. În acest fel se poate obține un sensor reversibil, sensibil doar în momentul activării suprafeței bio-funcționalizate (*Figura 1-5*)⁴².

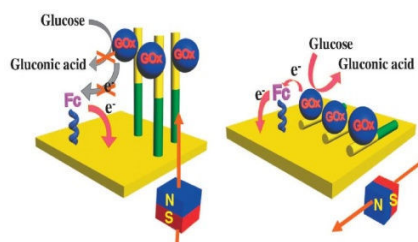


Figura 1-5: Exemplu de biosensor cu nanofire bi-component, cu posibilitatea de activare/pasivare a electrodului prin manipulare magnetică

Funcționalizând diferit segmentele folosind bioreceptori precum anticorpi sau oligonucleotide, se pot detecta proteine sau chiar hibridizarea acizilor nucleici (ADN). De asemenea, nanofirele multi-segment bio-funcționalizate sunt utilizate în transportul țintit de substanțe de interes biologic (plasmide), având avantaj față de nanoparticule prin faptul că fiecare segment poate fi funcționalizat diferit. Unul din segmentele nanofirului este responsabil cu legarea secvenței de ADN, iar celălalt segment este responsabil cu transportul unei molecule care va realiza desfacerea secvenței de ADN de pe nanofir, odată ajuns la destinație⁴³.

⁴¹ Jong-Sung Y., Jeong Yeon K., Seungho L., Jeremiah K. N. Mbindyo, Martin B.R., Mallouk T.E. - *Chem. Commun.* (2000), 2445–2446

⁴² Laocharoensuk R., Bulbarello A., Hocevar S.B., Mannino S., Ogorevc B., Wang J. - *J.A.C.S.*, 129 (2007), 7774-7775

⁴³ Bauer L.A., Birenbaum N.S., Meyer G.J. - *J. Mater. Chem.*, 14 (2004), 517-526

Capitolul 2: Obținerea unor nanostructuri de metale nobile

În capitolul de față propun obținerea unor nanoparticule și nanostructuri metalice.

2.2. Sinteza nanoparticulelor de aur

Citratul de sodiu acționează atât ca agent reducător, cât și ca agent stabilizator pentru nanoparticulele de aur formate. Concentrația de nanoparticule de aur obținute este de $2 \times 10^{-9} \text{M}$. Ele sunt stabile mai multe săptămâni, dacă se păstrează în condiții optime (la întuneric, la 4°C).

Nanoparticulele astfel obținute au diametrul mediu de 25nm, după cum reiese din histograma prezentată în *Figura 2-2*, realizată prin numărarea nanoparticulelor de diferite dimensiuni utilizând imagini de microscopie electronică de transmisie.

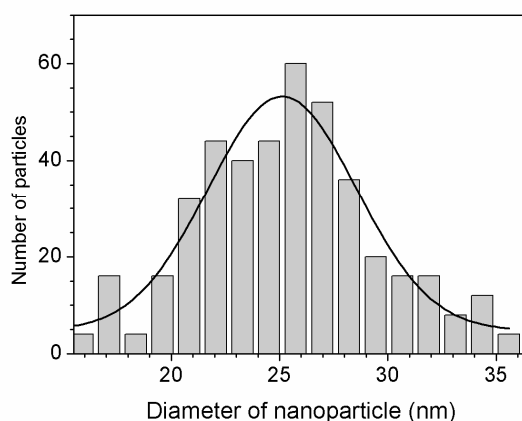


Figura 2-3: Distribuția diametrelor nanoparticulelor de aur sintetizate prin metoda lui Turkevich

2.3.3 Caracterizarea oxidului de aluminiu poros

Caracterizarea structurilor de oxid de aluminiu poros s-a realizat prin metode de microscopie electronică de baleiaj (SEM) și microscopie de forță atomică (AFM).

Membranele preparate în acid oxalic, la 40V, au diametrul porilor de aproximativ 40nm, după cum rezultă din imaginile AFM (*Figura 2-6*) și SEM (*Figurile 2-7 și 2-8*) obținute. Domeniile de supraordonare ale porilor sunt de aproximativ $1 \mu\text{m}^2$.

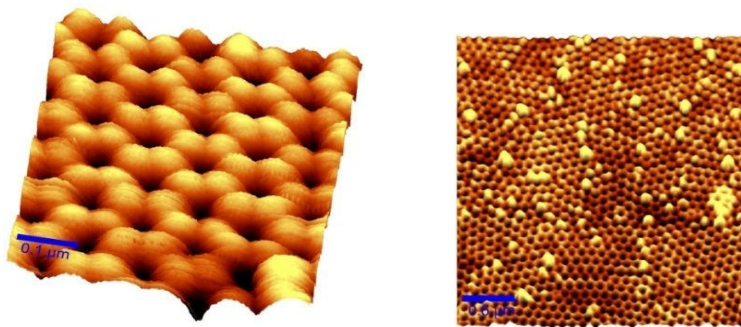


Figura 2-6: Imagini AFM ale unei membrane de oxid de aluminiu poros, obținută în acid oxalic

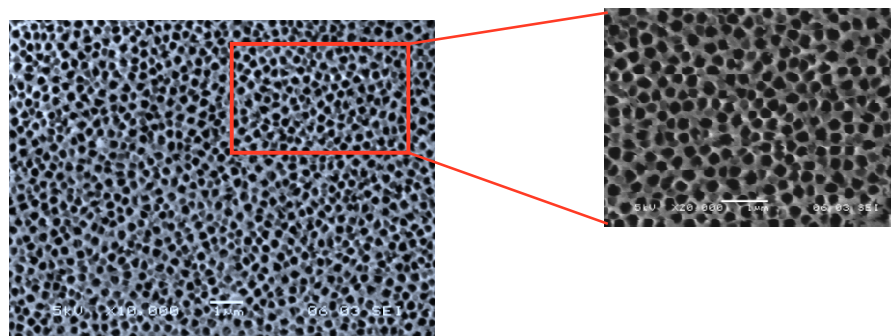


Figura 2-7: Imagini SEM ale membranei de oxid de aluminiu poros, obținute prin anodizare în acid oxalic (suprafața porilor)

2.3.4 Dizolvarea controlată electric a stratului barieră de oxid

2.3.4.2 Dizolvarea stratului barieră și subțierea membranei

Stratul barieră de oxid se dizolvă într-o soluție de acid fosforic 5%. O modalitate nouă de dizolvare a stratului barieră de oxid, precum și de subțiere a membranei de oxid de aluminiu poros presupune controlul electric al dizolvării.

Montajul folosit pentru dizolvarea controlată electric a stratului barieră este prezentat în *Figura 2-9*:

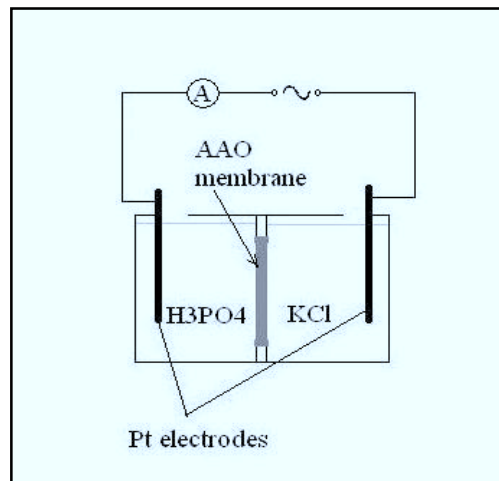


Figura 2-9: Montajul experimental folosit pentru dizolvarea controlată a stratului barieră de oxid

Electroliții folosiți în acest montaj sunt: acidul fosforic 5%, necesar dizolvării stratului barieră de oxid de aluminiu, și clorura de potasiu (KCl) 1M, fără să influențeze în vreun fel procesul de dizolvare. Clorura de potasiu a fost folosită având în vedere proprietățile sale electrolitice.

Pentru început am folosit membrane de oxid de aluminiu poros, la care am îndepărtat stratul rezidual de aluminiu. Membrana astfel obținută, compusă din stratul poros și stratul barieră, este introdusă în celula dublă, cu stratul barieră în contact cu acidul fosforic. Celula este conectată la o diferență de potențial de curent alternativ, prin intermediul a doi electrozi de platină. Valorile tensiunii utilizate au fost de 1V, 0.5V și 0.3V. Variația intensității curentului ce trece prin membrană în funcție de timpul de dizolvare este prezentată în graficele din *Figura 2-10*. Justificarea experimentului este simplă: curentul ce străbate membrana este direct legat de grosimea d a stratului barieră. Au fost folosite atât membrane obținute prin dublă anodizare, cât și membrane obținute printr-o anodizare simplă, cu și fără electrolustruire. Experimentele au fost repetate de mai multe ori, tendința curbelor fiind aceeași.

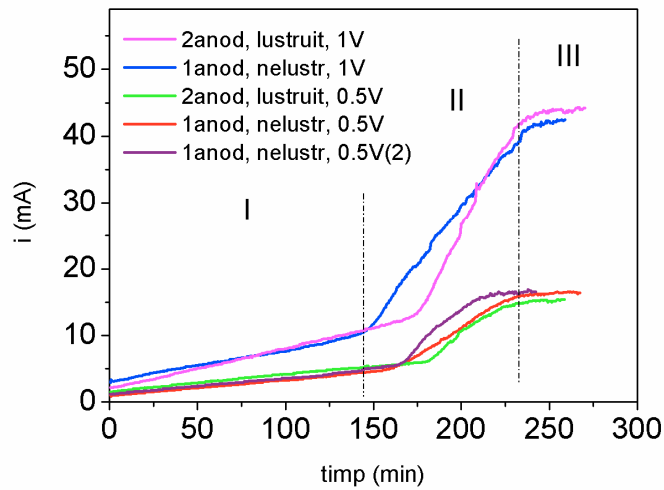


Figura 2-10: Variația intensității curentului electric în timpul dizolvării stratului barieră în cazul membranelor de AAO

Porțiunile din grafic corespund dizolvării astfel: panta lină de la început (zona I din grafic) corespunde dizolvării stratului barieră, până în momentul apariției primului por ce traversează membrana. Panta abruptă (zona II) corespunde creșterii numărului de pori ce traversează membrana, până în momentul în care toți porii sunt deschiși. Datorită micilor neuniformități în grosimea stratului barieră, nu toți porii sunt deschiși în același timp, și odată cu creșterea numărului de pori ce străbat membrana crește și curentul ce o străbate. După ce toți porii străbat membrana, curentul se menține aproximativ constant (zona III din grafic), porțiune corespunzătoare subțierii membranei.

Prin sondare cu tensiune (0.5V, c.a, 1 minut la fiecare 30 minute de pauză) am demonstrat că trecerea unui curent prin porii membranei de AAO nu influențează procesul de dizolvare. Rezultatul este prezentat în *Figura 2-12*.

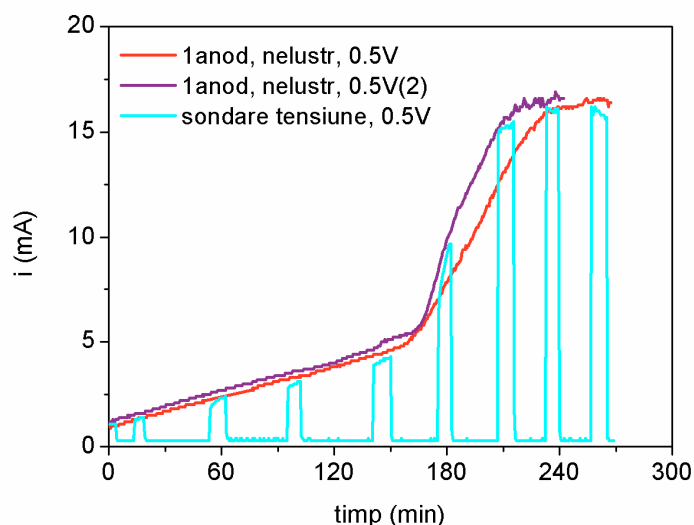


Figura 2-12: Variația intensității curentului la dizolvarea stratului barieră a unei membrane de AAO, la o tensiune constantă (c.a) și prin sondare cu aceeași tensiune

Temperatura la care are loc dizolvarea influențează durata dizolvării. Cu cât temperatura este mai mare, cu atât dizolvarea are loc mai repede, dar se mențin cele 3 porțiuni ale graficului.

Această metodă de dizolvare controlată a stratului barieră de oxid este o metodă nouă, elaborată în laboratorul nostru, rezultatele fiind publicate⁴⁴. Această metodă este utilă în obținerea unei rețele de nanofire metalice încorporate parțial în template-ul de oxid de aluminiu poros.

2.3.5. Studiul proprietăților optice ale oxidului de aluminiu poros

Membrana de oxid de aluminiu poros, dacă are o grosime suficient de mică (până la 3-4 μ m) are caracteristicile unui film subțire, pus în evidență prin apariția fenomenului de interferență a luminii ce o străbate. Filmul subțire de oxid de aluminiu poros studiat în cazul de față are grosimea inițială de $3 \pm 0,1 \mu\text{m}$.

Măsurătorile de transmisie au fost realizate la incidență normală, în domeniul spectral 700-2400 nm, utilizând un spectro-fotometru Jasco V 550. Cunoșcând valorile transmisiei luminii printr-un film subțire, cu fețele plan-paralele, pot fi determinate

⁴⁴ **Garabagiu S.**, Mihailescu G. – *Materials Letters*, 65 (2011), 1648–1650

componentele indicelui de refracție complex al materialului din care este alcătuit filmul subțire, precum și grosimea filmului.

Ținând cont de contribuția stratului barieră la spectrul la transmisie ($T_{barieră}$) și de porozitatea filmului de oxid de aluminiu (p), transmisia prin acest film (T) poate fi calculată utilizând (2-2):

$$T = T_{membrana}(1 - p) + T_{pori}p + T_{barieră} \quad (2-2)$$

unde p este porozitatea, T_{pori} = transmisia prin pori.

Transmisia luminii printr-un substrat cu indice de refracție s , cu grosimea mult mai mare decât grosimea unui film subțire este dată de (2-3):

$$T = \frac{2s}{s^2 - 1} \quad (2-3)$$

unde s este indicele de refracție al mediului.

Dependența indicelui de refracție de lungimea de undă incidentă este dată de formula lui Cauchy (2-4):

$$n = \frac{a}{\lambda^2} + b \quad (2-4)$$

În prezența teză de doctorat s-a studiat variația indicelui de refracție al filmului de oxid de aluminiu folosind spectrul de transmisie experimental și calculat (dupa modelul lui Swanepoel^{45,46}), precum și variația grosimii filmelor subțiri obținute. S-a pornit de la spectrele de transmisie experimentale, luând în considerare valorile transmisiilor maximelor și minimelor de interferență și lungimile de undă corespunzătoare acestora. Având ecuațiile celor două înfășurători, indicele de refracție al filmului subțire (ca funcție de lungimea de undă) se calculează din (2-6):

$$n = \left[N + (N^2 - s^2)^{1/2} \right]^{1/2} \quad (2-6)$$

$$\text{cu } N = 2s \frac{T_M - T_m}{T_M T_m} + \frac{s^2 + 1}{2}, \text{ si}$$

$s = 1$ (indicele de refracție al mediului).

⁴⁵ Swanepoel R. – *J.Phys.E.: Sci. Instrum*, 17 (1984), 896-903

⁴⁶ Swanepoel R. – *J.Phys.E.: Sci. Instrum*, 16 (1983), 1214-1222

Prin modelare matematică (utilizând limbajul de programare C), folosindu-ne de ecuațiile înfășurătoarelor pentru valorile maxime și minime ale transmisiei luminii prin substrat, precum și ținând cont de porozitatea filmului și de grosimea stratului barieră, au fost determinate grosimea filmului subțire, grosimea stratului barieră și neuniformitățile filmului, precum și variația indicelui de refracție a oxidului poros de aluminiu cu lungimea de undă incidentă.

Graficul corespunzător variației indicelui de refracție al oxidului de aluminiu poros este reprezentat în *Figura 2-15*. Valorile experimentale ale variației indicelui de refracție cu lungimea de undă incidentă se obțin utilizând *ecuația 2-6*.

Fitarea valorilor indicelui de refracție se realizează folosind formula lui Cauchy (*ecuația 2-4*), suprapunerea dintre valorile punctuale și ecuația obținută având coeficientul de corelație de 0,954. În cazul oxidului de aluminiu poros, valorile medii ale coeficienților Cauchy rezultați din modelări sunt:

$$a_{ch}=260140.336;$$

$$b_{ch}=1.556;$$

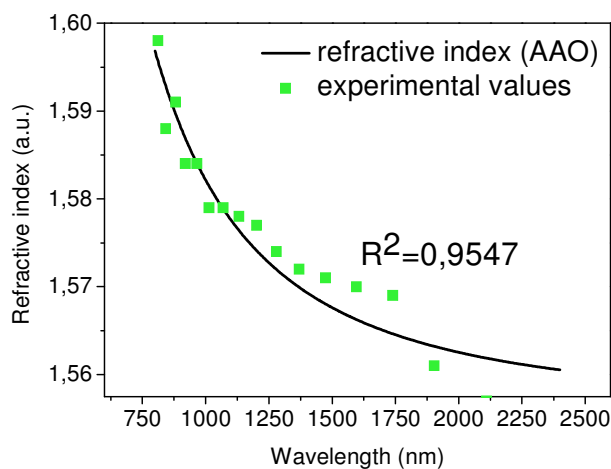


Figura 2-15: Variația indicelui de refracție al AAO

Grosimea calculată a filmului subțire este $d = 3050 \pm 50$ nm, în bună corelare cu valoarea experimentală (3000 nm). Grosimea stratului barieră este calculată a fi 70 ± 25 nm, fiind în bună concordanță cu datele bibliografice, iar neuniformitatea filmului este $\Delta d = 110 \pm 10$ nm⁴⁷.

Simulările spectrelor de transmisie au fost realizate utilizând parametrii determinați anterior (variația indicelui de refracție și grosimea filmului subțire)

⁴⁷ Garabagiu S., Mihailescu G. – *Materials Letters*, 65 (2011), 1648–1650

Coeficientul de corelație între spectrele experimentale și cele calculate este de 0,979 (Figura 2-16).

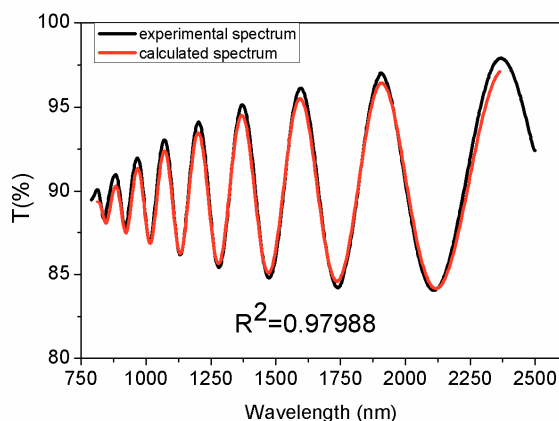


Figura 2-16: Corelația dintre spectrul experimental și calculat al filmului de oxid de aluminiu poros

În urma modelărilor matematice realizate după dizolvări succesive ale stratului barieră de oxid se poate concluziona că viteza de dizolvare a stratului barieră de oxid utilizând metoda de dizolvare controlată este de $0,5 \pm 0,1$ nm/min, rezultat în bună concordanță cu rezultatele din literatura de specialitate⁴⁸.

2.4. Obținerea nanofirelor metalice în template de oxid de aluminiu poros

2.4.4. Obținerea unei rețele de nanofire de argint

Dorința a fost de a realiza o rețea de nanofire de argint incluse parțial în template-ul de oxid de aluminiu poros, astfel încât, printr-o dizolvare controlată a matricii de oxid de aluminiu, pe suprafața acesteia să apară vârfulurile libere ale nanofirelor, paralele, orientate perpendicular pe suprafața de contact⁴⁹.

În funcție de durata dizolvării controlate a template-ului, lungimea firelor metalice ce ies din matrice poate fi controlată. Pentru aceasta, s-a folosit montajul de dizolvare controlată a stratului barieră de oxid de aluminiu prezentat anterior, folosind membrane cu nanofire incluse. Membranele folosite au fost obținute prin anodizare în acid oxalic, la

⁴⁸ Xu W.L., Chen H., Zheng M.J., Ding G.Q., Shen W.Z. – *Optical Materials*, 28 (2006), 1160-1165

⁴⁹ Garabagiu S., Mihailescu G., Giloan M. – Template synthesis of metallic nanowires, *Journal of Optoelectronics and Advanced Materials*, (2010) (submitted)

40V și 4°C, iar nanofirele de argint au fost electrodepute în curent alternativ, după modelul prezentat anterior.

Graficul dizolvării controlate a stratului barieră și apoi a oxidului din structura matricii în care au fost depuse electrochimic fire de Ag este prezentat în *Figura 2-23*.

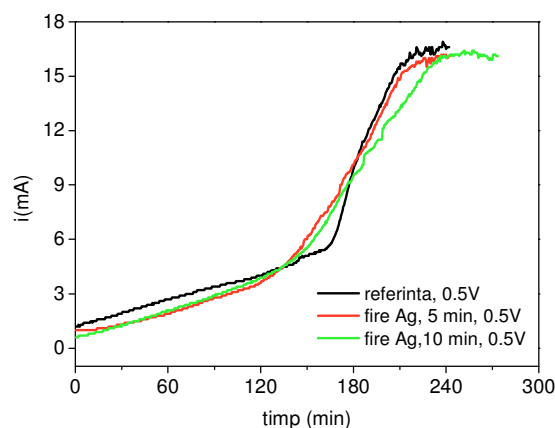


Figura 2-23: Intensitatea curentului în timpul dizolvării controlate a stratului barieră a unei membrane de AAO, cu fire de Ag, depunere realizată timpuri diferite

Având controlul asupra dizolvării, am depus simultan în porii a trei membrane argint, 10 minute, în curent alternativ, la 15V, cu stratul rezidual de aluminiu prezent, după care am dizolvat parțial oxidul (la o tensiune de 0.3V, c.a), oprind procesul la intervale de timp diferite. Spectrele de absorbție în UV-Vis arată că dacă dizolvarea are loc mai mult timp, atunci o parte din nanofirele de argint sunt desprinse din template, maximul de absorbție (la 401-403nm, caracteristic nanoparticulelor de argint, respectiv componentei transversale a nanofirelor de argint) scăzând în intensitate (*Figura 2-25 - A și B*). Având în vedere că indicele de refracție efectiv al mediului înconjurător nanofirelor se modifică, banda plasmonică se deplasează spre stânga, odată cu creșterea lungimii porțiunii de nanofire din aer (indicele de refracție efectiv scade).

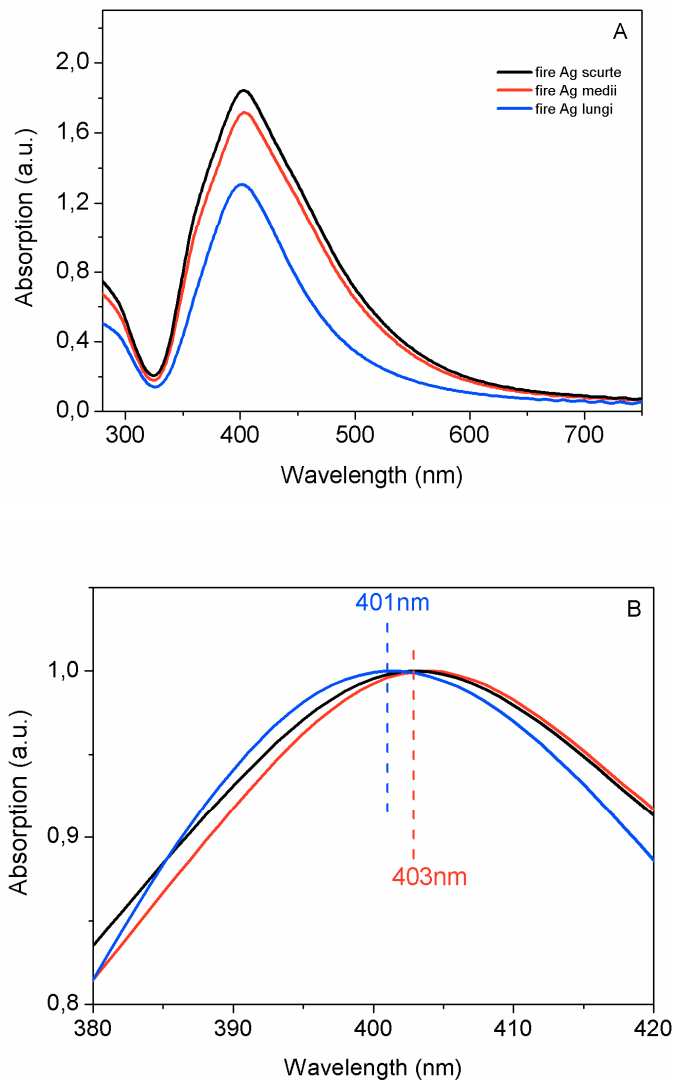


Figura 2-25: A: Spectrele de absorbție ale nanofirelor de Ag după dizolvarea parțială, timpi diferiți, a AAO; B: Evidențierea deplasării plasmonului de argint odată cu variația indicelui de refracție efectiv al mediului

Figura 2-26 prezintă imaginea AFM a nanofirelor de Ag după dizolvarea parțială a oxidului ce le înconjoară, structura prezentându-se ca o rețea ordonată de fire metalice perpendiculare pe membrana de oxid rămasă pentru a susține nanofirele în poziție verticală, membrana având în același timp rol de barieră izolatoare din punct de vedere electric între fire.

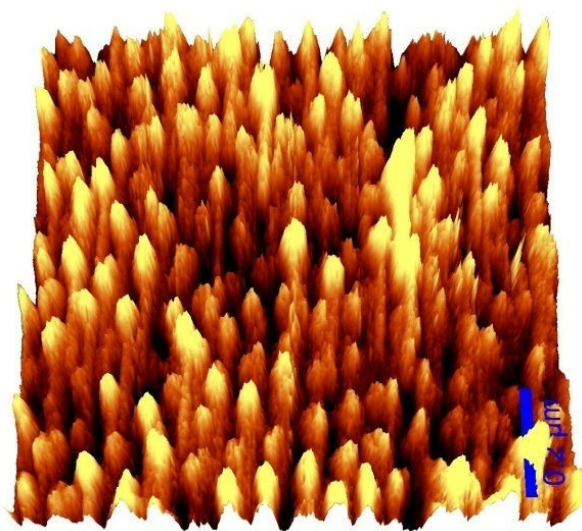


Figura 2-26: Imagine AFM a nanofirelor de Ag incluse în matrice de oxid de aluminiu, după un proces controlat de dizolvare

Capitolul 3: Utilizarea nanoparticulelor de aur bio-funcționalizate la detecția unei molecule de interes biologic

3.2. Hemoglobina

3.2.1. Structura hemoglobinei

Hemoglobina (*Figura 3-1*) este pigmentul respirator (pigmentul roșu), al tuturor vertebratelor, fiind prezentă în eritrocite, unde are rol în transportul oxigenului (oxihemoglobină), și a CO_2 (carbohemoglobină). Este constituită dintr-o componentă proteică numită globină și o componentă prostetică, colorată, și anume hemul, un nucleu porfirinic cu 11 duble legături conjugate (*Figura 3-2*). Molecula hemoglobinei este un ansamblu alcătuit din 4 subunități proteice, formate dintr-un lanț proteic strâns asociat cu grupul hemic. Fiecare lanț proteic adoptă o conformație de alfa helix identică cu globina din alte proteine (mioglobina, de exemplu). Schematic, structura hemoglobinei este prezentată în *Figura 3-1*.

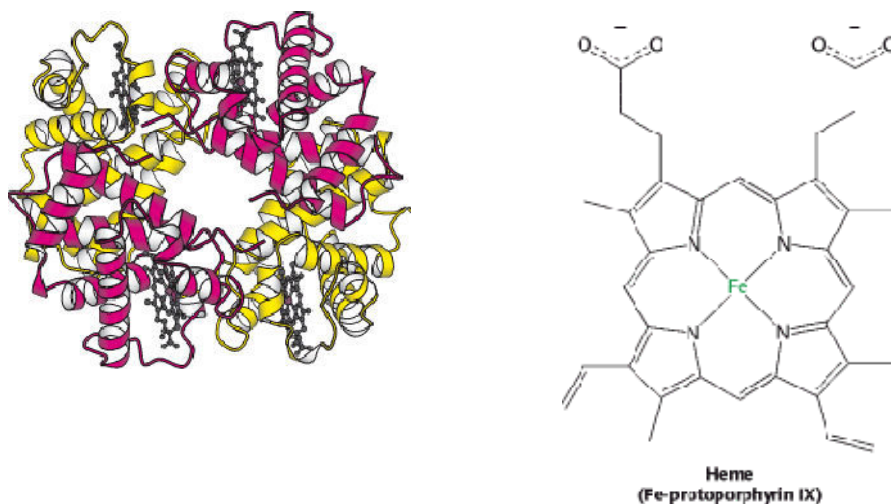


Figura 3-1 (stânga): Structura hemoglobinei⁵⁰: Tetramerul $\alpha_2\beta_2$; cu roșu cele două subunități α și cu galben cele două subunități β ; cu negru este reprezentată gruparea hem

Figura 3-2 (dreapta): Gruparea hem din structura hemoglobinei⁵⁰

3.3. Bio-funcționalizarea nanoparticulelor de aur utilizând hemoglobină

3.3.1. Formarea complexului nanoparticule de aur-hemoglobină

Hemoglobina, proteină globulară, este adsorbită pe suprafața nanoparticulelor de aur prin intermediul grupărilor aminice și tiolice din structura aminoacizilor constituenți. Interacțiunea dintre nanoparticulele de aur și o soluție de hemoglobină este pusă în evidență prin spectroscopie de absorbție în UV-Vis și spectroscopie de fluorescență.

3.3.2. Studii de spectroscopie în UV-Vis

Spectrul de absorbție al hemoglobinei prezintă banda Soret, caracteristică protoporfirinei ce formează structura hemului, cu maxim la 406nm. Banda plasmonică a nanoparticulelor de aur este situată la 524nm. La diferite concentrații de hemoglobină adăugate soluției coloidale, în spectrele de absorbție se observă o deplasare spre dreapta a maximului corespunzător nanoparticulelor de aur (*Figura 3-4 B*). Concentrațiile de hemoglobină utilizate au fost: 0 M, 5×10^{-9} M, 10^{-8} M și 2×10^{-8} M. Deplasarea apărută în spectrele de absorbție se datorează modificării indicelui de refracție din vecinătatea nanoparticulelor, ceea ce dovedește, ca primă constatare, atașarea moleculelor de hemoglobină pe suprafața nanoparticulelor de aur.

⁵⁰ Berg J.M., Tymoczko J.L., Stryer L - *Biochemistry (Fifth Edition)*, W.H. Freeman and Company, 2002

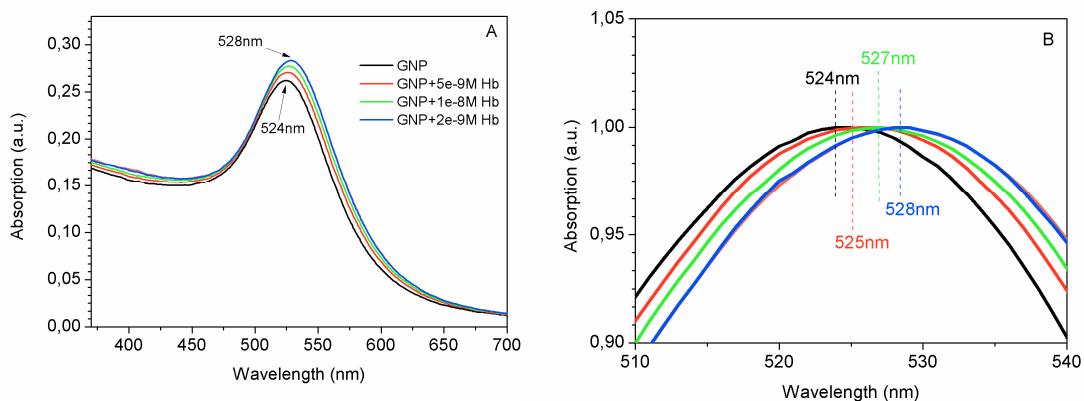


Figura 3-4: A: Spectrul UV-Vis al amestecului GNP+Hb, la adăugarea diferitelor concentrații de hemoglobină) B: Evidențierea deplasării plasmonului odată cu creșterea concentrației de hemoglobină din soluție (prin normalizare la unitate);

Daca într-o soluție de hemoglobină (1 μ M) adăugăm concentrații diferite de nanoparticule, se observă menținerea constantă a benzii Soret a hemoglobinei, odată cu amplificarea benzilor caracteristice hemoglobinei, fenomen numit amplificare în absorbție (Figura 3-6).

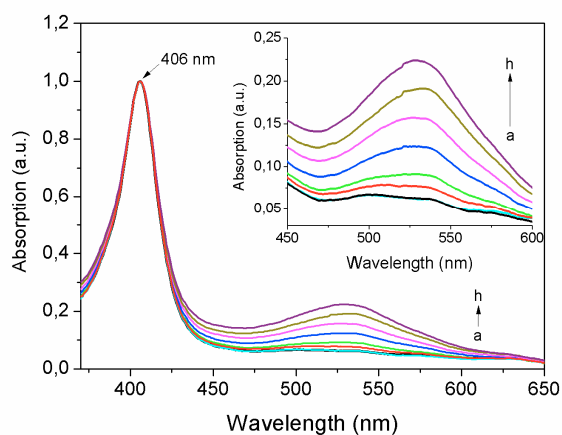


Figura 3-6: Spectrul UV-vis al amestecului Hb+GNP, la adăugarea diferitelor concentrații de GNP: a) 0M; b) 10^{-12} M; c) 5×10^{-12} M; d) 10^{-11} M; e) 2×10^{-11} M; f) 3×10^{-11} M; g) 4×10^{-11} M; h) 5×10^{-11} M

Energia dipolului creat de rezonanțele plasmonice ale metalului nobil (aur) este absorbită de moleculele de hemoglobină din imediata vecinătate a nanoparticulelor, aceasta rezultând într-o amplificare a coeficientului de absorbție, la lungimea de undă

rezonantă. Factorul de amplificare este definit ca raportul dintre rata de absorbție a dipolului și cea a unei incidente, în lipsa nanoparticulei⁵¹.

3.3.3. Stingerea fluorescenței hemoglobinei de către nanoparticulele de aur

Hemoglobina are în componență câte 3 molecule de triptofan în fiecare dimer $\alpha\beta$, în total 6 resturi triptofan. Un singur triptofan din fiecare dimer, și anume $\beta 37$ -Trp este situat la interfața dintre dimeri și prin urmare modificările apărute în structura cuaternară a proteinei vor interfera cu acest rest triptofan. Fluorescența intrinsecă a hemoglobinei este dată de triptofanul $\beta 37$ -Trp, care are un rol esențial în modificarea structurii conformaționale a proteinei, în urma interacțiunii cu diferiți liganzi^{52, 53}.

Fenomenul de stingere al fluorescenței intrinseci a hemoglobinei în urma interacțiunii cu nanoparticulele de aur ne dă posibilitatea de a afla constanțele de legare și variațiile energetice implicate în acest proces⁵⁴.

Parametrii termodinamici și forțele ce intervin în interacțiunea dintre nanoparticulele de aur și hemoglobină sunt calculați din spectrele de fluorescență ale compusului proteină-nanoparticule, stingerea fluorescenței intrinseci a proteinei (datorată triptofanului $\beta 37$ -Trp) în prezența nanoparticulelor fiind înregistrată la diferite temperaturi (301K și 311K).

Intensitatea semnalului de fluorescență scade odată cu creșterea concentrației de GNP din soluție, însă nu există nici o deplasare a poziției maximului de fluorescență (*Figura 3-8*). Scăderea semnalului de fluorescență se explică prin pozițiile celor două resturi triptofan $\beta 37$ -Trp, situați între cei doi dimeri ai proteinei. În urma complexării cu nanoparticulele de aur, structurile din vecinătatea acestor grupări triptofan se modifică, ceea ce duce la scăderea emisiei de fluorescență a celor două grupări triptofan. Din cauza poziției acestora, ele nu interacționează direct cu nanoparticulele de aur, și de aceea nu există nici o deplasare a maximului de emisie.

⁵¹ Khai Q. Le, Aimi Abass, Bjorn Maes, and Peter Bienstman, **Conference Paper**, Optical Nanostructures for Photovoltaics (PV) Karlsruhe, Germany, June 21, **2010**, PV Poster Session (PWB)

⁵² Goldbeck R.A., Esquerra R.M., Kliger D.S. – *J.A.C.S.*, 124 (**2002**), 7646-7647

⁵³ Venkatesh Rao S, Manoharan P.T. – *Spectrochimica Acta Part A*, 60 (**2004**), 2523-2526

⁵⁴ Garabagiu S. - A spectroscopic study on the interaction between gold nanoparticles and hemoglobin, *Mat. Res. Bull.*, 46 (**2011**), 2474-2477;

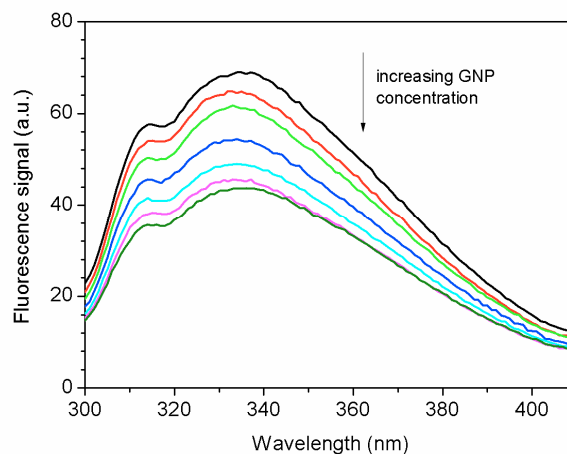


Figura 3-8: Stingerea fluorescenței hemoglobinei de către nanoparticulele de aur, la diferite concentrații de GNP (0M, 10^{-11} M, 2×10^{-11} M, 4×10^{-11} M, 6×10^{-11} M, 8×10^{-11} M, 10^{-10} M)

Mecanismul de stingere al fluorescenței⁵⁵ este descris de ecuația Stern-Volmer (3-1):

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_q \tau_0 [GNP] = 1 + K_{SV} [GNP] \quad (3-1)$$

unde:

- F_0 este intensitatea semnalului de fluorescență a moleculei fluorescente (hemoglobina);
- F este intensitatea fluorescenței după adăugarea soluției moleculare ce stinge fluorescența (GNP);
- K_q este constanta bimoleculară de stingere a fluorescenței;
- τ_0 este timpul de viață al fluoroforului în absența unei molecule ce stinge fluorescența;
- K_{SV} este constanta Stern-Volmer și
- $[GNP]$ reprezintă concentrația de nanoparticule de aur din soluție.

Reprezentarea grafică a ecuației Stern-Volmer, la două temperaturi, la diferite concentrații ale nanoparticulelor de aur din soluție, este prezentată în *Figura 3-9*.

⁵⁵ Lakowicz Joseph R., *Principles of Fluorescence Spectroscopy, Third Edition*, Springer Science+Business Media, LLC, (2006)

Analizând valorile constantelor Stern-Volmer (*Tabelul 3-1*) se constată că stingerea fluorescenței nu este datorată componentei dinamice, ci are loc o stingere statică a fluorescenței, cu formarea unui complex GNP-hemoglobină.

Pentru determinarea parametrilor de cuplaj în cazul stingerii statice a fluorescenței se utilizează ecuația (3-5):

$$\log\left(\frac{F_0}{F} - 1\right) = \log(K) + n\log[GNP] \quad (3-5)$$

unde:

- K este constanta de legare între cele două componente;
- n reprezintă numărul de situri de legare ale hemoglobinei pe suprafața nanoparticulelor de aur (stoichiometria legării).

Valorile obținute prin reprezentarea grafică (*Figura 3-10*) sunt prezentate în *Tabelul 3-1*. Datorită valorii mari a constantelor de legare, putem concluziona că legătura dintre nanoparticulele de aur și hemoglobină este stabilă⁵⁴.

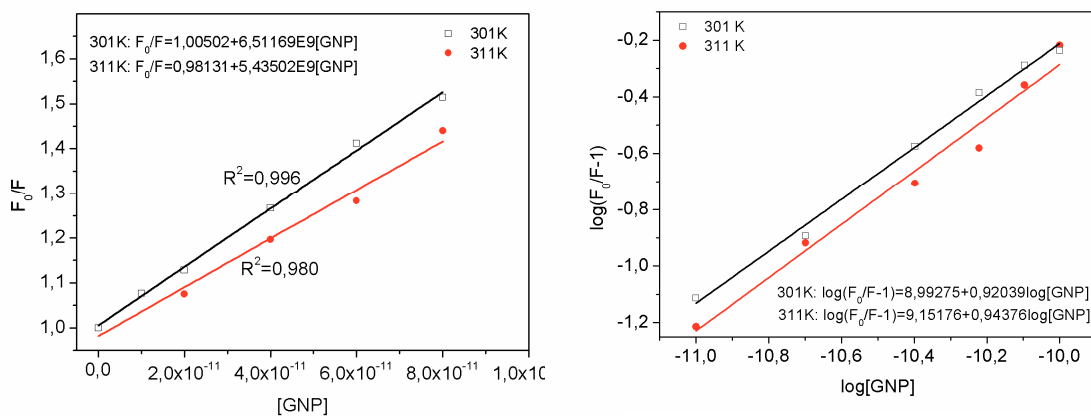


Figura 3-9 (stânga): Reprezentarea Stern-Volmer a stingerii fluorescenței hemoglobinei de către GNP, la două temperaturi (301K și 311K)

Figura 3-10 (dreapta): Efectul nanoparticulelor de aur asupra stingerii fluorescenței hemoglobinei, la două temperaturi diferite (301K și 311K)

Tabelul 3-1: Valorile constantelor Stern-Volmer și a constantelor de legare în cazul interacțiunii dintre nanoparticulele de aur și hemoglobină, la două temperaturi

Temperatura (K)	Constanta Stern-Volmer (l/mol)	Constanta de legare (l/mol)	Stoichiometria
301	6.51×10^9	9.8344×10^8	0.920
311	5.435×10^9	1.4182×10^9	0.943

3.4. Detecția electrochimică a acrilamidei utilizând electrozi modificați cu nanoparticule de aur și hemoglobină

3.4.1. Acrilamida și formarea aductului hemoglobină-acrilamidă

3.4.1.1. Acrilamida: substanță neurotoxică și potențial carcinogen

Acrilamida (*Figura 3-11*) este o pulbere cristalină de culoare albă, fără miros. Se dizolvă cu ușurință în apă, alcool, eter și cloroform. În urma descompunerii termice se formează monoxid de carbon, dioxid de carbon și oxizi de azot. Se prepară la scară industrială prin hidroliza acrilonitrilului.

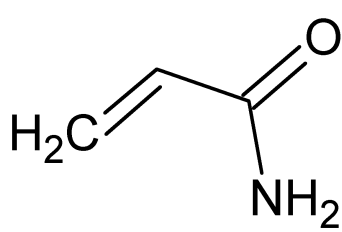


Figura 3-11: Structura acrilamidei

În 2002, Universitatea din Stockholm și Administrația Națională Alimentară din Suedia au pus în evidență pentru prima oară existența acrilamidei în produsele alimentare⁵⁶. Aceasta se formează prin procesarea la temperaturi înalte a produselor ce

⁵⁶ <http://aa.iacfc.affrc.go.jp/en/>

conțin cantități mari de amidon (de exemplu cartofii, pâinea)⁵⁷ și proteine, dar există și în cafea și în fumul de țigară. Este dovedit faptul că acrilamida are efecte neurotoxice, și se presupune a fi substanță cancerigenă. În martie 2010, acrilamida a fost adăugată de European Chemical Agency în lista de substanțe de foarte mare interes (SVHC-substance of very high concern), datorită efectelor cancerigene și mutagene⁵⁸, iar utilizarea acestei substanțe în Uniunea Europeană este restricționată.

Proprietatea hemoglobinei de a forma aducți cu diferite substanțe, cele mai multe toxice (acrilamidă, acrilonitril, aminofenoli, etc.⁵⁹) poate fi exploatată în vederea obținerii unor biosenzori.

3.4.1.2. Formarea aductului hemoglobina-acrilamidă

Cu acrilamida, hemoglobina formează un aduct covalent, legarea făcându-se prin intermediul unei reacții de N-alkilare, acrilamida reacționând cu gruparea aminică a aminoacidului terminal valină, din structura hemoglobinei (*Figura 3-12*). Prin urmare, hemoglobina poate fi folosită ca biomarker al expunerii la acrilamidă⁶⁰. Legătura realizată fiind covalentă, deci legătură puternică, componentele aductului vor fi greu de separat (datorită necesității ruperii legăturii covalente formate). Desfacerea legăturii se face prin procedura de degradare N-alkyl Edman.

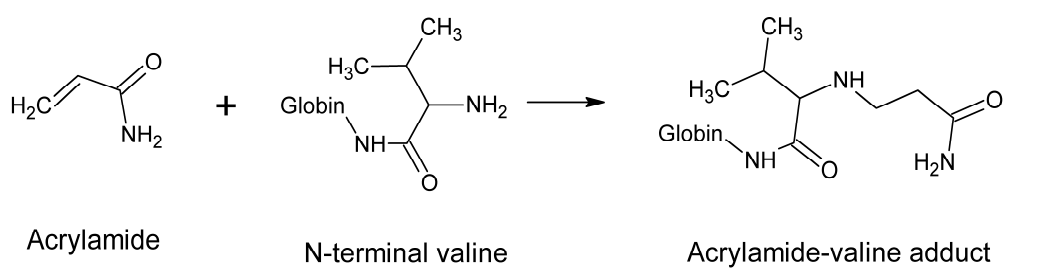


Figura 3-12: Formarea aductului covalent hemoglobină-acrilamidă

⁵⁷ Parzefall Wolfram - *Food and Chemical Toxicology*, 46 (2008), 1360–1364

⁵⁸ http://en.wikipedia.org/wiki/Substance_of_very_high_concern

⁵⁹ von Stedingk H., Rydberg P., Törnqvist M. - *Journal of Chromatography B*, 878 (2010), 2483–2490;

⁶⁰ Preston A., Terry F., Alistair D., Elliott C.T. - *Journal of Immunological Methods*, 341 (2009), 19–29

3.4.2. Obținerea și caracterizarea electrozilor modificați cu nanoparticule de aur și hemoglobină

Electrozii obținuți de noi utilizează nanoparticulele de aur ca intermediar pentru atașarea hemoglobinei pe substratul conductor, pentru creșterea suprafeței electrochimic active, precum și pentru îmbunătățirea transferului de sarcină de la hemoglobină la electrodul plan⁶¹). Dovada atașării componentelor sunt spectrele de absorbție obținute în urma procedeele de depunere, precum și imaginea AFM a unui electrod modificat obținută (*Figura 3-14*).

Imaginea AFM din *Figura 3-13* prezintă suprafața unui electrod de sticlă ITO modificat cu APTMS și nanoparticule de aur.

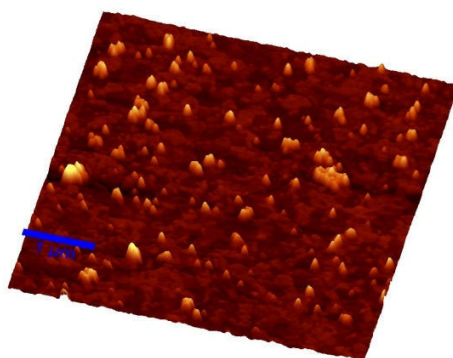


Figura 3-14: Imagine AFM a unui electrod modificat cu nanoparticule de aur

Spectrul de absorbție în UV-Vis al sticlei astfel modificate este prezentat în *Figura 3-15 A*. S-a folosit ca referință o sticlă ITO curată, având aceleași proprietăți optice ca și cea folosită pentru depunere. Existența peak-ului de la 544nm dovedește atașarea nanoparticulelor de aur pe suprafața sticlei silanizate. Diferența de 21 nm între maximum de absorbție al nanoparticulelor în soluție (*Figura 3-4 A*) față de cele pe substrat solid (*Figura 3-15 A*) se datorează următorilor factori: pe substrat solid, distanța dintre nanoparticule scade, comparativ cu soluția coloidală, creând o împachetare mai densă.

După aceste procedee, electrozii modificați sunt gata pentru a fi folosiți la detectarea electrochimică a acrilamidei.

⁶¹ Wang Yi, Weiping Qian, Yong Tang, Shaohua Ding, Haiqian Zhang – *Talanta*, 72 (2007), 1134-1140

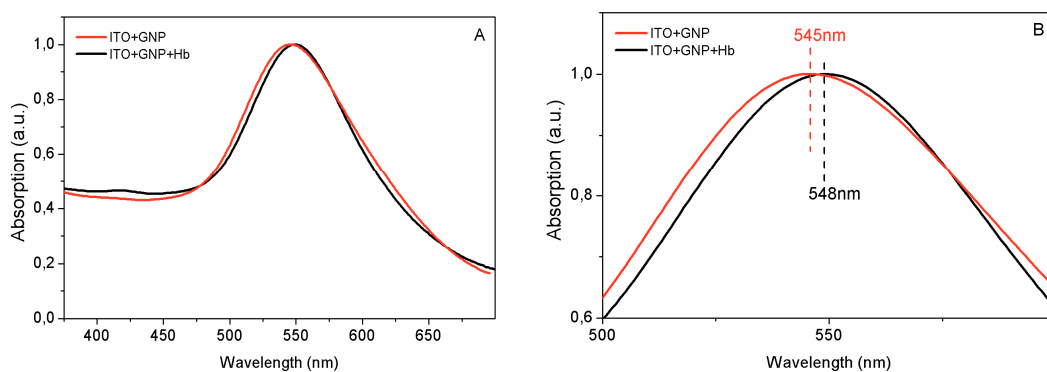


Figura 3-15 A: Spectrul de absorbție al unui electrod modificat cu GNP și hemoglobină;
 B: Evidențierea deplasării plasmonului de aur în urma legării hemoglobinei pe substrat;

3.4.3. Detectarea acrilamidei utilizând electrozi modificați cu nanoparticule de aur și hemoglobină

Principiul de detecție este următorul: când un electrod modificat cu nanoparticule de aur și hemoglobină este introdus într-o soluție ce conține acrilamidă, ca substanță de interes, aceasta se va atașa pe suprafața electrodului, datorită moleculelor de hemoglobină de la suprafață, cunoscut fiind faptul că acrilamida formează cu hemoglobina un aduct covalent. Aceasta duce la modificarea parametrilor electrici ai electrodului (prin creșterea rezistivității lui). În funcție de concentrația de analit din soluția de analizat, intensitatea semnalului electric ce străbate electrodul se va modifica. Înregistrând intensitățile curenților ce străbat electrozii pentru concentrații cunoscute ale analitului, și reprezentând grafic dreapta de calibrare, poate fi determinată concentrația analitului dintr-o soluție de concentrație necunoscută.

Pentru detectarea unor concentrații de acrilamidă de ordinul $10^{-5} \div 10^{-7}$ M am folosit ca metode electrochimice voltametria ciclică și voltametria în pulsuri diferențiale. Măsurătorile s-au realizat utilizând un potentiostat AUTOLAB GSTAT302N. Condițiile de lucru au fost următoarele:

- Voltamogramele ciclice au fost înregistrate între -0,2V și +0,7V, au fost variate vitezele de baleiaj de la 20 la 250mV/s.
- Voltamogramele în pulsuri au fost înregistrate între 0,1V și 0,45V, având pasul de potențial de 0,01V și amplitudinea pulsului de 0,025V.

Toate măsurătorile au fost realizate folosind ca electrod de lucru electrozi modificați de noi, având suprafața de 13mm^2 . Ca electrod auxiliar s-a folosit un disc de platină, iar electrodul de referință a fost electrodul de Ag/AgCl, în 3M KCl. Pentru detectarea acrilamidei s-a folosit viteza de baleiaj de 100mV/s .

Sistemul realizat de noi, bazat pe interacțiunea ireversibilă dintre hemoglobină și acrilamidă, presupune pasivarea electrodului modificat cu hemoglobină în momentul în care în electrolit există o anumită cantitate de acrilamidă. Pentru a obține semnal redox, am utilizat ca marker redox ferocianura de potasiu ($\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$), și am urmărit diminuarea intensității curentului corespunzător peak-urilor de oxido-reducere.

Voltamogramele ciclice obținute sunt prezentate în *Figura 3-20*. Concentrațiile de acrilamidă utilizate sunt: 0 M; 4×10^{-8} M; 4×10^{-7} M; 6×10^{-7} M; 18×10^{-7} M; 3×10^{-6} M; 4×10^{-6} M; 6×10^{-6} M și 10^{-5} M.

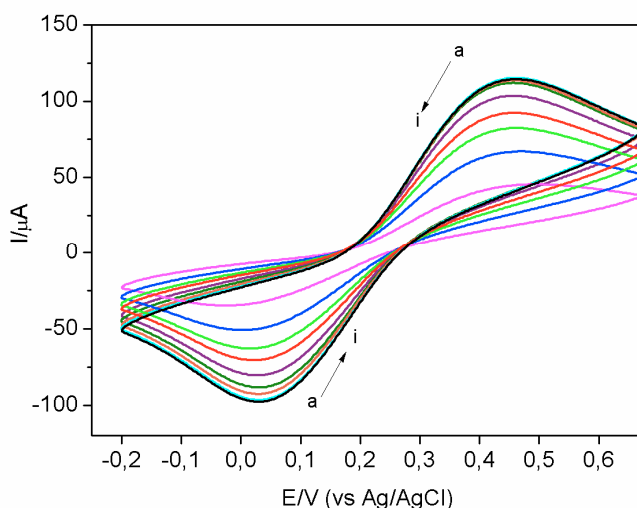


Figura 3-20: Răspunsul (voltamograme ciclice) unui electrod de ITO modificat cu GNP și Hb, în prezența diferitelor concentrații de acrilamidă (a-0; b- 4×10^{-8} ; c- 4×10^{-7} ; d- 6×10^{-7} ; e- 18×10^{-7} ; f- 3×10^{-6} ; g- 4×10^{-6} ; h- 6×10^{-6} ; i- 10^{-5})

Cu cât crește concentrația de acrilamidă din soluție, cu atât intensitatea peak-urilor de oxidare și de reducere scade. Dreapta de calibrare a concentrațiilor de acrilamidă în funcție de intensitatea curentului corespunzător peak-ului anodic este prezentată în *Figura 3-21*, și respectiv în *Figura 3-22* pentru peak-ul catodic. Aceste drepte permit determinarea concentrațiilor de acrilamidă în funcție de valoarea curentilor corespunzători peak-urilor.

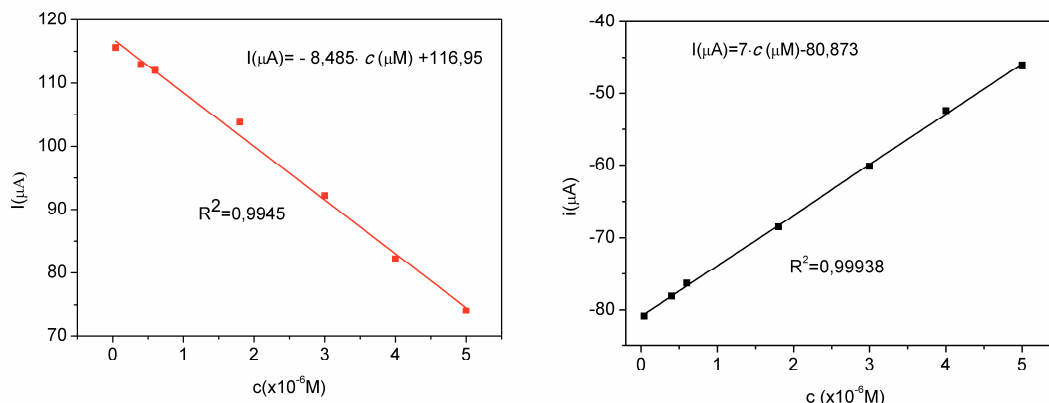


Figura 3-21 (dreapta): Dreapta de calibrare a concentrației de acrilamidă cu intensitatea peak-ului anodic (voltametrie ciclică)

Figura 3-22 (stânga): Dreapta de calibrare a concentrației de acrilamidă cu intensitatea peak-ului catodic (voltametrie ciclică)

Pe lângă voltametria ciclică, voltametria în pulsuri poate fi utilizată pentru determinarea concentrației unui anumit analit. Sensibilitatea acestei metode este apropiată de voltametria ciclică.

Limita de detecție este de 2×10^{-8} M. Luând în considerare zgomotul de fond, sensibilitatea sistemului obținut de noi ajunge la $0,1 \mu\text{M}$ ⁶². Această sensibilitate este satisfăcătoare în cazul determinării unor concentrații de acrilamidă din produse alimentare.

Potențiale îmbunătățiri ale sensibilității sistemului obținut pot fi realizate dacă se îmbunătățește legarea nanoparticulelor de aur pe electrod, sau a hemoglobinei pe suprafața nanoparticulelor atașate pe substrat.

Principalul dezavantaj al acestui sistem este acela că legarea acrilamidei de hemoglobină este ireversibilă. Desfacerea acestei legături se realizează mult mai greu decât a legăturilor formate între sticla ITO și GNP sau între GNP și moleculele de hemoglobină. Odată folosit, electrodul trebuie bio-funcționalizat din nou cu GNP și hemoglobina pentru o nouă utilizare. Dar, spre deosebire de procedeele obișnuite de determinare a acrilamidei, acesta este un procedeu simplu și necostisitor.

⁶² Garabagiu S., Mihailescu G. - *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 659 (2011), 196–200

Concluzii generale și perspective

În lucrarea de doctorat prezentată, s-au adus contribuții originale la câteva aspecte legate de obținerea de nanostructuri metalice, precum și bio-funcționalizarea nanoparticulelor de aur și demonstrarea posibilității de utilizare a nanoparticulelor de aur bio-funcționalizate în obținerea de bio-senzori electrochimici. Principalele rezultate prezentate în detaliu pe parcursul lucrării sunt următoarele:

1. Am fabricat și caracterizat membrane de oxid de aluminiu poros:

- ✓ Am dezvoltat o metodă nouă de dizolvare, cu control electric, a stratului barieră de oxid, format la interfața dintre stratul de aluminiu rezidual și stratul poros de oxid de aluminiu;
- ✓ Am studiat transmisia optică a luminii prin stratul de oxid de aluminiu poros, ca film subțire, utilizând spectroscopia de absorbție în UV-Vis-NIR, precum și prin simulări realizate în programul C;

2. Am preparat nanostructuri de metale nobile:

- ✓ Am fabricat prin electrodepunere în porii template-ului de oxid de aluminiu poros nanofire metalice (cupru, argint), atât în condiții de curent continuu, cât și în curent alternativ;
- ✓ Am utilizat metoda de dizolvare controlată a stratului barieră de oxid pentru a obține o rețea de nanofire de argint, perpendiculare pe suprafața de oxid, cu vârfurile nanofirelor libere, astfel că fiecare nanofir este înconjurat parțial de un strat izolator de oxid (nu există contact electric între nanofire)

3. Am analizat bio-funcționalizarea nanoparticulelor de aur cu hemoglobină:

- ✓ Am caracterizat interacțiunea nanoparticule de aur-hemoglobină utilizând spectroscopia UV-Vis și spectroscopia de fluorescență;
- ✓ Prin prelucrarea spectrelor de fluorescență, obținute la două temperaturi diferite, am determinat constantele de cuplaj și stoichiometria procesului de legare a hemoglobinei pe suprafața nanoparticulelor de aur;

- ✓ Am determinat forțele implicate în procesul de legare, analizând valorile parametrilor termodinamici ai procesului;

4. Am utilizat complexul nanoparticule de aur-hemoglobină pentru detecția unei substanțe neurotoxice (acrilamida):

- ✓ Am fabricat electrozi de sticlă ITO modificați cu nanoparticule de aur și hemoglobină;
- ✓ Am detectat concentrații de acrilamidă de ordinul $10^{-5} \div 10^{-8}$ M, utilizând electrozii modificați, prin metode electrochimice simple: voltametria ciclică și voltametria în pulsuri diferențiale;
- ✓ Am obținut drepte de calibrare pentru concentrații de acrilamidă în domeniul $10^{-5} \div 10^{-8}$ M;
- ✓ Limita de detecție pentru acrilamidă utilizând electrozi astfel modificați este de 10^{-7} M, ținând seama de zgomotele de fond.