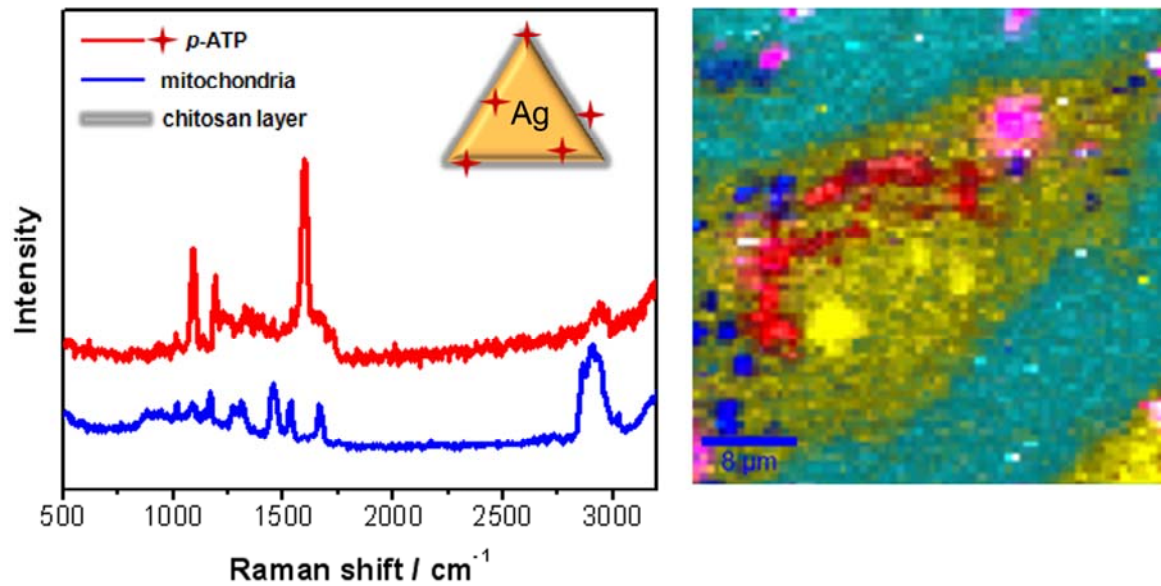


Lucrare de laborator

Utilizarea nanoparticulelor de metal nobile in imagistica celulara: reporteri Raman



Dr. CS III Monica Potara

1. Proprietatile plasmonice ale nanoparticulelor de metal nobil – teorie

Cand dimensiunea unui material devine de ordinul nanometrilor, proprietatile fizice si chimice ale acestuia se modifica in mod semnificativ. Multe dintre aceste caracteristici noi apar din cauza ca la scara nanometrica proprietatile suprafetei devin dominante in comparatie cu proprietatile materialului ca ansamblu. Mai exact, in cazul nanomaterialelor o mare parte a atomilor sau moleculelor constituate se afla la suprafata materialului ceea ce determina o crestere a raportului suprafata/volum in comparatie cu macrostructurile.¹ Aceasta, in schimb, influenteaza reactivitatea, duritatea cat si proprietatile optoelectronice, magnetice si catalitice ale materialului. Cel mai spectaculos fenomen, observat cu ochiul liber, consta in aparitia culorilor stralucitoare ale nanoparticulelor coloidale de metal nobil, culori diferite de cele ale materialului la scara macroscopica. Aceste culori sunt rezultatul interactiunii dintre campul electromagnetic al luminii si nanoparticulele de metal nobil. Pentru a intelege aceasta interactiune descriem nanoparticula metalica ca o retea de nuclee ionice cu electronii de conductie miscandu-se aproape liber in interiorul nanoparticulei. Cand particula este iluminata, campul electromagnetic exercita o forta asupra electronilor de conductie determinand deplasarea acestora la suprafata nanoparticulei. Apare, in acest fel o separare de sarcina: sarcina negativa (electronii) fiind acumulati la suprafata nanoparticulei si sarcina pozitiva in partea opusa; se creaza astfel un dipol electric. Acest dipol genereaza un camp electric in interiorul nanoparticulei, opus fata de cel al luminii incidente, care va forta electronii sa revina in pozitia de echilibru (**Figura 1**).

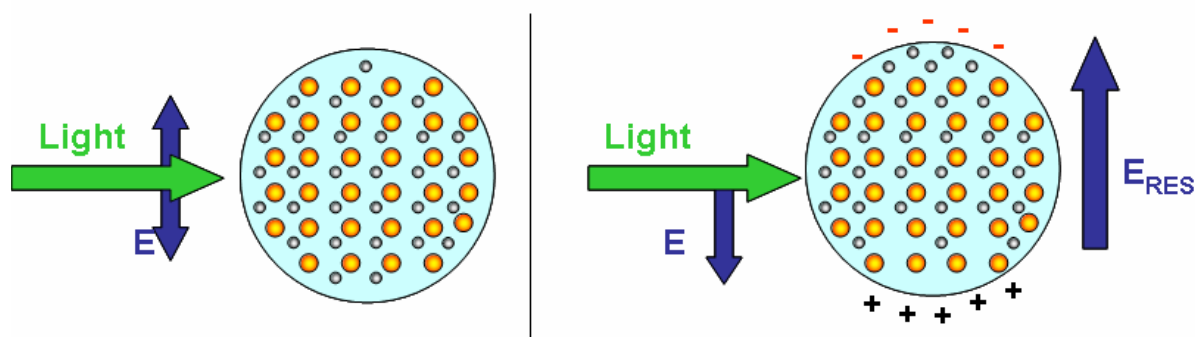


Figura 1. Reprezentarea schematica a interactiunii luminii cu o nanoparticula metalica. Campul electric al luminii incidente induce deplasarea si acumularea electronilor de conductie la suprafata nanoparticulei creand un dipol electric. Aceasta acumulare de sarcina creaza un camp electric opus fata de cel al luminii incidente.²

Se induce, in cel mai simplu caz, o oscilatie dipolară a tuturor electronilor cu aceeași faza. Electronii vor oscila cu o anumită frecvență, numită frecvență plasmonică. Când frecvența câmpului electromagnetic devine rezonantă cu oscilația coerentă a electronilor liberi din metal apar așa-numitele rezonanțe plasmonice de suprafață (SPR), acestea fiind originea culorilor soluțiilor coloidale de metal nobile. În cazul nanoparticulelor metalice aceste SPR sunt localizate la suprafața nanoparticulei și se numesc rezonanțe plasmonice de suprafață localizate (LSPR). Aceste LSPR se evidențiază experimental prin măsurarea spectrului de absorbție în domeniul vizibil-infraroșu apropiat al soluției coloidale de nanoparticule metalice. Poziția și forma LSPR depind de dimensiunea și forma nanoparticulei, de constanta dielectrică a metalului din care este constituită nanoparticula, precum și de constanta dielectrică a mediului din jurul nanoparticulei. Cel mai simplu caz este cel al nanoparticulelor sferice (forme izotrope); în acest caz electronii de conducție vor fi confinați la fel în toate direcțiile și, în consecință, proprietățile plasmonice sunt independente de direcție. În cazul în care nanoparticula sferică are o dimensiune mult mai mică decât lungimea de undă a luminii, câmpul electromagnetic va induce o polarizare omogenă a nanoparticulei și în spectrul de absorbție va apărea o singură LSPR. În cazul nanoparticulelor de formă anizotropă electronii de conducție vor fi confinați diferit la suprafața nanoparticulei în funcție de dimensiunea nanoparticulei pe o anumită direcție. Aceasta induce o dependență a proprietăților plasmonice ale nanoparticulei de formă anizotropă în funcție de direcție. Cu alte cuvinte, în spectrul de absorbție vor apărea mai multe benzi corespunzătoare direcției de oscilație a electronilor liberi.

O consecință a LSPR este câmpul electromagnetic amplificat la suprafața nanoparticulei metalice, care stă la baza spectroscopiilor amplificate de suprafață. Un astfel de exemplu este spectroscopia Raman amplificată de suprafață. Spectroscopia Raman este o tehnică specifică, având abilitatea de a identifica și a furniza informații structurale despre speciile moleculare datorită amprentei Raman vibraționale unice ale acestora. Un dezavantaj al spectroscopiei Raman este sensibilitatea scăzută; abia 1 foton dintr-un milion este împrăștiat Raman. Acest efect poate fi amplificat în prezența nanostructurilor plasmonice astfel încât să fie posibilă detectia chiar și a unei singure molecule. În lucrarea de față vom utiliza proprietatea nanoparticulelor de metal nobile de a amplifica semnalul Raman al moleculelor aflate în vecinătatea acestora nu pentru detecție, ci pentru realizarea unor agenți de contrast (reporteri Raman) pentru imagistica celulară. Componentele reporterilor Raman utilizați în lucrarea de față (**Figura 2**):

1. Solutie coloidala de nanoparticule triunghiulare de argint
2. Invelis polimeric (chitosan)
3. Molecula activa Raman: p-ATP

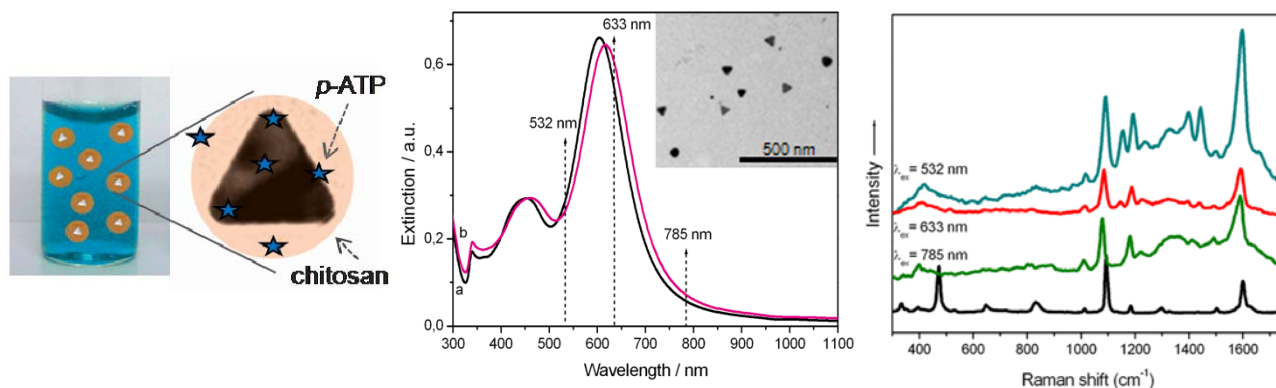


Figura 2. Reprezentarea schematica a unui reporter Raman (stanga). Caracterizarea proprietatilor plasmonice si morfologice ale reporterului Raman (mijloc). Caracterizarea spectroscopica (SERS) a reporterului Raman (dreapta).^{3,4}

Prepararea reporterilor Raman a fost realizata prin incubarea solutiei coloidale de nanoparticule triunghiulare de argint invelite in chitosan cu o solutie apoasa de p-ATP. Acest amestec a fost mentinut la temperatura camerei timp de 24 ore dupa care a fost centrifugat si resuspendat in apa ultrapura pentru a elimina moleculele care nu s-au legat de suprafata de argint. Reporterii Raman realizati au fost caracterizati prin spectroscopia UV-Vis, microscopia electronica de transmisie (TEM) si spectroscopia Raman amplificata de suprafata (SERS). Pentru validarea reporterilor Raman ca agenti de contrast in imagistica celulara, acestia au fost incubati la temperatura de 37 °C, timp de 24 ore cu celule de carcinom de colon. Pentru referinta a mai fost preparata o proba de celule de carcinom de colon fara reporteri Raman.

2. Descrierea aparaturii experimentale

Principalele componente ale microspectrometrului Raman confocal Alpha 300R, WiTec:

- Microscop optic echipat cu diferite obiective (20X, 50X, 100X - pentru masuratori in mediu uscat; 60X - cu imersie in apa si 100 X cu imersie in ulei).
- Filtre edge (532, 633 si 785 nm).

- Fibre optice single mode si multi mode cu conectori.
- Rezolutie optica laterala de 250 nm @ 532 nm.
- Laseri: NdYag la 532 nm, He-Ne la 632.8 nm si Dioda Laser la 785 nm.
- Detector CCD cu racire Peltier (-70°C).
- Iluminare prin spate tip Marconi: LED cu lumina alba.



Figura 3. Imaginea fotografica a microspectrometrului Raman confocal Alpha 300R, WiTec

Sistemul permite efectuarea mai multor tipuri de masuratori, si anume:

- achizitia spectrelor individuale (din zone selectate) cuplata cu vizualizarea zonei din care se face achizitia
- achizitia seriilor temporale (achizitia de spectre multiple pentru o zona fixata – evolutia in timp a spectrului Raman/SERS)
- imagistica spectrala Raman/SERS pe directiile x-y, precum si la diferite adancimi in z

3. Mersul lucrarii

- masurarea si interpretarea spectrelor de absorbie UV-Vis-NIR pentru diferite solutii coloidale de nanoparticule de aur si de argint

- analiza componentelor unui reporter Raman si intelegerea rolului fiecarui component
- localizarea componentelor microspectrometrului Raman confocal Alpha 300R, WiTec si intelegerea rolului fiecarui component
- inregistrarea spectrelor Raman individuale din diferite zone ale celulelor de carcinom de colon cu si fara reporteri Raman si interpretarea rezultatelor
- inregistrarea de harti Raman/SERS pe celulele de carcinom de colon cu si fara reporteri Raman si interpretarea rezultatelor

4. Chestionar

1. Care este rolul fiecarui component al unui reporter Raman?
2. In figura 2 se observa o deplasare a LSPR spre lungimi de unda mai mari in cazul solutiei coloidale de nanoparticule de argint invelite in chitosan incubate cu p-ATP fata de solutia coloidala initiala. De ce apare aceasta deplasare?
3. Cum se achizitioneaza o harta spectrala Raman/SERS? Cum se reprezinta o astfel de harta (in imagini)?

5. Bibliografie

1. M. A. Garcia, *Surface plasmons in metallic nanoparticles: fundamentals and applications*. J. Phys. D:Appl. Phys. 44 (2011) 283001 (20pp)
2. Panikkanvalappil R. Sajanalal, Theruvakkattil S. Sreeprasad, Akshaya K. Samal and Thalappil Pradeep, *Anisotropic nanomaterials: structure, growth, assembly, and functions*, Nano Reviews 2011, 2: 5883
3. Monica Potara, Sanda Boca, Emilia Licarete, Annette Damert, Marius C. Alupei, Mircea T. Chiriac, Octavian Popescu, Ute Schmidt, Simion Astilean, *Chitosan-coated triangular silver nanoparticles as a novel class of biocompatible, highly sensitive plasmonic platforms for intracellular SERS sensing and imaging*, Nanoscale (2013) 5, 6013–6022
4. M. Potara, A. Gabudean, S. Astilean, *Solution-phase, dual LSPR-SERS plasmonic sensors of high sensitivity and stability based on chitosan coated anisotropic silver nanoparticles*, J. Mater. Chem. 21 (2011) 3625-3633.