



Dr Pietro G. Gucciardi
Responsabile NanoSoftLab
CNR – Istituto Processi Chimico-Fisici
Viale F. Stagno D'Alcontres 37
I-98158 Messina, Italy

Oggetto: Relazione finale per la Short Term Mobility 2014. Soggiorno di ricerca del Prof. M. Lamy de La Chapelle

Gentile Responsabile,

desidero innanzitutto ringraziare il programma STM del CNR per averci fornito l'opportunità di effettuare diversi esperimenti originali che dimostrano la fattibilità di alcuni concetti nel campo della plasmonica e dei nanosensori plasmonici. Questo progetto ci ha permesso allo stesso tempo di rafforzare la collaborazione con il gruppo del Prof. Lamy de La Chapelle. Di seguito troverà una relazione sintetica dei risultati ottenuti. Alcuni dei risultati sono stati utilizzati come prospettiva di utilizzo del progetto europeo H2020 NanoDIAG sottomesso nella call H2020-PHC-2014-two-stage lo scorso 19 agosto.

Il prof. Lamy de La Chapelle ha effettuato il soggiorno presso l'IPCF – CNR dall'8 al 20 giugno 2014.

Gli obiettivi proposti nel progetto riguardavano esperimenti (proof of principle) per la rivelazione di biomarkers tumorali e inquinanti marini in ambiente nativo, mediante spettroscopia SERS con nanoantenne plasmoniche intrappolate/aggregate otticamente.

A questo fine il Prof. Lamy de La Chapelle ha portato campioni di MnSOD (proteina, biomarker tumorale), aptameri (frammenti di DNA) specifici per la MnSOD per la funzionalizzazione delle nanoantenne, campioni di naftalene e fluorantene (inquinanti), nanocilindri SERS-attivi di oro con diverse risonanze plasmoniche.

Stati effettuati i segg. esperimenti:

1. Intrappolamento ottico di dendriti di argento per valutare la possibilità di effettuare rivelazione SERS di molecole target in soluzione da singolo dendrita intrappolato.



2. Spettroscopia SERS in liquido di molecole adsorbite su nanocilindri di oro litografati su substrato, per valutare la possibilità di rivelare molecole target in ambiente nativo, senza la necessità di evaporare il solvente.
3. Studio degli effetti termoplasmonici associati all'eccitazione ottica risonante sui nanocilindri di oro, per valutare gli incrementi di temperatura locale a cui sono soggette le molecole assorbite sui cilindri in presenza di field-enhancement.
4. Funzionalizzazione di nanorods di oro con aptameri (frammenti di DNA) specifici per la cattura della MnSOD (proteina, biomarker tumorale) e misure di spettroscopia SERS della proteina MnSOD (biomarker tumorale) in soluzione buffer tramite aggregazione ottica di nanorods di oro funzionalizzati con gli aptameri.
5. Spettroscopia SERS su molecole di Naftalene (inquinante) su gabbie molecolari di dendriti di argento
6. Spettroscopia SERS su molecole di fluoroantene (inquinante) su dendriti di argento.

Sono stati ottenuti i segg. risultati:

1. Intrappolamento di dendriti di argento:

- a. **Materiali:** Sono stati prodotti dendriti di argento con metodi chimici su substrati di silicio. Il risultato di questa procedura è un network 3D frattalico di nanofili e nanoparticelle di argento SERS-attive (vedi figura 1), con dimensioni che vanno da poche decine di nm ai micron. Queste strutture possono essere impiegate tal quali, per catturare molecole disperse nel proprio solvente, permettendo misure SERS in ambiente nativo. Per poter essere intrappolati otticamente, i dendriti vanno invece dispersi.

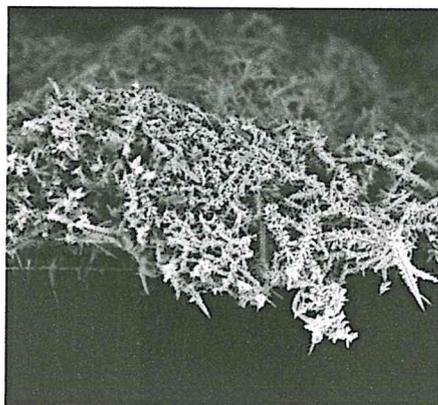


Figura 1: Immagine SEM dei dendriti di Ag.

La dispersione è stata effettuata mediante sonicazione a bagno o ultrasonicazione (con sonicatore a punta) del substrato immerso in acqua. Questo ci ha permesso di ottenere strutture sub-



micrometriche ben disperse in liquido. Per stabilizzare le nanoparticelle è stato impiegato anche un surfattante (SDS).

- b. **Misure:** Sono state effettuate misure di estinzione che mostrano (vedi figura 2) la presenza di un picco di risonanza plasmonica centrato a 396nm, con una coda che si estende oltre i 700nm. La misura suggerisce la presenza in liquido di particelle con un'ampia distribuzione in dimensione, da particelle con dimensioni di poche decine di nm a particelle sulle centinaia di nm. La misura indica allo stesso tempo che i **substrati sono potenzialmente SERS-attivi alle diverse lunghezze d'onda del visibile e del NIR.**

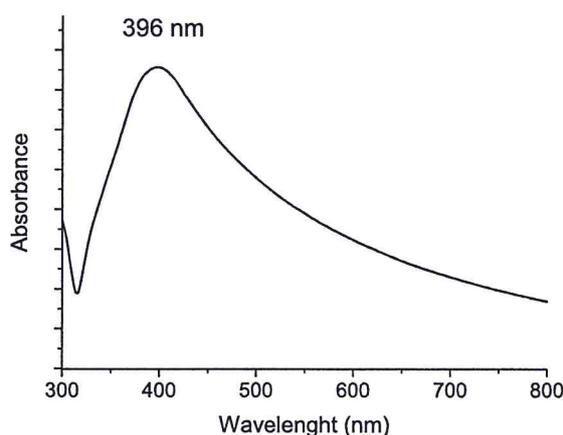


Figura 2: Spettro di estinzione dei dendriti di argento.

- c. Prove di intrappolamento ottico sono state effettuate usando diversi laser a 515nm, 633nm, 785nm, inserendo 80 μ L di soluzione in una microcella costituita da vetrino da microscopio con scasso. **Le misure mostrano che le nanoparticelle non vengono intrappolate ma sparate verso il fondo della cella, risultando interessanti in tutti quei processi legati all'aggregazione di nanoparticelle indotta otticamente su scala microscopica e alla rivelazione SERS da aggregati.**
- d. A questo scopo sono stati quindi mixati i dendriti dispersi ad una soluzione di BPE 1 mM in acqua all'interno di una microcella. Impiegando un obiettivo 50X lunga distanza di lavoro ed eccitando a 633nm è stato possibile investigare il segnale SERS emesso da aggregati di dendriti sul fondo della microcella. Come si vede nella figura 3, lo spettro SERS della BPE in presenza di dendriti in liquido (linea rossa) mostra gli stessi picchi dello spettro della BPE su nanocilindri di oro (linea nera), usati come campione di confronto, con in più alcune vibrazioni riconducibili probabilmente alla presenza del surfattante. **Questo prova come l'uso di dendriti di argento permetta di rivelare la presenza di molecole aromatiche in liquido tramite SERS indotto da aggregati.**

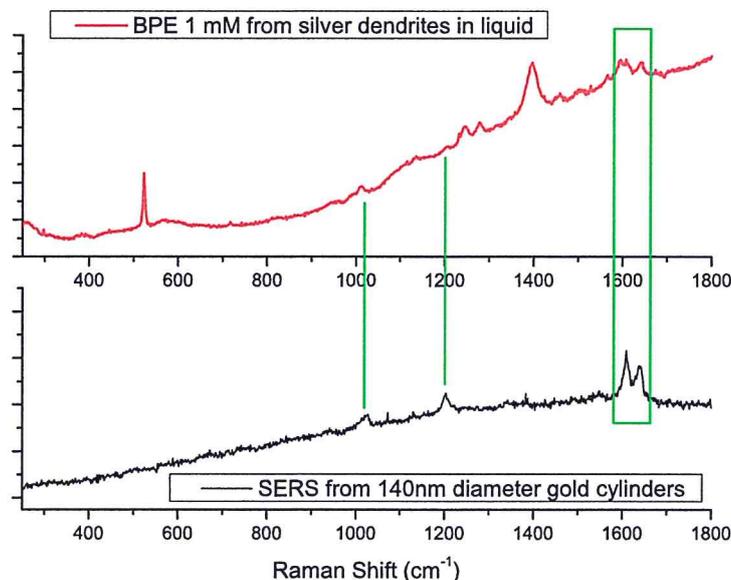


Figura 3: (linea rossa) Spettro SERS di BPE 1 mM adsorbita su dendriti di Ag in liquido. (linea nera) Spettro SERS di BPE 1 mM adsorbito su nanocilindri di oro.

2. SERS da nanocilindri di oro in liquido

- a. **Materiali:** Sono stati impiegati nanocilindri di oro di diametro 140nm, altezza 50nm, ordinati in un array bidimensionale a distanza di 200nm uno dall'altro (edge-to-edge), su cui sono state assorbite molecole di BPE mediante immersione del campione in soluzione a 10mM per 1h, seguita da risciacquo in etanolo e asciugatura sotto flusso di azoto. Misure SERS sono state effettuate in aria a 633nm mostrando i tipici spettri della BPE (vedi figura 3, linea nera).
- b. **Misure SERS:** Il campione di nanocilindri è stato successivamente immerso in acqua in configurazione upside down in modo che i cilindri fossero a contatto con la soluzione contenuta in una microcella e in maniera tale da poter eccitare e raccogliere attraverso il substrato di vetro su cui sono fabbricati i cilindri. **Focalizzando potenze di poche centinaia di μ W a 633nm è stato possibile ritrovare gli spettri della BPE**, mentre aumentando la potenza irradiata di un fattore 10 (fino a 6 mW su uno spot diffraction limited di ca. 600 nm di diametro) **abbiamo osservato fenomeni di ebollizione dell'acqua** in cui erano immersi i nanocilindri.

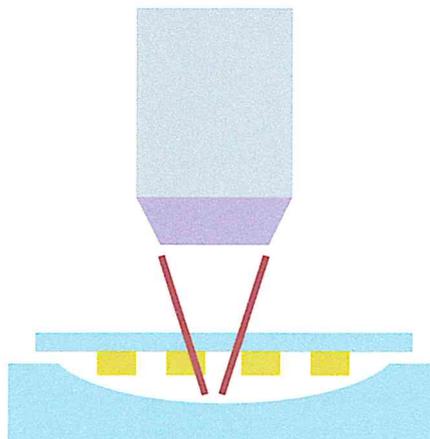


Figura 4 Schema usato per le misure SERS in liquido con nanocilindri di oro.

3. Effetti termoplasmonici in nanocilindri di oro.

- a. **Motivazioni e materiali:** la possibilità di indurre aumenti locali di temperatura per via ottica risulta assai interessante ad es. per poter controllare i fenomeni convettivi e di indirizzamento dei fluidi a livello sub-micrometrico in circuiti micro- e nano-fluidici. Questo ci ha portato a studiare in maniera più estensiva i fenomeni di bubbling osservati su nanocilindri di oro. La strategia seguita è stata quella di **determinare la soglia minima di potenza laser capace di indurre il bubbling, e quindi un aumento locale della temperatura di almeno 100 °C, per ciascun array di nanocilindri**, mettendo in relazione questo parametro con l'energia di risonanza plasmonica di ciascun array. Per ciascun array di nanocilindri sono state fatte misure usando laser a 561nm, 633nm, 785nm, 830nm, cioè dal visibile al NIR, e in modo da comprendere come la soglia di bubbling (e quindi l'assorbimento) siano correlati alla posizione del picco di risonanza plasmonica. Sono stati impiegati nanocilindri di oro di altezza 50nm, fabbricati per electron beam lithography su vetro, di **diametro variabile tra i 50nm e i 200nm**. I cilindri sono disposti in arrays bidimensionali con distanza uno dall'altro (edge-to-edge) di 200 nm.
- b. **Misure di estinzione:** sono state effettuate misure di estinzione (assorbimento + scattering) per determinare la posizione della risonanza plasmonica e l'intensità dell'assorbimento. I risultati in fig. 5 mostrano come **il picco di risonanza vari da 550nm (cilindri con 50nm di diametro) a 775nm (200nm diametro)**. L'intensità di estinzione raggiunge un massimo nei cilindri da 160nm di diametro.

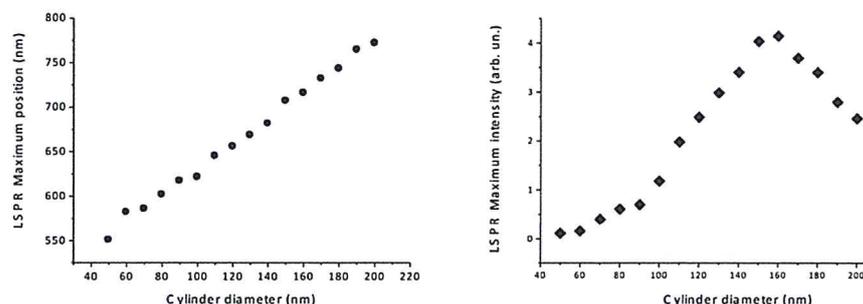


Figura 5: (sinistra) Posizione della risonanza plasmonica in funzione del diametro dei nanocilindri. (destra) Intensità del picco di risonanza plasmonica in funzione del diametro dei nanocilindri.

- c. **Soglia di bubbling a diverse lunghezze d'onda di eccitazione.** Per studiare questo fenomeno abbiamo impiegato quattro sorgenti laser a 561nm, 633nm, 785nm, 830nm. I campioni sono stati eccitati mediante un obiettivo 50x a lunga distanza di lavoro su uno spot diffraction limited (da ~ 1.5 a ~ 2.5 micron di diametro, a seconda della lunghezza d'onda) incrementando la potenza fino ad osservare la soglia di bubbling.

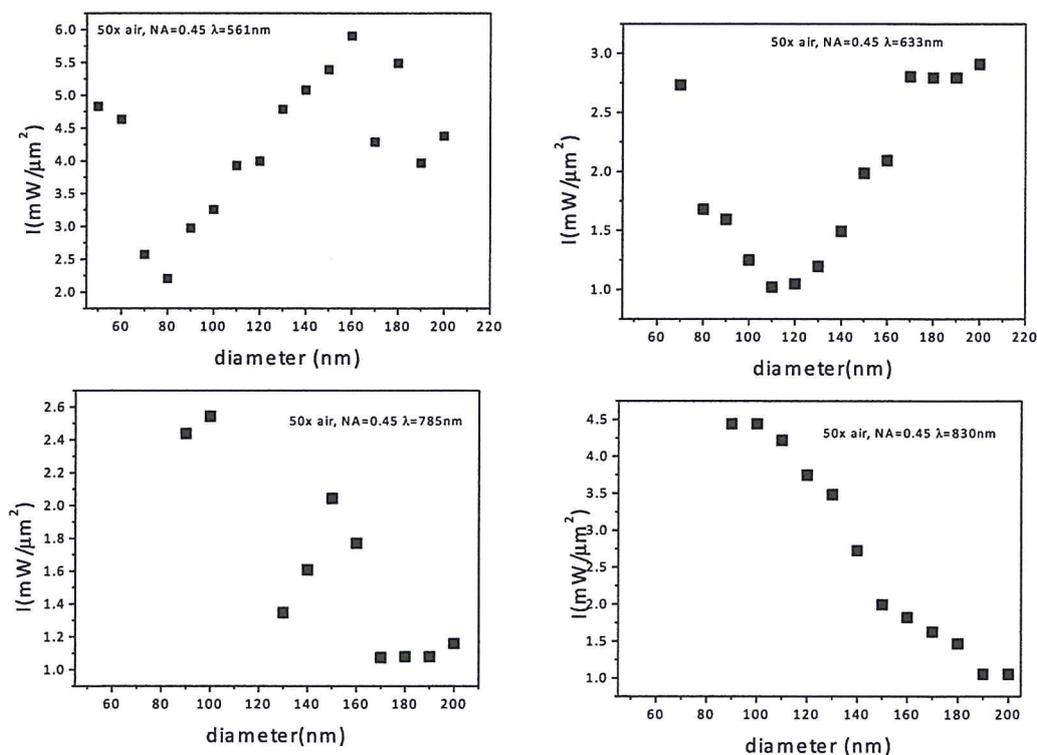


Figura 6: Soglie di potenza (in $\text{mW}/\mu\text{m}^2$) necessarie per indurre il bubbling alle diverse lunghezze d'onda in funzione del diametro dei cilindri



In figura 6 osserviamo come la potenza necessaria ad indurre il bubbling si abbassi di un fattore da 2.5 (eccitazione a 785nm) fino a un fattore 4 (eccitazione a 830nm) man mano che la lunghezza d'onda di eccitazione si avvicina alla risonanza plasmonica dei nanocilindri. Altra osservazione riguarda il fatto che il minimo di potenza si ha quando la frequenza di risonanza plasmonica è leggermente red-shiftata rispetto alla lunghezza di eccitazione laser. Questi fenomeni verranno investigati dal punto di vista teorico per comprendere le relazioni tra assorbimento (causa del bubbling) e l'estinzione (che contiene una parte di scattering)

4. **Funzionalizzazione di nanorods di oro con aptameri specifici per la MnSOD e SERS di MnSOD in liquido:**

- a. **Motivazioni:** nei nostri laboratori è stata recentemente dimostrata la possibilità di rivelare biomolecole in soluzione buffer mediante spettroscopia SERS tramite aggregazione di nanorods di oro indotta otticamente (Fazio et al. submitted). Questa tecnica al momento non risulta essere specifica in quanto, in presenza di diverse molecole in soluzione, tutte le biomolecole aventi affinità con le superfici di oro si attaccherebbero ai nanorods, generando segnale SERS. Al fine di aggiungere specificità abbiamo provato degli esperimenti di base in cui, prima funzionalizziamo i nanorods con aptameri specifici per la proteina MnSOD (un biomarker tumorale), e poi riveliamo la MnSOD in soluzione buffer.
- b. **Funzionalizzazione dei rods con Aptameri:** Gli aptameri (100 ng/ μ L) sono stati diluiti in KCl 1M (1:9 v/v), la soluzione risultante è stata aggiunta ai nanorods di oro (35nm diameter, 90 nm length, capped with CTAB) in una proporzione di 5:3 v/v per ottenere un sistema funzionalizzato con proprietà di legame selettivo alla MnSOD. Per verificare l'effettiva funzionalizzazione dei rods abbiamo cercato di osservare il SERS del DNA attaccato ai nanorods. Abbiamo quindi acquisito degli spettri SERS su aggregati di nanorods funzionalizzati con DNA depositati sul fondo di una microcella. Su questi campioni non è stato possibile indurre l'aggregazione otticamente, ma è stato necessario aspettare che i rods precipitassero sul fondo. In Figura 7 (linea rossa) mostriamo lo spettro SERS del DNA su un aggregato di nanorods in liquido e, per confronto (linea blu), lo spettro di DNA adsorbito su nanoantenne di oro in dry conditions ($\lambda_{exc} = 633$ nm, P=6 mW, T= 60 s). Si può osservare come i **picchi SERS presenti nel segnale misurato sui rods funzionalizzati aggregati si ritrovano nello spettro da DNA su nanoantenne**, sebbene l'enhancement factor dei vari modi differisca, questo probabilmente a causa dell'interazione del DNA con il layer di Cetyltrimethylammonium Bromide (CTAB) presente sulla superficie dei rods e necessario a stabilizzarli.

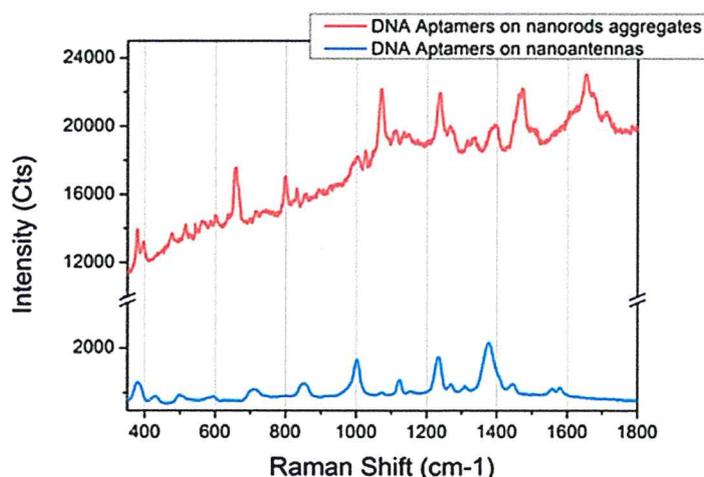


Figura 7: (linea rossa) SERS del DNA legato ai nanorods di oro. (linea blu) Misura comparativa di SERS di DNA depositato su nanocilindri

- C. Rivelazione SERS di MnSOD in buffer mediante aggregazione ottica di nanorods funzionalizzati.** Gli aptameri di DNA (100 ng/ μ L) sono stati diluiti in KCl 1 M (1:9); dopo sono stati uniti in un eppendorf con i nanorod di oro (5 parti di soluzione di DNA e 3 di NRs). Alla soluzione ottenuta è stata aggiunta la MnSOD 10^{-5} M (1 parte rod funzionalizzati e 3 di proteina). Sono quindi stati condotti esperimenti di rivelazione SERS indotta da aggregazione ottica dei nanorods. Gli esperimenti sono stati condotti eccitando con un laser He-Ne laser a 633 nm e $P=6$ mW focalizzato da un obiettivo 50X a lunga distanza di lavoro. La dimensione della hole confocale in rivelazione è stata ridotta a 50 μ m per ridurre gli effetti di background dal substrato di vetro e da zone di campione al di là dell'aggregato indotto otticamente (quali precipitati spontanei). Figura 8 (linea rossa) mostra che è **possibile rivelare la MnSOD a concentrazione di 10 μ M in HEPES buffer mediante SERS della ottenuto da aggregazione ottica dei nanorods funzionalizzati con aptameri** sulle pareti della microcella contenente la soluzione (tempo di integrazione 30 s), comparato con quello degli aptameri da soli (linea blu, tempo di integrazione 60s). Non è stato possibile misurare alcun segnale Raman convenzionale su MnSOD a concentrazioni di 10 μ M in HEPES, a dimostrazione di come il SERS sia una vera e propria "enabling technology." Dal confronto degli spettri del DNA e della MnSOD vediamo grosse differenze nella regione dei CH stretching region (2850 – 3000 cm^{-1}) della Amide I (1620 – 1680 cm^{-1}). Queste sono conseguenza dell'interazione della MnSOD con il DNA e con i nanorods di oro e ci danno dimostrazione di come ora il segnale sia dominato dalla MnSOD. Sono stati effettuati infine esperimenti SERS dinamici, osservando la crescita del segnale in funzione del



tempo di aggregazione su scale dei 10 sec, a dimostrazione del fatto che il segnale proviene da un aggregato indotto otticamente, che cresce con il tempo di irradiazione.

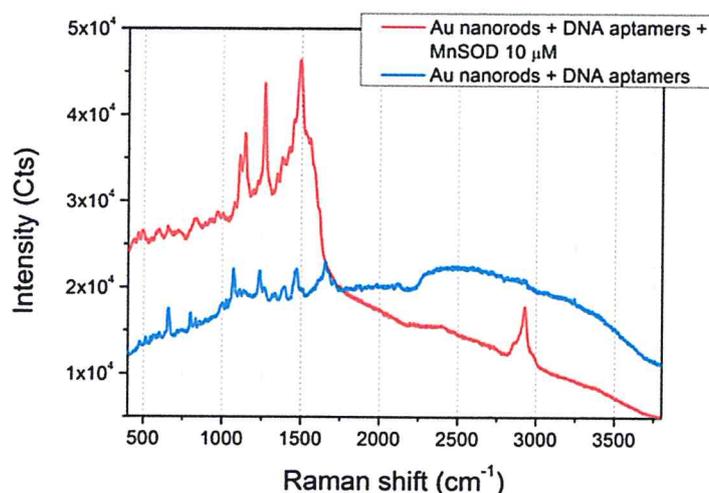


Figura 8: Spettri SERS di MnSOD adsorbita su nanorods funzionalizzati (linea rossa) e di DNA adsorbito sui nanorods (linea blu)

5. Spettroscopia SERS su molecole di Naftalene (inquinante) su gabbie molecolari di dendriti di argento.

- a. **Motivazioni:** il Naftalene è un inquinante marino poco solubile in acqua. La possibilità di rivelare il naftalene a basse concentrazioni è quindi molto interessante per lo sviluppo di sensori ad-hoc. Abbiamo quindi investigato la possibilità di usare dendriti di argento, un substrato facilmente riproducibile e low cost per la rivelazione del Naftalene. Un ulteriore vantaggio dei dendriti è quello di essere porosi e quindi assorbire e mantenere molecole in soluzione per tempi superiori rispetto a quanto non si riesca a fare con i normali substrati SERS litografati.
- b. **Misure SERS:** sono state inizialmente effettuate misure Raman sulla polvere e sulla polvere dispersa in acqua a concentrazione di 1 μM (15 ppm). Condizioni sperimentali: eccitazione a $\lambda_{\text{exc}} = 633 \text{ nm}$ e potenza $P = 6 \text{ mW}$, per la polvere abbiamo usato un obiettivo 50X LWD objective e tempo di integrazione di 1s per la soluzione acquosa (misura effettuata in una microcella come quelle usate nei precedenti esperimenti) abbiamo usato un obiettivo 100X e un tempo di integrazione di 300s. Lo spettro vibrazionale del Naftalene è facilmente misurabile sulla polvere (Figura 9, linea verde). Si osservano i modi più intensi a 508 cm^{-1} (CCC bending), 754 cm^{-1} (breathing), 1020 cm^{-1} (CC ring stretching), 1382 cm^{-1} (CC stretch. ring deformation), 1576 cm^{-1} (C=C stretch). Dopo la dispersione in acqua a concentrazione di 1 μM (15 ppm), nessuno spettro Raman del naftalene è visibile (solo i



modi dell'acqua appaiono a 1600 e a 3000 cm^{-1}). La stessa soluzione è stata depositata mediante drop casting su un substrato di dendriti di argento. Figura 9 (linea rossa) mostra uno spettro SERS acquisito con un obiettivo 100X, usando 60 μW di potenza e and 30 s di tempo di integrazione. Si può vedere la corrispondenza dei picchi con un leggero blue -shift (5 - 15 cm^{-1}) che viene di solito attribuito al bond strenghtening dovuto al legame della molecola con il substrato metallico. Si nota inoltre come i modi a 508 cm^{-1} (CCC bending), 754 cm^{-1} (breathing) siano soppressi o fortemente attenuati in virtù, probabilmente, del diverso enhancement chimico. Vista la bassa potenza e i bassi tempi di integrazione impiegati per ottenere questa misura, pensiamo **sia possibile spingere il limite di rivelazione del Naftalene in acqua sicuramente a livelli di 1 ppm e molto probabilmente nel range delle centinaia di ppb** usando dendriti di argento e lunghezze d'onda di eccitazione ottimali (es. 515 o 532nm).

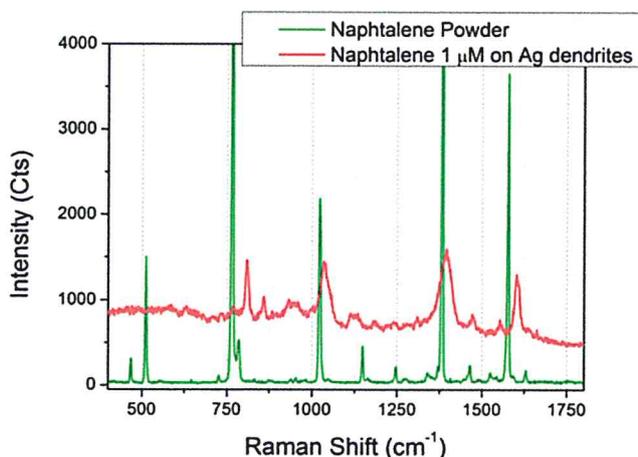


Figura 9: Spettro SERS del naftalene (linea rossa) confrontato con naftalene in polvere (linea verde)

6. **Spettroscopia SERS su molecole di fluoroantene (inquinante) su dendriti di argento.** Non è stato possibile rivelare segnali SERS riproducibili da fluorantene, probabilmente a causa del diverso solvente utilizzato (etanolo) e dei suoi effetti sul substrato SERS-attivo.

Data 28/8/2014

IPCF - CNR - IPCF

Tit.:	Cl:	F:
N. 0004755	01/09/2014	



Firma