
REZUMAT AL TEZEI DE DOCTORAT

Studiul interacțiunilor nanoparticulelor plasmonice cu medii biologice și compuși farmaceutici la scară nanometrică

Doctorand: **Anca ONACIU (GHENȚ)**

Conducător de doctorat: **Prof. Dr. Rareș-Ionuț ȘTIUFIUC**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINSUL TEZEI DE DOCTORAT

INTRODUCERE	1
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	3
1. Nanoparticule plasmonice	5
1.1. Metode de sinteză	6
1.2. Tehnici de caracterizare	7
2. Interacțiuni între nanoparticule plasmonice și medii la scară nanometrică	13
2.1. Mecanisme cheie de interacțiune	13
2.2. Proprietăți fizico-chimice ale nanoparticulelor care influențează interacțiunile acestora cu mediul	17
2.3. Condiții experimentale	19
2.4. Metode pentru caracterizarea interacțiunilor la scară nanometrică	21
3. Aplicații biomedicale și farmaceutice ale nanoparticulelor plasmonice	25
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	27
4. Scop și obiective	29
5. Studiul 1. Substrate SERS pe bază de nanoparticule de metal nobil	31
5.1. Introducere	31
5.2. Obiective	33
5.3. Materiale și metode	33
5.4. Rezultate	36
5.5. Discuții	48

5.6. Concluzii	50
6. Studiul 2. Interacțiuni între nanoparticule plasmonice și medii biologice	51
6.1. Introducere	51
6.2. Obiective	52
6.3. Materiale și metode	53
6.4. Rezultate	55
6.5. Discuții	61
6.6. Concluzii	65
7. Studiul 3. Interacțiuni între nanoparticule plasmonice și compuși farmaceutici	67
7.1. Introducere	67
7.2. Obiective	70
7.3. Materiale și metode	70
7.4. Rezultate	71
7.5. Discuții	78
7.6. Concluzii	80
8. Concluzii generale	81
9. Originalitatea și Contribuțiile Inovatoare ale Tezei	83
REFERINȚE	85
ANEXE	121

Cuvinte cheie: nanoparticule plasmonice, Raman/SERS, metilarea ADN-ului, enantiomeri ai atenololului, macrocicluri, geometria de interacțiune

LISTA DE PUBLICAȚII

Articole publicate *in extenso* ca rezultat al cercetării doctorale

1. Onaciu A, Toma V, Moldovan C, Țigu AB, Cenariu D, Culic C, Borșa RM, David L, Știuțiu GF, Tetean R, Tomuleasa C, Știuțiu RI. Nanoscale Investigation of DNA Demethylation in Leukemia Cells by Means of Ultrasensitive Vibrational Spectroscopy. *Sensors (Basel)*. 2022 Dec 29;23(1):346. doi: 10.3390/s23010346. PMID: 36616944; PMCID: PMC9823440. ISI Impact factor - 3.4, Q2

2. Onaciu A, Toma V, Borșa RM, Chiș V, Știuțiu GF, Culic C, Lucaciu CM, Știuțiu RI. Investigating Nanoscale Interactions of Host-Guest Complexes Formed Between CB[7] and Atenolol by Quantum Chemistry and Ultrasensitive Vibrational Spectroscopy. *Sensors (Basel)*. 2024 Nov 7;24(22):7156. doi: 10.3390/s24227156. PMID: 39598934; PMCID: PMC11598021. ISI Impact factor - 3.4, Q2

INTRODUCERE

Nanomaterialele plasmonice prezintă proprietăți optice, electrice și catalitice deosebite, susținând dezvoltarea unei game largi de aplicații biomedicale. Prin urmare, investigarea acestora în diverse condiții prezintă un interes deosebit.

Atât mediile biologice, cât și cele farmaceutice pot conține diverse molecule (proteine, acizi nucleici, lipide etc.), care pot fi adsorbite la nivelul nanoparticulelor (NPs).

Studiul interacțiunilor ce au loc la scară nanometrică între NPs și diferitele molecule implică o metodologie complexă. Pe de o parte, tehnicile de microscopie sunt utilizate, în general, pentru evaluarea proprietăților fizice ale NPs, dar pot fi folosite și pentru monitorizarea acestora în diferite condiții experimentale. Pe de altă parte, metodele spectroscopice pot oferi informații valoroase asupra fenomenelor care au loc la nivelul suprafeței NPs. În plus, metodele implicate în studiul sarcinii de suprafață și al dimensiunii NPs pot fi, de asemenea, abordate. Nu în ultimul rând, analiza acestor interacțiuni din perspectiva calculului teoretic completează spectrul informațional al cercetării în această direcție.

Scopul acestei teze de doctorat este de a aprofunda analiza interacțiunilor de la nivelul interfețelor nano-bio și nano-farma prin intermediul metodelor de spectroscopie vibrațională ultrasensibilă.

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Interacțiunea dintre nanomateriale și anumite molecule din diverse medii prezintă un impact major asupra identității nanostructurilor. Acest aspect stă la baza dezvoltării unor aplicații cu potențial medico-farmaceutic. Proprietățile fizico-chimice ale NPs (dimensiunea, forma, chimia suprafeței), alături de condițiile experimentale (mediul de suspensie, pH-ul, timpul și dozele de expunere), reprezintă principalii parametri care influențează interacțiunile dintre NPs și componentele mediilor.

Mecanismele cheie de interacțiune dintre NPs plasmonice și moleculele din mediu pot fi clasificate ca fiind fizice (optice, mecanice, termice) și chimice (legături de hidrogen, legături covalente, forțe van der Waals și interacțiuni electrostatice).

În literatura de specialitate sunt prezentate diverse metode pentru evaluarea interacțiunilor dintre diferite clase de NPs și medii. Unele metode utilizate în vederea caracterizării NPs pot fi aplicate și pentru analizarea acestora în diferite condiții, inclusiv pentru investigarea interacțiunilor cu diverse molecule.

Tehnicile de microscopie utilizate în vederea caracterizării nanostructurilor necesită o rezoluție înaltă, care să permită investigatorului evaluarea fenomenelor la scară nanometrică. În acest sens, microscopia electronică în transmisie (TEM), alături de microscopia confocală și cea în câmp întunecat, permit identificarea și localizarea NPs la nivel celular.

Tehnicile de spectroscopie implicate în procesele de caracterizare a NPs permit cuantificarea interacțiunilor care au loc la scară nanometrică. Dintre cele mai uzuale tehnici amintim: spectroscopia Raman și spectroscopia Raman amplificată de suprafață (SERS), spectroscopia în infraroșu cu transformată Fourier (FTIR) și rezonanța magnetică nucleară (RMN).

SERS are capacitatea de a investiga interacțiunile dintre NPs și diferite medii, fiind posibilă detectarea diferitelor molecule legate la suprafața sau aflate în imediata proximitate a NPs. Metodologia se caracterizează prin: simplitate, reproductibilitate, sensibilitate înaltă și stabilitate, timpi și costuri reduse. Această tehnică nu necesită marcarea în prealabil a probei. NPs plasmonice de metal nobile sunt frecvent utilizate datorită rezonanței plasmonice de suprafață localizată, prin intermediul căreia se generează efecte puternice de amplificare electromagnetică și chimică a semnalului moleculelor aflate în apropierea suprafeței substratului. În acest fel, se poate studia, din punct de vedere spectral, modul de interacțiune dintre diversele molecule și suprafața NPs la scară nanometrică.

CONTRIBUȚII PERSONALE

Studiul 1: Substrate SERS pe bază de nanoparticule plasmonice din metal nobil

Scop: Obținerea de substraturi SERS stabile și reproductibile pentru aplicații de detecție

Obiective:

1. Obținerea NPs plasmonice
2. Determinarea proprietăților fizico-chimice ale NPs
3. Selectarea NPs adecvate pentru aplicații SERS

Materiale și metode:

NPs plasmonice de metal nobil au fost obținute prin metode de reducere chimică. Imediat după sinteză, NPs au fost concentrate și purificate cu ajutorul procedurii de filtrare cu flux tangențial (TFF). Pe urmă, proprietățile fizico-chimice ale NPs de aur și argint au fost analizate prin: spectroscopie UV-Vis, TEM, analiza traiectoriei NPs (NTA) și microscopie de forță atomică (AFM).

Metoda de preparare a substratelor a implicat depozitarea a 1 μ L de coloid pe o sticlă Raman de CaF_2 , urmată de o etapă de uscare la 40°C. În final, două molecule standard (albastru de metilen și rodamină 6G) au fost evaluate prin tehnica SERS.

Rezultate:

Conform măsurătorilor AFM, ambele tipuri de NPs au format structuri auto-asamblate multistratificate pe sticla Raman. Suprafețe omogene au fost identificate la o distanță de 20-30 μ m de la marginea substratului. Prezența agregatelor de dimensiuni mici determină o anumită rugozitate care favorizează crearea de situsuri active (hotspot-uri) care pot fi ocupate rapid de către moleculele analitului.

Spectrele înregistrate pe molecule standard au prezentat un tropism uniform în cazul măsurătorilor efectuate pe substraturi pe bază de Ag. Pe de altă parte, în cazul substratelor pe bază de NPs de Au, s-au observat variații în rândul măsurătorilor. Comparând valorile intensităților benzii de la 1512 cm^{-1} atât în spectrele Raman, cât și în cele SERS ale moleculei de rodamină 6G, s-a evidențiat că semnalul Raman este considerabil amplificat atunci când se folosește un substrat de Ag.

Concluzii:

Ambele tipuri de NPs prezintă proprietăți fizico-chimice deosebite, ceea ce le recomandă pentru aplicații de detecție. O analiză mai detaliată a două molecule standard a dezvăluit faptul că NPs plasmonice de Ag au proprietăți superioare față de cele de Au în ceea ce privesc: reproductibilitatea, amplificarea semnalului și sensibilitatea la concentrații scăzute de analiți. Aceste rezultate sugerează faptul că NPs de Ag sunt potrivite ca substraturi SERS.

Studiu 2. Interacțiuni între nanoparticule plasmonice și medii biologice

Scop: Analiza interacțiunilor dintre NPs plasmonice și probele de ADN la scară nanometrică în vederea evaluării metilării ADN

Obiective:

1. Investigarea efectelor tratamentului cu 5-azacitidina pe diferite linii celulare
2. Dezvoltarea unui protocol pentru analiza ADN-ului prin spectroscopie Raman și SERS
3. Evaluarea metilării ADN

Materiale și metode:

Celulele de leucemie (DAMI Luc2, MEG-1) și celulele normale (LX2) au fost incubate cu diferite concentrații de 5-azacitidină (5-azaC) pentru 72 h pentru determinarea concentrației inhibitorii mediane (IC_{50}). Ulterior doza IC_{50} a fost aplicată pe celulele de leucemie, urmând ca pe urmă să se procedeze la extracția ADN pentru toate liniile celulare. Modificările structurale la scară nanometrică au fost monitorizate prin spectroscopie Raman și SERS. În cazul măsurătorilor SERS, s-a recurs la un pre-tratament termic la 94°C pentru a facilita interacțiunea catenelor ADN-ului cu NPs plasmonice.

Rezultate:

Spectrele Raman ale probelor de ADN izolate de la cele două linii celulare de leucemie sunt foarte asemănătoare, însă sunt diferite față de spectrul probelor de ADN izolat de la celulele normale. Diferențele cele mai evidente sunt în regiunea spectrală 1000-1700 cm^{-1} . În urma tratamentului cu 5-azaC, s-a observat o creștere în intensitate pentru majoritatea benzilor în ambele probe de ADN, cu o amplificare mai pronunțată în cazul ADN-ului izolat de la linia celulară MEG-1.

În ceea ce privește analiza SERS, cea mai mare diferență s-a observat în cazul benzii vibraționale localizate la 1008 cm^{-1} . Tratamentul cu 5azaC a dus la o creștere a intensității pentru majoritatea benzilor vibraționale prezente în spectrul SERS al ambelor linii de leucemie.

Concluzii:

Analiza Raman a permis discriminarea între ADN-ul canceros și cel normal pe baza diferențelor de metilare. Prin analiza SERS efectuată pe aceleași probe s-a identificat o bandă vibrațională intensă la 1008 cm^{-1} , care poate fi considerată semnătura moleculară a metilării ADN-ului. În cazul liniilor celulare de leucemie (DAMI Luc2 și MEG-1) tratate cu 5-azaC, a fost detectată o creștere per ansamblu a intensităților benzilor vibraționale. Aceste rezultate pot fi explicate dacă se are în vedere faptul că doar o fracțiune mică din deoxiriboza 5-azaC este încorporată în ADN, iar restul rămâne sub formă de trifosfat încorporat în ARN.

Studiul 3. Interacțiuni între nanoparticule plasmonice și compuși farmaceutici

Scop: Investigarea interacțiunilor dintre macrociclul CB[7] și enantiomerii atenolului (Ate) la scară nanometrică

Obiective:

1. Evaluarea geometriei de interacțiune dintre compușii farmaceutici și NPs plasmonice prin calcule teoretice
2. Examinarea semnăturii spectrale a acestor interacțiuni prin tehnica SERS
3. Determinarea potențialului CB[7] în discriminarea chirală între enantiomerii R și S ai Ate

Materiale și metode:

Teoria Funcțională a Densității (DFT) a fost utilizată pentru determinarea geometriei de interacțiune dintre CB[7] și cei doi enantiomeri ai Ate.

Pentru partea experimentală, s-au preparat sistemele supramoleculare în raport stoechiometric de 1:1 prin amestecarea unor volume echivalente din soluția CB[7] cu fiecare soluție de enantiomer. Probele au fost depuse pe substratele plasmonice solide, iar apoi s-au măsurat spectrele SERS.

Rezultate:

Conform calculelor DFT, complexele formate prezintă două conformații distincte. În cazul conformației A, inelul fenil al Ate este poziționat în centrul cavității CB[7], iar în cazul conformației B, acest inel se află în afara cavității.

Spectrele SERS ale complexelor formate între macrociclul CB[7] și enantiomerii Ate sunt dominate de benzile vibraționale localizate la 449, 835 și 1048 cm^{-1} . Au fost observate diferențe minore de intensitate pentru soluția de concentrație 1 mM. În schimb, pentru soluția de 0.1 mM, au fost observate diferențe clare de intensitate în ceea ce privește amplificarea în spectrul complexului R-Ate@CB[7], comparativ cu S-Ate@CB[7].

Concluzii:

Analiza DFT a contribuit la înțelegerea interacțiunilor dintre moleculele de CB[7] și cei doi enantiomeri ai Ate. Conformerii RUA@CB[7] s-au dovedit a fi mai stabili datorită faptului că între enantiomerul R și CB[7] se formează patru legături de hidrogen, în timp ce enantiomerul S formează doar două legături de hidrogen cu molecula gazdă. Spectroscopia SERS a confirmat experimental această afinitate ușor crescută a macrociclului CB[7] față de enantiomerul R al Ate.

CONCLUZII GENERALE

Design-ul experimental în cadrul analizelor SERS trebuie să fie adaptat la natura fizico-chimică a analitului și la obiectivele specifice cercetării. Această teză ilustrează abordarea unor strategii specifice, fiind structurată în trei studii distincte, dar complementare. Acestea sunt axate pe utilizarea tehnicilor Raman/SERS pentru evaluarea interacțiunilor la scară nanometrică dintre NPs plasmonice și diverse molecule.

În cadrul primului studiu, NPs plasmonice de aur și argint au fost sintetizate în vederea dezvoltării de substraturi solide SERS cu sensibilitate și reproductibilitate ridicate. Aplicarea unei proceduri de purificare și concentrare după sinteză a condus la obținerea unei populații omogene de NPs. Efectuând o analiză comparativă a proprietăților de amplificare a semnalului, s-a determinat că NPs de argint oferă performanțe superioare pentru aplicații de detecție. Prin urmare, acest tip de substraturi a fost utilizat în următoarele două studii din cadrul acestei cercetări.

Cel de-al II-lea studiu valorifică capacitatea tehnicii Raman/SERS de a evidenția modificările epigenetice din structura acizilor nucleici la scară nanometrică. Prin intermediul tehnicii SERS, s-a reușit identificarea benzilor vibraționale asociate cu citozina metilată, remarcându-se banda vibrațională situată la 1008 cm^{-1} . Acest lucru a fost posibil prin introducerea unei etape de denaturare termică a probelor de ADN în prezența substratului plasmonic. Datorită acestei strategii s-a reușit evidențierea diferențelor de metilare între ADN-ul provenit de la linia celulară normală și cele de leucemie. De asemenea, efectul unui agent de demetilare a fost investigat prin intermediul SERS, evidențiindu-se încorporarea acestuia în structura ADN-ului.

În cel de al III-lea studiu, a fost adoptată o strategie diferită de pregătire a probelor: complexul de analiți a fost depus direct pe substraturile solide pe bază de NPs plasmonice de Ag pentru a investiga interacțiunile de tip host-guest dintre enantiomerii atenololului și macrociclul CB[7]. Calculele teoretice, au permis o înțelegere în detaliu a geometriei moleculare, stabilității complexelor și totodată a facilitat atribuirea benzilor vibraționale. Combinația de metode teoretice și experimentale a relevat o afinitate preferențială a macrocilului în legarea enantiomerului R al Ate, fenomen evidențiat mai ales la concentrații foarte scăzute.

Selecția de metode prezentată în această teză – de la sinteza NPs până la protocoalele de pregătire a probelor – a fost atent adaptată caracteristicilor structurale și chimice ale analiților investigați. Prin integrarea unor design-uri experimentale diferite, această cercetare subliniază importanța adaptării modului de lucru atât la clasa de analit, cât și la tipul de interacțiune de explorat la scară nanometrică (de suprafață, modulată epigenetic sau recunoaștere host-guest). Această abordare flexibilă, dar țintită, a permis studierea unor medii diverse și a oferit perspective fundamentale asupra recunoașterii moleculare și interacțiunilor, dar și rezultate cu potențial practic precum detectarea metilării ADN-ului și discriminarea chirală.

ORIGINALITATEA ȘI CONTRIBUȚIILE INOVATIVE ALE CERCETĂRII DOCTORALE

Originalitatea acestei teze derivă din aplicarea metodelor de spectroscopie vibrațională ultrasensibilă în studiul interacțiunilor la scară nanometrică dintre NPs și molecule biologice, respectiv farmaceutice. Tehnicile de spectroscopie Raman și SERS permit analiza în timp real, oferind perspective detaliate asupra geometriei de interacțiune dintre molecule și substratele plasmonice.

NPs plasmonice sunt componente cheie în dezvoltarea substratelor SERS. În primul studiu s-a evidențiat faptul că Ag NPs prezintă proprietăți plasmonice superioare pentru amplificarea semnalului Raman, comparativ cu Au NPs.

În al doilea studiu a fost descrisă o strategie inovatoare pentru analiza spectrală a ADN-ului monocatenar (mcADN). Dezvoltarea unei metode noi de analiză ce implică un tratament termic la 94°C, a permis interacțiunea eficientă dintre mcADN și suprafața plasmonică. Datorită acestei abordări, tehnica SERS a oferit informații valoroase despre metilarea ADN-ului. Protocolul propus este versatil, aplicabil în diverse condiții experimentale și are potențialul de a inspira dezvoltarea unor noi platforme de detecție în cercetarea genetică.

În al treilea studiu, noutatea constă în îmbinarea metodelor experimentale și teoretice în vederea caracterizării interacțiunilor la scară nanometrică dintre nanostructurile plasmonice și compușii farmaceutici. Rolul CB[7] în discriminarea între enantiomerii R și S ai Ate a fost raportat pentru prima dată. Similar studiului anterior, metodologia propusă în această lucrare poate servi drept cadru de referință pentru evaluarea altor molecule farmaceutice și a potențialului de selector chiral al altor compuși.

Abordarea multidisciplinară demonstrată pe parcursul acestei teze aduce contribuții semnificative în înțelegerea fundamentală a interacțiunilor la scară nanometrică petrecute între diverse clase de molecule și nanoparticule. Studiile prezentate oferă perspective promițătoare, care pot fi extinse cu ușurință la o gamă largă de sisteme moleculare, accelerând inovația în domeniul nanotehnologiei și facilitând implementarea acestora în contexte clinice și în industria farmaceutică.

PhD THESIS ABSTRACT

Exploring the nanoscale interactions of plasmonic nanoparticles with biological media and pharmaceutical compounds

PhD Student: **Anca ONACIU (GHENȚ)**

PhD Supervisor: **Prof. Dr. Rareș-Ionuț ȘTIUFIUC**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

TABLE OF CONTENTS

INTRODUCTION	1
STATE OF THE ART	3
1. Plasmonic nanoparticles	5
1.1. Synthesis methods	6
1.2. Characterization techniques	7
2. Nanoscale interactions between plasmonic nanoparticles and media	13
2.1. Key interaction mechanisms	13
2.2. Physico-chemical properties that influence NPs interactions with media	17
2.3. Experimental conditions	19
2.4. Methods for nanoscale interactions characterization	21
3. Biomedical and pharmaceutical applications of plasmonic nanoparticles	25
PERSONAL CONTRIBUTION	27
4. Goal and objectives	29
5. 1 st Study. SERS substrates based on noble metal plasmonic nanoparticles	31
5.1. Introduction	31
5.2. Objectives	33
5.3. Materials and methods	33
5.4. Results	36

5.5. Discussions	48
5.6. Conclusions	50
6. 2 rd Study. Plasmonic nanoparticles-biological media interaction	51
6.1. Introduction	51
6.2. Objectives	52
6.3. Materials and methods	53
6.4. Results	55
6.5. Discussions	61
6.6. Conclusions	65
7. 3 rd Study. Plasmonic nanoparticles-pharmaceutical compounds interaction	67
7.1. Introduction	67
7.2. Objectives	70
7.3. Materials and methods	70
7.4. Results	71
7.5. Discussions	78
7.6. Conclusions	80
8. General conclusions	81
9. Originality and Innovative Contributions of the Thesis	83
REFERENCES	85
APPENDIX	121

Keywords: plasmonic nanoparticles, Raman/SERS, DNA methylation, atenolol enantiomers, macrocycles, geometry of interaction

LIST OF PUBLICATIONS

Full-length articles published as a result of the doctoral research

1. Onaciu A, Toma V, Moldovan C, Țigu AB, Cenariu D, Culic C, Borșa RM, David L, Știuțiu GF, Tetean R, Tomuleasa C, Știuțiu RI. Nanoscale Investigation of DNA Demethylation in Leukemia Cells by Means of Ultrasensitive Vibrational Spectroscopy. *Sensors (Basel)*. 2022 Dec 29;23(1):346. doi: 10.3390/s23010346. PMID: 36616944; PMCID: PMC9823440. ISI Impact factor - 3.4, Q2
2. Onaciu A, Toma V, Borșa RM, Chiș V, Știuțiu GF, Culic C, Lucaciu CM, Știuțiu RI. Investigating Nanoscale Interactions of Host-Guest Complexes Formed Between CB[7] and Atenolol by Quantum Chemistry and Ultrasensitive Vibrational Spectroscopy. *Sensors (Basel)*. 2024 Nov 7;24(22):7156. doi: 10.3390/s24227156. PMID: 39598934; PMCID: PMC11598021. ISI Impact factor - 3.4, Q2

INTRODUCTION

Plasmonic nanomaterials exhibit remarkable optical, electrical, and catalytical properties which can support the development of a wide range of biomedical applications. Therefore, their investigation under various conditions is of great interest.

Both biological and pharmaceutical environments may contain a variety of molecules (such as proteins, nucleic acids, lipids, etc.) that can be adsorbed onto the surface of nanoparticles (NPs). Studying the nanoscale interactions between NPs and these different molecules involves a complex methodology. On the one hand, microscopy techniques are generally used to evaluate NPs physical properties but can also be employed to monitor NPs under different experimental conditions. On the other hand, spectroscopic methods can provide valuable insights into the phenomena occurring at the NP interface. In addition, techniques for assessing surface charge and particle size may also be applied. Last but not least, theoretical calculations offer a complementary perspective, enriching the informational spectrum of research in this area.

The aim of this doctoral thesis is to deepen the analysis of nano-bio and nano-pharma interfaces approaching ultrasensitive vibrational spectroscopy techniques.

STATE OF THE ART

The interactions between nanomaterials and specific molecules present in various media have a major impact on the identity of the nanostructures. This aspect forms the foundation for the development of medical and pharmaceutical applications. The physico-chemical properties of NPs (size, shape, surface chemistry) along with experimental conditions (suspension media, pH, exposure time, and doses) represent the main parameters influencing the interactions between NPs and the components of surrounding media.

The key mechanisms of interaction between plasmonic NPs and media molecules can be classified as physical (optical, mechanical, thermal) and chemical (hydrogen and covalent bonds, van der Waals forces, electrostatic).

The scientific research literature describes various methods for evaluating the interactions between different classes of NPs and media. Some techniques used for NPs characterization can also be applied to their analysis under varying conditions, including the investigation of molecular interactions.

Microscopy techniques used in the characterization of nanostructures require high resolution to enable the observation of nanoscale phenomena. In this context, transmission electron microscopy (TEM), confocal microscopy, and dark-field microscopy allow for the identification and localization of NPs at the cellular level.

Spectroscopy methods employed in NPs characterization processes enable the quantification of interactions occurring at the nanoscale. Among the most commonly used methods are Raman spectroscopy, Surface Enhanced Raman Spectroscopy (SERS), Fourier Transform InfraRed (FTIR) spectroscopy and Nuclear Magnetic Resonance (NMR).

SERS is a powerful tool for investigating interactions between NPs and various media allowing for the detection of different molecules bound to or located in close proximity to the NP surface. The methodology is characterized by simplicity, reproducibility, high sensitivity, and stability, as well as time efficiency and low costs. Furthermore, this technique does not require prior labeling of the sample. Noble metal plasmonic NPs are frequently used due to their localized plasmon resonance, which produces strong electromagnetic and chemical enhancement of the signal from molecules near the substrate surface. In this way, the spectral investigation of the interaction modes between various molecules and the NP surface at the nanoscale becomes possible.

PERSONAL CONTRIBUTIONS

Study 1: SERS substrates based on noble metal plasmonic nanoparticles

Aim: To obtain stable and reproducible SERS substrates for sensing applications

Objectives:

1. Obtaining plasmonic NPs
2. Determining NPs physico-chemical properties
3. Selecting the proper NPs for SERS applications

Materials and methods:

Plasmonic noble metal NPs were obtained using wet chemistry reduction methods. A supplementary purification and concentration step was employed by using tangential flow filtration (TFF) procedure. Then, the physico-chemical properties of silver and gold NPs were investigated by means of UV-Vis spectroscopy, TEM, nanoparticle tracking analysis (NTA), and atomic force microscopy (AFM). Substrates preparation method involved the deposition of 1 μ L of colloid onto of CaF₂ Raman grade glass followed by a drying step at 40°C. Two different standard molecules (methylene blue and rhodamine 6G) were measured by means of SERS.

Results:

According to AFM measurements, both types of plasmonic NPs have formed self-assembled nanolayered architectures onto the Raman grade glass. Homogenous surfaces were identified at 20-30 μ m from the edge of the substrate. The presence of little aggregates of NPs determined certain rugosity which favors the creation of active sites (hotspots) that can be rapidly occupied by analyte molecules.

The spectra recorded on the standard molecules' solutions have presented a uniform tropism when using silver plasmonic NPs and variable patterns in the case of gold NPs. By comparing the intensity of 1512 cm^{-1} band in both Raman and SERS spectra of rhodamine 6G, it was clearly evident that its Raman signal is strongly enhanced when using silver substrates.

Conclusions:

Both silver and gold NPs have interesting physico-chemical properties that recommend their use in sensing applications. A deepen analysis of two standard molecules has revealed that silver plasmonic NPs exhibit high-quality features. They present superior reproducibility, enhancement efficiency and sensitivity in detecting low concentrations of analytes as compared to gold NPs. These findings suggest that silver plasmonic NPs are proficient in achieving ultra-sensitive detection in SERS measurements.

Study 2: Plasmonic nanoparticles-biological media interaction

Aim: To assess the nanoscale interaction of plasmonic NPs with DNA samples and to investigate DNA methylation.

Objectives:

1. Investigating 5-azacitidine treatment effect on different cell lines
2. Developing a protocol for the analysis of DNA by means of Raman and SERS
3. Evaluating the DNA methylation pattern

Materials and methods:

Leukemia cancer cells (DAMI Luc2, MEG-1) and normal cells (LX2) were incubated with varying concentrations of 5-azacytidine (5-azaC) to determine half-maximal inhibitory concentrations (IC_{50}). These doses were applied to the cells for 72 h, followed by DNA extraction. Nanoscale structural modifications were monitored using Raman and SERS spectroscopy. For SERS analysis, a heat treatment at 94 °C was applied to facilitate the interaction between DNA strands and plasmonic NPs.

Results:

Raman spectra of DNA extracted from the two leukemia cell lines exhibited similar profiles, distinct from the spectra of DNA from normal cells, especially in the 1000–1700 cm^{-1} spectral region. After treatment with 5-azaC, a significant increase in intensity was observed for most bands in both cancer samples, with a more pronounced effect in MEG-1 cells as compared to DAMI Luc2.

In the case of SERS spectra, the most notable difference appeared at the 1008 cm^{-1} band. Treatment with 5-azaC led to an increase in intensity for the majority of vibrational bands in the DNA isolated from leukemia cell lines.

Conclusions:

Raman analysis enabled discrimination between leukemia and normal DNA based on differences in methylation patterns. SERS analysis highlighted a strong vibrational band at 1008 cm^{-1} , which serves as a reliable fingerprint for DNA methylation. In leukemia cell lines treated with 5-azaC, an overall increase in vibrational band intensities was detected. These results can be explained by considering the fact that only a small fraction of 5-azaC deoxyribose is incorporated into DNA, while the rest remains in its triphosphate form integrated into RNA.

Study 3: Plasmonic nanoparticles-pharmaceutical compounds interaction

Aim: To investigate the nanoscale interactions between the CB[7] macrocycle and Atenolol (Ate) enantiomers

Objectives:

1. Evaluating the molecular geometry of interaction between pharmaceutical compounds and plasmonic NPs by theoretical calculations
2. Examining the spectral signature of such interactions by means of SERS
3. Determining CB[7]'s chiral discrimination potential between R-(+) and S(-) drug enantiomers

Materials and methods:

Density Functional Theory (DFT) was used to determine the geometry of interaction between CB[7] and the two enantiomers of Ate.

For the experimental part, supramolecular systems were prepared at a 1:1 stoichiometry ratio by mixing equivalent volumes of CB[7] solution with each enantiomer solution. The samples were deposited on solid plasmonic substrates and SERS measurements were performed.

Results:

According to DFT calculations, the complexes present two distinct conformations. In the case of A-type conformation, the phenyl ring of Ate is positioned in the middle of the CB[7] cavity, while in the case of B-type conformation, the Ate phenyl ring stands outside the CB[7] cavity.

The SERS spectra of complexes formed between CB[7] macrocycles and Ate enantiomers, are dominated by the bands located at 449, 835, and 1048 cm^{-1} . For a solution of 1 mM, minor intensity differences were observed. For 0.1 mM concentrations, noticeable amplification differences were observed regarding the spectrum of R-Ate@CB[7] complex with respect to S-Ate@CB[7].

Conclusions:

DFT analysis contributed to understanding the binding interactions arising between CB[7] molecules and the two enantiomers of Ate. RUA@CB[7] conformers resulted in having an increased stability due to the four H-bonds established between R-Ate and CB[7] as compared to S-enantiomer which form only two H-bonds with the host molecule. These subtle differences in affinity were experimentally confirmed through SERS spectroscopy, which demonstrated a slightly higher binding preference of the CB[7] macrocycle for the R-enantiomer of Ate.

GENERAL CONCLUSIONS

The design of experimental workflow in SERS analysis must be adapted to the physicochemical nature of the analyte and to the specific research objectives. This thesis illustrates the implementation of targeted strategies, structured into three distinct yet complementary studies. These studies focus on the application of Raman/SERS techniques to evaluate nanoscale interactions between plasmonic NPs and various molecules.

In the first study, gold and silver plasmonic NPs were synthesized for the development of solid SERS substrates with high sensitivity and reproducibility. The inclusion of a post-synthesis purification and concentration procedure resulted in a monodisperse population of NPs. A comparative analysis of signal enhancement properties revealed that silver NPs offer superior performance for sensing applications. Consequently, Ag NPs were employed in the following two studies of this research.

The second study explores the capacity of Raman/SERS techniques to detect epigenetic modifications in the structure of nucleic acids at the nanoscale. Using SERS, vibrational bands associated with methylated cytosine were successfully identified, with a notable signal observed at 1008 cm^{-1} . This achievement was made possible by introducing a thermal denaturation step of the DNA samples in the presence of the plasmonic substrates. This strategy enabled the differentiation of methylation patterns between DNA from a normal cell line and that from leukemia cell lines. Moreover, the effect of a demethylating agent was investigated by means of SERS, which clearly demonstrated its incorporation into the DNA structure.

In the third study, a different sample preparation strategy was adopted: the analyte complexes were directly deposited onto solid plasmonic Ag NPs substrates to investigate host-guest interactions between the enantiomers of atenolol and the CB[7] macrocycle. Theoretical calculations provided detailed insight into molecular geometry and complexes stability, while also facilitating the assignment of vibrational band. The combination of theoretical and experimental approaches revealed a preferential binding affinity of the macrocycle for the R- enantiomer of atenolol, a phenomenon particularly evident at very low concentrations.

The methodology presented in this thesis - from NPs synthesis to sample preparation protocols - was carefully adapted to the structural and chemical characteristics of the analytes. By integrating different experimental designs, this research highlights the importance of tailoring the analytical workflow to both the analyte class and the type of nanoscale interaction under investigation (surface-driven, epigenetically modulated, or host-guest recognition). This flexible yet targeted approach enabled the study of diverse molecular systems and provided both fundamental insights into molecular recognition and interactions, as well as practical outcomes, such as DNA methylation detection and chiral discrimination.

ORIGINALITY AND INNOVATIVE CONTRIBUTIONS OF THE THESIS

The originality of this thesis lies in the application of ultrasensitive vibrational spectroscopy methods to the study of nanoscale interactions between NPs and biological or pharmaceutical molecules. Raman and SERS spectroscopy techniques enable real-time analysis, providing detailed insights into the geometry of interaction between molecules and plasmonic substrates.

Plasmonic NPs are key components in the development of SERS substrates. In the first study, it was found that silver NPs exhibit superior plasmonic properties for Raman signal enhancement compared to gold NPs.

In the second study, an innovative strategy for the spectral analysis of single stranded (ssDNA) was described. The involvement of a heat treatment at 94°C enabled effective interaction between ssDNA and the plasmonic surface. As a result, SERS method was able to deliver valuable information regarding DNA methylation. The proposed protocol is versatile, applicable under various experimental conditions, and holds the potential to inspire the development of new detection platforms in genetic research.

In the third study, novelty stems from the integration of experimental and theoretical methods to characterize nanoscale interactions between plasmonic nanostructures and pharmaceutical compounds. Notably, the role of CB[7] in discriminating between R and S enantiomers of atenolol was reported for the first time. As in the previous study, the methodology proposed here may serve as a reference framework for the evaluation of other pharmaceutical molecules and for assessing the chiral selector potential of other compounds.

The multidisciplinary approach demonstrated throughout this thesis contributes significantly to the fundamental understanding of nanoscale interactions between various classes of molecules and NPs. The studies presented offer promising perspectives that can be readily extended to a wide range of molecular systems, accelerating innovation in the field of nanotechnology and facilitating its implementation in clinical contexts and pharmaceutical industry.