

Nicolae Leopold

Engineered metal nanoparticle structures towards interaction with cells,
molecules and light

SUMMARY OF HABILITATION THESIS

The electronic and optical properties of nanoparticles are in close relation with their size and shape. However, an important role is also played by the surfactant that covers the nanometric structure. Therefore, the control over size, shape and the surfactant enables the engineering of nanoparticles with desired physical, chemical and biological properties.

This habilitation thesis presents the most important results obtained so far, which would not have been possible without the contribution of my students. After obtaining the PhD degree, one of my research interest regarded the *in situ* synthesis of surface-enhanced Raman scattering (SERS) substrates that can be integrated into standard analytical chemistry methods such as capillary electrophoresis, microfluidic devices or thin layer chromatography. The *in situ* synthesis method was based on the direct photoreduction of silver onto desired surfaces, leading to the formation of a silver spot with nanometric irregularities that were responsible for the amplification of the Raman signal. Using this strategy, we successfully coupled electrophoresis with SERS detection. The silver spot was synthesized onto the inner surface of a 100 μm capillary tube, which enabled the real time SERS detection of analytes during electrophoretic separation. This strategy was subsequently used to couple SERS with microfluidic devices and thin layer chromatography.

Another research field regarded the design of new metallic colloidal nano agents as SERS substrate. For example, we reported a new synthesis protocol of chloride covered silver nanoparticles, which did not involve any organic reagent. Compared with conventional nanoparticles synthesized using citrate or hydroxylamine, our nanoparticles proved superior Raman signal enhancing capabilities, due to the fact that the chloride was present on the surface of the nanoparticles directly from synthesis. These results brought new insights into the roles of ions such as I^- , Cl^- , Ag^+ , Mg^{2+} in facilitating the adsorption of analytes onto the metallic surface and in mediating the electronic coupling.

We have also reported novel highly monodisperse gold nanoparticles synthesized using

glucose as both reducing and stabilizing agent. Subsequently, we extended this strategy to silver nanoparticles and proved for both gold and silver nanoparticles that they efficiently enhance the Raman signal.

Another study concerned polyethylene glycol stabilized gold nanoparticles, with controllable sizes in the 7-60 nm range, for which we have also determined the optimal dimension for enhancing the Raman signal.

In order to design even more biocompatible nanoparticles, we showed that using collagen as both reducing and stabilizing agent enables an excellent control over the size of gold nanoparticles in the 7-80 nm range. The collagen covered nanoparticles were highly biocompatible and they were easily internalized by cells, a finding which proved once more the important role played by surfactants in biocompatibility.

Besides spherical structures, we also engineered anisotropic gold nanoparticles with sizes in the 20 to 120 nm range using hydroxylamine as reducing agent. The applicative study focused on assessing the biocompatibility and potential as photothermal agent of these nanostructures.

The last part of this work describes my current research focus, which regards Raman and SERS studies of biofluids such as serum, urine or synovial fluid as well as Raman imaging of cells. These lines of study represent vibrant topics of research that aim to translate Raman in the clinical setting.

Nicolae Leopold

Engineered metal nanoparticle structures towards interaction with cells,
molecules and light

REZUMATUL TEZEI DE ABILITARE

Proprietățile electronice și optice ale nanoparticulelor metalice sunt în strânsă corelație cu dimensiunea și forma geometrică a acestora. Cu toate acestea, un rol determinant este atribuit și surfactantului ce acoperă structura nanometrică. Astfel, prin controlul dimensiunii, geometriei și a surfactantului, se pot obține nanostructuri cu proprietăți fizice, chimice și biologice bine definite.

Această teză de abilitare prezintă rezultatele obținute în urma activității de cercetare desfășurate în mare parte alături de studenți și doctoranzi. Una dintre direcțiile de cercetare dezvoltate în primii ani de după susținerea doctoratului s-a referit la sinteza *in situ* a unor substraturi pentru tehnica surface-enhanced Raman scattering (SERS), ce pot fi ușor integrate în tehnicile standard de chimie analitică: electroforeză capilară, tehnici microfluidice și cromatografie pe strat subțire. Metoda de sinteză *in situ* s-a bazat pe fotoreducerea argintului direct pe suprafața de interes, rugozitatea nanometrică a spotului creat facilitând amplificarea semnalului Raman. Prin folosirea acestui substrat, am reușit cuplarea separării electroforetice cu detecția SERS. Spotul de argint a putut fi sintetizat *in situ* în capilare cu dimensiunea interioară de 100 μm, fapt ce a permis detecția SERS în timp real a analiților, pe parcursul separării electroforetice a acestora. Tot pe baza spotului de argint folosit ca substrat, am arătat posibilitatea detecției SERS în timp real în celule microfluidice și de asemenea, detecția SERS *in-situ* în urma separării analiților prin cromatografie pe strat subțire.

O altă direcție de cercetare s-a referit la dezvoltarea unor noi metode de sinteză a substraturilor SERS coloidale. Astfel, am dezvoltat un nou protocol de sinteză a unor nanoparticulele de argint acoperite cu ioni de clor, active din punct de vedere SERS. Protocolul de sinteză nu implică nici un agent organic, iar activarea suprafeței nanoparticulelor cu clor chiar din procesul de sinteză facilitează un semnal SERS mai intens comparativ cu cel obținut pe nanoparticulele convenționale, preparate prin reducere cu citrat sau hidroxilamină. Tot pe baza noilor nanoparticule, am arătat faptul că efectul SERS este activat de ioni cum ar fi I⁻, Cl⁻, Ag⁺, Mg²⁺, ce facilitează adsorbția analitului și cuplajul

electronic cu suprafața metalică.

De asemenea, am propus un protocol de sinteză al unor nanoparticule de aur obținute prin folosirea glucozei ca agent reducător și stabilizator, având o geometrie sferică și un grad înalt de monodispersitate (85% din nanoparticule având diametrul în domeniul 8-9 nm). Ulterior, am extins această metodă de preparare și în cazul nanoparticulelor de argint, arătând că atât nanoparticulele de argint cât și cele de aur stabilizate cu glucoză pot fi utilizate ca substrat SERS.

Un alt studiu s-a referit la utilizarea polietilen glicolului, un polimer cunoscut pentru biocompatibilitatea sa, pentru sinteza de nanoparticule de aur cu control asupra dimensiunilor în domeniul 7-60 nm. Totodată, printr-un studiu sistematic, am determinat dimensiunile optime ale nanoparticulelor de aur acoperite cu polietilen glicol pentru amplificarea semnalului Raman.

În vederea dezvoltării de nanoparticule cu înaltă biocompatibilitate, am folosit colagenul ca agent reducător și stabilizator și am optimizat metodologia de preparare astfel încât să permită controlul dimensiunii nanoparticulelor de aur în domeniul 7-80 nm. Evaluarea biologică a nanoparticulelor de aur acoperite cu colagen a evidențiat o citotoxicitate redusă și un grad înalt de internalizare celulară. Astfel, studiul a confirmat faptul că surfactantul nanoparticulelor joacă un rol decisiv în biocompatibilitatea acestora.

Pe lângă structuri sferice, am propus și un protocol de sinteză a unor nanoparticule anizotropice cu dimensiunea cuprinsă între 20 și 120 nm, folosind hidroxilamina ca agent reducător. Studiul aplicativ s-a concentrat pe evaluarea biocompatibilității și a potențialului ca agent fototermic al acestor nanoagregate.

Direcțiile de cercetare viitoare sunt menționate pe scurt în ultima parte a tezei și vizează continuarea studiilor de imagistică Raman pe celule și SERS pe biofluide. Aceste direcții de cercetare intens studiate la nivel mondial au ca scop translatarea metodelor emergente Raman în practica clinică.