



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
FIRENZE

Scuola di
Scienze Matematiche
Fisiche e Naturali

Dottorato di Ricerca in Scienze Chimiche

Ciclo XXXIV

Coordinatore Prof. Piero Baglioni

Development and Spectroscopic Characterization of Plasmonic Materials for Biomedical Applications

Settori Scientifici Disciplinari CHIM/03-CHIM/01

Dottorando

Dott. Alessio Milanese

Tutore

Prof. Moreno Lelli

Controrelatrici

Prof.ssa Monica Bertoldo
Prof.ssa Ilaria Mannelli

Co-Tutori

Dr. Fulvio Ratto
Dr. Sonia Centi

Coordinatore

Prof. Piero Baglioni

Anni 2018/2021



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
FIRENZE

Scuola di
Scienze Matematiche
Fisiche e Naturali

Dottorato di Ricerca in Scienze Chimiche

Ciclo XXXIV

Coordinatore Prof. Piero Baglioni

Sviluppo e Caratterizzazione Spettroscopica di Materiali Plasmonici per Applicazioni Biomediche

Settori Scientifici Disciplinari CHIM/03-CHIM/01

Dottorando

Dott. Alessio Milanese

Tutore

Prof. Moreno Lelli

Controrelatrici

Prof.ssa Monica Bertoldo
Prof.ssa Ilaria Mannelli

Co-Tutori

Dr. Fulvio Ratto
Dr. Sonia Centi

Coordinatore

Prof. Piero Baglioni

Anni 2018/2021



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
FIRENZE

School of
Mathematical, Physical
and Natural Sciences

Research Doctorate (Ph.D.) in Chemical Sciences

Cycle XXXIV

Coordinator Prof. Piero Baglioni

Development and Spectroscopic Characterization of Plasmonic Materials for Biomedical Applications

Disciplinary Scientific Sectors CHIM/03-CHIM/01

PhD Student

Dott. Alessio Milanese

Tutor

Prof. Moreno Lelli

Countersupervisors

Prof.ssa Monica Bertoldo
Prof.ssa Ilaria Mannelli

Co-Tutors

Dr. Fulvio Ratto
Dr. Sonia Centi

Coordinator

Prof. Piero Baglioni

Years 2018/2021

A Massimiliano

INDICE

Abstract	6
1 Introduzione	10
1.1 I Gold-Nanorods (GNRs)	10
Riferimenti bibliografici	36
2 Effetto del rivestimento sulla fotostabilità dei GNRs	69
2.1 I Coating.....	69
Riferimenti bibliografici	80
2.2 Small Thiols Stabilize the Shape of Gold Nanorods.....	92
Abstract	92
2.2.1 Introduction.....	92
2.2.2 Experimental Methods	93
2.2.3 Results and Discussion.....	94
2.2.4 Conclusions.....	97
2.2.5 Acknowledgments.....	98
2.2.6 References	98
Supporting Information	101
Appendice	109
3 Effetto della rugosità sulla fotostabilità dei GNRs	110
3.1 La rugosità nei GNRs.....	110
3.2 Strategie alternative per aumentare la fotostabilità dei GNRs	119

Riferimenti bibliografici	122
3.3 Impact of Kapitza resistance on the stability and efficiency of photoacoustic conversion from gold nanorods	128
Abstract	128
3.3.1 Introduction	129
3.3.2 Materials and methods	129
3.3.3 Results and discussion	130
3.3.4 Conclusions	133
3.3.5 Acknowledgments	134
3.3.6 References	134
Supplementary Material	136
Appendice	141
 4 Applicazioni dei GNRs nel wound healing	142
4.1 GNRs inclusi in idrogel ibridi	142
Riferimenti bibliografici	147
4.2 Optically activated and interrogated plasmonic hydrogels for applications in wound healing	160
Abstract	160
4.2.1 Introduction	160
4.2.2 Experimental Section	161
4.2.3 Results and Discussion	163
4.2.4 Conclusion	167
4.2.5 Acknowledgments	167
4.2.6 References	167
Supporting Information	170
Appendice	173
 5 Conclusioni	174
 6 Ringraziamenti	178

ABSTRACT

Sviluppo e Caratterizzazione Spettroscopica di Materiali Plasmonici per Applicazioni Biomediche

Dottorando Dott. Alessio Milanesi alessio.milanesi@unifi.it

Tutore Prof. Moreno Lelli moreno.elli@unifi.it

Co-Tutore Dr. Fulvio Ratto f.ratto@ifac.cnr.it

Co-Tutrice Dr. Sonia Centi s.centi@ifac.cnr.it

Controrelatrice Prof.ssa Monica Bertoldo monica.bertoldo@unife.it

Controrelatrice Prof.ssa Ilaria Mannelli ilaria.mannelli@icfo.eu

Le particelle plasmoniche come i nanorods d'oro (GNRs) si stanno mostrando potenti agenti di contrasto per applicazioni importanti come l'imaging fotoacustico e l'ablazione fototermica del cancro. Però, la loro efficienza unica di conversione fototermica può trasformarsi in uno svantaggio pratico, e esporli al rischio di surriscaldamento e fotodanneggiamento irreversibile. Verranno approfonditi i processi di prefusione e rimodellazione dei GNRs sotto illuminazione con impulsi ottici di durata tipica dell'ordine di pochi ns. Verrà intrapresa una classificazione retrospettiva di tali approcci secondo principi spesso impliciti, come: vincolare la forma

iniziale, velocizzare il loro accoppiamento termico con l'ambiente abbassando la loro resistenza termica all'interfaccia, oppure ridistribuire l'energia in ingresso tra più particelle. Saranno discussi vantaggi e svantaggi e contesti di interesse pratico in cui una soluzione può essere più appropriata dell'altra.

La stabilizzazione delle proprietà ottiche delle particelle plasmoniche anisotrope tramite riscaldamento termico e irradiazione laser è una questione importante in molte applicazioni biomediche. Verrà affrontato l'effetto che piccoli tioli hanno sulla fotostabilità termica dei nanorods d'oro. Le nanoparticelle sono state trattate con miscele di poli-etilen-glicole tiolato (PEG-SH) e metil-benzen-tiolo (MBT) con rapporti molari compresi tra 0 (per il caso del PEG puro) e 20, e poi incubati in stufa in condizioni di sub-ebollizione. È stato scoperto che i piccoli tioli migliorano notevolmente la stabilità termica dei GNRs. Ad esempio, dopo 1 ora a 90 °C i campioni con PEG puro hanno perso più del 70% dell'assorbanza ottica nella loro posizione di picco iniziale, mentre le particelle ricoperte di un denso strato di MBT sono rimaste pressoché invariate. È possibile attribuire questo effetto ad una modulazione della barriera di attivazione per la diffusione superficiale degli atomi d'oro. Inoltre, abbiamo affrontato la traduzione di questo effetto sulla fotostabilità dei nanorods d'oro irradiati in condizioni di interesse per l'imaging fotoacustico ed è stato scoperto che i piccoli tioli ritardano le soglie di danneggiamento fino a un fattore di 2.

In questo lavoro di tesi viene descritto inoltre l'effetto della resistenza termica all'interfaccia oro-acqua (resistenza di Kapitza) sulle prestazioni di conversione fotoacustica dei nanorods d'oro. I risultati indicano possibili strategie per l'ottimizzazione delle particelle plasmoniche come agenti di contrasto per l'imaging, o anche come trasduttori per i biosensori.

Viene inoltre suggerito un approccio efficace per modulare la resistenza di Kapitza includendo caratteristiche ancora non ben studiate come rugosità o presenza di adsorbati. Seguendo questa idea è stata sintetizzata una variante rugosa di nanorods d'oro per deposizione e sostituzione galvanica di un guscio d'argento, dove la rugosità fornisce segnali fotoacustici più elevati di circa il 70% e soglie di danneggiamento del 120%. Inoltre, le particelle sono state rivestite con una corona proteica, la quale apporta una diminuzione dei segnali fotoacustici con l'aumentare dello spessore del guscio; questo potrebbe ispirare nuove soluzioni per biosensori basate su un meccanismo di trasduzione fotoacustica. Entrambi questi risultati sono coerenti con un'efficace modulazione della resistenza di Kapitza, che può diminuire con l'irruvidimento, a causa di un aumento della superficie specifica, e può aumentare con l'introduzione di un rivestimento proteico (il quale può fungere da isolamento termico).

Sono stati anche sviluppati materiali ibridi costituiti da nanorods core/shell Au/Ag, inclusi in fantocci biomimetici (scaffold) porosi di chitosano/polivinilil alcol (chitosano/PVA) per applicazioni

nell'ingegneria tissutale e nella guarigione delle ferite (wound healing). La combinazione di Au e Ag in un unico costrutto fornisce opportunità sinergiche per l'attivazione ottica di funzioni come la saldatura dei tessuti con laser nel vicino infrarosso e l'interrogazione remota per l'acquisizione di parametri di rilevanza prognostica nel monitoraggio della guarigione delle ferite. In particolare, la componente bimetallica assicura sintonizzabilità ottica, durata di conservazione e stabilità fototermica migliori, funge da serbatoio di cationi d'argento germicidi. Allo stesso tempo, la miscela polimerica è ideale per essere legata al tessuto connettivo a seguito di attivazione fototermica e per supportare i processi di fabbricazione che forniscono un'elevata porosità, come l'elettrofilatura, ponendo così tutte le premesse per il ripopolamento cellulare e la protezione antimicrobica.

In sintesi, in questo lavoro, è stata affrontata l'ottimizzazione di un sistema importante come i GNRs per applicazioni complementari in diversi ambiti biomedici; ne è stata ottimizzata la stabilità e l'efficienza di conversione fotoacustica per essere utilizzati come agenti di contrasto ottico, sviluppandone rivestimenti funzionali con piccole molecole organiche oppure con strati porosi metallici. Infine è stata valutata l'integrazione di nanorods bimetallici di Au/Ag in scaffold ibridi per ingegneria tissutale, sfruttandone sia l'efficienza di conversione fototermica sia la sensibilità ottica alle condizioni di stress ossidativo, allo scopo di attivare processi e monitorare parametri di interesse nell'ambito del wound healing.

1

INTRODUZIONE

1.1 *I Gold Nanorods (GNRs)*

Le particelle plasmoniche stanno emergendo come una soluzione versatile per un'ampia varietà di esigenze, al crocevia tra ottica biomedica, rilevamento e imaging, a causa della loro efficienza per migliorare, assorbire e diffondere la luce¹⁻³.



Figure 1.1: la figura a) a sinistra mostra una sospensione colloidale di nanorods d'oro; la figura b) a destra raffigura un'immagine TEM della relativa sospensione di rods.

In particolare, i nanorods d'oro sono una soluzione promettente che combina caratteristiche fotofisiche e biochimiche, favorevoli per applicazioni critiche come l'imaging fotoacustico (PAI, photoacoustic imaging) e l'ablazione fototermica del cancro^{4,5}, dove la luce viene rispettivamente convertita in ultrasuoni e calore. Però, in alcuni casi, la grande efficienza della conversione fototermica dei nanorods d'oro può rivelarsi un problema e una limitazione pratica, poiché l'energia in ingresso può innescare il loro surriscaldamento e rimodellamento, e quindi causare la loro deformazione permanente. Qui verrà presentata una panoramica di diversi approcci per migliorare la fotostabilità dei GNRs per applicazioni nel PAI, sia migliorando la loro stabilità termica (vincolando la forma iniziale e inibendo così l'inizio della prefusione attraverso l'aggiunta di gusci rigidi o morbidi, come monostrati autoassemblati); oppure accelerando il loro tasso di raffreddamento dissipativo verso l'ambiente, migliorando di conseguenza l'accoppiamento termico all'interfaccia oro/acqua attraverso una progettazione razionale del rapporto superficie/volume delle particelle; o anche ridistribuendo l'energia in ingresso tra più particelle attraverso la personalizzazione della sorgente ottica o una sottile modulazione delle loro forme. Discuteremo casi in cui una soluzione può essere più pertinente dell'altra, nonché combinazioni sinergiche che favoriscano l'applicazione delle particelle plasmoniche nella pratica biomedica⁶.

Il PAI sta emergendo come una potente soluzione per combinare i migliori vantaggi del contrasto ottico e del rilevamento acustico⁷.

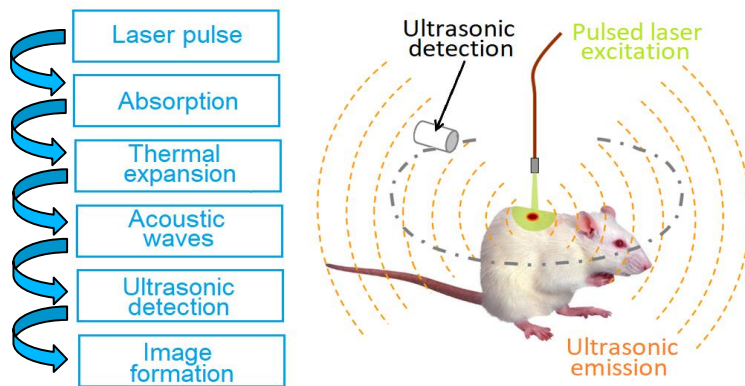


Figura 1.2: Schema del principio fisico su cui si basa l'imaging fotoacustico
(fonte: Wikipedia)

L'idea chiave è quella di irraggiare un campione biologico con impulsi brevi di un laser o di un LED, per generare esplosioni di ultrasuoni, e rilevare tali ultrasuoni con un trasduttore passivo per ricostruire un'immagine che codifica principalmente la distribuzione di un'assorbanza ottica. Pertanto, il meccanismo di contrasto è l'assorbanza ottica, ma l'immagine è formata dalla retro-proiezione di un fronte d'onda acustico, e quindi non soffre dell'effetto della torbidità, in prima istanza. La durata tipica degli impulsi ottici è nella scala dei nanosecondi, mentre la frequenza del segnale acustico dipende dalla scala delle lunghezze dell'oggetto target e può estendersi da centinaia di KHz, o meno, a decine di MHz, o più.

Sebbene la penetrazione della luce ponga ancora alcune limitazioni rispetto all'imaging ad ultrasuoni alla frequenza corrispondente^{8,9}, la tomografia fotoacustica fino a diversi cm è un traguardo rilevante¹⁰⁻¹³. Al centro del PAI c'è un processo di conversione fotoacustica che trasforma un impulso ottico in un segnale acustico¹⁴. A sua volta, il processo di conversione fotoacustica, e la seguente propagazione, deriva da una cascata di eventi consecutivi che includono le fasi di assorbimento ottico, conversione fototermica e propagazione del calore, e conversione termoelastica e propagazione acustica. In pratica, la fase iniziale della conversione fototermica genera una sorgente termica la cui potenza Q_t [W/m³] è descrivibile dall'equazione:

$$Q_t = \mu_a \times I \quad (1)$$

dove μ_a è l'assorbimento ottico [m⁻¹] e I è la densità di potenza ottica [W/m²].

Quindi, il processo di conversione fototermica e propagazione del calore è governato dall'equazione generale:

$$\rho C_p \frac{\partial T}{\partial t} - \nabla \cdot (k \nabla T) = Q_t \quad (2)$$

dove ρ è la densità [kg/m³], C_p è la capacità termica specifica a pressione costante [J/(K·kg)], e k è la conducibilità termica

[W/(m·K))].

Invece il processo di conversione termoelastica e propagazione acustica in un liquido segue l'equazione ugualmente generale:

$$\frac{1}{v_s^2} \frac{\partial^2 P}{\partial t^2} - \nabla^2 p = Q_a \quad (3)$$

dove v_s è la velocità del suono, e abbiamo introdotto Q_a come sorgente monopolare di pressione acustica [Pa/m²]. Nel caso particolare che la sorgente monopolare di pressione acustica nasca da un processo di espansione termoelastica in un liquido, l'equazione assume la forma:

$$Q_a = \frac{\alpha}{v_s^2} \frac{\partial^2 T}{\partial t^2} \quad (4)$$

dove α è un coefficiente di espansione della pressione $\alpha = \left(\frac{\partial P}{\partial T}\right)_V$.

Nel caso standard, dove i processi di assorbimento ottico ed espansione termoelastica avvengono nello stesso mezzo e l'intero processo è abbastanza veloce per far sì che la conducibilità termica sia trascurabile, cioè $k \approx 0$, l'intero fenomeno assume la forma comune di un'equazione d'onda:

$$\frac{\partial^2 P}{\partial t^2} - v_s^2 \nabla^2 P = \frac{\alpha \mu_a}{\rho C_P} \frac{\partial I}{\partial t} \quad (5)$$

che può godere di una soluzione analitica. Ad esempio, nell'approssimazione che l'impulso ottico è delta-like e l'oggetto bersaglio è puntiforme¹⁴, la pressione fotoacustica alla sua superficie risulta essere proporzionale al prodotto di $\mu_a \cdot \Gamma \cdot F$, dove abbiamo introdotto il Parametro di Grüneisen $\Gamma = \alpha/\rho C_p$, e F la fluenza ottica [J/m^2] dell'impulso in ingresso. La fluenza ottica è l'energia radiante ricevuta da un corpo per unità della sua superficie.

Tuttavia, in una situazione più generale, come quella di nostro interesse, dove l'evento di assorbanza ottica avviene all'interno dei nanorods d'oro, ma il processo di espansione termoelastica si sviluppa nel loro mezzo acquoso^{15,16}, la conduttività termica è vitale, e l'intensità della sorgente fotoacustica in realtà cresce con il coefficiente di conduttanza del contatto termico attraverso l'interfaccia metallo-acqua. La generazione fotoacustica da una sospensione colloidale di GNR è un processo complesso, dove le fasi di conversione fototermica ed espansione termoelastica sono debolmente accoppiate attraverso la velocità di raffreddamento dissipativo dell'agente di contrasto ottico. In questo contesto, le simulazioni numeriche con metodi multiscala come il Metodo degli Elementi Finiti (FEM)^{15,17} rappresenta uno strumento conveniente per affrontare le dipendenze dei parametri critici come l'evoluzione di temperatura nei nanorods d'oro o l'efficienza della conversione fotoacustica.

Il PAI è stato implementato in molti laboratori e diverse piattaforme sono disponibili sul mercato per lavori preclinici, traslazionali o clinici. In generale, i sistemi fotoacustici possono essere suddivisi in due classi generali¹⁸, cioè, tomografia e microscopia, a seconda della combinazione delle configurazioni per l'eccitazione ottica e la rivelazione acustica. In pratica, il setup tomografico prevede che il campione sia inondato di luce ad impulsi ad alta energia non focalizzata e bassa frequenza di ripetizione, e l'immagine può essere ricostruita attraverso una serie di trasduttori, mentre la controparte microscopica prevede che il campione sia scansionato con luce ad impulsi ad alta energia focalizzata e alta frequenza di ripetizione, e il segnale sia recuperato con risoluzione ottica o acustica. In entrambi i casi, la flukenza ottica è di un ordine di grandezza simile, tipicamente nell'intervallo di diversi mJ/cm^2 , al fine di suscitare un segnale fotoacustico di sufficiente rapporto segnale-rumore.

Come abbiamo accennato, il meccanismo principale di contrasto nel PAI è di natura ottica. Più precisamente, si presume spesso che le immagini fotoacustiche codifichino mappe di assorbanza. Tuttavia, purtroppo, altri fattori concorrono a fornire contrasto, come l'eterogeneità della flukenza ottica e del parametro di Grüneisen o riflessioni acustiche^{24,25}. Qui, ci atteniamo al concetto elementare che l'assorbanza ottica è la principale causa di contrasto nel PAI. Alcune principali fonti di contrasto endogeno sono i “coloranti” biologici come l'emoglobina e la melanina. L'implementazione multispettrale del PAI per definire l'ossi e deossi emoglobina e

rilevare la pressione parziale dell'ossigeno nei vasi sanguigni con risoluzione 4D²⁶, rimane probabilmente la più alta applicazione di successo dell'imaging fotoacustico; è stato sfruttato in contesti critici come il cancro²⁷⁻²⁹ o le lesioni cerebrali neonatali^{30,31}.

L'utilizzo del PAI per lo studio della distribuzione di emoglobina e della pressione parziale di ossigeno, sta diventando uno strumento clinico di interesse attuale. Tuttavia, resta inteso che il potenziale di questa tecnologia può estendersi facilmente al dominio dell'imaging molecolare generico mediante l'uso di mezzi di contrasto ottici mirati.

In contrapposizione con l'imaging ultrasonico, dove gli agenti di contrasto devono essere delle dimensioni dei micron³⁵ e quindi difficilmente possono macchiare il tessuto biologico e i fluidi corporei, i mezzi di contrasto ottici possono essere molto più piccoli e quindi consentire più applicazioni. Un caso tipico è l'utilizzo di mezzi di contrasto ottici in grado di fuoriuscire dai vasi sanguigni e marcare il microambiente tumorale.

Esistono molti materiali che sono oggetto di indagine come mezzi di contrasto esogeni per il PAI molecolare, e possono essere suddivisi in due classi generali: materiali inorganici, come nanoparticelle di metalli nobili o di carbonio, e materiali organici a base di coloranti organici, nanoparticelle di polimeri semiconduttori³⁶⁻³⁹. Come regola generale, i materiali organici spesso godono di migliori prestazioni in termini di biodegradabilità e biocompatibilità. Gli esempi includono varie particelle che incorporano coloranti organici, come i

sistemi micellari^{13,40}, i liposomi⁴¹, veicolanti a base di proteine⁴² o lipidi⁴³, polimeri che assorbono dal lontano rosso al vicino infrarosso (come i sistemi π -coniugati⁴⁴, la melanina⁴⁵ o la polidopamina^{46,47}).

Al contrario, i sistemi inorganici tendono a offrire una maggiore facilità di sintesi e manipolazione, una maggiore efficienza di conversione fototermica e una maggiore stabilità chimica e fotochimica³⁹. Esempi di questo tipo includono composti ionici come le nanoparticelle di blu di Prussia^{48,49}, nanotubi di carbonio⁵⁰ o grafene⁵¹ e un'ampia varietà di particelle plasmoniche⁵² che spesso sono costituite da metalli nobili come l'oro. Tra quest'ultima classe, i nanorods d'oro sono uno dei sistemi più interessanti e popolari^{4,53}, per i motivi che saranno illustrati successivamente.

Tuttavia, merita considerazione anche un altro argomento, ovvero l'uso di agenti di contrasto multifunzionali per fotoacustica o gli interventi guidati da immagini multimodali, come le terapie fototermiche o combinatorie. Anche in questo caso, si può trovare la stessa dicotomia tra nanoparticelle inorganiche⁵⁴⁻⁶⁰ e organiche^{61,62} che fungono da agenti teranostici e spesso integrano moduli multipli, con soluzioni basate su nanorods d'oro che giocano un ruolo chiave nella letteratura⁶³⁻⁶⁶.

Il caso dei nanorods d'oro, piuttosto che di altre forme in corso di valutazione in qualità di agenti di contrasto per il PAI, (come nano-shell⁶⁷, nano-cage^{68,69} o nano-stelle^{70,71}), è rappresentativo di una classe molto più ampia di materiali fotoresponsivi. Tra gli altri

modelli di particelle anisotrope di metalli nobili, i nanorods d'oro hanno ricevuto il massimo interesse accademico e commerciale, tanto che sono già disponibili dai principali fornitori come Merck Sigma-Aldrich o Creative Diagnostics. I GNRs si distinguono in termini di facilità di sintesi ed efficienza di conversione fototermica e fotoacustica, mentre altre soluzioni che presentano punte e avvallamenti, come i nano-cage o le nano-stelle, sono probabilmente le migliori per le applicazioni basate sull'effetto del miglioramento nel campo vicino negli hot spot plasmonici^{72,73}.

Ci sono molte ragioni per cui i nanorods d'oro sono diventati così popolari come agenti di contrasto per imaging ottico, e in particolare per applicazioni fotoacustiche, come confermato dal trend crescente del numero di articoli nel corso degli anni. Uno dei più notevoli vantaggi di queste particelle è la possibilità di sintonizzare (*tuning*) con precisione e facilità le loro bande plasmoniche attraverso le finestre spettrali vis-NIR, tramite la semplice variazione del loro cosiddetto aspect ratio (AR), cioè il rapporto tra lunghezza assiale e diametro trasversale^{5,79}. In termini più semplici, questa proprietà può essere spiegata ricorrendo alla teoria di Gans⁸⁰, che prevede una soluzione elettromagnetica nel caso di particelle omogenee con forma ellissoidale e permeabilità (ϵ) complessa incorporata in un ospite dielettrico con permeabilità (ϵ_m) reale. In particolare, la sezione d'urto per l'estinzione ottica di sferoidi orientati casualmente prevede $C_{ext} = 4\pi k \text{Im} \frac{(\alpha_1 + 2\alpha_2)}{3}$, dove $k = \frac{2\pi}{\lambda} = \frac{2\pi\sqrt{\epsilon_m}}{\lambda_0}$ è il numero

d'onda nel mezzo, e α_1 e α_2 sono le polarizzabilità elettrostatiche rispettivamente lungo e perpendicolare all'asse di simmetria⁸¹:

$$\alpha_{1,2} \equiv \alpha_{\parallel,\perp} = \frac{V}{4\pi} \frac{\varepsilon - \varepsilon_m}{\varepsilon_m + (\varepsilon - \varepsilon_m)L_{1,2}} \quad (6)$$

dove V è il volume della particella e $L_{1,2}$ sono i cosiddetti fattori di depolarizzazione geometrici. La lunghezza d'onda della risonanza plasmonica localizzata (λ_{LPR}) per l'eccitazione longitudinale può essere facilmente derivata dall'equazione (6) e utilizzando il modello di Drude per la funzione dielettrica dell'oro⁸¹:

$$\lambda_{LPR} = \lambda_p \sqrt{\varepsilon_{ib} + \left(\frac{\varepsilon_m}{L_1} - \varepsilon_m\right)} \quad (7)$$

dove il contributo interbanda è $\varepsilon_{ib} \sim 12$ e la lunghezza d'onda del plasma è $\lambda_p \sim 130$ nm, nel caso dell'oro. Quando il fattore di depolarizzazione geometrica L_1 varia da $\frac{1}{3}$ per sfere a zero per aghi ideali, l'equazione (7) prevede un'ampia variazione di λ_{LPR} da 520 nm per gocce standard in acqua lontano dalla finestra degli infrarossi.

Un'altra caratteristica chiave dei nanorods d'oro è la loro facilità di sintesi e modifica. I protocolli esistenti di sintesi elettrochimica^{82,83}, mediata da semi⁸⁴⁻⁸⁶ e templata^{87,88} consentono di produrre GNRs

con lunghezza da decine a 100 nm o più e larghezza da 5 a decine di nm. Tuttavia, per il più popolare approccio mediato da semi e le sue varie modifiche, la larghezza possibile varia più tipicamente tra 10 e 40 nm e l'AR varia da 2 a 7. Secondo l'equazione (7), la corrispondente λ_{LPR} longitudinale di tali particelle varia da circa 600 nm a 1200 nm.

Oltre all'AR, ci sono diversi altri fattori che determinano l'esatta posizione della λ_{LPR} . Il primo fattore aggiuntivo è la forma. Una forma a rod è vicino a un cilindro con estremità semisferiche (cilindro a S^{90} o sigaro), ma sono possibili e ricorrenti anche altre forme come dog-bones⁹³, manubri⁹⁴ e varianti più complicate⁹⁵. La diversità di forma porta ad una variazione nella λ_{LPR} fino a 50 nm rispetto al caso ideale di particelle simili a sigari. Il secondo fattore importante è lo spessore. Nello specifico, due serie di nanorods d'oro con identico AR, ma uno spessore diverso, mostreranno risonanze leggermente diverse, vale a dire la λ_{LPR} dei rods più spessi sarà spostata verso il rosso rispetto a quelli più sottili.

Ancora più importante, la variazione del volume totale porta a cambiamenti significativi nel rapporto tra assorbimento ottico e scattering. Per le particelle più piccole, l'assorbimento ottico prevale in modo schiacciante sull'estinzione totale, e questo è il caso più comune. Ottimizzare e sintonizzare quindi le proporzioni con il volume medio consente di produrre compromessi efficaci per varie applicazioni basate su interazioni con luce NIR.

Da un punto di vista chimico, la messa a punto delle proporzioni e del volume dei nanorods d'oro può essere ottenuta attraverso la variazione delle concentrazioni dei vari reagenti, e più comunemente le quantità di semi e ioni Ag^+ , in maniera graduale. Però, l'effetto desiderato può essere ottenuto anche con procedure aggiuntive. Recentemente, il nostro gruppo ha suggerito due protocolli utili per la messa a punto della lunghezza d'onda di risonanza plasmonica localizzata e del volume di GNRs basati su una combinazione di processi di crescita eccessiva⁹¹ ed etching⁹². Durante la crescita eccessiva, il volume totale del rod aumenta e la λ_{LPR} tende allo spostamento verso il blu, insieme all'AR. Invece, nel processo di etching, la lunghezza del rod subisce un progressivo decremento mentre lo spessore rimane costante. Questa trasformazione si traduce in una progressiva diminuzione della λ_{LPR} dal valore iniziale a un punto finale, tipicamente intorno 600 nm. Da notare che l'etching è un processo completamente controllabile e la lunghezza d'onda di risonanza può essere sintonizzata con una precisione di circa 1 nm. Quindi, le tecnologie di crescita eccessiva e l'etching possono essere utilizzate per la progettazione razionale della geometria del rod, e quindi per controllare la λ_{LPR} e il rapporto tra assorbimento ottico e scattering. Queste opportunità rendono i nanorods d'oro candidati promettenti per una vasta gamma di applicazioni. In particolare, gli obiettivi più importanti dei GNRs sono l'ipertermia ottica e l'imaging fotoacustico del cancro. Poiché entrambe le applicazioni derivano da un processo di conversione fototermica, nonostante le

differenze fondamentali, il tasso di assorbanza ottica e decadimento non radiativo sono indicatori chiave per le prestazioni di queste particelle come agenti di contrasto ottici. Sono stati condotti vari studi teorici⁹⁶⁻¹⁰⁰ e sperimentali^{76,77,101,102} per quantificare e confrontare l'efficienza della conversione fototermica di diversi modelli di particelle plasmoniche. Le simulazioni elettromagnetiche suggeriscono che i rods piccoli godono di assorbanza maggiore nella finestra del NIR rispetto alle possibili alternative. Per contro, l'anisotropia dei nanorods d'oro li rende molto sensibili alla polarizzazione della luce. I risultati sperimentali del riscaldamento fototermico dimostrano anche che i rod piccoli e le shell o cage cavi, in formato colloidale, producono il più alto tasso di conversione fototermica sotto irradiazione nel NIR. È importante notare che tutti gli esperimenti menzionati sono stati effettuati con sorgenti a bassa potenza. Per l'irradiazione pulsata ad alta energia, come vedremo, la velocità di dissipazione del calore nell'ambiente e anche il fenomeno del foto-danneggiamento delle particelle concorrono nel processo complessivo di conversione fototermica.

Un altro vantaggio dei nanorods d'oro è la loro facilità di modificarli con coatings funzionali. Per la maggior parte delle applicazioni biomediche, la superficie dell'oro dovrebbe essere derivatizzata con biomolecole appropriate, come anticorpi, DNA, Raman-reporter, tag fluorescenti, polimeri stealth, ecc.^{103,104}. A causa della presenza di un doppio strato protettivo di bromuro di cetil-trimetil-ammonio (CTAB) sulla superficie dei nanorods d'oro sintetizzati, la loro

modifica è spesso più impegnativa del caso delle particelle sferiche standard ricoperte di ioni citrato.

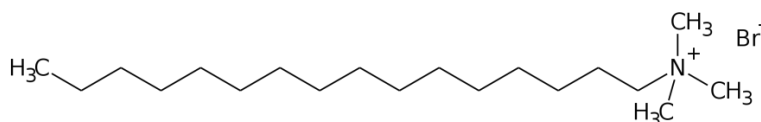


Figura 1.3: molecola di bromuro di cetil-trimetil-ammonio (CTAB)

L'uso della chimica del legame oro-tiolo è un modo comune per funzionalizzare i nanorods d'oro^{95,105,106}, sebbene altri approcci, come il rivestimento tramite polielettroliti¹⁰⁷ o pre-terminazioni con gusci di silice¹⁰⁸ o gusci di polidopamina^{109,110} siano utili alternative. In entrambi i casi, tali rivestimenti svolgono un ruolo critico nei profili biologici dei nanorods d'oro e possono svolgere funzioni eccezionali, come consentire il trasporto mirato a un tumore maligno attraverso una via di somministrazione sistemica come un'iniezione endovenosa. In tale contesto, le strategie comuni includono: l'uso di polimeri stealth, (come il poli-etilen-glicole (PEG), per ingannare la barriera reticoloendoteliale e soddisfare la cosiddetta permeabilità aumentata e l'effetto di ritenzione^{11,112}), e la sua associazione con un'ingegnosa pletora di soluzioni attive per riconoscimento host-guest¹¹³⁻¹¹⁵, oppure l'integrazione in cellule tumorali-tropiche¹¹⁶⁻¹¹⁸.

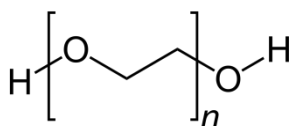


Figura 1.4: struttura del poli-etilen-glicole (PEG)

Nonostante i notevoli progressi, il trasporto mirato dei GNRs rimane un vivace campo di ricerca in corso, che beneficia enormemente della versatilità biochimica dell'oro. Oltre a questi vantaggi, il lavoro sui nanorods d'oro incontra anche criticità che rappresentano ancora una grande barriera contro la loro penetrazione traslazionale. Nella maggior parte dei casi, lo sviluppo di mezzi di contrasto per l'imaging fotoacustico punta ad un uso clinico nel corpo umano.

Senza approfondire la moltitudine di questioni normative ed etiche associate allo sviluppo di composti farmaceutici, citiamo solo che la loro valutazione è condizionata a una serie di prerequisiti coperti dall'acronimo ADMET, ovvero Assorbimento, Distribuzione, Metabolismo, Escrezione e Tossicità. In termini di adsorbimento e distribuzione, la comunità scientifica ha fatto passi da gigante verso un trasporto efficiente. Anche il problema della tossicità è stato oggetto di approfondite ricerche con esito complessivamente positivo^{119,120}. Al momento, il vero tallone d'Achille per la traduzione clinica delle nanoparticelle d'oro è il loro metabolismo o l'escrezione.

La premessa sconveniente è che l'inerzia biochimica dei metalli nobili è una caratteristica che fa sì che vengano scelti proprio per la

loro stabilità contro la corrosione e non tossicità, ma può fatalmente rallentare il loro metabolismo o la loro escrezione.

L'altro problema principale per l'implementazione dei nanorods d'oro come agenti di contrasto ottici per l'imaging fotoacustico è la loro fotoinstabilità. La fotoinstabilità dei nanorods d'oro non è solo un fenomeno di interesse accademico, ma anche una preoccupazione di pertinenza molto pratica. Infatti, i GNRs tendono a perdere l'efficienza della conversione fotoacustica per esposizione a impulsi di ns lunghi, già in regime di fluenza ottica dell'ordine di pochi mJ/cm^2 , più tipicamente sotto $10 \text{ mJ}/\text{cm}^2$, che è ben al di sotto dei limiti di esposizione permessi alle maggiori frequenze di interesse nel vicino infrarosso¹²³. Perciò, la fotoinstabilità dei nanorods d'oro rappresenta un vero collo di bottiglia nell'ottimizzazione delle applicazioni fotoacustiche.

Anche in condizioni ambientali¹²⁴, ma più facilmente all'aumentare della temperatura, e spesso, ancora più evidentemente dopo l'irradiazione con brevi impulsi ottici, i GNRs tendono a rimodellarsi in particelle più rotonde. Il driver di questo processo è che la forma prolata originata dalla crescita anisotropa dei nanorods d'oro è fuori equilibrio termodinamico e si discosta dalla loro costruzione di Wulff^{125,126}, che assomiglia a una sfera sfaccettata. Come regola generale, maggiore è la loro AR¹²⁷ e minore è la loro dimensione¹²⁸. In pratica, tutti quegli elementi che si discostano maggiormente da una costruzione di Wulff stabile, come punte e avvallamenti, sono meno stabili contro un trattamento termico o, naturalmente, anche

fototermico. In caso di irraggiamento con brevi impulsi ottici, i nanorods d'oro tendono a surriscaldarsi e poi a raffreddarsi nuovamente a temperatura ambiente attraverso un processo che comporta molteplici fasi successive: attivazione ottica delle oscillazioni plasmoniche, riscaldamento Joule per accoppiamento elettrone-fonone in una scala temporale inferiore a 10 ps, e quindi termalizzazione con l'ambiente mediante accoppiamento fonone-fonone in una scala temporale che dipende dalle varie caratteristiche dell'interfaccia e giace nell'ordine delle centinaia di ps^{127,19-132}. È generalmente inteso che la maggior parte della trasformazione si sviluppa vicino alla temperatura di picco¹⁷, cioè prima che la termalizzazione con l'ambiente prenda il sopravvento. La transizione completa da rods a sfere può richiedere tempi brevissimi, come poche decine di ps¹³³. Queste cifre mostrano bene la complessità del problema nel caso dell'imaging fotoacustico. Poiché la durata più tipica degli impulsi ottici implementata in tutte le piattaforme commerciali per l'imaging fotoacustico è nell'ordine di pochi ns, l'intera cascata di processi (dall'assorbimento alla sferoidizzazione) coesistono nel corso del tempo dell'innescio ottico. Perciò, i nanorods d'oro possono deformarsi e quindi perdere l'efficienza dell'assorbimento ottico e della conversione fotoacustica assorbendo la luce, cioè ben prima che l'impulso dannoso sia terminato. Al contrario, poiché la frequenza di ripetizione tipica è dell'ordine di pochi Hz fino a circa un KHz in alcuni casi, e la termalizzazione con l'ambiente richiede meno di circa 1 ns, il riscaldamento cumulativo

da impulso a impulso all'interno della singola particella è irrilevante. In alcuni passaggi, è inoltre importante chiarire che, con una diffusività termica in acqua dell'ordine di $100 \text{ nm}^2/\text{ns}$ ¹³⁴, la tipica scala di lunghezza coinvolta nell'imaging fotoacustico è dell'ordine di poche decine di nm, e quindi anche l'accoppiamento termico da particella a particella è spesso trascurabile¹³⁵. Come conseguenza, è solo la frazione di particelle in risonanza con il trigger ottico che è a rischio di rimodellamento¹³⁶. Invece la diffusività termica nell'oro è molto più alta e cade nell'ordine di $10^5 \text{ nm}^2/\text{ns}$, che è abbastanza veloce per ignorare la disomogeneità della temperatura lungo la lunghezza di ciascuna particella¹⁵. La deformazione delle particelle di metalli nobili non richiede il raggiungimento della loro temperatura di fusione rispetto al materiale bulk^{124,137}. Infatti, il loro rapporto superficie-volume è tale che il meccanismo dominante è la pre-fusione attraverso un processo di diffusione atomica superficiale, che sfocia in una riconfigurazione collettiva procedendo strato per strato o sfaccettatura per sfaccettatura senza transizione di fase, ma con attivazione termica secondo il comportamento di Arrhenius^{124,128,135,138}. In un recente articolo¹³⁵, è stato proposto un modello semplice per la cinetica della trasformazione dei nanorods d'oro, dove è stato implementato un valore costante di 0,6 eV per l'energia di attivazione di diffusione atomica superficiale. Tuttavia, un'accurata descrizione di questo parametro è piuttosto complessa e soggetta ad eterogeneità, ed è stata affrontata in vari documenti. I principi guida includono che il

suo valore varia con dettagli come la curvatura locale^{128,138} o più in generale la coordinazione¹³⁹⁻¹⁴¹, nonché le caratteristiche ambientali, o la rigidità^{124,128}. I fattori interni tendono a favorire la diffusività superficiale delle punte più acuminate rispetto a quella delle superfici più piatte. Invece, le caratteristiche ambientali modificano la dinamica complessiva aggiungendo forze viscoelastiche che tendono a vincolare la forma iniziale. Ad esempio, è stato dimostrato che i cosiddetti nano-dogbone d'oro inclusi in un film di polivinil alcol riscaldato a 110 °C¹²⁵, o nanorods d'oro PEGilati vincolati in una resina epossidica lasciata a scaldare da 120 a 220 °C¹²⁸ non sono riusciti a raggiungere la loro costruzione di Wulff, ma piuttosto sono giunti ad una forma intermedia, dove la pressione esercitata dall'ambiente esterno ha compensato l'effetto della forma prolata. Da un punto di vista pratico, la descrizione dell'esatto percorso che conduce alla sferoidizzazione dei nanorods d'oro non è così critica per lo scopo di questo lavoro. Però, è interessante notare che il processo rimane oggetto di ricerca in corso. Il fatto che le punte più acuminate siano contemporaneamente meno stabili e più mobili delle superfici più piatte ha portato la maggior parte degli autori a postulare un graduale trasferimento di materiale dalle calotte terminali alle pareti laterali dei nanorods d'oro^{128,138,142}. Nel caso di impulsi a lunghi ns, può anche apparire un rigonfiamento centrale nelle cosiddette particelle a forma di ϕ , come è stato riportato sempre dagli articoli precedenti^{82,143}. Causando una continua perdita di proporzioni, questo trasferimento basterebbe a spiegare la comune

osservazione di un progressivo blueshift della banda plasmonica delle oscillazioni longitudinali. Tuttavia, nel caso di particelle ultrapiccole, altri autori hanno evocato fenomeni più complessi, come l'espulsione di frammenti sferici secondo l'instabilità di Rayleigh-Plateau¹⁴⁴. Il principio fisico alla base di questo fenomeno è che l'emergere di increspature lungo le pareti laterali dei nanorods d'oro può dettare un gradiente di tensione superficiale in grado di alimentare un effetto valanga di amplificazione continua fino alla rottura in goccioline, come avviene nei fili metallici¹⁴⁵ e, forse più iconicamente, nei sistemi idrodinamici come le colonne liquide. La conseguenza in questo caso sarebbe un blueshift della banda plasmonica delle oscillazioni longitudinali accompagnate da una diminuzione del rapporto tra i loro componenti longitudinali e trasversali. Infine, ricordiamo che altri processi che sono stati descritti in letteratura includono la frammentazione esplosiva^{129,146}, la sublimazione¹⁴⁷, così come i percorsi collettivi verso una diminuzione della superficie specifica del particolato nel suo insieme, come la coalescenza e l'Ostwald-ripening^{142,144}, cioè uno scambio di materiale da particelle piccole o meno stabili a particelle più grandi o più stabili. La frammentazione esplosiva e l'emissione termoionica sono stati ipotizzati per spiegare una certa perdita di dimensione dei nanorods d'oro su un irraggiamento in regime degli impulsi ottici nell'ordine dei femto-secondi. Al contrario, la possibilità della coalescenza e dell'Ostwald-ripening è stata invocata in un regime continuo di annealing termico in presenza di un grande

eccesso di tensioattivo¹⁴², o nel caso di particelle ultrapiccole¹⁴⁴. Per quanto riguarda l'imaging fotoacustico, questi processi extra giocano probabilmente un ruolo trascurabile, e la perdita progressiva delle proporzioni rimane il meccanismo di maggiore importanza.

Come già accennato, le piattaforme commerciali per imaging fotoacustico purtroppo offrono poco controllo sui parametri chiave come la fluenza ottica. Per questo motivo, non sono sempre lo strumento migliore per l'ottimizzazione e la valutazione delle prestazioni di nuovi mezzi di contrasto, in particolare per quanto riguarda la fotostabilità, dove un controllo fine sulla fluenza è necessario per identificare le soglie di danneggiamento. Allo scopo di superare questi limiti, negli anni passati sono stati progettati allestimenti sperimentali dedicati e protocolli specifici. Tuttavia, un insieme standardizzato di linee guida e criteri non è ancora disponibile. Di conseguenza, possono essere trovati in letteratura diversi valori per la fluenza di soglia F_{th} , che vanno da poche centinaia fino a varie centinaia di mJ/cm^2 , con questa grande variabilità non solo dipendente dalle differenti proprietà delle particelle plasmoniche, ma spesso anche più sostanzialmente dai differenti criteri di misurazione e anche dai fantocci utilizzati per la loro implementazione.

Uno dei protocolli più popolari e diretti si basa sul confronto degli spettri di estinzione ottica dei nanorods d'oro prima e dopo l'esposizione al raggio laser per un dato numero di impulsi ad una data fluenza media^{63,123,148-150}. L'inizio di un esaurimento

dell'estinzione ottica nella posizione longitudinale del picco plasmonico, indica il verificarsi di parziale rimodellamento nell'insieme di particelle. L'analisi di tali perdite consente una definizione quantitativa di una soglia di danno^{123,149}, ma i valori rilevanti sono difficilmente comparabili da esperimento a esperimento. Ad esempio, l'insorgenza del danno può dipendere dal fatto che lo stesso campione sia riutilizzato per l'esposizione in condizioni diverse¹⁵¹, o invece rigenerato dopo ogni shot di impulsi ad una data fluenza¹²³. Questo protocollo è stato applicato principalmente con campioni liquidi, e la sua implementazione richiede sorgenti laser ad alta energia, al fine di irraggiare omogeneamente ampie aree di cuvette o piastre multipozzetto contenenti la dispersione di particelle plasmoniche per indagine con spettrofotometri standard. Un approccio alternativo sfrutta una sonda fotoacustica al posto dell'analisi spettrofotometrica per rilevare la trasformazione del mezzo di contrasto dopo un'eccitazione ottica^{17,152}. Attraverso un microscopio fotoacustico, viene monitorata la trasformazione delle particelle prendendo il rapporto R dell'efficienza di conversione fotoacustica in un certo punto di un fantoccio dopo e prima l'irradiazione con uno shot di impulsi da una sorgente focalizzata a una data fluenza. I segnali fotoacustici utilizzati come riferimento per misurare l'efficienza della conversione fotoacustica sono acquisiti a una fluenza significativamente inferiore alla soglia di danneggiamento. Come nel caso della perdita dell'intensità del picco plasmonico longitudinale, un decadimento di

R dall'unità denota una fotoinstabilità. In generale, l'andamento di R in funzione della fluensa media dell'eccitazione ottica, inizia dall'unità, e poi mostra un andamento sigmoideo decrescente, come è tipico per qualsiasi popolazione con una velocità di crescita negativa^{17,123}, che riflette una diminuzione delle particelle disponibili in risonanza con l'irraggiamento. Di solito, la fotostabilità di soglia è impostata in corrispondenza di un valore di R sufficientemente vicino all'unità per catturare il grande fotodanneggiamento iniziale, ma anche abbastanza lontano da garantire la significatività statistica. Un valore di $\frac{3}{4}$ è spesso una scelta decente per scopi generali. Questo protocollo è particolarmente adatto per campioni semisolidi^{17,152}. Un altro metodo che sfrutta la dipendenza della risposta fotoacustica dall'assorbanza ottica dei nanorods d'oro¹⁴ si basa sull'analisi dinamica del trend dell'ampiezza del segnale con la fluensa dell'eccitazione ottica^{151,153-155}. Per ogni condizione, l'ampiezza del segnale viene mediata su un dato tempo o numero di impulsi e quindi aggiunti a un grafico a dispersione in funzione della fluensa ottica. In assenza di fotodanneggiamento, la tendenza dovrebbe mantenersi lineare con pendenza proporzionale a $\mu_a \Gamma$. Invece, in presenza di una fotoinstabilità, la soglia rilevante si manifesta come l'inizio di una sublinearità. Quando il campione non viene rigenerato da condizione a condizione, questo metodo viene confrontato con il primo caso descritto in questo paragrafo, perché non si disaccoppia dagli effetti cumulativi che può sommarsi da un impulso all'altro e dipendere da tutti i dettagli della particolare

sequenza e del protocollo in uso. Per evitare tali effetti, è possibile implementare un'impostazione microfluidica per mantenere continuamente il flusso del campione¹⁵³⁻¹⁵⁵. In questo caso, il trend cattura l'inizio del rimodellamento delle particelle entro la durata di un singolo impulso. In un recente lavoro^{154,155}, nel nostro gruppo è stata implementata questa misura in un dispositivo completamente ottico adatto al confinamento di volumi di fluido ultra-piccoli, dove la miniaturizzazione mitiga i requisiti sulla produzione di energia erogata dalla sorgente ottica per una caratterizzazione approfondita del sistema. Infine, può essere menzionata anche la possibilità di un approccio più qualitativo e rapido basato sul monitoraggio continuo del segnale fotoacustico nel tempo o sul numero di impulsi ad una certa fluenza di interesse^{60,156}. In questo caso, in genere si decide se un campione è fotostabile o meno in una particolare configurazione, senza l'interesse a quantificare una fluenza di soglia. Questo approccio non è una prima scelta per un'analisi rigorosa della fotostabilità dei nanorods d'oro, ma potrebbe essere l'unica opzione disponibile quando si utilizza una piattaforma commerciale per scopi preclinici o traslazionali e, ad esempio, valutare la possibilità di utilizzare un agente di contrasto ottico in un determinato esperimento.

Per concludere questa sezione con una nota di cautela, è doveroso rimarcare che la rilevanza traslazionale di tutti questi protocolli e design per i fantocci biomimetici può suscitare controversie, perché è probabile che le particelle destinate all'uso in vivo perdano la loro

stabilità colloidale in alcuni punti dopo iniezione sistemica, ad esempio su clusterizzazione all'interno di vescicole endosomiali^{119,157}, che possono modificare il loro comportamento fototermico complessivo¹⁵⁸. Però, questo dubbio è stato affrontato in una recente pubblicazione¹³⁵, che ha rivelato l'assenza di effetti sostanziali sulla fotostabilità dei GNRs in un'ampia gamma di regimi dell'irradiazione ottica anche dopo una sostanziale interazione con il loro bersaglio biologico. Perciò, le soglie di fluenza misurate con i metodi descritti in questo paragrafo sono adatte a valutare la fotostabilità di nanorods d'oro da utilizzare come mezzi di contrasto ottici nell'imaging fotoacustico.

Riferimenti bibliografici

1. Dreaden, E.C.; Alkilany, A.M.; Huang, X.; Murphy, C.J.; El-Sayed, M.A. The golden age: Gold nanoparticles for biomedicine. *Chem. Soc. Rev.* 2012, 41, 2740–2779.
2. Dykman, L.; Khlebtsov, N. Gold nanoparticles in biomedical applications: Recent advances and perspectives. *Chem. Soc. Rev.* 2012, 41, 2256–2282.
3. Li, N.; Zhao, P.; Astruc, D. Anisotropic Gold Nanoparticles: Synthesis, Properties, Applications, and Toxicity. *Angew. Chem.* 2014, 53, 1756–1789.
4. Tong, L.; Wei, Q.; Wei, A.; Cheng, J.X. Gold Nanorods as Contrast Agents for Biological Imaging: Optical Properties, Surface Conjugation and Photothermal Effects†. *Photochem. Photobiol.* 2009, 85, 21–32.
5. Chen, H.; Shao, L.; Li, Q.; Wang, J. Gold nanorods and their plasmonic properties. *Chem. Soc. Rev.* 2013, 42, 2679–2724.
6. Riley, R.S.; Day, E.S. Gold nanoparticle-mediated photothermal therapy: Applications and opportunities for

- multimodal cancer treatment. Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol. 2017, 9, e1449.
7. Wang, L.V.; Hu, S. Photoacoustic Tomography: In Vivo Imaging from Organelles to Organs. *Science* 2012, 335, 1458–1462.
 8. Beard, P. Biomedical photoacoustic imaging. *Interface Focus* 2011, 1, 602–631.
 9. Steinberg, I.; Huland, D.M.; Vermesh, O.; Frostig, H.E.; Tummers, W.S.; Gambhir, S.S. Photoacoustic clinical imaging. *Photoacoustics* 2019, 14, 77–98.
 10. Kim, C.; Erpelding, T.N.; Jankovic, L.; Pashley, M.D.; Wang, L.V. Deeply penetrating in vivo photoacoustic imaging using a clinical ultrasound array system. *Biomed. Opt. Express* 2010, 1, 278–284.
 11. Kim, J.; Park, S.; Jung, Y.; Chang, S.; Park, J.; Zhang, Y.; Lovell, J.F.; Kim, C. Programmable Real-time Clinical Photoacoustic and Ultrasound Imaging System. *Sci. Rep.* 2016, 6, 35137.

12. Lin, L.; Hu, P.; Shi, J.; Appleton, C.M.; Maslov, K.; Li, L.; Zhang, R.; Wang, L.V. Single-breath-hold photoacoustic computed tomography of the breast. *Nat. Commun.* 2018, 9, 2352.
13. Chitgupi, U.; Nyayapathi, N.; Kim, J.; Wang, D.; Sun, B.; Li, C.; Carter, K.; Huang, W.C.; Kim, C.; Xia, J.; et al. Surfactant-Stripped Micelles for NIR-II Photoacoustic Imaging through 12 cm of Breast Tissue and Whole Human Breasts. *Adv. Mater.* 2019, 31, 1902279.
14. Wang, L.V. *Photoacoustic Imaging and Spectroscopy*; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2009.
15. Cavigli, L.; Milanesi, A.; Khlebtsov, B.N.; Centi, S.; Ratto, F.; Khlebtsov, N.G.; Pini, R. Impact of Kapitza resistance on the stability and efficiency of photoacoustic conversion from gold nanorods. *J. Colloid Interface Sci.* 2020, 578, 358–365.
16. Pang, G.A.; Poisson, F.; Laufer, J.; Haisch, C.; Bossy, E. Theoretical and Experimental Study of Photoacoustic Excitation of Silica-Coated Gold Nanospheres in Water. *J. Phys. Chem. C* 2020, 124, 1088–1098.

17. Cavigli, L.; de Angelis, M.; Ratto, F.; Matteini, P.; Rossi, F.; Centi, S.; Fusi, F.; Pini, R. Size Affects the Stability of the Photoacoustic Conversion of Gold Nanorods. *J. Phys. Chem. C* 2014, 118, 16140–16146.
18. Attia, A.B.E.; Balasundaram, G.; Moothanchery, M.; Dinish, U.; Bi, R.; Ntziachristos, V.; Olivo, M. A review of clinical photoacoustic imaging: Current and future trends. *Photoacoustics* 2019, 16, 100144.
19. Neuschmelting, V.; Burton, N.C.; Lockau, H.; Urich, A.; Harmsen, S.; Ntziachristos, V.; Kircher, M.F. Performance of a Multispectral Optoacoustic Tomography (MSOT) System equipped with 2D vs. 3D Handheld Probes for Potential Clinical Translation. *Photoacoustics* 2016, 4, 1–10.
20. Arthuis, C.J.; Novell, A.; Raes, F.; Escoffre, J.M.; Lerondel, S.; Le Pape, A.; Bouakaz, A.; Perrotin, F. Real-Time Monitoring of Placental Oxygenation during Maternal Hypoxia and Hyperoxygenation Using Photoacoustic Imaging. *PLoS ONE* 2017, 12, e0169850.
21. Su, R.; Ermilov, S.; Liopo, A.; Oraevsky, A. Laser optoacoustic tomography: Towards new technology for

- biomedical diagnostics. Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. A 2013, 720, 58–61.
22. Thompson, W.; Yu, A.; Dumani, D.S.; Cook, J.; Anastasio, M.A.; Emelianov, S.Y.; Ermilov, S.A. A preclinical small animal imaging platform combining multi-angle photoacoustic and fluorescence projections into co-registered 3D maps. Proc. SPIE 2020, 11240, 112400L.
 23. Saijo, Y.; Ida, T.; Iwazaki, H.; Miyajima, J.; Tang, H.; Shintate, R.; Sato, K.; Hiratsuka, T.; Yoshizawa, S.; Umemura, S. Visualization of skin morphology and microcirculation with high frequency ultrasound and dual-wavelength photoacoustic microscope. Proc. SPIE 2019, 10878, 108783E.
 24. Bauer, A.Q.; Nothdurft, R.E.; Culver, J.P.; Erpelding, T.N.; Wang, L.V. Quantitative photoacoustic imaging: Correcting for heterogeneous light fluence distributions using diffuse optical tomography. J. Biomed. Opt. 2011, 16, 1–8.
 25. Singh, M.K.A.; Jaeger, M.; Frenz, M.; Steenbergen, W. In vivo demonstration of reflection artifact reduction in photoacoustic imaging using synthetic aperture

photoacoustic-guided focused ultrasound (PAFUSion).
Biomed. Opt. Express 2016, 7, 2955–2972.

26. Li, M.; Tang, Y.; Yao, J. Photoacoustic tomography of blood oxygenation: A mini review. *Photoacoustics* 2018, 10, 65–73.
27. Jose, J.; Manohar, S.; Kolkman, R.G.M.; Steenbergen, W.; van Leeuwen, T.G. Imaging of tumor vasculature using Twente photoacoustic systems. *J. Biophotonics* 2009, 2, 701–717.
28. Diot, G.; Metz, S.; Noske, A.; Liapis, E.; Schroeder, B.; Ovsepian, S.V.; Meier, R.; Rummeny, E.; Ntziachristos, V. Multispectral Optoacoustic Tomography (MSOT) of Human Breast Cancer. *Clin. Cancer Res.* 2017, 23, 6912–6922.
29. Oraevsky, A.; Clingman, B.; Zalev, J.; Stavros, A.; Yang, W.; Parikh, J. Clinical optoacoustic imaging combined with ultrasound for coregistered functional and anatomical mapping of breast tumors. *Photoacoustics* 2018, 12, 30–45.
30. Wang, X.; Chamberland, D.L.; Xi, G. Noninvasive reflection mode photoacoustic imaging through infant skull toward

imaging of neonatal brains. *J. Neurosci. Methods* 2008, 168, 412–421.

31. Guevara, E.; Berti, R.; Londono, I.; Xie, N.; Bellec, P.; Lesage, F.; Lodygensky, G.A. Imaging of an Inflammatory Injury in the Newborn Rat Brain with Photoacoustic Tomography. *PLoS ONE* 2013, 8, e83045.
32. Upputuri, P.K.; Pramanik, M. Photoacoustic imaging in the second near-infrared window: A review. *J. Biomed. Opt.* 2019, 24, 1–20.
33. Sangha, G.S.; Phillips, E.H.; Goergen, C.J. In vivo photoacoustic lipid imaging in mice using the second near-infrared window. *Biomed. Opt. Express* 2017, 8, 736–742.
34. Park, E.; Lee, Y.J.; Lee, C.; Eom, T.J. Effective photoacoustic absorption spectrum for collagen-based tissue imaging. *J. Biomed. Opt.* 2020, 25, 1–8.
35. Klibanov, A.L. Microbubble Contrast Agents: Targeted Ultrasound Imaging and Ultrasound-Assisted Drug-Delivery Applications. *Investig. Radiol.* 2006, 41, 354–362.

36. Kim, J.; Park, S.; Lee, C.; Kim, J.Y.; Kim, C. Organic Nanostructures for Photoacoustic Imaging. *ChemNanoMat* 2016, 2, 156–166.
37. Weber, J.; Beard, P.; Bohndiek, S. Contrast agents for molecular photoacoustic imaging. *Nat. Methods* 2016, 13, 639–650.
38. Maturi, M.; Locatelli, E.; Monaco, I.; Comes Franchini, M. Current concepts in nanostructured contrast media development for in vivo photoacoustic imaging. *Biomater. Sci.* 2019, 7, 1746–1775.
39. Upputuri, P.K.; Pramanik, M. Recent advances in photoacoustic contrast agents for in vivo imaging. *WIREs Nanomed. Nanobiotechnol.* 2020, 12, e1618.
40. Gong, H.; Dong, Z.; Liu, Y.; Yin, S.; Cheng, L.; Xi, W.; Xiang, J.; Liu, K.; Li, Y.; Liu, Z. Engineering of Multifunctional Nano-Micelles for Combined Photothermal and Photodynamic Therapy Under the Guidance of Multimodal Imaging. *Adv. Funct. Mater.* 2014, 24, 6492–6502.

41. Lovell, J.F.; Jin, C.S.; Huynh, E.; Jin, H.; Kim, C.; Rubinstein, J.L.; Chan, W.C.W.; Cao, W.; Wang, L.V.; Zheng, G. Porphysome nanovesicles generated by porphyrin bilayers for use as multimodal biophotonic contrast agents. *Nat. Mater.* 2011, 10, 324–332.
42. Sheng, Z.; Hu, D.; Zheng, M.; Zhao, P.; Liu, H.; Gao, D.; Gong, P.; Gao, G.; Zhang, P.; Ma, Y.; et al. Smart Human Serum Albumin-Indocyanine Green Nanoparticles Generated by Programmed Assembly for Dual-Modal Imaging-Guided Cancer Synergistic Phototherapy. *ACS Nano* 2014, 8, 12310–12322.
43. Chen, Z.; Zhao, P.; Luo, Z.; Zheng, M.; Tian, H.; Gong, P.; Gao, G.; Pan, H.; Liu, L.; Ma, A.; et al. Cancer Cell Membrane-Biomimetic Nanoparticles for Homologous-Targeting Dual-Modal Imaging and Photothermal Therapy. *ACS Nano* 2016, 10, 10049–10057.
44. Pu, K.; Shuhendler, A.J.; Jokerst, J.V.; Mei, J.; Gambhir, S.S.; Bao, Z.; Rao, J. Porphysome nanovesicles generated by porphyrin bilayers for use as multimodal biophotonic contrast agents. *Nat. Nanotechnol.* 2014, 9, 233–239.

45. Jiang, Q.; Luo, Z.; Men, Y.; Yang, P.; Peng, H.; Guo, R.; Tian, Y.; Pang, Z.; Yang, W. Red blood cell membrane-camouflaged melanin nanoparticles for enhanced photothermal therapy. *Biomaterials* 2017, 143, 29–45.
46. Lin, L.S.; Cong, Z.X.; Cao, J.B.; Ke, K.M.; Peng, Q.L.; Gao, J.; Yang, H.H.; Liu, G.; Chen, X. Multifunctional Fe₃O₄@Polydopamine Core–Shell Nanocomposites for Intracellular mRNA Detection and Imaging-Guided Photothermal Therapy. *ACS Nano* 2014, 8, 3876–3883.
47. Hauser, D.; Septiadi, D.; Turner, J.; Petri-Fink, A.; Rothen-Rutishauser, B. From Bioinspired Glue to Medicine: Polydopamine as a Biomedical Material. *Materials* 2020, 13, 1730.
48. Cheng, L.; Gong, H.; Zhu, W.; Liu, J.; Wang, X.; Liu, G.; Liu, Z. PEGylated Prussian blue nanocubes as a theranostic agent for simultaneous cancer imaging and photothermal therapy. *Biomaterials* 2014, 35, 9844–9852.
49. Wang, X.; Cheng, L. Multifunctional Prussian blue-based nanomaterials: Preparation, modification, and theranostic applications. *Coord. Chem. Rev.* 2020, 419, 213393.

50. De La Zerda, A.; Zavaleta, C.; Keren, S.; Vaithilingam, S.; Bodapati, S.; Liu, Z.; Levi, J.; Smith, B.R.; Ma, T.J.; Oralkan, O.; et al. Carbon nanotubes as photoacoustic molecular imaging agents in living mice. *Nat. Nanotechnol.* 2008, 3, 557–562.
51. Sheng, Z.; Song, L.; Zheng, J.; Hu, D.; He, M.; Zheng, M.; Gao, G.; Gong, P.; Zhang, P.; Ma, Y.; et al. Protein-assisted fabrication of nano-reduced graphene oxide for combined in vivo photoacoustic imaging and photothermal therapy. *Biomaterials* 2013, 34, 5236–5243.
52. Wang, L.; Hasanzadeh Kafshgari, M.; Meunier, M. Optical Properties and Applications of Plasmonic-Metal Nanoparticles. *Adv. Funct. Mater.* 2020, 30, 2005400.
53. Manohar, S.; Ungureanu, C.; Van Leeuwen, T.G. Gold nanorods as molecular contrast agents in photoacoustic imaging: The promises and the caveats. *Contrast Media Mol. Imaging* 2011, 6, 389–400.
54. Cheng, L.; Liu, J.; Gu, X.; Gong, H.; Shi, X.; Liu, T.; Wang, C.; Wang, X.; Liu, G.; Xing, H.; et al. PEGylated WS₂ Nanosheets as a Multifunctional Theranostic Agent for in

vivo Dual-Modal CT/Photoacoustic Imaging Guided Photothermal Therapy. *Adv. Mater.* 2014, 26, 1886–1893.

55. Yu, J.; Yang, C.; Li, J.; Ding, Y.; Zhang, L.; Yousaf, M.Z.; Lin, J.; Pang, R.; Wei, L.; Xu, L.; et al. Multifunctional Fe₅C₂ Nanoparticles: A Targeted Theranostic Platform for Magnetic Resonance Imaging and Photoacoustic Tomography-Guided Photothermal Therapy. *Adv. Mater.* 2014, 26, 4114–4120.
56. Zhang, L.; Gao, S.; Zhang, F.; Yang, K.; Ma, Q.; Zhu, L. Activatable Hyaluronic Acid Nanoparticle as a Theranostic Agent for Optical/Photoacoustic Image-Guided Photothermal Therapy. *ACS Nano* 2014, 8, 12250–12258.
57. Song, X.R.; Wang, X.; Yu, S.X.; Cao, J.; Li, S.H.; Li, J.; Liu, G.; Yang, H.H.; Chen, X. Co₉Se₈ Nanoplates as a New Theranostic Platform for Photoacoustic/Magnetic Resonance Dual-Modal-Imaging-Guided Chemo-Photothermal Combination Therapy. *Adv. Mater.* 2015, 27, 3285–3291.
58. Yu, J.; Yin, W.; Zheng, X.; Tian, G.; Zhang, X.; Bao, T.; Dong, X.; Wang, Z.; Gu, Z.; Ma, X.; et al. Smart MoS₂/Fe₃O₄ Nanotheranostic for Magnetically Targeted Photothermal Therapy Guided by Magnetic

Resonance/Photoacoustic Imaging. *Theranostics* 2015, 5, 931–945.

59. Yang, W.; Guo, W.; Le, W.; Lv, G.; Zhang, F.; Shi, L.; Wang, X.; Wang, J.; Wang, S.; Chang, J.; et al. Albumin-Bioinspired Gd:CuS Nanotheranostic Agent for In Vivo Photoacoustic/Magnetic Resonance Imaging-Guided Tumor-Targeted Photothermal Therapy. *ACS Nano* 2016, 10, 10245–10257.
60. Borri, C.; Albino, M.; Innocenti, C.; Pineider, F.; Cavigli, L.; Centi, S.; Sangregorio, C.; Ratto, F.; Pini, R. A bionic shuttle carrying multi-modular particles and holding tumor-tropic features. *Mater. Sci. Eng. C* 2020, 117, 111338.
61. Liang, X.; Li, Y.; Li, X.; Jing, L.; Deng, Z.; Yue, X.; Li, C.; Dai, Z. PEGylated Polypyrrole Nanoparticles Conjugating Gadolinium Chelates for Dual-Modal MRI/Photoacoustic Imaging Guided Photothermal Therapy of Cancer. *Adv. Funct. Mater.* 2015, 25, 1451–1462.
62. Cai, Y.; Liang, P.; Tang, Q.; Yang, X.; Si, W.; Huang, W.; Zhang, Q.; Dong, X. Diketopyrrolopyrrole–Triphenylamine Organic Nanoparticles as Multifunctional Reagents for Photoacoustic Imaging-Guided Photodynamic/Photothermal

Synergistic Tumor Therapy. ACS Nano 2017, 11, 1054–1063.

63. Chen, Y.S.; Frey, W.; Kim, S.; Homan, K.; Kruizinga, P.; Sokolov, K.; Emelianov, S. Enhanced thermal stability of silica-coated gold nanorods for photoacoustic imaging and image-guided therapy. Opt. Express 2010, 18, 8867–8878.
64. Jia, Q.; Ge, J.; Liu, W.; Liu, S.; Niu, G.; Guo, L.; Zhang, H.; Wang, P. Gold nanorod@silica-carbon dots as multifunctional phototheranostics for fluorescence and photoacoustic imaging-guided synergistic photodynamic/photothermal therapy. Nanoscale 2016, 8, 13067–13077.
65. Xu, C.; Chen, F.; Valdovinos, H.F.; Jiang, D.; Goel, S.; Yu, B.; Sun, H.; Barnhart, T.E.; Moon, J.J.; Cai, W. Bacteria-like mesoporous silica-coated gold nanorods for positron emission tomography and photoacoustic imaging-guided chemo-photothermal combined therapy. Biomaterials 2018, 165, 56–65.
66. Yan, N.; Wang, X.; Lin, L.; Song, T.; Sun, P.; Tian, H.; Liang, H.; Chen, X. Gold Nanorods Electrostatically Binding Nucleic Acid Probe for In Vivo MicroRNA Amplified

Detection and Photoacoustic Imaging-Guided Photothermal Therapy. *Adv. Funct. Mater.* 2018, 28, 1800490.

67. Rouleau, L.; Berti, R.; Ng, V.W.K.; Matteau-Pelletier, C.; Lam, T.; Saboural, P.; Kakkar, A.K.; Lesage, F.; Rhéaume, E.; Tardif, J.C. VCAM-1-targeting gold nanoshell probe for photoacoustic imaging of atherosclerotic plaque in mice. *Contrast Media Mol. Imaging* 2013, 8, 27–39.
68. Kim, C.; Cho, E.C.; Chen, J.; Song, K.H.; Au, L.; Favazza, C.; Zhang, Q.; Cobley, C.M.; Gao, F.; Xia, Y.; et al. In Vivo Molecular Photoacoustic Tomography of Melanomas Targeted by Bioconjugated Gold Nanocages. *ACS Nano* 2010, 4, 4559–4564.
69. Xu, X.; Chong, Y.; Liu, X.; Fu, H.; Yu, C.; Huang, J.; Zhang, Z. Multifunctional nanotheranostic gold nanocages for photoacoustic imaging guided radio/photodynamic/photothermal synergistic therapy. *Acta Biomater.* 2019, 84, 328–338.
70. Liang, S.; Li, C.; Zhang, C.; Chen, Y.; Xu, L.; Bao, C.; Wang, X.; Liu, G.; Zhang, F.; Cui, D. CD44v6 Monoclonal Antibody-Conjugated Gold Nanostars for Targeted Photoacoustic Imaging and Plasmonic Photothermal Therapy

of Gastric Cancer Stem-like Cells. *Theranostics* 2015, 5, 970–984.

71. Tian, Y.; Zhang, Y.; Teng, Z.; Tian, W.; Luo, S.; Kong, X.; Su, X.; Tang, Y.; Wang, S.; Lu, G. pH-Dependent Transmembrane Activity of Peptide-Functionalized Gold Nanostars for Computed Tomography/Photoacoustic Imaging and Photothermal Therapy. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2017, 9, 2114–2122.
72. Khlebtsov, N.G. T-matrix method in plasmonics: An overview. *J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transf.* 2013, 123, 184–217.
73. Amendola, V.; Pilot, R.; Frasconi, M.; Maragò, O.M.; Iatì, M.A. Surface plasmon resonance in gold nanoparticles: A review. *J. Phys. Condens. Matter* 2017, 29, 203002.
74. Cheng, F.Y.; Chen, C.T.; Yeh, C.S. Comparative efficiencies of photothermal destruction of malignant cells using antibody-coated silica@Au nanoshells, hollow Au/Ag nanospheres and Au nanorods. *Nanotechnology* 2009, 20, 425104.

75. Cole, J.R.; Mirin, N.A.; Knight, M.W.; Goodrich, G.P.; Halas, N.J. Photothermal Efficiencies of Nanoshells and Nanorods for Clinical Therapeutic Applications. *J. Phys. Chem. C* 2009, 113, 12090–12094.
76. Richardson, H.H.; Carlson, M.T.; Tandler, P.J.; Hernandez, P.; Govorov, A.O. Experimental and Theoretical Studies of Light-to-Heat Conversion and Collective Heating Effects in Metal Nanoparticle Solutions. *Nano Lett.* 2009, 9, 1139–1146.
77. Chen, H.; Shao, L.; Ming, T.; Sun, Z.; Zhao, C.; Yang, B.; Wang, J. Understanding the Photothermal Conversion Efficiency of Gold Nanocrystals. *Small* 2010, 6, 2272–2280.
78. Pattani, V.P.; Tunnell, J.W. Nanoparticle-mediated photothermal therapy: A comparative study of heating for different particle types. *Lasers Surg. Med.* 2012, 44, 675–684.
79. Pérez-Juste, J.; Pastoriza-Santos, I.; Liz-Marzán, L.M.; Mulvaney, P. Gold nanorods: Synthesis, characterization and applications. *Coord. Chem. Rev.* 2005, 249, 1870–1901.

80. Gans, R. Über die Form ultramikroskopischer Goldteilchen. *Ann. Phys.* 1912, 342, 881–900.
81. Khlebtsov, N.G. Optics and biophotonics of nanoparticles with a plasmon resonance. *Quantum Electron.* 2008, 38, 504–529.
82. Chang, S.S.; Shih, C.W.; Chen, C.D.; Lai, W.C.; Wang, C.R.C. The Shape Transition of Gold Nanorods. *Langmuir* 1999, 15, 701–709.
83. Yu, Y.Y.; Chang, S.S.; Lee, C.L.; Wang, C.R.C. Gold Nanorods: Electrochemical Synthesis and Optical Properties. *J. Phys. Chem. B* 1997, 101, 6661–6664.
84. Nikoobakht, B.; El-Sayed, M.A. Preparation and Growth Mechanism of Gold Nanorods (NRs) Using Seed-Mediated Growth Method. *Chem. Mater.* 2003, 15, 1957–1962.
85. Wang, Z.; Mohamed, M.; Link, S.; El-Sayed, M. Crystallographic facets and shapes of gold nanorods of different aspect ratios. *Surf. Sci.* 1999, 440, L809–L814.

86. Requejo, K.I.; Liopo, A.V.; Zubarev, E.R. Gold Nanorod Synthesis with Small Thiolated Molecules. *Langmuir* 2020, 36, 3758–3769.
87. Martin, C.R. Membrane-Based Synthesis of Nanomaterials. *Chem. Mater.* 1996, 8, 1739–1746.
88. Wurtz, G.A.; Pollard, R.; Hendren, W.; Wiederrecht, G.P.; Gosztola, D.J.; Podolskiy, V.A.; Zayats, A.V. Designed ultrafast optical nonlinearity in a plasmonic nanorod metamaterial enhanced by nonlocality. *Nat. Nanotechnol.* 2011, 6, 107–111.
89. Wang, S.; Xi, W.; Cai, F.; Zhao, X.; Xu, Z.; Qian, J.; He, S. Three-Photon Luminescence of Gold Nanorods and Its Applications for High Contrast Tissue and Deep in vivo Brain Imaging. *Theranostics* 2015, 5, 251–266.
90. Khlebtsov, N.G.; Melnikov, A.G.; Bogatyrev, V.A.; Dykman, L.A.; Alekseeva, A.V.; Trachuk, L.A.; Khlebtsov, B.N. Can the Light Scattering Depolarization Ratio of Small Particles Be Greater Than 1/3? *J. Phys. Chem. B* 2005, 109, 13578–13584.

91. Khlebtsov, B.N.; Khanadeev, V.A.; Ye, J.; Sukhorukov, G.B.; Khlebtsov, N.G. Overgrowth of Gold Nanorods by Using a Binary Surfactant Mixture. *Langmuir* 2014, 30, 1696–1703.
92. Khanadeev, V.A.; Khlebtsov, N.G.; Burov, A.M.; Khlebtsov, B.N. Tuning of plasmon resonance of gold nanorods by controlled etching. *Colloid J.* 2015, 77, 652–660.
93. Xu, X.; Cortie, M. Shape Change and Color Gamut in Gold Nanorods, Dumbbells, and Dog Bones. *Adv. Funct. Mater.* 2006, 16, 2170–2176.
94. Wang, P.; Liu, M.; Gao, G.; Zhang, S.; Shi, H.; Li, Z.; Zhang, L.; Fang, Y. From gold nanorods to nanodumbbells: A different way to tailor surface plasmon resonances by a chemical route. *J. Mater. Chem.* 2012, 22, 24006–24011.
95. Vigderman, L.; Khanal, B.P.; Zubarev, E.R. Functional Gold Nanorods: Synthesis, Self-Assembly, and Sensing Applications. *Adv. Mater.* 2012, 24, 4811–4841.
96. Jain, P.K.; Lee, K.S.; El-Sayed, I.H.; El-Sayed, M.A. Calculated Absorption and Scattering Properties of Gold Nanoparticles of Different Size, Shape, and Composition:

Applications in Biological Imaging and Biomedicine. *J. Phys. Chem. B* 2006, 110, 7238–7248.

97. Khlebtsov, B.; Zharov, V.; Melnikov, A.; Tuchin, V.; Khlebtsov, N. Optical amplification of photothermal therapy with gold nanoparticles and nanoclusters. *Nanotechnology* 2006, 17, 5167–5179.
98. Stefan Kooij, E.; Poelsema, B. Shape and size effects in the optical properties of metallic nanorods. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2006, 8, 3349–3357.
99. Baffou, G.; Quidant, R.; Girard, C. Heat generation in plasmonic nanostructures: Influence of morphology. *Appl. Phys. Lett.* 2009, 94, 153109.
100. Kessentini, S.; Barchiesi, D. Quantitative comparison of optimized nanorods, nanoshells and hollow nanospheres for photothermal therapy. *Biomed. Opt. Express* 2012, 3, 590–604.
101. Maestro, L.M.; Camarillo, E.; Sánchez-Gil, J.A.; Rodríguez-Oliveros, R.; Ramiro-Bargueño, J.; Caamaño, A.J.; Jaque, F.; Solé, J.G.; Jaque, D. Gold nanorods for optimized photothermal therapy: The influence of irradiating in the first

and second biological windows. RSC Adv. 2014, 4, 54122–54129.

102. Khlebtsov, B.N.; Khanadeev, V.A.; Maksimova, I.L.; Terentyuk, G.S.; Khlebtsov, N.G. Silver nanocubes and gold nanocages: Fabrication and optical and photothermal properties. *Nanotechnol. Russ.* 2010, 5, 454–468.
103. Boisselier, E.; Astruc, D. Gold nanoparticles in nanomedicine: Preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity. *Chem. Soc. Rev.* 2009, 38, 1759–1782.
104. Rana, S.; Bajaj, A.; Mout, R.; Rotello, V.M. Monolayer coated gold nanoparticles for delivery applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2012, 64, 200–216.
105. Wang, X.; Mei, Z.; Wang, Y.; Tang, L. Gold nanorod biochip functionalization by antibody thiolation. *Talanta* 2015, 136, 1–8.
106. Zhang, X.; Servos, M.R.; Liu, J. Instantaneous and Quantitative Functionalization of Gold Nanoparticles with Thiolated DNA Using a pH-Assisted and Surfactant-Free Route. *J. Am. Chem. Soc.* 2012, 134, 7266–7269.

107. Wilson, C.G.; Sisco, P.N.; Gadala-Maria, F.A.; Murphy, C.J.; Goldsmith, E.C. Polyelectrolyte-coated gold nanorods and their interactions with type I collagen. *Biomaterials* 2009, 30, 5639–5648.
108. Lai, S.; Centi, S.; Borri, C.; Ratto, F.; Cavigli, L.; Micheletti, F.; Kemper, B.; Ketelhut, S.; Kozyreva, T.; Gonnelli, L.; et al. A multifunctional organosilica cross-linker for the bio-conjugation of gold nanorods. *Colloids Surf. B* 2017, 157, 174–181.
109. Azab, M.M.; Cherif, R.; Finnie, A.L.; Abou El-Alamin, M.M.; Sultan, M.A.; Wark, A.W. Optimized polydopamine coating and DNA conjugation onto gold nanorods for single nanoparticle bioaffinity measurements. *Analyst* 2018, 143, 1635–1643.
110. Khlebtsov, B.N.; Burov, A.M.; Pylaev, T.E.; Khlebtsov, N.G. Polydopamine-coated Au nanorods for targeted fluorescent cell imaging and photothermal therapy. *Beilstein J. Nanotechnol.* 2019, 10, 794–803.
111. Danhier, F.; Feron, O.; Préat, V. To exploit the tumor microenvironment: Passive and active tumor targeting of

nanocarriers for anti-cancer drug delivery. *J. Control. Release* 2010, 148, 135–146.

112. Prabhakar, U.; Maeda, H.; Jain, R.K.; Sevick-Muraca, E.M.; Zamboni, W.; Farokhzad, O.C.; Barry, S.T.; Gabizon, A.; Grodzinski, P.; Blakey, D.C. Challenges and Key Considerations of the Enhanced Permeability and Retention Effect for Nanomedicine Drug Delivery in Oncology. *Cancer. Res.* 2013, 73, 2412–2417.
113. Byrne, J.D.; Betancourt, T.; Brannon-Peppas, L. Active targeting schemes for nanoparticle systems in cancer therapeutics. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2008, 60, 1615–1626.
114. Huang, X.; Peng, X.; Wang, Y.; Wang, Y.; Shin, D.M.; El-Sayed, M.A.; Nie, S. A Reexamination of Active and Passive Tumor Targeting by Using Rod-Shaped Gold Nanocrystals and Covalently Conjugated Peptide Ligands. *ACS Nano* 2010, 4, 5887–5896.
115. Ratto, F.; Witort, E.; Tatini, F.; Centi, S.; Lazzeri, L.; Carta, F.; Lulli, M.; Vullo, D.; Fusi, F.; Supuran, C.T.; et al. Plasmonic Particles that Hit Hypoxic Cells. *Adv. Funct. Mater.* 2015, 25, 316–323.

116. Mooney, R.; Roma, L.; Zhao, D.; Van Haute, D.; Garcia, E.; Kim, S.U.; Annala, A.J.; Aboody, K.S.; Berlin, J.M. Neural Stem Cell-Mediated Intratumoral Delivery of Gold Nanorods Improves Photothermal Therapy. *ACS Nano* 2014, 8, 12450–12460.
117. Borri, C.; Centi, S.; Ratto, F.; Pini, R. Polylysine as a functional biopolymer to couple gold nanorods to tumor-tropic cells. *J. Nanobiotechnol.* 2018, 16, 50.
118. Ratto, F.; Centi, S.; Avigo, C.; Borri, C.; Tatini, F.; Cavigli, L.; Kusmic, C.; Lelli, B.; Lai, S.; Colagrande, S.; et al. A Robust Design for Cellular Vehicles of Gold Nanorods for Multimodal Imaging. *Adv. Funct. Mater.* 2016, 26, 7954–7954.
119. Alkilany, A.M.; Nagaria, P.K.; Hexel, C.R.; Shaw, T.J.; Murphy, C.J.; Wyatt, M.D. Cellular Uptake and Cytotoxicity of Gold Nanorods: Molecular Origin of Cytotoxicity and Surface Effects. *Small* 2009, 5, 701–708.
120. Ali, M.R.K.; Rahman, M.A.; Wu, Y.; Han, T.; Peng, X.; Mackey, M.A.; Wang, D.; Shin, H.J.; Chen, Z.G.; Xiao, H.; et al. Efficacy, long-term toxicity, and mechanistic studies of

gold nanorods photothermal therapy of cancer in xenograft mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2017, 114, E3110–E3118.

121. Kolosnjaj-Tabi, J.; Javed, Y.; Lartigue, L.; Volatron, J.; Elgrabli, D.; Marangon, I.; Pugliese, G.; Caron, B.; Figuerola, A.; Luciani, N.; et al. The One Year Fate of Iron Oxide Coated Gold Nanoparticles in Mice. *ACS Nano* 2015, 9, 7925–7939.
122. Balfourier, A.; Luciani, N.; Wang, G.; Lelong, G.; Ersen, O.; Khelfa, A.; Alloyeau, D.; Gazeau, F.; Carn, F. Unexpected intracellular biodegradation and recrystallization of gold nanoparticles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2020, 117, 103–113.
123. Fales, A.M.; Vogt, W.C.; Wear, K.A.; Ilev, I.K.; Pfefer, T.J. Pulsed laser damage of gold nanorods in turbid media and its impact on multi-spectral photoacoustic imaging. *Biomed. Opt. Express* 2019, 10, 1919–1934.
124. Zhang, Q.; Xia, Z.; Cheng, Y.B.; Gu, M. High-capacity optical long data memory based on enhanced Young's modulus in nanoplasmonic hybrid glass composites. *Nat. Commun.* 2018, 9, 1183.

125. Ratto, F.; Matteini, P.; Cini, A.; Centi, S.; Rossi, F.; Fusi, F.; Pini, R. CW laser-induced photothermal conversion and shape transformation of gold nanodogbones in hydrated chitosan films. *J. Nanopart. Res.* 2011, 13, 4337–4348.
126. Tong, W.; Katz-Boon, H.; Walsh, M.J.; Weyland, M.; Etheridge, J.; Funston, A.M. The evolution of size, shape, and surface morphology of gold nanorods. *Chem. Commun.* 2018, 54, 3022–3025.
127. González-Rubio, G.; Díaz-Núñez, P.; Rivera, A.; Prada, A.; Tardajos, G.; González-Izquierdo, J.; Bañares, L.; Llombart, P.; Macdowell, L.G.; Alcolea Palafox, M.; et al. Femtosecond laser reshaping yields gold nanorods with ultranarrow surface plasmon resonances. *Science* 2017, 358, 640–644.
128. Kennedy, W.J.; Izor, S.; Anderson, B.D.; Frank, G.; Varshney, V.; Ehlert, G.J. Thermal Reshaping Dynamics of Gold Nanorods: Influence of Size, Shape, and Local Environment. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2018, 10, 43865–43873.
129. Link, S.; Burda, C.; Mohamed, M.B.; Nikoobakht, B.; El-Sayed, M.A. Laser Photothermal Melting and Fragmentation

of Gold Nanorods: Energy and Laser Pulse-Width Dependence. *J. Phys. Chem. A* 1999, 103, 1165–1170.

130. Plech, A.; Kotaidis, V.; Lorenc, M.; Boneberg, J. Femtosecond laser near-field ablation from gold nanoparticles. *Nat. Phys.* 2006, 2, 44–47.
131. Ekici, O.; Harrison, R.K.; Durr, N.J.; Eversole, D.S.; Lee, M.; Ben-Yakar, A. Thermal analysis of gold nanorods heated with femtosecond laser pulses. *J. Phys. D* 2008, 41, 185501.
132. Wu, X.; Ni, Y.; Zhu, J.; Burrows, N.D.; Murphy, C.J.; Dumitrica, T.; Wang, X. Thermal Transport across Surfactant Layers on Gold Nanorods in Aqueous Solution. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2016, 8, 10581–10589.
133. Link, S.; Burda, C.; Nikoobakht, B.; El-Sayed, M. How long does it take to melt a gold nanorod? A femtosecond pump–probe absorption spectroscopic study. *Chem. Phys. Lett.* 1999, 315, 12–18.
134. Blumm, J.; Lindemann, A. Characterization of the thermophysical properties of molten polymers and liquids using the flash technique. *High Temp. High Press.* 2003, 35, 627–632.

- 135. Cavigli, L.; Cini, A.; Centi, S.; Borri, C.; Lai, S.; Ratto, F.; de Angelis, M.; Pini, R. Photostability of Gold Nanorods upon Endosomal Confinement in Cultured Cells. *J. Phys. Chem. C* 2017, 121, 6393–6400.
- 136. Zijlstra, P.; Chon, J.W.M.; Gu, M. Five-dimensional optical recording mediated by surface plasmons in gold nanorods. *Nature* 2009, 459, 410–413.
- 137. Plech, A.; Cerna, R.; Kotaidis, V.; Hudert, F.; Bartels, A.; Dekorsy, T. A Surface Phase Transition of Supported Gold Nanoparticles. *Nano Lett.* 2007, 7, 1026–1031.
- 138. Taylor, A.B.; Siddiquee, A.M.; Chon, J.W.M. Below Melting Point Photothermal Reshaping of Single Gold Nanorods Driven by Surface Diffusion. *ACS Nano* 2014, 8, 12071–12079.
- 139. Jaklevic, R.C.; Elie, L. Scanning-Tunneling-Microscope Observation of Surface Diffusion on an Atomic Scale: Au on Au(111). *Phys. Rev. Lett.* 1988, 60, 120–123.
- 140. Huber, S.E.; Warakulwit, C.; Limtrakul, J.; Tsukuda, T.; Probst, M. Thermal stabilization of thin gold nanowires by

surfactantcoating: A molecular dynamics study. *Nanoscale* 2012, 4, 585–590.

141. He, X.; Cheng, F.; Chen, Z.X. The Lattice Kinetic Monte Carlo Simulation of Atomic Diffusion and Structural Transition for Gold. *Sci. Rep.* 2016, 6, 33128.
142. Zou, R.; Zhang, Q.; Zhao, Q.; Peng, F.; Wang, H.; Yu, H.; Yang, J. Thermal stability of gold nanorods in an aqueous solution. *Colloids Surf. A* 2010, 372, 177–181.
143. Link, S.; Burda, C.; Nikoobakht, B.; El-Sayed, M.A. Laser-Induced Shape Changes of Colloidal Gold Nanorods Using Femtosecond and Nanosecond Laser Pulses. *J. Phys. Chem. B* 2000, 104, 6152–6163.
144. Takahata, R.; Yamazoe, S.; Warakulwit, C.; Limtrakul, J.; Tsukuda, T. Rayleigh Instability and Surfactant-Mediated Stabilization of Ultrathin Gold Nanorods. *J. Phys. Chem. C* 2016, 120, 17006–17010.
145. Karim, S.; Toimil-Molares, M.E.; Balogh, A.G.; Ensinger, W.; Cornelius, T.W.; Khan, E.U.; Neumann, R. Morphological evolution of Au nanowires controlled by Rayleigh instability. *Nanotechnology* 2006, 17, 5954–5959.

146. González-Rubio, G.; Guerrero-Martínez, A.; Liz-Marzán, L.M. Reshaping, Fragmentation, and Assembly of Gold Nanoparticles Assisted by Pulse Lasers. *Acc. Chem. Res.* 2016, 49, 678–686.
147. Mercatelli, R.; Ratto, F.; Centi, S.; Soria, S.; Romano, G.; Matteini, P.; Quercioli, F.; Pini, R.; Fusi, F. Quantitative readout of optically encoded gold nanorods using an ordinary dark-field microscope. *Nanoscale* 2013, 5, 9645–9650.
148. Conversano, F.; Soloperto, G.; Greco, A.; Ragusa, A.; Casciaro, E.; Chiriaco, F.; Demitri, C.; Gigli, G.; Maffezzoli, A.; Casciaro, S. Echographic detectability of optoacoustic signals from low-concentration PEG-coated gold nanorods. *Int. J. Nanomed.* 2012, 7, 373–4389.
149. Ungureanu, C.; Kroes, R.; Petersen, W.; Groothuis, T.A.M.; Ungureanu, F.; Janssen, H.; van Leeuwen, F.W.B.; Kooyman, R.P.H.; Manohar, S.; van Leeuwen, T.G. Light Interactions with Gold Nanorods and Cells: Implications for Photothermal Nanotherapeutics. *Nano Lett.* 2011, 11, 1887–1894.
150. Yoon, S.J.; Murthy, A.; Johnston, K.P.; Sokolov, K.V.; Emelianov, S.Y. Thermal stability of biodegradable

plasmonic nanoclusters in photoacoustic imaging. *Opt. Express* 2012, 20, 29479–29487.

151. Knights, O.B.; Ye, S.; Ingram, N.; Freear, S.; McLaughlan, J.R. Optimising gold nanorods for photoacoustic imaging in vitro. *Nanoscale Adv.* 2019, 1, 1472–1481.
152. Cavigli, L.; Tatini, F.; Borri, C.; Ratto, F.; Centi, S.; Cini, A.; Lelli, B.; Matteini, P.; Pini, R. Preparation and Photoacoustic Analysis of Cellular Vehicles Containing Gold Nanorods. *J. Vis. Exp.* 2016, 111, e53328.
153. Cavigli, L.; Micheletti, F.; Tortoli, P.; Centi, S.; Lai, S.; Borri, C.; Rossi, F.; Ratto, F.; Pini, R. Light activated microbubbles for imaging and microsurgery. *Proc. SPIE* 2017, 10064, 1006457.
154. Frigenti, G.; Cavigli, L.; Fernández-Bienes, A.; Ratto, F.; Centi, S.; García-Fernández, T.; Nunzi Conti, G.; Soria, S. Resonant Microbubble as a Microfluidic Stage for All-Optical Photoacoustic Sensing. *Phys. Rev. Appl.* 2019, 12, 014062.
155. Frigenti, G.; Cavigli, L.; Fernández-Bienes, A.; Ratto, F.; Centi, S.; García-Fernández, T.; Nunzi Conti, G.; Soria, S.

Microbubble Resonators for All-Optical Photoacoustics of Flowing Contrast Agents. *Sensors* 2020, 20, 1696.

156. Chen, L.C.; Wei, C.W.; Souris, J.S.; Cheng, S.H.; Chen, C.T.; Yang, C.S.; Li, P.C.; Lo, L.W. Enhanced photoacoustic stability of gold nanorods by silica matrix confinement. *J. Biomed. Opt.* 2010, 15, 1–6.
157. Hauck, T.; Ghazani, A.; Chan, W. Assessing the Effect of Surface Chemistry on Gold Nanorod Uptake, Toxicity, and Gene Expression in Mammalian Cells. *Small* 2008, 4, 153–159.
158. Mazzoni, M.; Ratto, F.; Fortunato, C.; Centi, S.; Tatini, F.; Pini, R. Partial Decoupling in Aggregates of Silanized Gold Nanorods. *J. Phys. Chem. C* 2014, 118, 20018–20025.

2

EFFETTO DEL RIVESTIMENTO SULLA FOTOSTABILITÀ DEI GNRs

2.1 I Coating

In considerazione della sua importanza in scenari applicativi tipici, diversi autori hanno intrapreso lo sviluppo di soluzioni per mitigare il problema della fotoinstabilità dei nanorods d'oro.

Pur consapevoli delle insidie nascoste in una rigida compartimentazione, questo lavoro intende mettere un po' di ordine su tali tematiche di ricerca recenti, riportati anche nella letteratura, ma in maniera frammentaria, e per orientare lo sperimentatore che voglia considerare l'uso di nanorods d'oro nell'imaging fotoacustico. In questo senso, vengono associati ad ogni metodo i dovuti riferimenti e una panoramica sui protocolli pertinenti per la loro attuazione pratica e con una discussione breve ma multidimensionale dei loro pro e contro per le applicazioni biomediche. Questa strategia intende aumentare la stabilità termica e rallentare il rimodellamento dei nanorods d'oro inibendo il loro

processo di pre-fusione, sia che essi siano esposti a un'eccitazione ottica o lasciati su una piastra calda, in un forno, ecc. L'approccio comune a questo effetto consiste nel vincolare la forma iniziale e nell'inibire il processo di sferoidizzazione mediante l'aggiunta di gusci rigidi (hard shell) o morbidi (soft shell). Kennedy et al.³ ha descritto l'effetto di un ambiente rigido, come ad esempio una resina epossidica che ospita nanorods d'oro, in qualità di mezzo viscoelastico che impone una pressione esterna che tende a compensare il guadagno nell'energia libera di Gibbs apportata dalla sferoidizzazione. In pratica, più rigido è il mezzo di dispersione, tanto più la configurazione di equilibrio del sistema particolato si avvicina ai rods sintetizzati, piuttosto che alla loro costruzione di Wulff.

Certo, la dispersione di un mezzo di contrasto ottico in un mezzo rigido è uno scenario di scarso interesse nel contesto dell'imaging fotoacustico; tuttavia, questa nozione può essere implementata su una scala molto più locale su ciascuna particella, come l'aggiunta di gusci rigidi o addirittura morbidi. Il rivestimento può influenzare la stabilità termica attraverso meccanismi multipli e sinergici, come di seguito indicato. L'uso di gusci rigidi è probabilmente la soluzione più popolare e inizialmente implementata per la stabilizzazione della risposta fotoacustica da nanorods d'oro. In particolare, il materiale del guscio più comune è la silice o l'organosilice, che consente un controllo preciso su parametri come lo spessore o il livello di porosità⁴. Un miglioramento della fotostabilità e la stabilità termica

dei nanorods d'oro dopo la silanizzazione è stata osservata da diversi autori, sia in regime continuo di trattamento termico⁵⁻⁷ che su un'eccitazione ottica con lunghi impulsi dell'ordine dei ns^{8,9} e dei fs¹⁰. L'uso di nanorods silanizzati per applicazioni nell'imaging fotoacustico è stato oggetto di ricerche approfondite. Oltre al suo effetto sulla stabilità, Chen et al.⁸ hanno dimostrato che un guscio ottimale di uno spessore di circa 20 nm è in grado di amplificare il segnale fotoacustico proveniente da nanorods d'oro incorporati in un fantoccio di gelatina di un fattore di circa 4, probabilmente a causa del potenziamento del trasferimento di calore attraverso le interfacce tra oro, silice mesoporosa e acqua. In un lavoro più recente¹, il nostro gruppo ha fornito una definizione quantitativa della fluenza di soglia per l'insorgenza di fotoinstabilità in nanorods d'oro modificati con organosilice, che porta a una migioria nell'ordine del 10% in media per nm di spessore di guscio (nel caso dell'utilizzo di marcaptosilano come precursore). Al di sopra di questa soglia, il cedimento del guscio deriva dalla sua deformazione plastica ed eventuale rottura per sollecitazione elastica^{6,10}. In caso di silice mesoporosa, alcuni autori hanno anche riferito che l'eventuale rottura del sistema plasmonico può dipendere da una perdita di oro fluido attraverso pori interconnessi o piccole cricche¹⁰. Per tali motivi, l'uso di gusci morbidi può essere un'alternativa vantaggiosa alla silice fragile. Diversi autori hanno predetto e osservato¹¹ che un debole adsorbato può migliorare la stabilità termica dei nanofili e dei nanorods d'oro ultrasottili ritardando la diffusività degli atomi di

superficie e che un'interazione più forte può migliorare l'effetto. Ad esempio, citiamo il concetto di rivestimento polielettrolitico^{12,13} come approccio versatile per ottenere soft shell e modulare parametri rilevanti come spessore del guscio tramite l'adsorbimento di strati consecutivi di polimeri con carica opposta. Più recentemente, abbiamo scoperto che è sufficiente un guscio di tioli aromatici (come il metil-benzen-tiolo (MBT)) sottili circa un monostato molecolare per raddoppiare la fluenza di soglia per la deformazione di nanorods di oro PEGilati¹⁴.

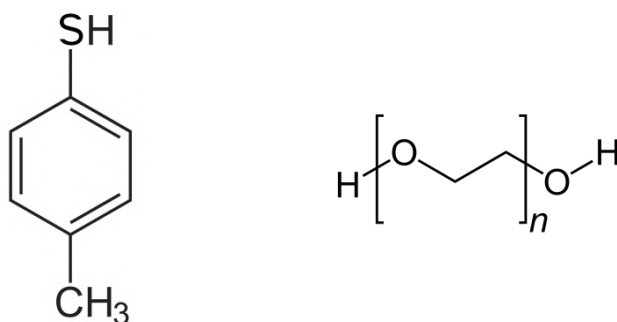


Figura 2.1: a) struttura del metil-benzen-tiolo (MBT) (a sinistra) e b) del polietilen-glicole (PEG) (a destra)

Abbiamo associato un effetto così notevole alla combinazione di diversi fattori, tra cui lo stretto ancoraggio dei tioli adsorbiti alla superficie dell'oro, il loro forte legame reciproco attraverso interazioni idrofobe intermolecolari come il π -stacking e la loro capacità di auto-riparazione (*self-healing*) che supporta la continua

disgregazione e riaggregazione e fornisce resilienza contro la deformazione del network morbido. In pratica, l'immagine sarebbe quella di un'alta densità di atomi d'oro legati con tiolo, incastrati in un'affollata giungla di legami covalenti e non covalenti. Infine, ricordiamo che un possibile trade-off tra le estremizzazioni dei gusci rigidi e dei gusci morbidi, può essere l'utilizzo di gusci metallici, che contengono il potenziale per una combinazione funzionale di rigidità e plasticità. In un recente lavoro¹⁵, abbiamo riportato l'osservazione empirica che nanorods d'oro ricoperti di argento metallico, mostrano apparentemente un'estrema stabilità termica per le applicazioni fototermiche, e riteniamo che questa direzione meriti ulteriori approfondimenti.

Un approccio comune per migliorare la funzionalità dei nanorods d'oro è la formazione di gusci inorganici o polimerici. Una prima scelta in questo contesto è l'aggiunta di silice. Gorelikov e Matsuura hanno suggerito un metodo valido e semplice per sintetizzare un guscio di silice mesoporosa con spessore controllabile¹⁶. Questo metodo consiste nell'idrolisi e condensazione di ortosilicato di tetraetile in una soluzione contenente bromuro di cetrimonio a pH intorno a 10-11. Di conseguenza, i nanorods d'oro sono rivestiti con un guscio rigido di spessore compreso tra 5 e 30 nm e con dimensione dei pori compresa tra 2 e 4 nm. Diverse modifiche di questo approccio sono state ulteriormente suggerite per migliorare la qualità del rivestimento. In particolare, i protocolli modificati

includono la sostituzione del tampone acquoso con una miscela di acqua/etanolo¹⁷ e la formazione di pori con dimensione, morfologia e orientamento controllabili¹⁸. La struttura porosa della silice non solo stabilizza la sospensione dei nanorods d'oro, ma serve anche come piattaforma efficace per aggiungere un'ampia varietà di ingredienti funzionali.

I protocolli per la deposizione della silice mesoporosa spesso soffrono di uno scarso controllo dello spessore. Altri protocolli popolari per rivestire nanorods d'oro con la silice derivano dal Processo di Stöber, in presenza di particelle templanti²². La sintesi di Stöber consiste nell'idrolisi e condensazione dell'ortosilicato di tetraetile in ambiente alcolico. È da notare che i nanorods d'oro rivestiti di cetrimonio non possono essere sospesi in etanolo o altri alcoli. Per risolvere questo problema, Liz-Marzan e colleghi hanno suggerito un approccio universale basato sulla PEGilazione preliminare delle particelle seguita dalla deposizione di silice tramite Processo Stöber²³. Questo approccio è adatto per un'ampia varietà di particelle così come un'ampia gamma di spessori del guscio risultante. Accanto alla fase preliminare di PEGilazione, sono state riportate altre strategie di pre-rivestimento utilizzando polivinilpirrolidone²⁴ oppure un sottile strato di silice^{20,25} prima della sospensione in mezzo alcolico. Il rivestimento in situ di nanorods d'oro con ammine o tioli è possibile anche utilizzando amminosilani²⁶ o mercaptosilani^{1,27} da soli o in combinazione con ortosilicato di tetraetile. Dal punto di vista ottico, il rivestimento con

silice porta ad uno spostamento verso il rosso delle bande plasmoniche e aumenta le cross-section di estinzione e di scattering specialmente in una regione di lunghezza d'onda più corta^{28,29}.

L'uso di polimeri organici è un'altra opzione popolare per rivestire i GNRs. Generalmente, la polimerizzazione dei monomeri sulla superficie delle particelle è una sfida sostanziale che contrasta con la stabilità colloidale della sospensione. Tuttavia, recentemente la polidopamina è stata suggerita come rivestimento rigido e conveniente per vari tipi di particelle^{30,31}. La polidopamina è un biopolimero nero con struttura chimica e proprietà ottiche simili a quelle della melanina³². I protocolli sono molto semplici in quanto la dopamina polimerizza direttamente sulla superficie dei nanorods d'oro a pH intorno a 8,5³¹. Un semplice variazione del rapporto tra monomeri e nanorods fornisce un ottimo controllo dello spessore del guscio da 2 a 50 nm. Inoltre, la polidopamina presenta una conveniente varietà di gruppi funzionali per ulteriori coniugazioni³³. Poiché la polidopamina assorbe la luce su un'ampia finestra, il suo effetto sull'estinzione ottica dei nanorods d'oro è diverso da quello della silice. Ad esempio, è stata recentemente segnalata un'insolita diminuzione della banda longitudinale delle oscillazioni plasmoniche dei nanorods d'oro rivestiti di polidopamina³⁴. Infine, ricordiamo anche che i GNRs possono servire come modello per la sintesi di nanorods core-shell interamente in metallo. La formazione di gusci uniformi di argento su nanorods d'oro è un metodo utile per fabbricare sistemi con nuove proprietà ottiche. Uno dei primi articoli

sui nanorods d'oro rivestiti d'argento con spessore controllabile è stato pubblicato da Ah et al. nel 2011³⁵. Un protocollo modificato è stato ulteriormente riportato da Okuno et al.³⁶, che ha migliorato il controllo sullo spessore e sulla forma del guscio. I nanorods d'oro ricoperti d'argento mostrano risonanze plasmoniche più nitide, più forti e spostate verso il blu rispetto ai loro rods non argentati. Anche un guscio d'argento sottile 2 nm è sufficiente per spostare verso il blu la banda longitudinale delle oscillazioni plasmoniche dei nanorods d'oro per decine di nm³⁷. Inoltre, possono essere ottenute (mediante reazione di sostituzione galvanica) strutture “rod in shell” (detti anche nano-cage) con proprietà ottiche sintonizzabili, in cui i nanorods d'oro argentati fungono da template e una soluzione di acido cloroaurico agisce come ossidante^{21,38}. Con la progettazione razionale di tali strutture interessanti, è possibile regolare il loro comportamento ottico e ulteriori parametri come rugosità o superficie specifica. In conclusione, la letteratura scientifica fornisce molteplici esempi di protocolli per rivestire i nanorods d'oro con gusci rigidi, morbidi o di altro tipo, come silice, polimeri organici e strategie più recenti come i metalli, che hanno il potenziale per migliorare la loro fotostabilità. L'utilizzo di silice o organosilice è la scommessa più sicura, vista la sua ricorrenza in letteratura. Ma le altre opzioni possono offrire vantaggi in termini di facilità di sintesi e purificazione.

Il rivestimento con gusci rigidi o morbidi implica ovviamente un certo livello di complessità aggiuntiva che altera molteplici caratteristiche delle particelle iniziali, inclusi i loro profili idrodinamici ed elettrocinetici. Tali modifiche possono comportare vantaggi e svantaggi ma, in ogni caso, necessitano di comprensione all'interno di un disegno complessivo del sistema. Gli svantaggi pratici comprendono una probabile complicazione delle procedure di depurazione, dovuta all'aumento delle fasi di sintesi e del possibile aumento della superficie specifica delle particelle. Ad esempio, i nanorods d'oro modificati con organosilice tendono a trattenere una frazione più elevata di impurità citotossiche utilizzate nei loro protocolli sintetici¹, come il CTAB. Per quanto riguarda la silice, il rivestimento con biopolimeri come la polidopamina è un'eccellente strategia per ottenere l'atossicità^{39,40}. Un'altra differenza evidente riguarda tutte quelle applicazioni che richiedono l'accesso diretto alla superficie del metallo nobile, come vari metodi per il rilevamento ottico basati sul Surface Enhanced Raman Scattering (SERS)^{41,42} o spostamenti della Risonanza Plasmonica localizzata di Superficie (localized SPR)⁴³ che possono completare le funzioni fotoacustiche.

Il vantaggio più evidente di una strategia basata sul potenziamento della stabilità termica dei nanorods d'oro è la garanzia dell'utilizzo di un approccio che promuove simultaneamente sia la conversione fotoacustica che la conversione fototermica¹⁴.

Nel caso di gusci porosi, un'altra caratteristica interessante è la loro facilità di ospitare ulteriori composti, come farmaci, fotosensibilizzanti e reporter. Sia i GNRs silanizzati⁴⁴⁻⁵¹ che quelli rivestiti di polielettrolita^{52,53} sono diventati una scelta popolare per il trasporto e il rilascio controllato di farmaci dopo l'attivazione fototermica, con un ottimo controllo.

La letteratura recente contiene una pletora di esempi di sistemi per la terapia multimodale del cancro integrando per esempio l'ablazione fototermica e la chemioterapia all'interno dell'ambito delle stesse particelle⁵⁴. Un'altra idea popolare è quella di arricchire i GNRs silanizzati e ricoperti con polielettroliti, con coloranti per uso nell'imaging multimodale, come metodi fotoacustici e metodi fluorescenti⁵⁵, metodi fotoacustici e Raman⁵⁶, metodi fotoacustici e metodi non ottici (come la risonanza magnetica per immagini (MRI))^{57,58}, o altre applicazioni che si combinano bene con un trattamento dell'ipertermia, come la termometria locale⁴⁸.

In alcuni casi, l'organosilice¹ o la polidopamina² possono rappresentare solo un conveniente cross-linker per la costruzione di particelle. Un altro vantaggio dei gusci rigidi come la silice è che il loro ingombro sterico fornisce una soluzione affidabile contro l'accoppiamento plasmonico nel caso di aggregazione di particelle in ambiente biologico¹, per esempio dopo l'assorbimento endosomiale. L'accoppiamento plasmonico si pone accanto al problema della fotoinstabilità come un'altra grave minaccia alla stabilità ottica dei nanorods d'oro. Nel complesso, l'aggiunta di gusci

rigidi o morbidi per mitigare la fotoinstabilità dei nanorods utilizzati come agenti di contrasto ottici per l'imaging fotoacustico è un approccio efficace che rende particolare senso in un contesto in cui l'implementazione di questa soluzione appartiene ad un ripensamento multidimensionale delle particelle e delle loro funzioni.

Riferimenti bibliografici

1. Lai, S.; Centi, S.; Borri, C.; Ratto, F.; Cavigli, L.; Micheletti, F.; Kemper, B.; Ketelhut, S.; Kozyreva, T.; Gonnelli, L.; et al. A multifunctional organosilica cross-linker for the bio-conjugation of gold nanorods. *Colloids Surf. B* 2017, 157, 174–181.
2. Khlebtsov, B.N.; Burov, A.M.; Pylaev, T.E.; Khlebtsov, N.G. Polydopamine-coated Au nanorods for targeted fluorescent cell imaging and photothermal therapy. *Beilstein J. Nanotechnol.* 2019, 10, 794–803.
3. Kennedy, W.J.; Izor, S.; Anderson, B.D.; Frank, G.; Varshney, V.; Ehlert, G.J. Thermal Reshaping Dynamics of Gold Nanorods: Influence of Size, Shape, and Local Environment. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2018, 10, 43865–43873.
4. Slowing, I.I.; Vivero-Escoto, J.L.; Wu, C.W.; Lin, V.S.Y. Mesoporous silica nanoparticles as controlled release drug delivery and gene transfection carriers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2008, 60, 1278–1288. *Inorganic Nanoparticles in Drug Delivery.*

5. Liu, J.; Kan, C.; Cong, B.; Xu, H.; Ni, Y.; Li, Y.; Shi, D. Plasmonic Property and Stability of Core-Shell Au@SiO₂ Nanostructures. *Plasmonics* 2014, 9, 1007–1014.
6. Gergely-Fülöp, E.; Zámbo, D.; Deák, A. Thermal stability of mesoporous silica-coated gold nanorods with different aspect ratios. *Mater. Chem. Phys.* 2014, 148, 909–913.
7. Chang, C.S.; Rothberg, L.J. Plasmon-Enhanced Photoconductivity in Amorphous Silicon Thin Films by Use of Thermally Stable Silica-Coated Gold Nanorods. *Chem. Mater.* 2015, 27, 3211–3215.
8. Chen, Y.S.; Frey, W.; Kim, S.; Kruizinga, P.; Homan, K.; Emelianov, S. Silica-Coated Gold Nanorods as Photoacoustic Signal Nanoamplifiers. *Nano Lett.* 2011, 11, 348–354.
9. Hu, X.; Gao, X. Multilayer coating of gold nanorods for combined stability and biocompatibility. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2011, 13, 10028–10035.
10. Albrecht, W.; Deng, T.S.; Goris, B.; van Huis, M.A.; Bals, S.; van Blaaderen, A. Single Particle Deformation and Analysis of Silica-Coated Gold Nanorods before and after

Femtosecond Laser Pulse Excitation. *Nano Lett.* 2016, 16, 1818–1825.

11. Canpean, V.; Gabudean, A.; Astilean, S. Enhanced thermal stability of gelatin coated gold nanorods in water solution. *Colloids Surf. A* 2013, 433, 9–13.
12. Gole, A.; Murphy, C.J. Polyelectrolyte-Coated Gold Nanorods: Synthesis, Characterization and Immobilization. *Chem. Mater.* 2005, 17, 1325–1330.
13. Alkilany, A.M.; Thompson, L.B.; Murphy, C.J. Polyelectrolyte Coating Provides a Facile Route to Suspend Gold Nanorods in Polar Organic Solvents and Hydrophobic Polymers. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2010, 2, 3417–3421.
14. Centi, S.; Cavigli, L.; Borri, C.; Milanesi, A.; Banchelli, M.; Chioccioli, S.; Khlebtsov, B.N.; Khlebtsov, N.G.; Matteini, P.; Bogani, P.; et al. Small Thiols Stabilize the Shape of Gold Nanorods. *J. Phys. Chem. C* 2020, 124, 11132–11140.
15. Milanesi, A.; Magni, G.; Centi, S.; Schifino, G.; Aluigi, A.; Khlebtsov, B.N.; Cavigli, L.; Barucci, A.; Khlebtsov, N.G.; Ratto, F.; et al. Optically activated and interrogated

- plasmonic hydrogels for applications in wound healing. *J. Biophotonics* 2020, 13, e202000135.
16. Gorelikov, I.; Matsuura, N. Single-Step Coating of Mesoporous Silica on Cetyltrimethyl Ammonium Bromide-Capped Nanoparticles. *Nano Lett.* 2008, 8, 369–373.
 17. Inose, T.; Oikawa, T.; Shibuya, K.; Tokunaga, M.; Hatoyama, K.; Nakashima, K.; Kamei, T.; Gonda, K.; Kobayashi, Y. Fabrication of silica-coated gold nanorods and investigation of their property of photothermal conversion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2017, 484, 318–322.
 18. Santana Vega, M.; Guerrero Martínez, A.; Cucinotta, F. Facile Strategy for the Synthesis of Gold@Silica Hybrid Nanoparticles with Controlled Porosity and Janus Morphology. *Nanomaterials* 2019, 9, 348.
 19. Wang, S.; Zhao, X.; Wang, S.; Qian, J.; He, S. Biologically Inspired Polydopamine Capped Gold Nanorods for Drug Delivery and Light-Mediated Cancer Therapy. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2016, 8, 24368–24384.

20. Khlebtsov, B.; Khanadeev, V.; Khlebtsov, N. Surface-enhanced Raman scattering inside Au@Ag core/shell nanorods. *Nano Res.* 2016, 9, 2303–2318.
21. Tsai, M.F.; Chang, S.H.G.; Cheng, F.Y.; Shanmugam, V.; Cheng, Y.S.; Su, C.H.; Yeh, C.S. Au Nanorod Design as Light-Absorber in the First and Second Biological Near-Infrared Windows for in Vivo Photothermal Therapy. *ACS Nano* 2013, 7, 5330–5342.
22. Stöber, W.; Fink, A.; Bohn, E. Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range. *J. Colloid Interface Sci.* 1968, 26, 62–69.
23. Fernández-López, C.; Mateo-Mateo, C.; Álvarez Puebla, R.A.; Pérez-Juste, J.; Pastoriza-Santos, I.; Liz-Marzán, L.M. Highly Controlled Silica Coating of PEG-Capped Metal Nanoparticles and Preparation of SERS-Encoded Particles. *Langmuir* 2009, 25, 13894–13899.
24. Liu, J.; Chang, M.J.; Gao, B.; Xu, Z.G.; Zhang, H.L. Sonication-assisted synthesis of multi-functional gold nanorod/silica core-shell nanostructures. *J. Alloys Compd.* 2013, 551, 405–409.

25. Liu, Y.; Xu, M.; Chen, Q.; Guan, G.; Hu, W.; Zhao, X.; Qiao, M.; Hu, H.; Liang, Y.; Zhu, H.; et al. Gold nanorods/mesoporous silica-based nanocomposite as theranostic agents for targeting near-infrared imaging and photothermal therapy induced with laser. *Int. J. Nanomed.* 2015, 10, 4747–4761.
26. Hinman, J.G.; Stork, A.J.; Varnell, J.A.; Gewirth, A.A.; Murphy, C.J. Seed mediated growth of gold nanorods: Towards nanorod matryoshkas. *Faraday Discuss.* 2016, 191, 9–33.
27. Sendroiu, I.E.; Warner, M.E.; Corn, R.M. Fabrication of Silica-Coated Gold Nanorods Functionalized with DNA for Enhanced Surface Plasmon Resonance Imaging Biosensing Applications. *Langmuir* 2009, 25, 11282–11284.
28. Malinsky, M.D.; Kelly, K.L.; Schatz, G.C.; Van Duyne, R.P. Chain Length Dependence and Sensing Capabilities of the Localized Surface Plasmon Resonance of Silver Nanoparticles Chemically Modified with Alkanethiol Self-Assembled Monolayers. *J. Am. Chem. Soc.* 2001, 123, 1471–1482.

29. Khlebtsov, N.G.; Dykman, L.A.; Bogatyrev, V.A.; Khlebtsov, B.N. Two-Layer Model of Colloidal Gold Bioconjugates and Its Application to the Optimization of Nanosensors. *Colloid. J.* 2003, 65, 508–518.
30. Ryu, J.H.; Messersmith, P.B.; Lee, H. Polydopamine Surface Chemistry: A Decade of Discovery. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2018, 10, 7523–7540.
31. Liu, M.; Zeng, G.; Wang, K.; Wan, Q.; Tao, L.; Zhang, X.; Wei, Y. Recent developments in polydopamine: An emerging soft matter for surface modification and biomedical applications. *Nanoscale* 2016, 8, 16819–16840.
32. Liu, Y.; Ai, K.; Lu, L. Polydopamine and Its Derivative Materials: Synthesis and Promising Applications in Energy, Environmental, and Biomedical Fields. *Chem. Rev.* 2014, 114.
33. Ding, Y.; Floren, M.; Tan, W. Mussel-inspired polydopamine for bio-surface functionalization. *Biosurf. Biotribol.* 2016, 2, 121–136.
34. Khlebtsov, B.N.; Burov, A.M.; Khlebtsov, N.G. Polydopamine coating decreases longitudinal plasmon of Au

nanorods: Experiment and simulations. *Appl. Mater. Today* 2019, 15, 67–76.

35. Ah, C.S.; Hong, S.D.; Jang, D.J. Preparation of Au@Ag shell Nanorods and Characterization of Their Surface Plasmon Resonances. *J. Phys. Chem. B* 2001, 105, 7871–7873.
36. 191. Okuno, Y.; Nishioka, K.; Kiya, A.; Nakashima, N.; Ishibashi, A.; Niidome, Y. Uniform and controllable preparation of Au–Ag core–shell nanorods using anisotropic silver shell formation on gold nanorods. *Nanoscale* 2010, 2, 1489–1493.
37. Khlebtsov, B.N.; Liu, Z.; Ye, J.; Khlebtsov, N.G. Au@Ag core/shell cuboids and dumbbells: Optical properties and SERS response. *J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transf.* 2015, 167, 64–75.
38. Wang, S.; Xu, H.; Ye, J. Plasmonic rod-in-shell nanoparticles for photothermal therapy. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2014, 16, 12275–12281.

39. Ho, C.C.; Ding, S.J. Structure, Properties and Applications of Mussel-Inspired Polydopamine. *J. Biomed. Nanotechnol.* 2014, 10, 3063–3084.
40. Sahiner, N.; Sagbas, S.; Sahiner, M.; Blake, D.A.; Reed, W.F. Polydopamine particles as nontoxic, blood compatible, antioxidant and drug delivery materials. *Colloids Surf. B* 2018, 172, 618–626.
41. Von Maltzahn, G.; Centrone, A.; Park, J.H.; Ramanathan, R.; Sailor, M.J.; Hatton, T.A.; Bhatia, S.N. SERS-Coded Gold Nanorods as a Multifunctional Platform for Densely Multiplexed Near-Infrared Imaging and Photothermal Heating. *Adv. Mater.* 2009, 21, 3175–3180.
42. Khlebtsov, B.N.; Khanadeev, V.A.; Panfilova, E.V.; Bratashov, D.N.; Khlebtsov, N.G. Gold Nanoisland Films as Reproducible SERS Substrates for Highly Sensitive Detection of Fungicides. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2015, 7, 6518–6529.
43. Cao, J.; Sun, T.; Grattan, K.T. Gold nanorod-based localized surface plasmon resonance biosensors: A review. *Sens. Actuator B-Chem.* 2014, 195, 332–351.

44. Wang, Z.; Zong, S.; Yang, J.; Li, J.; Cui, Y. Dual-mode probe based on mesoporous silica coated gold nanorods for targeting cancer cells. *Biosens. Bioelectron.* 2011, 26, 2883–2889.
45. Zhang, Y.; Qian, J.; Wang, D.; Wang, Y.; He, S. Multifunctional Gold Nanorods with Ultrahigh Stability and Tunability for In Vivo Fluorescence Imaging, SERS Detection, and Photodynamic Therapy. *Angew. Chem.* 2013, 52, 1148–1151.
46. Gao, Z.; Burrows, N.D.; Valley, N.A.; Schatz, G.C.; Murphy, C.J.; Haynes, C.L. In solution SERS sensing using mesoporous silica-coated gold nanorods. *Analyst* 2016, 141, 5088–5095.
47. Zhang, Z.; Wang, L.; Wang, J.; Jiang, X.; Li, X.; Hu, Z.; Ji, Y.; Wu, X.; Chen, C. Mesoporous Silica-Coated Gold Nanorods as a Light-Mediated Multifunctional Theranostic Platform for Cancer Treatment. *Adv. Mater.* 2012, 24, 1418–1423.
48. Huang, Y.; Rosei, F.; Vetrone, F. A single multifunctional nanoplatform based on upconversion luminescence and gold nanorods. *Nanoscale* 2015, 7, 5178–5185.

49. Liu, J.; Detrembleur, C.; De Pauw-Gillet, M.C.; Mornet, S.; Jérôme, C.; Duguet, E. Gold Nanorods Coated with Mesoporous Silica Shell as Drug Delivery System for Remote Near Infrared Light-Activated Release and Potential Phototherapy. *Small* 2015, 11, 2323–2332.
50. Dykman, L.A.; Khlebtsov, N.G. Multifunctional gold-based nanocomposites for theranostics. *Biomaterials* 2016, 108, 13–34.
51. Song, Z.; Liu, Y.; Shi, J.; Ma, T.; Zhang, Z.; Ma, H.; Cao, S. Hydroxyapatite/mesoporous silica coated gold nanorods with improved degradability as a multi-responsive drug delivery platform. *Mater. Sci. Eng. C* 2018, 83, 90–98.
52. Huang, H.C.; Barua, S.; Kay, D.B.; Rege, K. Simultaneous Enhancement of Photothermal Stability and Gene Delivery Efficacy of Gold Nanorods Using Polyelectrolytes. *ACS Nano* 2009, 3, 2941–2952.
53. Huang, J.; Jackson, K.S.; Murphy, C.J. Polyelectrolyte Wrapping Layers Control Rates of Photothermal Molecular Release from Gold Nanorods. *Nano Lett.* 2012, 12, 2982–2987.

54. Haine, A.T.; Niidome, T. Gold Nanorods as Nanodevices for Bioimaging, Photothermal Therapeutics, and Drug Delivery. *Chem. Pharm. Bull.* 2017, 65, 625–628.
55. Peng, D.; Du, Y.; Shi, Y.; Mao, D.; Jia, X.; Li, H.; Zhu, Y.; Wang, K.; Tian, J. Precise diagnosis in different scenarios using photoacoustic and fluorescence imaging with dual-modality nanoparticles. *Nanoscale* 2016, 8, 14480–14488.
56. Jokerst, J.V.; Cole, A.J.; Van de Sompel, D.; Gambhir, S.S. Gold Nanorods for Ovarian Cancer Detection with Photoacoustic Imaging and Resection Guidance via Raman Imaging in Living Mice. *ACS Nano* 2012, 6, 10366–10377.
57. Yang, H.W.; Liu, H.L.; Li, M.L.; Hsi, I.W.; Fan, C.T.; Huang, C.Y.; Lu, Y.J.; Hua, M.Y.; Chou, H.Y.; Liaw, J.W.; et al. Magnetic gold-nanorod/PNIPAAmMA nanoparticles for dual magnetic resonance and photoacoustic imaging and targeted photothermal therapy. *Biomaterials* 2013, 34, 5651–5660.
58. Guo, T.; Lin, Y.; Li, Z.; Chen, S.; Huang, G.; Lin, H.; Wang, J.; Liu, G.; Yang, H.H. Gadolinium oxysulfide-coated gold nanorods with improved stability and dual-modal magnetic resonance/photoacoustic imaging contrast enhancement for cancer theranostics. *Nanoscale* 2017, 9, 56–61.

Small Thiols Stabilize the Shape of Gold Nanorods

Sonia Centi, Lucia Cavigli, Claudia Borri, Alessio Milanesi, Martina Banchelli, Sofia Chioccioli, Boris N. Khlebtsov, Nikolai G. Khlebtsov, Paolo Matteini, Patrizia Bogani, Fulvio Ratto,* and Roberto Pini

Cite This: *J. Phys. Chem. C* 2020, 124, 11132–11140

Read Online

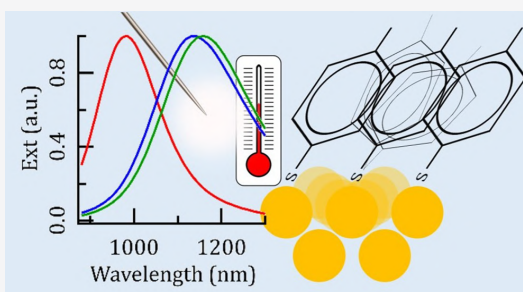
ACCESS |

Metrics & More

Article Recommendations

Supporting Information

ABSTRACT: The stabilization of the optical properties of anisotropic plasmonic particles upon thermal annealing and laser irradiation is an important issue in many biomedical applications. Here, we address the effect of small thiols on the thermal and photostability of gold nanorods. As-synthesized colloids were treated with mixtures of thiolated polyethylene glycol and methylbenzenethiol with molar ratios ranging from 0, for pure PEG, to 20 and then incubated in an oven at sub-boiling conditions. We found that small thiols dramatically enhance the thermal stability of gold nanorods. For instance, after 1 h at 90 °C samples with pure PEG lost more than 70% of optical absorbance at their initial peak position, while particles coated with a thicker layer of methylbenzenethiol remained nearly unchanged. We ascribe this effect to a modulation of the activation barrier for surface diffusion of gold atoms. Additionally, we addressed the translation of this effect to the photostability of gold nanorods irradiated under conditions of interest in photoacoustic imaging and found that small thiols delay relevant damage thresholds by as much as a factor of 2. Our findings will help researchers design novel tags that overcome the limitations related to thermal and photostabilities in a broad variety of applicative contexts.



INTRODUCTION

Over the past couple of decades or so, near-infrared resonant plasmonic particles exhibiting conformational anisotropy have received substantial interest for applications as contrast agents in biomedical optics.^{1–6} In some cases, their use has literally accompanied the emergence of major innovations, such as photoacoustic imaging^{7–9} and flow cytometry,^{10,11} where these materials have appeared ever since seminal papers. In these contexts, the optimization of their photostability is a recurrent issue^{10,12–19} because, in most cases of practical interest, relevant thresholds fall well below maximum permissible exposure (MPE) boundaries²⁰ and so represent a limiting factor. Even at room temperature,²¹ but much more prevalently upon irradiation with short optical pulses, noble-metal particles start to premelt through a process of atomic surface diffusion that requires no phase transition, proceeds with thermal activation through Arrhenius behavior,^{21–24} and promotes a collective reconfiguration that tends to lower their surface to volume ratio, that is, to gain higher sphericity.²⁵ The exact pathway behind this reconfiguration remains a subject of ongoing research. In the case of gold nanorods, most authors have postulated a gradual relocation of material from the end-caps to the side walls.^{22,24,26} However, other authors have evoked more complex phenomena, such as the ejection of spherical fragments according to Rayleigh-Plateau instability,²⁷ as occur in metal wires^{28,29} and liquid columns. In a recent

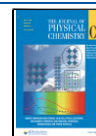
paper,²³ we outlined a simple model for the kinetics of the transformation of gold nanorods where we implemented a constant value of 0.6 eV for the activation energy for atomic surface diffusion. However, an accurate description of this parameter needs to account for local details, such as curvature^{22,24} or chemical coordination,^{30–32} which make sharper tips more mobile, and environmental features, such as stiffness,^{21,24} which modify the overall dynamics.

Among the strategies proposed to inhibit the effect of reshaping, the use of thick shells made of silica,^{14,33} mixed Si–Ti oxide,³⁴ or organosilica¹⁸ stands out as an effective tool that constrains the initial shape by acting as a rigid mold. As a rule of thumb, for instance, we quantified that the threshold of optical fluence for reshaping of gold nanorods increases by as much as 10% per nanometer of added organosilica.¹⁸ However, this approach modifies the functionality of plasmonic particles in very many respects. In a sense, silanization may confer valuable porosity and tunable hydrophilicity for use, for

Received: January 27, 2020

Revised: April 29, 2020

Published: April 30, 2020



instance, to carry and enable the controlled release of drugs^{33,35,36} or to host upconverting lanthanides for local thermometry.³⁷ In another sense, its effect may be intrusive and bring along significant drawbacks, in terms of much more complexity, cytotoxicity,¹⁸ and a negative impact on near field-based applications, such as surface enhanced raman scattering (SERS) or colorimetric assays.

Here, we present a protocol that makes use of a small thiol to affect the kinetics of premelting of gold nanorods, and we assess its performance under conditions of practical relevance for applications in vitro and in vivo. The interaction between noble metal films or particles, small thiols, and their self-assembled monolayers has been the subject of extensive and ongoing research.^{38–40} In particular, the adsorption and desorption of such species have been investigated under a broad variety of conditions.^{41–48} What emerges is that denser layers of aromatic thiols supporting π -interactions tend to exhibit more stability^{42–45,48} as a rule of thumb. However, much less attention has been paid to the other side of the interface, which may reveal more opportunities for technological applications. Our work fits in this gap. We postulate that thiolate-bound gold atoms are more constrained and exhibit higher activation energy for surface hopping,^{30,32} thus delaying the onset of reshaping. We demonstrate this effect on the thermal stability of a colloidal suspension of gold nanorods left in an oven at moderate temperature and discuss its implication on their photostability under conditions of interest in photoacoustic imaging.

■ EXPERIMENTAL METHODS

Materials. α -Methoxy- ω -mercapto poly(ethylene glycol) (PEG, MW 5000 Da, mPEG-SH) was acquired from Iris Biotech GmbH (Marktredwitz, Germany). All other chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, U.S.A.) and used as received.

Synthesis of the Particles. Gold nanorods were synthesized according to our variant of the protocol developed by Vigderman and Zubarev.^{49,50} After synthesis, particles were brought to a concentration of 1.6 mM Au in a 100 mM acetate buffer of pH 5.0 containing 500 μ M cetrimonium bromide (CTAB) and 0.005% (w/w) polysorbate 20 and 50 μ M mPEG-SH.⁵¹ After 30 min under gentle agitation at 37 °C, suspensions were supplemented with different doses of methylbenzenethiol (MBT), that is, none (sample PEG/MBT 1:0), 50 μ M (PEG/MBT 1:1), or 1 mM (PEG/MBT 1:20), and left at rest at 4 °C for 24 h. Finally, all particles were purified by three cycles of centrifugation, in order to remove the excess of free thiols, and transferred to ultrapure water containing 0.005% (w/w) polysorbate 20. The reaction buffer and the supernatant obtained after the first cycle of centrifugation were treated with Ellman's reagent, and their optical absorbance around 412 nm was compared in order to assess the percentage of unreacted thiols.

Optical and Morphological Characterization of the Particles. The PEGylation and colloidal stability of the particles were checked by dynamic light scattering⁵² with a Zetasizer Nano ZS 90 platform from Malvern Instruments (Malvern, U.K.). Spectra of optical extinction were recorded with a Lambda 950 spectrophotometer from PerkinElmer (Waltham, MA, U.S.A.). Optical spectra were analyzed with a numerical model that represents a convolution of a Weibull distribution of aspect ratio (AR, or ratio of length to diameter) times the line shape returned from the dipolar approximation

of Mie-Gans theory.⁵³ Details are given elsewhere.^{25,54} This model allows us to work out an effective distribution of AR from the optical spectra of gold nanorods or the refractive index of their medium. Since particles are rendered as spheroids, results fail to account for subtle details of their shape,⁵⁵ such as the precise layout of facets and so forth, and are approximate. However, the final outcome is often accurate to the level of a few percent²⁵ and succeeds to capture major trends involved in the process of reshaping.

SERS experiments were carried out using a Xplora microRaman spectrometer from Horiba (Villeneuve-d'Ascq, France) coupled to 532 or 785 nm wavelength laser sources. Single acquisitions were performed with integration time of 10 s, laser power at the sample of 4.8 mW, and a 1200-grooves/mm grating. The backscattered signal was acquired by means of a 10 $\times$ microscope objective (0.25 NA), generating an $\sim$ 7 μ m beam waist that provides an average response, in turn minimizing possible local signal variability. SERS measurements were performed by focusing the laser beam on the exposed face of a 7 μ L droplet of suspended particles (PEG/MBT 1:0, 1:1, and 1:20) accommodated in 3 mm² round holes obtained from a polypropylene support.⁵⁶ SERS data are reported as average over 15 random measurement points from 3 replicated samples.

Transmission electron micrographs were acquired in the laboratories of Center for Electronic Microscopy Laura Bonzi of CNR in Sesto Fiorentino with a CM12 platform from Philips (Amsterdam, The Netherlands) operated at 100 kV or at Simbioz Center for the Collective Use of Research Equipment in the Field of Physical–Chemical Biology and Nanobiotechnology of IBPPM RAS in Saratov with a Libra-120 transmission electron microscope from Carl Zeiss (Jena, Germany). For TEM measurements, suspensions of particles were centrifuged twice and resuspended in ultrapure water. Five microliters of samples were deposited onto 300-mesh copper grids covered with Formvar films and left to dry in an oven at 40 °C.

Photoacoustic Characterization of the Particles. Photoacoustic experiments were carried out with a homemade inverted photoacoustic microscope.^{50,57} The optical source was a fiber-coupled diode-pumped microchip laser by Asclepion Laser Technologies (Jena, Germany) emitting pulses with a wavelength of 1064 nm, duration of 3.3 ns, and repetition rate of 10 Hz. An attenuator placed in front of the output was used to tune the optical fluence, which was monitored in real time with a QE8SP pyroelectric detector from Gentec-EO (Quebec, QC, Canada). Photoacoustic signals were acquired by an amplified immersion transducer from Olympus Panametrics (mod V382-SU-F, sensor diameter 0.5 in., frequency range 3.5 MHz, focal distance 0.83 in., 40 dB amplifier mod S676, Tokyo, Japan) and recorded with a RTO1004 digital oscilloscope from Rohde&Schwarz (Munich, Germany).

Flow chambers (μ -Slide I Luer Family, channel height 200 μ m, IBIDI GmbH, Planegg/Martinsried, Germany) were filled with suspensions of gold nanorods, coupled to a peristaltic pump (model FH10, Thermo Scientific, Waltham, MA U.S.A.), and immersed in DI water.⁵⁷ The use of microfluidic chambers is a promising tool to assess the performance of photoacoustic systems and contrast agents.^{58,59} The laser beam was focused perpendicular to the flow chamber with a spot diameter of 300 μ m.

Photoacoustic signals (I) were analyzed in terms of peak-to-peak amplitude and their trend with fluence of the optical

trigger (F) was modeled with an analytical function that describes a depletion of optical absorbance according to a sigmoid curve^{18,23}

$$I = a + \frac{b \cdot F}{1 + \left(\frac{F}{F_0}\right)^p} \quad (1)$$

The parameters contained in the sigmoid term were worked out to extract a threshold for photoinstability as $F_{th} = (1/3)^{1/p}$. F_0 , which amounts to a loss of efficiency of photoacoustic conversion by 25%, consistent with our previous definition.^{16,18,23}

RESULTS AND DISCUSSION

Model of Thiolated Particles. In order to assess the effect of small thiols on the stability of gold nanorods, we added different amounts of MBT to the reaction mixture used for their PEGylation. The latter probably represents the most standard modification of gold nanorods for applications in biomedical optics.^{51,60–62} Figure 1a shows a representative transmission electron image of the particles used in this work. We chose MBT for its ability to form self-assembled monolayers^{63–66} that change in conformation and stability with density due to the effect of π -stacking. In addition, benzene thiols are a common choice for use as reference for performance assessment of SERS substrates⁶⁷ or to prepare SERS tags for biomedical sensing.^{68,69} Here, we treated as-synthesized gold nanorods with thiolated PEG and MBT at different molar ratios. We started with a ratio of thiolated PEG/MBT of 1:0, which has no MBT but just our PEGylated benchmark. Next, the ratio was modified to 1:1, where the dosage of MBT was such that the nominal size of gold surface area available per small thiol was about 25–50 Å², and finally a ratio of 1:20, that is, a gold surface area per MBT molecule around 1.3–3 Å². Since the footprint of MBT in a self-assembled monolayer on gold is 19 Å²,⁷⁰ the latter sample theoretically reflects a condition of oversaturation. Instead, the intermediate case stands below saturation. Note that we use the labels PEG/MBT 1:0, 1:1, and 1:20 in order to indicate these three cases according to their ratios of thiols dosed in the reaction mixture. The actual density of PEG and MBT immobilized on the particles is more difficult to determine. The quantification of thiols left unreacted in the reaction buffer suggests that sample 1:1 is close to the nominal density of MBT, and sample 1:20 reaches saturation and actually carries as much as 2–4 monolayers of MBT, probably stacked through hydrophobic interactions prior to subsequent purification. In practice, we consider sample 1:20 as the subject of our study, 1:0 as our benchmark, and 1:1 as an intermediate case used to verify the existence of a trend. Figure 1b provides a cartoon of our samples for use as a memo, where some details may be inaccurate. In particular, as we shall see, the persistence of PEG in the particles treated with MBT may be subject to dynamic thiol exchange. Conversely, different observations concur to confirm the trend in density of MBT bound per particle.

Figure 1c displays the spectra of optical extinction of our samples. We observed a red shift of the plasmonic bands upon increase in dosage of MBT with their longitudinal oscillations peaking from 1143 to 1167 to 1172 nm. We analyzed these spectra with a numerical model derived from Mie-Gans theory⁵³ that was demonstrated elsewhere^{25,54} and double-checked once more in this work (see Supporting Information).

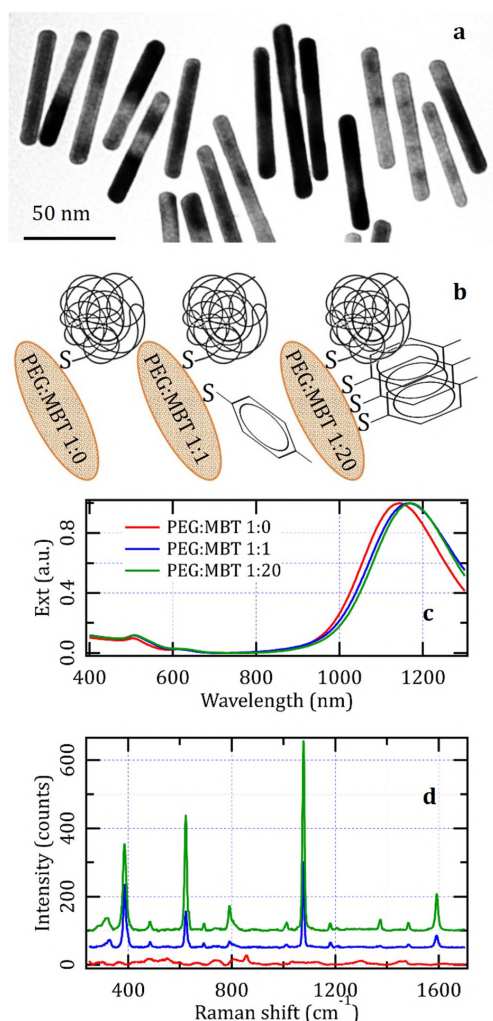


Figure 1. (a) Representative transmission electron micrograph of the particles used in the main text of this work. (b) Cartoon representing the different modifications with a ratio of PEG/MBT of 1:0, 1:1, or 1:20, from left to right. Methoxylated PEG is drawn as a curled strand. (c) Their spectra of optical extinction. (d) Their Raman spectra acquired with an excitation wavelength of 785 nm. Curves were offset by 50 counts for clarity.

According to this model, the optical features of our samples arise from a distribution of AR with an average of 7.7 and standard deviation of 0.8, and their shift points to an increase of effective refractive index from 1.33 to 1.36 to 1.37. A red shift of the plasmonic bands of gold nanospheres that tends to saturate with density of MBT was also reported by Lu et al.⁷¹

Figure 1d compares the Raman spectra of our samples. The Au–S modes around 380 cm^{−1} increase with dosage of MBT, which accounts for an overall enrichment in thiols anchored to the metal surface. The change of intensity ratio between the SERS bands corresponding to vibrational modes with in-plane A1 to out-of-plane B1 symmetry seen from sample PEG/MBT 1:1 to 1:20 suggests a compaction of the layer of MBT^{71–74}

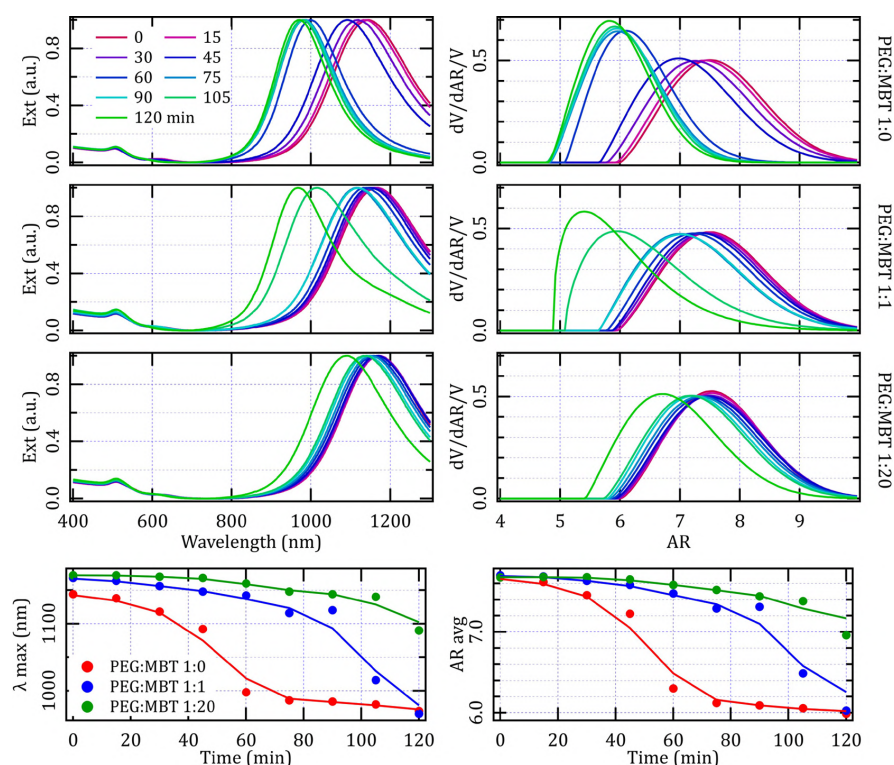


Figure 2. Normalized spectra of optical extinction and their decryption in terms of distributions of AR for particles modified with the named mixtures of thiols and treated for the named intervals at 90 °C. Note that the right-hand histograms integrate to unity. The lower panels summarize the kinetics of evolution of peak position of the longitudinal band and average value of AR: dots are experimental values; lines are drawn to guide the eye.

(see Table S1 in [Supporting Information](#) for an attribution of peaks according to symmetry).⁷⁵ For an orientative estimate, the prescriptions by Szafranski et al.⁷³ for roughened gold electrodes would project a decrease of average tilt angle of the aromatic ring from 26 to 21° with respect to the normal. In addition, the sharp rise of vibrational modes at 1372 and 1593 cm^{-1} suggests the onset of charge transfer from gold to MBT,^{76–78} which points to a net change of surface electronic states (see also Figure S1 in [Supporting Information](#)). Meanwhile, the weak SERS bands associated with PEG that are visible in sample PEG/MBT 1:0 tend to disappear, which is consistent with a change of conformation that makes PEG more extended outward⁷⁹ or the onset of dynamic thiol exchange. PEG is the most popular choice to enhance the colloidal stability of particles intended for biomedical applications^{51,60–62} and its loss may trigger flocculative processes.⁸⁰ However, we never observed any sign of flocculation, that is, no increase of hydrodynamic size, broadening of the plasmonic bands,⁸¹ nor sedimentation, and we found consistent values of hydrodynamic size for all three samples. These qualitative observations collectively point to some persistence of PEG. Another detail discernible from our SERS spectra is the lack of clear Raman signals from CTAB^{82,83} (see Figure S2 in [Supporting Information](#)), which is a cytotoxic surfactant used in the synthesis of gold nanorods. The presence of CTAB is a critical issue for the translation of

gold nanorods into biomedical applications, and its thorough removal is a recurrent subject of research.^{84–87} In this respect, our single-step protocol for PEGylation and purification in an acetate buffer containing polysorbate 20 is an efficient solution, consistent with our previous findings on the biological profiles of our particles.⁵¹

Thermal Stability. In order to verify the effect of MBT on the thermal stability of gold nanorods, we used an oven set at 90 °C and followed the shift of their plasmonic bands over time. We chose this temperature for no particular reason but to accelerate all kinetics without the nuisance of a boiling medium.

The upper left panel of [Figure 2](#) shows the spectra of optical extinction of PEGylated particles left at 90 °C for different times. The longitudinal band blue shifts from 1144 to 998 nm after 1 h and then more slowly drifts to 970 nm after 2 h. In order to reconstruct the underlying transformation, we analyzed all spectra with the numerical model based on Mie-Gans theory, which allows us to translate the distribution of optical modes into one of shape.²⁵ The plasmonic shift corresponds to a modification of the distribution of AR from 7.7 ± 0.8 to 6.3 ± 0.6 after 1 h to 6.0 ± 0.6 after 2 h. The transmission electron micrographs reported in [Supporting Information](#) corroborate the validity of this interpretation, and reveal additional details. Upon annealing, the overall shape of the particles becomes smoother, that is, side-walls get flatter

and end-caps get rounder. The loss of AR derives more from an increase in diameter than a decrease in length, so that the average size of the particles seems to grow as in the presence of collective effects, such as Ostwald ripening⁸⁸ or coalescence. The possibility of Ostwald ripening has been evoked by previous authors in the presence of a large excess of surfactant,²⁶ or in the case of ultrasmall particles,²⁷ and will be the subject of our future investigation. The overall dynamics closely resemble the transformation of so-called gold nanodogbones that we found in a poly(vinyl alcohol) film heated to 110 °C²⁵ or of PEGylated gold nanorods constrained in an epoxy resin left at 120 to 220 °C,²⁴ that is, a rather sharp transition followed by a slow stabilization to a smoother intermediate between the initial shape and the spherical limit. Meanwhile, the fraction of spherical particles returned by our optical analysis did not increase over time (see Figure S3 in Supporting Information), which is in disagreement with a mechanism of spheroidization driven by Rayleigh-Plateau instability.

In this context, MBT exerts a significant stabilization of the initial shape. Figure 2 summarizes all optical results together with their decryption in morphological terms. The kind of rapid development that occurs around 45 min for PEGylated particles sets on around 90 min in sample PEG/MBT 1:1 and after more than 2 h in sample PEG/MBT 1:20. For instance, after 1 h at 90 °C, the rearrangement of AR from 7.7 ± 0.8 to 6.3 ± 0.6 seen in sample PEG/MBT 1:0 reduces to 7.5 ± 0.8 in sample PEG/MBT 1:1 and only 7.6 ± 0.8 in 1:20. After 2 h, the drift to 6.0 ± 0.6 in sample PEG/MBT 1:0 compares with 6.0 ± 0.8 in sample PEG/MBT 1:1 and 7.0 ± 0.8 in 1:20. In practice, after 1 h sample PEG/MBT 1:0 lost more than 70% of optical absorbance at its initial peak position, while 1:1 retained more than 96% and 1:20 retained more than 99%. We may say that sample PEG/MBT 1:0 already transitioned but the other two did not. After 2 h, sample PEG/MBT 1:0 lost more than 80%, 1:1 lost more than 70%, while 1:20 still retained more than 70%. Therefore, samples PEG/MBT 1:0 and 1:1 transitioned but 1:20 just began. According to our SERS data, no significant modification in the arrangement of the shell occurred in sample PEG/MBT 1:20 until 150 min of thermal treatment (see Figure S6 in Supporting Information), and so the onset of the deformation does not seem to originate from the desorption of MBT. We hypothesize that the density of facets and defects in gold nanorods grown at ambient conditions may raise the stability of the adsorbate.⁸⁹

From a technological perspective, the conditions applied in the thermal treatment of our samples are too severe to simulate major cases as the optical hyperthermia of cancer, where the typical combination of temperature and time is much milder, and PEGylated gold nanorods are quite enough.^{2,3,33,61} However, in other emerging contexts, such as the use of plasmonic particles in biochemical processes as the polymerase chain reaction,^{90–92} our results may make a substantial impact (see Supporting Information).

We hypothesize that the effect of MBT delays the process of premelting and stabilizes the initial shape through the interplay of different factors. One possible factor is chemical coordination,^{30–32} as it determines the difference between subsurface and surface diffusivity as well as more subtle effects, such as the relative stability of rounder rods.^{22,24} Another relevant factor is the stiffness of the environment,^{21,24} which is regarded as the main player involved in alternative strategies as silanization.^{14,18,24,33} We suggest that the adsorption of small

thiols may synergistically affect both aspects, that is, gold coordination and adlayer stiffness, with a high density of surface atoms tightly pinned to an aromatic shell cooperatively hardened by the effect of π -stacking.^{42–45,48} A similar mechanism was already invoked to explain the effect of small thiols on the mechanical strength of nanoporous gold.⁹³ The steric crowdedness of the organic shell may be another element playing against a loss of surface to volume ratio, as was proposed in the case of polymers as PEG.²⁴ Previous authors have predicted³¹ and observed^{26,27} that a weak adsorbate may enhance the thermal stability of ultrathin gold nanowires and rods by retarding their surface atom diffusivity, and that a stronger and stabler interaction may enhance this effect. Our work suggests that a dense layer of aromatic thiols may represent a viable solution to fulfill this objective. Finally, we emphasize that different elements of our results prove to be very robust and were confirmed in different batches of gold nanorods prepared from the same or alternative synthetic protocols (see Supporting Information): that PEGylated particles undergo a thermal transformation over a few tens of minutes around 90 °C that settles to an intermediate shape between the initial one and the spherical limit and that MBT stabilizes the initial shape and delays its deformation easily by a factor around 3 in time.

Stability of Photoacoustic Conversion. In order to challenge the versatility of our concept in a context of more practical relevance and more established solutions, we verified the use of MBT to enhance the stability of photoacoustic conversion of gold nanorods suspended in an aqueous medium. Here, we exploited a microfluidic setup⁵⁷ to monitor the intensity of the photoacoustic signal versus the fluence of the optical trigger set at a wavelength of 1064 nm. The typical outcome is a linear behavior that persists until the onset of a sublinearity related to a photoinstability.^{57,94} Indeed, the slope of the curve corresponds to the efficiency of photoacoustic conversion, which starts to decrease as the subpopulation of particles that resonate with the optical trigger begins to reshape within the time scale of each pulse. The regime at play is very different from the previous conditions, that is, a time scale in the order of few nanoseconds or shorter, peak temperature up to several hundreds of centigrades,^{15,16} and optical selectivity for the subpopulation of particles with the appropriate shape and instantaneous orientation.^{95,96} However, it is understood that the underlying process is the same, that is, overheating and premelting^{22,23} with the possibility of additional photo-mechanical effects.⁵⁰ Figure 3 displays our results.

In order to analyze our results, we fitted the experimental curves to an empirical model that is the product of a linear trend times a sigmoid function^{18,23} describing the depletion of optical absorbance of the particles. Regardless of the theoretical justification of this model, its use provides an excellent description of the experimental data, and a quantitative tool to identify the onset of the sublinearity. Figure 3b shows the optical fluence that corresponds to a level of loss of efficiency of photoacoustic conversion of 25% of the initial value, consistent with our previous gauge.^{16,18,23} We found an increase from (15 ± 3) mJ/cm² for our PEGylated benchmark to (19 ± 4) mJ/cm² for sample PEG/MBT 1:1 to (30 ± 6) mJ/cm² for 1:20. The effect of MBT in sample PEG/MBT 1:20 is also evident on visual inspection, and amounts to a doubling of damage threshold, which brings our particles to approach relevant MPE limits in the near-infrared window of biological tissue.²⁰ This result is rather surprising, when it is

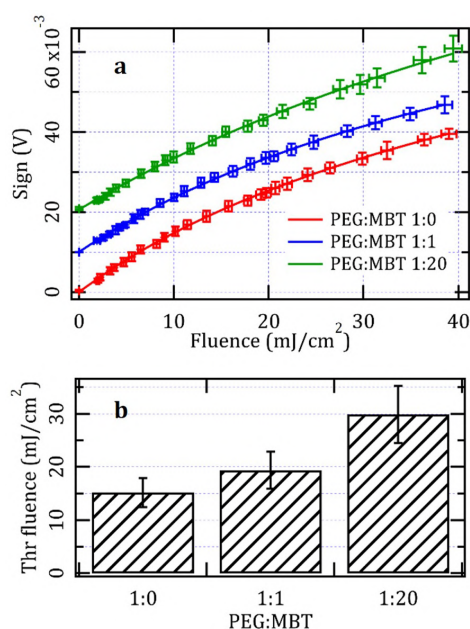


Figure 3. (a) Photoacoustic signal as a function of fluence of the optical trigger for particles prepared with the named mixtures of thiols: dots are experimental values; lines are a fit to an analytical model that accounts for a depletion of optical absorbance. (b) Threshold of fluence of the optical trigger corresponding to a loss of efficiency of photoacoustic conversion by 25%.

considered that an increase of damage threshold by 100% is what we predicted for a shell of organosilica as thick as 10 nm.¹⁸ We hypothesize that the elasticity and self-healing capacity^{97,98} of a dense layer of MBT supporting the deformation and reformation of intermolecular noncovalent interactions⁹⁹ may provide an advantage with respect to a brittle glass as organosilica, where eventual failure probably relates to a photomechanical event of irreversible rupture. In this regime of optical excitation, the effect of density seems to be more prominent than the case of simple annealing at 90 °C for reasons that may belong to the cooperative resistance of the monolayer against desorption.^{42–45,48}

CONCLUSIONS

In conclusion, we have investigated the effect of an aromatic thiol as MBT on the thermal and photostability of gold nanorods. We have treated colloidal suspensions of gold nanorods with mixtures of thiolated PEG and MBT with different molar ratios ranging from pure PEG to PEG/MBT 1:20. During annealing in an oven set at 90 °C, we found a sharp effect of MBT to delay the deformation of gold nanorods, for example, from 45 min to beyond 2 h. For instance, whereas after 1 h particles with PEG alone lost more than 70% of optical absorbance at their initial peak position, those saturated with MBT remained nearly unchanged. This result may enable the introduction of gold nanorods in biochemical processes as the polymerase chain reaction that require thermal annealing at temperatures approaching the boiling point of water over tens of minutes. In addition, we addressed the effect of MBT on the photostability of gold

nanorods irradiated under conditions of interest for photoacoustic imaging. Also, in this case we found a delay of relevant damage thresholds by about a factor of 2, that is, from 15 to 30 mJ/cm², which becomes comparable with MPE constraints at a wavelength of 1064 nm.

In the future, we will address the extension of our findings to other models of small mono-, di-, and multivalent thiols, including the effect of a higher density of thiolated PEG,^{86,87} binary or more complex mixtures, cofactors, or more kinds of soft templates, in order to understand their generality and to pursue their optimization for real-world applications. We are confident that our results will inspire more work to overcome the limitations related to the thermal and photostability of plasmonic tags.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jpcc.0c00737>.

SERS data, additional details; thermal stability of PEGylated gold nanorods, morphological details; thermal stability of MBT-modified gold nanorods, applications in the polymerase chain reaction; thermal stability of MBT-modified gold nanorods, persistence of the shell (PDF)

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

Fulvio Ratto – Istituto di Fisica Applicata “Nello Carrara”, Consiglio Nazionale delle Ricerche, 50019 Sesto Fiorentino (FI), Italy; orcid.org/0000-0001-6721-9486; Phone: +39 0555225307; Email: f.ratto@ifac.cnr.it

Authors

Sonia Centi – Istituto di Fisica Applicata “Nello Carrara”, Consiglio Nazionale delle Ricerche, 50019 Sesto Fiorentino (FI), Italy

Lucia Cavigli – Istituto di Fisica Applicata “Nello Carrara”, Consiglio Nazionale delle Ricerche, 50019 Sesto Fiorentino (FI), Italy; orcid.org/0000-0002-6279-8869

Claudia Borri – Istituto di Fisica Applicata “Nello Carrara”, Consiglio Nazionale delle Ricerche, 50019 Sesto Fiorentino (FI), Italy

Alessio Milanese – Istituto di Fisica Applicata “Nello Carrara”, Consiglio Nazionale delle Ricerche, 50019 Sesto Fiorentino (FI), Italy; Dipartimento di Chimica “Ugo Schiff”, Università degli Studi di Firenze, 50019 Sesto Fiorentino (FI), Italy

Martina Banchelli – Istituto di Fisica Applicata “Nello Carrara”, Consiglio Nazionale delle Ricerche, 50019 Sesto Fiorentino (FI), Italy

Sofia Chioccioli – Dipartimento di Biologia, Università degli Studi di Firenze, 50019 Sesto Fiorentino (FI), Italy

Boris N. Khlebtsov – Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Saratov 410049, Russia; orcid.org/0000-0003-3996-5750

Nikolai G. Khlebtsov – Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Saratov 410049, Russia; Saratov State University, Saratov 410026, Russia; orcid.org/0000-0002-2055-7784

Paolo Matteini – Istituto di Fisica Applicata “Nello Carrara”, Consiglio Nazionale delle Ricerche, 50019 Sesto Fiorentino (FI), Italy; orcid.org/0000-0002-8488-5867

Patrizia Bogani – Dipartimento di Biologia, Università degli Studi di Firenze, 50019 Sesto Fiorentino (FI), Italy

Roberto Pini – Istituto di Fisica Applicata “Nello Carrara”, Consiglio Nazionale delle Ricerche, 50019 Sesto Fiorentino (FI), Italy

Complete contact information is available at:
<https://pubs.acs.org/10.1021/acs.jpcc.0c00737>

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

This work was partially supported by a collaborative grant from National Research Council Italy and Russian Foundation for Basic Research (18-52-7803, “HYPNOSYs”) and by Regione Toscana within Project “SENSOGM”.

■ REFERENCES

- (1) Hu, M.; Chen, J.; Li, Z.-Y.; Au, L.; Hartland, G. V.; Li, X.; Marquez, M.; Xia, Y. Gold Nanostructures: Engineering Their Plasmonic Properties for Biomedical Applications. *Chem. Soc. Rev.* **2006**, *35*, 1084–1094.
- (2) Jain, P. K.; Huang, X.; El-Sayed, I. H.; El-Sayed, M. A. Noble Metals on the Nanoscale: Optical and Photothermal Properties and Some Applications in Imaging, Sensing, Biology, and Medicine. *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 1578–1586.
- (3) Huang, X.; Neretina, S.; El-Sayed, M. A. Gold Nanorods: From Synthesis and Properties to Biological and Biomedical Applications. *Adv. Mater.* **2009**, *21*, 4880–4910.
- (4) Dreaden, E. C.; Alkilany, A. M.; Huang, X.; Murphy, C. J.; El-Sayed, M. A. The Golden Age: Gold Nanoparticles for Biomedicine. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 2740–2779.
- (5) Dykman, L.; Khlebtsov, N. Gold Nanoparticles in Biomedical Applications: Recent Advances and Perspectives. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 2256–2282.
- (6) Dykman, L. A.; Khlebtsov, N. G. Gold Nanoparticles in Chemo-, Immuno-, and Combined Therapy: Review [Invited]. *Biomed. Opt. Express* **2019**, *10*, 3152–3182.
- (7) Kim, K.; Huang, S.-W.; Ashkenazi, S.; O'Donnell, M.; Agarwal, A.; Kotov, N. A.; Denny, M. F.; Kaplan, M. J. Photoacoustic Imaging of Early Inflammatory Response Using Gold Nanorods. *Appl. Phys. Lett.* **2007**, *90*, 223901.
- (8) Wang, L. V. Multiscale Photoacoustic Microscopy and Computed Tomography. *Nat. Photonics* **2009**, *3*, 503–509.
- (9) Lu, W.; Huang, Q.; Ku, G.; Wen, X.; Zhou, M.; Guzatov, D.; Brecht, P.; Su, R.; Oraevsky, A.; Wang, L. V.; et al. Photoacoustic Imaging of Living Mouse Brain Vasculature Using Hollow Gold Nanospheres. *Biomaterials* **2010**, *31*, 2617–2626.
- (10) Li, P.-C.; Huang, S.-W.; Wei, C.-W.; Chiou, Y.-C.; Chen, C.-D.; Wang, C.-R. C. Photoacoustic Flow Measurements by Use of Laser-Induced Shape Transitions of Gold Nanorods. *Opt. Lett.* **2005**, *30*, 3341–3343.
- (11) Zharov, V. P.; Galanzha, E. I.; Shashkov, E. V.; Khlebtsov, N. G.; Tuchin, V. V. In Vivo Photoacoustic Flow Cytometry for Monitoring of Circulating Single Cancer Cells and Contrast Agents. *Opt. Lett.* **2006**, *31*, 3623–3625.
- (12) Pérez-Juste, J.; Rodríguez-González, B.; Mulvaney, P.; Liz-Marzán, L. Optical Control and Patterning of Gold-Nanorod-Poly(vinyl alcohol) Nanocomposite Films. *Adv. Funct. Mater.* **2005**, *15*, 1065–1071.
- (13) Petrova, H.; Perez Juste, J.; Pastoriza-Santos, I.; Hartland, G. V.; Liz-Marzán, L. M.; Mulvaney, P. On the Temperature Stability of Gold Nanorods: Comparison Between Thermal and Ultrafast Laser-Induced Heating. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2006**, *8*, 814–821.
- (14) Chen, Y.-S.; Frey, W.; Kim, S.; Homan, K.; Kruizinga, P.; Sokolov, K.; Emelianov, S. Enhanced Thermal Stability of Silica-Coated Gold Nanorods for Photoacoustic Imaging and Image-Guided Therapy. *Opt. Express* **2010**, *18*, 8867–8878.
- (15) Chen, X.; Chen, Y.; Yan, M.; Qiu, M. Nanosecond Photothermal Effects in Plasmonic Nanostructures. *ACS Nano* **2012**, *6*, 2550–2557.
- (16) Cavigli, L.; de Angelis, M.; Ratto, F.; Matteini, P.; Rossi, F.; Centi, S.; Fusi, F.; Pini, R. Size Affects the Stability of the Photoacoustic Conversion of Gold Nanorods. *J. Phys. Chem. C* **2014**, *118*, 16140–16146.
- (17) Moon, H.; Kumar, D.; Kim, H.; Sim, C.; Chang, J.-H.; Kim, J.-M.; Kim, H.; Lim, D.-K. Amplified Photoacoustic Performance and Enhanced Photothermal Stability of Reduced Graphene Oxide Coated Gold Nanorods for Sensitive Photoacoustic Imaging. *ACS Nano* **2015**, *9*, 2711–2719.
- (18) Lai, S.; Centi, S.; Borri, C.; Ratto, F.; Cavigli, L.; Micheletti, F.; Kemper, B.; Ketelhut, S.; Kozyreva, T.; Gonnelli, L.; et al. A Multifunctional Organosilica Cross-Linker for the Bio-Conjugation of Gold Nanorods. *Colloids Surf., B* **2017**, *157*, 174–181.
- (19) Chen, Y.-S.; Zhao, Y.; Yoon, S. J.; Gambhir, S. S.; Emelianov, S. Miniature Gold Nanorods for Photoacoustic Molecular Imaging in the Second Near-Infrared Optical Window. *Nat. Nanotechnol.* **2019**, *14*, 465–472.
- (20) American National Standard for Safe Use of Lasers; Laser Institute of America, ANSI: New York, 2014.
- (21) Zhang, Q.; Xia, Z.; Cheng, Y.-B.; Gu, M. High-Capacity Optical Long Data Memory Based on Enhanced Young's Modulus in Nanoplasmonic Hybrid Glass Composites. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 1183.
- (22) Taylor, A. B.; Siddiquee, A. M.; Chon, J. W. M. Below Melting Point Photothermal Reshaping of Single Gold Nanorods Driven by Surface Diffusion. *ACS Nano* **2014**, *8*, 12071–12079.
- (23) Cavigli, L.; Cini, A.; Centi, S.; Borri, C.; Lai, S.; Ratto, F.; de Angelis, M.; Pini, R. Photostability of Gold Nanorods upon Endosomal Confinement in Cultured Cells. *J. Phys. Chem. C* **2017**, *121*, 6393–6400.
- (24) Kennedy, W. J.; Izor, S.; Anderson, B. D.; Frank, G.; Varshney, V.; Ehler, G. J. Thermal Reshaping Dynamics of Gold Nanorods: Influence of Size, Shape, and Local Environment. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2018**, *10*, 43865–43873.
- (25) Ratto, F.; Matteini, P.; Cini, A.; Centi, S.; Rossi, F.; Fusi, F.; Pini, R. CW Laser-Induced Photothermal Conversion and Shape Transformation of Gold Nanodogbones in Hydrated Chitosan Films. *J. Nanopart. Res.* **2011**, *13*, 4337–4348.
- (26) Zou, R.; Zhang, Q.; Zhao, Q.; Peng, F.; Wang, H.; Yu, H.; Yang, J. Thermal Stability of Gold Nanorods in an Aqueous Solution. *Colloids Surf., A* **2010**, *372*, 177–181.
- (27) Takahata, R.; Yamazoe, S.; Warakulwit, C.; Limtrakul, J.; Tsukuda, T. Rayleigh Instability and Surfactant-Mediated Stabilization of Ultrathin Gold Nanorods. *J. Phys. Chem. C* **2016**, *120*, 17006–17010.
- (28) Nichols, F. A.; Mullins, W. W. Surface (Interface) and Volume Diffusion Contributions to Morphological Changes Driven by Capillarity. *Trans. Metal. Soc. AIME* **1965**, *233*, 1840–1847.
- (29) Karim, S.; Toimil-Molares, M. E.; Balogh, A. G.; Ensinger, W.; Cornelius, T. W.; Khan, E. U.; Neumann, R. Morphological Evolution of Au Nanowires Controlled by Rayleigh Instability. *Nanotechnology* **2006**, *17*, 5954–5959.
- (30) Jaklevic, R. C.; Elie, L. Scanning-Tunneling-Microscope Observation of Surface Diffusion on an Atomic Scale: Au on Au(111). *Phys. Rev. Lett.* **1988**, *60*, 120–123.
- (31) Huber, S. E.; Warakulwit, C.; Limtrakul, J.; Tsukuda, T.; Probst, M. Thermal Stabilization of Thin Gold Nanowires by Surfactant-Coating: A Molecular Dynamics Study. *Nanoscale* **2012**, *4*, 585–590.
- (32) He, X.; Cheng, F.; Chen, Z. The Lattice Kinetic Monte Carlo Simulation of Atomic Diffusion and Structural Transition for Gold. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 33128.
- (33) Moreira, A. F.; Rodrigues, C. F.; Reis, C. A.; Costa, E. C.; Correia, I. J. Gold-Core Silica Shell Nanoparticles Application in

- Imaging and Therapy: A Review. *Microporous Mesoporous Mater.* **2018**, *270*, 168–179.
- (34) Mazzoni, M.; Dagar, J.; Lai, S.; Centi, S.; Ratto, F.; Pini, R.; Zani, L. Transformed Double-Capped Gold Nanorods in Dye Co-Sensitized Solar Cells for Semitransparent Windows. *Curr. Nanosci.* **2019**, *15*, 309–318.
- (35) Yang, X.; Liu, X.; Liu, Z.; Pu, F.; Ren, J.; Qu, X. Near-Infrared Light-Triggered, Targeted Drug Delivery to Cancer Cells by Aptamer Gated Nanovehicles. *Adv. Mater.* **2012**, *24*, 2890–2895.
- (36) Zhang, Z.; Wang, L.; Wang, J.; Jiang, X.; Li, X.; Hu, Z.; Ji, Y.; Wu, X.; Chen, C. Mesoporous Silica-Coated Gold Nanorods as a Light-Mediated Multifunctional Theranostic Platform for Cancer Treatment. *Adv. Mater.* **2012**, *24*, 1418–1423.
- (37) Huang, Y.; Rosei, F.; Vetrone, F. A Single Multifunctional Nanoparticle Based on Upconversion Luminescence and Gold Nanorods. *Nanoscale* **2015**, *7*, 5178–5185.
- (38) Love, J. C.; Estroff, L. A.; Kriebel, J. K.; Nuzzo, R. G.; Whitesides, G. M. Self-Assembled Monolayers of Thiolates on Metals as a Form of Nanotechnology. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 1103–1170.
- (39) Jadzinsky, P. D.; Calero, G.; Ackerson, C. J.; Bushnell, D. A.; Kornberg, R. D. Structure of a Thiol Monolayer-Protected Gold Nanoparticle at 1.1 Å Resolution. *Science* **2007**, *318*, 430–433.
- (40) Vericat, C.; Vela, M. E.; Benitez, G.; Carro, P.; Salvarezza, R. C. Self-Assembled Monolayers of Thiols and Dithiols on Gold: New Challenges for a Well-Known System. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1805–1834.
- (41) Schlenoff, J. B.; Li, M.; Ly, H. Stability and Self-Exchange in Alkanethiol Monolayers. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 12528–12536.
- (42) Murty, K. V. G. K.; Venkataramanan, M.; Pradeep, T. Self-assembled Monolayers of 1,4-Benzenedimethanethiol on Polycrystalline Silver and Gold Films: An Investigation of Structure, Stability, Dynamics, and Reactivity. *Langmuir* **1998**, *14*, 5446–5456.
- (43) Bandyopadhyay, K.; Vijayamohan, K.; Venkataramanan, M.; Pradeep, T. Self-Assembled Monolayers of Small Aromatic Disulfide and Diselenide Molecules on Polycrystalline Gold Films: A Comparative Study of the Geometrical Constraint Using Temperature-Dependent Surface-Enhanced Raman Spectroscopy, X-ray Photoelectron Spectroscopy, and Electrochemistry. *Langmuir* **1999**, *15*, 5314–5322.
- (44) Wan, L.-J.; Terashima, M.; Noda, H.; Osawa, M. Molecular Orientation and Ordered Structure of Benzenethiol Adsorbed on Gold(111). *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 3563–3569.
- (45) Garg, N.; Carrasquillo-Molina, E.; Lee, T. R. Self-Assembled Monolayers Composed of Aromatic Thiols on Gold: Structural Characterization and Thermal Stability in Solution. *Langmuir* **2002**, *18*, 2717–2726.
- (46) Cristina, L. J.; Ruano, G.; Salvarezza, R.; Ferrón, J. Thermal Stability of Self-Assembled Monolayers of n-Hexanethiol on Au(111)-(1 × 1) and Au(001)-(1 × 1). *J. Phys. Chem. C* **2017**, *121*, 27894–27904.
- (47) Rittikulsittichai, S.; Park, C. S.; Jamison, A. C.; Rodríguez, D.; Zenasni, O.; Lee, T. R. Bidentate Aromatic Thiols on Gold: New Insight Regarding the Influence of Branching on the Structure, Packing, Wetting, and Stability of Self-Assembled Monolayers on Gold Surfaces. *Langmuir* **2017**, *33*, 4396–4406.
- (48) Verwüster, E.; Wruss, E.; Zojer, E.; Hofmann, O. T. Exploring the Driving Forces Behind the Structural Assembly of Biphenylthiolates on Au(111). *J. Chem. Phys.* **2017**, *147*, 024706.
- (49) Vigderman, L.; Zubarev, E. R. High-Yield Synthesis of Gold Nanorods with Longitudinal SPR Peak Greater than 1200 nm Using Hydroquinone as a Reducing Agent. *Chem. Mater.* **2013**, *25*, 1450–1457.
- (50) Cavigli, L.; Centi, S.; Borri, C.; Tortoli, P.; Panettieri, I.; Streit, I.; Ciofini, D.; Magni, G.; Rossi, F.; Siano, S.; et al. 1064-nm-Resonant Gold Nanorods for Photoacoustic Theranostics Within Permissible Exposure Limits. *J. Biophotonics* **2019**, *12*, e201900082.
- (51) Tatini, F.; Landini, I.; Scaletti, F.; Massai, L.; Centi, S.; Ratto, F.; Nobili, S.; Romano, G.; Fusi, F.; Messori, L.; et al. Size Dependent Biological Profiles of PEGylated Gold Nanorods. *J. Mater. Chem. B* **2014**, *2*, 6072–6080.
- (52) Centi, S.; Tatini, F.; Ratto, F.; Gnerucci, A.; Mercatelli, R.; Romano, G.; Landini, I.; Nobili, S.; Ravalli, A.; Marrazza, G. In Vitro Assessment of Antibody-Conjugated Gold Nanorods for Systemic Injections. *J. Nanobiotechnol.* **2014**, *12*, 55.
- (53) Pérez-Juste, J.; Pastoriza-Santos, I.; Liz-Marzán, L. M.; Mulvaney, P. Gold Nanorods: Synthesis, Characterization and Applications. *Coord. Chem. Rev.* **2005**, *249*, 1870–1901.
- (54) Ratto, F.; Witort, E.; Tatini, F.; Centi, S.; Lazzeri, L.; Carta, F.; Lulli, M.; Vullo, D.; Fusi, F.; Supuran, C. T.; et al. Plasmonic Particles that Hit Hypoxic Cells. *Adv. Funct. Mater.* **2015**, *25*, 316–323.
- (55) Khlebtsov, B.; Khanadeev, V.; Pylaev, T.; Khlebtsov, N. A New T-Matrix Solvable Model for Nanorods: TEM-Based Ensemble Simulations Supported by Experiments. *J. Phys. Chem. C* **2011**, *115*, 6317–6323.
- (56) Matteini, P.; Cottat, M.; Tavanti, F.; Panfilova, E.; Scuderi, M.; Nicotra, G.; Menziani, M. C.; Khlebtsov, N.; de Angelis, M.; Pini, R. Site-Selective Surface-Enhanced Raman Detection of Proteins. *ACS Nano* **2017**, *11*, 918–926.
- (57) Cavigli, L.; Micheletti, F.; Tortoli, P.; Centi, S.; Lai, S.; Borri, C.; Rossi, F.; Ratto, F.; Pini, R. Light Activated Microbubbles for Imaging and Microsurgery **2017**, *10064*, 744–750.
- (58) Nedosekin, D. A.; Fahmi, T.; Nima, Z. A.; Nolan, J.; Cai, C.; Sarimollaoglu, M.; Dervishi, E.; Basnakian, A.; Biris, A. S.; Zharov, V. P. Photoacoustic Flow Cytometry for Nanomaterial Research. *Photoacoustics* **2017**, *6*, 16–25.
- (59) Frigenti, G.; Cavigli, L.; Fernández-Bienes, A.; Ratto, F.; Centi, S.; García-Fernández, T.; Nunzi Conti, G.; Soria, S. Resonant Microbubble as a Microfluidic Stage for All-Optical Photoacoustic Sensing. *Phys. Rev. Appl.* **2019**, *12*, 014062.
- (60) Niidome, T.; Yamagata, M.; Okamoto, Y.; Akiyama, Y.; Takahashi, H.; Kawano, T.; Katayama, Y.; Niidome, Y. PEG-Modified Gold Nanorods with a Stealth Character for in Vivo Applications. *J. Controlled Release* **2006**, *114*, 343–347.
- (61) von Maltzahn, G.; Park, J.-H.; Agrawal, A.; Bandaru, N. K.; Das, S. K.; Sailor, M. J.; Bhatia, S. N. Computationally Guided Photothermal Tumor Therapy Using Long-Circulating Gold Nanorod Antennas. *Cancer Res.* **2009**, *69*, 3892–3900.
- (62) Centi, S.; Ratto, F.; Tatini, F.; Lai, S.; Pini, R. Ready-to-Use Protein G-Conjugated Gold Nanorods for Biosensing and Biomedical Applications. *J. Nanobiotechnol.* **2018**, *16*, 5.
- (63) Nara, J.; Higai, S.; Morikawa, Y.; Ohno, T. Density Functional Theory Investigation of Benzenethiol Adsorption on Au(111). *J. Chem. Phys.* **2004**, *120*, 6705–6711.
- (64) Seo, K.; Borguet, E. Potential-Induced Structural Change in a Self-Assembled Monolayer of 4-Methylbenzenethiol on Au(111). *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111*, 6335–6342.
- (65) Kuzumoto, Y.; Kitamura, M. Work Function of Gold Surfaces Modified Using Substituted Benzenethiols: Reaction Time Dependence and Thermal Stability. *Appl. Phys. Express* **2014**, *7*, 035701.
- (66) Zeng, C.; Chen, Y.; Kirschbaum, K.; Lambright, K. J.; Jin, R. Emergence of Hierarchical Structural Complexities in Nanoparticles and Their Assembly. *Science* **2016**, *354*, 1580–1584.
- (67) Banchelli, M.; Amicucci, C.; Ruggiero, E.; D'Andrea, C.; Cottat, M.; Ciofini, D.; Osticioli, I.; Ghini, G.; Siano, S.; Pini, R.; et al. Spot-on SERS Detection of Biomolecules with Laser-Patterned Dot Arrays of Assembled Silver Nanowires. *ChemNanoMat* **2019**, *5*, 1036–1043.
- (68) Khlebtsov, B. N.; Bratashov, D. N.; Khlebtsov, N. G. Tip-Functionalized Au@Ag Nanorods as Ultrabright Surface-Enhanced Raman Scattering Probes for Bioimaging in Off-Resonance Mode. *J. Phys. Chem. C* **2018**, *122*, 17983–17993.
- (69) Khlebtsov, B. N.; Bratashov, D. N.; Byzova, N. A.; Dzantiev, B. B.; Khlebtsov, N. G. SERS-Based Lateral Flow Immunoassay of Troponin I by Using Gap-Enhanced Raman Tags. *Nano Res.* **2019**, *12*, 413–420.
- (70) Rycenga, M.; Xia, X.; Moran, C. H.; Zhou, F.; Qin, D.; Li, Z.-Y.; Xia, Y. Generation of Hot Spots with Silver Nanocubes for Single-

Molecule Detection by Surface-Enhanced Raman Scattering. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2011**, *50*, 5473–5477.

(71) Lu, G.; Shrestha, B.; Haes, A. J. Importance of Tilt Angles of Adsorbed Aromatic Molecules on Nanoparticle Rattle SERS Substrates. *J. Phys. Chem. C* **2016**, *120*, 20759–20767.

(72) Carron, K. T.; Hurley, L. G. Axial and Azimuthal Angle Determination with Surface-Enhanced Raman Spectroscopy: Thiophenol on Copper, Silver, and Gold Metal Surfaces. *J. Phys. Chem.* **1991**, *95*, 9979–9984.

(73) Szafranski, C. A.; Tanner, W.; Laibinis, P. E.; Garrell, R. L. Surface-Enhanced Raman Spectroscopy of Aromatic Thiols and Disulfides on Gold Electrodes. *Langmuir* **1998**, *14*, 3570–3579.

(74) Holze, R. The Adsorption of Thiophenol on Gold – a Spectroelectrochemical Study. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2015**, *17*, 21364–21372.

(75) Varsanyi, G.; Láng, L. *Assignments for Vibrational Spectra of Seven Hundred Benzene Derivatives*; Wiley: New York, 1974.

(76) Yoon, J. H.; Park, J. S.; Yoon, S. Time-Dependent and Symmetry-Selective Charge-Transfer Contribution to SERS in Gold Nanoparticle Aggregates. *Langmuir* **2009**, *25*, 12475–12480.

(77) Ye, J.; Hutchison, J. A.; Uji-i, H.; Hofkens, J.; Lagae, L.; Maes, G.; Borghs, G.; Van Dorpe, P. Excitation Wavelength Dependent Surface Enhanced Raman Scattering of 4-Aminothiophenol on Gold Nanorings. *Nanoscale* **2012**, *4*, 1606–1611.

(78) Goldmann, C.; Lazzari, R.; Paquez, X.; Boissière, C.; Ribot, F.; Sanchez, C.; Chanéac, C.; Portehault, D. Charge Transfer at Hybrid Interfaces: Plasmonics of Aromatic Thiol-Capped Gold Nanoparticles. *ACS Nano* **2015**, *9*, 7572–7582.

(79) Levin, C. S.; Bishnoi, S. W.; Grady, N. K.; Halas, N. J. Determining the Conformation of Thiolated Poly(ethylene glycol) on Au Nanoshells by Surface-Enhanced Raman Scattering Spectroscopic Assay. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 3277–3281.

(80) Niidome, T.; Ohga, A.; Akiyama, Y.; Watanabe, K.; Niidome, Y.; Mori, T.; Katayama, Y. Controlled Release of PEG Chain from Gold Nanorods: Targeted Delivery to Tumor. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 4453–4458.

(81) Mazzoni, M.; Ratto, F.; Fortunato, C.; Centi, S.; Tatini, F.; Pini, R. Partial Decoupling in Aggregates of Silanized Gold Nanorods. *J. Phys. Chem. C* **2014**, *118*, 20018–20025.

(82) Zhang, Z.; Lin, M. Fast Loading of PEG–SH on CTAB-Protected Gold Nanorods. *RSC Adv.* **2014**, *4*, 17760–17767.

(83) Tebbe, M.; Kuttner, C.; Männel, M.; Fery, A.; Chanana, M. Colloidally Stable and Surfactant-Free Protein-Coated Gold Nanorods in Biological Media. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**, *7*, 5984–5991.

(84) Leonov, A. P.; Zheng, J.; Clogston, J. D.; Stern, S. T.; Patri, A. K.; Wei, A. Detoxification of Gold Nanorods by Treatment with Polystyrenesulfonate. *ACS Nano* **2008**, *2*, 2481–2488.

(85) Boca, S. C.; Astilean, S. Detoxification of Gold Nanorods by Conjugation with Thiolated Poly(ethylene glycol) and Their Assessment as SERS-Active Carriers of Raman Tags. *Nanotechnology* **2010**, *21*, 235601.

(86) Kinnear, C.; Dietsch, H.; Clift, M. J. D.; Endes, C.; Rothen-Rutishauser, B.; Petri-Fink, A. Gold Nanorods: Controlling Their Surface Chemistry and Complete Detoxification by a Two-Step Place Exchange. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2013**, *52*, 1934–1938.

(87) Ruff, J.; Steitz, J.; Buchkremer, A.; Noyong, M.; Hartmann, H.; Besmehn, A.; Simon, U. Multivalency of PEG-Thiol Ligands Affects the Stability of NIR-Absorbing Hollow Gold Nanospheres and Gold Nanorods. *J. Mater. Chem. B* **2016**, *4*, 2828–2841.

(88) Voorhees, P. W. The Theory of Ostwald Ripening. *J. Stat. Phys.* **1985**, *38*, 231–252.

(89) Cortés, E.; Rubert, A. A.; Benitez, G.; Carro, P.; Vela, M. E.; Salvarezza, R. C. Enhanced Stability of Thiolate Self-Assembled Monolayers (SAMs) on Nanostructured Gold Substrates. *Langmuir* **2009**, *25*, 5661–5666.

(90) Li, M.; Lin, Y.-C.; Wu, C.-C.; Liu, H.-S. Enhancing the Efficiency of a PCR Using Gold Nanoparticles. *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, e184–e184.

(91) Vanzha, E.; Pylaev, T.; Khanadeev, V.; Konnova, S.; Fedorova, V.; Khlebtsov, N. Gold Nanoparticle-Assisted Polymerase Chain Reaction: Effects of Surface Ligands, Nanoparticle Shape and Material. *RSC Adv.* **2016**, *6*, 110146–110154.

(92) Roche, P. J. R.; Najih, M.; Lee, S. S.; Beitel, L. K.; Carnevale, M. L.; Paliouras, M.; Kirk, A. G.; Trifiro, M. A. Real Time Plasmonic qPCR: How Fast is Ultra-Fast? 30 Cycles in 54 Seconds. *Analyst* **2017**, *142*, 1746–1755.

(93) Mameka, N.; Lühns, L.; Heissler, S.; Gliemann, H.; Wöll, C. Tailoring the Strength of Nanoporous Gold by Self-Assembled Monolayers of Alkanethiols. *ACS Appl. Nano Mater.* **2018**, *1*, 6613–6621.

(94) Knights, O. B.; Ye, S.; Ingram, N.; Freear, S.; McLaughlan, J. R. Optimising Gold Nanorods for Photoacoustic Imaging in Vitro. *Nanoscale Adv.* **2019**, *1*, 1472–1481.

(95) Zijlstra, P.; Chon, J. W. M.; Gu, M. Five-Dimensional Optical Recording Mediated by Surface Plasmons in Gold Nanorods. *Nature* **2009**, *459*, 410–3.

(96) Zharov, V. P. Ultrasharp Nonlinear Photothermal and Photoacoustic Resonances and Holes Beyond the Spectral Limit. *Nat. Photonics* **2011**, *5*, 110–116.

(97) Rytchinski, B. Adaptive Supramolecular Nanomaterials Based on Strong Noncovalent Interactions. *ACS Nano* **2011**, *5*, 6791–6818.

(98) Meltzer, C.; Paul, J.; Dietrich, H.; Jäger, C. M.; Clark, T.; Zahn, D.; Braunschweig, B.; Peukert, W. Indentation and Self-Healing Mechanisms of a Self-Assembled Monolayer—A Combined Experimental and Modeling Study. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 10718–10727.

(99) Tuncaboylu, D. C.; Sari, M.; Oppermann, W.; Okay, O. Tough and Self-Healing Hydrogels Formed via Hydrophobic Interactions. *Macromolecules* **2011**, *44*, 4997–5005.

SUPPORTING INFORMATION

Small Thiols Stabilize the Shape of Gold Nanorods

Sonia Centi,[†] Lucia Cavigli,[†] Claudia Borri,[†] Alessio Milanesi,^{‡,§} Martina Banchelli,[†] Sofia Chioccioli,[‡] Boris N. Khlebtsov,[¶] Nikolai G. Khlebtsov,^{¶,||} Paolo Matteini,[†] Patrizia Bogani,[‡]
Fulvio Ratto,^{*,†} and Roberto Pini[†]

[†]Istituto di Fisica Applicata ‘Nello Carrara’, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Via Madonna del Piano, 10, 50019 Sesto Fiorentino (FI), Italy

[‡]Dipartimento di Biologia, Università degli Studi di Firenze, Via Madonna del Piano, 6, 50019 Sesto Fiorentino (FI), Italy

[¶]Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, 13 Prospekt Entuziastov, Saratov 410049, Russia

[§]Dipartimento di Chimica ‘Ugo Schiff’, Università degli Studi di Firenze, Via della Lastruccia, 3-13, 50019 Sesto Fiorentino (FI), Italy

^{||}Saratov State University, 83 Ulitsa Astrakhanskaya, Saratov 410026, Russia

E-mail: f.ratto@ifac.cnr.it

Phone: +39 0555225307

SERS data: additional details

Table S1 reports the assignment of the peaks found in the Raman spectra of MBT-modified gold nanorods, according to Varsanyi and Lang and references therein.¹

Mode assignment	Raman shift (cm ⁻¹)	Symmetry
ν (C-S) + β (C-C-C)	385	A1
γ (C-C-C)	482	B1
β (C-C-C)	621	A1
γ (C-C-C)	663	B1
β (C-C-C) + ν (C-S)	785	A1
β (C-H)	1012	A1
ν (C-S) + β (C-C-C)	1076	A1
β (C-H)	1180	A1
β (C-H)	1372	B2
ν (C-C)	1593	A1
ν (CH ₃)	2857	-
ν (CH ₃)	2908	-
ν (C-H)	3044	A1

Table S1: Assignment of Raman peaks for MBT

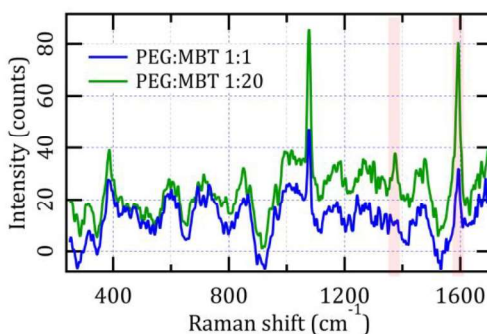


Figure S1: Raman spectra of samples PEG:MBT 1:1 and 1:20 acquired at a wavelength of 532 nm. The pink bands highlight the features at peak position of 1372 and 1593 cm⁻¹.

Figure S1 displays Raman spectra acquired at 532 nm, which emphasizes the oscillations associated to charge transfer from gold to MBT around 1372 and 1593 cm⁻¹, according to the reference literature.^{2,3,4} We found a significant increase of these contributions when the relative dose of MBT increased from PEG:MBT 1:1 to 1:20.

Instead, Figure S2 reveals additional details of sample PEG:MBT 1:0. The low level of the Raman signals from cetrimonium bromide, i.e. the strong peak of the Au-Br stretch near 200 cm^{-1} , the peak of the trimethylammonium headgroup at 763 cm^{-1} , the typical bands of the CN group at 1061 cm^{-1} and 1127 cm^{-1} and of the skeletal chain (CC, CH₂) at 1295 cm^{-1} and 1460 cm^{-1} ,^{5,6,7} suggests that the protocols implemented for PEGylation and purification of the particles in an acetate buffer containing polysorbate 20 provide an effective solution for its replacement.

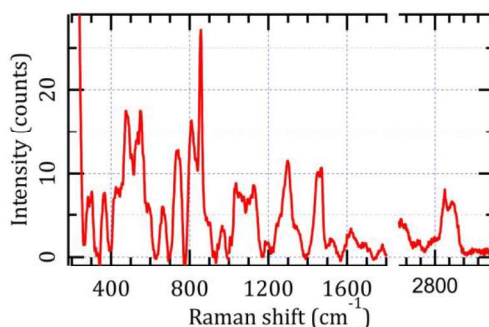


Figure S2: Raman spectrum of sample PEG:MBT 1:0 acquired at a wavelength of 785 nm of laser excitation.

Thermal stability of PEGylated gold nanorods: morphological details

As an additional outcome of the optical analysis reported in Figure 2 of the main text, Figure S3 shows the trend of the fraction of quasi-spherical byproducts in sample PEG:MBT 1:0. In practice, this parameter does not exhibit any significant variation with incubation time in an oven set at 90°C , and suggests a mechanism of gradual reshaping that does not entail the generation of spherical particles.

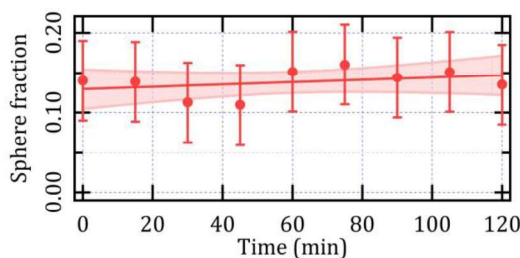


Figure S3: Volumetric fraction of spherical byproducts as a function of incubation time in an oven set at 90°C for sample PEG:MBT 1:0. The red line and pink band represent a linear fit and relevant confidence interval at 95%. On average, the incidence of spherical particles increases by $(0.01 \pm 0.03)\% \text{ min}^{-1}$.

We repeated, in our labs in IBPPM (Saratov, Russia), some of the experiments reported in the main text, which were carried out in our labs in CNR (Sesto Fiorentino, Italy). We note that the nominal protocols implemented for the synthesis and PEGylation of the particles were the same, but subtle differences in the available labware and kinetic conditions, together with the usual batch-to-batch variability, concurred to return a different product. In particular, the batch reported hereafter contained particles that were on average larger and slightly less prolate than those described in the main text. We capitalized on these differences in order to test the robustness of our findings, and to acquire transmission electron micrographs of a quality sufficient to cross-validate the model used to retrieve the shape of the particles from their optical spectra, and to gain more morphological details. Figure S4 is a collection of transmission electron micrographs, spectra of optical extinction, and their numerical decryption in terms of distributions of aspect ratio (AR, or ratio of length to diameter) for particles treated under different conditions.

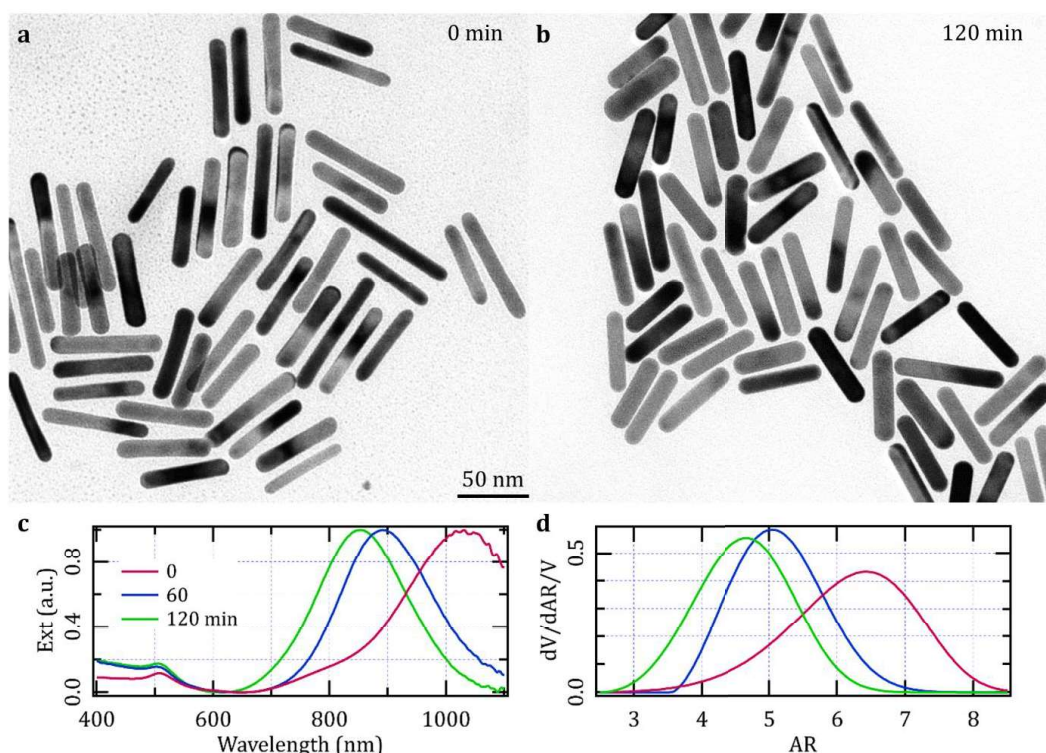


Figure S4: (a) and (b) show representative transmission electron micrographs of PEGylated particles before and after annealing at 90°C for two hours, respectively; (c) displays spectra of optical extinction and (d) their deconvolution in terms of distributions of AR for PEGylated particles left at 90°C for the named intervals.

Consistent with the results reported in the main text, we found that PEGylated gold nanorods left in an oven at 90°C undergo a significant transformation that mostly develops within the first hour and then apparently slowly settles to a configuration intermediate between the initial one and the spherical limit. In this case, our numerical analysis of the optical spectra returns a distribution of aspect ratio that starts from 6.2 ± 0.9 , and then evolves to 5.1 ± 0.7 after one hour and 4.6 ± 0.7 after two hours. According to our transmission electron micrographs, after two hours at 90°C, particles became shorter from an average of 76 to 72 nm and thicker from an average of 12.6 to 16 nm. Thus, their mean aspect ratio decreased from 6.0 to 4.5, which is in good agreement with the optical analysis based on Mie-Gans model. The increase in diameter is more important and only partially compensated by the decrease in length, so that the average size of the particles seems to increase by as much as 50%. At present, we lack an explanation for this finding, which is rather surprising and evokes the possibility of inter-particle exchanges, such as those involved in Ostwald ripening or coalescence. However, the investigation of this phenomenon would

bring us too far from the scope of this work, which is to address the stabilization of gold nanorods by the use of aromatic thiols. Instead, we also found that the shape of the particles became smoother after treatment with flatter side-walls and rounder end-caps, which may contribute to establish an intermediate shape enjoying sufficient stability to withstand additional annealing. This interpretation is consistent with that reported in our previous work on the thermal stability of so-called gold nanodogbones or nanodumbbells.⁸

Thermal stability of MBT-modified gold nanorods: applications in the polymerase chain reaction

The need to sustain temperatures in the order of 90°C for intervals in the order of several tens of minutes holds little relevance in major contexts as the optical hyperthermia of cancer. However, there are emerging other applications where the stabilization of gold nanorods in this regime of conditions may be critical. One such example is the integration of gold nanorods in biochemical processes as the polymerase chain reaction (PCR) for the amplification of genetic material for a broad variety of purposes. PCR requires thermal cycling of a complex mixture of biochemicals between a so-called denaturation temperature, an annealing temperature and an extension temperature, where typical values are 95, 55 and 72°C, respectively. Each cycle almost doubles the amount of target genes present in an extract, so that repetitive cycling conveys their exponential amplification. A number of cycles around 30 is standard in many contexts, for an overall duration of the run around 2 hours. The integration of plasmonic particles in the reaction mixture has been proposed as a tool to enhance the reaction yield,^{9,10} or even to serve as photothermal transducers to enable faster cycling with an optical trigger. For instance, Roche et al demonstrated photothermal cycling with a population of gold nanorods resonating at 808 nm.¹¹

In an attempt to reproduce those conditions, we synthesized gold nanorods with a plasmonic band around 800 nm, by the implementation of our previous protocols.¹² Nominally, these particles are also the same as those used in ref 8, where we assessed their photostability in a PVA film. Here, we achieved their PEGylation and modification with MBT with a ratio of PEG : MBT of 1 : 20, according to the procedure outlined in the main text. Then, particles were added in a so-called master mix for end-point PCR, and left to cycle in a thermal cycler set with standard parameters. Figure S5 shows the overall profile of the thermal cycle, as well as the optical spectra of the particles before and after thermal cycling.

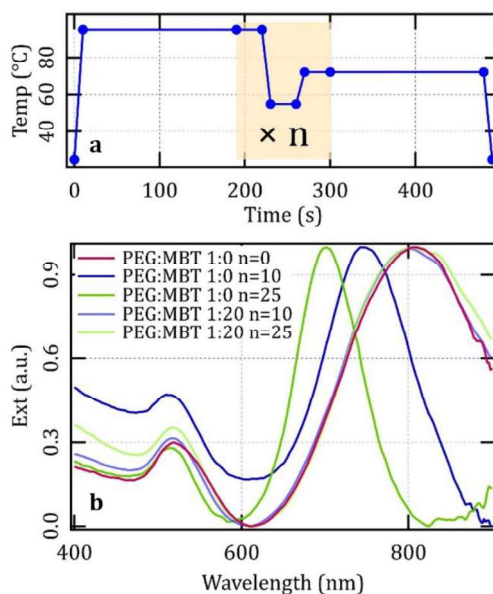


Figure S5: (a) shape of a thermal cycle, where the segment highlighted with a pink shadow is repeated n times. Melting temperature, annealing temperature and elongation temperature are 95, 55 and 72°C, respectively; (b) spectra of optical extinction of particles prepared with the named mixtures of thiols, suspended in a master mix for end-point PCR and left to cycle for the named numbers of times.

Also in this case, we found that PEGylated particles suffer from a transformation that jeopardizes their efficiency of photothermal conversion at the initial peak position, which is almost halved already after 10 and literally decimated after 25 cycles. In contrast, sample PEG:MBT 1:20 undergoes negligible modifications and retains its optical absorbance over the entire run. Therefore, the use of MBT may be an ideal solution to make gold nanorods compatible with this kind of applications.

Thermal stability of MBT-modified gold nanorods: persistence of the shell

Figure S6 compares the SERS spectra of sample PEG:MBT 1:20 prepared as described in the main text before and after 150 min of incubation in an oven set at 90°C. No evident change is visible, which suggests that the shell does not undergo any significant desorption nor reconfiguration under these conditions.

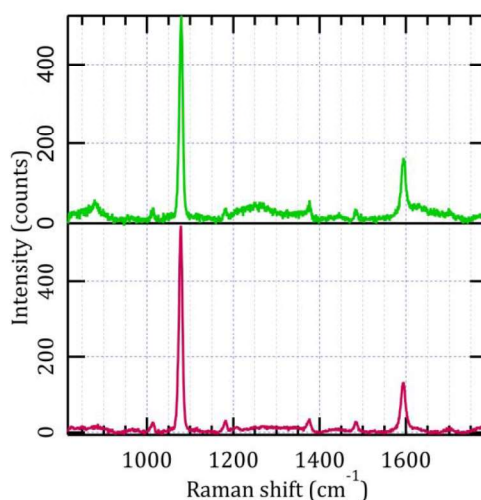


Figure S6: Raman spectra of sample PEG:MBT 1:20 before and after 150 min of thermal annealing at 90°C acquired at a wavelength of 785 nm of laser excitation.

- ¹ Varsanyi, G.; Lang, L. Assignments for Vibrational Spectra of Seven Hundred Benzenederivatives; 1974
- ² Yoon, J. H.; Park, J. S.; Yoon, S. Time-Dependent and Symmetry-Selective Charge-Transfer Contribution to SERS in Gold Nanoparticle Aggregates. *Langmuir* **2009**, *25*, 12475–12480, PMID: 19817481.
- ³ Ye, J.; Hutchison, J. A.; Uji-i, H.; Hofkens, J.; Lagae, L.; Maes, G.; Borghs, G.; Van Dorpe, P. Excitation Wavelength Dependent Surface Enhanced Raman Scattering of 4-Aminothiophenol on Gold Nanorings. *Nanoscale* **2012**, *4*, 1606–1611.
- ⁴ Goldmann, C.; Lazzari, R.; Paquez, X.; Boissière, C.; Ribot, F.; Sanchez, C.; Chanéac, C.; Portehault, D. Charge Transfer at Hybrid Interfaces: Plasmonics of Aromatic Thiol-Capped Gold Nanoparticles. *ACS Nano* **2015**, *9*, 7572–7582, PMID:26161962.
- ⁵ Tebbe, M.; Kuttner, C.; Männel, M.; Fery, A.; Chanana, M. Colloidally Stable and Surfactant-Free Protein-Coated Gold Nanorods in Biological Media. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**, *7*, 5984–5991.
- ⁶ Yu, C.; Varghese, L.; Irudayaraj, J. Surface Modification of Cetyltrimethylammonium Bromide-Capped Gold Nanorods to Make Molecular Probes. *Langmuir* **2007**, *23*, 9114–9119.
- ⁷ He, J.; Unser, S.; Bruzas, I.; Cary, R. J.; Shi, Z.; Mehra, R.; Aron, K.; Sagle, L. The Facile Removal of CTAB from the Surface of Gold Nanorods. *Colloids Surf. B* **2018**, *163*, 140–145.
- ⁸ Ratto, F.; Matteini, P.; Cini, A.; Centi, S.; Rossi, F.; Fusi, F.; Pini, R. CW Laser-Induced Photothermal Conversion and Shape Transformation of Gold Nanodogbones in Hydrated Chitosan Films. *J. Nanoparticle Res.* **2011**, *13*, 4337–4348.
- ⁹ Li, M.; Lin, Y.-C.; Wu, C.-C.; Liu, H.-S. Enhancing the Efficiency of a PCR Using Gold Nanoparticles. *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, e184–e184.
- ¹⁰ Vanzha, E.; Pylaev, T.; Khanadeev, V.; Konnova, S.; Fedorova, V.; Khlebtsov, N. Gold Nanoparticle-Assisted Polymerase Chain Reaction: Effects of Surface Ligands, Nanoparticle Shape and Material. *RSC Adv.* **2016**, *6*, 110146–110154.
- ¹¹ Roche, P. J. R.; Najih, M.; Lee, S. S.; Beitel, L. K.; Carnevale, M. L.; Paliouras, M.; Kirk, A. G.; Trifiro, M. A. Real Time Plasmonic qPCR: How Fast is Ultra-Fast? 30 Cycles in 54 Seconds. *Analyst* **2017**, *142*, 1746–1755.
- ¹² Ratto, F.; Matteini, P.; Rossi, F.; Pini, R. Size and Shape Control in the Overgrowth of Gold Nanorods. *J. Nanoparticle Res.* **2010**, *12*, 2029–2036.

Appendice

In questa prima parte della ricerca è stato affrontato l'effetto dei piccoli tioli sulla stabilità termica e fotostabilità dei nanorods d'oro. Le dispersioni colloidali sono state trattate con miscele di polietilen-glicole tiolato e metil-benzen-tiolo con rapporti molari compresi tra 0 (per il PEG puro) e 20, e poi incubate in stufa in condizioni di sub-ebollizione. È stato scoperto che i piccoli tioli migliorano notevolmente la stabilità termica dei nanorods d'oro. Questo effetto è stato attribuito a una modulazione della barriera di attivazione per la diffusione superficiale degli atomi d'oro. Inoltre, è stata affrontata la traslazione di questo effetto nella fotostabilità di nanorods d'oro irradiati in condizioni di interesse per l'imaging fotoacustico, ed è stato scoperto che i piccoli tioli ritardano le soglie di danno rilevanti di un fattore pari a 2.

In conclusione, è stato studiato l'effetto di tioli aromatici sulla termostabilità e fotostabilità dei nanorods d'oro. Sono state trattate sospensioni colloidali di nanorods d'oro con miscele di PEG tiolato e MBT con diversi rapporti molari, e successivamente poste in forno. Inoltre, è stato affrontato l'effetto del MBT sulla fotostabilità dei nanorods d'oro irradiati in condizioni di interesse per l'imaging fotoacustico.

3

EFFETTO DELLA RUGOSITÀ SULLA FOTOSTABILITÀ DEI GNRs

3.1 La rugosità nei GNRs

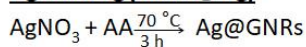
Un altro fattore critico della fotostabilità dei nanorods d'oro è l'accoppiamento termico con l'ambiente. Abbiamo già menzionato che l'accoppiamento termico tra i nanorods d'oro e il loro ambiente è un fattore critico nel processo fotoacustico, perché la conversione fototermica avviene all'interno delle particelle, ma l'espansione termoelastica avviene nel loro mezzo di dispersione. In pratica questo fattore può essere ottimizzato abbassando la resistenza termica all'interfaccia tra le particelle e il loro mezzo di dispersione o aumentando la superficie specifica delle particelle. L'idea di minimizzare intenzionalmente la resistenza termica interfacciale è difficile, perché rimane un'ingegneria razionale dell'accoppiamento fonone-fonone a un confine eterogeneo. È stato dimostrato che la resistenza termica all'interfaccia tra le particelle d'oro e il loro ambiente acquoso varia tra circa 2 e $30 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2/\text{KW}$, e dipende da

una serie di parametri intrinseci, come la temperatura delle superfici dei rods e il flusso di calore⁵, pattern su nanoscala⁶, raggio di curvatura⁷ e bagnabilità⁸. Quando i fattori estrinseci sono incorporati in una definizione efficace di resistenza termica, come caratteristiche non risolte come rugosità locale o presenza di adlayers⁹, come tensioattivi o polimeri utilizzati per stabilizzare una sospensione di nanorods d'oro, ma anche la silice stessa, o la formazione di bolle di vapore^{10,11}, il suo intervallo di variabilità può estendersi su vari ordini di grandezza. In particolare, secondo Chen et al.⁴, l'effetto della silice sull'amplificazione dei segnali fotoacustici si riferisce ad una diminuzione complessiva di questo parametro. Luna et al.¹² ha riportato un effetto simile nel caso di nanorods d'oro rivestiti con ossido di grafene. L'idea di massimizzare razionalmente l'area superficiale specifica delle particelle è più fattibile. Una possibilità potrebbe essere quella di miniaturizzare i GNRs. In prima approssimazione, secondo la teoria di Gans, dividendo una particella più grande in N particelle più piccole con lo stesso volume totale e la stessa forma non c'è influenza sull'assorbanza ottica e quindi sull'efficienza della conversione fototermica del sistema. Se quelle particelle fossero isolate dal loro ambiente, il sistema composto da N individui più piccoli subirebbe più deformazione, perché i nanorods d'oro più piccoli sono meno stabili e più inclini alla pre-fusione. Tuttavia, la resistenza termica all'interfaccia tra oro e ambiente acquoso non è infinita, e il sistema fatto di N particelle più piccole presenta un'area superficiale specifica che è maggiore di quella delle

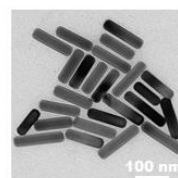
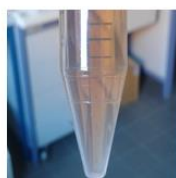
loro pari più grandi, di un fattore $\sqrt[3]{N}$. Si scopre che il vantaggio apportato da una superficie specifica più ampia, in genere, compensa di più la perdita di stabilità termica nel sistema miniaturizzato, così che l'utilizzo di NRs più piccoli sono una strategia efficace per ottenere la fotostabilità. Già nel 2014, è stato dimostrato un notevole aumento della fotostabilità dopo la miniaturizzazione di nanorods d'oro. Una diminuzione del raggio effettivo di un fattore intorno a 4 ha prodotto un aumento della soglia di rovinamento dei rods superiore a un fattore 3, che è l'esito atteso da un guscio equivalente di silice dello spessore di circa 30 nm.

Con l'aiuto di simulazioni FEM (Finite Element Method), questo effetto è stato attribuito a una forte diminuzione della temperatura di picco raggiunta entro ogni particella, grazie ad un miglior rilassamento attraverso un modello realistico di confine termicamente resistivo¹³. Altri autori hanno confermato lo stesso risultato con l'implementazione di diversi protocolli per la miniaturizzazione delle particelle e diverse piattaforme per il photoacoustic imaging, confermando così la solidità di questo approccio. In un recente lavoro, il nostro gruppo ha proposto un concetto alternativo per aumentare l'area di contatto all'interfaccia tra i nanorods d'oro e il loro ambiente acquoso tramite deposizione e successivo etching galvanico di un coating d'argento che restituisce un rivestimento d'oro ruvido o poroso sui GNRs.

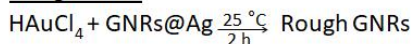
Ag-coating (GNRs@Ag)



GNRs covered by an Ag-shell



Rough GNRs



Starting from GNRs@Ag, by galvanic replacement of 3Ag^+ with Au^{3+} , rough GNRs are obtained.

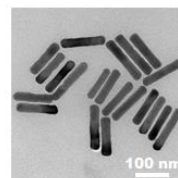
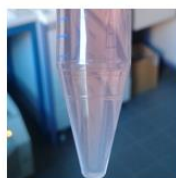
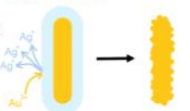


Figura 3.1: schema del processo di reazione del galvanic replacement per la formazione dei nanorods d'oro rivestiti di argento metallico, e successivo ottenimento di rods rugosi

È stato scoperto che la fluenza di soglia per l'insorgenza della fotoinstabilità è quasi scalabile con la rugosità, nonostante la fragilità apportata dalla struttura porosa.

All'inizio, è stata perseguita la miniaturizzazione come preconditione per massimizzare l'assorbanza ottica dei GNRs per unità di volume, e quindi la loro efficienza di foto-conversione termica. La comune sintesi mediata da semi restituisce particelle con diametro maggiore di circa 10 nm. Il protocollo più ovvio per ridurre la dimensione dei GNRs è quello di aumentare la densità dei semi aggiunti alla miscela di reazione¹⁴. La logica è che, se l'aggiunta di un seme porta alla crescita di una particella, un aumento del numero di semi, diciamo di un fattore 8, con la stessa quantità del precursore

di Au(III), dovrebbe portare a una diminuzione, di 8 volte, del volume delle particelle, o di due volte in diametro. Tuttavia, questo approccio non solo tende a produrre una diminuzione consistente nella dimensione delle particelle, ma modifica anche la cinetica di crescita complessiva, e risulta veicolare a maggiore quantità di sottoprodotti di forma indesiderabile¹⁵. Per superare questa difficoltà Murphy e collaboratori^{15,16} hanno suggerito di ottenere un maggiore controllo su tutti i parametri di processo utilizzando un reattore millifluidico. In alcune condizioni, questi autori hanno ottenuto GNRs piuttosto sottili con diametri di 6,6 nm.

Wang e colleghi hanno ottenuto GNRs piccoli di alta qualità combinando un cambiamento nel rapporto molare tra semi e precursore dell'Au(III) attraverso l'uso del bromuro di cetil-tripriloil-ammonio in sostituzione del bromuro di cetil-trimetil-ammonio (CTAB) come tensioattivo stabilizzante¹⁷. Quando la densità dei semi aumenta in una data soluzione di crescita, la dimensione dei GNRs finali diminuisce e lo spessore minimo riportato è di circa 6 nm.

El-Sayed e collaboratori¹⁸ hanno sviluppato un nuovo metodo cosiddetto “senza semi” per la sintesi di piccoli GNRs, che consiste in un'iniezione diretta di NaBH_4 nella miscela di reazione per una rapida nucleazione iniziale. A rigor di termini, le parole “senza semi” sono evocative, ma in realtà fuorvianti, perché non è che manchi il seeding, ma semplicemente la nucleazione avviene in situ, piuttosto che in una fiala separata preparata in una fase preliminare,

come nel loro protocollo originale. Questi autori hanno scoperto che il pH gioca un ruolo cruciale nella monodispersità delle particelle. In condizioni molto acide, vale a dire, pH intorno a 1-2, il potere riducente dell'acido ascorbico e del NaBH_4 diminuisce e l'omogeneità dei GNRs piccoli aumenta. Di conseguenza, sono stati ottenuti GNRs di alta qualità con diametro fino a 5 nm. In linea con i protocolli più tradizionali, le quantità di AgNO_3 e NaBH_4 aggiunti controllano le proporzioni delle particelle risultanti. Il metodo “senza semi” è stato ulteriormente modificato dall'uso di composti aromatici¹⁹ e da aggiustamenti della temperatura di reazione fino a 97 °C²⁰, per migliorare la possibilità di regolare la dimensione dei rods più piccoli. Nel complesso, entrambe le strategie basate sull'aumento della dose di semi o sull'iniezione diretta di NaBH_4 nell'ambiente di reazione, intendono modulare la competizione tra nucleazione e crescita nella sintesi di nanorods d'oro. Tuttavia, questo approccio è intrinsecamente impegnativo, perché la qualità del campione finale dipende da un sottile equilibrio delle condizioni cinetiche. L'aumento della dose dei semi tende probabilmente a fornire un maggiore controllo e riproducibilità²¹. Ma l'approccio “senza semi” rappresenta un'alternativa interessante nel complesso globale, perché la sintesi dei semi nel protocollo classico (in due fasi) è una complicazione sostanziale e dispendiosa in termini di tempo.

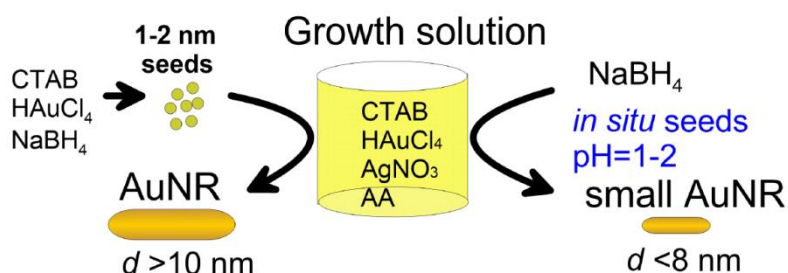


Figura 3.2: schema raffigurante le due tipologie di approccio per la sintesi dei gold nanorods (“senza semi” a destra e con semi a sinistra)

L’uso di particelle più piccole, come qualsiasi altra soluzione per aumentare la superficie specifica, comporta una minore stabilità termica. Pertanto, il regime della rilevanza di questa strategia è sottile e presuppone una forte competizione tra eccitazione e rilassamento: in caso di impulsi ottici troppo corti o troppo lunghi, la perdita di stabilità termica può prevalere sul guadagno nel trasferimento di calore all'ambiente e sulla miniaturizzazione delle particelle, e può diventare controproducente.

Lo svantaggio pratico della miniaturizzazione delle particelle risiede nel fatto che è molto più difficile implementare protocolli standard di purificazione, modifica ecc. mediante l'uso di cicli di centrifugazione e decantazione (in quanto pellettare (tramite centrifugazione) particelle più piccole può richiedere molto tempo, soprattutto con dispositivi che operano al di sotto di 50.000 rcf).

Inoltre, in generale, le particelle più piccole tendono a mostrare bande plasmoniche più ampie²² per una miscela di fattori intrinseci e problemi legati all'eterogeneità dell'insieme. L'aumento della superficie specifica tende a favorire la ritenzione delle impurezze citotossiche utilizzate nella sintesi, e quindi a suscitare maggiore citotossicità²¹. È risaputo che i cluster d'oro più piccoli di circa 2 nm allentano l'inertia e iniziano a mostrare un comportamento catalitico²³⁻²⁴ che può impartire vari meccanismi di danno biologico. Un altro elemento da tenere a mente è che temperature di picco più basse intorno alle singole particelle possono complicare alcune applicazioni di nicchia, come quelle basate sull'iniziazione della fotocavitazione²⁴.

Tuttavia, detto questo, esistono anche argomenti molto convincenti a favore della miniaturizzazione delle particelle. In linea di principio, accelerando l'accoppiamento termico tra i nanorods d'oro e il loro ambiente, non si influisce solo sulla loro fotostabilità, ma può anche migliorare l'efficienza di conversione fotoacustica, perché la sorgente di pressione associata alla conversione termoelastica nel mezzo di sospensione scala come il quadrato della derivata temporale della temperatura. Questo effetto è stato invocato nel caso di particelle silanizzate⁴ e irruvidite¹.

Un decisivo vantaggio della miniaturizzazione delle particelle è che questa direzione può aiutare a conformarsi ai criteri ADMET e ai vincoli normativi. Anche se non si vogliono approfondire le sottigliezze di questo problema, è importante ricordare che la ricerca

di particelle di metalli nobili con almeno una sezione trasversale inferiore a circa 5 nm rappresenta un obiettivo promettente per ottenere la compatibilità con clearance renale²⁵⁻²⁷, e quindi per mitigare il loro accumulo a lungo termine. La biocompatibilità di nanoparticelle non biodegradabili inferiori a circa 5 nm può essere uno spartiacque per l'uso clinico di nanorods d'oro. Per le considerazioni fatte sul tema della citotossicità, la finestra ideale può essere tra circa 2 e 5 nm. Nel complesso, la miniaturizzazione delle particelle o qualsiasi altro modo per aumentare il loro tasso di dissipazione, è uno strumento efficace per ottenere la fotostabilità per l'imaging fotoacustico. Tuttavia, questa soluzione è meno universale rispetto al concetto per migliorare la loro stabilità termica, e probabilmente richiede attenzione e verifica caso per caso. In ogni caso, crediamo che la miniaturizzazione delle particelle possa essere l'ancora di salvezza per uno sfruttamento clinico dei nanorods d'oro. Pertanto, la fotostabilità può diventare un importante vantaggio collaterale per lo sviluppo traslazionale di questo materiale. Per concludere, segnaliamo anche che in un recente contributo²⁸, il nostro gruppo ha scoperto che nanorods d'oro con proporzioni più lunghe risuonano a frequenze più basse senza perdite di fotostabilità al microscopio fotoacustico, grazie ad un rilassamento più veloce.

3.2 Strategie alternative per aumentare la fotostabilità dei GNRs

Nella sezione precedente, sono state riassunte le due vie più affermate per migliorare la fotostabilità dei nanorods d'oro per imaging fotoacustico. Certo, esistono soluzioni alternative o sinergiche. Ad esempio, un'altra potenziale strategia può derivare dalla nozione generale di condividere la stessa misura di assorbanza ottica tra più particelle nell'insieme. Il fatto che la forma dei nanorods d'oro sia intrinsecamente anisotropa e tipicamente disomogenea da particella a particella, si traduce in un'ampia eterogeneità dei comportamenti fotofisici. In pratica, quando la luce monocromatica polarizzata linearmente viene utilizzata come trigger ottico, l'energia viene assorbita solo da una piccola frazione di nanorods d'oro che godono di proporzioni quasi risonanti e un corretto allineamento tra i loro assi longitudinali e il campo elettrico. In una recente pubblicazione², il nostro gruppo ha stimato quanto dovrebbe essere vicina la condizione di risonanza e quanto piccola è la sottopopolazione coinvolta nella conversione fotoacustica, in condizioni tipiche. Il risultato è stato di circa 1/30. In particolare, un fattore di 1/3 deriva dall'effetto dell'anisotropia, e un altro fattore di circa 1/10 dalla disomogeneità riscontrata in un tipico ensemble. Queste cifre suggeriscono due possibili accorgimenti per ritardare l'insorgenza del foto-danneggiamento, ovvero l'uso di luce

polarizzata circolarmente e impulsi non monocromatici con una larghezza di banda che si sovrappone alla banda plasmonica dell'ensemble. In particolare, l'uso di luce non polarizzata o luce circolarmente polarizzata raddoppierebbe la frazione di particelle risonanti e idealmente lascerebbe inutilizzata solo quella con NRs allineati con l'asse ottico. Invece, l'uso di luce non monocromatica consentirebbe di recuperare un altro fattore pari a circa 10. La combinazione di entrambe le soluzioni può migliorare la fotostabilità fino a circa 20, rappresentando così potenzialmente la strategia più efficace tra quelle delineate.

Tuttavia, al meglio delle nostre conoscenze, questa strategia non è mai stata dimostrata esplicitamente, finora. Anziché, è stato riportato l'effetto del rimodellamento selettivo con monocromaticità e polarizzazione in contesti differenti. Ad esempio, un cosiddetto fenomeno di hole burning²⁹ è spesso osservato negli spettri ottici di nanorods d'oro esposti a serie di impulsi brevi, dove il contributo delle particelle risonanti tende a scomparire nel tempo.

In un'interessante pubblicazione del 2009, Zijlstra et al.³ ha sfruttato gli effetti di polarizzazione e monocromaticità, in combinazione con un elevato controllo spaziale, per fotodanneggiare selettivamente nanorods d'oro incorporati in pellicole di PVA, e dimostrare l'ottenimento di un semplice dispositivo per memorizzazione e lettura ottica dei dati su cinque dimensioni. Una variante equivalente a questa idea, per considerare l'effetto dell'allargamento disomogeneo nell'insieme delle particelle, può essere quello di

imporre un concetto di allargamento omogeneo, dove una banda plasmonica più piatta in ogni particella, risulterebbe in più particelle che risuonano con minore intensità rispetto alla stessa eccitazione monocromatica³⁰. Questo effetto può, ad esempio, concorrere nel caso della miniaturizzazione delle particelle, dove le particelle più piccole tendono a mostrare picchi più ampi di assorbanza ottica²², ed è stato esplicitamente invocato nel caso di altri modelli di particelle plasmoniche, come le nanoshell d'oro.

Riferimenti bibliografici

1. Cavigli, L.; Milanesi, A.; Khlebtsov, B.N.; Centi, S.; Ratto, F.; Khlebtsov, N.G.; Pini, R. Impact of Kapitza resistance on the stability and efficiency of photoacoustic conversion from gold nanorods. *J. Colloid Interface Sci.* 2020, 578, 358–365.
2. Cavigli, L.; Cini, A.; Centi, S.; Borri, C.; Lai, S.; Ratto, F.; de Angelis, M.; Pini, R. Photostability of Gold Nanorods upon Endosomal Confinement in Cultured Cells. *J. Phys. Chem. C* 2017, 121, 6393–6400.
3. Zijlstra, P.; Chon, J.W.M.; Gu, M. Five-dimensional optical recording mediated by surface plasmons in gold nanorods. *Nature* 2009, 459, 410–413.
4. Chen, Y.S.; Frey, W.; Kim, S.; Kruizinga, P.; Homan, K.; Emelianov, S. Silica-Coated Gold Nanorods as Photoacoustic Signal Nanoamplifiers. *Nano Lett.* 2011, 11, 348–354.
5. Vera, J.; Bayazitoglu, Y. Temperature and heat flux dependence of thermal resistance of water/metal nanoparticle interfaces at sub-boiling temperatures. *J. Heat Mass Transf.* 2015, 86, 433–442.

6. Hu, H.; Sun, Y. Effect of nanopatterns on Kapitza resistance at a water-gold interface during boiling: A molecular dynamics study. *J. Appl. Phys.* 2012, 112, 053508.
7. Gonzalez, M.G.; Acosta, E.O.; Santiago, G.D. Determination of the thermal boundary conductance of gold nanoparticles in aqueous solution using a method based on nanobubble generation. *Appl. Opt.* 2018, 57, 6229–6232.
8. Chen, X.; Munjiza, A.; Zhang, K.; Wen, D. Molecular Dynamics Simulation of Heat Transfer from a Gold Nanoparticle to a Water Pool. *J. Phys. Chem. C* 2014, 118, 1285–1293.
9. Alper, J.; Hamad-Schifferli, K. Effect of Ligands on Thermal Dissipation from Gold Nanorods. *Langmuir* 2010, 26, 3786–3789.
10. Lombard, J.; Biben, T.; Merabia, S. Kinetics of Nanobubble Generation Around Overheated Nanoparticles. *Phys. Rev. Lett.* 2014, 112, 105701.
11. Stoll, T.; Maioli, P.; Crut, A.; Rodal-Cedeira, S.; Pastoriza-Santos, I.; Vallée, F.; Del Fatti, N. Time-Resolved Investigations of the Cooling Dynamics of Metal

Nanoparticles: Impact of Environment. *J. Phys. Chem. C* 2015, 119, 12757–12764.

12. Moon, H.; Kumar, D.; Kim, H.; Sim, C.; Chang, J.H.; Kim, J.M.; Kim, H.; et al. Amplified Photoacoustic Performance and Enhanced Photothermal Stability of Reduced Graphene Oxide Coated Gold Nanorods for Sensitive Photoacoustic Imaging. *ACS Nano* 2015, 9, 2711–2719.
13. Chen, Y.S.; Zhao, Y.; Yoon, S.J.; Gambhir, S.S.; Emelianov, S. Miniature gold nanorods for photoacoustic molecular imaging in the second near-infrared optical window. *Nat. Nanotechnol.* 2019, 14, 465–472.
14. Chang, H.H.; Murphy, C.J. Mini Gold Nanorods with Tunable Plasmonic Peaks beyond 1000 nm. *Chem. Mater.* 2018, 30, 1427–1435.
15. Sau, T.K.; Murphy, C.J. Seeded High Yield Synthesis of Short Au Nanorods in Aqueous Solution. *Langmuir* 2004, 20, 6414–6420.
16. Lohse, S.E.; Eller, J.R.; Sivapalan, S.T.; Plews, M.R.; Murphy, C.J. A Simple Millifluidic Benchtop Reactor System for the High- Throughput Synthesis and Functionalization of

Gold Nanoparticles with Different Sizes and Shapes. *ACS Nano* 2013, 7, 4135–4150.

17. Jia, H.; Fang, C.; Zhu, X.M.; Ruan, Q.; Wang, Y.X.J.; Wang, J. Synthesis of Absorption-Dominant Small Gold Nanorods and Their Plasmonic Properties. *Langmuir* 2015, 31, 7418–7426
18. Ali, M.R.K.; Snyder, B.; El-Sayed, M.A. Synthesis and Optical Properties of Small Au Nanorods Using a Seedless Growth Technique. *Langmuir* 2012, 28, 9807–9815.
19. Zhang, L.; Xia, K.; Lu, Z.; Li, G.; Chen, J.; Deng, Y.; Li, S.; Zhou, F.; He, N. Efficient and Facile Synthesis of Gold Nanorods with Finely Tunable Plasmonic Peaks from Visible to Near-IR Range. *Chem. Mater.* 2014, 26, 1794–1798.
20. Zijlstra, P.; Bullen, C.; Chon, J.W.M.; Gu, M. High-Temperature Seedless Synthesis of Gold Nanorods. *J. Phys. Chem. C* 2006, 110, 19315–19318.
21. Tatini, F.; Landini, I.; Scaletti, F.; Massai, L.; Centi, S.; Ratto, F.; Nobili, S.; Romano, G.; Fusi, F.; Messori, L.; et al. Size dependent biological profiles of PEGylated gold nanorods. *J. Mater. Chem. B* 2014, 2, 6072–6080.

22. Juvé, V.; Cardinal, M.F.; Lombardi, A.; Crut, A.; Maioli, P.; Pérez-Juste, J.; Liz-Marzán, L.M.; Del Fatti, N.; Vallée, F. Size-Dependent Surface Plasmon Resonance Broadening in Nonspherical Nanoparticles: Single Gold Nanorods. *Nano Lett.* 2013, 13, 2234–2240.
23. Pan, Y.; Neuss, S.; Leifert, A.; Fischler, M.; Wen, F.; Simon, U.; Schmid, G.; Brandau, W.; Jahnen-Dechent, W. Size-Dependent Cytotoxicity of Gold Nanoparticles. *Small* 2007, 3, 1941–1949.
24. Cavigli, L.; Centi, S.; Borri, C.; Tortoli, P.; Panettieri, I.; Streit, I.; Ciofini, D.; Magni, G.; Rossi, F.; Siano, S.; et al. 1064-nm-resonant gold nanorods for photoacoustic theranostics within permissible exposure limits. *J. Biophotonics* 2019, 0, e201900082.
25. Tam, J.M.; Tam, J.O.; Murthy, A.; Ingram, D.R.; Ma, L.L.; Travis, K.; Johnston, K.P.; Sokolov, K.V. Controlled Assembly of Biodegradable Plasmonic Nanoclusters for Near-Infrared Imaging and Therapeutic Applications. *ACS Nano* 2010, 4, 2178–2184.
26. Liu, J.; Yu, M.; Zhou, C.; Yang, S.; Ning, X.; Zheng, J. Passive Tumor Targeting of Renal-Clearable Luminescent

Gold Nanoparticles: Long Tumor Retention and Fast Normal Tissue Clearance. *J. Am. Chem. Soc.* 2013, 135, 4978–4981.

27. Cassano, D.; Summa, M.; Pocoví-Martínez, S.; Mapanao, A.K.; Catelani, T.; Bertorelli, R.; Voliani, V. Biodegradable Ultrasmall-in-Nano Gold Architectures: Mid-Period In Vivo Distribution and Excretion Assessment. *Part. Part. Syst. Charact.* 2019, 36, 1800464.
28. Cavigli, L.; Centi, S.; Lai, S.; Borri, C.; Micheletti, F.; Tortoli, P.; Panettieri, I.; Streit, I.; Rossi, F.; Ratto, F.; et al. Light-activated microbubbles around gold nanorods for photoacoustic microsurgery. *Proc. SPIE* 2018, 10494, 104942D.
29. De Santis, C.J.; Huang, D.; Zhang, H.; Hogan, N.J.; Zhao, H.; Zhang, Y.; Manjavacas, A.; Zhang, Y.; Chang, W.S.; Nordlander, P.; et al. Laser-Induced Spectral Hole-Burning through a Broadband Distribution of Au Nanorods. *J. Phys. Chem. C* 2016, 120, 20518–20524.
30. Liu, J.; Yu, M.; Zhou, C.; Yang, S.; Ning, X.; Zheng, J. Passive Tumor Targeting of Renal-Clearable Luminescent Gold Nanoparticles: Long Tumor Retention and Fast Normal Tissue Clearance. *J. Am. Chem. Soc.* 2013, 135, 4978–4981.



Contents lists available at ScienceDirect

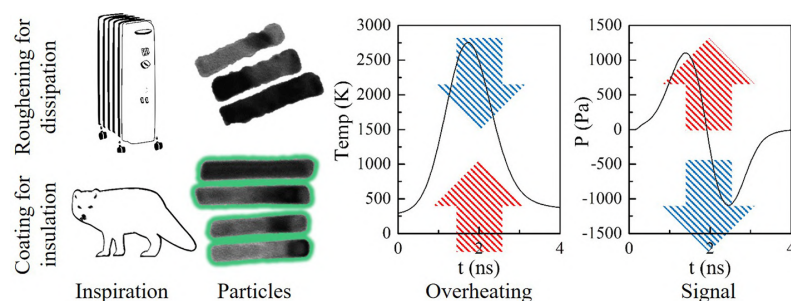
Journal of Colloid and Interface Science

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jcis

Impact of Kapitza resistance on the stability and efficiency of photoacoustic conversion from gold nanorods

Lucia Cavigli^a, Alessio Milanese^{a,b}, Boris N. Khlebtsov^c, Sonia Centi^a, Fulvio Ratto^{a,*}, Nikolai G. Khlebtsov^{c,d}, Roberto Pini^a^a Istituto di Fisica Applicata Nello Carrara, IFAC-CNR, Via Madonna del Piano 10, Sesto Fiorentino 50019, Italy^b Dipartimento di Chimica 'Ugo Schiff', Università degli Studi di Firenze, Via della Lastruccia, 3-13, 50019 Sesto Fiorentino (FI), Italy^c Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, 13 Prospekt Entuziastov, Saratov 410049, Russia^d Saratov State University, 83 Ulitsa Astrakhanskaya, Saratov 410026, Russia

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 April 2020

Accepted 29 May 2020

Available online 6 June 2020

Keywords:

Kapitza resistance
Gold nanoparticles
Photoacoustic conversion
Photostability
Roughness
Protein corona

ABSTRACT

Plasmonic particles have been proposed for a broad variety of optical and hybrid applications, including the photothermal ablation and photoacoustic imaging of cancer, or their integration in photonic sensors. Here, we address the effect of thermal resistance at the gold–water interface, or Kapitza resistance, on the performance of photoacoustic conversion of gold nanorods. Our findings point to possible strategies for the optimization of plasmonic particles as contrast agents for imaging, or even as transducers for biosensing. We perform numerical simulations that project a simultaneous increase of efficiency and stability of photoacoustic conversion with a decrease of Kapitza resistance. We suggest an effective approach to modulate Kapitza resistance by including underresolved features as roughness or the presence of adsorbates. Inspired by this idea, we synthesize a rough variant of gold nanorods by the deposition and galvanic replacement of a silver shell, where roughness provides higher photoacoustic signals by about 70% and damage thresholds by 120%. In addition, we coat our particles with a protein corona and find a decrease of photoacoustic signals with shell thickness, which may inspire new solutions for biosensors based on a mechanism of photoacoustic transduction. Both our findings are consistent with an effective modulation of Kapitza resistance, which decreases upon roughening, due to an underlying increase of specific surface area, and increases upon coating with a protein shell that may act as a thermal insulation.

* Corresponding author.

E-mail address: f.ratto@ifac.cnr.it (F. Ratto).¹ ORCID(s): 0000-0001-6721-9486.

We discuss possible directions to gain more advantage of our concept for topical applications at the cross-roads of plasmonics, biomedical optics and biosensing.

© 2020 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

The last couple of decades has seen a significant interest for the optimization of plasmonic particles for use as contrast agents in biomedical optics for such applications as the optical hyperthermia [1,2] and photoacoustic imaging of cancer [3–5]. In the particular case of photoacoustic imaging and microsurgery, major current trends include the use of shorter optical pulses as a general approach to achieve much more intense signals [3,6], and the miniaturization of the plasmonic particles as a pathway to delay their photo-instability [7–10]. In practice, both approaches work by accelerating the kinetics of heat transfer to the aqueous environment, where the thermoelastic conversion takes place.

Shorter optical pulses provide much more intense signals independent of the use of exogenous dyes, as a direct consequence of basic principles in photoacoustics [3,11]. Possible limitations of this strategy include that the photoacoustic intensity may decay faster and more erratically with penetration depth, due to broadening of pulse duration by optical scattering [12]. In addition, as heat confinement intensifies, shorter optical pulses pose a greater challenge on the photostability of plasmonic particles. The sharp role of pulse duration on the photostability of gold nanorods has attracted interest ever since their introduction in the mid 90s [13–16].

With their larger specific surface area, the use of smaller particles helps to improve their thermal coupling to the aqueous environment, and so to mitigate their overheating [7–10]. In addition, at present, the pursuit of sub 5-nm particles is the most hopeful solution for these materials to comply with renal clearance, and so to conform to regulatory constraints for clinical use [17,18]. However, miniaturization may hamper attractive applications as photoacoustic microsurgery, where concentration of energy at the nanoscale is key to ignite photocavitation and lysis [19–21].

Here, we propose that another variable that may play a major role is Kapitza resistance, also termed interfacial thermal resistance [22]. Kapitza resistance at the interface between gold particles and their aqueous environment was shown to vary between about 2 and $30 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ K W}^{-1}$, and to depend on a number of intrinsic parameters, such as wall temperature and heat flux [23], nanoscale pattern [24], radius of curvature [25] and wettability [26]. When extrinsic factors are incorporated in an effective definition of Kapitza resistance, such as underresolved features as roughness or adlayers, or the formation of vapor bubbles [27,28], its range of variability may span orders of magnitude. Despite the importance of Kapitza resistance at the nanoscale, it is probably more common to think of its effect on the kinetics of heat transfer in materials engineering at the macroscale, such as e.g. in building construction and electronics. In particular, its role in the photothermal and photoacoustic conversion from plasmonic particles has received relatively little attention. Chen et al. [29] found that silanization amplifies the efficiency of photoacoustic conversion of gold nanorods, and ascribed their results to a decrease of interfacial thermal resistance. Other authors focused on its impact on the process of photocavitation [30,31]. In a very recent paper, Pang et al. [32] simulated the effect of Kapitza resistance on the efficiency of photoacoustic conversion from gold nanospheres, and found that the lower its value, the more intense the photoacoustic pressure. Here, we extend this observation by undertaking a computational study of the effect of Kapitza resistance on the efficiency

and stability of photoacoustic conversion from gold nanorods, and discuss possible synergistic combinations with the pursuit of complementary strategies, such as the use of shorter optical pulses and smaller particles. After identifying relevant trends, we take inspiration from common concepts in building construction to implement an experimental modulation of this parameter, verify the behavior expected from the numerical simulations, and exploit its implications in different applications spanning from photoacoustic imaging to bio-sensing.

2. Materials and methods

2.1. FEM simulations of the photoacoustic process

We developed a finite element method (FEM) model of the photoacoustic conversion from a single gold nanorod with aspect ratio of 7, by the use of COMSOL Multiphysics®. The model recapitulates a complex cascade of steps triggered by an optical pulse, i.e. photothermal conversion from the particle, propagation of heat in the presence of a certain value of Kapitza resistance at the gold-water interface, thermoelastic conversion in the aqueous environment, and propagation of ultrasound [11,33]. As a result, we receive various parameters, including temperature within the particle and pressure at a reference distance of the particle. The cross section of optical absorption of a gold nanorod was implemented in the definition of a heat source, and worked out in a preliminary simulation based on the Wave Optics module of COMSOL Multiphysics®, as is described elsewhere [15,34]. In the case of particles with different size, in order to disentangle the role of Kapitza resistance, we adopted a dipolar approximation derived from Mie-Gans theory [35–37], and assumed their optical absorbance to scale with particle volume, i.e. their efficiency of photothermal conversion to be the same. Then, photoacoustic pressure was re-scaled by particle volume, in order to make sure to compare configurations with the same optical absorbance. More details are given as [Supplementary material](#).

2.2. Preparation of the particles

Apart from alpha-methoxy-omega-mercapto poly(ethylene glycol) (mPEG-SH, MW 5000 Da) that was acquired from Iris Biotech GmbH (Marktredwitz, Germany), all other chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) and used as received.

2.2.1. Roughened gold nanorods

Gold nanorods were synthesized according to our variant of the protocol developed by Vigdeman and Zubarev [38,21]. Thereafter, some particles were coated with a silver shell according to the protocol reported in [39,40] and etched by galvanic replacement with chloroauric acid in cetrimonium bromide (CTAB) solution [41,42]. In brief, as-synthesised gold nanorods were transferred at a nominal concentration of 200 μM Au in 20 mM cetrimonium chloride (CTAC) supplemented with silver nitrate and four equivalents of ascorbic acid. The dose of silver nitrate was such that the ratio Ag: Au was 43%, or 85%, or 170% by mole. After two hours at 70 °C, particles were transferred at the same nominal concentration in 100 mM CTAB containing chloroauric acid at a concentration corresponding to 1/12 of the nominal amount of silver

atoms. Note that, usually, the galvanic replacement between ionic gold compounds and metallic silver needs temperatures around 100 °C [43]. Here, we obtained that the complex of CTAB and chloroauric acid oxidizes metallic silver even at room temperature, and results in the formation of rough gold or gold/silver deposits. In practice, each molecule of chloroauric acid oxidizes and replaces three silver atoms, thus etching cavities in the silver shell, and creating porosity and roughness. Our ratios amount to a nominal value of 25% of shell etched. However, we note that, before etching, the silver shell is probably thinner than its nominal value, both because some silver nitrate may remain unreacted in the intermediate step of growth, and because some silver atoms may undergo oxidation in the next step of purification. We found that 25% is a safe choice. In any case, the amount of chloroauric acid should never approach and certainly not exceed 1/3 of the actual amount of silver atoms, because after galvanic replacement of silver, there may begin that of gold with a net effect of polishing [44,45]. Etching of gold nanorods with chloroauric acid has been the subject of extensive research, as a post-synthetic tool to fine-tune and gain more control over particle size and shape [44]. Either without or after creation of a rough overlayer, particles were PEGylated according to our previous protocol [46], and transferred at a nominal concentration of 1.6 mM Au in Phosphate-Buffered Saline (PBS) containing 0.005% polysorbate 20.

2.2.2. BSA-coated gold nanorods

Other particles were modified with a protein corona of Bovine Serum Albumin (BSA) of different thickness. BSA represents an ubiquitous model of protein adsorbate, and its interaction with plasmonic particles has undergone extensive research [47–51].

As-synthesised CTAB-coated gold nanorods were transferred at a nominal concentration of 1.6 mM Au in 100 mM CTAB supplemented with 0.1% or 1% BSA, and left under mild agitation for 24 h at 37 °C before use.

2.2.3. Particle characterization

All particles were characterized by spectrophotometry with a Lambda 950 platform from Perkin Elmer (Waltham, MA, USA), and dynamic light scattering with a Zetasizer Nano ZS 90 scanner from Malvern Instruments (Malvern, UK).

Transmission electron microscopy (TEM) images were recorded on a Libra-120 transmission electron microscope (Carl Zeiss, Jena, Germany) at the Simbioz Center for the Collective Use of Research Equipment in the Field of Physical–Chemical Biology and Nanobiotechnology (IBPPM-RAS, Saratov). For TEM measurements, samples were centrifuged twice and resuspended in water. 5 µL of washed particles were deposited onto 300-mesh copper microscopic grids covered with a formvar film and left to dry in an oven at 40 °C.

2.3. Photoacoustic setup and tests

Photoacoustic experiments were carried out with a homemade inverted photoacoustic microscope [52,21]. The optical source was a fiber-coupled diode-pumped microchip laser by Asclepion Laser Technologies (Jena, Germany) emitting pulses with a wavelength of 1064 nm, duration of 3.3 ns and repetition rate of 10 Hz. An attenuator placed in front of the output was used to tune the optical fluence, which was monitored in real time with a QE8SP pyroelectric detector from Gentec-EO (Quebec, QC, Canada). Photoacoustic signals were acquired by an amplified immersion transducer from Olympus Panametrics (mod V382-SU-F, sensor diameter 0.5 inch, frequency range 3.5 MHz, focal distance 0.83 inch, 40 dB amplifier mod 5676, Tokyo, Japan) and recorded with a RTO1004 digital oscilloscope from Rohde&Schwarz (Munich, Germany).

Flow chambers (μ -Slide 1 Luer Family, channel height 200 µm, IBDI GmbH, Planegg/ Martinsried, Germany) were filled with suspensions of gold nanorods, coupled to a peristaltic pump (model FH10, Thermo Scientific, Waltham, MA USA), and immersed in DI water. The use of microfluidic chambers is a promising tool to assess the performance of photoacoustic systems and contrast agents [53,33]. The laser beam was focused perpendicular to the flow chamber with a spot diameter of 300 µm.

Photoacoustic signals were averaged over 100 events, in order to mitigate the effect of white and electrical noise, and to achieve signal-to-noise ratios always exceeding about 100 (see Fig. S2 in Supplementary material). Average signals I were analyzed in terms of peak-to-peak amplitude, and normalized by the fraction of optical energy absorbed in the flow chambers, by integrating the optical attenuation at 1064 nm across the optical path length, for the sake of comparison from sample to sample.

The trend of PA signal with fluence F of the optical trigger was modelled with an empirical function that describes the photoinstability as a depletion of optical absorbance with F . In practice, we modified the usual equation: $I \propto \Gamma \mu_a F$, where Γ is Grüneisen parameter and μ_a the optical absorbance [11], with the following S-shaped logistic curve, which is commonly adopted in several fields of science to describe population dynamics [15,54,10,55]:

$$I = a + \frac{b \cdot F}{1 + \left(\frac{F}{F_0}\right)^p} \quad (1)$$

Here a is a parameter that accounts for the electrical noise, b is proportional to the product of Grüneisen parameter and the initial optical absorbance $\mu_a|_{F=0}$ times the efficiency of photoacoustic conversion, while F_0 and p are, respectively, the center and power of the logistic function. In particular, F_0 is a direct indicator for the damage threshold of the gold nanorods.

3. Results and discussion

3.1. FEM simulations of the photoacoustic process

We undertook an analysis of the effect of Kapitza resistance over a broad range of values exceeding its intrinsic limits, in order to be ready to accommodate extrinsic factors, such as those involved in our experimental tests, and to highlight its relevance in the photoacoustic process. We performed a multidimensional analysis of photoacoustic pressure and max temperature reached within each particle vs. major players as pulse duration and particle size, and Kapitza resistance. We fixed pulse energy, and varied pulse duration within a typical range from 0.1 to 10 ns, and particle size from a radius between 3 and 7 nm, which corresponds to a span exceeding a factor of 12 by volume. We chose to constrain the variation of particle size within limits that may suit our approximation to treat optical absorbance to scale with particle volume [35–37], which we adopted for the sake of comparison. Fig. 1 displays representative results of our simulations across different cut planes, i.e. photoacoustic pressure (left panels) or max temperature (right panels) vs. pulse duration and Kapitza resistance at constant particle size (upper panels), or vs. particle size and Kapitza resistance at constant pulse duration (lower panels), in order to highlight their synergistic combinations. Max temperature was taken as an indicator of photoinstability according to the reference literature [7,56,9]: the higher its value, the lower the optical thresholds for photoinstability.

Our simulations confirm the principal trends found in the reference literature, which indirectly provides their cross-validation [32]. In particular, pulse duration is found to exert a major effect both on photoacoustic pressure and max temperature. The direction of this effect is unfortunately antagonistic, i.e. photoacoustic

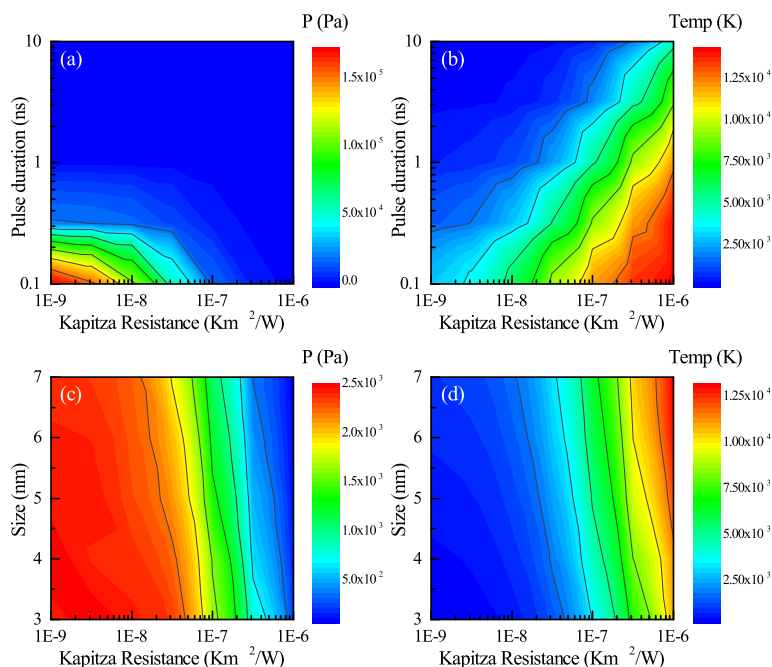


Fig. 1. Simulations of photoacoustic pressure 1 μm away of a gold nanorod (a and c), or max temperature within a gold nanorod (b and d) vs pulse duration and Kapitza resistance for constant particle radius of 5 nm (a and b), or vs particle radius and Kapitza resistance for constant pulse duration of 1 ns (c and d). Optical fluence was set to 1 mJ/cm^2 . In the case of a variation of particle size, photoacoustic pressure was rescaled according to particle volume. Note that the color scales differ from panel to panel. See Supplementary material for more details. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

pressure benefits from shorter pulses, but particle stability demands longer width. Instead, the advantage of particle miniaturization is more univocal, because smaller particles enjoy more photostability and also slightly more efficiency of photoacoustic conversion [9]. However, our results do not encourage to pursue particle miniaturization as a direction to gain more signal, because the response is very subtle and probably insufficient to counterbalance an experimental tendency to spectral broadening [46].

On the whole, the effect of Kapitza resistance is more straightforward. As a rule of thumb, a lower value of Kapitza resistance simultaneously exerts a beneficial effect both on the efficiency and stability of photoacoustic conversion. Truth be told, we have found conditions as combinations of pulse duration above about 3 ns and Kapitza resistance below about $10 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ K W}^{-1}$, where it is the optical source that limits the overall kinetics, and so the trend of photoacoustic pressure is less pronounced, consistent with the work by Pang et al. [32]. Viewed on a larger scale, the effect of Kapitza resistance is predominant and fit to synergistically combine with other strategies, such as to mitigate particle overheating in the case of shorter pulses.

On the other hand, the intentional modulation of Kapitza resistance is not as trivial. We note that, in some cases, its intrinsic dependency on accessible parameters may happen to be beneficial. For instance, Gonzalez et al. [25] found that smaller particles exhibit lower Kapitza resistance, which would favourably synergize with the intrinsic increase in specific surface area brought by miniaturization. In other cases, it may be problematic. In this sense, its tendency to grow with temperature [23] and to diverge upon formation of vapor bubbles [27,28] would provide a negative feedback against stability. Instead, when external parameters are embedded in an effective concept of Kapitza resistance, there arise more opportunities. In the following paragraphs, we pursue an

experimental corroboration of the trends recapitulated in Fig. 1. We exploit an extrinsic dependence of Kapitza resistance on underresolved features of interest in different contexts, and, in the meantime, we suggest relevant perspectives for applications and anticipate possible advances based on our numerical simulations. Although the pulse duration available in our labs is rather too long to spotlight the importance of these features, our results point to new opportunities behind the notion to see Kapitza resistance as a key player.

3.2. Optimization of a photoacoustic contrast agent: effect of roughness

First, we test an experimental model where we intentionally pursue an effective decrease of Kapitza resistance, verify its benefit in terms of efficiency and stability of photoacoustic conversion according to Fig. 1, and assess its technological relevance for the optimization of a contrast agent for PAI. According to Han et al. [57], an increase of height of nanoscale patterns leads to a reduction of Kapitza resistance at the gold-water interface, by increasing the interaction energy per unit area. The decrease is in the order of a factor of two or more. In addition, here, we consider roughness as an underresolved feature that conveys an effective decrease of Kapitza resistance by an underlying increase of the true contact area between gold and water. We follow the logic of Merabia and Termentzidis[58], who used relaxation simulations to show that the thermal conductivity through a rough interface approximately scales with its true contact area, and that the exact shape of the asperities plays a secondary role. In practice, we consider a nanoscale analog of a radiator.

We compared gold nanorods coated with a rough overlayer of different thickness that was prepared by the deposition and

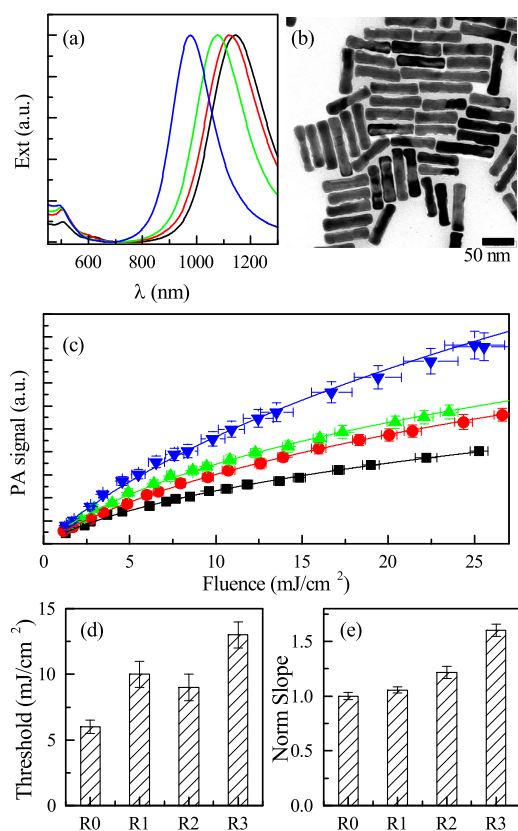


Fig. 2. Effect of roughness on the performance of photoacoustic conversion of gold nanorods: (a) spectra of optical extinction of particles without modification (R0, black line) or roughened from a silver shell amounting to 43% (R1, red line), 85% (R2, green line), or 170% (R3, blue line) of nominal gold molarity; (b) representative transmission electron micrograph of a sample roughened from a silver shell amounting to 170% of nominal gold molarity, which displays an outer rough overlayer; (c) plot of peak-to-peak photoacoustic amplitude vs fluence of the optical excitation at 1064 nm for the samples mentioned in panel a. The color code is the same as panel a. Experimental data are given as full symbols with error bars. Continuous lines represent their fit to the analytical function described in the main text. (d) damage threshold set at 25% loss of efficiency of photoacoustic conversion, and (e) relative efficiency of photoacoustic conversion in the limit of lower fluence extracted from the analytical fit in panel c. Samples R0 to R3 correspond to an initial silver shell of 0 to 170% of nominal gold molarity. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

oxidative etching of a silver shell. While we are unable to quantify the final specific surface area per particle, in [Supplementary material](#) we demonstrate a qualitative increase by several folds, which would end up to decrease the effective value of Kapitza resistance. [Fig. 2a](#) displays the spectra of optical extinction of our particles, which shift from sample to sample according to their modification. However, we note that the values of optical absorbance recorded at our pulse wavelength of 1064 nm are rather consistent, i.e. that the sub-populations of particles in resonance with our laser module are comparable, and we recall that our treatment of photoacoustic signals is fit to compensate these differences. [Fig. 2b](#) gives an idea of the aspect of our roughened particles, which exhibit a cavernous overlayer with a hierarchical pattern of pores (more TEM images of smooth gold nanorods and their counterparts with different roughness are given in [Fig. S4](#) in [Supplementary material](#)).

[Fig. 2c](#) summarizes our photoacoustic data. For all samples, the amplitude of photoacoustic pressure grows with pulse fluence and follows a smooth trend that progressively departs from linearity and achieves sublinearity, due to the effect of photoinstability [52,33]. The analytical function used to fit the experimental data (see [Eq. 1](#)) performs seamlessly over the entire dataset, and allows us to extract effective parameters. [Figs. 2d](#) and [e](#) report the effective values for photoinstability threshold and initial slope (b). The photoinstability threshold was set at 25% loss of initial slope for the sake of consistency with our previous work [7,15,54], i.e.

$F_{thr} = \sqrt[3]{\frac{1}{3}} F_0$. On the whole, we found an increase from (6.0 ± 0.5) to (13 ± 1) mJ/cm^2 , or about 120%. We ascribe the noise in this trend to the interplay of different factors that complicate our interpretation, such that a thicker overlayer may not necessarily correspond to more roughness, and that roughened particles may intrinsically exhibit lower stability, due to their higher specific surface area or the presence of sharp edges [59]. The trend of efficiency is more neat. In relative terms, we found an increase from (1.00 ± 0.04) to (1.70 ± 0.06) .

Independent of their interpretation, our results are of technological value, and demonstrate the enhancement of the performance of photoacoustic conversion of gold nanorods by the addition of a rough overlayer. We ascribe this achievement to the decrease of the effective value of Kapitza resistance due to an intrinsic effect of roughness [57] accompanied by an underresolved increase in specific surface area [58]. Upon roughening, our particles undergo a simultaneous increase in average volume until a factor around 2.3. However, according to [Fig. 1](#), this factor alone does not explain our results and would actually oppose both the increase of efficiency and stability of photoacoustic conversion. We suggest that also the results by [Chen et al. \[29\]](#) may relate to the porosity of their silica overlayer. The concept of Kapitza resistance allows us to rationalize our results, and to design strategies to engineer our contrast agent.

3.3. Perspectives for a photoacoustic biosensor: effect of adlayers

Next, we show a complementary experimental model that further corroborates the effect of Kapitza resistance on the efficiency and stability of photoacoustic conversion according to [Fig. 1](#), without the entanglement of varying the size and shape of the plasmonic core, and assess its technological relevance in the field of biosensing. In addition to the effect of roughness, we addressed the impact of a biological adlayer. An extreme example of this kind is the cushion of vapor that forms upon vaporization of the aqueous environment around overheated particles, which has been described as an insulator boosting the value of Kapitza resistance [27,28]. Once again, we treat our adlayer as an underresolved feature that modifies the effective value of Kapitza resistance. Here, in practice, we think of a nanoscale analog of something like a thermal insulation wall cladding system.

As a model of biochemical adlayer, we chose BSA, which is known to form a so-called protein corona around gold nanorods terminated with CTAB or PEG [47,48,50,51]. In practice, we take the adsorption of BSA to epitomize typical scenarios in immunosensing [60–62] or genosensing [63], where multiple layers of macromolecules may assemble in specific constructs. [Figs. 3a](#) and [b](#) display the optical spectra and the hydrodynamic size of our particles. Until 0.1% BSA, we found a modest modification of the optical spectra despite a significant increase of hydrodynamic size, consistent with the formation of a protein corona. A small blue-shift and broadening of the longitudinal modes and change of ratio between the longitudinal and transversal bands suggest the inception of particle aggregation [64]. Instead, around about 1% BSA, particle aggregation becomes massive, and sediment-

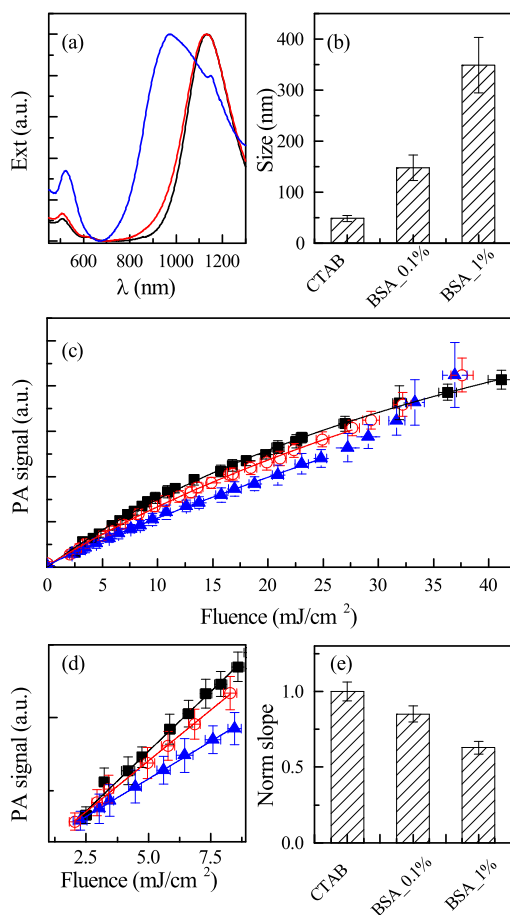


Fig. 3. Effect of a protein corona on the performance of photoacoustic conversion of gold nanorods: (a) spectra of optical extinction of as-synthesized particles without (black line) or with the addition of 0.1% (red line) or 1% BSA (blue line); (b) average hydrodynamic size of these samples, which suggests the onset of flocculation, especially in the case with 1% BSA, consistent with the spectral broadening seen in panel a; (c) plot of peak-to-peak photoacoustic amplitude vs fluence of the optical excitation at 1064 nm for the samples mentioned in panel a. The color code is the same as panel a. Experimental data are given as full symbols with error bars. Continuous lines represent their fit to the analytical function described in the main text. The trend of the experimental data departs from this function with the emergence of a superlinear regime that suggests the onset of photocavitation. Panel d zooms into the data in panel c and highlights the loss of photoacoustic efficiency at increasing BSA content in the limit of lower fluence; (e) relative efficiency of photoacoustic conversion extracted from the analytical fit in panel d. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

tation starts to come into play over a timescale of hours at rest. However, a longitudinal band is still visible and useful for photoacoustic experiments.

Fig. 3c displays the effect of a biological adlayer on the efficiency of photoacoustic conversion of gold nanorods. Curves become more complex with an earlier appearance of a superlinear regime that relates to stochastic and nonlinear events, such as photocavitation [19–21]. Fingerprints of vapor microbubbles and their collapse were also detected in the experimental records as a pressure burst with anomalous delay and oscillations with respect to the principal maximum (see Fig. S3 in Supplementary material) [65,66]. We ascribe this complexity to the onset of particle aggre-

gation, which lowers the threshold for photocavitation [67]. In any case, a quantitative parameterization of these curves gets more complicated. However, an initial trend to lose efficiency of photoacoustic conversion with thickness of the adlayer is clear, as shown in Fig. 3d, which highlights the trend of PA signal in the linear regime at lower fluence. Fig. 3e reports the corresponding slopes normalised to the value of gold nanorods without BSA. We observed a decrease from (1.00 ± 0.06) to (0.85 ± 0.05) for the sample containing 0.1 % BSA down to (0.63 ± 0.04) for that with 1 % BSA. According to Fig. 1a, we expect that a regime of optical pulses shorter than those available in our labs may emphasize these differences, and provide even more sensitivity to the adsorption of macromolecules for applications in biosensing.

Plasmonic particles as gold nanorods have been proposed in a broad variety of biosensors that exploit their sensitivity to their dielectric landscape, as in localized Surface Plasmon Resonance (SPR) methods [68–70], or their ability to enhance Raman transitions of a molecular adsorbate, as in Surface-Enhanced Raman Spectroscopy (SERS) [71–75]. In either case, the molecular target needs to come to very close proximity of particle surface, say within a distance shorter than particle diameter, in order to overlap the outer decay of the plasmonic mode. This condition complicates the implementation of mainstream approaches, such as immunohistochemistry, which typically require the use of a cross linker that may also ensure colloidal stability, such as 5000-g mol^{-1} PEG [76,77,61], a molecular ligand, such as an antibody, the molecular target in question, and maybe also secondary antibodies. The final architecture may bring the analyte or tag of interest too far from particle surface for proper identification. Instead, the notion to exploit an effective variation of Kapitza resistance in a thermal transducer, together with a photoacoustic readout, is a new idea that may mitigate the need to compact the molecular system for capture, and open new scenarios in biosensing.

4. Conclusions

In conclusion, we have addressed the effect of Kapitza resistance at the gold-water interface on the efficiency and stability of photoacoustic conversion from gold nanorods. According to our numerical simulations, a decrease of Kapitza resistance is beneficial for both parameters and may synergize with current strategies to enhance the performance of photoacoustic platforms. In particular, in the case of optical pulses shorter than about 1 ns, a lower value of Kapitza resistance may help to consolidate the enhancement of photoacoustic pressure, and to simultaneously delay the damage threshold of the contrast agent. We took an effective approach to the modulation of Kapitza resistance with extrinsic parameters. We showed that rough gold nanorods produced by the deposition and galvanic replacement of a silver shell yielded both higher signals by 70% and damage threshold by 120% in our batch, which seems to be a worthwhile direction to optimize the contrast agent. In addition, we found that particles coated with a protein corona exhibit lower signals, which tend to decrease with shell thickness. We believe that this notion deserves more investigation for a new kind of biosensor based on photoacoustic transduction, which may tolerate complex architectures to gain binding affinity, such as those used in immunohistochemistry, better than SERS or colorimetric systems. We ascribed both findings to a modulation of Kapitza resistance, which undergoes an effective decrease upon roughening, due to an increase of specific surface area as a nanoscale analog of a radiator, and a relative increase upon coating with a protein shell that may act as a thermal insulation.

In the future, we wish to translate these results from a regime of pulse duration of the optical trigger of few ns to well below 1 ns, in

order to verify our expectation of a bigger effect of Kapitza resistance. We are confident that our concepts will inspire more work on the modulation of relevant parameters at the interface between plasmonic particles and their environment for photothermal and photoacoustic applications.

Author contributions

Lucia Cavigli performed and interpreted the optical and photoacoustic characterization of the particles, and contributed to the discussion of the results; Alessio Milanese and Sonia Centi undertook the synthesis of all particles and analyzed their hydrodynamic size; Fulvio Ratto coordinated the work, performed the numerical simulations, and drafted the manuscript; Boris Khlebtsov designed the protocols for the synthesis of rough gold nanorods, and provided for their TEM analysis; and Nikolai Khlebtsov and Roberto Pini contributed to the discussion of the results and perspectives.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

This work is partially supported by a collaborative grant from National Research Council Italy and Russian Foundation for Basic Research, project “HYPNOSYS” (18-52-7803).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2020.05.108>.

References

- [1] X. Huang, P.K. Jain, I.H. El-Sayed, M.A. El-Sayed, Plasmonic photothermal therapy (phtt) using gold nanoparticles, *Lasers Med. Sci.* 23 (2008) 217.
- [2] R.S. Riley, E.S. Day, Gold nanoparticle-mediated photothermal therapy: applications and opportunities for multimodal cancer treatment, *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* 9 (2017) e1449.
- [3] M. Xu, L.V. Wang, Photoacoustic imaging in biomedicine, *Rev. Sci. Instrum.* 77 (2006) 041101.
- [4] L. Wang, Multiscale photoacoustic microscopy and computed tomography, *Nature Photon.* 3 (2009) 503–509.
- [5] V. Gujrati, A. Mishra, V. Ntziachristos, Molecular imaging probes for multi-spectral optoacoustic tomography, *Chem. Commun.* 53 (2017) 4653–4672.
- [6] T. Agano, M.K.A. Singh, R. Nagaoka, K. Awazu, Effect of light pulse width on frequency characteristics of photoacoustic signal—an experimental study using a pulse-width tunable led-based photoacoustic imaging system, *Int. J. Res. Eng. Technol.* 7 (2018) 4300–4303.
- [7] L. Cavigli, M. de Angelis, F. Ratto, P. Matteini, F. Rossi, S. Centi, F. Fusi, R. Pini, Size affects the stability of the photoacoustic conversion of gold nanorods, *J. Phys. Chem. C* 118 (2014) 16140–16146.
- [8] Y. Shi, S. Yang, D. Xing, Quantifying the plasmonic nanoparticle size effect on photoacoustic conversion efficiency, *J. Phys. Chem. C* 121 (2017) 5805–5811.
- [9] Y.S. Chen, Y. Zhao, S.J. Yoon, S.S. Gambhir, S. Emelianov, Miniature gold nanorods for photoacoustic molecular imaging in the second near-infrared optical window, *Nat. Nanotechnol.* 14 (2019) 465–472.
- [10] O.B. Knights, S. Ye, N. Ingram, S. Freear, J.R. McLaughlan, Optimising gold nanorods for photoacoustic imaging in vitro, *Nanoscale Adv.* 1 (2019) 1472–1481.
- [11] L.V. Wang, *Photoacoustic Imaging and Spectroscopy*, CRC Press, Boca Raton, 2009.
- [12] A. Bassi, D. Brida, C. D’Andrea, G. Valentini, R. Cubeddu, S.D. Silvestri, G. Cerullo, Time-gated optical projection tomography, *Opt. Lett.* 35 (2010) 2732–2734.
- [13] S. Link, C. Burda, B. Nikoobakht, M.A. El-Sayed, Laser-induced shape changes of colloidal gold nanorods using femtosecond and nanosecond laser pulses, *J. Phys. Chem. C* 104 (2000) 6152–6163.
- [14] H. Petrova, J. Perez Juste, I. Pastoriza-Santos, G.V. Hartland, L.M. Liz-Marzán, P. Mulvaney, On the temperature stability of gold nanorods: comparison between thermal and ultrafast laser-induced heating, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 8 (2006) 814–821.
- [15] L. Cavigli, A. Cini, S. Centi, C. Borri, S. Lai, F. Ratto, M. de Angelis, R. Pini, Photostability of gold nanorods upon endosomal confinement in cultured cells, *J. Phys. Chem. C* 121 (2017) 6393–6400.
- [16] A. Plech, S. Ibrahimkuty, S. Reich, G. Newby, Thermal dynamics of pulsed-laser excited gold nanorods in suspension, *Nanoscale* 9 (2017) 17284–17292.
- [17] X.-D. Zhang, D. Wu, X. Shen, P.-X. Liu, F.-Y. Fan, S.-J. Fan, In vivo renal clearance, biodistribution, toxicity of gold nanoclusters, *Biomaterials* 33 (2012) 4628–4638.
- [18] D. Cassano, M. Summa, S. Pocovi-Martínez, A.-K. Mapanao, T. Catelani, R. Bertorelli, V. Voliani, Biodegradable ultrasmall-in-nano gold architectures: Mid-period in vivo distribution and excretion assessment, Part. Part. Syst. Charact. 36 (2019) 1800464.
- [19] V. Pustovalov, A. Smetannikov, V. Zharov, Photothermal and accompanied phenomena of selective nanophotothermolysis with gold nanoparticles and laser pulses, *Laser Phys. Lett.* 5 (2008) 775–792.
- [20] H. Ju, R.A. Roy, T.W. Murray, Gold nanoparticle targeted photoacoustic cavitation for potential deep tissue imaging and therapy, *Biomed. Opt. Express* 4 (2013) 66–76.
- [21] L. Cavigli, S. Centi, C. Borri, P. Tortoli, I. Panettieri, I. Streit, D. Ciofini, G. Magni, F. Rossi, S. Siano, F. Ratto, R. Pini, 1064-nm-resonant gold nanorods for photoacoustic theranostics within permissible exposure limits, *J. Biophotonics* (2019) e201900082.
- [22] G.L. Pollack, Kapitza resistance, *Rev. Mod. Phys.* 41 (1969) 48–81.
- [23] J. Vera, Y. Bayazitoglu, Temperature and heat flux dependence of thermal resistance of water/metal nanoparticle interfaces at sub-boiling temperatures, *J. Heat Mass Transf.* 86 (2015) 433–442.
- [24] H. Hu, Y. Sun, Effect of nanopatterns on kapitza resistance at a water-gold interface during boiling: A molecular dynamics study, *J. Appl. Phys.* 112 (2012) 053508.
- [25] M.G. Gonzalez, E.O. Acosta, G.D. Santiago, Determination of the thermal boundary conductance of gold nanoparticles in aqueous solution using a method based on nanobubble generation, *Appl. Opt.* 57 (2018) 6229–6232.
- [26] X. Chen, A. Munjiza, K. Zhang, D. Wen, Molecular dynamics simulation of heat transfer from a gold nanoparticle to a water pool, *J. Phys. Chem. C* 118 (2014) 1285–1293.
- [27] J. Lombard, T. Biben, S. Merabia, Kinetics of nanobubble generation around overheated nanoparticles, *Phys. Rev. Lett.* 112 (2014) 105701.
- [28] T. Stoll, P. Maioli, A. Crut, S. Rodal-Cedeira, I. Pastoriza-Santos, F. Vallée, N. Del Fatti, Time-resolved investigations of the cooling dynamics of metal nanoparticles: Impact of environment, *J. Phys. Chem. C* 119 (2015) 12757–12764.
- [29] Y.-S. Chen, W. Frey, S. Kim, P. Kruizinga, K. Homan, S. Emelianov, Silica-coated gold nanorods as photoacoustic signal nanoamplifiers, *Nano Lett.* 11 (2011) 348–354.
- [30] K. Metwally, S. Mensah, G. Baffou, Fluence threshold for photothermal bubble generation using plasmonic nanoparticles, *J. Phys. Chem. C* 119 (2015) 28586–28596.
- [31] S. Wang, L. Fu, Y. Zhang, J. Wang, Z. Zhang, Quantitative evaluation and optimization of photothermal bubble generation around overheated nanoparticles excited by pulsed lasers, *J. Phys. Chem. C* 122 (2018) 24421–24435.
- [32] G.A. Pang, F. Poisson, J. Laufer, C. Haisch, E. Bossy, Theoretical and experimental study of photoacoustic excitation of silica-coated gold nanospheres in water, *J. Phys. Chem. C* 124 (2020) 1088–1098.
- [33] G. Frigenti, L. Cavigli, A. Fernández-Bienes, F. Ratto, S. Centi, T. García-Fernández, G. Nunzi Conti, S. Soria, Resonant microbubble as a microfluidic stage for all-optical photoacoustic sensing, *Phys. Rev. Appl.* 12 (2019) 014062.
- [34] M.N. Cristiano, T.V. Tsoulos, L. Fabris, Quantifying and optimizing photocurrent via optical modeling of gold nanostar-, nanorod-, and dimer-decorated mos2 and mote2, *J. Chem. Phys.* 152 (2020) 014705.
- [35] J. Pérez-Juste, I. Pastoriza-Santos, L.M. Liz-Marzán, P. Mulvaney, Gold nanorods: Synthesis, characterization and applications, *Coord. Chem. Rev.* 249 (2005) 1870–1901. 36th International Conference on Coordination Chemistry, Merida, Mexico, July 2004.
- [36] F. Ratto, P. Matteini, A. Cini, S. Centi, F. Rossi, F. Fusi, R. Pini, Cw laser-induced photothermal conversion and shape transformation of gold nanodendrites in hydrated chitosan films, *J. Nanoparticle Res.* 13 (2011) 4337–4348.
- [37] F. Ratto, E. Witort, F. Tatini, S. Centi, L. Lazzari, F. Carta, M. Lulli, D. Vullo, F. Fusi, C.T. Supuran, A. Scozzafava, S. Capaccioli, R. Pini, Plasmonic particles that hit hypoxic cells, *Adv. Funct. Mater.* 25 (2015) 316–323.
- [38] L. Vigderman, E.R. Zubarev, High-yield synthesis of gold nanorods with longitudinal spr peak greater than 1200 nm using hydroquinone as a reducing agent, *Chem. Mater.* 25 (2013) 1450–1457.
- [39] B. Khlebtsov, V. Khanadeev, N. Khlebtsov, Surface-enhanced raman scattering inside au@ag core/shell nanorods, *Nano Res.* 9 (2016) 2303–2318.
- [40] B.N. Khlebtsov, D.N. Bratashov, N.G. Khlebtsov, Tip-functionalized au@ag nanorods as ultrabright surface-enhanced raman scattering probes for bioimaging in off-resonance mode, *J. Phys. Chem. C* 122 (2018) 17983–17993.
- [41] X. Lu, H.-Y. Tuan, J. Chen, Z.-Y. Li, B.A. Korgel, Y. Xia, Mechanistic studies on the galvanic replacement reaction between multiply twinned particles of ag and hauc4 in an organic medium, *J. Am. Chem. Soc.* 129 (2007) 1733–1742.
- [42] X. Lu, J. Chen, S.E. Skrabalak, Y. Xia, Galvanic replacement reaction: A simple and powerful route to hollow and porous metal nanostructures, *Proc. Inst. Mech. Eng. N* 221 (2007) 1–16.

- [43] A.G.M. da Silva, T.S. Rodrigues, S.J. Haigh, P.H.C. Camargo, Galvanic replacement reaction: recent developments for engineering metal nanostructures towards catalytic applications, *Chem. Commun.* 53 (2017) 7135–7148.
- [44] V.A. Khanadeev, N.G. Khlebtsov, A.M. Burov, B.N. Khlebtsov, Tuning of plasmon resonance of gold nanorods by controlled etching, *Colloid J.* 77 (2015) 652–660.
- [45] S. Yoon, C. Kim, B. Lee, J.H. Lee, From a precursor to an etchant: spontaneous inversion of the role of Au(III) chloride for one-pot synthesis of smooth and spherical gold nanoparticles, *Nanoscale Adv.* 1 (2019) 2157–2161.
- [46] F. Tatini, I. Landini, F. Scaletti, L. Massai, S. Centi, F. Ratto, S. Nobili, G. Romano, F. Fusi, L. Messori, E. Mini, R. Pini, Size dependent biological profiles of pegylated gold nanorods, *J. Mater. Chem. B* 2 (2014) 6072–6080.
- [47] T. Cedervall, I. Lynch, S. Lindman, T. Berggård, E. Thulin, H. Nilsson, K.A. Dawson, S. Linse, Understanding the nanoparticle–protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104 (2007) 2050–2055.
- [48] L. Wang, J. Li, J. Pan, X. Jiang, Y. Ji, Y. Li, Y. Qu, Y. Zhao, X. Wu, C. Chen, Revealing the binding structure of the protein corona on gold nanorods using synchrotron radiation-based techniques: Understanding the reduced damage in cell membranes, *J. Am. Chem. Soc.* 135 (2013) 17359–17368.
- [49] M.H. Cui, R.X. Liu, Z.Y. Deng, G.L. Ge, Y. Liu, L.M. Xie, Quantitative study of protein coronas on gold nanoparticles with different surface modifications, *Nano Res.* 7 (2014) 345–352.
- [50] F. Scaletti, A. Feis, S. Centi, R. Pini, V.M. Rotello, L. Messori, Tuning the interactions of peg-coated gold nanorods with BSA and model proteins through insertion of amino or carboxylate groups, *J. Inorg. Biochimica* 150 (2015) 120–125.
- [51] R. Nicora, M. Ilie, A. Uiflean, C.A. Iuga, F. Loghin, Quantification of the pegylated gold nanoparticles protein corona: influence on nanoparticle size and surface chemistry, *Appl. Sci.* 9 (2019).
- [52] L. Cavigli, F. Micheletti, P. Tortoli, S. Centi, S. Lai, C. Borri, F. Rossi, F. Ratto, R. Pini, Light activated microbubbles for imaging and microsurgery, *Proc. SPIE* 10064 (2017), 1006457–1006457–7.
- [53] D.A. Nedosekin, T. Fahmi, Z.A. Nima, J. Nolan, C. Cai, M. Sarimollaoglu, E. Dervishi, A. Basnakan, A.S. Biris, V.P. Zharov, Photoacoustic flow cytometry for nanomaterial research, *Photoacoustics* 6 (2017) 16–25.
- [54] S. Lai, S. Centi, C. Borri, F. Ratto, L. Cavigli, F. Micheletti, B. Kemper, S. Ketelhut, T. Kozyreva, L. Gonnelli, F. Rossi, S. Colagrande, R. Pini, A multifunctional organosilica cross-linker for the bio-conjugation of gold nanorods, *Colloids Surf. B* 157 (2017) 174–181.
- [55] A.M. Fales, W.C. Vogt, K.A. Wear, I.K. Ilev, T.J. Pfeifer, Pulsed laser damage of gold nanorods in turbid media and its impact on multi-spectral photoacoustic imaging, *Biomed. Opt. Express* 10 (2019) 1919–1934.
- [56] L. Cavigli, S. Centi, S. Lai, C. Borri, F. Micheletti, P. Tortoli, I. Panettieri, I. Streit, F. Rossi, F. Ratto, R. Pini, Light-activated microbubbles around gold nanorods for photoacoustic microsurgery, *Proc. SPIE* 10494 (2018) 10494–10494 – 6.
- [57] H. Hu, Y. Sun, Effect of nanopatterns on kapitza resistance at a water-gold interface during boiling: A molecular dynamics study, *J. Appl. Phys.* 112 (2012) 053508.
- [58] S. Merabia, K. Termentzidis, Thermal boundary conductance across rough interfaces probed by molecular dynamics, *Phys. Rev. B* 89 (2014) 054309.
- [59] H. Vanrompay, E. Bladt, W. Albrecht, A. Béché, M. Zakhozheva, A. Sánchez-Iglesias, L.M. Liz-Marzán, S. Bals, 3d characterization of heat-induced morphological changes of Au nanostars by fast in situ electron tomography, *Nanoscale* 10 (2018) 22792–22801.
- [60] S. Centi, G. Messina, S. Tombelli, I. Palchetti, M. Mascini, Different approaches for the detection of thrombin by an electrochemical aptamer-based assay coupled to magnetic beads, *Biosens. Bioelectron.* 23 (2008) 1602–1609.
- [61] S. Centi, F. Ratto, F. Tatini, S. Lai, R. Pini, Ready-to-use protein g-conjugated gold nanorods for biosensing and biomedical applications, *J. Nanobiotechnol.* 16 (2018) 5.
- [62] K. Zhang, G. Liu, E.M. Goldys, Robust immunosensing system based on biotin-streptavidin coupling for spatially localized femtogram ml⁻¹ level detection of interleukin-6, *Biosens. Bioelectron.* 102 (2018) 80–86.
- [63] S. Mariani, S. Scarano, J. Spadavecchia, M. Minunni, A reusable optical biosensor for the ultrasensitive and selective detection of unamplified human genomic DNA with gold nanostars, *Biosens. Bioelectron.* 74 (2015) 981–988.
- [64] M. Mazzoni, F. Ratto, C. Fortunato, S. Centi, F. Tatini, R. Pini, Partial decoupling in aggregates of silanized gold nanorods, *J. Phys. Chem. C* 118 (2014) 20018–20025.
- [65] M. Kitz, S. Preisser, A. Wetterwald, M. Jaeger, G.N. Thalmann, M. Frenz, Vapor bubble generation around gold nanoparticles and its application to damaging of cells, *Biomed. Opt. Express* 2 (2011) 291–304.
- [66] S. Peeters, M. Kitz, S. Preisser, A. Wetterwald, B. Rothen-Rutishauser, G.N. Thalmann, C. Brandenberger, A. Bailey, M. Frenz, Mechanisms of nanoparticle-mediated photomechanical cell damage, *Biomed. Opt. Express* 3 (2012) 435–446.
- [67] E. Lukianova-Hleb, Y. Hu, L. Latterini, L. Tarpani, S. Lee, R.A. Drezek, J.H. Hafner, D.O. Lapotko, Plasmonic nanobubbles as transient vapor nanobubbles generated around plasmonic nanoparticles, *ACS Nano* 4 (2010) 2109–2123.
- [68] E.M. Larsson, J. Alegret, M. Käll, D.S. Sutherland, Sensing characteristics of NIR localized surface plasmon resonances in gold nanorings for application as ultrasensitive biosensors, *Nano Lett.* 7 (2007) 1256–1263.
- [69] J. Cao, T. Sun, K.T. Grattan, Gold nanorod-based localized surface plasmon resonance biosensors: A review, *Sens. Actuators B-Chem.* 195 (2014) 332–351.
- [70] S. Scarano, E. Pascale, P. Palladino, E. Fratini, M. Minunni, Determination of fermentable sugars in beer wort by gold nanoparticles@polydopamine: A layer-by-layer approach for localized surface plasmon resonance measurements at fixed wavelength, *Talanta* 183 (2018) 24–32.
- [71] Y. Wang, S. Guo, H. Chen, E. Wang, Facile fabrication of large area of aggregated gold nanorods film for efficient surface-enhanced Raman scattering, *J. Colloid Interface Sci.* 318 (2008) 82–87.
- [72] B. Sharma, M. Fernanda Cardinal, S.L. Kleinman, N.G. Greeneltch, R.R. Frontiera, M.G. Blaber, G.C. Schatz, R.P. Van Duyne, High-performance SERS substrates: advances and challenges, *MRS Bulletin* 38 (2013) 615–624.
- [73] M.Y. Tsvetkov, B.N. Khlebtsov, V.A. Khanadeev, V.N. Bagratashvili, P.S. Timashev, M.I. Samoylovich, N.G. Khlebtsov, SERS substrates formed by gold nanorods deposited on colloidal silica films, *Nanoscale Res. Lett.* 8 (2013) 250.
- [74] B.N. Khlebtsov, V.A. Khanadeev, E.V. Panfilova, D.N. Bratashov, N.G. Khlebtsov, Gold nanostars as reproducible SERS substrates for highly sensitive detection of fungicides, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 7 (2015) 6518–6529.
- [75] C. Hamon, L.M. Liz-Marzán, Colloidal design of plasmonic sensors based on surface enhanced Raman scattering, *J. Colloid Interface Sci.* 512 (2018) 834–843.
- [76] N. Bogliotti, B. Oberleitner, A. Di-Cicco, F. Schmidt, J.-C. Florent, V. Semetey, Optimizing the formation of biocompatible gold nanorods for cancer research: Functionalization, stabilization and purification, *J. Colloid Interface Sci.* 357 (2011) 75–81.
- [77] B. Thierry, H.J. Griesser, Dense PEG layers for efficient immunotargeting of nanoparticles to cancer cells, *J. Mater. Chem.* 22 (2012) 8810–8819.

Supplementary material

Impact of Kapitza resistance on the stability and efficiency of photoacoustic conversion from gold nanorods

Lucia Cavigli^a, Alessio Milanese^{a,b}, Boris N. Khlebtsov^c, Sonia Centi^a, Fulvio Ratto^{a,*}, Nikolai G. Khlebtsov^{c,d} and Roberto Pini^a

^a Istituto di Fisica Applicata Nello Carrara, IFAC-CNR, Via Madonna del Piano 10, Sesto Fiorentino 50019, Italy

^b Dipartimento di Chimica 'Ugo Schiff', Università degli Studi di Firenze, Via della Lastruccia, 3-13, 50019 Sesto Fiorentino (FI), Italy

^c Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, 13 Prospekt Entuziastov, Saratov 410049, Russia

^d Saratov State University, 83 Ulitsa Astrakhanskaya, Saratov 410026, Russia

* Corresponding author: f.ratto@ifac.cnr.it; ORCID(s): 0000-0001-6721-9486

1. Simulations

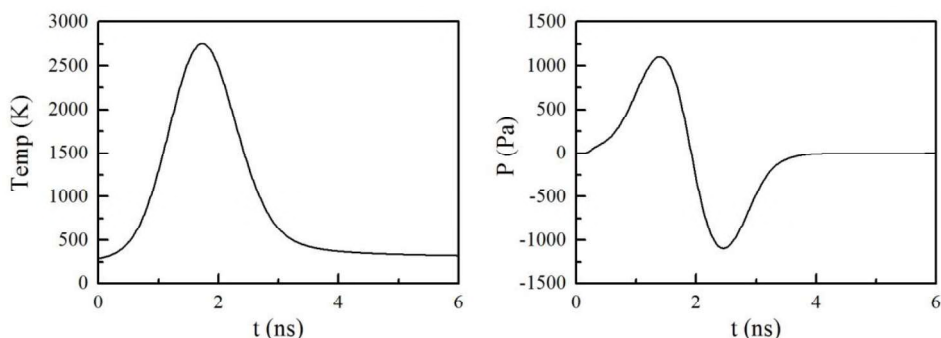


Figure S1: representative results of a numerical simulation for a pulse duration of 1 ns, particle radius of 5 nm, and Kapitza resistance at the gold-water interface of $1 \times 10^{-8} \text{ m}^2 \times \text{K/W}$: average temperature within the gold nanorod (left panel) and average pressure 1 μm away of the gold nanorod (right panel).

We used COMSOL Multiphysics® (Stockholm, Sweden) as a finite element method ecosystem to simulate the photoacoustic conversion from a single gold nanorod ab initio as a cascade of multiple steps, i.e. photo-thermal conversion, thermal propagation, thermo-elastic conversion, and acoustic propagation, which is a combination of the fundamental processes involved in the photoacoustic conversion [1].

The geometry of the simulation consisted of a gold nanorod in the center of an aqueous sphere with radius 20% larger than the product of total timeframe and speed of sound, accounted for cylindrical symmetry with axis parallel to particle stem and plane symmetry across particle equator, and so neglected the break of symmetry along the optical axis.

In the computational routine, we made use of the modules named Heat Transfer in Fluids and Pressure Acoustics (Transient), and added relevant equations. In particular, the photo-thermal conversion was set up by defining a homogeneous heat source Q [W/m³] within the rod, as $Q = \sigma \times I/V$, where σ [m²] is cross section of optical absorbance of a rod oriented parallel to the optical polarization, I [W/m²] is power density of the optical pulse exhibiting Gaussian temporal profile, and V [m³] is particle volume. σ was retrieved from a preliminary simulation performed in the frequency domain for a rod with radius $r = 5$ nm and immersed in water, according to the prescriptions of ref [2]. Then, we assumed the outcome of Mie-Gans theory that σ scales with volume, such that, for a rod with radius $r = R$, $\sigma_{r=R} = \sigma_{r=5\text{ nm}} \times R^3/(5\text{ nm})^3$, which holds in the limit of smaller particles. Also, we treated the inhomogeneity of dissipation of optical power within the rod as an underresolved feature, because heat diffusion within gold is much faster than any other process at play (1.27×10^{-4} m²/s, or about 10 ps to cover the full extent of particle size). This assumption simultaneously allows us to implement the cylindrical symmetry, and the homogeneous spreading of the heat source across particle volume. Kapitza resistance was inputted as boundary condition at the gold-water interface.

The thermo-elastic conversion was described by defining a monopole pressure source Q_m [s⁻²] within the module named Pressure Acoustics (Transient), as $Q_m = \alpha/\rho \times v^2 d^2T/dt^2$, where $\alpha = dP/dT$ [Pa/K] is a pressure-temperature coupling parameter, ρ [Kg/m³] is density, v [m/s] is speed of sound, T is temperature and t is time [1]. The gold-water interface and the outer wall were both treated as a hard wall, which reflects the impedance mismatch between gold and water in the former case, and is irrelevant in the latter case, because the pressure burst never comes to reach that boundary.

The simulation returns multiple dependents, including the distributions of temperature everywhere and of pressure in the aqueous domain, as a function of time. We averaged temperature within the rod and pressure over a spherical surface centered in the particle center and with radius 1 μm , which is far enough for the wavefront of the pressure transient to approximate a sphere. Then, for the sake of comparison among particles with different radii, we rescaled pressure as $\tilde{P} = P \times (5\text{ nm})^3/R^3$, so as to reflect systems with the same amount of gold and the same optical absorbance.

Figure S1 provides representative examples of these variables, which we used to extract the values of max temperature within the rod and peak-to-peak amplitude of photoacoustic pressure.

2. Photoacoustic signals

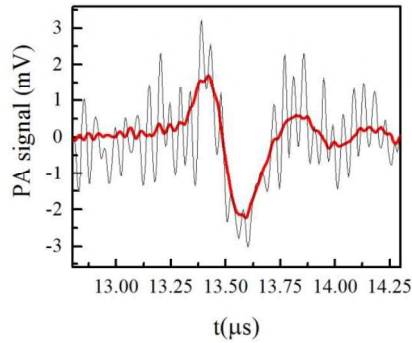


Figure S2: comparison between a single photoacoustic transient and an average over 100 pulses recorded at a fluence of the optical excitation around 1 mJ/cm^2 . After averaging, the peak-to-peak amplitude is measured with signal-to-noise ratio around 100.

Figure S2 compares photoacoustic transients for a single event and averaged over 100 pulses, in the case of as-synthesized gold nanorods excited with optical fluence on the lower limit of the scanned interval. Averaging proves to be critical to minimize the incidence of white and electrical noise, and to achieve signal-to-noise ratios in excess of 100. Peak-to-peak amplitudes were worked out from these average signals, in order to analyze the efficiency and stability of photoacoustic conversion.

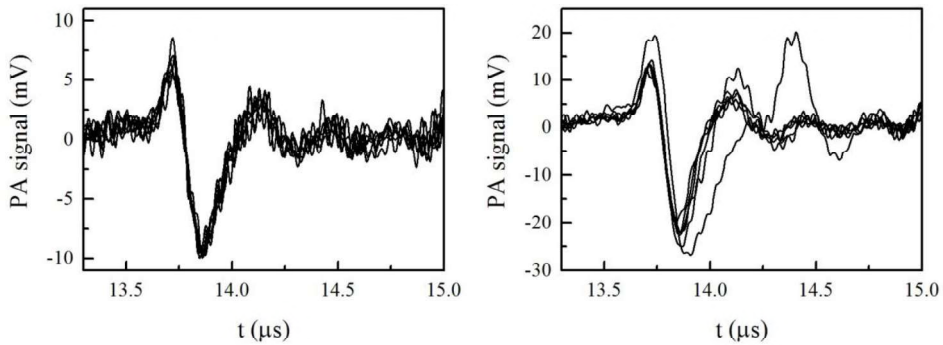


Figure S3: comparison between 6 single shots at an optical fluence of 18 mJ/cm^2 (left panel) or 37 mJ/cm^2 (right panel) for a sample containing 1% BSA. At the higher level of optical excitation, there appear anomalous transients that fluctuate in intensity, delay and ratio of adjacent oscillations

Figure S3 displays typical profiles of pressure transients recorded for BSA-coated gold nanorods, in the absence or the presence of photocavitation.

In the case of particles coated with 1% BSA, we found clear fingerprints of photocavitation already in the analysis of single events.

In our previous work, we found that the most distinctive sign of photocavitation was an additional pressure burst recorded a few μs after the principal transient, and corresponded to the collapse of vapor microbubbles. Its features differed from a simple reflection, both in that its appearance was

stochastic and fluctuated in delay and intensity, and its polarity was the same as the principal transient, at variance with the effect of a single bounce.

Here, confinement within the rigid walls of a flow chamber seems to modify the sign of photocavitation, which shows up as a stochastic deformation of the principal transient that shifts in delay and intensity, and displays an anomalous pattern of oscillations that often fail to monotonically fade out, as it happens in the standard case. We hypothesize that the presence of the rigid walls may modify the dynamics of bubble expansion and collapse, and cause the latter to overlap with normal reflections. In the future, we will delve more into these dynamics, in order to understand their relevance for a new generation of biosensors based on particle aggregation.

3. *Roughness of roughened gold nanorods*

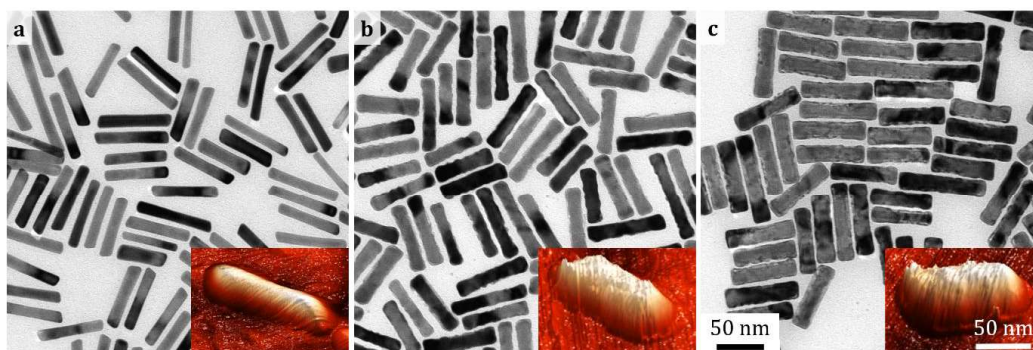


Figure S4: Typical TEM and AFM images (insets) of initial gold nanorods (a) and rough gold nanorods obtained by galvanic replacement of silver shells prepared by dosing 85% (b) or 170% (c) of AgNO_3 with respect to the nominal amount of gold.

Figure S4 displays representative TEM and Atomic Force Microscopy (AFM) images of our gold nanorods before and after implementation of a rough coating. Samples were prepared for AFM analysis by centrifugation, washing with water and drop-drying on Si wafers. AFM images were acquired with a SolverBio microscope from NT-MDT Spectrum Instruments (Moscow, Russia) equipped with a special cantilever with tip radius around 1 nm designed for samples with height distribution below 20 nm. We performed an AFM study of the roughness of single particles [3] ($N = 10$) that shows a trend from (1.4 ± 0.4) nm for the initial gold nanorods, to (2.7 ± 1) and (3.2 ± 1.4) nm for rough particles obtained by galvanic replacement of silver shells prepared by dosing 85% and 170% of AgNO_3 with respect to the nominal amount of gold.

In order to qualitatively corroborate the trend of roughness, we performed a Surface Enhanced Raman Scattering (SERS) analysis of a small thiol bound to the different particles. 2 mL of each sample at the same particle concentration by number were mixed with 60 μL of 2 mM 4-Nitrobenzenethiol (NBT) solution in ethanol and incubated for 2 hrs at room temperature. Thereafter, samples were centrifuged and thoroughly washed with 5 mM aqueous cetrimonium chloride. SERS spectra were measured in colloidal suspension with a Peak Seeker Pro 785 Raman spectrometer from Ocean Optics

(Largo, FL, USA) in 1 cm quartz cuvettes. Laser power was 30 mW and acquisition interval was 10 s. In order to exclude the effect of inner filtration, the laser beam was focused near the wall of the cuvette.

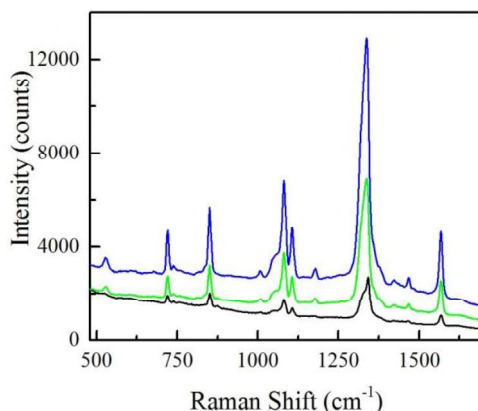


Figure S5: SERS spectra of NBT adsorbed on gold nanorods without modification (black line) or roughened from a silver shell amounting to 85% (green line), or 170% (blue line) of nominal gold molarity. All spectra are shown as measured without background correction.

Figure S5 shows SERS spectra of NBT adsorbed on the smooth and roughened gold nanorods. We observe a sharp increase of SERS intensity with thickness of the rough coating. The reason is twofold, i.e. an increase of specific surface area of the particulate, and therefore of the number of adsorbed NBT molecules, and the creation of a large number of hotspots upon roughening of the particles. Therefore, these results collectively corroborate the increase of roughness of our samples upon addition and oxidative etching of a silver shell.

REFERENCES

- [1] L. V. Wang, Photoacoustic Imaging and Spectroscopy, CRC Press, Boca Raton, 2009
- [2] L. Cavigli, A. Cini, S. Centi, C. Borri, S. Lai, F. Ratto, M. de Angelis, R. Pini, Photostability of gold nanorods upon endosomal confinement in cultured cells, *J. Phys. Chem. C* 121 (2017) 6393–6400.
- [3] M. Christensen, J. T. Rasmussen, A. C. Simonsen, Roughness analysis of single nanoparticles applied to atomic force microscopy images of hydrated casein micelles, *Food Hydrocolloid* 45 (2015) 168–174.

Appendice

In questa seconda parte di ricerca è stato affrontato l'effetto della resistenza termica all'interfaccia oro-acqua, o resistenza di Kapitza, sulle prestazioni di conversione fotoacustica dei nanorods d'oro. È stato suggerito un approccio efficace a modulare la resistenza di Kapitza includendo caratteristiche come la rugosità o la presenza di adsorbati. Con questa idea, è stata sintetizzata una variante rugosa di nanorods d'oro mediante deposizione e successiva sostituzione galvanica di un guscio d'argento, dove la rugosità fornisce segnali fotoacustici più elevati di circa 70% e soglie di danno del 120%.

Inoltre, le particelle sono state ricoperte con un guscio proteico di BSA e troviamo una diminuzione dei segnali fotoacustici con lo spessore del guscio, che potrebbe ispirare nuove soluzioni per biosensori basati su un meccanismo di trasduzione fotoacustica.

Questi risultati sono stati attribuiti ad un'efficace modulazione della resistenza di Kapitza, che diminuisce con l'irruvidimento, a causa di un aumento di superficie specifica, e aumenta dopo il rivestimento con un guscio proteico che può fungere da isolamento termico.

4

APPLICAZIONI DEI GNRs NEL WOUND HEALING

4.1 GNRs inclusi in idrogel ibridi

La nanotecnologia ha reso un tale impatto nei campi convergenti dell'ingegneria dei tessuti e la guarigione delle ferite¹⁻⁶. Tra i tanti incroci di queste discipline, la moltiplicazione della funzionalità di scaffold o patch biomimetici è una prospettiva ricorrente. In questo contesto, recentemente, è cresciuto l'interesse per il potenziamento di idrogel biopolimerici con nanoparticelle di metalli nobili⁷⁻¹³ assegnate a molteplici funzioni. Per esempio, in una vasta serie di documenti e brevetti¹⁴⁻¹⁷, è stato proposto di sfruttare le caratteristiche plasmoniche di nanoparticelle di Au in idrogel fisici di chitosano per la medicazione di ferite, rilascio controllato di farmaci o entrambi. In particolare, i nanorods di oro mostrano intense bande di assorbanza ottica nella cosiddetta finestra terapeutica e supportano una conversione fototermica che si combina con le caratteristiche fisico-chimiche di un chitosano o un

idrogel composito per legare il tessuto endogeno o rilasciare principi attivi. Altri autori hanno proposto di ricorrere alle caratteristiche biochimiche delle nanoparticelle di Ag in molti scaffold tra cui idrogel fisici e fibre elettrofilate di chitosano/alcol polivinilico (PVA) per effetti antimicrobici¹⁸⁻²².

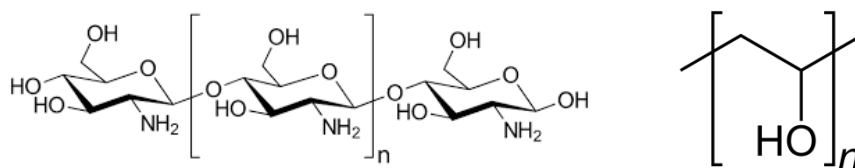


Figura 4.1: a) struttura del chitosano (a sinistra) e b) del poli-vinil-alcol (PVA) (a destra)

Le nanosfere di Ag rappresentano probabilmente il prodotto di maggior successo della nanomedicina per le loro proprietà antimicrobiche^{11,12,23-27}, che è un problema critico nella guarigione delle ferite. Il rilascio passivo e prolungato di cationi Ag⁺ da nanoparticelle di argento esercita una sorta di effetto citotossico sui microbi patogeni^{28,28} che hanno un basso potenziale a suscitare resistenza. Ma la combinazione di comportamento ottico e redox di questi materiali può servire anche per ulteriori compiti di interesse nella guarigione delle ferite. Questo è il caso della valutazione dello stress ossidativo mediante la misurazione del tasso di dissoluzione ossidativa di nanoparticelle di Ag²⁹⁻³⁶.

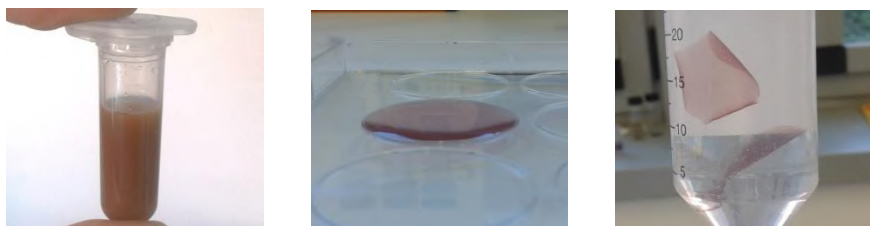


Figura 4.2: a) impasto di chitosano e PVA con all'interno GNRs rivestiti d'argento (a sinistra), b) impasto depositato in una multiwell di forma circolare (al centro), c) fantoccio biomimetico circolare ottenuto aggiungendo NaOH alla multiwell, che permette il distacco del fantoccio stesso (a destra)

La motivazione alla base di tutti questi sviluppi è una persistente richiesta di una migliore assistenza sanitaria nel contesto della gestione delle ferite. In particolare, nel caso della medicazione delle ferite, esiste una spinta di fondo per superare gli inconvenienti associati al tipo standard di cerotti adesivi, come l'incidenza delle reazioni da corpo estraneo, la permeabilità della riparazione, o l'onnipresente piaga delle infezioni microbiche. Inoltre, la sutura è una pratica delicata che può essere inadatta in alcune microstrutture anatomiche e procedure chirurgiche, dove la mancanza di alternative è davvero notevole ad un problema sostanziale. Esempi rilevanti includono, per esempio, diversi casi in Oftalmologia³⁷, come i trapianti dell'endotelio corneale^{38,39} o la chiusura della capsula del cristallino oculare⁴⁰ dopo la procedura Phaco-Ersatz, e in Neurochirurgia, come le microanastomosi dei vasi sanguigni⁴¹⁻⁴³ e nervi⁴⁴.

Un altro problema è la formazione di cicatrici. In questo contesto, la saldatura laser^{37,45,46} o saldatura^{5,47,48} da sola o in combinazione con impalcature biocompatibili rappresentano una direzione di speranza. Sono stati anche implementati materiali ibridi con dispersioni di indocianina verde approvati dalla FDA⁴³ o nanorods d'oro¹⁴⁻¹⁷ in un idrogel fisico di chitosano, dove i coloranti incorporati convertono un'emissione del vicino infrarosso in calore e il polisaccaride riscaldato reagisce e aderisce al tessuto connettivo¹⁴. Tra i problemi lasciati aperti citiamo la fotoinstabilità dell'indocianina verde⁴⁹ o l'instabilità termica dei coloranti plasmonici⁵⁰, la rigidità della struttura del chitosano che non riusciva a conformarsi facilmente a siti anatomici arbitrari, e una necessità generale di aggiungere più funzionalità e capacità di prognosi.

Il monitoraggio della guarigione delle ferite sta emergendo come un altro importante problema nella maggior parte dei contesti chirurgici. Il processo fisiologico è complesso e ancora non del tutto compreso, e coinvolge molteplici passaggi interdipendenti. Tuttavia, studi recenti hanno stabilito che le specie reattive dell'ossigeno (ROS) sono regolatori chiave e svolgono un ruolo cruciale, in modo che il livello di stress ossidativo può servire come parametro aggregato ai fini del monitoraggio⁵¹⁻⁵⁵. Nonostante la sua evidente citotossicità, il livello di perossido aumenta immediatamente dopo l'infortunio come parte critica della risposta fisiologica⁵⁶. Concentrazioni di H₂O₂ tra circa 100-500 µM sono correlati a un esito normale, mentre sia i livelli inferiori che quelli superiori

richiedono attenzione^{54,55}. Nell'intervallo ottimale, i ROS regolano il richiamo dei neutrofili e monociti durante la fase infiammatoria^{57,58}, sono coinvolti nelle vie di attivazione delle metalloproteinasi 1 e 2⁵⁹, e stimolano la proliferazione di fibroblasti, cheratinociti e cellule endoteliali vascolari, supportando così il processo di angiogenesi^{57,60,61}. Questi dati suggeriscono che i livelli basali di ROS nelle cellule sono essenziali per la progressione biologica, come la proliferazione e la differenziazione. Invece, livelli più alti complicano la rigenerazione di nuovo tessuto⁶². Nonostante la sua importanza, la determinazione dello stress ossidativo in vivo è difficile, ed è stato soggetto ad analisi indirette dei prodotti di ossidazione, come lipidi, proteine o DNA^{54,55}. In questo contesto, le nanosfere di Ag hanno attirato l'attenzione come un caso ideale dei tag ottici, perché il loro tasso di dissoluzione ossidativa aumenta con la concentrazione ambientale dei ROS²⁹⁻³⁶. È un peccato che la banda plasmonica delle nanosfere di Ag cada nella finestra blu, il che è problematico per le applicazioni biomediche e limita la profondità di penetrazione ottica a soli poche centinaia di micron.

Riferimenti bibliografici

1. Bettinger, C. J., Langer, R., Borenstein, J. T. Engineering substrate topography at the micro-and nanoscale to control cell function. *Angewandte Chemie International Edition* 2009, 48(30), 5406-5415.
2. Bhardwaj, N., Kundu, S. C. Electrospinning: a fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnology advances* 2010, 28(3), 325-347.
3. Dvir, T., Timko, B. P., Kohane, D. S., Langer, R. Nanotechnological strategies for engineering complex tissues. *Nature nanotechnology* 2011, 6(1), 13-22.
4. Ku, S. H., Lee, M., Park, C. B. Carbon-based nanomaterials for tissue engineering. *Advanced healthcare materials* 2013, 2(2), 244-260.
5. Frost, S. J., Mawad, D., Hook, J., Lauto, A. Micro-and Nanostructured Biomaterials for Sutureless Tissue Repair. *Advanced healthcare materials* 2016, 5(4), 401-414.

6. Haider, A., Haider, S., Kang, I. K. A comprehensive review summarizing the effect of electrospinning parameters and potential applications of nanofibers in biomedical and biotechnology. *Arabian Journal of Chemistry* 2018, 11(8), 1165-1188.
7. Banerjee, S., Das, R. K., Maitra, U. Supramolecular gels ‘in action’. *Journal of Materials Chemistry* 2009, 19(37), 6649-6687.
8. Tomatsu, I., Peng, K., Kros, A. Photoresponsive hydrogels for biomedical applications. *Advanced drug delivery reviews* 2011, 63(14-15), 1257-1266.
9. Sahay, R., Kumar, P. S., Sridhar, R., Sundaramurthy, J., Venugopal, J., Mhaisalkar, S. G., Ramakrishna, S. Electrospun composite nanofibers and their multifaceted applications. *Journal of Materials Chemistry* 2012, 22(26), 12953-12971.
10. Wang, J., Yao, H. B., He, D., Zhang, C. L., Yu, S. H. Facile fabrication of gold nanoparticles-poly (vinyl alcohol) electrospun water-stable nanofibrous mats: efficient substrate materials for biosensors. *ACS applied materials & interfaces* 2012, 4(4), 1963-1971.

11. Liang, D., Lu, Z., Yang, H., Gao, J., Chen, R. Novel asymmetric wettable AgNPs/chitosan wound dressing: in vitro and in vivo evaluation. *ACS applied materials & interfaces* 2016, 8(6), 3958-3968.
12. Vimbela, G. V., Ngo, S. M., Frazee, C., Yang, L., Stout, D. A. Antibacterial properties and toxicity from metallic nanomaterials. *International journal of nanomedicine* 2017, 12, 3941.
13. Geng, J., Yao, C., Kou, X., Tang, J., Luo, D., Yang, D. A fluorescent biofunctional DNA hydrogel prepared by enzymatic polymerization. *Advanced healthcare materials* 2018, 7(5), 1700998.
14. Matteini, P., Ratto, F., Rossi, F., Centi, S., Dei, L., Pini, R. Chitosan films doped with gold nanorods as laser-activatable hybrid bioadhesives. *Advanced Materials* 2010, 22(38), 4313-4316.
15. Matteini, P., Ratto, F., Rossi, F., de Angelis, M., Cavigli, L., Pini, R. Hybrid nanocomposite films for laser-activated tissue bonding. *Journal of biophotonics* 2012, 5(11-12), 868-877.

16. Matteini, P., Tatini, F., Luconi, L., Ratto, F., Rossi, F., Giambastiani, G., Pini, R. Photothermally activated hybrid films for quantitative confined release of chemical species. *Angewandte Chemie International Edition* 2013, 52(23), 5956-5960.
17. Matteini, P., Martina, M. R., Giambastiani, G., Tatini, F., Cascella, R., Ratto, F. et al. Light-responsive nanocomposite sponges for on demand chemical release with high spatial and dosage control. *Journal of Materials Chemistry B* 2013, 1(8), 1096-1100.
18. Hang, A. T., Tae, B., Park, J. S. Non-woven mats of poly (vinyl alcohol)/chitosan blends containing silver nanoparticles: fabrication and characterization. *Carbohydrate Polymers* 2010, 82(2), 472-479.
19. Agnihotri, S., Mukherji, S., Mukherji, S. Antimicrobial chitosan–PVA hydrogel as a nanoreactor and immobilizing matrix for silver nanoparticles. *Applied Nanoscience* 2012, 2(3), 179-188.
20. Li, C., Fu, R., Yu, C., Li, Z., Guan, H., Hu, D. et al. Silver nanoparticle/chitosan oligosaccharide/poly (vinyl alcohol)

nanofibers as wound dressings: a preclinical study. International journal of nanomedicine 2013, 8, 4131.

21. Abdelgawad, A. M., Hudson, S. M., Rojas, O. J. Antimicrobial wound dressing nanofiber mats from multicomponent (chitosan/silver-NPs/polyvinyl alcohol) systems. Carbohydrate polymers 2014, 100, 166-178.
22. Hajji, S., Khedir, S. B., Hamza-Mnif, I., Hamdi, M., Jedidi, I., Kallel, R. et al. Biomedical potential of chitosan-silver nanoparticles with special reference to antioxidant, antibacterial, hemolytic and in vivo cutaneous wound healing effects. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects 2019, 1863(1), 241-254.
23. Sharma, V. K., Yngard, R. A., Lin, Y. Silver nanoparticles: green synthesis and their antimicrobial activities. Advances in colloid and interface science 2009, 145(1-2), 83-96.
24. Lemire, J. A., Harrison, J. J., Turner, R. J. Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications. Nature Reviews Microbiology 2013, 11(6), 371-384.

25. Gurunathan, S., Han, J. W., Kwon, D. N., Kim, J. H. Enhanced antibacterial and anti-biofilm activities of silver nanoparticles against Gram-negative and Gram-positive bacteria. *Nanoscale research letters* 2014, 9(1), 1-17.
26. Durán, N., Durán, M., De Jesus, M. B., Seabra, A. B., Fávaro, W. J., Nakazato, G. Silver nanoparticles: A new view on mechanistic aspects on antimicrobial activity. *Nanomedicine: nanotechnology, biology and medicine* 2016, 12(3), 789-799.
27. Zheng, K., Setyawati, M. I., Leong, D. T., Xie, J. Antimicrobial silver nanomaterials. *Coordination Chemistry Reviews* 2018, 357, 1-17.
28. Mi, G., Shi, D., Wang, M., Webster, T. J. Reducing bacterial infections and biofilm formation using nanoparticles and nanostructured antibacterial surfaces. *Advanced Healthcare Materials* 2018, 7(13), 1800103.
29. Mi, G., Shi, D., Wang, M., Webster, T. J. Reducing bacterial infections and biofilm formation using nanoparticles and nanostructured antibacterial surfaces. *Advanced Healthcare Materials* 2018, 7(13), 1800103.

30. Zhang, Q., Cobley, C. M., Zeng, J., Wen, L. P., Chen, J., Xia, Y. Dissolving Ag from Au–Ag alloy nanoboxes with H₂O₂: a method for both tailoring the optical properties and measuring the H₂O₂ concentration. *The Journal of Physical Chemistry C* 2010, 114(14), 6396-6400.
31. Miao, P., Wang, B., Yin, J., Chen, X., Tang, Y. Electrochemical tracking hydrogen peroxide secretion in live cells based on autocatalytic oxidation reaction of silver nanoparticles. *Electrochemistry Communications* 2015, 53, 37-40.
32. Sigg, L., Lindauer, U. Silver nanoparticle dissolution in the presence of ligands and of hydrogen peroxide. *Environmental Pollution* 2015, 206, 582-587.
33. Toh, H. S., Jurkschat, K., Compton, R. G. The Influence of the capping agent on the oxidation of silver nanoparticles: nano-impacts versus stripping voltammetry. *Chemistry–A European Journal* 2015, 21(7), 2998-3004.
34. Alipilakkotte, S., Sreejith, L. Green synthesized PLA/silver nanoparticle probe for sensing of hydrogen peroxide in biological samples. *Materials Letters* 2018, 217, 33-38.

35. Nguyen, N. D., Van Nguyen, T., Chu, A. D., Tran, H. V., Tran, L. T., Huynh, C. D. A label-free colorimetric sensor based on silver nanoparticles directed to hydrogen peroxide and glucose. *Arabian Journal of Chemistry* 2018, 11(7), 1134-1143.
36. Teodoro, K. B., Migliorini, F. L., Christinelli, W. A., Correa, D. S. Detection of hydrogen peroxide (H₂O₂) using a colorimetric sensor based on cellulose nanowhiskers and silver nanoparticles. *Carbohydrate polymers* 2019, 212, 235-241.
37. Rossi, F., Matteini, P., Ratto, F., Menabuoni, L., Lenzetti, I., Pini, R. Laser tissue welding in ophthalmic surgery. *Journal of biophotonics* 2008, 1(4), 331-342.
38. Rossi, F., Canovetti, A., Malandrini, A., Lenzetti, I., Pini, R., Menabuoni, L. An “All-laser” endothelial transplant. *Journal of visualized experiments: JoVE* 2015, (101).
39. Jia, Y., Li, W., Duan, H., Li, Z., Zhou, Q., Shi, W. Mini-sheet injection for cultured corneal endothelial transplantation. *Tissue Engineering Part C: Methods* 2018, 24(8), 474-479.

40. Pini, R., Rossi, F., Menabuoni, L., Lenzetti, I., Yoo, S., Parel, J. M. A new technique for the closure of the lens capsule by laser welding. *Ophthalmic Surgery, Lasers and Imaging Retina* 2008, 39(3), 260-261.
41. Puca, A., Albanese, A., Esposito, G., Maira, G., Tirpakova, B., Rossi, G. et al. Diode laser-assisted carotid bypass surgery: an experimental study with morphological and immunohistochemical evaluations. *Neurosurgery* 2006, 59(6), 1286-1295.
42. Matteini, P., Ratto, F., Rossi, F., Rossi, G., Esposito, G., Puca, A. et al. In vivo carotid artery closure by laser activation of hyaluronan-embedded gold nanorods. *Journal of Biomedical Optics* 2010, 15(4), 041508.
43. Esposito, G., Rossi, F., Matteini, P., Scerrati, A., Puca, A., Albanese, A. et al. In vivo laser assisted microvascular repair and end-to-end anastomosis by means of indocyanine green-infused chitosan patches: A pilot study. *Lasers in surgery and medicine* 2013, 45(5), 318-325.
44. Ngeow, W. C. Scar less: a review of methods of scar reduction at sites of peripheral nerve repair. *Oral Surgery,*

Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology 2010, 109(3), 357-366.

45. Rossi, F., Pini, R., Menabuoni, L., Mencucci, R., Menchini, U., Ambrosini, S., Vannelli, G. Experimental study on the healing process following laser welding of the cornea. *Journal of biomedical optics* 2005, 10(2), 024004.
46. Ratto, F., Matteini, P., Rossi, F., Menabuoni, L., Tiwari, N., Kulkarni, S. K., Pini, R. Photothermal effects in connective tissues mediated by laser-activated gold nanorods. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 2009, 5(2), 143-151.
47. Simhon, D., Gabay, I., Shpolyansky, G., Vasilyev, T., Nur, I., Meidler, R. et al. Temperature-controlled laser-soldering system and its clinical application for bonding skin incisions. *Journal of biomedical optics* 2015, 20(12), 128002.
48. Basov, S., Milstein, A., Sulimani, E., Platkov, M., Peretz, E., Rattunde, M. et al. Robot-assisted laser tissue soldering system. *Biomedical optics express* 2018, 9(11), 5635-5644.
49. Holzer, W., Mauerer, M., Penzkofer, A., Szeimies, R. M., Abels, C., Landthaler, M., Bäumler, W. Photostability and

thermal stability of indocyanine green. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 1998, 47(2-3), 155-164.

50. Ratto, F., Matteini, P., Cini, A., Centi, S., Rossi, F., Fusi, F., Pini, R. CW laser-induced photothermal conversion and shape transformation of gold nanodogbones in hydrated chitosan films. *Journal of Nanoparticle Research* 2011, 13(9), 4337-4348.
51. Griendling, K. K., FitzGerald, G. A. Oxidative stress and cardiovascular injury: Part I: basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS. *Circulation* 2003, 108(16), 1912-1916.
52. James, T. J., Hughes, M. A., Cherry, G. W., Taylor, R. P. Evidence of oxidative stress in chronic venous ulcers. *Wound Repair and Regeneration* 2003, 11(3), 172-176.
53. Soneja, A., Drews, M., Malinski, T. Role of nitric oxide, nitroxidative and oxidative stress in wound healing. *Pharmacological reports* 2005, 57, 108.
54. Soneja, A., Drews, M., Malinski, T. Role of nitric oxide, nitroxidative and oxidative stress in wound healing. *Pharmacological reports* 2005, 57, 108.

55. Cano Sanchez, M., Lancel, S., Boulanger, E., Neviere, R. Targeting oxidative stress and mitochondrial dysfunction in the treatment of impaired wound healing: a systematic review. *Antioxidants* 2018, 7(8), 98.
56. Niethammer, P., Grabher, C., Look, A. T., Mitchison, T. J. A tissue-scale gradient of hydrogen peroxide mediates rapid wound detection in zebrafish. *Nature* 2009, 459(7249), 996-999.
57. Wlaschek, M., Scharffetter-Kochanek, K. Oxidative stress in chronic venous leg ulcers. *Wound Repair and Regeneration* 2005, 13(5), 452-461.
58. Dunnill, C., Patton, T., Brennan, J., Barrett, J., Dryden, M., Cooke, J. et al. Reactive oxygen species (ROS) and wound healing: the functional role of ROS and emerging ROS-modulating technologies for augmentation of the healing process. *International wound journal* 2017, 14(1), 89-96.
59. Wenk, J., Brenneisen, P., Wlaschek, M., Poswig, A., Briviba, K., Oberley, T. D., Scharffetter-Kochanek, K. Stable overexpression of manganese superoxide dismutase in mitochondria identifies hydrogen peroxide as a major oxidant in the AP-1-mediated induction of matrix-degrading

metalloprotease-1. Journal of Biological Chemistry 1999, 274(36), 25869-25876.

60. Loo, A. E. K., Halliwell, B. Effects of hydrogen peroxide in a keratinocyte-fibroblast co-culture model of wound healing. Biochemical and biophysical research communications 2012, 423(2), 253-258.
61. Ponugoti, B., Xu, F., Zhang, C., Tian, C., Pacios, S., Graves, D. T. FOXO1 promotes wound healing through the up-regulation of TGF- β 1 and prevention of oxidative stress. Journal of Cell Biology 2013, 203(2), 327-343.
62. Roy, S., Khanna, S., Nallu, K., Hunt, T. K., Sen, C. K. Dermal wound healing is subject to redox control. Molecular therapy 2006, 13(1), 211-220.

Optically activated and interrogated plasmonic hydrogels for applications in wound healing

Alessio Milanese^{1,2} | Giada Magni¹ | Sonia Centi¹ | Gioacchino Schifino³ |
Annalisa Aluigi³ | Boris N. Khlebtsov⁴ | Lucia Cavigli¹ | Andrea Barucci¹ |
Nikolai G. Khlebtsov^{4,5} | Fulvio Ratto¹  | Francesca Rossi¹ | Roberto Pini¹

¹Istituto di Fisica Applicata "Nello Carrara", Consiglio Nazionale delle Ricerche, Sesto Fiorentino, Florence, Italy

²Dipartimento di Chimica "Ugo Schiff", Università degli Studi di Firenze, Sesto Fiorentino, Florence, Italy

³Istituto per la Sintesi Organica e la Fotoreattività, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Bologna, Italy

⁴Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Saratov, Russia

⁵Faculty of Nano- and Biomedical Technologies, Saratov State University, Saratov, Russia

Correspondence

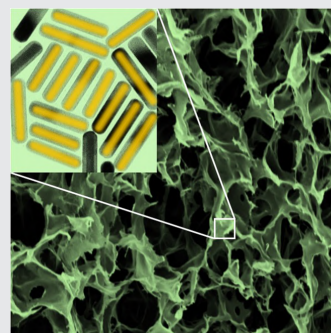
Fulvio Ratto and Francesca Rossi, Istituto di Fisica Applicata "Nello Carrara", Consiglio Nazionale delle Ricerche, Via Madonna del Piano 10, 50019 Sesto Fiorentino, Florence, Italy.
Email: f.ratto@ifac.cnr.it (F. Ra.) and f.rossi@ifac.cnr.it (F. Ro.)

Funding information

Consiglio Nazionale delle Ricerche, Grant/Award Number: HYPNOSYS; Fondazione Cassa di Risparmio di Firenze, Grant/Award Number: MONSTER; Russian Foundation for Basic Research, Grant/Award Number: 18-52-7803 "HYPNOSYS"

Abstract

We disclose the use of hybrid materials featuring Au/Ag core/shell nanorods in porous chitosan/polyvinyl alcohol scaffolds for applications in tissue engineering and wound healing. The combination of Au and Ag in a single construct provides synergistic opportunities for optical activation of functions as near infrared laser tissue bonding, and remote interrogation to return parameters of prognostic relevance in wound healing monitoring. In particular, the bimetallic component ensures optical tunability, enhanced shelf life and photothermal stability, serves as a reservoir of germicidal silver cations, and changes in near-infrared and visible color according to the environmental level of oxidative stress. At the same time, the polymeric blend is ideal to bind connective tissue upon photothermal activation, and to support fabrication processes that provide high porosity, such as electrospinning, thus putting all the premises for cellular repopulation and antimicrobial protection.



KEYWORDS

chitosan hydrogels, electrospinning, gold nanorods, laser welding, oxidative stress monitoring, silver nanoparticles

1 | INTRODUCTION

In few other biomedical domains, nanotechnology has made such an impact as in the converging fields of tissue engineering and wound healing [1–6]. Among the many crossroads of these disciplines, the multiplication of the

functionality of biomimetic scaffolds or patches is a recurrent perspective.

In this context, in the recent past, there has grown interest for the enhancement of bio-polymeric hydrogels with noble metal nanoparticles [7–13] assigned to manifold functions. For instance, in an extensive series of papers and patents [14–17], some of us have proposed to exploit the plasmonic features of Au nanoparticles in

Alessio Milanese and Giada Magni are equally contributing authors.

chitosan physical hydrogels for wound dressing, controlled drug release, or both. In particular, Au nanorods exhibit intense bands of optical absorbance in the so-called therapeutic window and support a photothermal conversion that combines with the physicochemical features of a chitosan or composite hydrogel to bind endogenous tissue or release active ingredients. Other authors have proposed to resort to the biochemical features of Ag nanoparticles in many scaffolds including chitosan/polyvinyl alcohol (PVA) physical hydrogels and electrospun fibers for antimicrobial effects [18–22]. Ag nanospheres probably represent the most successful product of nanomedicine for their antimicrobial properties [11, 12, 23–27], which is a critical issue in wound healing. The passive and sustained release of Ag cations from Ag nanoparticles exerts a kind of cytotoxic effect on microbial pathogens and biofilms [25, 28] that holds low potential to elicit resistance. But the combination of optical and redox behavior of these materials may serve even more tasks of interest in wound healing. This is the case for the assessment of oxidative stress by the measurement of the rate of oxidative dissolution of Ag nanoparticles [29–36].

The motivation behind all these developments is a persistent demand for better healthcare in the context of wound management.

In particular, in the case of wound dressing, there exists an underlying push to overcome the drawbacks associated to stitches or the standard kind of adhesive patches, such as the incidence of foreign-body reactions, the permeability of the repair, or the ubiquitous plague of microbial infections. Moreover, suturing is a delicate practice that may be unsuitable in certain anatomical microstructures and surgical procedures, where the lack of alternatives really amounts to a substantial problem. Relevant examples include, for instance, several cases in Ophthalmology [37], such as transplantations of corneal endothelium [38, 39] or the closure of the eye lens capsule [40] after Phaco-Ersatz procedure, and in Neurosurgery, such as microanastomoses of blood vessels [41–43] and nerves [44] or sealing of dura mater. Another issue is the formation of scars. In this context, laser welding [37, 45, 46] or soldering [5, 47, 48] alone or in combination with biocompatible scaffolds represent a hopeful direction. In our previous work, some of us implemented hybrid materials featuring dispersions of FDA-approved indocyanine green [43] or inert Au nanorods [14–17] in a chitosan physical hydrogel, where the embedded dyes convert a near-infrared trigger into heat, and the heated polysaccharide reacts and adheres to the connective tissue [14]. Among the problems left open, we mention the photoinstability of indocyanine green [49] or the thermal instability of the plasmonic dyes [50], the rigidity of the chitosan scaffold that failed to easily conform to arbitrary anatomical sites, and a general need to add more functionality and prognostic capability.

Wound healing monitoring is emerging as another important issue in most surgical contexts. The physiological process is complex and still not fully understood, and involves multiple and interdependent steps. However, recent studies have established that reactive oxygen species (ROS) are key regulators and play a crucial role, so that the level of oxidative stress may serve as an aggregate parameter for monitoring purposes [51–55]. Despite its obvious cytotoxicity, the level of peroxide increases immediately after injury as a critical part of the physiological response [56]. Concentrations of H_2O_2 between about 100 and 500 μM correlate with a normal outcome, whereas both lower and higher levels require attention [54, 55]. In the optimal range, ROS regulate the recruitment of neutrophils and monocytes during the inflammation phase [57, 58], are involved in the activation pathways of metalloproteinases 1 and 2 [59], and stimulate the proliferation of fibroblasts, keratinocytes and vascular endothelial cells, thus supporting the process of angiogenesis [57, 60, 61]. These data suggest that basal levels of ROS in cells are essential for biological progression, such as proliferation and differentiation. Instead, higher levels complicate the regeneration of new tissue [62]. In spite of its importance, the determination of oxidative stress *in vivo* is difficult, and has been subject to indirect analyses of oxidation products, such as lipids, proteins or DNA [54, 55]. In this context, Ag nanospheres have attracted attention as an ideal case of optical tags, because their rate of oxidative dissolution increases with the environmental concentration of ROS [29–36]. It is unfortunate that the plasmonic band of Ag nanospheres falls in the blue window, which is problematic for biomedical applications and limits the depth of optical penetration to few hundreds microns.

Here, we propose a reformulation of our previous material that features a synergistic interplay of Au and Ag components, enjoys more thermal stability, compatibility with overwhelming processes in tissue engineering as electrospinning [2, 6, 9, 18, 21, 63–70], and unique spectral response to environmental parameters of clinical relevance. We demonstrate its use in connective tissue bonding as well as its colorimetric sensitivity to oxidative stress with optical response in the therapeutic window.

2 | EXPERIMENTAL SECTION

2.1 | Materials

Alpha-methoxy-omega-mercapto poly(ethylene glycol) (mPEG-SH, MW 5000 Da, mPEG-SH) was acquired from Iris Biotech GmbH (Marktredwitz, Germany). All other chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri) and used as received.

2.2 | Preparation of the plasmonic dyes

Gold nanorods were synthesized according to our variant of the protocol developed by Vigderman and Zubarev [71, 72]. Thereafter, cetrimonium-capped particles were coated with a Ag shell according to the protocol reported in References [73, 74]. In brief, as-synthesized Au nanorods were transferred at a nominal concentration of 200 μM Au in 20 mM cetrimonium chloride (CTAC) supplemented with AgNO_3 and four equivalents of ascorbic acid. The dose of AgNO_3 was such that the ratio Ag: Au was 43%, or 85%, or 170% by mole. After 2 hours at 70°C, particles were brought to a concentration of 1.6 mM Au in a 100 mM acetate buffer pH 5.0 containing 500 μM CTAC, 0.005% (wt/wt) polysorbate 20 and 50 μM mPEG-SH for PEGylation [75]. After 2 hours under gentle agitation at 37°C, suspensions were purified and transferred to ultrapure water containing 0.005% (wt/wt) polysorbate 20 before subsequent manipulation.

2.3 | Preparation of the biopolymeric scaffolds

Biopolymeric scaffolds holding PEGylated particles were prepared by the adaptation of our previous protocols [14–17]. In brief, we started from an acidic aqueous paste of a mixture of PVA (about 5% wt/wt) and chitosan (about 1% wt/wt), which has become established as a first-choice venue for applications in wound dressing and antimicrobial protection [18, 20, 21, 64–68, 76–78]. Then, we implemented different methods for rapid ejection of the aqueous content to achieve a solid film with porous microstructure. In particular, we tested a simpler protocol, where the acidic paste was cast in a dish and dehydrated by the addition of abundant ethanol, or a more controlled process based on electrospinning [18, 20, 21, 64–68, 70, 79] with a home-made setup that is described elsewhere [69]. Optimal parameters for electrospinning were a distance of needle to collector of 12 cm and voltage of 25 kV and a flow rate of the polymeric paste of 30 $\mu\text{L}/\text{min}$. The final films were stable in aqueous solution at physiological pH.

2.4 | Optical and morphological inspection

Samples were analyzed by spectrophotometry with a Lambda 950 platform from Perkin Elmer (Waltham, Massachusetts), and dynamic light scattering with a Zetasizer Nano ZS 90 scanner from Malvern Instruments (Malvern, United Kingdom).

Transmission electron microscopy (TEM) images were recorded on a Libra-120 TEM (Carl Zeiss, Jena, Germany) at the Simbios Center for the Collective Use of Research Equipment in the Field of Physical-Chemical Biology and Nanobiotechnology (IBPPM-RAS, Saratov). For TEM measurements, samples were centrifuged twice and resuspended in water. Five microliters of washed particles were deposited onto 300-mesh copper microscopic grids covered with a formvar film and left to dry in an oven at 40°C.

Patches were observed under a 435 VP scanning electron microscope (SEM, LEO Electron Microscopy Ltd, United Kingdom) with an acceleration voltage of 15 kV, current of 100 pA and working distance around 20 mm. Before SEM analysis, a part of each sample was sputter-coated with an Au layer using a K550 device from Emitech (Ashford, United Kingdom) with a current of 20 mA for an interval of 240 s. Fiber diameters were analyzed by means of GIMP 2.8 (GNU Image Manipulation Program) by taking 200 measurements from random locations and different micrographs.

2.5 | Setup for connective tissue bonding

The feasibility of the different scaffolds for laser bonding was tested in rabbit tendons. Freshly harvested tendons from rabbit legs were purchased from the local slaughterhouse and used within 4 hours from sacrifice. A diode laser emitting cw light at 810 nm (SMARTY A800, DEKA, Calenzano FI, Italy) was used to weld the scaffolds onto the tendons, according to our previous publications [37, 40, 45, 46]. Light was coupled into a multi-mode 300 μm -core diameter optical fiber terminating in a handpiece. The treatment was performed under a surgical microscope. The fiberoptic tip was kept in contact with the scaffold that was gently pressed onto the tendon, or vice versa. Particular care was taken in order to ensure the hydration of the scaffold/tendon interface through the entire procedure. Light was delivered as one pulse per spot, with output power between 0.7 and 2.0 W and duration within 100 to 500 ms, according to the thickness and optical absorbance of the scaffold.

After welding, samples were prepared and analyzed by standard H&E histology, in order to investigate the efficacy and safety of the procedure.

2.6 | Setup for oxidative stress dosimetry

Biopolymeric scaffolds were cast in a 12 well plate and each well was added with 4 mL of aqueous H_2O_2 at concentration ranging from 60 μM to 1 mM. In order to

follow the change in color over time, we built a miniature setup featuring an overhead projector for backlight illumination, and an ESP32-CAM microcontroller running an Arduino sketch that provides for image acquisition and storage in a micro-SD memory card, and for Bluetooth connectivity for quality control over a virtual serial port. The overall setup was mounted in an oven kept at 30°C and 100% relative humidity. Images were analyzed with a Python routine that retrieves the average intensity of RGB channels over predefined regions of interest. Experiments were performed in quadruplicate, but the mini camera was able to capture only two samples at a time. The other two samples were used for qualitative verification.

3 | RESULTS AND DISCUSSION

3.1 | Hybrid scaffolds

Our materials consist of PEGylated Au/Ag core/shell nanorods in chitosan/PVA physical hydrogels.

The rationale to use PEGylated Au/Ag core/shell nanorods is to combine the plasmonic features of systems derived from Au nanorods [80] and the biochemical activity of Ag nanoparticles. It turned out that the combination of these components is synergistic over multiple dimensions. Figure 1 documents different steps of our synthetic procedure. First of all, according to panels A and B, the deposition of a Ag shell proved to be a robust approach to progressively blue-shift and gain more control over the longitudinal band of Au nanorods [73, 74]. A practical approach is to start with high-aspect ratio (AR, or ratio of length to diameter) Au nanorods resonating at a wavelength longer than the optical source at disposal, and then to deposit Ag until a thickness conveying the due overlap. We note that this strategy also benefits from latest progress in the design of synthetic routes to manufacture high-AR Au nanorods [71, 72, 81, 82], which have probably become more efficient and reproducible than their standard low-AR counterparts [80]. In our case, we started with Au nanorods with AR around 8 and resonating around 1100 nm, and it took a Ag deposit with a nominal molar ratio Ag: Au = 170% to reach around 810 nm. Our TEM micrographs, such as that reported in panel C, reveal that the Ag shell is uniform and smooth. The role of thiolated PEG is particularly critical as well. PEG is the most standard coating to gain colloidal stability in physiological fluids [75, 83–85]. Here, we found that its use also grants substantial chemical stability. In particular, PEGylated particles proved to be stable under environmental conditions, whereas the Ag shell of their as-synthesized precursor suffered from rapid oxidation

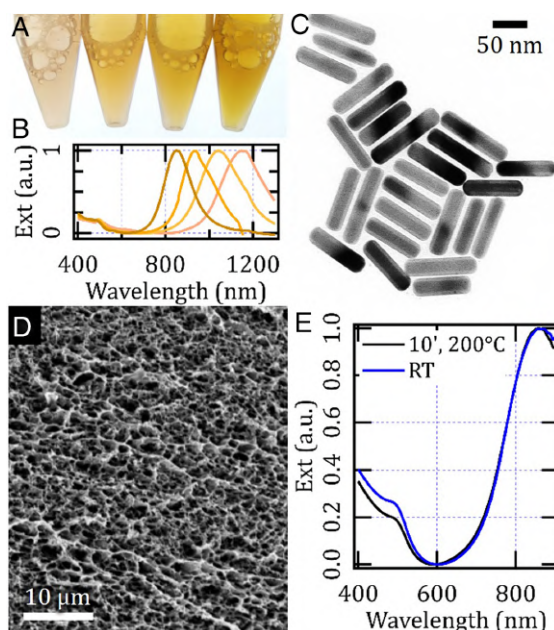


FIGURE 1 Preparation of composite patches containing Au/Ag core/shell nanorods in a chitosan/PVA matrix: A, photograph and B, spectra of optical extinction of aqueous suspensions of particles before and after the addition of Ag until a ratio Ag: Au = 43%, 85% or 170%, from left to right in A, and the other way around in B; C, representative transmission electron micrograph of Au/Ag core/shell nanorods with a nominal ratio Ag: Au = 170%, such as those used for integration in our patches; D, scanning electron micrograph of a hybrid patch highlighting its porous ultrastructure; E, comparison of the spectra of optical extinction through the same patches before and after treatment on a heating plate at the named conditions

even in a sealed vial. In particular, when as-synthesized particles were transferred to an acetate buffer [86], such as that used for the preparation of the polymeric paste described below, their color reverted to that of bare Au nanorods within minutes. Instead, PEGylated particles were stable for months, but for a slow trend toward colloidal instability and aggregation. The effect of thiolated PEG as an effective barrier against oxidative dissolution of Ag nanoparticles is consistent with previous reports from other authors [33].

Apart from the plasmonic dyes, we also revisited our previous formulation for the polymeric paste. We reconfirmed the use of chitosan as a first-choice material in tissue engineering [87–90]. Then, we blended chitosan with a biocompatible polymer like PVA [91], in order to obtain solutions suitable for film fabrication by rapid extraction of water with ethanol or by electrospinning [18, 20, 21, 64–68], and to gain an ideal combination of malleability,

porosity, as well as the perspective to add more active ingredients, for example, antimicrobial functions [18, 19, 21, 68, 76–78]. PVA is widely proposed in the literature as blending polymer for chitosan. It has been demonstrated that intermolecular interactions between PVA and chitosan occur through the formation of C–N and hydrogen bonds [92, 93]. The main advantage of the processes selected for film fabrication is in the rapid removal of water. This expedient probably helps to inhibit the physical phenomenon of coarsening upon phase separation between the two polymers [63], and to promote more inter-chain interactions [65]. The final products display a homogeneous color and are stable in physiological saline. Conversely, when left to dry in air over hours, mixtures of chitosan and PVA broke down and then underwent extensive swelling and fast dissolution in wet conditions. Our SEM micrographs, such as that reported in panel D, reveal that the scaffolds prepared by the extraction of water with ethanol are sponge-like and present a porous ultrastructure with pore size in the order of 1 μm . Overall, these materials resemble our previous generation of chitosan physical hydrogels [14–17, 43], but display much more malleability. The capacity to adapt to different shapes belongs to the poor cohesive forces among PVA strands [91], while chitosan chains provide mechanical strength and enable safe manipulation. By hand working, we did not manage to achieve fine control and consistency over thickness, and ended up to manufacture thicker films (say around 200 μm or more). We anticipate that the automation of the procedure will allow us to mitigate this limitation and to obtain better results.

As a fortuitous advantage, we found that PEGylated Au/Ag core/shell nanorods display outstanding thermal stability. In our previous work, some of us documented that bare Au nanorods dispersed in PVA films undergo a significant transformation at a temperature of 110°C within about 1 minute [50], due to surface premelting [94–96]. This process is ubiquitous and determines a loss of efficiency of photothermal conversion over time, which amounts to a nuisance of practical importance. Instead, we challenged our newer samples over a broad variety of conditions of optical irradiation and never found any significant sign of deterioration. When left over a heating plate at 200°C for as much as 10 minutes, we detected some modification of the biopolymeric scaffold, which probably undergoes compaction and a loss of optical scattering at lower wavelength, but almost no sign of transformation of the plasmonic modes. At the moment, we take this fact as an experimental evidence of technological relevance. We conjecture that different factors may concur to inhibit the process of surface premelting, such as a high stability of the Ag shell grown

at temperature higher than those in place in the synthesis of Au nanorods [73, 74], and a strong resistance against dewetting at the Au/Ag interface.

3.2 | Electrospun scaffolds

The mixture of chitosan and PVA as carrier polymer was especially designed with the purpose to enable electrospinning [18, 20, 21, 64–68]. Indeed, electrospun fibers of chitosan and PVA are emerging as an ideal platform for applications in tissue engineering and wound dressing for their combination of antimicrobial [18, 19, 21, 68, 78] and regenerative properties, to stimulate cellular repopulation [67, 97, 98], and for their ability to retain and release active ingredients [21, 68, 99]. Figure 2 displays representative images of our samples and their analysis. Our scanning electron micrographs in panels A and B demonstrate the electrospinnability of our polymeric paste, consistent with the reference literature. We achieved mats featuring a uniform distribution of composite fibers with average diameter of 87 nm and SD of 36 nm. However, there also occurred bead defects and a minority of ribbons with lateral size exceeding 100 nm until around 260 nm. The plasmonic particles seem to be well dispersed within the composite fibers with no clear sign of aggregation, and to retain their prolate shape.

With respect to the process based on the extraction of water with ethanol, owing to the serial nature of electrospinning, we achieved fine control over thickness down to the level of 1 μm . Meshes of electrospun fibers with thickness around 40 μm were impalpable to the touch but tough enough for subsequent manipulation. Upon laying over hydrated skin, their turbidity immediately disappeared by imbibition, and their shape conformed to the underlying tissue, which is ideal for applications in wound dressing (see Supporting Information).

We believe that the incorporation of Au and Ag features within the same architecture, rather than two separate ingredients, helps to retain the compatibility of the polymeric paste with manufacturing processes as electrospinning, which rely on an exquisite balance of rheological parameters, and may suffer from a high specific surface area of a particulate impurity [100].

3.3 | Applications in connective tissue bonding

In order to verify the performance of our materials for applications in laser welding, we implemented the scaffolds obtained by the extraction of water with ethanol

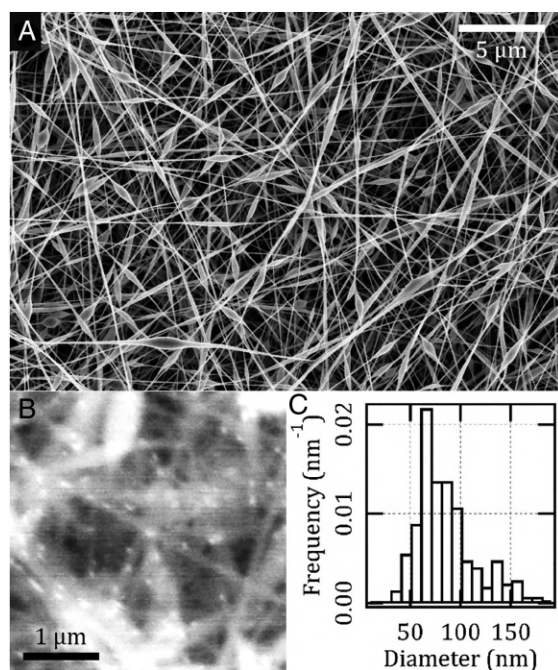


FIGURE 2 Electrospun patches: A and B, representative scanning electron micrographs of samples prepared by electrospinning. The close-up in panel B was acquired before metallization, in an attempt to highlight the plasmonic component as a constellation of bright grains. Note that the metal particles are well dispersed and embedded within the polymeric fibers; C, histogram of fiber diameter normalized to unity

and a common model of connective tissue as thin segments of rabbit tendon. Figure 3A is a cartoon of the experimental setup, which consisted of an overlap of both layers. The irradiation of their interface with millisecond-duration optical pulses, delivered from either side of the overlap, triggered an adhesive effect of a strength sufficient to withstand extensive manipulation, similar to our previous generation of chitosan physical hydrogels [14, 15, 43]. Figure 3B displays the typical appearance of a welded patch. Our H&E images, such as that reported in Figure 3C, demonstrate the successfulness of the adhesive effect. The weld spots were able to withstand the process of sample preparation better than the native tissue, which occasionally tends to undergo rupture and exfoliation under a microtome. According to our past experience [40, 101], this observation probably corresponds to a tensile strength at break between 70% and 90% of native tissue, or 3 to 4 N/mm² in this case, due to the onset of thermal damage in the connective matrix. Signs of thermal damage were minimal and always confined within about 100 μm of the weld spots [46]. The possibility to monitor the extent of thermal damage by optical

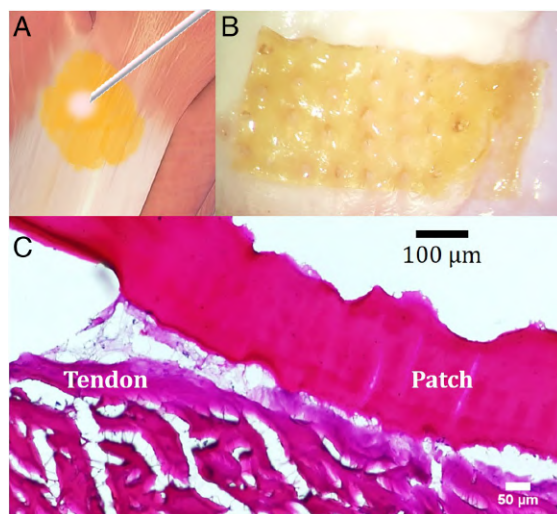


FIGURE 3 Laser welding of patches obtained by the extraction of water with ethanol and segments of rabbit tendon: A, cartoon of the experimental setup; B, representative photograph of a sample irradiated with a raster scan of optical pulses with output power of 600 mW and duration of 500 ms. Light was delivered from the side of the artificial patch; C, histological section across a weld site obtained with a single pulse of output power of 1 W and duration of 500 ms administered from the side of the biological tissue

methods as terahertz radiation [102] may be added in future implementations as a means to enhance the safety of the procedure. Altogether, our results are consistent with our previous work [14, 15, 43]. Advantages include more malleability and an almost complete removal of any limitation associated to photostability [50]. We believe that the adhesive quality of PVA helps to consolidate the role of chitosan [14, 91] to physically cross-link to the endogenous proteins.

In Supporting Information, we report the possibility to achieve similar results from the electrospun embodiment of our materials, and disclose relevant advantages.

While Au is critical for its optical absorbance, having Ag in our materials may serve multiple purposes, such as the sustained release of antimicrobial cations that may synergize with the intrinsic properties of chitosan [18, 19, 21, 22]. In the next paragraph, we introduce another function of interest in wound healing monitoring, which emphasizes the unique advantage of an Au/Ag core/shell architecture.

3.4 | Applications in wound healing monitoring

We found that aqueous suspensions of PEGylated Au/Ag core/shell nanorods enjoy substantial stability in an

aqueous environment. However, in the presence of H_2O_2 , Ag shells tend to undergo oxidative dissolution over a time scale that depends on peroxide concentration [30–36]. In Supporting Information, we give an idea of the kinetics of this reaction, which starts rather slow, but then suddenly accelerates until complete etching of the Ag shell down to its interface with Au. We believe that thiolated PEG may play a key role as a capping agent [33] subject to eventual breaching. The effect of the oxidative dissolution of the Ag shell was a simultaneous shift of the longitudinal and transversal modes of plasmonic oscillations back to those of bare Au nanorods. In particular, a small displacement of the transversal band produced a visible change in color from brown or green to pink. Instead, a more substantial transition occurred within the near infrared range pertaining to the longitudinal band, and was invisible to the eye. Compared to the loss of optical absorbance in the blue window that is typical of the oxidative dissolution of Ag nanoparticles [34–36], a shift of plasmonic modes within the therapeutic window by few hundreds nanometer is a major advantage in terms of perspectives for optical or hybrid detection, for instance by the use of pulse oximetry, photoacoustic spectroscopy, or more innovative methods, such as terahertz radiation [103]. The detection of small changes of optical absorbance at near infrared frequencies, such as those related to the oxygenation or deoxygenation of hemoglobin [104, 105], is a mature achievement in biomedical optics. A similar system was proposed by Zhang et al. [30], who exploited the differential oxidation of Ag/Au nanocages to gain colorimetric sensitivity to H_2O_2 in the green or yellow domain.

We obtained a similar change in color when the PEGylated particles were embedded in the biopolymeric scaffold and then exposed to different levels of oxidative stress in separate wells. Figure 4 and Movie S1 in Supporting Information recapitulate our results. We recorded time-lapse movies that revealed that, with respect to the aqueous colloid, the transition proceeded much more slowly and gradually. We hypothesize that chitosan and PVA may cooperate to consolidate the passivation of the PEGylated particles [33]. We worked out a quantitative parameter to follow the change in color through the ratio of green to average of all RGB channels in our mini CCD camera. According to panel B, the intensity of this parameter decays over time with a trend that begins linear and then undergoes saturation at a certain point, probably upon complete dissolution of the Ag shells. Meanwhile, both the rate of decay and, correspondingly, the saturation point reported in panel C are almost linear with peroxide concentration, consistent with the first-order nature of the oxidative dissolution of Ag nanoparticles [29]. At lower concentrations, there

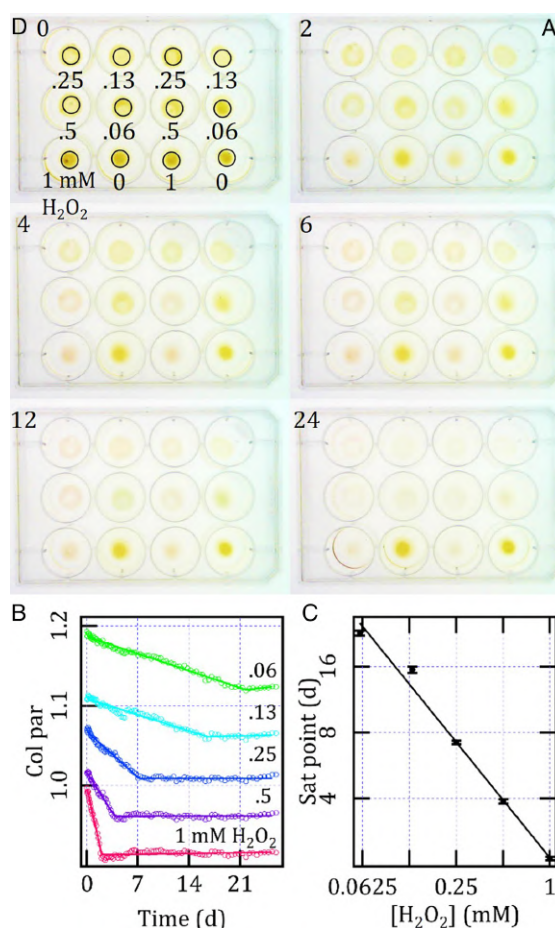


FIGURE 4 Evolution of the color of patches prepared by the extraction of water with ethanol in the presence of oxidative stress: A, photographs extracted from a time-lapse movie at the named time points and displaying samples treated with aqueous H_2O_2 at the named concentrations. Note the faint change in color that corresponds to the loss of the Ag shells and reversal to Au nanorods; B, evolution of the colorimetric parameter presented in the main text averaged over each two samples at the named concentration point, as a function of time. Open circles are experimental data, and continuous curves are their fit to a polygonal chain with one vertex, which served to quantify a saturation point. Data were offset for clarity; C, saturation point vs peroxide concentration and its fit to a power law returning an exponent of 0.9. Note that the normal concentration of H_2O_2 is between about 100 and 500 μM [54, 55] during wound healing, which matches well with the range of our sensor

occurred some departure from linearity, which we ascribe to artifacts that complicate the experiment at longer times, such as the degradation of peroxide titer or the evaporation of water. We assume that the change in visible hue from light brown to pinkish is the same

documented in Supporting Information, and so also comes with a corresponding shift in the near infrared window.

While our materials certainly leave room for optimization, even now, we managed to achieve batch-to-batch reproducibility, and a dynamic range of sensitivity to ROS that already matches the level of peroxide concentration and the timeline of interest in wound healing, that is, 50 μM to 1 mM H_2O_2 over few weeks [54, 55]. We note that, as previous concepts based on indirect analyses of oxidation products [54, 55], this method works more as an integral dosimeter than a real-time sensor. The perspective of an optical or photoacoustic readout with mini-invasive profile may enable online monitoring in point-of-care scenarios.

4 | CONCLUSION

In conclusion, we have presented a new material for applications in tissue engineering and wound healing. In practice, we have started from our previous work, where some of us demonstrated a chitosan physical hydrogel containing Au nanorods for photothermal tissue bonding and controlled drug release [14–17], and added much more functionality. We replaced Au nanorods with a Au/Ag core/shell variant that provides a potential reservoir of germicidal Ag cations, optical sensitivity to key parameters in wound healing monitoring as oxidative stress, and also enables fine control over optical features and surprising thermal stability. Instead, we have blended the chitosan component with PVA, in order to gain malleability and compatibility with functional fabrication processes as electrospinning, in a context where electrospun mats of chitosan and PVA are emerging as a gold standard for tissue regeneration, cellular repopulation [67, 97, 98] and controlled drug release [18, 20, 21, 64–68]. Here, we have demonstrated applications that illustrate the coactivity of our ingredients, that is, laser welding to a benchmark of connective tissue as rabbit tendon and monitoring of the environmental level of ROS, where the interplay of the inorganic and organic parts, and their inner composition play a key role. In conclusion, our system may become an ideal candidate to control multiple functions of interest in tissue engineering and wound healing, where the same device may seal to the endogenous tissue, serve as a scaffold for its regeneration, protect its recovery against infection, and return information of prognostic relevance.

In the future, we will verify the points drawn from the reference literature that chitosan/PVA scaffolds are suitable for cellular repopulation [67, 97, 98], antimicrobial protection and controlled drug release [18, 20, 21,

64–68, 76–78], and we will challenge the translation of our results from in vitro or ex vivo to in vivo.

We are confident that our work will inspire new solutions to combine multiple resources in synergistic compounds for applications at the crossroads of nanotechnology, theranostics and tissue engineering.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was partially supported by a collaborative grant from National Research Council Italy and Russian Foundation for Basic Research (18-52-7803, “HYPNOSys”) and by Fondazione Cassa di Risparmio di Firenze within Project “MONSTER.”

ORCID

Fulvio Ratto  <https://orcid.org/0000-0001-6721-9486>

REFERENCES

- [1] C. J. Bettinger, R. Langer, J. T. Borenstein, *Angew. Chem.* **2009**, 48(30), 5406.
- [2] N. Bhardwaj, S. C. Kundu, *Biotechnol. Adv.* **2010**, 28(3), 325.
- [3] T. Dvir, B. P. Timko, D. S. Kohane, R. Langer, *Nat. Nanotechnol.* **2011**, 6, 13.
- [4] S. H. Ku, M. Lee, C. B. Park, *Adv. Healthc. Mater.* **2013**, 2(2), 244.
- [5] S. J. Frost, D. Mawad, J. Hook, A. Lauto, *Adv. Healthc. Mater.* **2016**, 5(4), 401.
- [6] A. Haider, S. Haider, I.-K. Kang, *Arab. J. Chem.* **2018**, 11(8), 1165.
- [7] S. Banerjee, R. K. Das, U. Maitra, *J. Mater. Chem.* **2009**, 19, 6649.
- [8] I. Tomatsu, K. Peng, A. Kros, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2011**, 63(14), 1257.
- [9] R. Sahay, P. Suresh Kumar, R. Sridhar, J. Sundaramurthy, J. Venugopal, S. G. Mhaisalkar, S. Ramakrishna, *J. Mater. Chem.* **2012**, 22, 12953.
- [10] J. Wang, H.-B. Yao, D. He, C.-L. Zhang, Y. Shu-Hong, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2012**, 4(4), 1963.
- [11] D. Liang, Z. Lu, H. Yang, J. Gao, R. Chen, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, 8(6), 3958.
- [12] G. V. Vimbela, S. M. Ngo, C. Frazee, L. Yang, D. A. Stout, *Int. J. Nanomedicine* **2017**, 12, 3941.
- [13] J. Geng, C. Yao, X. Kou, J. Tang, D. Luo, D. Yang, *Adv. Healthc. Mater.* **2018**, 7(5), 1700998.
- [14] P. Matteini, F. Ratto, F. Rossi, S. Centi, L. Dei, R. Pini, *Adv. Mater.* **2010**, 22(38), 4313.
- [15] P. Matteini, F. Ratto, F. Rossi, M. de Angelis, L. Cavigli, R. Pini, *J. Biophotonics* **2012**, 5(11–12), 868.
- [16] P. Matteini, F. Tatini, L. Luconi, F. Ratto, F. Rossi, G. Giambastiani, R. Pini, *Angew. Chem.* **2013**, 52(23), 5956.
- [17] P. Matteini, M. R. Martina, G. Giambastiani, F. Tatini, R. Cascella, F. Ratto, C. Cecchi, G. Caminati, L. Dei, R. Pini, *J. Mater. Chem. B* **2013**, 1, 1096.
- [18] A. Thi Hang, B. Tae, J. S. Park, *Carbohydr. Polym.* **2010**, 82(2), 472.
- [19] S. Agnihotri, S. Mukherji, S. Mukherji, *Appl. Nanosci.* **2012**, 2(3), 179.

- [20] C. Li, F. R. Y. C. Z. Li, H. Guan, H. D. Zhao, L. Lu, *Int. J. Nanomedicine* **2013**, 8, 4131.
- [21] A. M. Abdelgawad, S. M. Hudson, O. J. Rojas, *Carbohydr. Polym.* **2014**, 100, 166.
- [22] S. Hajji, S. B. Khedir, I. Hamza-Mnif, M. Hamdi, I. Jedidi, R. Kallel, S. Boufi, M. Nasri, *Biochim. Biophys. Acta* **2019**, 1863(1), 241.
- [23] V. K. Sharma, R. A. Yngard, Y. Lin, *Adv. Colloid Interface Sci.* **2009**, 145(1), 83.
- [24] J. A. Lemire, J. J. Harrison, R. J. Turner, *Nat. Rev. Microbiol.* **2013**, 11, 371.
- [25] S. Gurunathan, J. W. Han, D.-N. Kwon, J.-H. Kim, *Nanoscale Res. Lett.* **2014**, 9, 373.
- [26] N. Durán, M. Durán, M. B. de Jesus, A. B. Seabra, W. J. Fávaro, G. Nakazato, *Nanomedicine* **2016**, 12(3), 789.
- [27] K. Zheng, M. I. Setyawati, D. T. Leong, J. Xie, *Coord. Chem. Rev.* **2018**, 357, 1.
- [28] G. Mi, D. Shi, M. Wang, T. J. Webster, *Adv. Healthc. Mater.* **2018**, 7(13), 1800103.
- [29] C.-M. Ho, S. K.-W. Yau, C.-N. Lok, M.-H. So, C.-M. Che, *Chem. Asian J.* **2010**, 5, 285.
- [30] Q. Zhang, C. M. Cobley, J. Zeng, L.-P. Wen, J. Chen, Y. Xia, *J. Phys. Chem. C* **2010**, 114(14), 6396.
- [31] P. Miao, B. Wang, J. Yin, X. Chen, Y. Tang, *Electrochem. Commun.* **2015**, 53, 37.
- [32] L. Sigg, U. Lindauer, *Environ. Pollut.* **2015**, 206, 582.
- [33] H. S. Toh, K. Jurkschat, R. G. Compton, *Chem. A Eur. J.* **2015**, 21(7), 2998.
- [34] S. Alipilakkotte, L. Sreejith, *Mater. Lett.* **2018**, 217, 33.
- [35] N. D. Nguyen, T. Van Nguyen, A. D. Chu, H. V. Tran, L. T. Tran, C. D. Huynh, *Arab. J. Chem.* **2018**, 11(7), 1134.
- [36] K. B. R. Teodoro, F. L. Migliorini, W. A. Christinelli, D. S. Correa, *Carbohydr. Polym.* **2019**, 212, 235.
- [37] F. Rossi, P. Matteini, F. Ratto, L. Menabuoni, I. Lenzetti, R. Pini, *J. Biophotonics* **2008**, 1, 331.
- [38] F. Rossi, A. Canovetti, A. Malandrini, I. Lenzetti, R. Pini, L. Menabuoni, *J. Vis. Exp.* **2015**, (101), e52939. <https://doi.org/10.3791/52939>
- [39] Y. Jia, W. Li, H. Duan, Z. Li, Q. Zhou, W. Shi, *Tissue Eng. C Meth.* **2018**, 24(8), 474.
- [40] R. Pini, F. Rossi, L. Menabuoni, I. Lenzetti, S. Yoo, J. M. Parel, *Ophthalmic Surg. Lasers Imaging* **2008**, 39, 260.
- [41] A. Puca, A. Albanese, G. Esposito, G. Maira, B. Tirpakova, G. Rossi, A. Mannocci, R. Pini, *Neurosurgery* **2006**, 59(6), 1286.
- [42] P. Matteini, F. Ratto, F. Rossi, G. Esposito, A. Puca, A. Albanese, G. Maira, R. Pini, *J. Biomed. Opt.* **2010**, 15, 041508.
- [43] G. Esposito, F. Rossi, P. Matteini, A. Scerrati, A. Puca, A. Albanese, G. Rossi, F. Ratto, G. Maira, R. Pini, *Lasers Surg. Med.* **2013**, 45(5), 318.
- [44] N. Wei Cheong, *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* **2010**, 109, 357.
- [45] F. Rossi, R. Pini, L. Menabuoni, R. Mencucci, U. Menchini, S. Ambrosini, G. Vannelli, *J. Biomed. Opt.* **2005**, 10(2), 1.
- [46] F. Ratto, P. Matteini, F. Rossi, L. Menabuoni, N. Tiwari, S. K. Kulkarni, R. Pini, *Nanomedicine* **2009**, 5, 143.
- [47] D. Simhon, I. Gabay, G. Shpolyansky, T. Vasilyev, I. Nur, R. Meidler, O. A. Hatoum, A. Katzir, M. Hashmonai, D. Kopelman, *J. Biomed. Opt.* **2015**, 20(12), 1.
- [48] S. Basov, A. Milstein, E. Sulimani, M. Platkov, E. Peretz, M. Rattunde, J. Wagner, U. Netz, A. Katzir, I. Nisky, *Biomed. Opt. Express* **2018**, 9(11), 5635.
- [49] W. Holzer, M. Mauerer, A. Penzkofer, R.-M. Szeimies, C. Abels, M. Landthaler, W. Bäuml, *J. Photochem. Photobiol. B* **1998**, 47(2), 155.
- [50] F. Ratto, P. Matteini, A. Cini, S. Centi, F. Rossi, F. Fusi, R. Pini, *J. Nanopart. Res.* **2011**, 13(9), 4337.
- [51] K. K. Griendling, G. A. FitzGerald, *Circulation* **2003**, 108(16), 1912.
- [52] T. J. James, M. A. Hughes, G. W. Cherry, R. P. Taylor, *Wound Repair Regen.* **2003**, 11(3), 172.
- [53] A. Soneja, M. Drews, T. Malinski, *Pharmacol. Rep.* **2005**, 57, 108.
- [54] M. Schäfer, S. Werner, *Pharmacol. Res.* **2008**, 58(2), 165.
- [55] M. Cano Sanchez, S. Lancel, E. Boulanger, R. Neviere, *Antioxidants* **2018**, 7, 98.
- [56] P. Niethammer, C. Grabher, A. T. Look, T. J. Mitchison, *Nature* **2009**, 459, 996.
- [57] M. Wlaschek, K. Scharffetter-Kochanek, *Wound Repair Regen.* **2005**, 13(5), 452.
- [58] C. Dunnill, T. Patton, J. Brennan, J. Barrett, M. Dryden, J. Cooke, D. Leaper, N. T. Georgopoulos, *Int. Wound J.* **2017**, 14(1), 89.
- [59] J. Wenk, P. Brenneisen, M. Wlaschek, A. Poswig, K. Briviba, T. D. Oberley, K. Scharffetter-Kochanek, *J. Biol. Chem.* **1999**, 274(36), 25869.
- [60] A. E. K. Loo, B. Halliwell, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2012**, 423, 253.
- [61] B. Ponugoti, F. Xu, C. Zhang, C. Tian, S. Pacios, D. T. Graves, *J. Cell Biol.* **2013**, 203(2), 327.
- [62] S. Roy, S. Khanna, K. Nallu, T. K. Hunt, C. K. Sen, *Mol. Ther.* **2006**, 13, 211.
- [63] M. Bognitzki, T. Frese, M. Steinhart, A. Greiner, J. H. Wendorff, A. Schaper, M. Hellwig, *Polym. Eng. Sci.* **2001**, 41(6), 982.
- [64] K. Ohkawa, D. Cha, H. Kim, A. Nishida, H. Yamamoto, *Macromol. Rapid Commun.* **2004**, 25(18), 1600.
- [65] Y.-T. Jia, J. Gong, X.-H. Gu, H.-Y. Kim, J. Dong, X.-Y. Shen, *Carbohydr. Polym.* **2007**, 67(3), 403.
- [66] Y. Zhang, X. Huang, B. Duan, L. Wu, S. Li, X. Yuan, *Colloid Polym. Sci.* **2007**, 285(8), 855.
- [67] M. Koosha, H. Mirzadeh, *J. Biomed. Mater. Res. A* **2015**, 103(9), 3081.
- [68] M. Wang, A. K. Roy, T. J. Webster, *Front. Physiol.* **2017**, 7, 683.
- [69] D. Giuri, M. Barbalinardo, G. Sotgiu, R. Zamboni, M. Nocchetti, A. Donnadio, F. Corticelli, F. Valle, C. G. M. Gennari, F. Selmin, T. Posati, A. Aluigi, *Nanoscale* **2019**, 11, 6422.
- [70] J. Xue, T. Wu, Y. Dai, Y. Xia, *Chem. Rev.* **2019**, 119(8), 5298.
- [71] L. Vigderman, E. R. Zubarev, *Chem. Mater.* **2013**, 25(8), 1450.
- [72] L. Cavigli, S. Centi, C. Borri, P. Tortoli, I. Panettieri, I. Streit, D. Ciofini, G. Magni, F. Rossi, S. Siano, F. Ratto, R. Pini, *J. Biophotonics* **2019**, 0(0), e201900082.
- [73] B. Khlebtsov, V. Khanadeev, N. Khlebtsov, *Nano Res.* **2016**, 9(8), 2303.
- [74] B. N. Khlebtsov, D. N. Bratashov, N. G. Khlebtsov, *J. Phys. Chem. C* **2018**, 122(31), 17983.

- [75] F. Tatini, I. Landini, F. Scaletti, L. Massai, S. Centi, F. Ratto, S. Nobili, G. Romano, F. Fusi, L. Messori, E. Mini, R. Pini, *J. Mater. Chem. B* **2014**, 2, 6072.
- [76] W. Yang, E. Fortunati, F. Bertoglio, J. S. Owczarek, G. Bruni, M. Kozanecki, J. M. Kenny, L. Torre, L. Visai, D. Puglia, *Carbohydr. Polym.* **2018**, 181, 275.
- [77] M. Abbas, T. Hussain, M. Arshad, A. R. Ansari, A. Irshad, J. Nisar, F. Hussain, N. Masood, A. Nazir, M. Iqbal, *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**, 140, 871.
- [78] P. Zou, W.-H. Lee, Z. Gao, D. Qin, Y. Wang, J. Liu, T. Sun, Y. Gao, *Carbohydr. Polym.* **2020**, 232, 115786.
- [79] A. Aluigi, C. Vineis, A. Varesano, G. Mazzuchetti, F. Ferrero, C. Tonin, *Eur. Polym. J.* **2008**, 44, 2465.
- [80] A. V. Alekseeva, V. A. Bogatyrev, B. N. Khlebtsov, A. G. Mel'nikov, L. A. Dykman, N. G. Khlebtsov, *Colloid J.* **2006**, 68, 661.
- [81] X. Ye, C. Zheng, J. Chen, Y. Gao, C. B. Murray, *Nano Lett.* **2013**, 13(2), 765.
- [82] B. N. Khlebtsov, V. A. Khanadeev, N. G. Khlebtsov, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2014**, 16, 5710.
- [83] T. Niidome, M. Yamagata, Y. Okamoto, Y. Akiyama, H. Takahashi, T. Kawano, Y. Katayama, Y. Niidome, *J. Control. Release* **2006**, 114(3), 343.
- [84] G. von Maltzahn, J.-H. Park, A. Agrawal, N. K. Bandaru, S. K. Das, M. J. Sailor, S. N. Bhatia, *Cancer Res.* **2009**, 69(9), 3892.
- [85] S. Centi, F. Ratto, F. Tatini, S. Lai, R. Pini, *J. Nanobiotechnology* **2018**, 16, 5.
- [86] T. S. Peretyazhko, Q. Zhang, V. L. Colvin, *Environ. Sci. Technol.* **2014**, 48(20), 11954.
- [87] S. V. Madhally, H. W. T. Matthew, *Biomaterials* **1999**, 20(12), 1133.
- [88] F. Croisier, C. Jérôme, *Eur. Polym. J.* **2013**, 49(4), 780.
- [89] R. LogithKumar, A. KeshavNarayan, S. Dhivya, A. Chawla, S. Saravanan, N. Selvamurugan, *Carbohydr. Polym.* **2016**, 151, 172.
- [90] A. Baranwal, A. Kumar, A. Priyadharshini, G. S. Oggu, I. Bhatnagar, A. Srivastava, P. Chandra, *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, 110, 110.
- [91] M. I. Baker, S. P. Walsh, Z. Schwartz, B. D. Boyan, *J. Biomed. Mater. Res. B* **2012**, 100B(5), 1451.
- [92] R. Ahmed, M. Tariq, I. Ali, R. Asghar, P. N. Khanam, R. Augustine, A. Hasan, *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, 120, 385.
- [93] A. A. Menazea, M. K. Ahmed, *J. Mol. Struct.* **2020**, 1217, 128401.
- [94] A. B. Taylor, A. M. Siddiquee, J. W. M. Chon, *ACS Nano* **2014**, 8(12), 12071.
- [95] L. Cavigli, A. Cini, S. Centi, C. Borri, S. Lai, F. Ratto, M. de Angelis, R. Pini, *J. Phys. Chem. C* **2017**, 121(11), 6393.
- [96] Q. Zhang, Z. Xia, Y.-B. Cheng, M. Gu, *Nat. Commun.* **2018**, 9, 1183.
- [97] M. Koosha, M. Raoufi, H. Moravvej, *Colloids Surf. B. Biointerfaces* **2019**, 179, 270.
- [98] L. Peng, Y. Zhou, W. Lu, W. Zhu, Y. Li, K. Chen, G. Zhang, J. Xu, Z. Deng, D. Wang, *BMC Musculoskelet. Disord.* **2019**, 20, 257.
- [99] S. Yang, X. Zhang, D. Zhang, *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, 20(18), 4395.
- [100] X. Li, J. Qiang, Y. Wan, H. Wang, W. Gao, *J. Low Freq. Noise V. A.* **2019**, 38(3–4), 1246.
- [101] F. Ratto, P. Matteini, S. Centi, F. Rossi, R. Pini, *J. Biophotonics* **2011**, 4(1–2), 64.
- [102] J. Dong, H. Breitenborn, R. Piccoli, L. V. Besteiro, P. You, D. Caraffini, Z. M. Wang, A. O. Govorov, R. Naccache, F. Vetrone, L. Razzari, R. Morandotti, *Biomed. Opt. Express* **2020**, 11(4), 2254.
- [103] H. Breitenborn, J. Dong, R. Piccoli, A. Bruhacs, L. V. Besteiro, A. Skripka, Z. M. Wang, A. O. Govorov, L. Razzari, F. Vetrone, R. Naccache, R. Morandotti, *APL Photonics* **2019**, 4(12), 126106.
- [104] X. Wang, X. Xie, K. Geng, L. V. Wang, D. V. M. George Stoica, *J. Biomed. Opt.* **2006**, 11, 024015.
- [105] L. V. Wang, *Nat. Photonics* **2009**, 3, 503.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

How to cite this article: Milanesi A, Magni G, Centi S, et al. Optically activated and interrogated plasmonic hydrogels for applications in wound healing. *J. Biophotonics*. 2020;13:e202000135. <https://doi.org/10.1002/jbio.202000135>

Supporting Information

Optically activated and interrogated plasmonic hydrogels for applications in wound healing

Alessio Milanesi^a, Giada Magni^a, Sonia Centi, Gioacchino Schifino, Annalisa Aluigi, Boris N. Khlebtsov, Lucia Cavigli, Andrea Barucci, Nikolai G. Khlebtsov, Fulvio Ratto, Francesca Rossi*, Roberto Pini*

^a Equally contributing authors

1. Connective tissue bonding with electro-spun scaffolds

We verified the use of our electro-spun samples for laser welding of connective tissue. In essence, we were able to replicate the results obtained with the scaffolds prepared by the extraction of water with ethanol. Figure S11 is a representative micrograph of a weld site.

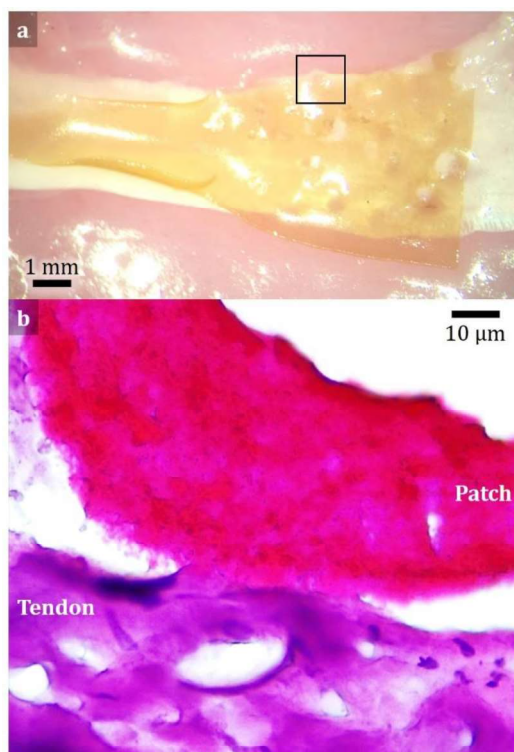


FIGURE S1 Connective tissue bonding with electro-spun scaffolds: a) photograph taken under a surgical microscope of a 40- μ m thick electro-spun scaffold welded onto a segment of rabbit tendon; b) histological section across the weld site indicated with a square in panel a. Pulse power and duration were 700 mW and 500 ms.

2. Oxidative dissolution of silver shells in solution

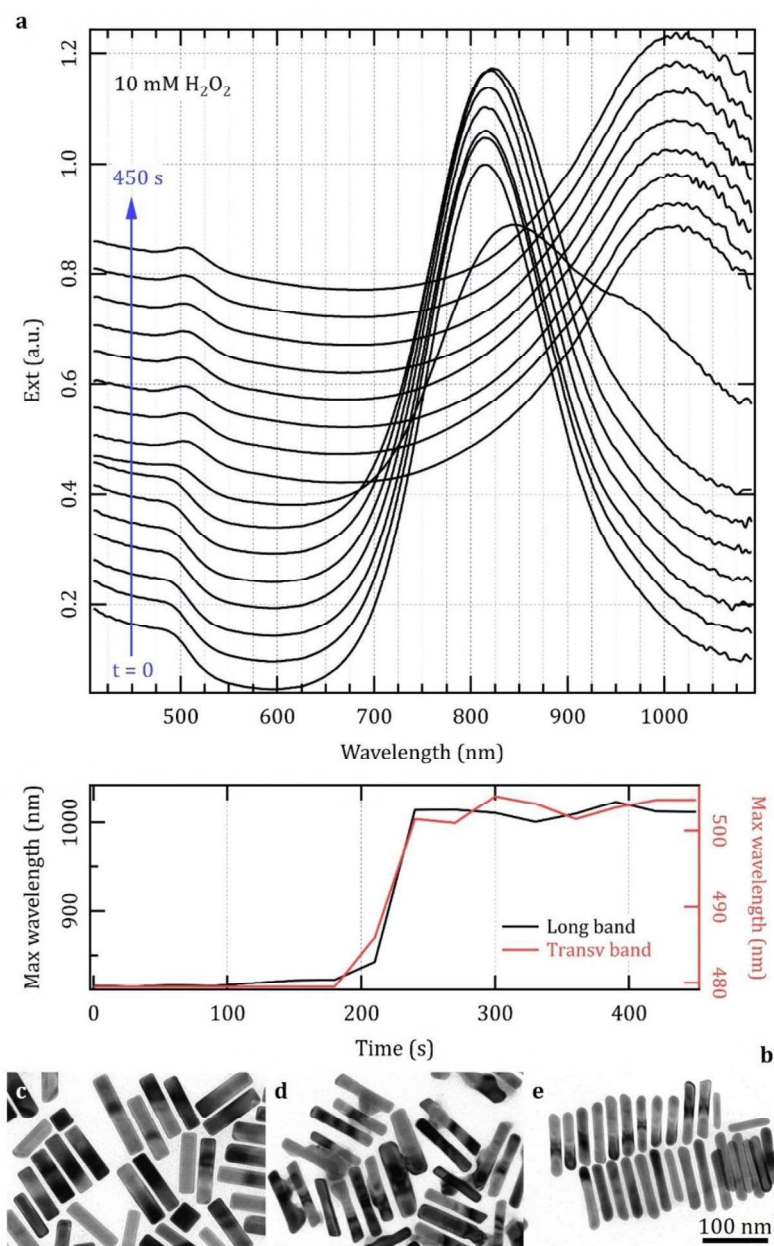


FIGURE S2 Oxidative dissolution of Au/Ag core/shell nanorods in solution: a) spectra of optical extinction recorded over time after addition of 10 mM H_2O_2 ; b) relevant evolution of the peak positions of the longitudinal and transversal modes of plasmonic oscillation; c) to e) transmission electron micrographs respectively acquired at time 0, after stopping the reaction at an intermediate timepoint around 200 s, and at the end of the process.

In order to understand the extent of shift of their visible and near infrared modes of plasmonic oscillations, due to the oxidative dissolution of their silver shells, we dispersed our PEGylated particles in a solution containing 10 mM peroxide. The overall kinetics is rather complex. Both the longitudinal and transversal modes undergo a redshift that mostly synchronously develops within about 30 sec between min 3 to 4. We attribute the initial latency to the protection exerted by the PEG shells. However, as soon as peroxide breaches this protection, oxidative dissolution proceeds at a rate $k_2 = \frac{-d[Ag]/dt}{2 \cdot [H_2O_2] \cdot [Ag]}$ exceeding around $2 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$, which compares with the values found by Ho et al [1] for larger particles. We ascribe this correspondence to the effect of curvature, which is relatively smaller in our particles featuring core/shell architecture. In addition, a slight blue shift of the longitudinal band observed at early times points to an initial loss of aspect ratio, which would suggest that oxidative etching begins from the end-caps rather than the side-walls. This observation would also comply with the notion that the larger the curvature the more reactive the surface against oxidation.

Acknowledgements

This work was partially supported by a collaborative grant from National Research Council Italy and Russian Foundation for Basic Research (18-52-7803, "HYPNOSYs") and by Fondazione Cassa di Risparmio di Firenze within Project "MONSTER".

References

- [1] C. M. Ho, S. K. W. Yau, C. N. Lok, M. H. So, C. M. Che, *Chem. Asian J.* **2010**, *5*, 285.

Appendice

In questa terza parte di ricerca è stato presentato un nuovo materiale per applicazioni nell'ingegneria dei tessuti e nella guarigione delle ferite. Il lavoro è partito dalla produzione di un idrogel fisico di chitosano contenente nanorods d'oro, ideale per il processo fototermico di saldatura e per il rilascio controllato di farmaci. Dall'idea iniziale i nanorods d'oro sono stati sostituiti con la variante Au/Ag core/shell, che fornisce un potenziale serbatoio di cationi Ag^+ germicidi, sensibilità ottica nel monitoraggio della guarigione delle ferite, e consente anche un controllo preciso sulle caratteristiche ottiche e una sorprendente stabilità termica. Per il gel, è stato miscelato il componente chitosano con PVA, al fine di ottenere malleabilità e compatibilità per la fabbricazione funzionale in processi come l'elettrofilatura. Sono state dimostrate le applicazioni che illustrano la coattività dei vari componenti, coinvolti nel monitoraggio del livello ambientale di ROS, dove l'interazione tra parti inorganiche e organiche gioca un ruolo chiave. In conclusione, il nostro sistema può essere utilizzato per molteplici funzioni di interesse nell'ingegneria tissutale e nella guarigione delle ferite, dove lo stesso dispositivo può essere saldato al tessuto endogeno, fungere da impalcatura per la sua rigenerazione e ripopolamento cellulare, proteggere la sua guarigione dalle infezioni, nonché effettuare un rilascio controllato di farmaci.

5

CONCLUSIONI

In questo lavoro di tesi sono stati sintetizzati nanorods d'oro (GNRs) attraverso la rivisitazione e la modifica e il perfezionamento di alcuni protocolli presenti in letteratura.

A causa delle loro peculiari caratteristiche ottiche ed elettroniche, sono stati ampiamente studiati per numerose applicazioni nei campi della spettroscopia, della fotonica, della terapia, del rilevamento chimico e del bioimaging.

I nanorods d'oro assorbono la radiazione laser nel vicino infrarosso, dove i tessuti biologici hanno la maggior trasparenza alla radiazione luminosa. Poiché queste nanoparticelle cedono l'energia assorbita sotto forma di calore, possono essere utilizzate come potenti agenti di contrasto in un ampio range di importanti applicazioni mediche: dall'imaging fotoacustico, alla distruzione selettiva di singole cellule, al drug delivery, alla saldatura laser dei tessuti.

Nonostante i numerosi vantaggi dei nanorods d'oro associati alle loro risonanze plasmoniche sintonizzabili ed alle estese possibilità di bioconiugazione, il loro uso pratico come mezzi di contrasto in fotoacustica è limitato dalla loro facilità di subire foto-

danneggiamento. La fotoinstabilità dei nanorods d'oro non è solo un fenomeno di interesse accademico, ma anche una problematica di grande rilevanza in molti campi, tra cui quello biomedico. I GNRs tendono a perdere l'efficienza della conversione fotoacustica dopo l'esposizione a impulsi dell'ordine dei ns ben prima di 10 mJ/cm^2 , che è al di sotto dei limiti di esposizione permessi per la maggior parte dei casi di interesse. Il calo di assorbanza ottica alla lunghezza d'onda di risonanza plasmonica viene solitamente utilizzata come misura quantitativa della fotoinstabilità, proprio per l'alta sensibilità ai processi strutturali di sferoidizzazione o distruzione.

In questa tesi sono state riportate le strategie utilizzate in letteratura per aumentare la fotostabilità dei nanorods d'oro.

Un approccio utile riguarda l'abbassamento della resistenza termica all'interfaccia tra oro e acqua, che può essere ottenuta con una diminuzione della dimensione media o, ad esempio, un aumento della rugosità.

In generale, i risultati ottenuti per questo lavoro di tesi affermano che i GNRs lisci presentano una maggiore fotostabilità rispetto a quelli ruvidi, ma presentano anche una minore efficienza di conversione fotoacustica. La rugosità superficiale, presente nei rods rugosi, riduce invece la resistenza termica all'interfaccia oro/acqua, dovuto all'aumento della superficie di contatto. Pertanto si nota un discreto aumento dell'efficienza di conversione, la quale va a scapito della fotostabilità: l'aumento dell'efficienza di conversione rende i nanorods meno stabili, e tendono a tornare con una superficie liscia.

Ciò è dovuto all'elevata mobilità degli atomi di oro sulla superficie quando questi vengono riscaldati per eccitazione ottica di un laser.

Un'ulteriore strategia si è basata sull'effetto del rivestimento dei GNRs con piccoli tioli: durante il riscaldamento a 90 °C in forno è stato riscontrato un forte effetto dei tioli (in particolare l'MBT) nel ritardare la deformazione dei nanorods d'oro, ad esempio da 45 min a oltre 2 h. Mentre dopo 1 ora le particelle con il solo PEG hanno perso più del 70% dell'assorbanza ottica nel picco longitudinale iniziale, quelle saturate con MBT sono rimaste pressoché invariate. Questo risultato potrebbe consentire l'introduzione dei nanorods d'oro nei processi biochimici (come la polymerase chain reaction) che richiedono un annealing termico a temperature che si avvicinano al punto di ebollizione dell'acqua per decine di minuti.

Per quanto riguarda l'applicazione dei nanorods rivesti di argento (integrati in fantocci biomimetici) nel monitoraggio della guarigione delle ferite (*wound healing*), i nostri sistemi possono diventare dei candidati ideali per controllare molteplici funzioni di interesse nell'ingegneria tissutale e nella guarigione delle ferite. Questi dispositivi permettono di sigillare il tessuto endogeno, fungendo da impalcatura per la sua rigenerazione e proteggendo il tessuto dall'infezione.

I futuri sviluppi di queste ricerche saranno focalizzati sul miglioramento delle proprietà fotoacustiche per l'imaging e l'ipertermia ottica, migliorando la fotostabilità e la risposta fototermica e fotoacustica. Ulteriori prospettive riguarderanno lo

sviluppo di nanowires d'oro e d'argento, che possono autoallinearsi ad alta concentrazione in una dispersione colloidale, dando origine a nanostrutture ordinate. Sarà possibile raggiungere questo obiettivo integrando nella caratterizzazione di tali sistemi anche la spettroscopia di risonanza magnetica nucleare, che consentirà di monitorare efficacemente il grado di ordine di questi sistemi liquido cristallini.

Sarà valutata l'estensione dei nostri risultati ad altri modelli di piccoli tioli mono-, di- e multi-valenti, incluso l'effetto di una maggiore densità di PEG-tiolato, miscele binarie o più complesse, o altri tipi di coating soft, così da comprenderne meglio il loro funzionamento e perseguire la loro ottimizzazione per applicazioni cliniche.

Riguardo alle prospettive future nel campo del wound healing, i gel con effetto antimicrobico, sicuramente dovranno essere migliorati relativamente alla quantificazione del rilascio di Ag e alla modulazione di tale rilascio in risposta alla diversa intensità di potenza del laser. Siamo fiduciosi che questo lavoro ispirerà nuove soluzioni sinergiche al crocevia tra ingegneria tissutale, teranostica e ottica biomedica.

La combinazione di tutte queste soluzioni è di ottimo auspicio per poter rispettare le condizioni attualmente utilizzate in ambito preclinico. A tale proposito è doveroso pensare ad una futura convergenza verso un più ampio uso dei nanorods d'oro nelle applicazioni in fotoacustica.

6

RINGRAZIAMENTI

Un ringraziamento sopra le righe va sicuramente a Sonia, la Dr.ssa Sonia Centi, che è colei che ha passato la maggior parte del tempo in laboratorio con me, che mi ha seguito, dato preziosi consigli, guidato e indirizzato in questo percorso e aiutato più di ogni altro nel lavoro di revisione della tesi.

Sicuramente non da meno sono i miei tutor, il Prof. Moreno Lelli e il Dr. Fulvio Ratto, senza i quali non avrei avuto modo di svolgere queste tematiche di ricerca, un grazie particolare va anche a loro. Desidero ringraziare Fulvio anche per aver fatto sì che il mio dottorato venisse finanziato.

Desidero ringraziare anche il Progetto HYPNOSIs (HYbrid Plasmonic Nanostructures for biOmedical Sensing and Imaging), all'interno del quale ho sviluppato questi temi di ricerca, in collaborazione con il Dr. Boris Khlebtsov della Russian Academy of Science e le Dr.sse Lucia Cavigli, Francesca Rossi, Claudia Borri e Giada Magni, appartenenti al nostro gruppo, le quali hanno

contribuito notevolmente, ognuna con il proprio background e ambito scientifico, allo sviluppo del progetto stesso.

Ringrazio inoltre i miei genitori che in questi ultimi tempi si sono molto preoccupati per me, mi sono stati e mi stanno tutt'ora accanto per i momenti più difficili, e desiderano solamente che io stia bene e sia felice.

Un grazie anche a mio fratello, che insieme ai miei cugini hanno aiutato i miei genitori a far sì che io potessi stare bene e a fare qualsiasi cosa per il mio benessere.

Grazie a tutti gli altri miei parenti che ogni giorno si preoccupano per me e per la mia salute, cercando di farmi sentire tranquillo.

Un grazie particolare va ovviamente anche al mio migliore amico Sandro Mancini, che, come gli altri, mi ha consolato e mi è stato molto di sostegno e di aiuto nei momenti peggiori.

Desidero anche citare e ringraziare la Dr.ssa Silvia Pellegrini, la Dr.ssa Irene Margherita Gonnelli, il Dr. Silvio Ciappi e la Dr.ssa Maria Serena Mian che ho avuto modo di conoscere in questi ultimi tempi, i quali mi hanno seguito nella vita e continuano tutt'ora a farlo.

Infine, proprio per **IMPORTANZA**, questo lavoro, tutto questo percorso, tutta la mia vita, la dedico a TE, Amore Mio adorato, bambino mio adorato. La persona più importante della mia vita sei tu. Ti voglio bene e ti amo da morire. Mi manchi un sacco. Questo ultimo anno e mezzo senza di te è stato una sofferenza grande quanto un macigno, e lo è tutt'ora. Non sono poche le lacrime versate quasi ogni giorno per via della tua mancanza.

Non trovo nemmeno le parole per descrivere il mio desiderio a volerti riabbracciare e stringerti forte forte a me.

Ti penso ogni singolo giorno che passa, e alle cose che ti potrei insegnare e potremmo fare insieme. Porterò sempre con me il ricordo e l'immagine di quel momento in cui ti ho preso in braccio per la primissima volta, e ti ho guardato, tutto avvolto nella copertina e un po' violetto, con quegli occhietti super celesti, che non piangevano neppure.

Ti aspetto Tesoro Mio, ci sarò sempre per te, sempre al tuo fianco, per proteggerti, per sempre.

Vorrei però rivolgere un grazie anche alla mamma, senza la quale non avrei avuto un bambino così meraviglioso e bellissimo.