

**UNIVERSITATEA BABEȘ-BOLYAI CLUJ NAPOCA**  
**FACULTATEA DE FIZICĂ**  
**SPECIALIZAREA FIZICĂ MEDICALĂ**



**LUCRARE DE LICENȚĂ**

**Coordonator științific**

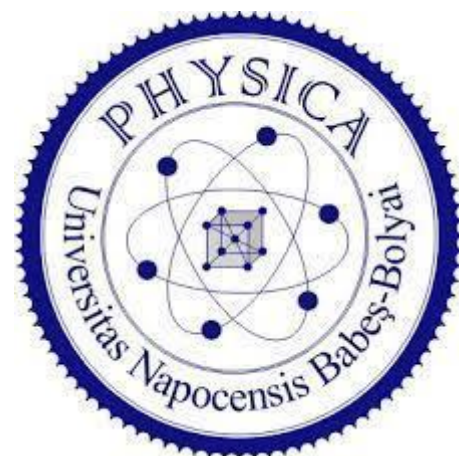
Prof. dr. Nicolae Leopold

**Absolvent**

Hada Giulia Roberta

2023

**UNIVERSITATEA BABEȘ-BOLYAI CLUJ NAPOCA**  
**FACULTATEA DE FIZICĂ**  
**SPECIALIZAREA FIZICĂ MEDICALĂ**



**LUCRARE DE LICENȚĂ**

**Optimizarea detecției SERS a moleculei uracil**

**Coordonator științific**

Prof. dr. Nicolae Leopold

**Absolvent**

Hada Giulia Roberta

**2023**

# CUPRINS

<b>ABSTRACT.....</b>	<b>4</b>
<b>INTRODUCERE .....</b>	<b>5</b>
<b>CAPITOLUL I. STUDIUL SPECTROSCOPIC AL URACILULUI.....</b>	<b>7</b>
<b>CAPITOLUL II. METODE SPECTROSCOPICE IR SI RAMAN .....</b>	<b>11</b>
<b>II.1. Spectroscopia Raman.....</b>	<b>11</b>
II.1.1. Efectul Raman și energiile de tranziție.....	13
II.1.2. Reguli de selecție și principii pentru spectroscopia Raman .....	14
II.1.3. Aplicațiile spectroscopiei Raman .....	18
<b>II.2. Spectroscopia Raman Amplificată de Suprafață (SERS).....</b>	<b>18</b>
II.2.1. Efectul SERS.....	20
II.2.2. Amplificarea câmpului electromagnetic .....	21
II.2.3. Amplificarea chimică.....	21
<b>II.3. Spectroscopia de absorbție în infraroșu (IR) .....</b>	<b>22</b>
II.3.1. Reguli de selecție și principii pentru spectroscopia în domeniul infraroșu .....	24
II.3.2. Aplicațiile spectroscopiei de absorbție în infraroșu .....	25
II.3.3. Spectrometrul de absorbție în infraroșu .....	26
<b>CAPITOLUL III. METODE EXPERIMENTALE.....</b>	<b>29</b>
<b>III.1. Sinteza nanoparticulelor de Ag coloidal (hya-AgNPs) .....</b>	<b>29</b>
<b>III.2. Sinteza nanoparticulelor de Ag acoperite cu citrat (cit-AgNPs).....</b>	<b>30</b>
<b>III.3. Aparat și materiale .....</b>	<b>32</b>
<b>CAPITOLUL IV. REZULTATE ȘI DISCUȚII .....</b>	<b>34</b>
<b>CONCLUZII.....</b>	<b>40</b>
<b>BIBLIOGRAFIE .....</b>	<b>41</b>

## ABSTRACT

The central theme of the thesis is the optimization of SERS detection of the uracil molecule. The SERS technique can be addressed by both direct and indirect detection. Direct detection, also called free-label, consists of assigning the spectra recorded to the sample itself, whereas the SERS spectra appear from SERS labels, used to signal the analyte of interest.

Surface-enhanced Raman spectroscopy is a unique experimental method used in various applications, analytically developed and used in the characterization and detection of molecules. It is based on the amplified Raman scattering intensity effect performed on molecules when they are located on nanostructured metal surfaces. Uracil is important in biochemistry and organic chemistry.

Nanoscale materials are of great interest in various scientific, engineering, and biomedical fields. The basic argument is that nanoscale materials, typically between 1 and 100 nm, exhibit exceptional structural and functional properties not found in heavier materials.

The study shall present the optimization of SERS detection of the uracil molecule. The optimization study of the SERS detection of the uracil molecule indicates optimal conditions for obtaining the SERS spectrum of the uracil molecule:  $8 \times 10^{-6}$  M concentration, silver colloid reduced with citrate and supplemented with  $\text{Ca}^{2+}$  ions of concentration  $5 \times 10^{-2}$  M. The presence of calcium ions results in a SERS signal with intense bands. The presence of  $\text{Mg}^{2+}$  ions at a concentration of  $5 \times 10^{-2}$  M also allows SERS spectra of the uracil molecule to be obtained, but weak bands are shown. In contrast,  $\text{Zn}^{2+}$  ions at  $5 \times 10^{-2}$  M do not contribute to the amplification of the SERS signal of the uracil molecule.

Although the results presented in this study can be improved, the SERS analysis of uracil is an area in constant development. Thus, this work supports the possibilities and advantages of the applicability of the SERS spectroscopy in this field.

## INTRODUCERE

Tema centrală a lucrării de licență este reprezentată de optimizarea detecției SERS a moleculei uracil. Spectroscopia Raman amplificată de suprafață este o singura metodă experimentală utilizată în diferite aplicații, analitică dezvoltată și folosită în caracterizarea și detecția moleculelor. Se bazează pe efectul amplificat a intensității de dispersie Raman efectuat pe molecule, în momentul în care sunt situate pe suprafețele metalice nanostructurate. Uracilul este important în domeniul biochimic și al chimiei organice.

Detecția moleculei uracil cu tehnica spectroscopică tradițională Raman transmite limitări specifice din cauză că nivelul de semnal care se obține este scăzut. Utilizarea spectroscopiei Raman amplificată de suprafață creează posibilități semnificative de evoluție a selectivității și sensibilității în detectarea moleculei de uracil. Acest fapt deschide noi orizonturi în domeniul de analize moleculare.

Lucrarea cuprinde patru capitole principale în care se prezintă studiul spectroscopic al uracilului, metode spectroscopice, experimentale și rezultate științifice și discuții.

Capitolul I descrie studiul spectroscopic al uracilului. În acest capitol se regăsește o scurtă descriere a moleculei uracil. Totodată sunt prezentate spectrele uracilului, structura, formula chimică și aplicațiile biomedicale.

Al doilea capitol prezintă clasic și semicuantic bazele teoretice ale spectroscopiei Raman și derivatele acesteia. De asemenea sunt introduse tehnicile absorbție în infraroșu (IR) și spectroscopia de absorbție UV-VIS.

În Capitolul III sunt prezentate metodele experimentale utilizate în laborator. Sunt descrise modul de sinteză a nanoparticulelor de argint, aparatura și materialele necesare utilizate.

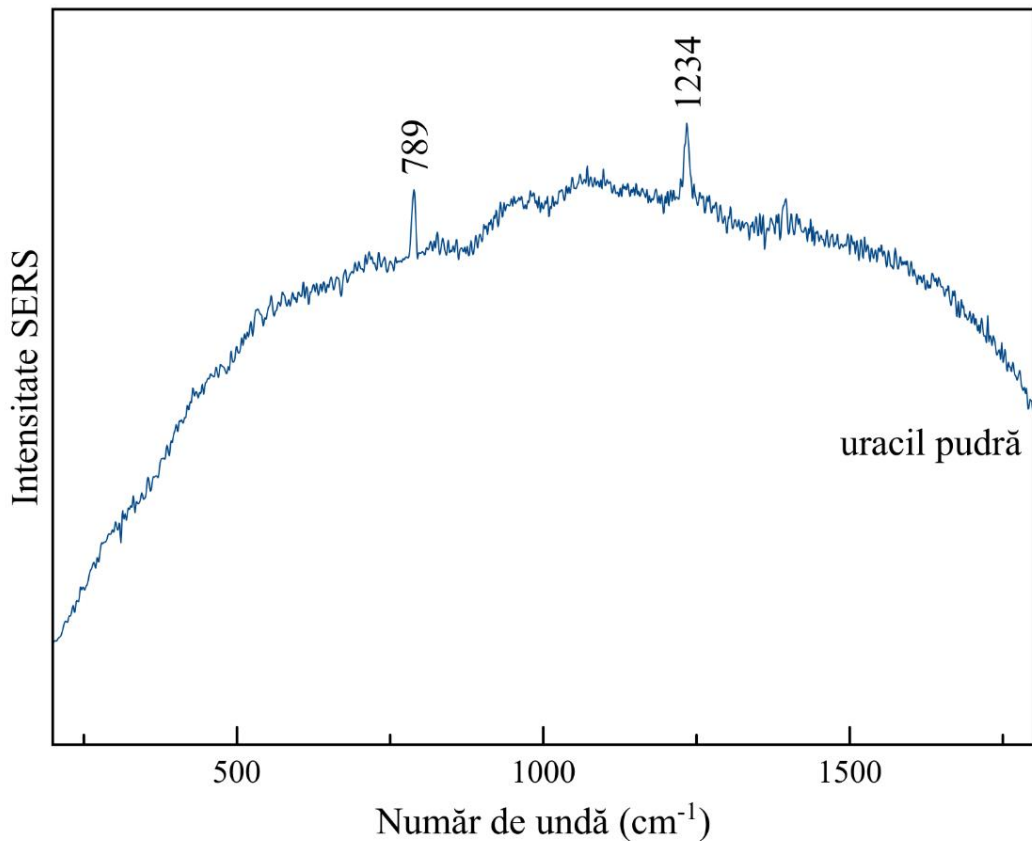
Capitolul IV, cuprinde rezultatele obținute precum și analiza acestora. Partea experimentală cuprinde achiziționarea spectrelor SERS a moleculei uracil. Tot în acest capitol este abordat studiul spectrelor SERS la diferite concentrații și în prezența a diferiți ioni, în vederea optimizării detecției SERS a moleculei uracil.

Studiul optimizării detecției SERS a moleculei uracil indică condițiile optime pentru obținerea spectrului SERS a moleculei uracil: concentrația  $8 \times 10^{-6}$  M, coloid de argint redus cu citrat și suplimentat cu ioni de  $\text{Ca}^{2+}$  de concentrație  $5 \times 10^{-2}$  M. Prezența ionilor de calciu determină un semnal SERS cu benzi intense. Prezența ionilor de  $\text{Mg}^{2+}$  la concentrația  $5 \times 10^{-2}$  M permite de

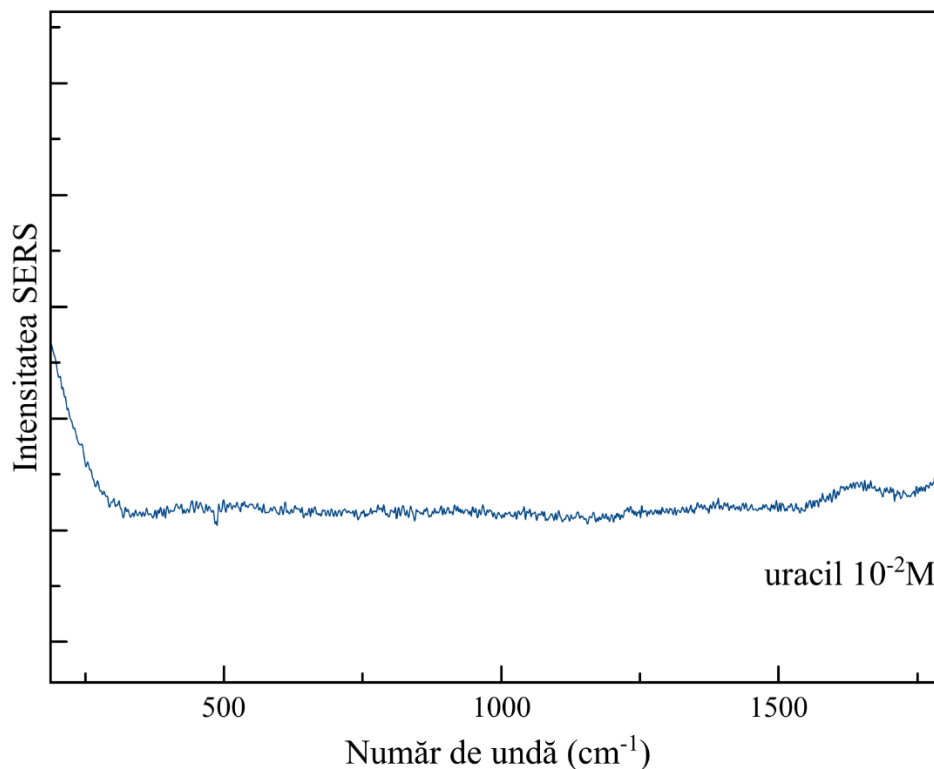
asemenea obținerea spectrelor SERS ale moleculei uracil, dar se evidențiază benzi de slabă intensitate. În schimb, ionii de  $Zn^{2+}$  la concentrația  $5 \times 10^{-2}$  M nu contribuie la amplificarea semnalului SERS a moleculei uracil.

## CAPITOLUL I. STUDIUL SPECTROSCOPIC AL URACILULUI

Studiul spectroscopic al uracilului reprezintă metoda științifică care examinează interacțiunea luminii cu baza azotată identificată în ADN și ARN, uracilul. În această metodă de cercetare este permis studiul în detaliu al caracteristicilor spectroscopice ale uracilului, precum împrăștierea, absorbția și emisia de lumină în distincte domenii ale spectroscopiei electromagnetice. Cu ajutorul investigațiilor de însușiri spectroscopice am obținut diferite informații despre moleculă: structura, comportamentul în situații practice diversificate și compoziția chimică. [1]



**Figura I.1.** Spectrul SERS al uracilului sub formă de pulbere



**Figura I.2.** Spectrul SERS al uracilului la concentrația 10<sup>-2</sup> M

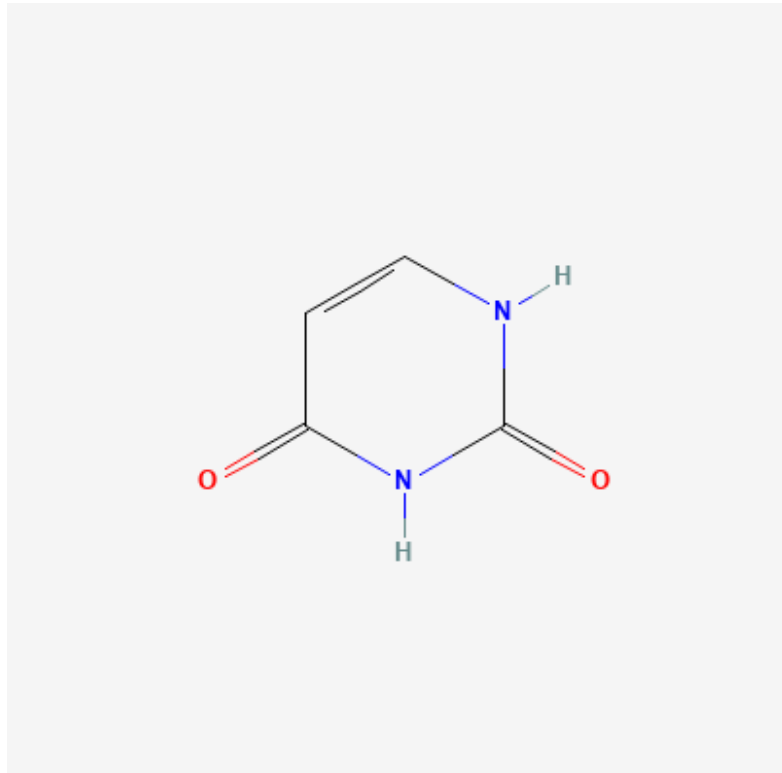
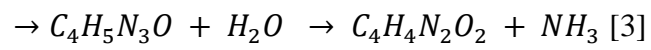
Uracilul face parte din clasa de compuși organici, clasa de compuși chimici a căror moleculă are legătura chimică hidrogen-carbon, denumiți pirimidone. Pirimidona conține în structura sa un inel de pirimidină care transportă o cetonă. Spre deosebire de pirimidonă, pirimidina reprezintă inelul format din șase atomi, dintre care patru atomi sunt de carbon și doi centri de azot situați în pozițiile 1 și 3. Uracilul este pirimidina comună și naturală regăsită în ADN, baza acesteia fiind asociată cu adenina, iar în timpul de transcripție al ADN-ului să substituie timina. [1]

Robert Behrend, este chimistul german care a inventat numele „uracil” în anul 1885. Acesta a încercat să sintetizeze derivații acidului uric. Abia în anul 1900, uracilul a fost descoperit și se găsește în toate organismele vii: bacterii, plante, chiar și la în oameni. Funcționarea celulelor prin legătura cu riboze și fosfați este realizabilă doar prin utilizarea de uracil care îmbunătățește efectuarea sintezei a numeroaselor enzime. [1]

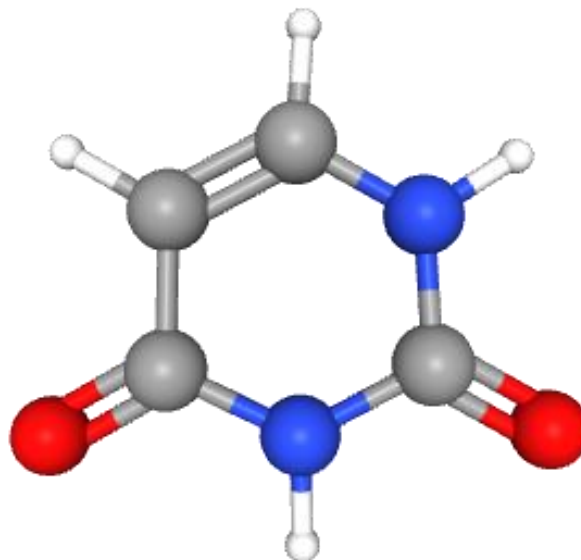
Uracilul este o pulbere albă, solidă cu formula chimică  $C_4H_4N_2O_2$ , cu masa molară 112,09 g/mol și care se topește la 339 ° C. Molecula este un compus chimic cristalin, incolor, inodor și care nu prezintă fosforescență. Are ca proprietate fizică absorbția luminii, și ca proprietate chimică principală aparierea realizată prin constituirea de 2 legături de hidrogen. [2] [3]

Uracilul este sintetizată în laborator prin reacția apei cu citozina:





**Figura I.3.** Reprezentarea structurii chimice 2D. [3]



**Figura I.4.** Reprezentarea structurii chimice 3D. [3]

Spectroscopia uracilului are un rol foarte însemnat în progresarea de medicamente și cercetarea științifică. Acest studiu spectroscopic facilitează înțelegerea proceselor biochimice și la detecția de posibile interacțiuni cu diferite substanțe.

Uracilul este studiat în cazul unor terapii și afecțiuni particulare. Este utilizat ca marker în detectarea de rare boli genetice, precum tulburarea de metabolism a pirimidinei. Testul generic evidențiază mutația din gena implicată în metabolismul uracilului și oferă informații despre riscul de dezvoltare al afecțiunii respective.

Totodată, uracilul este utilizat în chimioterapie ca un medicament. Câteva exemple de medicamente anticanceroase care conțin uracil sau derivați ai uracilului sunt fluorouracilul, tegafur-uracilul sau capecitabina. Aceste substanțe menționate anterior au rolul de a împiedica și de a stopa diviziunea celulară și dezvoltarea tumorii prin inhibarea de sinteză de ARN și ADN în celulele canceroase.

Pe de altă parte uracilul este regăsit și în studiile de cercetări științifice ample din domeniul de medicină molară și de biochimie. Cercetătorii examinează mecanismul de interacțiune al uracilului cu proteinele și alte molecule, spre exemplu enzimele care sunt implicate în repararea ADN-ului. Aceste studii ajută în dezvoltarea de tratamente noi și strategii de terapie în lupta împotriva bolilor genetice și de cancer. [2]

## CAPITOLUL II. METODE SPECTROSCOPICE IR SI RAMAN

### II.1. Spectroscopia Raman

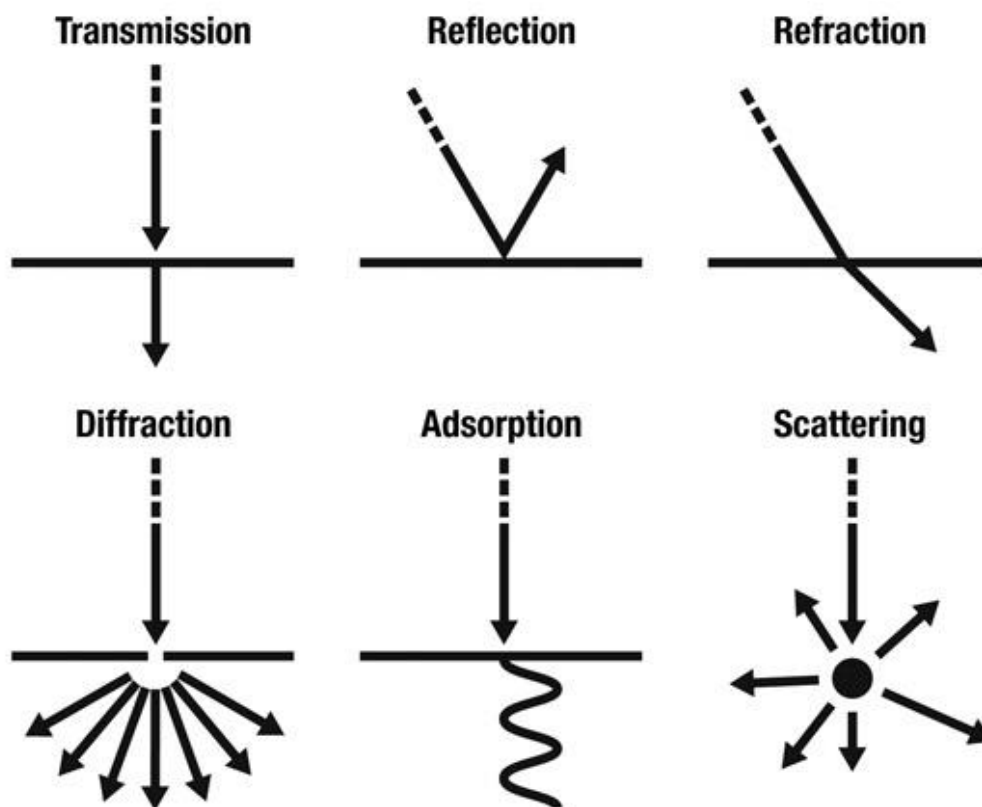
În India în anul 1921 a fost descoperit un efect de împrăștiere Raman de către Chandrasekhara Venkata Raman. Acest fenomen a fost intuit teoretic de Smekal, iar C.V. Raman și K.S. Krishnan au constatat în India aproape concomitent cu G. Landersberg și L. Mandelstan în Rusia. Utilizând unelte primitive precum ochiul ca detector și soarele ca sursă de lumină, Raman a găsit acest efect intitulat împrăștiere Raman Stokes. [4]

Tehnica spectroscopică care prezintă atât informații cantitative, cât și calitative se numește spectroscopia Raman. Pentru a se determina compoziția chimică a probei se utilizează spectroscopia optică ce stă la baza interacțiunii luminii cu materia. Aceasta interacțiune se poate clasifica în trei grupe elementare, acestea fiind reflexia, refracția și transmisia. Împrăștierea inelastică a luminii pe probă stă la baza spectroscopiei Raman, fiind folosită pentru a măsura o structură chimică a probei, în acest caz substanța uracil. [5] [6] [7]

Tehnica analitică excepțional de utilă pentru cercetarea materialelor este tehnica descrisă anterior. Spectroscopia Raman suportă înregistrarea de informație chimică, biochimică și structurală din spectre cu rezoluție spectrală înaltă.

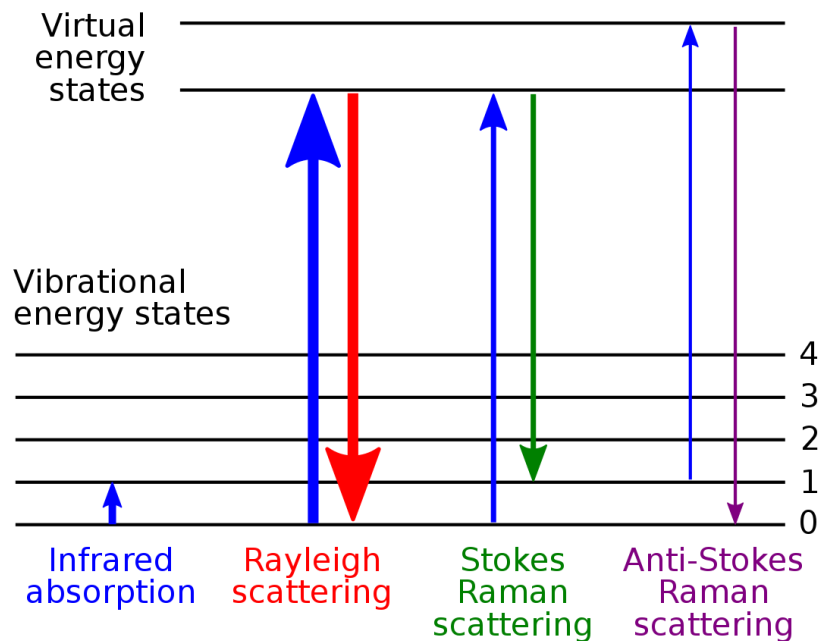
La început spectroscopia Raman s-a aplicat analiza chimică a probelor biologice, dar în ultima perioadă s-a utilizat o creștere semnificativă în folosirea tehnicii studiilor biomedicale pentru înțelegerea mai eficientă și accelerată a structurilor biologice din corpul uman. Informațiile sunt obținute fără clasarea probei datorită analizei Raman care este accesibilă și ușor de realizat. Nu este necesară prepararea probei, astfel această tehnică fiind cea mai eficientă în cazul lucrării. [8]

Lumina ultravioletă, vizibilă și infraroșie are la bază același principiu, acesta fiind spectroscopia Raman. Lumina transmisă printr-un mediu cauzează în mod inevitabil o anumită interacțiune a proprietăților electrice ale moleculelor (polarizarea și momentul dipol) și a componentei electrice a câmpului electromagnetic, iar dacă lumina se intersectează cu o suprafață, aceasta interacționează cu molecula din materialul de pe suprafață. Între mediu și radiație există mai multe tipuri de interacțiune: de refracție, reflexie, transmisie difractată împrăștiată sau absorbită.



**Figura II.1.** Tipuri de interacțiune a luminii cu mediul. [9]

Tehnica spectroscopică aplicată la constatarea modurilor de vibrație, rotație și ale altor moduri de mișcare a unui sistem, mișcare cu o frecvență redusă se numește spectroscopia Raman. Sir C. V. Raman a aflat în anul 1928 această tehnică spectroscopică în lichidele organice, pe care a denumit-o după numele său. [10] În domeniile UV-VIS (UltraViolet) sau NIR(Near Infrared light) este utilizată lumină monocromatică. Domeniile menționate anterior sunt utilizate în evidențierea fenomenului de împrăștiere inelastică a radiațiilor sau a luminii. Creșterea (anti-Stokes) sau scăderea (Stokes) energiei fotonilor de pe nivelul energetic virtual este evidențiat de efectul Raman. Energia crește și scade datorită luminii care interferează cu modul vibrațional al legăturilor chimice afișate în probă în Figura II.2. Shiftul denumit și schimbul de energie prezintă existența modurilor discrete din moleculele polarizabile. Astfel se poate obține o măsurătoare a compoziției biochimică calitativă.



**Figura II.2.** Nivele de energie din spectroscopia Raman. [10]

În analiza biomaterialelor se utilizează o tehnică excepțională denumită spectroscopia Raman, aceasta prezintă o specificitate molară ridicată. Efectul de împrăștiere Raman (inelastic) deține probabilitatea de producere redusă, chiar dacă este potrivită pentru analizarea materialelor.

### II.1.1. Efectul Raman și energiile de tranziție

Împrăștierea Raman sau atomii, reprezintă procese fizice în care lumina este inclusă și poate să fie caracterizată pe baza fizicii cuantice în descrierea nivelurilor energetice moleculare (electronice și vibraționale). Pe proba biologică sunt focalizați fotoni printr-un obiectiv de microscop care interacționează cu moleculele din probă și electronii sunt excitați pe nivelurile de energie virtuală. Pe aceste nivele inițiale de energie revin apoi moleculele din probă prin dezexcitarea radioactivă. Împrăștierea Rayleigh, respectiv împrăștierea elastică este provocată de excitația emisiei de fotoni. Există dezexcitări care suferă o schimbare a nivelului de energie final (shift) întorcându-se la un nivel de energie ridicat (Stokes) sau la un nivel de energie scăzut (anti-Stokes). [4]

Ciocnirea elastică și inelastică a fotonilor incidenți și a moleculelor de pe probă este arătată printr-o manieră simplificată de termeni denumită difuzia Raman. Fotonii incidenți de energie  $h\nu_0$  implicați în ciocnirea elastică reies din difuzia fotonilor cu energie egală ( $h\nu_0$ ) în toate sensurile. Fotonii împrăștiați nu conferă date asupra moleculelor din probă, această modalitate este una

favorizată. De asemenea se obțin informații despre ciocnirile inelastice, unde în urma ciocnirii cu moleculele de pe probă fotonii incidenți ( $h\nu_0$ ) au două variante: primesc sau cedează energie. Astfel că fotonul difuzat are în final energia următoare:

$$h\nu_f = h\nu_0 \pm h\nu_k$$

unde  $h\nu_0$  reprezintă energia primită sau cedată a fotonului.

Energia cinetică nu se modifică, aceasta fiind:

$$E_0 + h\nu_0 = h\nu_f + E_1$$

unde  $E_0$  reprezintă energia de vibrație a moleculei înaintea ciocnirii și respectiv  $E_1$  este energia vibrațională după ciocnire.

Împrăștierea Raman este scrisă:

$$\nu_0 - \nu_f = \left( \frac{E_1 - E_0}{h} \right)$$

Difuzia Raman este detectată doar în cazul în care  $E_0 = E_1$ , adică ciocnirea este elastică. Difuzia Stokes și difuzia anti-Stokes este constatată doar dacă  $\nu_f < \nu_0$  sau  $\nu_f > \nu_0$ .

Această regulă de selecție  $\Delta V = -1; 0; 1$  este utilizată în spectroscopia Raman în concordanță cu difuziile Stokes, anti-Stokes și respectiv Rayleigh. În momentul în care schimburile din frecvență sunt măsurate, frecvența de radiație incidentă  $\nu_0$  nu mai este criticată.

Linia cu cea mai mare intensitate dintre liniile Stokes, anti-Stokes și Rayleigh este ultima menționată. Pentru a apărea difuzia anti-Stokes molecula este necesar să dețină o stare vibrațională excitată, iar pentru apariția difuziei Stokes molecula se află în stare vibrațională fundamentală. Distribuția Boltzmann este reprezentată de formula următoare:

$$\frac{N_1}{N_0} = e^{-\left(\frac{\Delta E}{kT}\right)}$$

unde  $N_1$  este populația pentru prima stare de excitație, respectiv  $N_0$  este starea fundamentală și constanta Boltzmann este reprezentată prin  $k$ . Când temperatura se află la nivelul camerei linia Stokes este mult amplificată în comparație cu linia anti-Stokes, din cauză că există puține molecule în stare de excitație, iar marea majoritate a acestora sunt repartizate pe cel mai mic nivel vibrațional.[12] [13] [14] [15] [16]

## II.1.2. Reguli de selecție și principii pentru spectroscopia Raman

Polarizabilitatea moleculei este schimbată în funcție de mișcarea vibrațională atunci când aceasta este activă Raman. Rezultatul constatată în urma aplicării unui câmp electromagnetic extern cu frecvență ridicată este reprezentat de polarizabilitatea electronică măsurată a gradului de deformare a norului de electricitate molară. Vibrația de atomi din molecula și câmpul exterior aplicat sunt elemente care influențează distribuția de sarcina a electronilor periferici. Efectul Raman se bazează pe variația de polarizabilitate electronică, acesta creează momentul de dipol care transmite radiații electromagnetice pe mai multe nivele de frecvență. Frecvențele se află în contact direct cu frecvențele propagărilor de lumină excitatoare și cu frecvențele vibraționale moleculare. Efectul Raman este în concordanță cu frecvența de vibrație moleculară.

Spectrul Raman se excită cu radiația monocromatică de frecvență  $\nu_0$  și în lumina propagată este constatată o radiație cu frecvență egală cu radiația excitatoare numită difuzia Rayleigh. Când frecvența este mai mică decât  $\nu_0$  este observată difuzia Raman Stokes, iar când frecvența este mai mare decât  $\nu_0$  este remarcată difuzia Raman din domeniul anti-Stokes. Din cauza faptului că moleculele se situează în general pe cel mai scăzut nivel vibrațional intensitatea anti-Stokes este considerabil mai mică decât intensitatea domeniului Stokes. Din această cauză spectrul Raman este înregistrat în domeniul Stokes.

Dacă radiația monocromatică cade pe o moleculă și are frecvența  $\nu_0$ :

$$E = E_0 \cos(2\pi\nu_0 t),$$

aceasta formează în moleculă momentul de dipol de forma:

$$\mu = \alpha E = \alpha E_0 \cos(2\pi\nu_0 t),$$

unde  $\alpha$  reprezintă polarizabilitatea moleculei.

Polarizabilitatea se modifica în timpul de vibrației a moleculei și poate fi scrisă în serie Taylor:

$$\alpha = \alpha_0 + \sum_k \left( \frac{\delta\alpha}{\delta Q_k} \right)_0 Q_k + \dots,$$

unde  $\alpha_0$  reprezintă polarizabilitatea poziției de echilibru.

Având în vedere faptul că:

$$E = E_0 \cos(2\pi\nu_0 t)$$

$$Q_k = Q_k^0 \cos(2\pi\nu_0 t)$$

unde  $\nu_k$  reprezintă frecvența de vibrație  $k$ , atunci polarizabilitatea este:

$$\alpha = \alpha_0 + \sum_k \left( \frac{\delta\alpha}{\delta Q_k} \right)_0 Q_k^0 \cos(2\pi\nu_0 t)$$

Momentul de dipol este:

$$\mu = E_0 \alpha_0 \cos(2\pi\nu_0 t) + \sum_k \left( \frac{\delta\alpha}{\delta Q_k} \right)_0 E_0 Q_k^0 [\cos 2\pi(\nu_0 + \nu_k) t] + \cos 2\pi(\nu_0 - \nu_k) t]$$

Din ecuația precedentă primul termen reprezintă difuzia Rayleigh, cel de-al doilea termen prezintă difuzia Raman anti-Stokes, iar ultimul termen descrie difuzia Raman Stokes.

Intensitatea luminii împrăștiată se află în raport direct cu produsul dintre frecvența de radiație excitatoare ridicată la puterea a patra și momentul de dipol la puterea a doua:

$$I \sim M_{ind}^2 \nu^4$$

Pentru banda Stokes și anti-Stokes particularizată avem:

$$I_{Stokes} = \left( \frac{\delta\alpha}{\delta q} \right)_0 Q^2 E_0^2 (\nu_0 - \nu)^4$$

$$I_{anti-Stokes} = \left( \frac{\delta\alpha}{\delta q} \right)_0 Q^2 E_0^2 (\nu_0 + \nu)^4$$

Pentru a calcula raportul intensităților celor două benzi a funcției de distribuție Boltzmann trebuie luată în vedere și popularea nivelelor vibraționale:

$$\frac{I_{anti-Stokes}}{I_{Stokes}} = \left( \frac{\nu_0 + \nu_k}{\nu_0 - \nu_k} \right)^4 \exp\left(-1,439 \frac{\overline{\nu_k}}{T}\right)$$

Intensitatea de difuzie Raman se reprezintă experimental prin ecuația:

$$I = kCI_0(\nu_0)^4$$

Unde C reprezintă concentrația speciei responsabilă în difuzie, k este constanta instrumentului, iar  $\nu_0$  descrie frecvența de radiație incidentă.

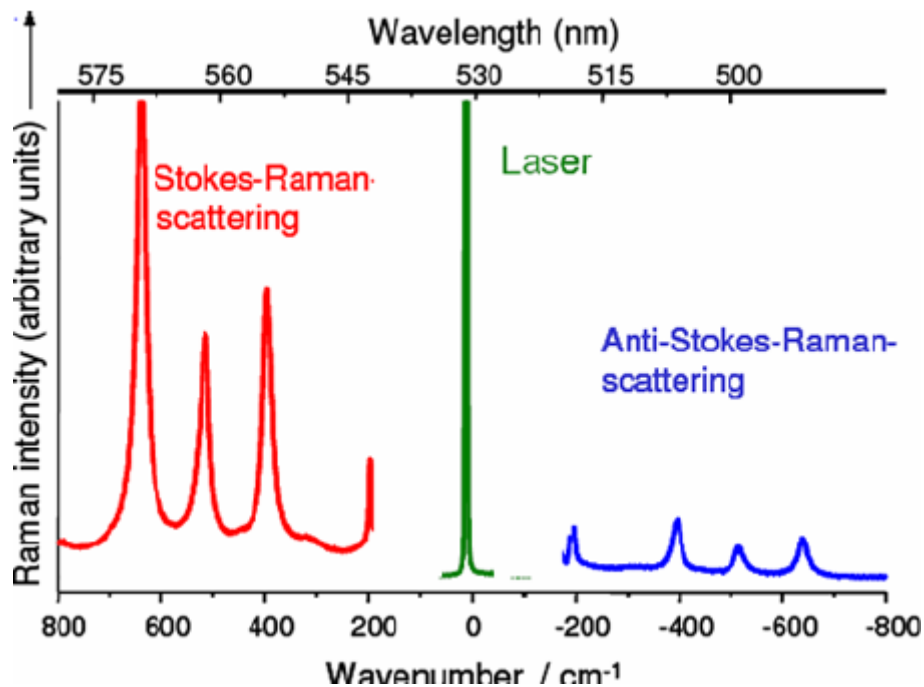
Unda electromagnetică care induce momentul de dipol în moleculă este lumina, aceasta fiind una dintre concluziile finale din abordarea subiectului prezentat, efectul Raman. Vibrația moleculară modulează formarea momentului de dipol de către un câmp electric incipient. Polarizabilitatea  $\alpha$  reprezintă funcția coordonatei vibraționale  $q$ . Dipolul indus fluctuează atât la frecvența câmpului incipient, cât și a benzilor laterale și la diferența frecvenței dintre vibrația moleculară și a luminii



incidente. Astfel este reprezentat prin apariția de benzi laterale Stokes și anti-Stokes din lumina propagată.

Avantajele remarcate prin utilizarea de laseri ca sursă de excitare în comparație cu metodele consacrate în obținerea de spectre Raman au evidențiat avansarea noii tehnicii experimentale și a fenomenelor de tip Raman.

Pentru a finaliza un experiment de tip împrăștiere Raman este necesar ca lumina, respectiv laserul să fie concentrat pe mostra care urmează să fie analizată cu ajutorul unei lentile. Lumina care se împrăștie este colectată cu ajutorul unei alte lentile și transmisă apoi în monocromator. La sfârșit intensitatea se măsoară cu un fotomultiplicator. De obicei lumina care se împrăștie este detectată pe direcție diferită ( $90^\circ$ ), din cauză că lumina trebuie să se reflecte pe probă, cu excepția cazului când în timpul experimentului este utilizat sub un microscop. [12] [13] [14] [15] [16]



**Figura II.3.** Reprezentarea schematică a efectului Raman. [17]

În figura este reprezentată pe coordonata X o scala energetica unde la valoarea 0 este indicată energia fotonilor incidenti, astfel ca energia reprezentativă procesului Raman Stokes este pozitivă, în timp ce energia corespunzătoare procesului Raman anti-Stokes este negativă. Se poate observa că difuzia Stokes este cu mult mai intensă comparativ cu difuzia anti-Stokes.

În figura sunt observate câteva vibrații, însă în realitate sunt prezente mult mai multe moduri vibrationale ale moleculelor organice. Spre exemplu, în cazul sticlei (material dezordonat) se observă benzi largi. [12] [13] [14] [15] [16]

### II.1.3. Aplicațiile spectroscopiei Raman

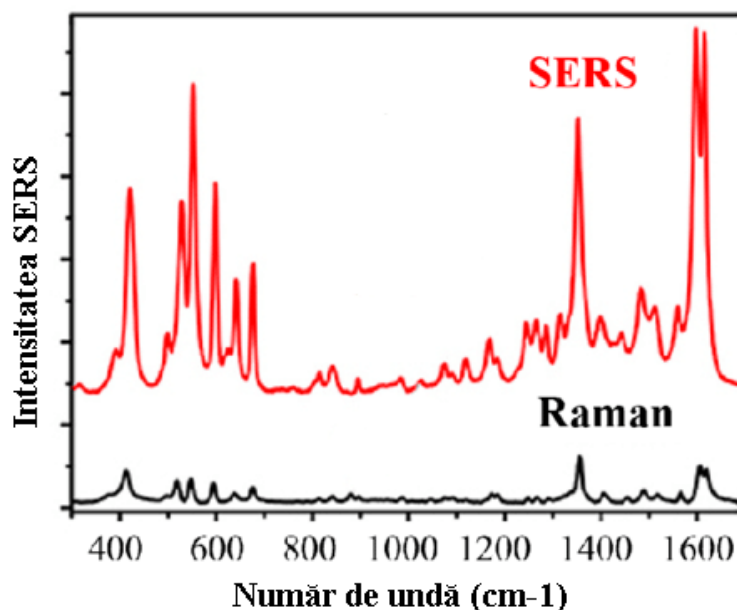
Energia vibrațiilor reprezintă o trăsătură specifică atât pentru structura de cristal a solidelor, cât și pentru materiale. În cazul solidelor, dacă este utilizată presiunea, poziția liniilor Raman este transformată, făcând în anumite cazuri ca presiunea să poate fi determinată.

Mijlocul intens folosit în investigarea proprietăților electronice ale moleculelor este reprezentat de cercetarea fenomenului rezonant identificat în momentul în care energia fotonilor incidenți este aceeași cu energia de tranziții electronice. [12] [13] [14] [15] [16]

## II.2. Spectroscopia Raman Amplificată de Suprafață (SERS)

Corelația strânsă a semnalului, concentrației și ușurința de achiziționare transformă spectroscopia Raman într-o tehnică foarte utilă în aplicațiile analitice. Cu toate acestea, această metodă prezintă un dezavantaj major. Sensibilitatea sa foarte slabă îngreunează achiziționarea de spectre ale probelor biologice, în special în momentul în care concentrația substanței de analizat este cu mult mai scăzută decât limita detecției spectroscopiei Raman.

În acest caz, chiar dacă este o problemă majoră, există o rezolvare pentru această problemă, aceasta fiind spectroscopia Raman amplificată de suprafață (SERS). Proba de concentrație micromolară sau nanomolară poate fi înregistrată utilizând spectroscopia Raman amplificată de suprafață. În momentul în care molecula produce un semnal Raman, atunci interacțiunea cu rezonanțele plasmonice situate pe substratul metalic amplifică semnalul, producând SERS. Pentru ca atașarea moleculelor să fie posibilă are nevoie de manipulări chimice și uneori este destul de greu de manipulat. Pentru a achiziționa semnalele detectabile este mult mai ușor cu ajutorul împrăștierii Raman, însă găsirea semnalelor slabe poate fi îngreunată. Pentru observarea semnalului, este important ca optimizarea corectă a diversilor parametri să fie redusă, în scopul de a maximiza suprafața, amplificarea, numărul de molecule absorbite și mecanismele optice utilizate. Orice moleculă este observabilă în SERS, însă unele molecule au nevoie de mai mult efort înainte ca semnalul să fie observat. [12] [13] [14] [15] [16]



**Figura II.4.** Reprezentarea schematică a spectrului SERS și a spectrului Raman. [18]

În Figura II.4. se poate observa diferența dintre un spectru Raman și un spectru SERS. Unitatea de măsură de pe axa orizontală este  $\text{cm}^{-1}$ , aceasta având valori egale pentru ambele spectre. Pentru a trece de la spectrul Raman la spectrul SERS este nevoie de amplificarea semnalului Raman. Spre deosebire de spectrul Raman, în spectrul SERS peak-urile sunt mult mai intense și zgomotul este mult mai slab.

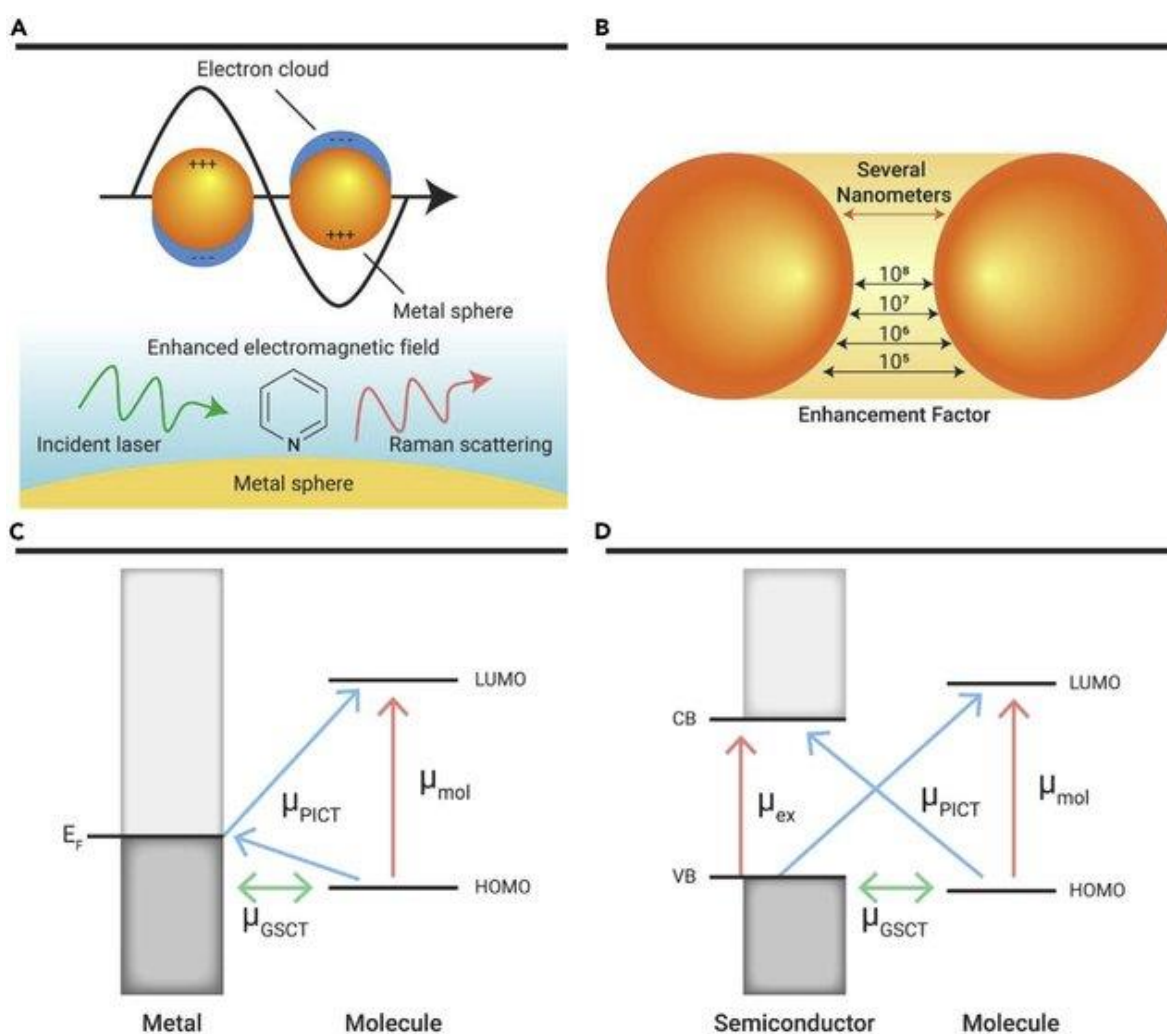
Fleishman a fost prima persoană care a observat spectroscopia Raman amplificată de suprafață în anul 1970, urmând ca mai târziu, să fie explicată de Jeanmarie și Van Duyne. Albert și Creighton au explicat-o și ei mai târziu în anul 1977. Primele observații despre spectroscopia Raman amplificată de suprafață sunt incompatibile cu descoperirea pe care acesta a făcut-o. Fleischman a utilizat metoda adsorbției piridinei pe suprafața unui electrod tratat electrochimic. Motivul de creștere a semnalului a fost atribuit creșterii de suprafață a substratului tratat. În anul 1978, Van Duyne și Creighton au sesizat că îmbunătățirea Raman este comparabil mai mare decât numărul moleculelor situate pe suprafața electronilor de argint. Aceștia au sugerat că această creștere este din cauza excitării de plasmoni de suprafață.

Spectroscopia Raman amplificată de suprafață este o metodă spectroscopică, cu ajutorul căreia sunt obținute informații despre procesul de interferență și suprafață. În domeniul biomedicinii și a biofizicii, SERS a descoperit noi posibilități spectroscopice. [12] [13] [14] [15] [16]

## II.2.1. Efectul SERS

Efectul SERS numit și efectul Raman amplificat de suprafață reprezintă o metodă care îmbină spectroscopie de laser contemporană cu excitarea de proprietăți optice a nanostructurilor de metal. Se obține semnalul Raman amplificat cu ajutorul moleculelor atașate structurii de dimensiune nanometrică a metalelor aur și argint. Astfel că, semnalul Raman achiziționat oferă informații despre structura moleculară a moleculelor adsorbite la suprafața metalică. Aceste informații sunt obținute în mod normal în spectroscopia Raman, însă semnalul este foarte amplificat și permite detecția semnalelor slab amplificate rezultate de la numărul scăzut de molecule.

Efectul SERS este explicat prin două efecte: amplificarea datorată câmpului electromagnetic și amplificarea chimică. Asupra amplificării SERS există o diferență de impact a celor două efecte. Efectul electromagnetic conduce la amplificarea mult mai mare în comparație cu efectul chimic. [12] [13] [14] [15] [16]



**Figura II.5.** Reprezentarea schematică a diferenței dintre efectul electromagnetic (A,C) și efectul chimic (B,D). [19]

## II.2.2. Amplificarea câmpului electromagnetic

Factorul de amplificare al câmpului electromagnetic, este inițiat din câmpul optic local amplificat în locul moleculelor situate în vecinătatea suprafeței metalice, din cauza excitării de rezonanță electromagnetică. Aceasta apare pe baza excitării colective de electroni de conducție pe stratul metalic mic, numit rezonanța plasmonului de suprafață. Cel mai ușor de abordat model în discuția despre conceptul de amplificare a câmpului electromagnetic datorat rezonanței de plasmon este prin tehnica particulei metalice sub forma de sferă.

Sfera metalică izolată susține oscilația de plasmoni de suprafață, oscilație colectivă a electronilor liberi situați în metalele ionice. Plasmonii dipolari sunt identificați în particulele mai mici comparativ cu lungimea de undă utilizată. Cu cât electronii din particulele de metal sunt mai liberi, cu atât plasmonii dipolari sunt mai rezonanți. Prin utilizarea unui laser de excitație care rezonază cu particulele mici, este emisă o radiație.

Momentul dipol regăsit în moleculă de câmpul incident și imagine este:

$$\mu = \alpha (E + E_{im})$$

$E$ ,  $E_{im}$  reprezintă câmpurile incident, respectiv imagine. Componenta  $z$  a polarizabilității moleculei este  $\alpha$ , iar  $E_{im}$  rezultă din formula:

$$E_{im} = \frac{[(\epsilon - \epsilon_0) / (\epsilon + \epsilon_0)\mu]}{4r^3}$$

Distanța dintre suprafață și dipol este notată cu  $r$ . Înlocuind relația devine:

$$\mu = \alpha [1 - (\alpha/4r^3)(\epsilon - \epsilon_0)/(\epsilon + \epsilon_0)]^{-1} E$$

Relația arată precum expresia convențională de moment de dipol indus cu influența câmpului electric  $E$ , doar că în locul polarizabilității  $\alpha$  are polarizabilitate efectivă:

$$\alpha_{eff} = \frac{\alpha}{1 - (\alpha/4r^3)(\epsilon - \epsilon_0)/(\epsilon + \epsilon_0)} \quad [12] [13] [14] [15] [16]$$

## II.2.3. Amplificarea chimică

Prin-strat este numele mecanismelor, din cauză că ele prevăd contactul direct al moleculei cu metalul. Acest mecanism este atribuit între interacțiunea specifică a moleculei cu metalul și formarea de complex adsorbat-suprafață, a cărui efect crește secțiunea efectivă Raman a moleculelor adsorbite, comparativ cu secțiunea efectivă a moleculelor libere din experimentul

Raman comun. El există datorită deplasării și lărgirii de nivele electronice ale moleculei adsorbite comparativ cu molecula liberă.

Efectul Raman amplificat de suprafață de prim-strat numit și transferul de sarcină diatomică este descris prin următoarele etape:

1. Anihilarea de foton și excitarea de electron în starea numită stare electronică „caldă”
2. Transferul de electron „cald” în orbitalul LUMO al moleculei
3. Transferul de electron „cald” din orbitalul LUMO în metalul inițial
4. Reîntoarcerea la starea inițială și generală a fotonului Stokes

Au fost descoperite studii la baza acestui mecanism, în ajutorul de explicare a factorului de amplificare mărit SERS, în spectroscopia Raman amplificat de suprafață pe o singura moleculă. Pe scara atomică a rugozității metalului, mecanismul de schimb dinamic încărcat cu sarcină este condiția anticipată în amplificarea chimică SERS. [12] [13] [14] [15] [16]

### II.3. Spectroscopia de absorbție în infraroșu (IR)

Informațiile despre modurile de vibrație și cele vibrațional-rotaționale ale moleculelor sunt descrise prin spectroscopia de absorbție în infraroșu și spectroscopia Raman. Când proba se regăsește în stare gazoasă, adică molecula este rotită liber, sunt observate benzile rotaționale. Când proba este în stare lichidă sau solidă, este observată doar frecvența de vibrație a probei. Cele două moduri sunt în subordinea condițiilor de simetrie. Vibrația este activată în spectroscopia de absorbție în infraroșu, dacă momentul de dipol variază în timpul vibrației. Vibrația activă Raman este vibrația care schimbă polarizabilitatea moleculară. Astfel că, activitatea modului de vibrație depinde de simetria moleculei și de simetria acesteia. Regula excuziunii mutuale reprezintă o regulă simplă de simetrie în care vibrația activă Raman, nu este activă IR și viceversa, în cazul moleculei cu centru de simetrie.

Oscilatorul armonic reprezintă cel mai simplu tip de moleculă diatomică de vibrație, pentru care distanța internucleară este schimbată cu energia potențială. Energia de vibrație cuantificată este:

$$E_v = hv \left( v + \frac{1}{2} \right), \quad v = 0,1,2 \dots$$

unde  $v$  reprezintă numărul cuantic vibrațional,  $h$  este constanta lui Planck și  $v$  definește frecvența de vibrație. Frecvența vibrațională reprezintă funcția de putere a legăturii unui oscilator armonic și masa redusă  $\mu$ :

$$v = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}}$$

În modelul oscilatorului armonic nivelul de energie de vibrație se află la distanță egală. Spațiul dintre nivelele energetice adiacente  $E$  este:

$$\Delta E = hv = h \sqrt{\frac{k}{\mu}}$$

Din numărul de atomi  $N$  ai moleculei și din forma moleculară se poate determina numărul de moduri de vibrație existente ale moleculei. Coordonatele carteziene ale fiecărui atom caracterizează geometria moleculară. Molecula conține  $3N$  grade de libertate, dintre care trei din acestea sunt utilizate pentru a specifica mișcarea de translație a moleculei, iar celelalte două sau trei grade (molecule liniare, respectiv neliniare) sunt esențiale în specificarea mișcării de rotație. Numărul de moduri de vibrație este în conformitate cu gradele de libertate rămase, adică:  $3N-5$  în favoarea moleculei liniare și  $3N-6$  la molecula neliniară.

Una dintre cea mai eficientă metodă de recunoaștere a existenței de grupări funcționale de polarizare din aranjarea moleculelor compușilor organici se numește spectroscopia în domeniul infraroșu.

Radiația infraroșie (IR) descrie partea spectrului electromagnetic situată între zona vizibilă și cea a microundelor. Aceasta este caracterizată prin lungimea de undă de ordinul  $10^{-5}$  m. În achiziționarea de spectre IR aplicate în determinarea de structură a compușilor organici este utilizat numai domeniul infraroșu. Acesta cuprinde lungimi de undă regăsite în domeniul 2,5- 25  $\mu\text{m}$ . De multe ori descrierea este găsită prin folosirea numerelor de undă situate în domeniul 400- 4000  $\text{cm}^{-1}$ .

Cele două tipuri de vibrații de grupuri din moleculă identificate în spectroscopia în domeniul infraroșu sunt: alungirea și deformarea. Vibrația de alungire, notată cu  $v$ , este o mișcare ritmică pe direcția axei de legătură covalentă. Astfel apare variația distanței interatomice, aceasta fiind denumită și vibrația de valență. Cea de a doua vibrație, numită și vibrația de deformare stă la baza principiului de modificare de unghi a două legături de covalență, având în comun un singur atom. În planul înfățișat de un grup de atomi, sau în afara acestuia, apar vibrații localizate din cauza unei mișcări a unui grup de atomi alături de restul moleculelor. Astfel sunt prezente posibilele vibrațiile de deformare în plan precum: vibrația de forfecare, notată cu  $\delta$ , și vibrația de rotire, notată cu  $\rho$ . Totodată este posibilă prezența unei vibrații de deformare și în afara planului evidențiată prin: vibrația de balans, notată cu  $\omega$  și vibrația de torsiune, notată cu  $\tau$ . [12] [13] [14] [15] [16]

## II.3.1. Reguli de selecție și principii pentru spectroscopia în domeniul infraroșu

Momentul de dipol al moleculei diatomice asimilează radiația infraroșie, doar în cazul în care este modificată după o schimbare de distanță intranucleară. Diferența de populație a două stări cuantice  $\Delta N$  și pătratul unui moment de dipol de tranziție  $M$ :

$$\text{probabilitatea de tranziție} \sim \Delta N |M|^2$$

unde, pentru molecula regăsită în stare electronică dată, momentul de dipol de tranziție a unei tranziții de vibrație corespunde formulei:

$$M = \int \Psi_v^* \mu_0^{(e)} \Psi_v d\tau$$

Starea de vibrație inițială și respectiv finală este reprezentată de funcția de undă  $\Psi_v^*$  și  $\Psi_v$ .

$\mu_0^{(e)}$  descrie permanența momentului de dipol electric din starea electronică. Permanența momentului de dipol electric a unei mișcări de vibrație a unei molecule diatomice se poate extinde în seria Taylor după ce se separă echilibrul intranuclear  $r_e$ :

$$\mu_0^{(e)} = \mu_e + \left(\frac{\partial \mu}{\partial r}\right)_{r_e} q + \frac{1}{2} \left(\frac{\partial^2 \mu}{\partial r^2}\right)_{r_e} q^2 + \dots$$

$q = r - r_e$  reprezintă distanța dintre nuclee la un moment dat;

$\mu_e$  reprezintă momentul de dipol în momentul în care legătura este în poziția de echilibru;

Înlocuind forma sporită a momentului de dipol electric în ecuația momentului de dipol a tranziției de vibrație se poate obține o probabilitate de apariție a unei tranziții de vibrație în molecula diatomică:

$$\int \Psi_v^* \mu_0^{(e)} \Psi_v d\tau = \mu_e \int \Psi_v^* \Psi_v d\tau + \left(\frac{\partial \mu}{\partial r}\right)_{r_e} \int \Psi_v^* q \Psi_v d\tau + \frac{1}{2} \left(\frac{\partial^2 \mu}{\partial r^2}\right)_{r_e} \int \Psi_v^* q^2 \Psi_v d\tau + \dots$$

Având în vedere faptul că funcțiile de undă vibraționale  $\Psi_v^*$  și  $\Psi_v$  sunt ortogonale, semnifică faptul că primul termen al ecuației este nul. Dacă momentul de dipol este în subordine cu distanța dintre nuclee  $r \left(\frac{\partial \mu}{\partial r}\right) \neq 0$ , atunci cel de al doilea termen este diferit de zero.

În momentul în care există o modificare de moment de dipol în timpul unei mișcări vibraționale va apărea adsorbția de vibrație în spectru a moleculelor biatomice. Pentru moleculele diatomice homonucleare, momentul de dipol este egal cu zero în cazul tuturor lungimilor de lanțuri și nu dețin spectru de adsorbție vibrațional. În teoria de mecanică cuantică este specificat faptul că adsorbția de lumină roșie apare doar în cazul în care modul de vibrație necesită o schimbare de



moment de dipol. Tot aici este prezentat faptul că nivelul de energie vibrațională din moleculă este cuantificat. Totodată, teoria menționează că tranzițiile au loc numai între nivelele adiacente de energie, din cauză că integrala din al doilea termen pentru polinomul Hermite care definește pentru oscilatorul armonic funcția de undă, nu este egală cu zero în cazul  $\Delta V = \pm 1$ .

Radiația infraroșie descrisă de numerele de undă mai mici de  $100 \text{ cm}^{-1}$  este posibil să fie absorbită de molecula compușilor organici și transformată în energie moleculară rotațională. Absorbția este cuantificată, acest fapt determinând achiziția de spectru de rotație al moleculei structurat din linii discrete. Molecula compușilor organici poate să absoarbă radiația infraroșie din domeniul  $10.000\text{-}100 \text{ cm}^{-1}$ , în urma căruia apar modificări de stări de vibrație moleculară. Absorbția menționată anterior este cuantificată. Spectrele de vibrație achiziționate cu ajutorul spectroscopiei IR sunt alcătuite din benzi care absorb, pentru că orice modificare de energie vibrațională este însoțită de modificări de energie rotațională.

Spectrul infraroșu este alcătuit din benzi de absorbție datorită vibrațiilor care participă simultan cu atomii din structura de molecule ale compusului organic examinat (vibrația normală). Poziția benzii de absorbție formată folosind excitarea de vibrație a unei grupe funcționale este convenabil specificată în spectru. Aceasta variază în limitele restrânse alături de gruparea funcțională din cadrul moleculei. Aproximativ la o valoare egală a unui număr de undă din spectrul infraroșu al moleculei se întâlnește o bandă de absorbție specifică cu aceeași grupare funcțională (vibrația specifică de grup).

Factorii de care este dependentă poziția benzii de absorbție al spectrului infraroșu sunt: geometria moleculei, constanta de forță a legăturii contributive în excitarea de vibrație și masa relativă a atomului. Energia vibrațională a legăturii de covalență are doar valori cuantificate în concordanță cu frecvența de oscilație a sistemului alcătuit din două mase conectate printr-un arc. [12] [13] [14] [15] [16]

### II.3.2. Aplicațiile spectroscopiei de absorbție în infraroșu

#### 1. Analize calitative

Spectrul infraroșu complex și unic al fiecărui compus în parte este alcătuit din combinația vibrațiilor și rotațiilor fundamentale a distinctelor grupări funcționale și interacțiunea subtilă cu alți atomi sau alte molecule. [12] [13] [14] [15] [16]

#### 2. Determinarea structurală

Absorbția infraroșie a grupărilor fundamentale variază pe o gamă complexă datorită interacțiunilor dintre atomii moleculei. Indiferent de relația pe care o au cu celelalte molecule s-a sesizat că multe grupări oferă absorbție infraroșie specifică la frecvență caracteristică în intervalele înguste. Tabelele cu pozițiile și intensitățile benzilor de absorbție sunt utilizate pentru determinarea grupărilor funcționale din moleculă. Toate graficele folosite de referință se află într-o bază de date. [12] [13] [14] [15] [16]

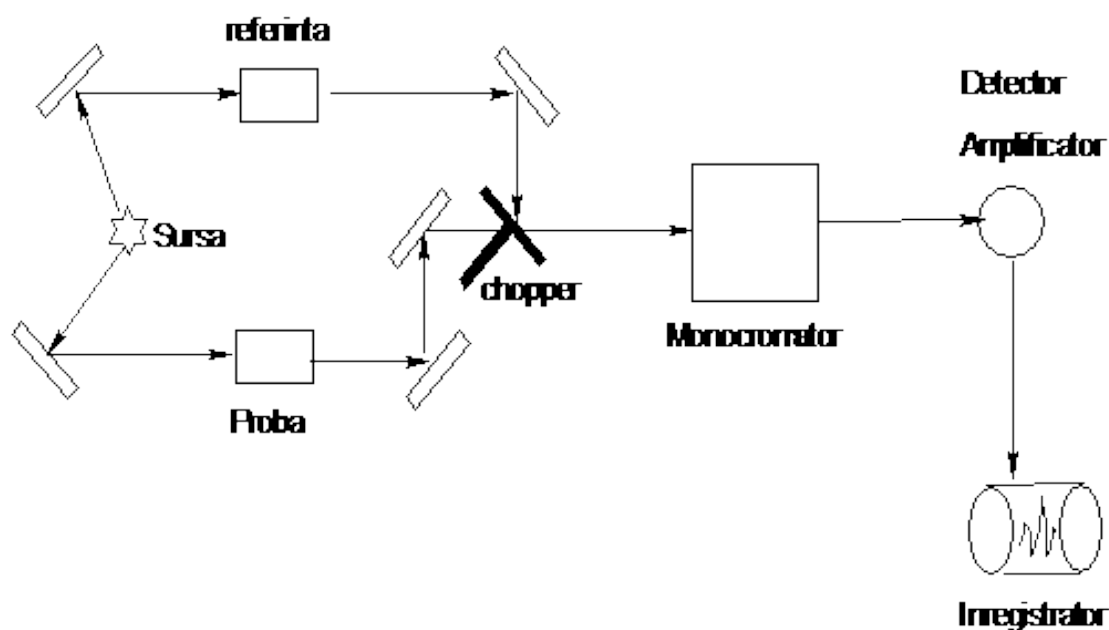
### 3. Determinarea identificării de componente

O metodă semnificativă de identificare a compușilor organici este de a identifica un spectru comparabil potrivit cu spectrul necunoscut, din cauză că spectrul oricărei molecule este unic. Pentru stările gazoase și lichide sunt disponibile o variată gamă de spectre de referință. Cu ajutorul programelor computerizate de identificare se poate realiza un proces de ușurare în potrivirea spectrelor. În cele mai multe cazuri nu se găsește o potrivire perfectă de spectru, în schimb programul oferă componente de referință care sunt compatibile cu spectrul materialului necunoscut. Când datele sunt comparate cu datele obținute din alte încercări de analize, precum spectroscopia de masă sau rezonanța magnetică nucleară, se poate realiza identificarea cu o precizie mare.

Scopul de creare al spectroscopiei infraroșii a fost de a oferi analize semicantitative și calitative a probelor, în special pentru momentul când datele sunt achiziționate cu ajutorul instrumentelor convenționale de dispersie. Dezvoltarea de instrumente și de prelucrare de date computerizată au adus un plus de valoare în determinările cantitative. [12] [13] [14] [15] [16]

#### II.3.3. Spectrometrul de absorbție în infraroșu

Spectrele infraroșii pot fi achiziționate cu ajutorul a două tipuri distincte de spectrometre IR: aparat clasic cu fascicul dublat de rază electromagnetică și nul optic sau dispozitiv contemporan cu irradiație în plusuri. Ambele aparate au la bază același principiu de funcționare. [12] [13] [14] [15] [16]



**Figura II.6.** Principiul de bază a spectrometrului infraroșu. [20]

Spectrometrul clasic este un dispozitiv unde radiația electromagnetică produsă de sursă este împrăștiată în două fascicule: unul este de referință, iar cel de-al doilea fascicul trece prin probă. Rolul spectrometrului cu fascicul dublu este de măsurare a diferenței de intensitate a celor două fascicule pentru toate lungimile de undă separat. Chopper-ul numit și „separatorul” reflectă cele două fascicule și este format dintr-o oglindă rotativă. După atingerea a celei de a 10-a a rotire pe secundă a chopperului se observă ca fasciculul care traversează proba și fasciculul de referință se reflectă alternativ pe rețeaua de difracție. Frecvența individuală este transmisă la detector, care transformă energia infraroșie în energie încărcată cu electroni. Rolul amplificatorului este de a intensifica curentul alternativ. Pe amplificator se detectează semnal, acesta este conectat cu un servomotor de dimensiuni destul de mici.

Există aparate care conțin prisme optice. Ele funcționează pe același principiu, doar că aici rețeaua de difracție este înlocuită cu prisma și oglinda rotativă separă frecvența individual.

Spectrometrul infraroșu cu transformată Fourier înlocuiește aparatul clasic doar după dezvoltarea de tehnici de informatică contemporane apt în achiziționarea și prelucrarea de cantități mari de date. Transformata Fourier este metoda utilizată prin care funcția descrisă în domeniul timpului este modificată în funcția din domeniul de frecvențe.

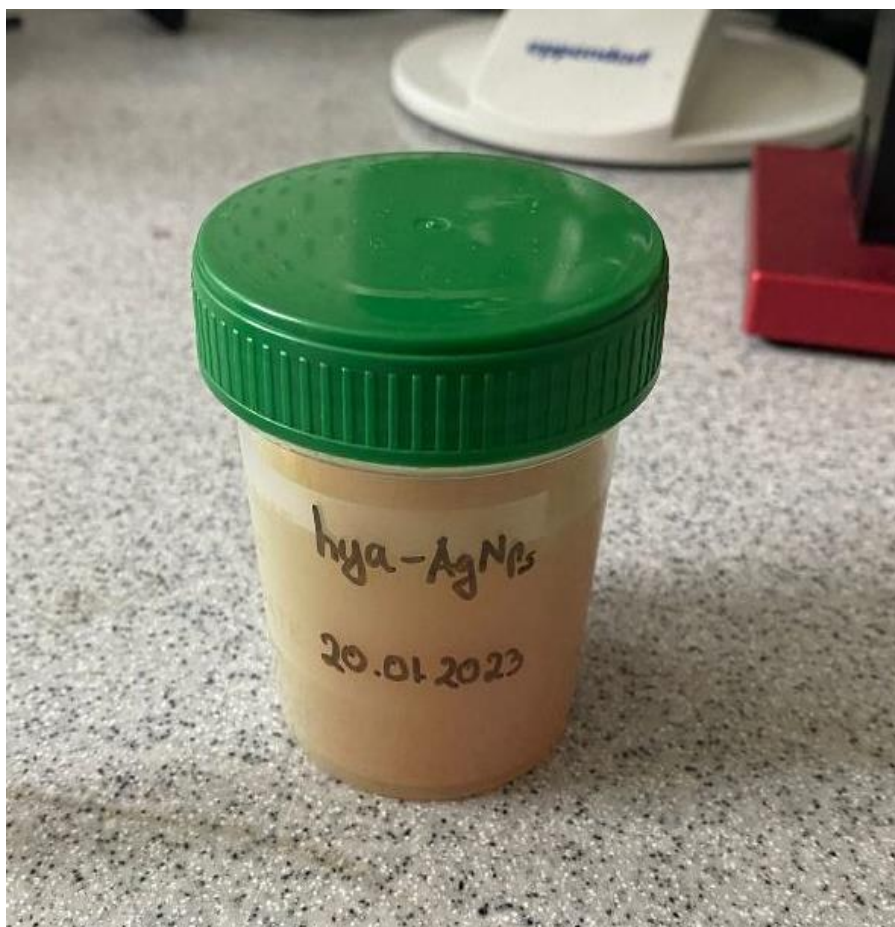
În dispozitivul FTIR raza emisă de sursă trece prima dată prin interferometru, apoi străbate alternativ proba, ca în final să fie obținute interferograme care se transformă în spectre infraroșii datorită transformatei Fourier. Spre deosebire de aparatele clasice, acest dispozitiv utilizează un

singur fascicul de lumina, adică este monofascicol, spectrul de referință fiind scăzut. Câteva avantaje ale acestei tehnici sunt timpul de înregistrare al spectrului mult mai scurt și precizia de citire a datelor specifice maximelor benzii de absorbție mult mai mare. [12] [13] [14] [15] [16]

## CAPITOLUL III. METODE EXPERIMENTALE

### III.1. Sinteza nanoparticulelor de Ag coloidal (hya-AgNPs)

Pentru sintetizarea nanoparticulelor de argint coloidal s-a utilizat metoda reducerii argintului cu hidroxilamina hidrocloridă. Pentru aceasta s-au preparate două soluții depozitate în recipiente separate. Prima soluție este formată din 0.020 g de sare de  $\text{AgNO}_3$  solvat în 90  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$  ultrapură, iar a doua soluție este formată din 0.020 g de hidroxilamina hidrocloridă solvată în 10  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$  ultrapură. S-a adăugat în compoziția finală 1200  $\mu\text{L}$  hidroxid de sodiu. Soluția finală este preparată prin amestecarea celor două soluții, fiind depozitată într-un recipient de plastic pe care s-a notat data în care a fost obținută soluția. La scurt timp se observă culoarea soluției coloidale verde-maronie.



**Figura III.1.** Soluție coloidală de nanoparticule de argint reduse cu hidroxilamină (hya-AgNPs).

### III.2. Sinteza nanoparticulelor de Ag acoperite cu citrat (cit-AgNPs)

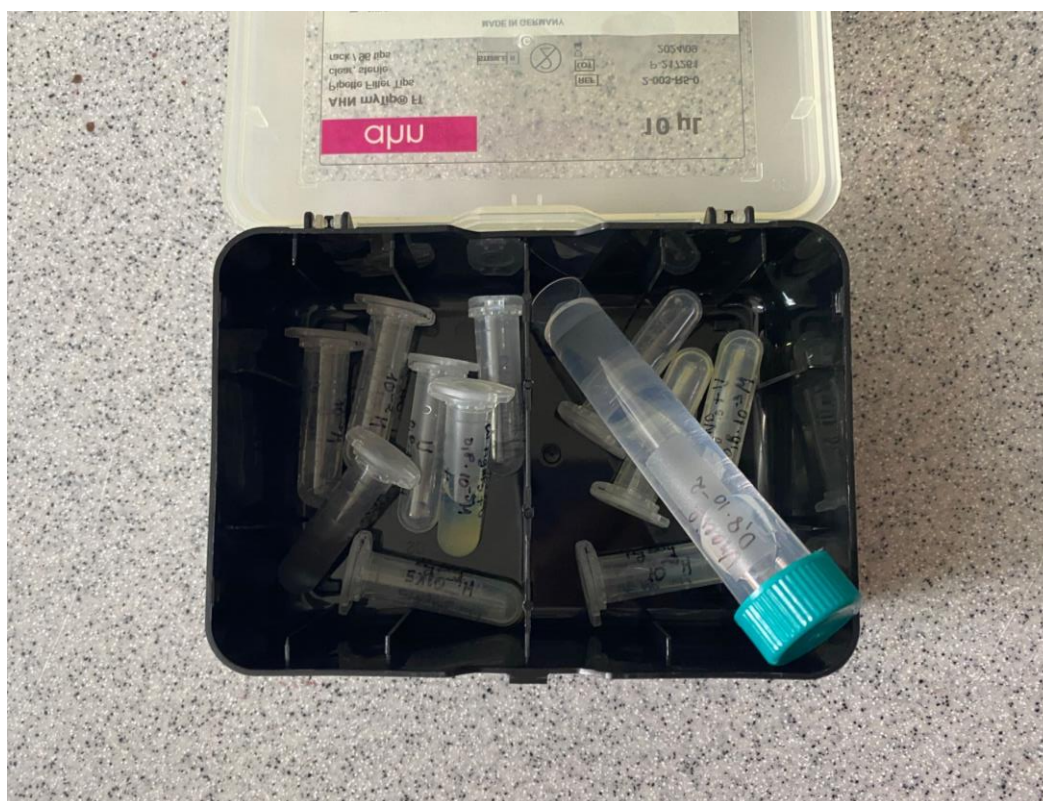
Pentru sintetizarea nanoparticulelor de argint acoperite cu citrat s-a utilizat metoda . Pentru aceasta s-a preparat o soluție din 0,017 g  $\text{AgNO}_3$  dizolvată în 98  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$  ultrapură. Coloidul este adus la punctul de fierbere prin punerea lui pe o plită electrică și adăugarea unui agitator magnetic, nanoparticulele de argint formându-se imediat. După atingerea punctului de fierbere se adaugă 2 mL de 1% soluție de citrat de sodiu. Soluția este lăsată la fiert timp de 30 de minute. După sinteza coloidală se observă un pH 6. [22]



**Figura III.2.** Nanoparticule de argint reduse și acoperite cu citrat (cit-AgNPs).



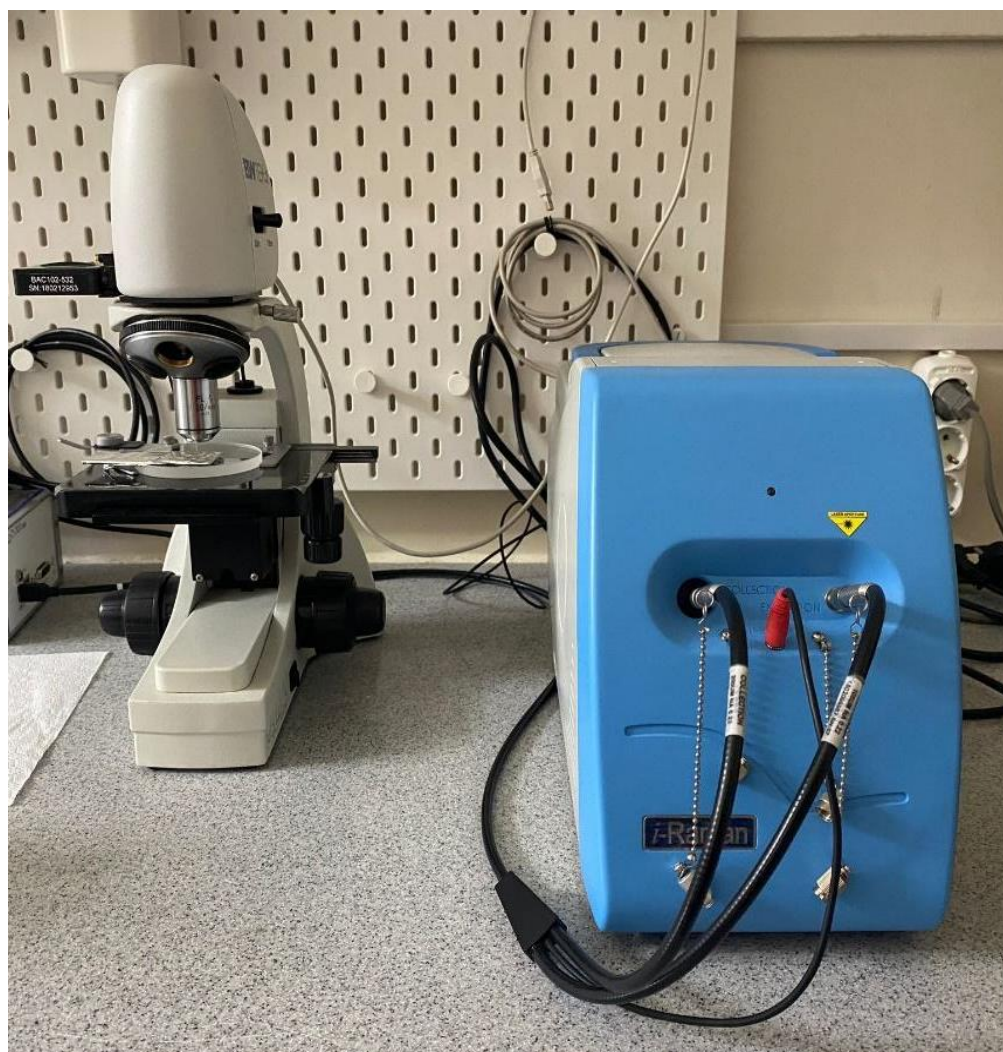
**Figura III.3.** Substanțele utilizate în timpul cercetării din laborator depozitate în recipiente (vialuri) de plastic.



**Figura III.4.** Cutia de depozitare a recipientelor cu soluțiile preparate pe parcursul lucrării.

### III.3. Aparate și materiale

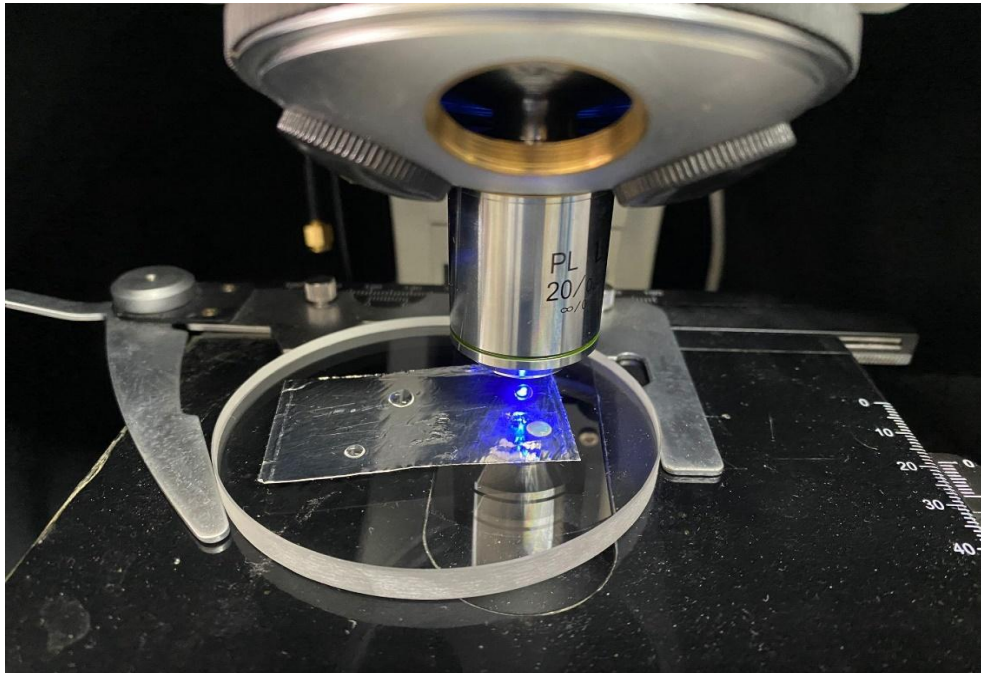
Aparatul Raman Portabil BWtek este aparatul Raman utilizat în achiziționarea măsurătorilor uracilului. La acesta este legat un microscop video cu obiectivul 20 X și apertura numerică N.A. 0.4.



**Figura III.5.** Spectrometrul Raman Portabil BWtek legat cu microscopul video.

Spectrometrul utilizează un laser Nd:YAG cu frecvența dublată de 523 nm. Acesta este focalizat pe proba și acționează pe o lamelă acoperită cu folie de aluminiu (Figura III.6.) cu o putere de aproximativ 20 mW. Domeniul spectral măsurat este de la  $50 \text{ cm}^{-1}$  până la  $3300 \text{ cm}^{-1}$ , având rezoluția spectrală de  $8 \text{ cm}^{-1}$ . Spectrele sunt înregistrate prin 3 achiziții de 5 secunde la puterea 100 mW.





**Figura III.6.** Laserul focalizat pe probă cu spectrometru optic.



**Figura III.7.** Cântarul folosit pentru preparări cantitative.

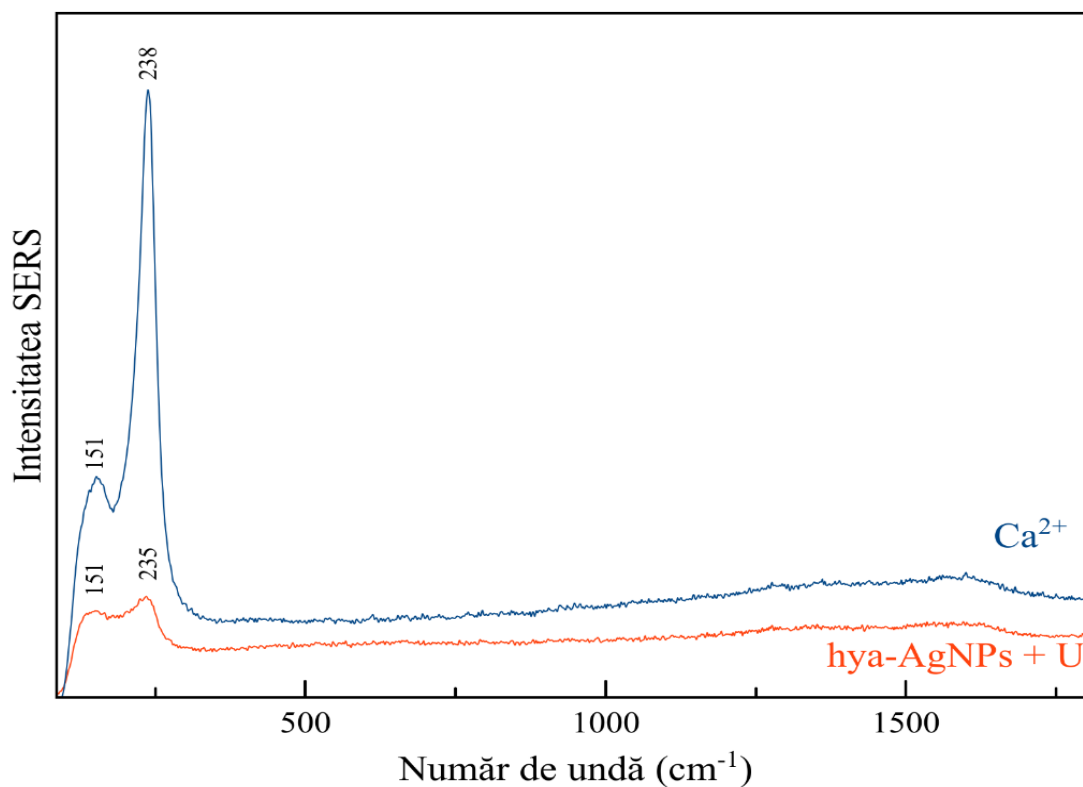
## CAPITOLUL IV. REZULTATE ȘI DISCUȚII

Rezultatele experimentale din acest capitol au vizat optimizarea metodologiei pentru obținerea spectrelor SERS a moleculei uracil.

Pentru înregistrarea măsurătorilor SERS citratul și coloidul au fost activate de substanța principală uracil, urmând să fie adăugați ionii  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  și  $\text{Zn}^{2+}$  la diferite concentrații finale. Cationii sunt adăugați sub formă de praf de sare de nitrat sau sulfat:  $\text{CaNO}_3$ ,  $\text{MgSO}_4$  și  $\text{ZnSO}_4$ .

Siturile SERS sunt activate pe nanoparticulele de argint cu ajutorul adionilor. Spectrul uracilului a fost observat la o concentrație finală de 50  $\mu\text{L}$  după activarea cu  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  și  $\text{Zn}^{2+}$  a nanoparticulelor de argint. Chemisorbția este amplificată de anionii cu afinitate crescută în comparație cu aria suprafeței de argint.

Figura IV.1. prezintă primele încercări în vederea obținerii spectrelor SERS ale uracilului în prezența de ioni de  $\text{Ca}^{2+}$ .



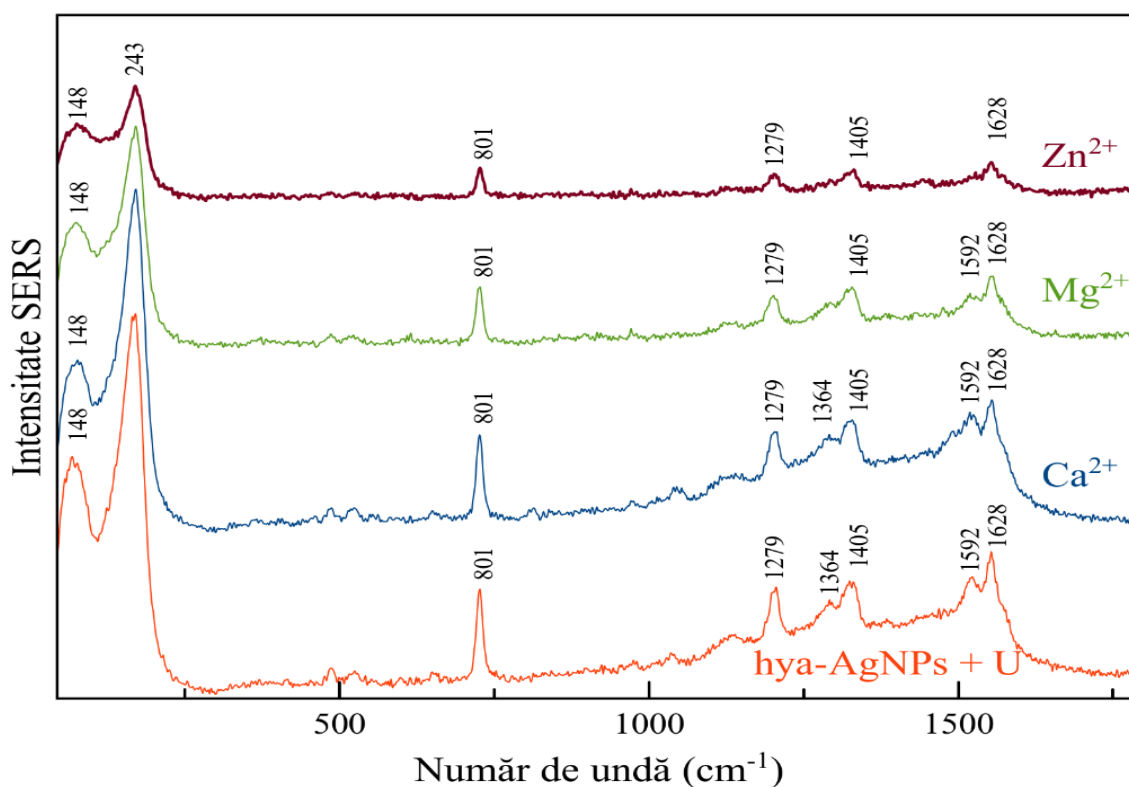
**Figura IV.1.** Spectre SERS ale uracilului la concentrația  $8 \times 10^{-5} \text{ M}$

- Spectrul SERS al uracilului obținut în urma amestecării cu nanoparticule de argint hya-AgNPs.
- Spectrul SERS al uracilului obținut în urma amestecării cu nanoparticule de argint hya-AgNPs suplimentat cu  $\text{Ca}^{2+}$  ( $5 \times 10^{-2}$  M).

Primele încercări au vizat obținerea spectrelor SERS ale uracilului la concentrația  $10^{-5}$  M. În acest sens s-a adăugat uracilul la o soluție coloidală de argint obținută prin reducere cu hidroxilamina hidroclohidă. Spectrul rezultat nu prezintă benzi ale uracilului, de unde am concluzionat că acesta nu adsoarbe sau adsoarbe dar în măsură prea mică la suprafața nanoparticulelor studiate.

Pentru a facilita adsorbția uracilului la suprafața nanoparticulelor s-au adăugat ioni de  $\text{Ca}^{2+}$  de concentrație  $5 \times 10^{-2}$  M. Spectrul SERS obținut prezintă o singură bandă intensă la  $238 \text{ cm}^{-1}$ , bandă ce este atribuită din literatură vibrației  $\text{AgCl}$ . Prin urmare, ionii de  $\text{Ca}^{2+}$  facilitează adsorbția clorurii la suprafața metalică, dar nu și a uracilului.

Figura IV.2. prezintă încercări în vederea obținerii spectrelor SERS ale uracilului în prezența ionilor de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ .



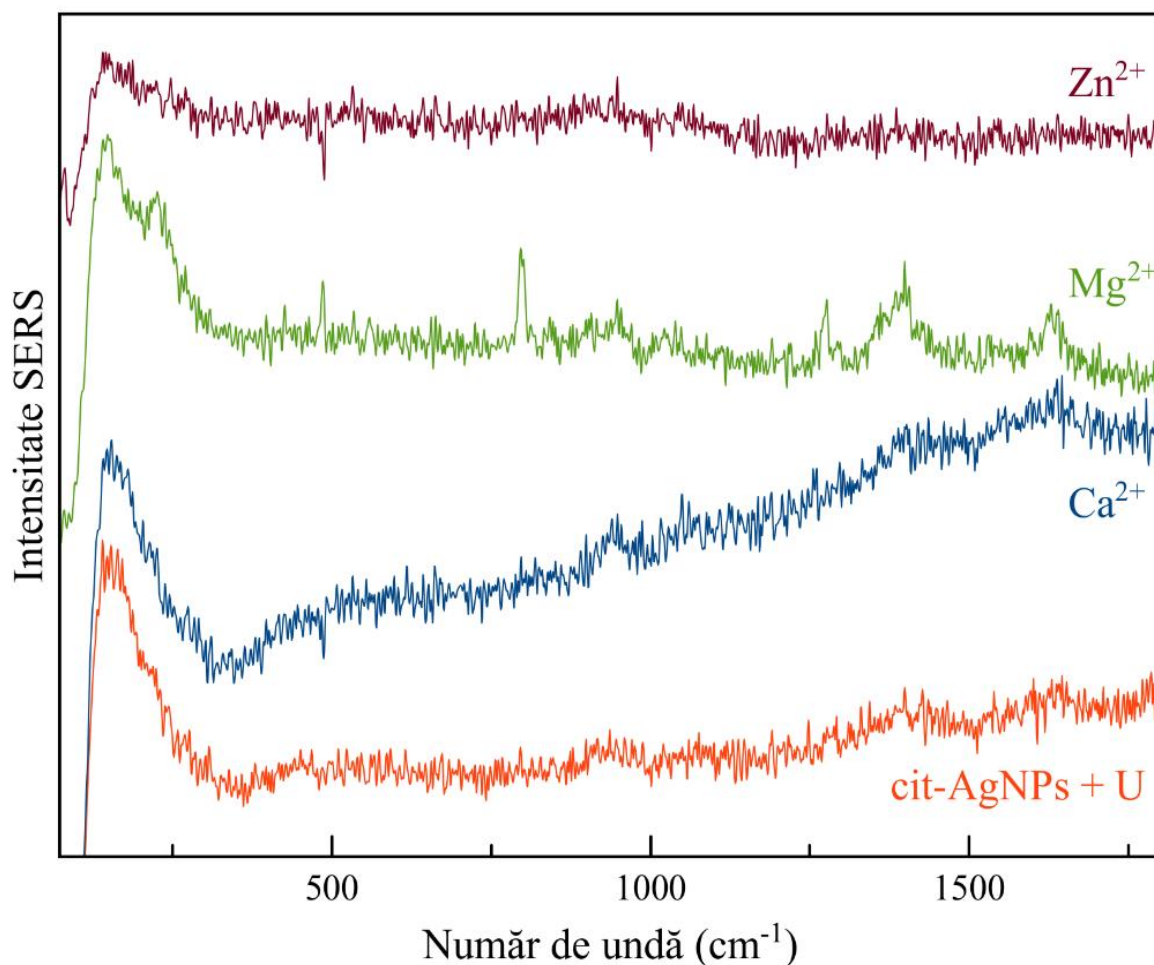
**Figura IV.2.** Spectre SERS ale uracilului la concentrația  $8 \times 10^{-4}$  M.

- a) Spectrul SERS al uracilului obținut în urma amestecării cu nanoparticule de argint hya-AgNPs.
- b) Spectrul SERS al uracilului obținut în urma amestecării cu nanoparticule de argint hya-AgNPs suplimentat cu  $\text{Ca}^{2+}$  ( $10^{-2}$  M).
- c) Spectrul SERS al uracilului obținut în urma amestecării cu nanoparticule de argint hya-AgNPs suplimentat cu  $\text{Mg}^{2+}$  ( $10^{-2}$  M).
- d) Spectrul SERS al uracilului obținut în urma amestecării cu nanoparticule de argint hya-AgNPs suplimentat cu  $\text{Zn}^{2+}$  ( $10^{-2}$  M).

Pentru achiziționarea spectrului SERS al uracilului am încercat creșterea concentrației de uracil de la  $8 \times 10^{-5}$  M la  $8 \times 10^{-4}$  M. Figura IV.2. prezintă spectrul SERS al uracilului în prezența nanoparticulelor de argint reduse cu hidroxilamină hidrocloridă. Acest rezultat demonstrează adsorbția uracilului la suprafața nanoparticulelor de argint și în prezența clorurii, dar la concentrații mai mari de  $8 \times 10^{-4}$  M. Prin urmare la concentrația  $8 \times 10^{-5}$  M adsoarbe un număr mai mic de molecule de uracil pentru a observa semnal SERS.

În continuare, pentru a adsorbi un număr mai mare de uracil la suprafața metalică am încercat suplimentarea soluției cu ioni de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ . Spectrele din Figura IV.2. prezintă benzi caracteristice uracilului și în prezența acestor ioni, dar nu se observă o amplificare suplimentară a spectrului SERS al uracilului.

Figura IV.3. prezintă încercări în vederea obținerii spectrelor SERS ale uracilului în prezența ionilor de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ .



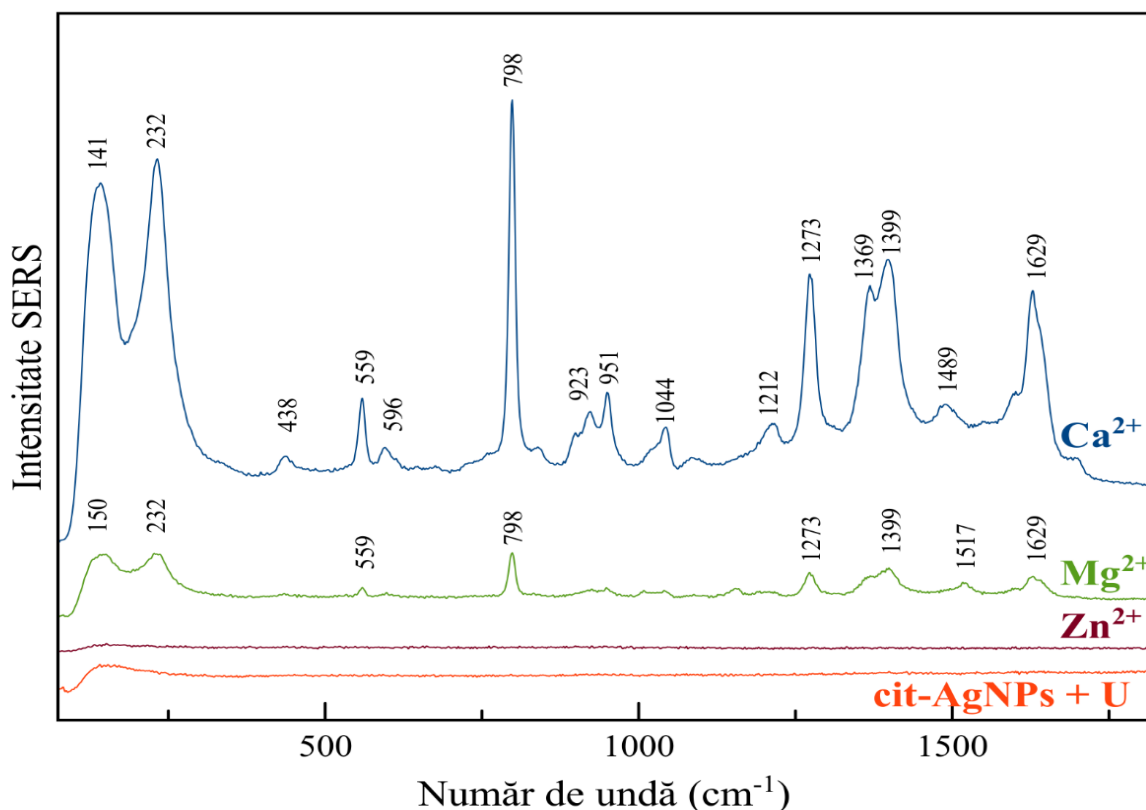
**Figura IV.3.** Spectre SERS ale uracilului la concentrația  $8 \times 10^{-6}$  M

- Spectrul SERS al uracilului obținut în urma amestecării cu nanoparticule de argint cit-AgNPs.
- Spectrul SERS al uracilului obținut în urma amestecării cu nanoparticule de argint cit-AgNPs. suplimentat cu  $\text{Ca}^{2+}$  ( $10^{-2}$  M).
- Spectrul SERS al uracilului obținut în urma amestecării cu nanoparticule de argint cit-AgNPs suplimentat cu  $\text{Mg}^{2+}$  ( $10^{-2}$  M).
- Spectrul SERS al uracilului obținut în urma amestecării cu nanoparticule de argint cit-AgNPs suplimentat cu  $\text{Zn}^{2+}$  ( $10^{-2}$  M).

Pentru obținerea semnalului SERS al uracilului am folosit în continuare soluție coloidală de argint care nu conține clor. În acest sens s-a încercat achiziționarea spectrului SERS al uracilului folosind nanoparticule de argint reduse cu citrat. Figura IV.3. prezintă spectrele înregistrate ale uracilului la concentrația  $8 \times 10^{-6}$  M, precum și în prezența ionilor de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  la concentrația  $10^{-2}$  M.

Nu au fost obținute spectre SERS caracteristice uracilului. Spectrele nu prezintă semnal Raman cu excepția soluției suplimentată cu  $Mg^{2+}$  unde se observă benzi de slabă intensitate atribuite uracilului.

Figura IV.4. prezintă spectrul SERS al uracilului în prezența ionilor de  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  obținut prin adsorbția la suprafața nanoparticulelor de argint acoperite cu citrat.



**Figura IV.4.** Spectre SERS ale uracilului la concentrația  $8 \times 10^{-6}$  M

- Spectrul SERS al uracilului obținut în urma amestecării cu nanoparticule de argint cit-AgNPs.
- Spectrul SERS al uracilului obținut în urma amestecării cu nanoparticule de argint cit-AgNPs. suplimentat cu  $Ca^{2+}$  ( $5 \times 10^{-2}$  M).
- Spectrul SERS al uracilului obținut în urma amestecării cu nanoparticule de argint cit-AgNPs suplimentat cu  $Mg^{2+}$  ( $5 \times 10^{-2}$  M).
- Spectrul SERS al uracilului obținut în urma amestecării cu nanoparticule de argint cit-AgNPs suplimentat cu  $Zn^{2+}$  ( $5 \times 10^{-2}$  M).

În ultima încercare de a optimiza parametrii experimentali pentru obținerea spectrului SERS al uracilului la concentrație cât mai scăzută am folosit soluția coloidală de argint care să nu includă clor. În această privință s-a încercat achiziționarea spectrului SERS al uracilului utilizând nanoparticule de argint reduse cu citrat. Figura IV.4 conferă spectrele SERS înregistrate ale uracilului la concentrația  $8 \times 10^{-6}$  M.

Pentru a facilita adsorbția uracilului la suprafața nanoparticulelor s-au adăugat ioni de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  la concentrație  $10^{-2}$  M. Spectrul nu prezintă semnal Raman, cu excepția soluției suplimentată cu  $\text{Ca}^{2+}$ , unde se observă benzi de intensitate puternică și soluția sporită cu  $\text{Mg}^{2+}$ , unde se evidențiază benzi de slabă intensitate atribuite uracilului.

## CONCLUZII

La concentrații relativ mici,  $8 \times 10^{-5}$  M nu s-a putut obține spectrul SERS al uracilului prin adsorbție directă, folosind ca substrat nanoparticulele de argint reduse cu hidroxilamina hidrocloridă. Adsorbția uracilului este împiedicată de prezența ionilor clorură ce prezintă o afinitate mai mare pentru suprafața metalică. Această concluzie este suportată și de spectrul SERS obținut în prezența ionilor de  $\text{Ca}^{2+}$  cu concentrația  $5 \times 10^{-2}$  M, fiind vizibilă doar banda AgCl la  $238 \text{ cm}^{-1}$ . Ionii de  $\text{Ca}^{2+}$  mediază în acest caz doar adsorbția ionilor de clor.

Creșterea concentrației de uracil de la  $8 \times 10^{-5}$  M la  $8 \times 10^{-4}$  M permite obținerea spectrelor SERS ale uracilului. Se observă adsorbția atât a moleculei uracil, cât și a clorurii la suprafața metalică. Se remarcă atât banda AgCl la  $243 \text{ cm}^{-1}$ , cât și benzi caracteristice uracilului. Ionii  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  nu aduc un aport semnificativ la îmbunătățirea calității spectrelor SERS.

La concentrația  $8 \times 10^{-6}$  M a uracilului și folosirea ca substrat a nanoparticulelor de argint cu citrat, nu se obțin spectre SERS ale moleculei analit. Ionii de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  nu aduc un aport semnificativ prin medierea adsorbției, spectrele obținute prezentând doar zgomot.

Studiul optimizării detecției SERS a moleculei uracil indică condițiile optime pentru obținerea spectrului SERS a moleculei uracil: concentrația  $8 \times 10^{-6}$  M, coloid de argint redus cu citrat și suplimentat cu ioni de  $\text{Ca}^{2+}$  de concentrație  $5 \times 10^{-2}$  M. Prezența ionilor de calciu determină un semnal SERS cu benzi intense. Prezența ionilor de  $\text{Mg}^{2+}$  la concentrația  $5 \times 10^{-2}$  M. permite de asemenea obținerea spectrelor SERS ale moleculei uracil, dar se evidențiază benzi de slabă intensitate. În schimb, ionii de  $\text{Zn}^{2+}$  la concentrația  $5 \times 10^{-2}$  M nu contribuie la amplificarea semnalului SERS a moleculei uracil.



**BIBLIOGRAFIE**

- [1] <https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0000300>, 18.06.2023
- [2] <https://ro.wikipedia.org/wiki/Uracil> , 15.06.2023
- [3] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1174> , 15.06.2023
- [4] Ru EL, Etchegoin P, Principles of Surface-Enhanced Raman Spectroscopy: and Related Plasmonic Effects. Elsevier, 2008
- [5] Ellis, D. I., Cowcher, D. P., Ashton, L., O'Hagan, S. & Goodacre, R. Illuminating disease and enlightening biomedicine Raman spectroscopy as a diagnostic tool. Analyst 138, 3871–3884, 2013
- [6] Downes, A. & Elfick, A. Raman Spectroscopy and Related Techniques in Biomedicine. Sensors 10, 1871–1889 (2010)
- [7] Downes A, Elfick A, Raman Spectroscopy and Related Techniques in Biomedicine. Sensors 10:1871–1889, 2010. <https://doi.org/10.3390/s100301871>
- [8] Krafft C, Popp J (2015) The many facets of Raman spectroscopy for biomedical analysis. Anal Bioanal Chem 407:699–717. <https://doi.org/10.1007/s00216-014-8311-9>
- [9] <https://physicsweekly.weebly.com/reflection-refraction-and-diffraction.html> , 18.05.2023
- [10] Gardiner DJ, Graves PR, Practical Raman Spectroscopy. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 1989
- [11] [https://en.wikipedia.org/wiki/Raman\\_spectroscopy#/media/File:Raman\\_energy\\_levels.svg](https://en.wikipedia.org/wiki/Raman_spectroscopy#/media/File:Raman_energy_levels.svg) , 18.05.2023
- [12] W. Demtroder, Laser Spectroscopy: Basic Concepts and Instrumentation, Springer, 1955
- [13] B. Schader, Infrared and Raman Spectroscopy-Methods and Applications, Wiley-VCH, 1998
- [14] Onuc Cozar, Teoria Grupurilor în Fizica Atomului și Moleculei, Litografia Universitatii Babes-Bolyai, Cluj Napoca, 1986
- [15] T. Iliescu, Spectroscopie Optica Moleculara, Casa Cartii de Stiinta, Cluj Napoca, 2000
- [16] Simion Astilean, Metode și Tehnici Moderne de Spectroscopie Optica-Spectroscopia IR și Raman, Casa Cartii de Stiinta, Cluj Napoca, 2002

- [17] N. Tarcea, T. Frosch, P. Rösch, M. Hilchenbach, T. Stuffer, S. Hofer, H. Thiele, R. Hochleitner, J. Popp, Raman Spectroscopy - A Powerful Tool for in situ Planetary Science, *Space Sci Rev*, 135, 281-292, 2008
- [18] M. Petersen, Z. Yu, X. Lu, Application of Raman Spectroscopic Methods in Food Safety: A Review, *Biosensors*, 11, 187, 2, 2021
- [19] S. Cong, X. Liu, Y. Jiang, W. Zang, Z. Zhao, Surface Enhanced Raman Scattering Revealed by Interfacial Charge – Transfer Transitions, *The Innovation* 1, 100051, 3, 2020
- [20] [https://www.creeaza.com/files/alimentatie-nutritie/194\\_poze/image020.gif](https://www.creeaza.com/files/alimentatie-nutritie/194_poze/image020.gif), 19.05.2023
- [21] Leopold N, Lendl B, A New Method for Fast Preparation of Highly Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) Active Silver Colloids at Room Temperature by Reduction of Silver Nitrate with Hydroxylamine Hydrochloride, *J. Phys. Chem. B*, 107, 5723-5727, 2003
- [22] S. D. Iancu, A. Stefanu, V. Moisiu, L. F. Leopold, N. Leopold, The role of  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  and  $\text{Al}^{3+}$  adions in the SERS turn-on effect of anionic analytes, *Beilstein J. Nanotechnol*, 10, 2338–2345, 2019
- [23] A. Stefanu, S. D. Iancu, N. Leopold, Selective Single Molecule SERRS Cationic and Anionic Dyes by  $\text{Cl}^-$  and  $\text{Mg}^{2+}$  Adions: An Old New Idea, *J. Phys. Chem. C*, 125, 12802-12810, 2021

**DECLARAȚIE PE PROPRIE RĂSPUNDERE**

Subsemnatul, Hada Giulia Roberta, declar că Lucrarea de licență/diplomă/disertație pe care o voi prezenta în cadrul examenului de finalizare a studiilor la Facultatea de Fizică, din cadrul Universității Babeș-Bolyai, în sesiunea Iulie 2023, sub îndrumarea lui Leopold Nicolae, reprezintă o operă personală. Menționez că nu am plagiat o altă lucrare publicată, prezentată public sau un fișier postat pe Internet. Pentru realizarea lucrării am folosit exclusiv bibliografia prezentată și nu am ascuns nici o altă sursă bibliografică sau fișier electronic pe care să le fi folosit la redactarea lucrării.

Prezenta declarație este parte a lucrării și se anexează la aceasta.

Data,

28.06.2023

Nume,

Hada Giulia Roberta

Semnătură

