



Proefschrift ter verkrijging van de graad van Master in de Fysica

Een kwantitatieve methode voor de analyse van de helische morfologie van nanostructuren op basis van elektronentomografie

Departement Fysica
Faculteit Wetenschappen
Universiteit Antwerpen

Academiejaar 2021 – 2022

Auteur: Wouter Heyvaert

Promotor: Prof. Dr. Sara Bals

Copromotor: Dr. Wiebke Albrecht

Abstract

Sinds enkele jaren is er een sterke toename betreffende wetenschappelijke interesse in plasmonische nanodeeltjes met een chirale morfologie. Zulke chirale nanodeeltjes interageren in verschillende mate met links- en rechtshandig circulair gepolariseerd licht, wat chiroptische activiteit wordt genoemd. Er is echter nog relatief weinig geweten over de fundamentele interactie tussen chirale nanodeeltjes en circulair gepolariseerd licht. Hierdoor is de ontwikkeling van nieuwe chirale nanodeeltjes met sterke chiroptische activiteit gewoonlijk een *trial-and-error* proces. Om de origine van de chiroptische activiteit van chirale nanodeeltjes beter te begrijpen, is een correlatief onderzoek nodig waarbij het verband tussen de structurele en optische chiraliteit van individuele nanodeeltjes onderzocht wordt. Dit vereist een lokale, driedimensionale karakteriseringsmethode om de chirale morfologie van nanodeeltjes op een kwantitatieve manier te analyseren. Elektronentomografie is een techniek die toelaat om de driedimensionale morfologie van nanodeeltjes te bekomen, maar tot nu toe was enkel een kwalitatieve analyse van de mate van chiraliteit van de morfologie mogelijk. In deze thesis wordt een nieuwe methode voorgesteld waarmee de heliceiteit, dit is een subklasse van chiraliteit, van nanodeeltjes op een kwantitatieve manier geanalyseerd kan worden. Zo kan bijvoorbeeld de heliceiteitsfunctie berekend worden. Deze functie komt overeen met een decompositie van een structuur in een combinatie van helices en laat toe om onder andere de helische inclinatiehoeken van helische oppervlakte elementen te bestuderen. Op basis van de heliceiteitsfunctie kan ook de totale heliceiteit berekend worden, dit is een scalaire grootheid die de mate van heliceiteit van het object weergeeft. Tenslotte kan ook een heliceiteitsmap opgesteld worden om de verdeling van helische oppervlakte elementen van complexe structuren te visualiseren. Aan de hand van enkele experimentele resultaten wordt aangetoond dat significante inzichten over chirale nanodeeltjes bekomen kunnen worden met deze nieuwe methodologie. Zulke inzichten zijn niet enkel nuttig om de interactie tussen structurele en optische chiraliteit te ontrafelen, maar bieden ook waardevolle informatie om de synthese van nieuwe nanodeeltjes met versterkte chiroptische activiteit te optimaliseren.

Summary

In recent years there has been a strongly increasing scientific interest in plasmonic nanoparticles with a chiral morphology. Such nanoparticles interact differently with left- and right-handed circularly polarized light, which is called chiroptical activity. There is however relatively little known about the fundamental interaction between chiral nanoparticles and circularly polarized light, making the synthesis of new chiral nanoparticles with an enhanced chiroptical activity a complex trial-and-error process. To better understand the origin of the chiroptical activity of nanoparticles, a correlative analysis is required to investigate the link between the structural and optical chirality of single chiral nanoparticles. Such an analysis requires a methodology to investigate the three-dimensional morphology of nanoparticles in a quantitative manner. Electron tomography is a technique capable of acquiring the three-dimensional shape of nanoparticles, but so far only a qualitative analysis of the chirality of their morphology was possible. In this thesis, a novel methodology is presented to quantitatively investigate helicity, which is a subclass of chirality. One can for example calculate the helicity function, which effectively decomposes a given morphology into a combination of helices. The helicity function allows one to study helical inclination angles of helical surface features. Based on the helicity function, one can also calculate the total helicity. This is a scalar indicating the degree of helicity of the entire structure. Finally, a helicity map can be calculated to visualize the spread of helical features across the surface of complex structures. Experimental results are used to showcase how significant insights about chiral nanoparticles can be obtained using this novel methodology. Such insights can be used to uncover the correlation between the structural and optical chirality, but they can also provide valuable information to improve the synthesis of new nanoparticles with an enhanced chiroptical response.

Dankwoord

Eerst en vooral wil ik mijn promotor, prof. Dr. Sara Bals, bedanken voor haar begeleiding de afgelopen drie jaar bij zowel mijn bachelorproef als mijn masterproef. Daarnaast wil ik ook mijn copromotor, Dr. Wiebke Albrecht, bedanken voor haar begeleiding bij mijn masterproef. Dankzij hen heb ik niet enkel dit proefschrift kunnen afwerken, maar heb ik ook al een eerste paper, genaamd “Quantification of the Helical Morphology of Chiral Gold Nanorods”, uitgebracht in ACS Materials Letters als eerste auteur.

Ik zou bovendien alle coauteurs van mijn paper willen bedanken voor al hun hulp bij het onderzoek dat gepresenteerd werd en bij het schrijven van deze paper. Ook wil ik Dr. Alexander Skorikov en Dr. Ajinkya Kadu bedanken om mij uit te nodigen om mijn resultaten te presenteren op de SIAM Conference of Imaging Science (IS22).

Verder wil ik Dr. Adrián Pedraza-Tardajos bedanken voor onze vele brainstorm sessies die cruciaal waren om het voorgestelde werk op punt te stellen. Ook Mikhail Mychinko heeft me veel geholpen met het uitvoeren van verschillende experimenten en wil ik daarvoor bedanken. Tenslotte wil ik Dr. Bing Ni bedanken om zijn samples van chirale Au nanodeeltjes beschikbaar te stellen voor gebruik in mijn thesis, ondanks dat deze data nog niet gepubliceerd werden.

Inhoudsopgave

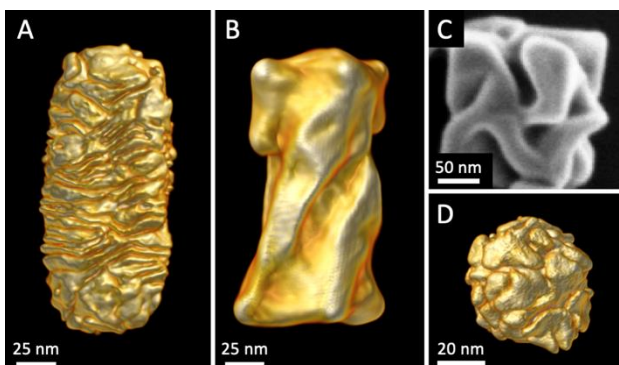
Abstract	2
Summary	3
Dankwoord	4
1 Inleiding	6
2 Elektronentomografie als middel om de 3D vorm van nanodeeltjes te karakteriseren	9
2.1 Rastertransmissie-elektronenmicroscopie	9
2.2 Elektronentomografie	11
2.3 Werkwijze	14
3 Methode voor de kwantitatieve analyse van een helische structuur	16
3.1 Literatuuronderzoek	16
3.2 Methodologie voor de kwantitatieve analyse van helische nanostructuren	19
3.3 Implementatie van de voorgestelde methode	21
4 Experimentele resultaten	25
4.1 Verdraaide Au nanostaafjes met een licht verschillende synthese	25
4.2 Heliciteit als functie van opwarming van verdraaide Au nanostaafjes	29
4.3 Au kern-schil nanostaafjes	31
4.4 Helische cluster van achirale Au nanostaafjes	34
5 Conclusies	36
Bibliografie	38
Bijlage A. Synthese van verdraaide Au nanostaafjes	43
Bijlage B. Additionele resultaten van verdraaide Au nanostaafjes met een verschillende synthese	44
Bijlage C. Additionele resultaten van het verdraaide Au nanostaafje bij opwarming	45
Bijlage D. Synthese van Au kern-schil nanostaafjes	46
Bijlage E. Additionele resultaten van Au kern-schil nanostaafjes	48

1 Inleiding

Omwille van hun kleine afmetingen hebben nanomaterialen unieke eigenschappen die leiden tot nieuwe toepassingen die niet bekomen kunnen worden met equivalente macroscopische materialen. Metalen nanodeeltjes kunnen bijvoorbeeld koppelen met elektromagnetische straling via gelokaliseerde oppervlakte plasmon resonanties (LSPR). Dit zijn collectieve oscillaties van elektronen in zulke nanodeeltjes, en wanneer de frequentie van elektromagnetische radiatie overeenkomt met de eigenfrequentie van een LSPR, vindt er resonantie plaats. De frequentie waarbij zulke LSPRs plaatsvinden, is sterk afhankelijk van de chemische samenstelling, de grootte en de morfologie van een nanodeeltje en kan verder beïnvloed worden door verschillende nanodeeltjes dicht (maximaal enkele tientallen nm) bij elkaar te brengen.¹ Hierdoor is het mogelijk om de koppeling van metalen nanodeeltjes met licht vrijwel naar keuze te optimaliseren in het zichtbare licht en nabije infrarood (VIS-NIR) tijdens de synthese procedure van de nanodeeltjes. Dit biedt een enorme variatie aan mogelijkheden om dit plasmonisch effect te gebruiken in verschillende toepassingen.^{2,3}

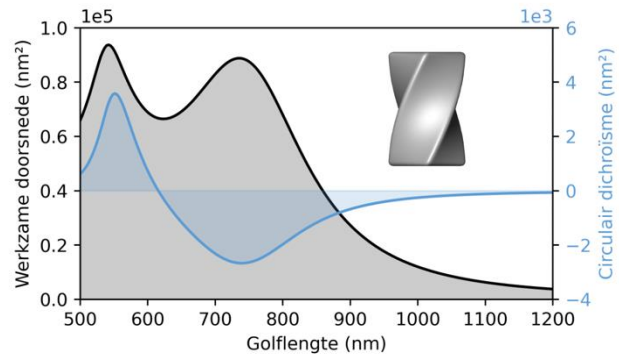
Metalen nanodeeltjes kunnen bijvoorbeeld gefunctionaliseerd worden door bepaalde biomoleculen aan het oppervlak van de nanodeeltjes te hechten. Vaak wordt hiervoor gebruik gemaakt van gouden (Au) nanodeeltjes vanwege hun biocompatibiliteit.⁴ De sterke optische activiteit van de nanodeeltjes maakt het dan mogelijk om de gezochte biomoleculen te lokaliseren. Op die manier is men in staat om onder andere kankercellen op te sporen of neurodegeneratieve ziektes te onderzoeken.⁵⁻⁷ Anderzijds wordt optische energie via LSPRs omgezet in warmte die gebruikt kan worden om nanocapsules te openen. Zo is het mogelijk om bepaalde medicijnen zeer gelokaliseerd toe te dienen en zo neveneffecten bij gezond weefsel te beperken.^{5,7} De toepassingen van plasmonische effecten reiken bovendien veel verder dan de biomedische sector. Aangezien licht sterk verstrooit aan plasmonische nanodeeltjes en het lokaal elektromagnetisch veld in de buurt van zulke deeltjes enorm versterkt wordt, kunnen ze bijvoorbeeld ook gebruikt worden om de efficiëntie van fotonvoltaïsche cellen te verbeteren of om fotokatalytische processen te versterken.^{5,7}

Een recente trend die veel wetenschappelijke interesse opwerkt is de synthese en karakterisering van chirale metalen nanodeeltjes (zie **Figuur 1.1**).^{8,9,18,19,10-17} Deze nanodeeltjes hebben een vorm zonder enige spiegelsymmetrie. Het is dus niet mogelijk om de vorm van zulke na-



Figuur 1.1. Enkele voorbeelden van chirale metalen nanodeeltjes: **A.** 3D reconstructie, bekomen met elektronentomografie, van een Au nanostaafje met helisch-georiënteerde rimpels;¹⁵ **B.** 3D reconstructie, bekomen met elektronentomografie, van een Au nanostaafje met vier helische randen;¹¹ **C.** Rasterelektronenmicroscopie afbeelding van een chirale Au nanokubus, hergebruikt van Lee et al.;¹⁰ **D.** 3D reconstructie, bekomen met elektronentomografie, van een Au nanosfeer met kleine rimpels.¹⁵

nodeeltjes volledig te overlappen met hun spiegelbeeld. Hierdoor interageren deze nanodeeltjes verschillend met linkshandig en rechtshandig circulair gepolariseerd licht (CPL), wat chiroptische activiteit genoemd wordt.²⁰⁻²² Dit wordt gemeten als circulair dichroïsme (CD), wat het verschil is tussen het extinctie spectrum – dit is de som van absorptie en verstrooiing – van linkshandig en rechtshandig CPL. **Figuur 1.2** toont het berekende extinctie spectrum en CD van een gemodelleerd chiraal



Figuur 1.2. Berekende werkzame doorsnede voor extinctie bij een gemodelleerd chiraal Au nanodeeltje (voorgesteld in de figuur) en het circulair dichroïsme van dit nanodeeltje.

Au nanodeeltje. Er is al veel vooruitgang gemaakt op vlak van de synthese van chirale nanodeeltjes met sterke chiroptische activiteit, maar er is weinig geweten over de fundamentele interactie tussen zulke nanodeeltjes en CPL, of over de oorzaak van deze effecten. Het optimaliseren van de morfologie van chirale nanodeeltjes is hierdoor nog vaak een ingewikkeld *trial-and-error* proces waarbij de optimale vorm van de nanodeeltjes niet eens gekend is. Het zou daarom een enorme meerwaarde bieden als de belangrijkste eigenschappen die een sterke chiroptische activiteit induceren op voorhand gekend zijn. Het sterkste vermoeden is namelijk dat de chirale vorm een zeer belangrijke rol speelt, maar andere factoren kunnen nog niet worden uitgesloten. Onder andere een chirale ordening van atomen in de kristalstructuur of chirale moleculen nabij het oppervlak van nanodeeltjes kunnen ook chiroptische activiteit induceren.^{13,22-24} Hoogstwaarschijnlijk ligt de origine van deze activiteit dus bij een combinatie van verschillende effecten.

Het is duidelijk dat een correlatief onderzoek vereist is om de oorzaak van chiroptische activiteit bij chirale metalen nanodeeltjes in kaart te brengen. Zo een onderzoek kan bijvoorbeeld bestaan uit het vergelijken van (de extrema van) het CD spectrum van nanodeeltjes met de mate van chiraliteit van de morfologie van de overeenkomstige nanodeeltjes. Daartoe zijn er echter verschillende struikelblokken die overkomen moeten worden. Enerzijds is het meten van het CD spectrum van een enkel nanodeeltje wel mogelijk, maar dit vereist zeer moderne technieken zoals fothermische of verstrooiingsmicroscopie.^{25,26} Anderzijds bestaat er nog geen geschikte en universeel geaccepteerde techniek om de chirale morfologie van nanodeeltjes op een objectieve en kwantitatieve manier te onderzoeken. Daarom is het doel van dit proefschrift het creëren van een betrouwbare kwantitatieve techniek om de chirale morfologie van nanodeeltjes te ontrafelen, en zo een antwoord te bieden op de onderzoeksvraag:

Hoe kan de chiraliteit van de morfologie van individuele nanodeeltjes op een objectieve en kwantitatieve manier bestudeerd worden?

Hierbij moet het mogelijk zijn om de chirale morfologie van metalen nanodeeltjes te kwantificeren, los van alle andere mogelijke oorzaken of effecten van hun chiroptische activiteit. Zo kan toekomstig onderzoek uitwijzen wat de exacte invloed is van de chirale morfologie van

nanodeeltjes met betrekking tot hun chiroptische activiteit. Verder moet zo een methode in staat zijn om niet enkel de mate van chiraliteit te kwantificeren, maar om ook inzichten te bieden die nuttig kunnen zijn bij het optimaliseren van de synthese procedure.

2 Elektronentomografie als middel om de 3D vorm van nanodeeltjes te karakteriseren

De theoretisch optimale resolutie van lichtmicroscopen wordt beperkt door diffractie tot ongeveer de halve golflengte van het licht. Voor zichtbaar licht (400 nm – 700 nm) is de optimale resolutie dus van de grootteorde van enkele honderden nanometers. Om nanomaterialen in beeld te brengen is een resolutie van maximaal enkele nanometers vereist, en is lichtmicroscopie dus niet bruikbaar.²⁷ Daarom is elektronenmicroscopie de huidige norm bij de structurele analyse van nanomaterialen. De golf-deeltje dualiteit laat toe om elektronen te gebruiken voor beeldvorming met superieure resolutie in vergelijking met lichtmicroscopie. De golflengte van elektronen wordt bepaald door hun energie en een resolutie van enkele picometers kan in theorie bereikt worden met elektronen met een energie van ongeveer 100 keV. In de praktijk wordt deze resolutie gelimiteerd door aberraties van de elektromagnetische lenzen die gebruikt worden om de elektronenbundel te focussen, maar met moderne apparatuur is het al mogelijk om atomaire resolutie te halen met transmissie-elektronenmicroscopie (TEM).²⁷

Er bestaan bovendien verschillende soorten van elektronenmicroscopen, waaronder de transmissie-elektronenmicroscop. Bij TEM worden elektronen versneld met een versnelspanning van 60 kV tot 400 kV, of zelfs hoger.^{27,28} Hierdoor kunnen dunne specimens gepenetreerd worden door de elektronenbundel en kunnen onder andere de transmissie-elektronen gebruikt worden voor beeldvorming van het specimen. De benodigde apparatuur voor TEM is echter ingewikkeld en duur, waardoor deze techniek enkel in gespecialiseerde laboratoria beschikbaar is. In de literatuur wordt daarom vaker gebruik gemaakt van raster-elektronenmicroscopie (*Scanning Electron Microscopy*, SEM).^{11,14–18,29} Hierbij wordt een elektronenbundel versneld met een lagere versnelspanning van enkele tientallen kV. SEM is meer toegankelijk dan TEM, maar heeft het nadeel dat de resolutie lager is en er enkel een beeld van het oppervlak van het specimen verkregen kan worden. De elektronenbundel kan het specimen namelijk niet volledig doordringen, maar andere effecten zoals terugverstrooiing of de generatie van secundaire elektronen kunnen wel gebruikt worden voor beeldvorming van het specimen. De interne structuur van nanodeeltjes kan dus niet bestudeerd worden met SEM.

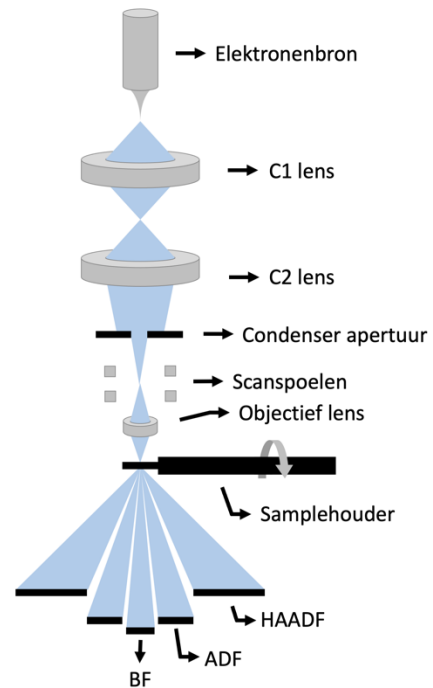
2.1 Rastertransmissie-elektronenmicroscopie

In een rastertransmissie-elektronenmicroscopie mode (*Scanning Transmission Electron Microscopy*, STEM), dit is een beeldvormingsmethode bij TEM, wordt een elektronenbundel versneld naar het specimen zoals schematisch getoond wordt in **Figuur 2.1**. Deze bundel wordt versneld vanuit een elektronenbron en gefocuseerd via een reeks elektromagnetische lenzen in een kleine probe met een doorsnede kleiner dan 1 nm, waardoor er slechts met een beperkt gebied van het specimen interactie ontstaat.^{27,28} Een grote meerderheid van de elektronen zullen ofwel ongestoord door het specimen gaan, ofwel verstrooien onder verschillende hoeken door interactie met het specimen. Bij inelastische verstrooiing verliezen de elektronen

een deel van hun energie. Dit gebeurt voornamelijk bij zeer kleine verstrooiingshoeken en kan dus opgemeten worden in de doorgaande bundel, wat bijvoorbeeld het geval is bij elektronen-energieverlies spectroscopie (*Electron Energy Loss Spectroscopy*, EELS). Bij elastische verstrooiing ondergaan de elektronen daarentegen een richtingsverandering zonder energieverlies. Dit kan opgedeeld worden in twee types. Enerzijds is er coherente elastische verstrooiing (Bragg diffractie), dit is gerelateerd aan de periodische kristalstructuur van het specimen. Anderzijds is er incoherente elastische verstrooiing (Rutherford verstrooiing), die veroorzaakt wordt door de interactie van de elektronenbundel met afzonderlijke atomen. Rutherford verstrooiing is daarom geen diffractie effect en is proportioneel met de dikte t van het specimen en het atoomnummer Z van de atomen waarvan het specimen gemaakt is. Het contrast dat resulteert uit Rutherford verstrooiing is evenredig met $t \cdot Z^2$, dit noemt men ook wel massa-dikte contrast.²⁷

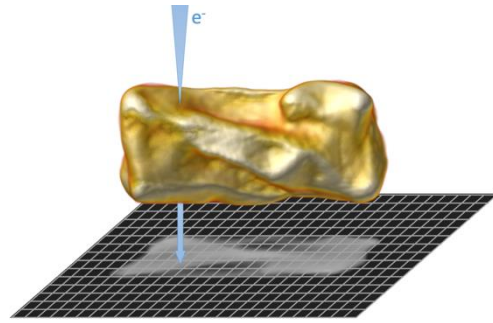
Hoewel de werkzame doorsnedes van beide types van elastische verstrooiing afnemen naarmate grotere verstrooiingshoeken beschouwd worden, moet vermeld worden dat die van Rutherford verstrooiing minder snel afneemt dan de werkzame doorsnede van Bragg diffractie. Bij verstrooiingshoeken van meer dan ongeveer 5° is Bragg diffractie nauwelijks nog waarneembaar, terwijl er nog steeds een deel aan Rutherford verstrooiing gemeten kan worden.²⁷ Daarom wordt er in STEM mode gewoonlijk gebruik gemaakt van verschillende ringvormige detectoren om de elektronen te meten die verstrooien onder bepaalde hoeken ten opzichte van de doorgaande bundel. Een typische configuratie bestaat uit drie detectoren: De doorgaande bundel wordt gemeten met een helderveld (*bright-field*, BF) detector, elektronen die verstrooien onder lage hoeken (gewoonlijk kleiner dan 3°) worden opgemeten met een ringvormige donkerveld (*annular dark-field*, ADF) detector, en een hoge-hoek ringvormige donkerveld (*high-angle annular dark-field*, HAADF) detector vangt de elektronen op die verstrooien onder hogere hoeken.²⁷

Het contrast in de afbeeldingen hangt dus af van het type detector dat gebruikt wordt. Verstrooiing van elektronen onder lage hoeken wordt voornamelijk gedomineerd door inelastische en coherente elastische verstrooiing, dit maakt de BF en ADF detectoren geschikt om bijvoorbeeld defecten in de kristalstructuur van materialen te onderzoeken. Het contrast bij HAADF-STEM is daarentegen minder afhankelijk van zulke effecten en wordt voornamelijk bepaald door massa-dikte contrast.



Figuur 2.1. Schematische voorstelling van de componenten van een rastertransmissie-elektronenmicroscop en het pad van de elektronenbundel (niet op schaal).

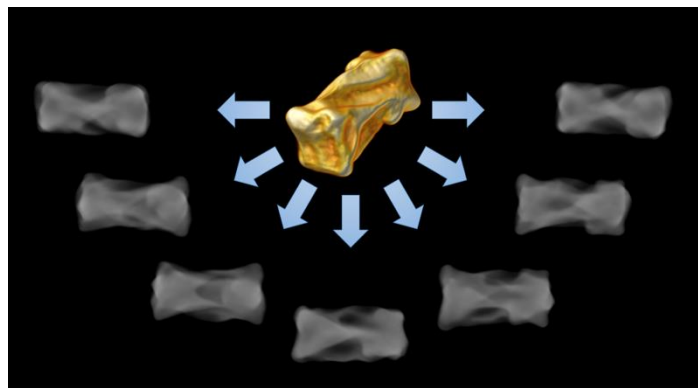
Scanspoelen kunnen de elektronenbundel vervolgens richten naar verschillende locaties op de samplehouder. Hiervan wordt gebruik gemaakt om een afbeelding te creëren. Dit gebeurt door de elektronenbundel te scannen over een denkbeeldig rooster over het specimen en in elk roosterpunt een meting uit te voeren met één of meerdere STEM detectoren. Die meting geeft de grijswaarde voor de overeenkomstige pixel in de resulterende afbeelding zoals geïllustreerd in **Figuur 2.2**.



Figuur 2.2. Schematische voorstelling van de beeldvormings-procedure in STEM, waarbij de intensiteit in elke pixel wordt bepaald door het signaal op de gekozen detector wanneer de elektronenbundel naar het roosterpunt gericht wordt dat met die pixel overeen komt.

2.2 Elektronentomografie

Elektronenmicroscopie maakt het mogelijk om nanomaterialen in beeld te brengen met een zeer hoge resolutie, maar er zijn toch nog beperkingen: STEM afbeeldingen vormen immers slechts 2D projecties van 3D objecten. 3D beeldvorming is echter vereist wanneer men geïnteresseerd is in de vorm van nanodeeltjes, want 2D beelden kunnen misleidend zijn en kunnen bijvoorbeeld onmogelijk

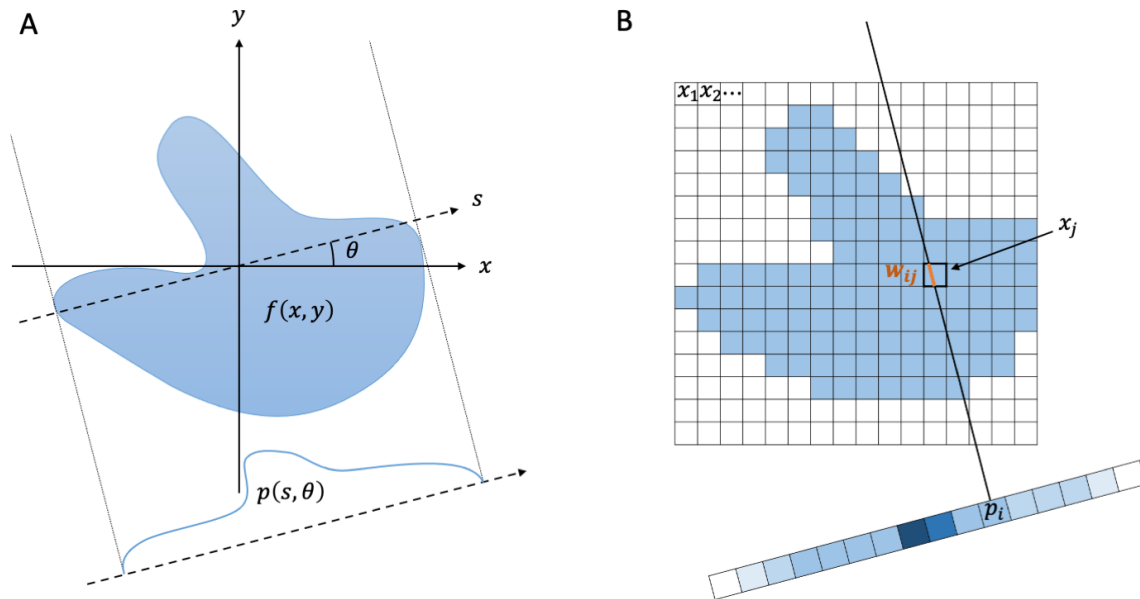


Figuur 2.3. Illustratie van de opname van een tiltreeks.

gebruikt worden om de handigheid van chirale nanodeeltjes te bepalen. Elektronentomografie (ET) is een methode die het mogelijk maakt om de 3D morfologie van nanodeeltjes te reconstrueren. Dit kan gedaan worden door een reeks van verschillende HAADF-STEM beelden op te nemen terwijl het specimen getilt wordt, zoals getoond in **Figuur 2.3**. Met wiskundige algoritmes kan de volledige 3D morfologie van het nanodeeltje gereconstrueerd worden op basis van zo een tiltreeks.³⁰

Tomografie is gebaseerd op de Radon transformatie. Dit is een reversibele transformatie die gebruikt kan worden om de projectiebeelden van een object onder alle hoeken te berekenen als lijnintegralen, zoals weergegeven in **Figuur 2.4 A**.³⁰⁻³² De Radon transformatie is gedefinieerd als:

$$p(s, \theta) := \iint_{\mathbb{R}^2} f(x, y) \delta(x \cos \theta + y \sin \theta - s) dx dy \quad 2.1$$

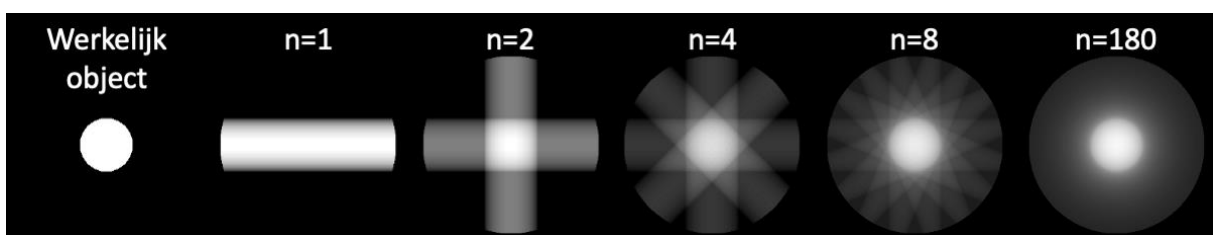


Figuur 2.4. Illustratie van de Radon transformatie $f(x, y) \rightarrow p(s, \theta)$, **A.** Continue Radon transformatie, **B.** Discrete Radon transformatie.

Hier is $f(x, y)$ een functie die de dichtheid van het object weergeeft in elk punt, $p(s, \theta)$ is de verzameling van projectiebeelden, en $\delta(\cdot)$ is de Dirac-delta distributie. Deze transformatie kan ook eenvoudig uitgebreid worden voor 3D objecten door elk horizontaal vlak afzonderlijk te beschouwen:

$$p(s, \theta, z) := \iint_{\mathbb{R}^2} f(x, y, z) \delta(x \cos \theta + y \sin \theta - s) dx dy \quad 2.2$$

Het uitvoeren van de Radon transformatie wordt een voorwaartse projectie genoemd. Als de gebruikte beeldvormingsmethode deze operatie uitvoert, is het mogelijk om het object $f(x, y)$ terug te reconstrueren en hierbij bestaan verschillende methoden. De meest eenvoudige methode is de terugprojectie. Hierbij wordt $p(s, \theta)$ uitgesmeerd langs de respectievelijke projectielijnen voor alle projectierichtingen θ , zoals weergegeven in **Figuur 2.5**, waar de terugprojecties berekend werden op basis van een beperkt aantal projectiebeelden. Hoewel de Radon transformatie een continue transformatie is, is projectiedata in werkelijkheid discreet in alle coördinaten zoals in **Figuur 2.4 B** geïllustreerd wordt. De projectie kan daardoor ook gedefinieerd worden als een stelsel van lineaire vergelijkingen:



Figuur 2.5. Terugprojectie van n projectiebeelden van een uniforme cirkel.

$$p_i = \sum_{j=1}^n w_{ij} x_j \quad 2.3$$

$$\mathbf{p} = W\mathbf{x}$$

\mathbf{p} is hier een vector met de projectiedata, \mathbf{x} is een vector met de dichtheid van het object, en W is de projectiematrix die aangeeft hoeveel elke voxel in de representatie van het object bijdraagt aan elke pixel in de projectieafbeeldingen. Terugprojectie kan uitgevoerd worden door de inverse van W te vinden:

$$\mathbf{x} = W^{-1}\mathbf{p} \quad 2.4$$

Dit is echter niet evident, want de dimensionaliteit van \mathbf{p} is gewoonlijk veel kleiner is dan die van \mathbf{x} . Hierdoor is W niet inverteerbaar en wordt W^{-1} dikwijls benaderd door zijn getransponeerde W^T . De reconstructie kan daarom best uitgevoerd worden met een iteratieve methode zoals de simultane iteratieve reconstructietechniek (SIRT).^{32,33} Dit is een methode waarbij in elke iteratie de waarden van \mathbf{x} aangepast worden om de reconstructie te verbeteren volgens:

$$\mathbf{x}^{(k+1)} = \mathbf{x}^{(k)} + CW^T R(\mathbf{p} - W\mathbf{x}^{(k)}) \quad 2.5$$

C en R zijn diagonaalmatrices die respectievelijk het aantal projectielijnen die elke voxel x_i raken en het aantal voxels die geraakt worden door elke projectielijn in rekening brengen (zie ook **Figuur 2.4 B**):

$$c_{jj} = \frac{1}{\sum_i w_{ij}}$$

$$r_{ii} = \frac{1}{\sum_j w_{ij}}$$

Bij SIRT worden de voxelwaarden in de reconstructie dus zo aangepast dat de projectiefout – dit is het verschil tussen de gemeten projecties en de voorwaartse projecties van de huidige reconstructie – geminimaliseerd wordt. Een andere gebruikelijke reconstructietechniek voor ET is de *Expectation Maximization* (EM) reconstructietechniek.^{34,35} Deze is gelijkaardig aan SIRT, maar maakt gebruik van een multiplicatief updateschema dat beter geschikt is om met Poisson ruis in de projectiebeelden om te gaan:

$$\mathbf{x}^{(k+1)} = \mathbf{x}^{(k)} \circ CW^T(\mathbf{p} \oslash W\mathbf{x}^{(k)}) \quad 2.6$$

Hierbij zijn \circ en \oslash respectievelijk een elementsgewijs product en een elementsgewijze deling tussen twee vectoren. De reconstructie in de volgende iteratie wordt dus berekend als het product van de voxelwaarden van de huidige iteratie met de voxelwaarden van de genormaliseerde terugprojecties van de verhouding tussen de pixels in de gemeten projectiebeelden en de pixels in de voorwaartse projectie van de huidige reconstructie.

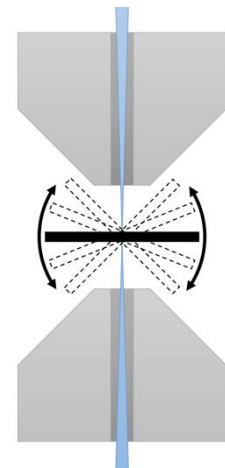
2.3 Werkwijze

Om tot een 3D ET reconstructie te komen, zijn er drie fases die doorlopen moeten worden: de opname van een tiltreeks, uitlijning en correctie van de beelden, en tot slot de reconstructie zelf.

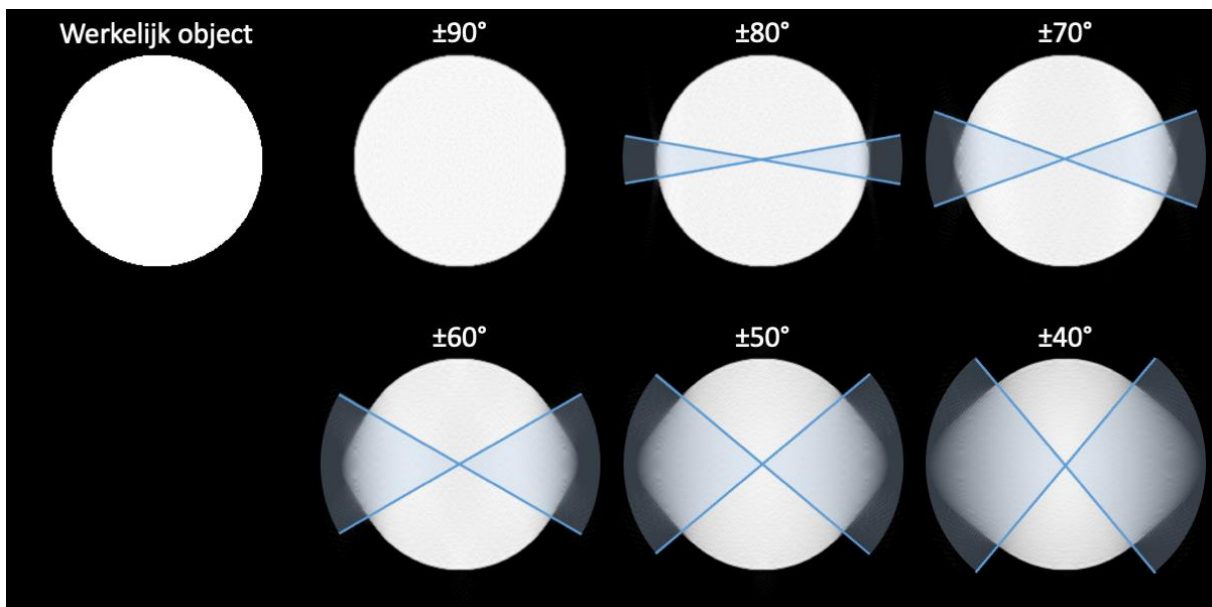
Opname

Om tomografie correct te kunnen toepassen, moet de grijswaarde in de afbeeldingen van de tiltreeks lineair afhankelijk zijn van de dikte en dichtheid van het specimen. Het massa-dikte contrast bij HAADF-STEM is hier dus ideaal voor. Het specimen kan in een elektronenmicroscop getilt worden door de samplehouder rond zijn as te roteren (zie **Figuur 2.1**) om een tiltreeks te bekomen. Het is echter niet mogelijk om een volledige rotatie van $\pm 90^\circ$ uit te voeren omdat de poolschoenen van de objectieflens zich te dicht bij de samplehouder bevinden, dit wordt geïllustreerd in **Figuur 2.6**. Deze poolschoenen zijn componenten die de magnetische flux van de lens concentreren in een zeer klein volume tussen de poolschoenen om de elektronenbundel te focussen op het specimen. Zelfs een gespecialiseerde samplehouder kan hierdoor slechts roteren tussen $\pm 75^\circ$. Dit gebrek aan data in de resterende projectiehoeken resulteert in zogenaamde *missing wedge* artefacten in de reconstructie.³⁶ Dit is een verlies aan resolutie in de reconstructie volgens de oriëntaties die niet aanwezig zijn in de tiltreeks. Voorbeelden voor de SIRT reconstructies van een uniforme cirkel aan de hand van verschillende tiltreeksen met verschillende tilt bereiken worden getoond in **Figuur 2.7**.

De opname van een tiltreeks is bovendien zeer tijdsintensief. Voor elk projectiebeeld moet de samplehouder eerst geroteerd worden, en vervolgens moet het specimen terug gecentreerd



Figuur 2.6. De poolschoenen van de objectieflens beperken het rotatie-bereik van de samplehouder.



Figuur 2.7. Voorbeelden van *missing wedge* artefacten (aangeduid in blauw) bij SIRT reconstructies van een uniforme cirkel aan de hand van tiltreeksen met een verschillend tilt bereik.

worden in de afbeelding en in focus gebracht worden. Het aantal projectiehoeken dat opgenomen kan worden, is dus een afweging tussen de opnametijd en reconstructiekwaliteit. Gewoonlijk wordt een tilt stap van 2° tot 5° gebruikt, wat resulteert in een tiltreeks van 30 tot 70 projectiebeelden, en een opnametijd tussen 30 minuten en één uur of zelfs meer.

Beeldcorrectie en Uitlijning

Wanneer de tiltreeks opgenomen is, moeten de afbeeldingen eerst verwerkt worden voor ze geschikt zijn om een reconstructie te berekenen. Eerst dient een onderscheid gemaakt te worden tussen het object en de achtergrond. Om nanodeeltjes in een transmissie elektronenmicroscop te bestuderen, worden ze op een dun rooster van amorfe koolstof gedeponereerd. De elektronenbundel interageert ook met dit rooster, wat resulteert in een zwak achtergrondsignaal. Dit signaal dient afgetrokken te worden van de afbeeldingen, wat gedaan kan worden door manuele of automatische segmentatie van de projectiebeelden.

De volgende stap is de uitlijning van de afbeeldingen. Omdat de rotatieas van de samplehouder niet exact overeen komt met de centrale verticale as in de afbeeldingen, gaat een rotatie van de samplehouder gepaard met een translatie van het specimen. Daardoor moet het specimen telkens opnieuw gecentreerd worden in de afbeeldingen tijdens de opname. Dit is echter ook niet exact, terwijl de reconstructie algoritmes wel aannemen dat de werkelijke rotatieas overeen komt met de centrale verticale as in de afbeeldingen. De projectiebeelden worden gewoonlijk in twee stappen uitgelijnd om aan deze eisen te voldoen. Eerst worden ze uitgelijnd ten opzichte van elkaar. De relatieve translatie tussen elk paar van opeenvolgende projectiebeelden kan hiervoor berekend worden met behulp van de kruiscorrelatie tussen deze beelden.³⁷ Vervolgens moeten de projectiebeelden een gezamenlijke translatie ondergaan om de rotatieas te centreren in de afbeeldingen. Dit kan gedaan worden door eerst het massemiddelpunt van de tiltreeks te centreren in de afbeeldingen en vervolgens de projectiefout te minimaliseren door reconstructies te berekenen voor verschillende kleine horizontale verschuivingen.^{30,38,39}

Reconstructie

Tenslotte kan de 3D morfologie van het specimen gereconstrueerd worden met een algoritme zoals SIRT of EM. Om de reconstructiekwaliteit te optimaliseren, is het bovendien nuttig om voorkennis over het specimen te gebruiken tijdens de reconstructie. Enerzijds kan er een beperking op de voxelwaarden van de reconstructie opgelegd worden om te voorkomen dat deze negatief worden. Anderzijds kan een laagdoorlaatfilter in de Fourier ruimte van de reconstructie gebruikt worden om hoogfrequente ruis en artefacten te beperken. Door zulke beperkingen op te leggen op de reconstructie in iedere SIRT of EM iteratie, kan de reconstructiekwaliteit, inclusief *missing wedge* artefacten, significant verbeterd worden.³⁸

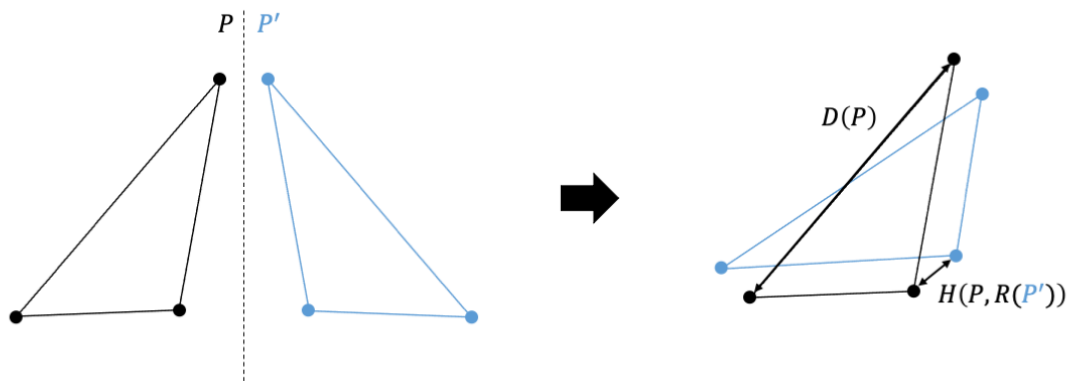
3 Methode voor de kwantitatieve analyse van een helische structuur

3.1 Literatuuronderzoek

Een chirale structuur is een structuur waarvan het spiegelbeeld niet exact gelijk is aan de oorspronkelijke structuur, ongeacht de oriëntatie of positie van dit spiegelbeeld.⁴⁰ Chiraliteit is een gekende eigenschap van moleculen en is daarom al goed bestudeerd in (bio)chemie. Chirale moleculen absorberen en/of verstrooien links- en rechtshandig circulair gepolariseerd licht (CPL) in verschillende mate, maar het is ook zeer belangrijk om met de juiste enantiomeren te werken onder andere bij het ontwikkelen van medicijnen.^{41,42} Dit eerste effect leidt ertoe dat men meestal CD spectroscopie gebruikt om de chiraliteit van moleculen en nanodeeltjes te kwantificeren. Hoewel dit een zeer effectieve methode is, is deze niet voldoende voor het doel van deze thesis. Het is namelijk de bedoeling om de structurele chiraliteit van nanomaterialen te kwantificeren, losstaande van hun optische eigenschappen. Zo is het mogelijk om het verband tussen de structurele en optische chiraliteit in verder onderzoek te achterhalen. Als dat verband gekend is, is het mogelijk om nieuwe nanodeeltjes met versterkte chiroptische eigenschappen te ontwikkelen, zonder dat dit een ingewikkeld *trial-and-error* proces hoeft te zijn.

Hausdorff chiraliteitsmaat

De Hausdorff chiraliteitsmaat is een kwantificatiemethode voor structurele chiraliteit die informatie biedt complementair aan de informatie die verkregen kan worden via CD spectroscopie.⁴³ Deze methode werd voornamelijk ontwikkeld om de chiraliteit van moleculen te onderzoeken, maar kan in theorie ook uitgebreid worden om nanodeeltjes via ET reconstructies te onderzoeken. De methode is gebaseerd op het idee om een molecule weer te geven als een verzameling van punten in \mathbb{R}^3 die overeenkomen met de posities van de atomen in de molecule. Vervolgens wordt getracht om deze verzameling zo goed mogelijk te laten overlappen met het spiegelbeeld van die molecule. Zoals geïllustreerd in **Figuur 3.1**, wordt de minimale genormaliseerde Hausdorff afstand tussen die twee enantiomeren gebruikt als een maat voor



Figuur 3.1. Illustratie van de Hausdorff chiraliteitsmaat: De Hausdorff afstand tussen een gegeven puntenverzameling P en haar spiegelbeeld P' wordt geminimaliseerd door middel van rigide transformaties van P' en het genormaliseerde resultaat wordt gebruikt als een maat voor de chiraliteit van de puntenverzameling.

de chiraliteit van de molecule. De Hausdorff chiraliteitsmaat wordt mathematisch gegeven door:

$$C_H := \min_R \frac{H(P, R(P'))}{D(P)} \quad 3.1$$

Hierbij zijn P en P' respectievelijk de representaties van de molecule en haar spiegelbeeld, is R een rigide transformatie (rotatie + translatie), is $H(P, P')$ de Hausdorff afstand tussen beide representaties, en is $D(P)$ de diameter van de molecule. De diameter van een molecule is gedefinieerd als de maximale afstand tussen de punten \mathbf{p}_i in de verzameling P :

$$D(P) := \max_{i,j} \|\mathbf{p}_i - \mathbf{p}_j\| \quad \forall \mathbf{p}_i, \mathbf{p}_j \in P \quad 3.2$$

De Hausdorff afstand tussen twee puntenverzamelingen is gedefinieerd als de maximale afstand tussen een punt in P en het dichtstbij gelegen punt in P' :

$$H(P, P') := \max_i \left(\min_j \|\mathbf{p}_i - \mathbf{p}'_j\| \right) \quad \forall \mathbf{p}_i \in P, \forall \mathbf{p}'_j \in P' \quad 3.3$$

Het komt er dus op neer om een rigide transformatie te zoeken die het spiegelbeeld van een puntenverzameling optimaal overlapt met de originele puntenverzameling zodat de afstand, in dit geval de Hausdorff afstand, tussen beide puntenverzamelingen een indicatie geeft naar de chiraliteit van de verzameling.

Om deze methode te kunnen toepassen op ET reconstructies, moet er echter een andere maat voor de afstand tussen twee objecten gekozen worden. ET reconstructies worden namelijk voorgesteld door grijswaarden in een 3D rooster in plaats van een puntenverzameling. Een gebruikelijke maat voor de overlap tussen twee ET reconstructies V_1 en V_2 is de vormfout.^{37,44} Dit is de verhouding van het niet-overlappende volume tussen beide objecten en het totale volume van het referentie object:

$$VF(V_1, V_2) := \frac{\text{Vol}(V_1 \neq V_2)}{\text{Vol}(V_1)} \quad 3.4$$

Met $V_1 \neq V_2$ wordt het gedeelte van de reconstructies bedoeld dat tot V_1 of V_2 behoort, maar niet tot het andere object. De aangepaste Hausdorff chiraliteitsmaat voor ET reconstructies kan dus gedefinieerd worden als:

$$C_{VF} := \min_R VF(V, R(V')) \quad 3.5$$

waarbij opnieuw V' het spiegelbeeld is van de ET reconstructie V . Hoewel dit een relatief eenvoudige methode is, vereist de minimalisatieprocedure zeer veel rekentijd. Een rigide transformatie wordt gedefinieerd door zes variabelen (drie translatie richtingen en drie rotatie assen) en voor elke combinatie van deze variabelen moet de transformatie uitgevoerd worden op het spiegelbeeld van de reconstructie. Dit zorgt ervoor dat het berekenen van de (aangepaste) Hausdorff chiraliteitsmaat in de praktijk zeer lang kan duren. Bovendien is het resultaat een waarde tussen nul (geen chiraliteit) en één (volledige chiraliteit). Dit is makkelijk te interpreteren, maar geeft verder geen inzichten in de structuur van het bestudeerde object.

Driedimensionale Fouriertransformatie

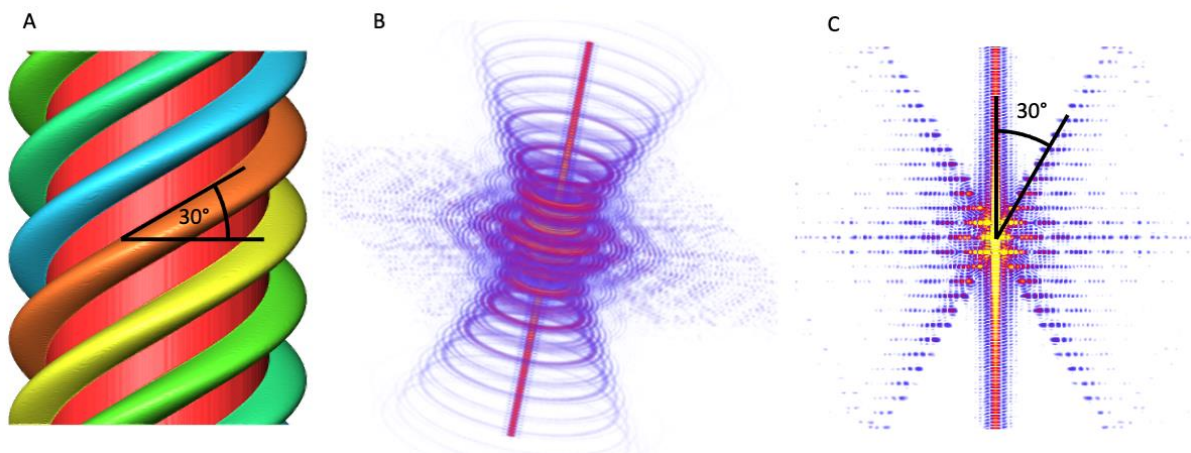
Zoals eerder vermeld, is chiraliteit een eigenschap van asymmetrische vormen. Chirale structuren kunnen onmogelijk overlappen met hun spiegelbeeld en bevatten dus geen spiegelsymmetrie. Heliciteit is daarentegen een type van chiraliteit waarbij de gegeven structuur delen van helices bevat. Heliciteit is wat vager gedefinieerd dan chiraliteit, maar een helische structuur wordt gekenmerkt door onder andere een helische as en een inclinatiehoek.

Een helische structuur wordt gekarakteriseerd door ringen op het oppervlak van een kegel in de Fourier ruimte, zoals getoond wordt in **Figuur 3.2** voor een gemodelleerd helisch object.¹³ Indien dit patroon herkend kan worden in de Fouriertransformatie van een gegeven nanodeeltje, dan is dit een zeer sterke aanwijzing (maar geen bewijs) dat het nanodeeltje een helische structuur heeft. Bovendien kan de helische inclinatiehoek afgeleid worden uit de openingshoek van de kegelstructuur. Zo kunnen zeer gelijkaardige helische nanodeeltjes met elkaar vergeleken worden. Het nadeel van deze methode is dat het moeilijk is om de gezochte patronen te herkennen in de Fouriertransformatie, en dat de handigheid van de nanodeeltjes niet bepaald kan worden. De Fouriertransformatie van realistische nanodeeltjes bevat namelijk veel contributies van andere structurele eigenschappen van het nanodeeltje die niet bijdragen tot de heliciteit.

Als men de gezochte kegelstructuur kan herkennen, is het wel mogelijk om de inverse Fouriertransformatie toe te passen op enkel die Fourier componenten waarin men geïnteresseerd is. Hierdoor kunnen helische patronen gelokaliseerd worden in een nanodeeltje.¹³

State-of-the-art

Het is duidelijk dat er momenteel nog geen methode bestaat die toelaat om de oppervlaktomorfologie van individuele helische nanostructuren te kwantificeren en bijvoorbeeld de handigheid van een structuur, de helische inclinatiehoek van oppervlakte elementen, of de locatie van de sterkste helische patronen te bepalen. De (aangepaste) Hausdorff chiraliteitsmaat en



Figuur 3.2. **A.** Gemodelleerd helisch object, gemaakt van een cilindrische kern (rood) omsingeld door vijf helices (aangeduid met verschillende kleuren) met een inclinatiehoek van 30° aan het oppervlak van de kern; **B.** Half transparante 3D visualisatie van de 3D Fouriertransformatie van het helisch object, gekenmerkt door ringen op een kegelstructuur; **C.** Doorsnede van de Fouriertransformatie waaruit de helische inclinatiehoek afgeleid kan worden.

3D Fouriertransformatie zijn beiden enkel afhankelijk van de morfologie van een nanodeeltje, wat hen op het eerste gezicht geschikt maakt. De Hausdorff methode heeft echter het nadeel dat het resultaat enkel een kwantitatieve maat voor de chiraliteit van een object weergeeft. Extra informatie over de (lokale) chirale structuur, zoals bijvoorbeeld de handigheid van de structuur, is hierbij niet beschikbaar. De 3D Fouriertransformatie heeft dan weer het voordeel dat de helische inclinatiehoek gevat zit in de kegelstructuur in de Fouriertransformatie en dat helische patronen gelokaliseerd kunnen worden met behulp van de inverse Fouriertransformatie. Het nadeel van deze methode is dat ook hier de handigheid en de mate van chiraliteit niet kwantitatief bepaald kunnen worden.

3.2 Methodologie voor de kwantitatieve analyse van helische nanostructuren

De meeste chirale nanodeeltjes worden gesynthetiseerd op basis van helische overgroei procedures.¹³ Bovendien biedt heliceiteit meer intuïtieve informatie over de structuur van nanodeeltjes dan chiraliteit. Daarom werd er gekozen om een kwantificatiemethode te ontwikkelen gericht op de analyse van heliceiteit in plaats van chiraliteit.

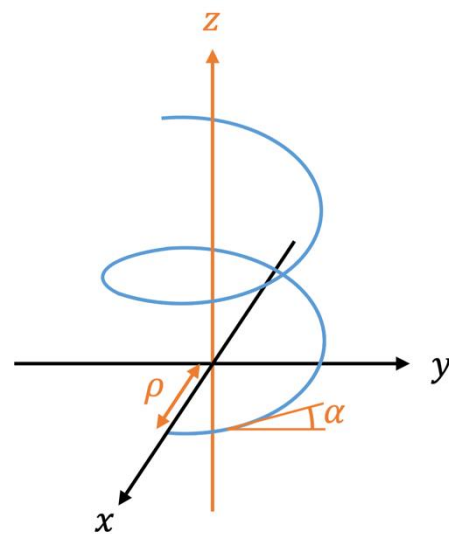
De voorgestelde methode, die reeds gepubliceerd werd in ACS Materials Letters,⁴⁵ is gebaseerd op de basiskenmerken van een helix, namelijk een helische as, een straal (ρ), en een inclinatiehoek (α), zoals weergegeven in **Figuur 3.3**. Meer bepaald is het mogelijk om de gradiënt van de dichtheid van een homogeen object te gebruiken om de lokale oriëntatie van het oppervlak te berekenen. Als de helische as gekend is, is het mogelijk om de lokale inclinatiehoek af te leiden uit de oriëntatie van het oppervlak. Men kan vervolgens een heliceiteitsfunctie opstellen als volgt:

$$H(\rho, \alpha) := \frac{1}{S} \iint_S \text{sign}(\alpha'(\mathbf{s})) \delta(\rho'(\mathbf{s}) - \rho) \delta(|\alpha'(\mathbf{s})| - \alpha) d\mathbf{s} \quad 3.6$$

met

$$\rho \in [0, \infty[\quad \rho' \in [0, \infty[\quad \alpha \in [0, \pi] \quad \alpha' \in [-\pi, \pi]$$

Hierbij omvat de integraal alle punten \mathbf{s} op het oppervlak S van het nanodeeltje, $\alpha'(\mathbf{s})$ en $\rho'(\mathbf{s})$ zijn respectievelijk de inclinatiehoek van het oppervlak in het punt \mathbf{s} en de afstand tot de helische as van het punt \mathbf{s} . De heliceiteitsfunctie geeft dus weer welke fractie van het oppervlak de helische eigenschappen ρ en α heeft en komt overeen met een decompositie van een gegeven object in een combinatie van helices. Bovendien moet opgemerkt worden dat de heliceiteitsfunctie enkel gedefinieerd is voor positieve inclinatiehoeken. De handigheid wordt



Figuur 3.3. Een helix wordt gedefinieerd door een helische as (z), een straal (ρ), en een inclinatiehoek (α).

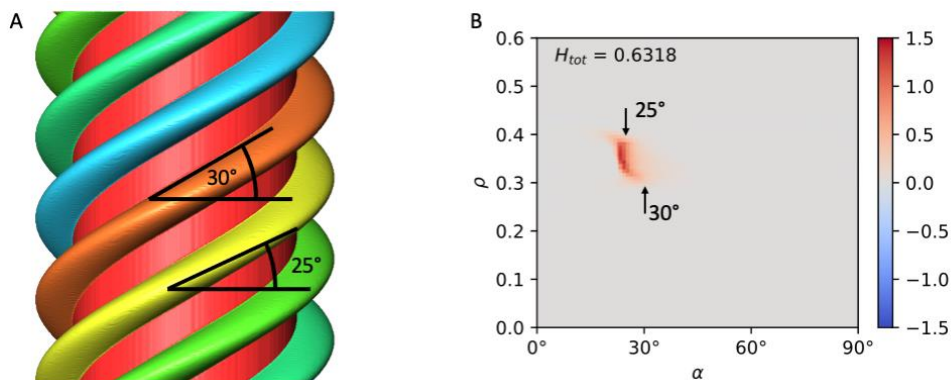
aangegeven door het teken van $\alpha'(s)$. Positieve waarden van $H(\rho, \alpha)$ wijzen op een dominante rechtshandige structuur en negatieve waarden wijzen op een overheersende linkshandige structuur. De totale heliceit van de structuur kan ook berekend worden door de heliceitsfunctie te integreren over ρ en α :

$$H_{tot} := \int_0^{\infty} \int_0^{\pi} H(\rho, \alpha) d\rho d\alpha = \frac{1}{S} \iint_S \text{sign}(\alpha'(s)) ds \quad 3.7$$

Ter illustratie worden de heliceitsfunctie en totale heliceit voor het eerder gebruikte helische voorbeeldobject getoond in **Figuur 3.4**. Dit object was ontworpen met een cilindrische kern met straal 0.3 (arbitraire eenheden) en de helices hebben een dikte 0.1. In de heliceitsfunctie in **Figuur 3.4 B** is het meteen duidelijk dat enkel de helices bijdragen tot de heliceit van het object, de heliceitsfunctie is namelijk overal nul behalve tussen $\rho > 0.3$ en $\rho < 0.4$. Bovendien kan de helische inclinatiehoek α ook makkelijk afgelezen worden. Deze is 30° bij $\rho = 0.3$, wat overeen komt met het ontwerp van dit voorbeeldobject. Het is echter ook belangrijk om op te merken dat de helische inclinatiehoek kleiner wordt bij grotere ρ ($\alpha \approx 25^\circ$ bij $\rho = 0.4$). Dit is ook in lijn met het ontwerp van het object, zoals aangegeven in **Figuur 3.4 A**. Tenslotte dient opgemerkt te worden dat de waarden in de heliceitsfunctie positief zijn, wat rechtshandige heliceit aanduidt.

Ook de totale heliceit werd berekend voor het voorbeeld in **Figuur 3.4**: $H_{tot} = 0.6318$. Dit wil zeggen dat ongeveer 63% van het volledige oppervlak van het model een rechtshandige helische oriëntatie heeft. De resterende 27% van het oppervlak bestaat uit niet-helische delen en/of een combinatie van rechts- en linkshandige delen die elkaar opheffen. De totale heliceit is dus een kwantitatieve maat voor heliceit waarbij een waarde van +1 overeen komt met perfecte rechtshandige heliceit, een waarde van -1 overeen komt met perfecte linkshandige heliceit, en een waarde van nul aanduidt dat het object niet helisch is, of evenveel rechts- en linkshandige delen bevat.

Het is overigens ook mogelijk om de lokale helische structuur van een vorm in beeld te brengen. Hiervoor kan men de gemiddelde heliceit uitrekenen in een klein gebied rond iedere voxel om zo de lokale heliceit rond elke voxel te vinden. **Figuur 3.5** toont de heliceitsmap

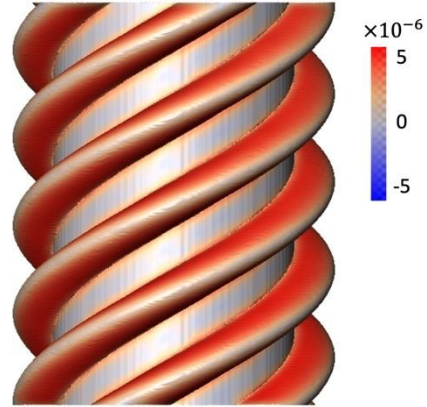


Figuur 3.4. Heliceitsfunctie en totale heliceit voor een gemodelleerde rechtshandige helische cilinder; **A.** 3D visualisatie van de cilinder; **B.** Heliceitsfunctie $H(\rho, \alpha)$ en totale heliceit H_{tot} .

voor het voorbeeldobject. Hier kan gezien worden dat enkel de boven- en onderkant van de helices bijdragen tot de rechtshandige heliceiteit van het object, en dat de andere delen niet helisch zijn.

3.3 Implementatie van de voorgestelde methode

Om de voorgestelde methode in de praktijk toe te passen op experimentele ET data moet er rekening mee worden gehouden dat nanodeeltjes een willekeurige oriëntatie hebben in de elektronenmicroscopie en dus ook in de reconstructie. Nadat het specimen gereconstrueerd is, moet men dus eerst de helische as detecteren. Vervolgens is het belangrijk te beseffen dat een ET reconstructie wordt weergegeven door grijswaarden in een discreet 3D rooster. De berekeningen van de heliceiteitsfunctie, totale heliceiteit en heliceiteitsmap moeten dusdanig gediscretiseerd worden. De implementatie die in dit deel wordt voorgesteld, werd bovendien beschikbaar gemaakt als een Python pakket genaamd “HeliQ”.⁴⁵



Figuur 3.5. Heliceiteitsmap van het helisch modelobject.

Uitlijning van de helische as

In wat volgt wordt ervan uitgegaan dat de z-as overeen komt met de helische as. Echter, nanodeeltjes hebben een willekeurige oriëntatie in de elektronenmicroscopie, en dus ook in de reconstructie. Daarom moet de reconstructie eerst worden aangepast zodat de z-as overeen komt met de helische as van het nanodeeltje. Voor langwerpige nanodeeltjes, zoals nano-staafjes (**Figuur 1.1 A en B**), kan de aanname gemaakt worden dat de helische as overeen komt met de longitudinale as van het nanodeeltje. Deze longitudinale as kan automatisch gedetecteerd worden met principale-componentenanalyse (PCA). De principale component van een multivariate dataset is de richting (een lineaire combinatie van de basisvectoren) waarlangs de variantie het grootst is. Men kan de richting van de longitudinale as van een langwerpig nanodeeltje dus vinden door PCA toe te passen op de verzameling van alle x-, y-, en z-coördinaten van de voxels die tot het nanodeeltje behoren. De 3D ET reconstructie kan dan uitgelijnd worden door eerst het massamiddelpunt van het nanodeeltje in de oorsprong te plaatsen en vervolgens een rotatie uit te voeren die de principale as naar de z-as roteert.

Detectie van het oppervlak

Het is bovendien nodig om het oppervlak te herkennen in een ET reconstructie. Hiervoor kan gebruik gemaakt worden van de gradiënt van de reconstructie. Voor een binaire reconstructie – dit is een reconstructie waarbij elke voxel de waarde nul of één aanneemt – zal de gradiënt namelijk een vectorveld zijn dat in elke voxel de waarde één aanneemt als die voxel tot het oppervlak van het gereconstrueerde object behoort en anders de waarde nul aanneemt. De richting van de gradiëntvector is de richting van de normaalvector van het oppervlak in elke voxel. Een ET reconstructie is echter nooit volledig binair. Eén oorzaak hiervoor is dat veel

voxels aan de randen van het specimen zich slechts gedeeltelijk binnen het specimen bevinden, en dus een grijswaarde tussen nul en één aannemen. Reconstructiefouten, zoals onder andere *missing wedge* artefacten, leiden er bovendien toe dat ook andere voxels die in theorie wel de waarde nul of één zouden hebben hier toch van afwijken (zie **Figuur 2.7**).

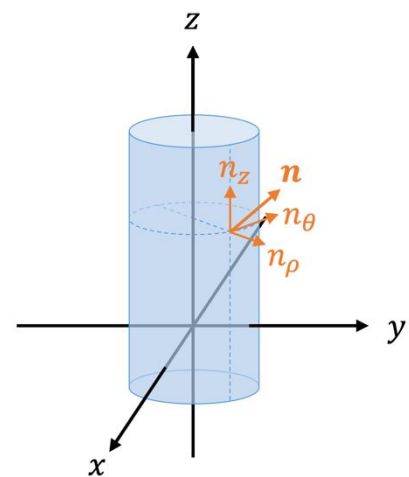
Eenzijds is het mogelijk om een binaire reconstructie te bekomen op basis van een gekozen segmentatiemethode. Hierbij stelt zich het probleem voor dat het oppervlak gekarteld zal zijn door de discrete voxelgrootte, waardoor de gradiënt de oppervlakteoriëntatie niet volledig accuraat kan opnemen. Anderzijds kan men ook rechtstreeks werken met de niet-binaire reconstructie. De vloeiende overgangen van de voxelwaarden nabij het oppervlak zorgen er dan voor dat de oriëntatie beter bekomen wordt met behulp van de gradiënt. Echter, de gradiënt zal niet overal één of nul zijn. De waarde van de gradiënt kan hierbij geïnterpreteerd worden als de kans dat die voxel tot het oppervlak behoort en kan dus rechtstreeks gebruikt worden om de heliceitsfunctie te berekenen. Reconstructiefouten, zoals *missing wedge* artefacten, zorgen er bovendien voor dat ook voxels ver van de randen een kleine gradiënt kunnen hebben. Dit zorgt voor fouten in de heliceitsfunctie.

Om de gradiënt van een reconstructie te berekenen, kan de reconstructie eerst met een gaussische filter geconvolveerd worden alvorens de gradiënt te berekenen. De gaussische filter zorgt hier voor een vermindering van fouten in de gradiënt ten gevolge van reconstructie artefacten en ruis. Ook het probleem met gekartelde randen bij binaire reconstructies kan hiermee opgelost worden.

Discretisatie van de heliceitsfunctie

Wanneer de helische as overeen komt met de z-as en de oppervlakte-oriëntatie gekend is in elke voxel die tot het oppervlak behoort, kan de discrete heliceitsfunctie berekend worden. Als s_i het oppervlak in elke voxel i weergeeft en \mathbf{n}_i de normaalvector is van dat oppervlakte-element, dan kan de helische inclinatiehoek gevonden worden door \mathbf{n}_i te projecteren op het cilindrische vlak rond de helische as. Hiervoor dient \mathbf{n}_i beschreven te worden in cilindrische coördinaten (zie **Figuur 3.6**):

$$\begin{cases} n_z = n_z \\ n_\rho = \sqrt{n_x^2 + n_y^2} \\ n_\theta = n_x \sin \theta + n_y \cos \theta \end{cases}$$



Figuur 3.6. Een vector \mathbf{n} en haar componenten in cilindrische coördinaten.

De helische inclinatiehoek α_i kan dan bekomen worden door \mathbf{n}_i eerst te projecteren op het (θ, z) -vlak en vervolgens de hoek te meten tussen deze geprojecteerde vector en het horizontale vlak:

$$\alpha_i = \text{atan} \frac{n_{i,z}}{n_{i,\theta}} + \frac{\pi}{4} \quad 3.8$$

Hierbij wordt een hoek van $\frac{\pi}{4}$ opgeteld omdat de normaalvector loodrecht op het oppervlak staat. Inclinatiehoeken met een verschil van π zijn equivalent, waardoor $\alpha_i \in \left[-\frac{\pi}{2}, \frac{\pi}{2}\right]$. Bovendien geeft de projectie van \mathbf{n}_i op het (θ, z) -vlak weer hoe sterk het oppervlak s_i helisch georiënteerd is:

$$s'_i = s_i \frac{\sqrt{n_{i,z}^2 + n_{i,\theta}^2}}{\sqrt{n_{i,z}^2 + n_{i,\rho}^2 + n_{i,\theta}^2}} \quad 3.9$$

Dit levert vier waarden voor elke voxel die van belang zijn om de heliceitsfunctie te berekenen:

- s_i : het oppervlak in voxel i
- s'_i : het deel van het oppervlak s_i dat bijdraagt tot de heliceit
- ρ'_i : de afstand tussen voxel i en de helische as
- α'_i : de helische inclinatiehoek van het oppervlak in voxel i

De discrete vorm van de heliceitsfunctie is dan een matrix $H \in \mathbb{R}^{m \times n}$ met elementen

$$H_{pq} := H(\rho_p, \alpha_q) = \frac{1}{S \Delta\rho \Delta\alpha} \sum_i \text{sign}(\alpha'_i) \delta_{\rho'_i, \rho_p} \delta_{|\alpha'_i|, \alpha_q} \quad 3.10$$

Hierbij werd gebruik gemaakt van

$$\delta(\rho'(\mathbf{s}) - \rho) \rightarrow \frac{1}{\Delta\rho} \delta_{\rho'_i, \rho_p}$$

$$\delta(|\alpha'(\mathbf{s})| - \alpha) \rightarrow \frac{1}{\Delta\alpha} \delta_{|\alpha'_i|, \alpha_q}$$

waarbij $\Delta\rho = \rho_{p+1} - \rho_p$ en $\Delta\alpha = \alpha_{q+1} - \alpha_q$ de afmetingen zijn van de elementen in de discrete heliceitsfunctie H_{pq} . De heliceitsfunctie kan dan berekend worden volgens **Algoritme 1**.

De laatste stap in **Algoritme 1**, de normalisatie van H , is belangrijk omdat de waarden in H anders afhankelijk zijn van de gekozen waarden voor $\Delta\rho$ en $\Delta\alpha$. De totale heliceit kan dan bekomen worden als $H_{tot} = \sum_{p,q} \Delta\rho \Delta\alpha H_{pq}$. Bovendien worden voxels die niet tot het oppervlak behoren automatisch niet meegerekend omdat die een oppervlakte $s_i = 0$ hebben.

De heliceitsmap kan tenslotte berekend worden door H_{tot} te berekenen voor elke voxel in de reconstructie, waarbij enkel rekening gehouden dient te worden met de nabije voxels. Hoeveel voxels er worden meegerekend, dit is de “venstergrootte”, is afhankelijk van de vereiste resolutie. Wil men een heliceitsmap opbouwen die zeer lokaal aangeeft wat de handigheid is van elk punt op het oppervlak van een nanodeeltje, dan kan een venstergrootte van $1 \times 1 \times 1$ voxel gekozen worden. Als men echter geïnteresseerd is in de heliceit van bepaalde oppervlakte-elementen, dan moet de venstergrootte zo gekozen worden dat die deze oppervlakte-elementen net omvat.

Algoritme 1. Berekening van de discrete heliceitsfunctie.

Creëer een matrix $H \in \mathbb{R}^{m \times n}$ met m waarden voor de ρ -as en n waarden voor de α -as van de heliceitsfunctie.

Initialiseer alle waarden van H op nul.

Bepaal het totale oppervlak S van het gegeven object ($S = \sum_i s_i$).

Voor elke voxel i **in** de ET reconstructie:

Bepaal de overeenkomstige rij p in H op basis van ρ_i .

Bepaal de overeenkomstige kolom q in H op basis van α_i .

Voeg het helisch georiënteerde deel van het oppervlak toe aan het gekozen element in H ($H_{pq} \rightarrow H_{pq} + \frac{1}{S} s'_i$).

Normaliseer H op basis van de afmetingen van haar elementen ($H \rightarrow \frac{1}{\Delta\rho \Delta\alpha} H$).

4 Experimentele resultaten

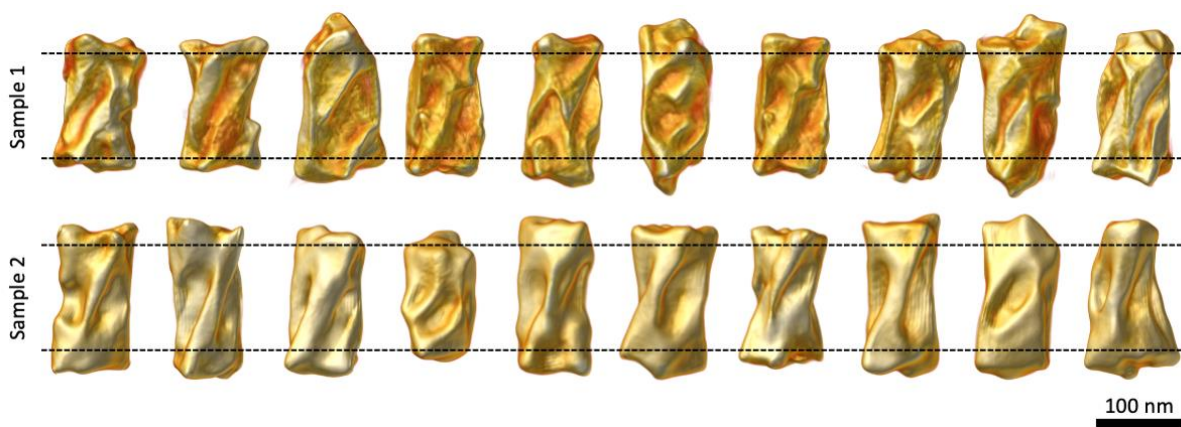
De voorgestelde methodologie werd gebruikt om enkele chirale nanosystemen te analyseren. Hierbij werd eerst gekeken naar “verdraaide” Au nanostaafjes met een relatief eenvoudige morfologie. Er wordt aangetoond hoe verschillende samples met kleine morfologische verschillen met elkaar vergeleken kunnen worden. Van diezelfde samples werd vervolgens de heliceit van een nanostaafje bestudeerd als functie van de opwarming van dat nanostaafje. Daarna werd er gekeken naar Au nanostaafjes met een kern-schil structuur, waarbij de schil een zeer complexe helische morfologie vertoont. Tenslotte wordt geïllustreerd dat de voorgestelde methodologie niet enkel toepasbaar is bij helische nanostaafjes, maar zeker ook gebruikt kan worden bij andere structuren, zoals een helische cluster van achirale nanostaafjes.

4.1 Verdraaide Au nanostaafjes met een licht verschillende synthese

Er werden twee licht verschillende samples van chirale Au nanostaafjes geprepareerd door Dr. Bing Ni binnen de onderzoeksgroep van professor Cölfen aan de Universiteit van Konstanz.¹⁹ Deze samples werden met een gelijkaardige methode gesynthetiseerd, die leidt tot rechtshandige verdraaide Au nanostaafjes. Meer details over de exacte synthese procedure worden gegeven in Bijlage A. Het verschil tussen beide samples is dat de temperatuur van sample 1 bij de laatste vier stappen van de synthese procedure verlaagd werd van 23 °C naar 16 °C, terwijl de temperatuur bij de synthese van sample 2 voortdurend op 23 °C gehouden werd.

Structurele eigenschappen

Aangezien beide samples gemaakt zijn met een gelijkaardige synthese procedure, wordt verwacht dat hun morfologie ook zeer gelijkaardig is. Om dat te onderzoeken, werd ET toegepast op tien willekeurige nanostaafjes van elk sample. De resulterende reconstructies worden voorgesteld in **Figuur 4.1**. Tiltreeksen werden hiervoor bekomen in HAADF-STEM mode met een Thermofisher Scientific Tecnai Osiris transmissie elektronenmicroscop in het tilt bereik $\pm 72^\circ$ met een tilt stap van 3° . In voorverwerking werd een artificieel neurale netwerk gebruikt voor ruisvermindering in de opgenomen projectiebeelden en werd het achtergrondsignaal



Figuur 4.1. 3D visualisaties van de ET reconstructies van tien willekeurig gekozen nanodeeltjes van elk van de twee samples van verdraaide Au nanostaafjes. Het deel van de reconstructies dat verder gebruikt werd voor de kwantitatieve analyse bevindt zich tussen de zwarte stippellijnen. De schaal is geldig voor alle reconstructies in de figuur.

verwijderd door de projectiebeelden te segmenteren.⁴⁶ Vervolgens werd de kruiscorrelatie berekend tussen elk paar van opeenvolgende afbeeldingen in de tiltreeksen om de beelden met elkaar uit te lijnen. Om de tilt as in de tiltreeksen te centreren, werden de afbeeldingen eerst collectief gecentreerd op basis van het massamiddelpunt van elke tiltreeks. Deze ruwe uitlijning van de tilt as werd daarna verfijnd door de projectiefout te minimaliseren voor kleine horizontale translaties van de tiltreeksen. Tenslotte werden de reconstructies bekomen met een methode die SIRT combineert met een laagdoorlaatfilter in de Fourier ruimte van de reconstructie die hoogfrequente ruis en reconstructie artefacten reduceert.⁴⁶

Chiroptische eigenschappen

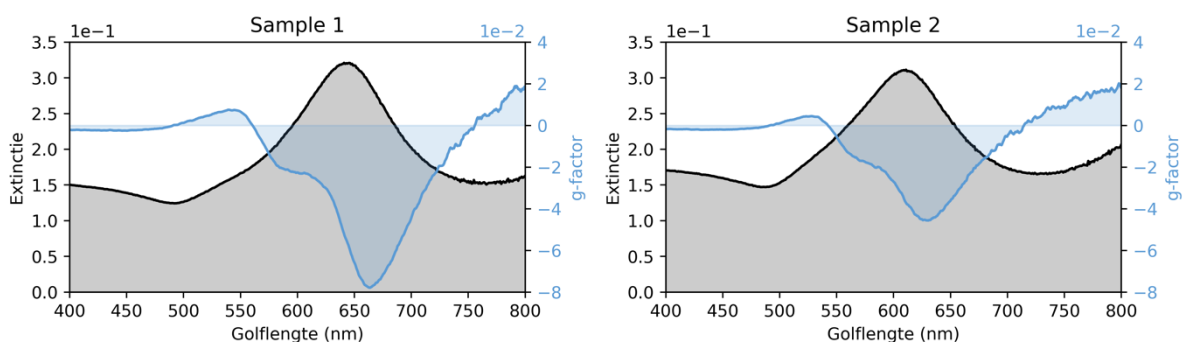
Vlak na de synthese werden de extinctie spectra en optische anisotropie-factors (g-factors) opgemeten met een UV-VIS spectrometer (**Figuur 4.2**). De g-factor is het genormaliseerde CD spectrum en wordt gedefinieerd als

$$g(\lambda) := \frac{CD(\lambda)}{Ext(\lambda)} \quad 4.1$$

met $CD(\lambda)$ het CD spectrum en $Ext(\lambda)$ het extinctie spectrum bij golflengte λ . De extinctie spectra van beide samples zijn zeer gelijkaardig, maar de g-factor van het tweede sample is zwakker dan die van het eerste sample. Beide samples zijn dus minder transparant voor links-handig CPL dan voor rechtshandig CPL in het spectrum tussen ongeveer 550 nm en 700 nm, maar het eerste sample maakt een groter verschil tussen links- en rechtshandig CPL dan het tweede sample.

Hypothese

Er zijn bijgevolg drie mogelijke hypothesen voor dit verschil in chiroptische activiteit. Enerzijds is het mogelijk dat er een kwalitatief verschil is tussen de morfologie van de nanostaafjes in sample 1 ten opzichte van sample 2, waarbij de morfologie van de nanostaafjes een sterkere chiroptische activiteit induceert. Anderzijds kan het ook zijn dat de nanodeeltjes nauwelijks verschillen in morfologie, maar dat er een grotere variëteit is in één van beide samples. Het is namelijk al experimenteel aangewezen dat er grote verschillen kunnen zijn in de morfologie

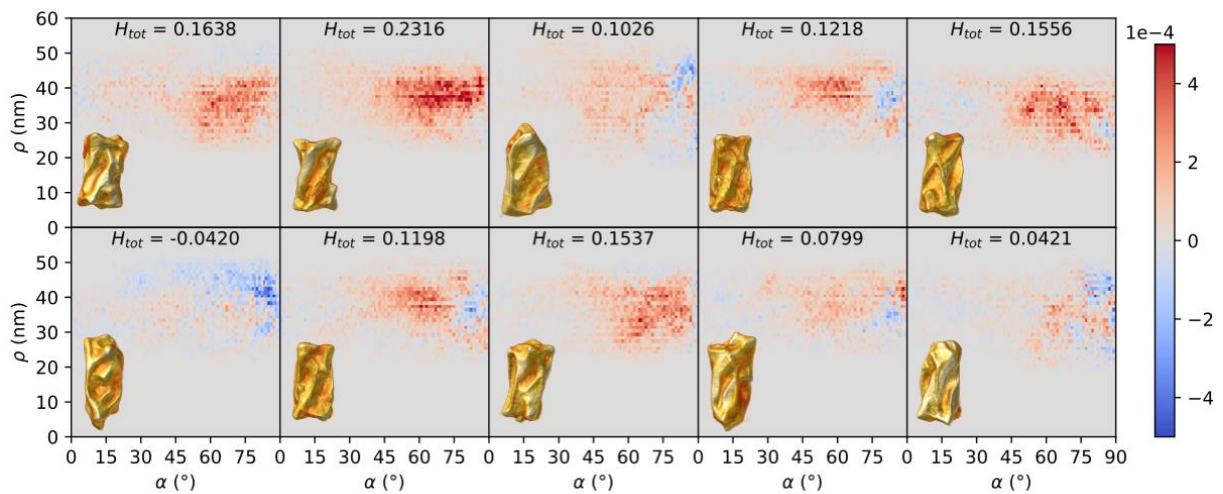


Figuur 4.2. Extinctie spectra en optische anisotropie-factors (g-factors) van de twee licht verschillende samples van chirale Au nanostaafjes.

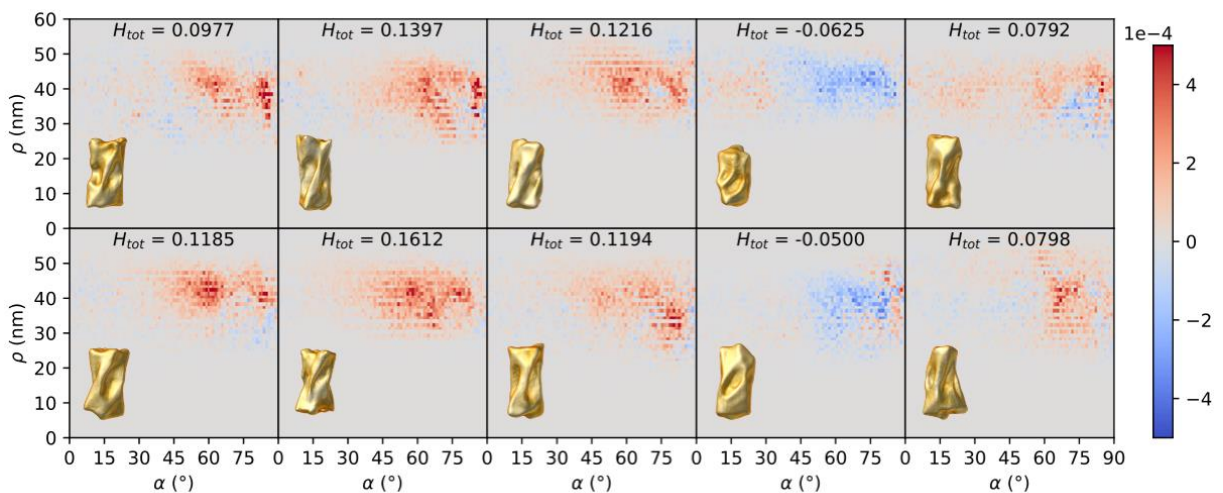
van individuele chirale nanodeeltjes in hetzelfde sample.²⁶ Als sample 2 een grotere verhouding achirale nanodeeltjes of nanodeeltjes met de tegengestelde handigheid bevat, dan is dat mogelijk de oorzaak van een zwakkere chiroptische activiteit van het hele sample. Tenslotte mag ook nog niet uitgesloten worden dat het verschil in chiroptische activiteit geen gevolg is van een verschillende morfologie, maar van andere factoren zoals bijvoorbeeld een chirale ordening van atomen, van chirale oppervlaktmoleculen, alsook de versterking van lokale chirale effecten ten gevolge van LSPRs.

Structurele analyse

Om de eerste twee hypothesen te testen, werd voor elk van deze 20 nanodeeltjes de helici-teitsfunctie en totale heliceiteit berekend, deze resultaten worden weergegeven in **Figuur 4.3** en **Figuur 4.4**. Hiervoor werden de reconstructies eerst gesegmenteerd op basis van Otsu's thresholding methode.⁴⁷ Ook werden de boven- en onderkant van de nanostaafjes manueel



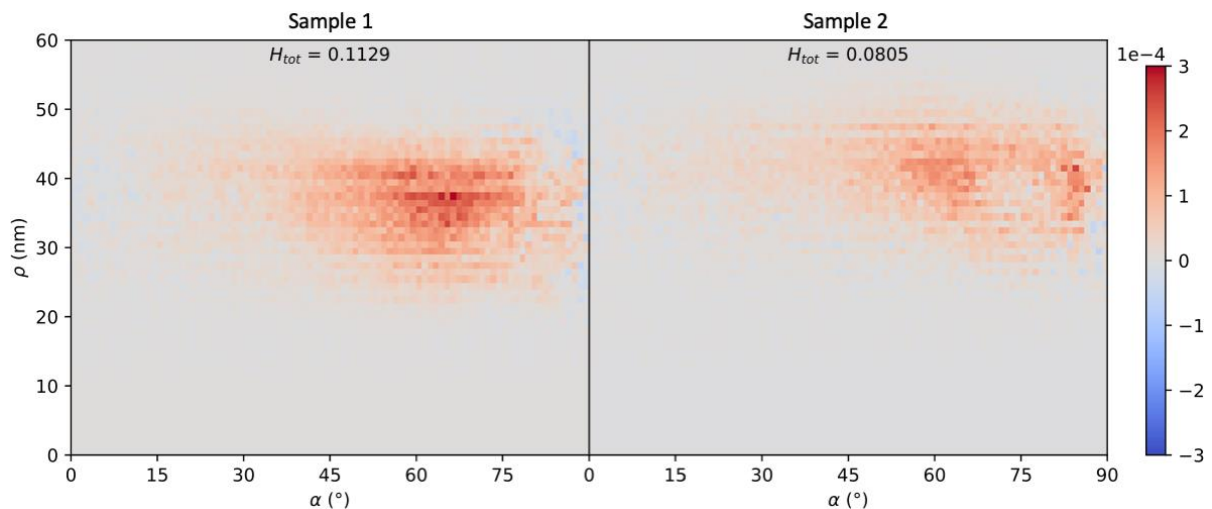
Figuur 4.3. Heliciteitsfuncties en totale heliceiteit van de tien nanostaafjes uit sample 1. Bij elke heliciteitsfunctie wordt het bijhorende nanodeeltje links onderaan gevisualiseerd.



Figuur 4.4. Heliciteitsfuncties en totale heliceiteit van de tien nanostaafjes uit sample 2. Bij elke heliciteitsfunctie wordt het bijhorende nanodeeltje links onderaan gevisualiseerd.

verwijderd zoals geïllustreerd wordt met zwarte stippellijnen in **Figuur 4.1**. Dit werd gedaan omdat die delen een oppervlak hebben met eerder willekeurige oriëntaties. Door enkel de resultaten van het middelste gedeelte van de nanodeeltjes te onderzoeken is het dus mogelijk om een beter beeld te krijgen van hun heliceit. De resultaten waarbij de boven- en onderkant niet verwijderd werden, worden getoond in Bijlage B. Daar kan gezien worden dat de heliceitsfuncties weinig verschillen van deze in **Figuur 4.3** en **Figuur 4.4** en dat het verwijderen van de boven- en onderkant dus geen grote gevolgen heeft voor de uitkomst. Het voornaamste verschil dat in Bijlage B opgemerkt kan worden, is dat de boven- en onderkant een kleine additionele contributie in de heliceitsfunctie veroorzaken, wat vermoedelijk een artefact is ten gevolge van het feit dat de helische as niet geldig is voor deze delen van de reconstructie. Tenslotte wordt ook het gemiddelde van de heliceitsfuncties en totale heliceit van alle nanodeeltjes van elk sample getoond in **Figuur 4.5**.

Uit deze resultaten kan geconcludeerd worden dat de heliceit van al deze nanodeeltjes gevonden wordt in de schil en bij hoge inclinatiehoeken. Beide samples hebben een niet-helische kern met een straal van 20 tot 30 nm, waarrond zich een helische schil bevindt die gaat tot een straal van ongeveer 50 nm. De inclinatiehoeken variëren hierbij tussen ongeveer 45° en 80°. Bovendien is de totale heliceit van de meeste nanodeeltjes positief, wat op rechtshandige heliceit wijst. Bij beide samples dient het wel opgemerkt te worden dat er een groot verschil is tussen de heliceit van verschillende nanodeeltjes binnen hetzelfde sample. Dit is voornamelijk af te leiden uit de sterk verschillende waarden voor de totale heliceit van de afzonderlijke nanodeeltjes in elk sample, en in beide samples zijn er ook een aantal linkshandige nanodeeltjes. Het feit dat er in het eerste sample één linkshandig nanodeeltje gevonden werd, terwijl er twee gevonden werden in sample 2, zou mogelijk kunnen suggereren dat het verschil in chiroptische activiteit verklaard kan worden door de variëteit aan diverse helische morfologieën binnen elk sample. Echter, er werden maar tien nanodeeltjes per sample onderzocht, wat te weinig is voor een statistische validatie. De waarden voor de totale heliceit van de individuele nanodeeltjes kunnen namelijk onderworpen worden aan Student's T-test. Dit



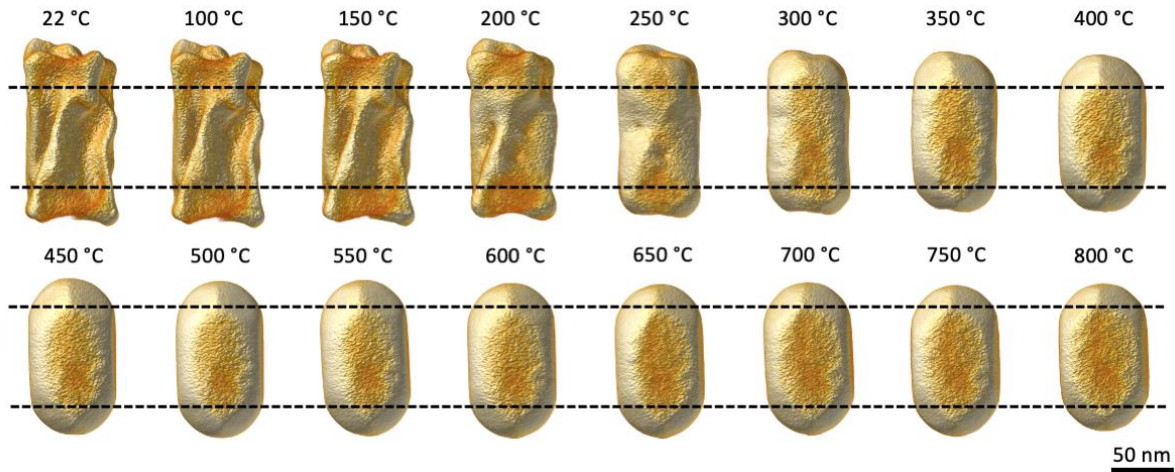
Figuur 4.5. Gemiddelde heliceitsfuncties en gemiddelde totale heliceit van beide samples, berekend op basis van de resultaten van alle afzonderlijke nanodeeltjes.

is een statistische test waarmee men kan nagaan of de gemiddeldes van twee verschillende datasets met weinig datapunten (minder dan 30) significant verschillen van elkaar.⁴⁸ Voor de resultaten bekomen in **Figuur 4.3** en **Figuur 4.4** resulteert Student's T-test in een p-waarde van 0.175. Er is dus 17.5% kans dat er geen significant verschil is tussen beide samples. Met de beschikbare data is er echter slechts een kans van 23.8% dat Student's T-test een verschil tussen de beide samples detecteert. Om die statistische kracht te versterken naar 90% moeten er 93 nanostaafjes van elk sample onderzocht worden, of er moeten 117 nanostaafjes onderzocht worden om een statistische kracht van 95% te halen. Als er toch aangenomen wordt dat er een verschil is tussen beide samples, suggereren de gemiddelde waarden per sample, die weergegeven worden in **Figuur 4.5**, dat het verschil in morfologie waarschijnlijk een invloed heeft op de chiroptische activiteit. Sample 1 heeft een grotere totale heliceiteit dan sample 2, wat in lijn ligt met de gemeten optische anisotropie factoren, waar sample 1 ook een sterkere optische anisotropie vertoont dan sample 2.

4.2 Heliceiteit als functie van opwarming van verdraaide Au nanostaafjes

Eén van de verdraaide Au nanostaafjes uit sample 1 werd vervolgens *in-situ* opgewarmd tot 800 °C om te onderzoeken hoe de helische vorm verandert als functie van opwarming. Daartoe werd ET toegepast op verschillende momenten tijdens de opwarming. De exacte experimentele procedure was als volgt: Eerst werd een tiltreeks opgenomen bij kamertemperatuur (22 °C). Vervolgens werd het specimen opgewarmd naar verschillende temperaturen, vanaf 100 °C in stappen van 50 °C tot een maximale temperatuur van 800 °C. Bij elke temperatuurstep werd die temperatuur vastgehouden voor vijf minuten, waarna het specimen snel terug afgekoeld werd tot kamertemperatuur om te verhinderen dat het tijdens de acquisitie van de tiltreeks van verder vervormt. Er werd dan een tiltreeks opgenomen om vervolgens het specimen terug te verhitten naar de volgende temperatuurstep. Om de tiltreeksen te bekomen werd gebruik gemaakt van een Thermofisher Scientific Titan transmissie elektronenmicroscoop en de opwarming van het nanodeeltje werd uitgevoerd met behulp van een DENS Solutions Wildfire *in-situ* sample houder, die in staat is om het sample in de elektronenmicroscoop op te warmen. De tiltreeksen werden opgenomen met de recent ontwikkelde "snelle tomografie" techniek met een tilt bereik van $\pm 70^\circ$ in tilt stappen van 3° .^{37,49} Van de opgenomen dataset werden de projectiebeelden met de onvoldoende kwaliteit manueel verwijderd, en de reconstructies werden bekomen met het EM algoritme. De resulterende ET reconstructies op de verschillende temperatuursteps worden gevisualiseerd in **Figuur 4.6**.

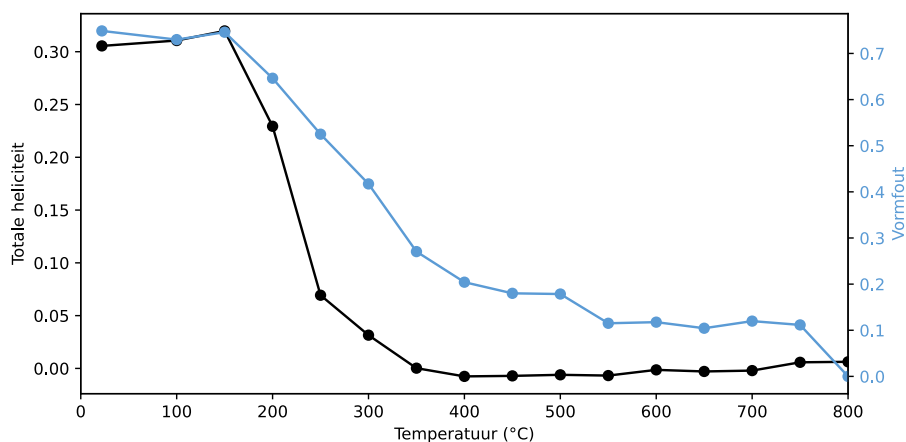
Een initiële visuele inspectie geeft al aan dat het nanostaafje start met een helische vorm en deze ook kan volhouden tot een temperatuur van ongeveer 200 °C. Bij verdere opwarming is er een sterke transformatie waarneembaar van de helische morfologie naar een achirale vorm van het nanostaafje. Bij ongeveer 400 °C is de transformatie compleet. Verdere opwarming resulteert dan enkel nog in een reductie van de verhouding tussen de lengte en diameter van het nanostaafje. Dit wordt ook op kwantitatieve wijze aangetoond met behulp van de vormfout in **Figuur 4.7**. De vormfout (Vergelijking 3.4) werd hierbij berekend ten opzichte van de



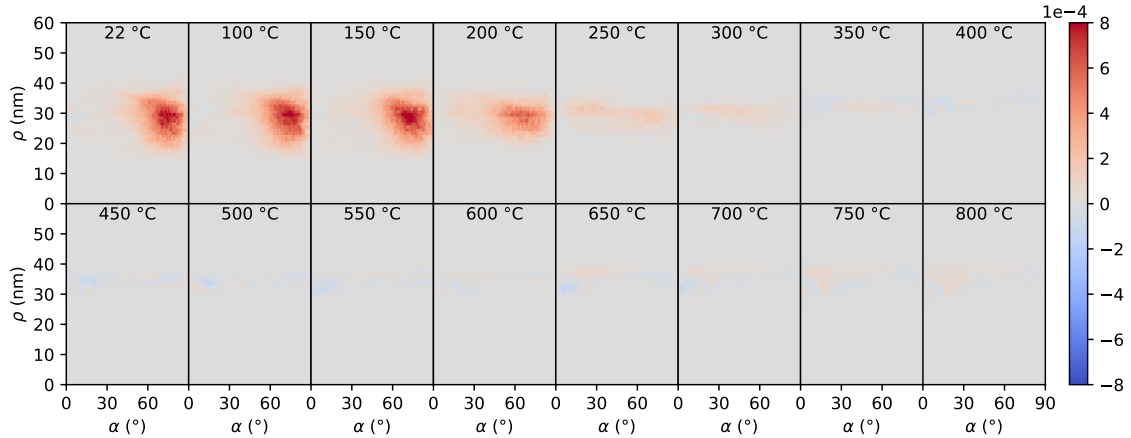
Figuur 4.6. ET reconstructies van een verdraaid Au nanostaafje op verschillende momenten tijdens een *in-situ* opwarmingsprocedure. De stippellijnen tonen aan welke delen werden meegerekend in de kwantificatie van heliceiteit en de schaal is geldig voor alle reconstructies.

finale vorm van het nanostaafje (na opwarming tot 800 °C) en geeft een indicatie van de mate van vervorming van het nanostaafje. Hier kan gezien worden dat de vormfout constant blijft tot en met 200 °C, er is dus inderdaad geen significante vervorming waarneembaar bij lage temperaturen. Bij verdere opwarming verlaagt de vormfout tot ongeveer 0.2 bij 400 °C, dit blijft constant tot 500 °C waarna er nog een kleine verandering te zien is tot een vormfout van ongeveer 0.15. Uit deze resultaten kan dus geconcludeerd worden dat het nanostaafje sterk vervormt is tussen 200 °C en 400 °C, en dat daarna nog kleine vervormingen waarneembaar waren. Dit komt overeen met eerdere observaties in de literatuur, waar waargenomen werd dat Au nanodeeltjes al beginnen te vervormen vanaf 200 °C.⁵⁰

Voor een additionele kwantitatieve analyse worden de totale heliceiteit en heliceiteitsfuncties van elk van deze reconstructies getoond in respectievelijk **Figuur 4.7** en **Figuur 4.8**. Net als in de vorige secties werden ook hier de boven- en onderkant van het nanostaafje niet meegerekend zoals aangegeven met stippellijnen in **Figuur 4.6**. Ter volledigheid worden de resultaten waarbij de volledige reconstructies gebruikt werden, getoond in Bijlage C. Uit deze resultaten



Figuur 4.7. Totale heliceiteit en vormfout van het verdraaide Au nanostaafje op verschillende temperaturen. De vormfout werd berekend ten opzichte van de laatste reconstructie (bij 800 °C).

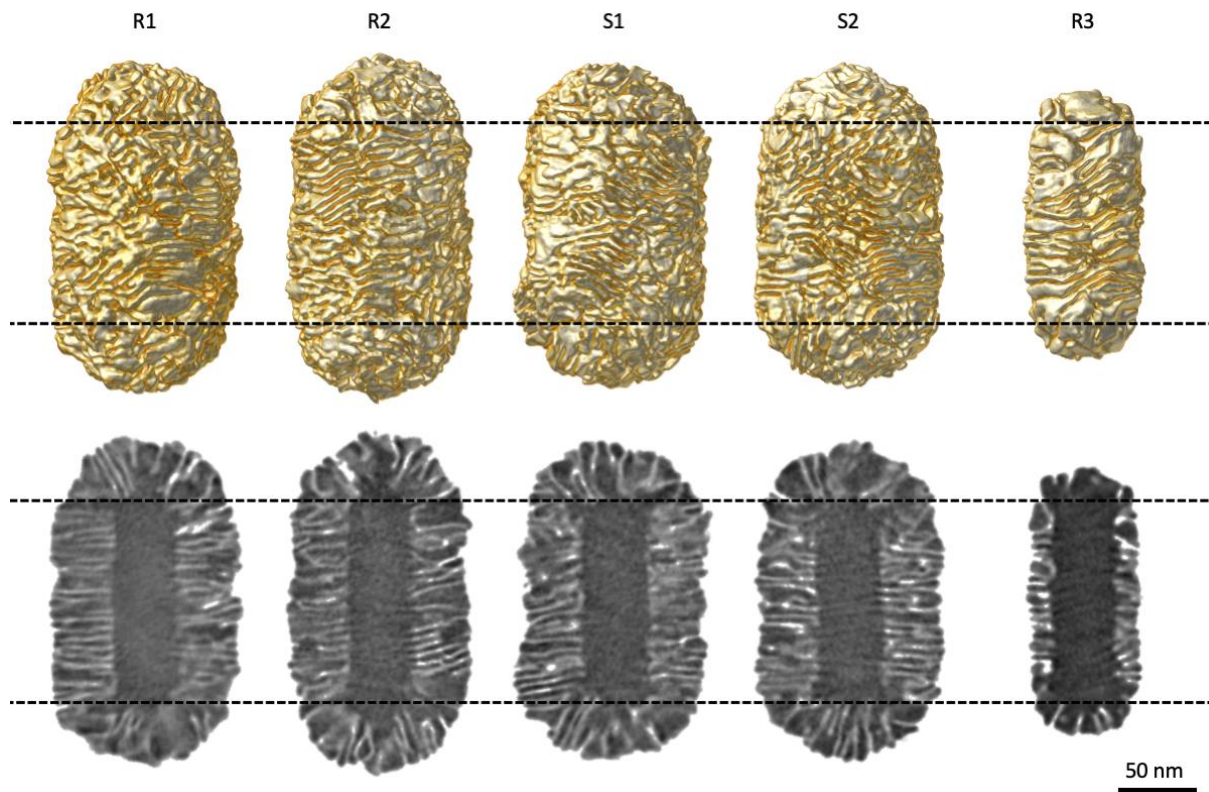


Figuur 4.8. Heliciteitsfuncties van de reconstructies van het verdraaide Au nanostaafje op verschillende temperaturen.

wordt duidelijk dat ook de heliceit pas vanaf 200 °C begint af te nemen. In **Figuur 4.7** en **Figuur 4.8** is echter te zien dat alle heliceit al verdwenen is bij 350 °C, en dat de heliceit van het nanostaafje daarna niet meer significant verandert. Aangezien er wel nog lichte verandering van de morfologie waarneembaar zijn tot 500 °C, kan geconcludeerd worden dat heliceit veroorzaakt wordt door instabiele oppervlaktekenmerken die in de eerste fase van de vorming van het nanostaafje al meteen verdwijnen. Dit wil dus zeggen dat deze helische nanodeeltjes enkel bruikbaar zijn bij lage tot gemiddelde temperaturen tot ongeveer 200 °C. Dit is meestal geen probleem voor toepassingen zoals enantioselectieve biosensing, enantioselectieve katalyse of enantioselectieve separatie van chirale moleculen.^{6,51–53} De toepassing van deze chirale nanodeeltjes als polarisator om circulair gepolariseerde lasers te maken, wordt hierdoor echter wel verhinderd aangezien metalen nanodeeltjes sterk kunnen opwarmen onder invloed van laserlicht.^{46,54–56}

4.3 Au kern-schil nanostaafjes

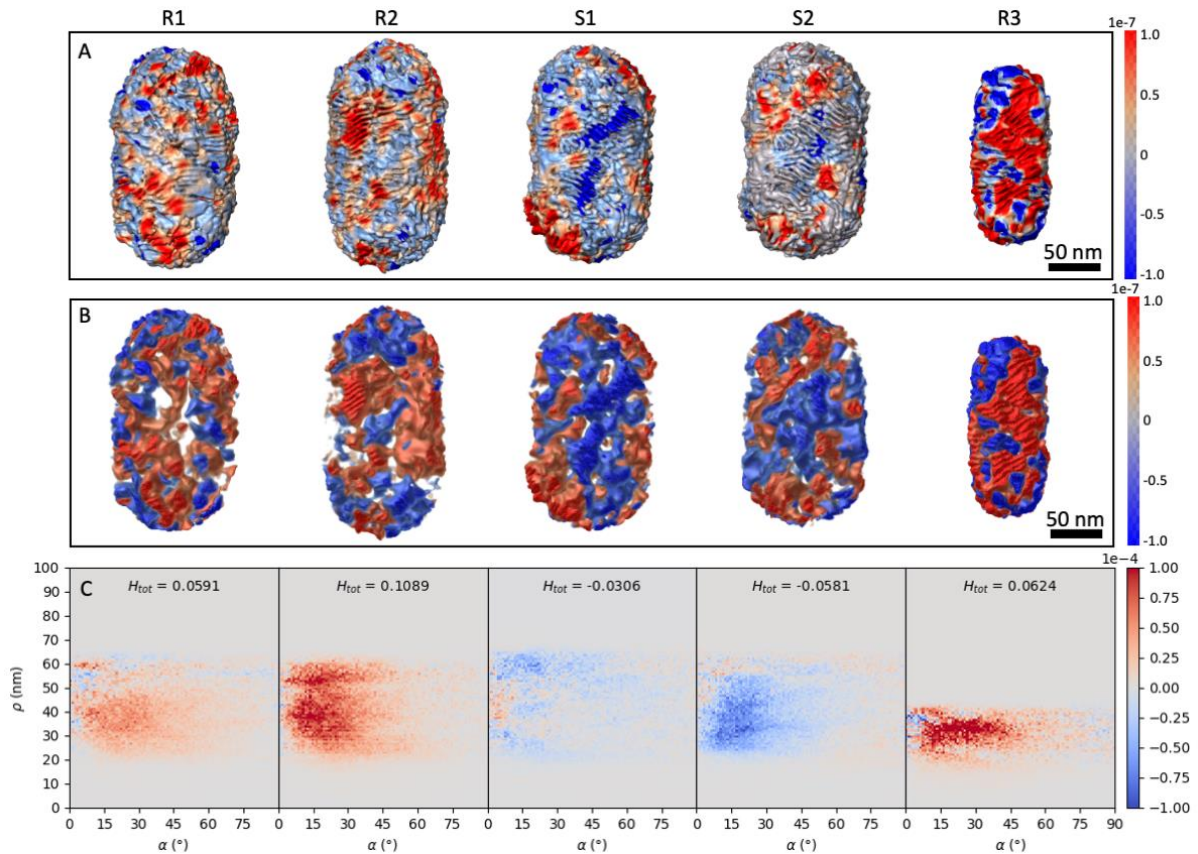
Een ander type van chirale Au nanostaafjes met zeer sterke chiroptische activiteit werd recent voorgesteld door González-Rubio *et al.*¹³ Deze nanostaafjes werden gemaakt vertrekkende van achirale Au nanostaafjes die dienen als kernen waarrond een chirale schil kan groeien (zie **Figuur 4.9**). Die chirale schil werd vervolgens gemaakt door de achirale kernen eerst te bedekken met chirale oppervlakte-actieve stoffen en vervolgens het groeiproces van de Au nanostaafjes te hervatten. De oppervlakte-actieve stoffen die hierbij gebruikt werden, zijn cetrimoniumchloride (CTAC) in combinatie met R-BINAMINE voor rechtshandige nanostaafjes of S-BINAMINE voor linkshandige nanostaafjes. BINAMINE (1,1'-binaftil-2,2'-diamine) is een derivaat van BINOL (1,1'-bi-2-naftol) en werkt als een chirale stof om helische micellen te vormen rond de achirale Au kernen. Het resultaat bestaat uit Au nanostaafjes met een achirale kern en een chirale schil. **Figuur 4.9** toont de 3D reconstructies van vijf van zulke nanostaafjes. Deze reconstructies werden bekomen volgens dezelfde procedure als de vorige samples, maar met een FEI Titan transmissie elektronenmicroscop. De eerste twee van deze nanostaafjes (R1 en R2) komen uit hetzelfde sample en werden gemaakt met R-BINAMINE. Nanostaafjes S1 en S2



Figuur 4.9. 3D visualisaties (bovenaan) van de ET reconstructies van vijf chirale Au kern-schil nanostaafjes, de doorsneden door het midden van de reconstructies (onderaan) tonen de kern-schil structuur van de nanostaafjes. De stippellijnen geven weer welke delen van de nanostaafjes gebruikt werden om de heliceitsfuncties te berekenen. De schaalbar is geldig voor alle afbeeldingen.

komen ook uit hetzelfde sample, dat gemaakt werd volgens dezelfde procedure als het sample van R1 en R2, maar waarbij S-BINAMINE gebruikt werd. Het laatste nanostaafje, R3, werd gesynthetiseerd met R-BINAMINE en een licht verschillende synthese procedure die resulteerde in een dunnere chirale schil. Meer details over de exacte synthese procedures worden gegeven in Bijlage D.

Door de combinatie van de dikte van deze nanostaafjes (meer dan 100 nm doorsnede) en het fijne detail in de chirale schillen, was het enkel mogelijk om de voorkanten van de nanostaafjes met voldoende resolutie te reconstrueren met ET. De voorgestelde kwantificatie methodologie is echter zeer flexibel, en is in staat om enkel bepaalde delen van een ET reconstructie in rekening te nemen. Zo is het mogelijk om de boven- en onderkant buiten beschouwing te houden, wat ook al gedaan werd in de vorige secties. Het is bovendien mogelijk om enkel de goed gereconstrueerde helft van de reconstructies te gebruiken. Voor de analyse van deze nanostaafjes werden daarom de boven-, onder- en achterkant niet meegerekend. De voorkant wordt getoond in **Figuur 4.9** en het deel tussen de boven- en onderkant dat gebruikt werd, wordt in diezelfde figuur aangeduid met stippellijnen. De resultaten van de analyse van de heliceit van deze nanostaafjes worden gepresenteerd in **Figuur 4.10** en de heliceitsfuncties die berekend werden zonder de boven- en onderkant te verwijderen zijn te vinden in Bijlage E. Omdat de complexe structuur van de helische schillen van deze nanostaafjes een correcte segmentatie verhinderde, werd ervoor gekozen om deze nanostaafjes niet te segmenteren.



Figuur 4.10. **A.** 3D visualisaties van de heliceitsmappen van de vijf chirale Au kern-schil nanostaafjes; **B.** Half-transparante visualisaties van de heliceitsmappen die de interne structuur weergeven; **C.** Heliceitsfuncties en totale heliceit van de vijf nanostaafjes. De schalen in A en B zijn geldig voor alle nanostaafjes.

De resultaten werden dus berekend op basis van de onbewerkte ET reconstructies. Aangezien de helische structuur van deze nanostaafjes zich niet enkel op het oppervlak bevindt, maar ook tot binnenin de helische schil rijkt, worden twee verschillende visualisaties van de heliceitsmappen getoond. **Figuur 4.10 A** toont een kwantitatieve representatie van de heliceit op het oppervlak van de nanostaafjes, waarbij de kleurcode rechtstreeks overeenkomt met de lokale heliceit. **Figuur 4.10 B** toont daarentegen half-transparante visualisaties van de heliceitsmappen. De interne structuur is hier zichtbaar, maar door de aard van de half-transparante visualisatiemethode is de kleurcode op de afbeeldingen niet exact. Deze heliceitsmappen werden berekend met een venstergrootte van 10 nm wat overeenkomt met de gemiddelde breedte van de helisch georiënteerde rimpels. Ook de heliceitsfuncties en totale heliceit van deze vijf nanostaafjes worden weergegeven in **Figuur 4.10 C**.

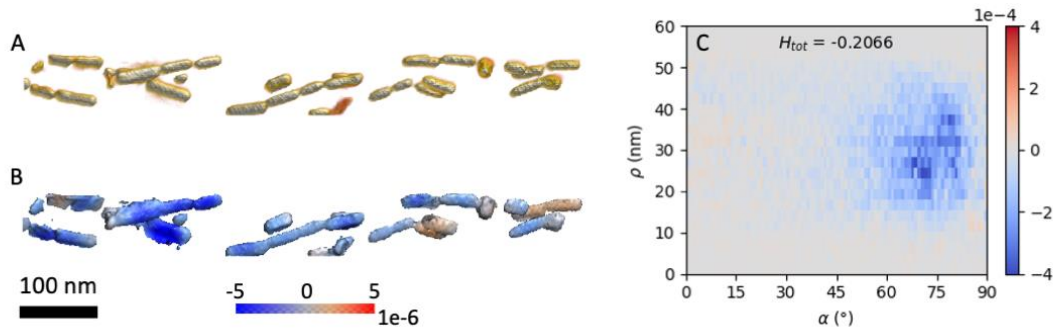
In tegenstelling tot de nanostaafjes die in de vorige delen onderzocht werden, hebben deze kern-schil nanostaafjes een zeer complexe structuur. De resultaten in **Figuur 4.10 A** en **B** tonen aan dat elk van deze nanostaafjes, ongeacht de algemene handigheid, contributies bevat van zowel links- als rechtshandige domeinen in de schil. Nanostaafjes die gemaakt werden met R-BINAMINE/CTAC lijken wel meer en/of grotere rechtshandige domeinen te hebben, en nanostaafjes die met S-BINAMINE/CTAC gemaakt werden, worden gedomineerd door linkshandige patronen. Dit resultaat geeft een eerste aanwijzing naar de hypothese dat het mogelijk zou zijn om nanostaafjes met een nog sterkere chiroptische activiteit te ontwikkelen indien de

synthese procedure in staat zou zijn om nanostaafjes te ontwikkelen met een helische schil met een meer homogene verdeling van de handigheid. Om deze hypothese te onderzoeken, is er echter meer data nodig van nanodeeltjes met variërende verhoudingen tussen links- en rechtshandige domeinen in de schil. Het creëren van nanodeeltjes met een zeer homogene helische structuur is natuurlijk de heilige graal van de synthese. Daarom is het belangrijk om op voorhand te weten of dit inderdaad de chiroptische eigenschappen kan versterken en of er eventueel andere haalbare opties zijn die de chiroptische activiteit in gelijke of grotere mate kunnen versterken.

Tenslotte bieden ook de heliceitsfuncties en totale heliceit (**Figuur 4.10 C**) complementaire informatie over de helische structuur van deze nanostaafjes. Zo kan er opgemerkt worden dat de kernen ($\rho < 20$ nm) zoals verwacht niet helisch zijn. De helische schil van de dikkere nanostaafjes rijkt bovendien tot $\rho = 60$ nm, terwijl die van R3 dunner is en rijkt tot $\rho = 40$ nm. Daarenboven hebben de nanostaafjes die met R-BINAMINE/CTAC gemaakt werden een positieve totale heliceit, wat wijst op een dominant rechtshandige structuur, en diegenen die met S-BINAMINE/CTAC gesynthetiseerd werden hebben een negatieve totale heliceit. De handigheid van deze nanodeeltjes kan dus gekozen worden door het corresponderende enantiomeer van BINAMINE te gebruiken. Op vlak van inclinatiehoeken kan vastgesteld worden dat deze nanostaafjes voornamelijk bepaald worden door lage inclinatiehoeken, tussen $\alpha = 5^\circ$ en $\alpha = 30^\circ$. Het kleinere nanostaafje lijkt echter iets steilere inclinatiehoeken te bevatten, tot $\alpha = 45^\circ$. Dit kan een gevolg zijn van de variatie tussen verschillende nanodeeltjes in de samples, of het zou ook mogelijk indiceren dat de inclinatiehoeken gecontroleerd kunnen worden met de dikte van de helische schil. Om deze hypothese te testen is opnieuw meer data vereist. Dit valt buiten het bereik van dit werk. De natuurlijke variatie tussen nanodeeltjes binnen hetzelfde sample wordt ook duidelijk uit het verschil tussen de resultaten van R1 en R2 enerzijds, en tussen die van S1 en S2 anderzijds. Het is bovendien opmerkelijk dat de heliceitsfuncties van al deze nanostaafjes erop lijken te wijzen dat ze zuiver links- of rechtshandige oppervlakte elementen bevatten, terwijl de heliceitsmappen duidelijk aanwijzen dat dit niet het geval is. Deze ogenschijnlijke tegenspraak is het gevolg van het feit dat de oppervlakte elementen met tegengestelde handigheid zeer gelijkaardige inclinatiehoeken hebben als de oppervlakte elementen met de dominante handigheid. Hierdoor reduceren ze het signaal in de heliceitsfuncties, maar zijn er in de heliceitsfuncties geen afzonderlijke signalen zichtbaar met de tegengestelde handigheid. De links- en rechtshandige signalen in de heliceitsfunctie middelen elkaar dus gedeeltelijk uit.

4.4 Helische cluster van achirale Au nanostaafjes

Hoewel de voorgestelde methodologie voornamelijk ontworpen werd voor de analyse van helische nanostaafjes, werden er weinig aannames gemaakt. Bijgevolg is deze methode toepasselijk voor veel andere soorten van helische materialen. Ter illustratie werd daarom de heliceit van een cluster van Au nanostaafjes rond een amyloïde fibril onderzocht. De ET reconstructie van deze cluster wordt getoond in **Figuur 4.11 A**. Zulke fibrillen worden gevormd



Figuur 4.11. A. ET reconstructie van een helische cluster van Au nanostaafjes; B. Heliciteitsmap van de cluster; C. Heliciteitsfunctie en totale heliceit van de cluster. De schaalbar is geldig voor A en B.

door de agglomeratie van amyloïde proteïnen en zijn gerelateerd aan diverse neurodegeneratieve ziektes zoals de ziekte van Parkinson.⁶ De dubbele-helix structuur van deze fibrillen kan dan als template gebruikt worden om een helische cluster van Au nanostaafjes te vormen. Kumar *et al.* toonden in eerder onderzoek aan dat de plasmonische activiteit van Au nanostaafjes de chiroptische activiteit van die clusters enorm versterkt, waardoor het mogelijk is om de aanwezigheid van amyloïde fibrillen selectief te detecteren.⁶

De heliciteitsmap, heliciteitsfunctie en totale heliceit van deze helische cluster worden getoond in **Figuur 4.11**. Het is meteen duidelijk dat het een linkshandige structuur betreft, wat Kumar *et al.* ook concludeerden op basis van de chiroptische activiteit en een visuele inspectie van de reconstructie.⁶ De heliciteitsmap (**Figuur 4.11 B**) werd berekend met een venster-grootte van 10 nm en toont dat, op enkele uitzonderingen na, elk nanostaafje in de cluster linkshandig georiënteerd is. Deze conclusie volgt uit het feit dat de heliciteitsmap negatief is bij nagenoeg alle nanodeeltjes. De heliciteitsfunctie (**Figuur 4.11 C**) toont tenslotte aan dat de nanostaafjes zich bevinden tussen $\rho = 15$ nm en $\rho = 45$ nm en dat de cluster een helische inclinatiehoek van ongeveer $\alpha = 70^\circ \pm 10^\circ$ heeft.

5 Conclusies

Bij gebrek aan een kwantitatieve methodologie om de structurele chiraliteit van chirale nano-staafjes te onderzoeken, werd een nieuwe methode voorgesteld om heliceiteit te kwantificeren op basis van 3D elektronentomografie reconstructies van die nanostaafjes. De voorgestelde methode gaat uit van de basiskenmerken van een helix, zijnde een helische as, een straal ρ , en een inclinatiehoek α . De aanwezigheid van deze kenmerken wordt gedetecteerd in de 3D elektronentomografie reconstructies van nanostaafjes, waarbij een zogenaamde heliceiteitsfunctie $H(\rho, \alpha)$ wordt opgesteld die als het ware een decompositie is van een gegeven vorm in een combinatie van links- en rechtshandige helices. Bovendien kan op basis van deze heliceiteitsfunctie ook de totale heliceiteit H_{tot} van een structuur berekend worden. De totale heliceiteit is een scalaire waarde tussen +1 en -1 die een indicatie geeft van de mate van heliceiteit en de handigheid van het bestudeerde nanodeeltje. Tenslotte kan de lokale heliceiteit berekend worden in kleine gebiedjes rond elke voxel in de elektronentomografie reconstructie, om zo een heliceiteitsmap te bekomen. Op die manier is het mogelijk om de verdeling van helische patronen in complexe structuren te analyseren.

Het nut van de voorgestelde methodologie werd besproken aan de hand van enkele experimentele voorbeelden. Zo werd aangetoond hoe systematische structurele verschillen tussen licht verschillende samples opgemerkt kunnen worden door de gemiddelde heliceiteitsfunctie en totale heliceiteit te berekenen over de resultaten van meerdere nanodeeltjes uit eenzelfde sample. Bovendien werd aan de hand van een *in-situ* opwarmingsexperiment toegelicht op welke wijze de voorgestelde methode een meerwaarde kan bieden bij de analyse van de verandering van een helische morfologie ten gevolge van externe factoren. Tenslotte werden verschillende complexe helische structuren onderzocht waarbij de flexibiliteit van de methode duidelijk werd. Het is bijvoorbeeld mogelijk om enkel bepaalde delen te selecteren uit een elektronentomografie reconstructie waarop de methodologie wordt toegepast. Daarenboven maakt de methode slechts weinig aannames over de structuren. Hierdoor is ze niet enkel toepasselijk voor helische nanostaafjes, maar ook voor verscheidene andere helische structuren.

Hoewel de voorgestelde methode zeer flexibel is en gebruikt kan worden om verschillende (nano)structuren op een objectieve en kwantitatieve manier te onderzoeken, zijn er nog een aantal beperkingen. De voornaamste beperking is dat er momenteel nog geen objectieve methode beschikbaar is om de helische as te detecteren, waardoor deze manueel identificeerbaar moet zijn. Voor langwerpige structuren, zoals nanostaafjes, kan aangenomen worden dat de helische as parallel is aan de longitudinale as van de structuur en door het massamiddelpunt gaat. Voor andere structuren is dit echter niet mogelijk. Bovendien hebben de uiteindes van nanostaafjes dikwijls een meer willekeurige oriëntatie, waardoor die aanname ook niet correct is in die gebieden. Om dit probleem te omzeilen, is het mogelijk om de uiteindes niet mee te rekenen bij het berekenen van de heliceiteitsfunctie en totale heliceiteit, zoals ook consistent gedaan werd in dit werk. Dit is echter niet de beste oplossing, aangezien die uiteindes wel degelijk aanwezig zijn en dus in principe niet genegeerd mogen worden. Tenslotte worden de resultaten van de voorgestelde kwantificatieprocedure gelimiteerd door de kwaliteit van

de elektronentomografie reconstructies en is het dus van belang dat deze reconstructies zeer accuraat de vorm van de nanodeeltjes weergeven.

In verder onderzoek zal de voorgestelde methodologie gebruikt kunnen worden om het verband tussen structurele en optische chiraliteit te ontrafelen. Hiervoor is een correlatief onderzoek nodig waarbij CD spectroscopie van enkelvoudige nanodeeltjes gecombineerd wordt met elektronentomografie van diezelfde nanodeeltjes. Als de helicheit van de nanodeeltjes werkelijk de oorzaak is van de geïnduceerde chiroptische activiteit, dan zal er een correlatie waarneembaar zijn tussen de totale helicheit enerzijds en een extremum van het CD spectrum anderzijds. Met de experimentele resultaten die in dit werk werden voorgesteld, werd al gehint naar zulke correlaties, maar een volledig correlatief onderzoek vereist meer data.

Er zijn duidelijk nog een aantal struikelblokken die overwonnen moeten worden om de voorgestelde methodologie algemeen toe te kunnen passen. Desondanks is het duidelijk dat de resultaten complementair zijn aan CD spectroscopie en zeer nuttige inzichten kunnen bieden in de structurele helicheit van nanomaterialen. De voorgestelde methode kan zo aan de basis liggen van een grootschalig onderzoek naar enerzijds de correlatie tussen structurele en optische chiraliteit van metalen nanodeeltjes, en anderzijds naar de synthese van nanodeeltjes met superieure chiroptische eigenschappen.

Bibliografie

- (1) Mock, J. J.; Hill, R. T.; Degiron, A.; Zauscher, S.; Chilkoti, A.; Smith, D. R. Distance-Dependent Plasmon Resonant Coupling between a Gold Nanoparticle and Gold Film. *Nano Lett.* **2008**, *8* (8), 2245–2252. <https://doi.org/10.1021/nl080872f>.
- (2) Nehl, C. L.; Hafner, J. H. Shape-Dependent Plasmon Resonances of Gold Nanoparticles. *Journal of Materials Chemistry*. The Royal Society of Chemistry May 13, 2008, pp 2415–2419. <https://doi.org/10.1039/b714950f>.
- (3) 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* (14), 7238–7248. <https://doi.org/10.1021/jp057170o>.
- (4) Yaqoob, A. A.; Ahmad, H.; Parveen, T.; Ahmad, A.; Oves, M.; Ismail, I. M. I.; Qari, H. A.; Umar, K.; Mohamad Ibrahim, M. N. Recent Advances in Metal Decorated Nanomaterials and Their Various Biological Applications: A Review. *Frontiers in Chemistry*. Frontiers Media S.A. May 19, 2020, p 341. <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.00341>.
- (5) Garcia, M. A. Surface Plasmons in Metallic Nanoparticles: Fundamentals and Applications. *Journal of Physics D: Applied Physics*. IOP Publishing June 24, 2011, p 283001. <https://doi.org/10.1088/0022-3727/44/28/283001>.
- (6) Kumar, J.; Eraña, H.; López-Martínez, E.; Claes, N.; Martín, V. F.; Solís, D. M.; Bals, S.; Cortajarena, A. L.; Castilla, J.; Liz-Marzán, L. M. Detection of Amyloid Fibrils in Parkinson's Disease Using Plasmonic Chirality. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2018**, *115* (13), 3225–3230. <https://doi.org/10.1073/pnas.1721690115>.
- (7) Jimenez de Aberasturi, D.; Belén Serrano-Montes, A.; Liz-Marzán, L. M.; Liz-Marzán, L. M.; Jimenez de Aberasturi, D.; Serrano-Montes, A. B. Modern Applications of Plasmonic Nanoparticles: From Energy to Health. *Adv. Opt. Mater.* **2015**, *3* (5), 602–617. <https://doi.org/10.1002/ADOM.201500053>.
- (8) Esposito, M.; Tasco, V.; Todisco, F.; Cuscunà, M.; Benedetti, A.; Sanvitto, D.; Passaseo, A. Triple-Helical Nanowires by Tomographic Rotatory Growth for Chiral Photonics. *Nat. Commun.* **2015**, *6* (1), 1–7. <https://doi.org/10.1038/ncomms7484>.
- (9) Frank, B.; Yin, X.; Schäferling, M.; Zhao, J.; Hein, S. M.; Braun, P. V.; Giessen, H. Large-Area 3D Chiral Plasmonic Structures. *ACS Nano* **2013**, *7* (7), 6321–6329. <https://doi.org/10.1021/nn402370x>.
- (10) Furusawa, G.; Kan, T. Au Nanospirals Transferred onto PDMS Film Exhibiting Circular Dichroism at Visiblewavelengths. *Micromachines* **2020**, *11* (7). <https://doi.org/10.3390/MI11070641>.
- (11) Lee, H. E.; Kim, R. M.; Ahn, H. Y.; Lee, Y. Y.; Byun, G. H.; Im, S. W.; Mun, J.; Rho, J.; Nam, K. T. Cysteine-Encoded Chirality Evolution in Plasmonic Rhombic Dodecahedral Gold Nanoparticles. *Nat. Commun.* **2020**, *11* (1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-14117-x>.
- (12) Sobczak, K.; Turczyniak-Surdacka, S.; Lewandowski, W.; Baginski, M.; Tupikowska, M.; González-Rubio, G.; Wójcik, M.; Carlsson, A.; Donten, M. STEM Tomography of Au

- Helical Assemblies. *Microsc. Microanal.* **2021**, 1–5.
<https://doi.org/10.1017/S1431927621012009>.
- (13) González-Rubio, G.; Mosquera, J.; Kumar, V.; Pedraza-Tardajos, A.; Llombart, P.; Solís, D. M.; Lobato, I.; Noya, E. G.; Guerrero-Martínez, A.; Taboada, J. M.; Obelleiro, F.; MacDowell, L. G.; Bals, S.; Liz-Marzán, L. M. Micelle-Directed Chiral Seeded Growth on Anisotropic Gold Nanocrystals. *Science (80-.)*. **2020**, *368* (6498), 1472–1477.
<https://doi.org/10.1126/science.aba0980>.
- (14) Liu, Z.; Xu, Y.; Ji, C. Y.; Chen, S.; Li, X.; Zhang, X.; Yao, Y.; Li, J. Fano-Enhanced Circular Dichroism in Deformable Stereo Metasurfaces. *Adv. Mater.* **2020**, *32* (8).
<https://doi.org/10.1002/adma.201907077>.
- (15) Chen, J.; Gao, X.; Zheng, Q.; Liu, J.; Meng, D.; Li, H.; Cai, R.; Fan, H.; Ji, Y.; Wu, X. Bottom-Up Synthesis of Helical Plasmonic Nanorods and Their Application in Generating Circularly Polarized Luminescence. *ACS Nano* **2021**, *15* (9), 15114–15122.
<https://doi.org/10.1021/ACSANO.1C05489>.
- (16) Cho, N. H.; Lee, H. E.; Ahn, H. Y.; Lee, Y. Y.; Im, S. W.; Kim, H.; Nam, K. T. Cysteine Induced Chiral Morphology in Palladium Nanoparticle. *Part. Part. Syst. Charact.* **2019**, *36* (5), 1900062. <https://doi.org/10.1002/ppsc.201900062>.
- (17) Cho, N. H.; Byun, G. H.; Lim, Y. C.; Im, S. W.; Kim, H.; Lee, H. E.; Ahn, H. Y.; Nam, K. T. Uniform Chiral Gap Synthesis for High Dissymmetry Factor in Single Plasmonic Gold Nanoparticle. *ACS Nano* **2020**, *14* (3), 3595–3602.
<https://doi.org/10.1021/acsnano.9b10094>.
- (18) Lee, H. E.; Ahn, H. Y.; Mun, J.; Lee, Y. Y.; Kim, M.; Cho, N. H.; Chang, K.; Kim, W. S.; Rho, J.; Nam, K. T. Amino-Acid- and Peptide-Directed Synthesis of Chiral Plasmonic Gold Nanoparticles. *Nature* **2018**, *556* (7701), 360–364. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0034-1>.
- (19) Sample Courtesy of Dr. Bing Ni, University of Konstanz.
- (20) Hentschel, M.; Schäferling, M.; Duan, X.; Giessen, H.; Liu, N. Chiral Plasmonics. *Science Advances*. American Association for the Advancement of Science May 1, 2017, p e1602735. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1602735>.
- (21) Goerlitzer, E. S. A.; Puri, A. S.; Moses, J. J.; Poulikakos, L. V.; Vogel, N. The Beginner's Guide to Chiral Plasmonics: Mostly Harmless Theory and the Design of Large-Area Substrates. *Advanced Optical Materials*. May 28, 2021, p 2100378.
<https://doi.org/10.1002/adom.202100378>.
- (22) Gutsche, P.; Garcia-Santiago, X.; Schneider, P. I.; McPeak, K. M.; Nieto-Vesperinas, M.; Burger, S. Role of Geometric Shape in Chiral Optics. *Symmetry (Basel)*. **2020**, *12* (1).
<https://doi.org/10.3390/SYM12010158>.
- (23) Ben-Moshe, A.; da Silva, A.; Muller, A.; Abu-Odeh, A.; Harrison, P.; Waelder, J.; Niroui, F.; Ophus, C.; Minor, A. M.; Asta, M.; Theis, W.; Ercius, P.; Alivisatos, A. P. The Chain of Chirality Transfer in Tellurium Nanocrystals. *Science (80-.)*. **2021**, *372* (6543), 729–733. <https://doi.org/10.1126/science.abf9645>.
- (24) Canfield, B. K.; Kujala, S.; Laiho, K.; Jefimovs, K.; Turunen, J.; Kauranen, M. Chirality Arising from Small Defects in Gold Nanoparticle Arrays. *Opt. Express* **2006**, *14* (2), 950.

<https://doi.org/10.1364/opex.14.000950>.

- (25) Spaeth, P.; Adhikari, S.; Le, L.; Jollans, T.; Pud, S.; Albrecht, W.; Bauer, T.; Caldarola, M.; Kuipers, L.; Orrit, M. Circular Dichroism Measurement of Single Metal Nanoparticles Using Photothermal Imaging. *Nano Lett.* **2019**, *19* (12), 8934–8940. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.9b03853>.
- (26) Karst, J.; Cho, N. H.; Kim, H.; Lee, H. E.; Nam, K. T.; Giessen, H.; Hentschel, M. Chiral Scatterometry on Chemically Synthesized Single Plasmonic Nanoparticles. *ACS Nano* **2019**, *13* (8), 8659–8668. <https://doi.org/10.1021/acsnano.9b04046>.
- (27) Williams, D. B.; Carter, C. B. *Transmission Electron Microscopy: A Textbook for Materials Science*; Springer US, 2009. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-76501-3>.
- (28) Nellist, P. D. *Scanning Transmission Electron Microscopy*; Pennycook, S. J., Nellist, P. D., Eds.; Springer, 2019. https://doi.org/10.1007/978-3-030-00069-1_2.
- (29) Zu, S.; Bao, Y.; Fang, Z. Planar Plasmonic Chiral Nanostructures. *Nanoscale* **2016**, *8* (7), 3900–3905. <https://doi.org/10.1039/c5nr09302c>.
- (30) Weyland, M.; Midgley, P. A. Electron Tomography. *Mater. Today* **2004**, *7* (12), 32–40. [https://doi.org/10.1016/S1369-7021\(04\)00569-3](https://doi.org/10.1016/S1369-7021(04)00569-3).
- (31) Radon, J. Über Die Bestimmung von Funktionen Durch Ihre Integralwerte Ängs Gewisser Mannigfaltigkeiten. *Akad. Wiss.* **1917**, *69*, 262–277.
- (32) Andersen, M. S.; Batenburg, K. J.; Dong, Y.; Quinto, E. T.; Sijbers, J.; Hansen, P. C.; Jorgensen, J. S.; Lionheart, W. R. B. *Computed Tomography: Algorithms, Insight, and Just Enough Theory*; Hansen, P. C., Jørgensen, J., Lionheart, W. R. B., Eds.; Society for Industrial and Applied Mathematics: Philadelphia, PA, 2021. <https://doi.org/10.1137/1.9781611976670>.
- (33) Gregor, J.; Benson, T. Computational Analysis and Improvement of SIRT. *IEEE Trans. Med. Imaging* **2008**, *27* (7), 918–924. <https://doi.org/10.1109/TMI.2008.923696>.
- (34) Levitan, E.; Herman, G. T. A Maximum A Posteriori Probability Expectation Maximization Algorithm for Image Reconstruction in Emission Tomography. *IEEE Trans. Med. Imaging* **1987**, *6* (3), 185–192. <https://doi.org/10.1109/TMI.1987.4307826>.
- (35) Bruyant, P. P. Analytic and Iterative Reconstruction Algorithms in SPECT. *J. Nucl. Med.* **2002**, *43* (10), 1343–1358.
- (36) Goris, B.; Van den Broek, W.; Batenburg, K. J.; Heidari Mezerji, H.; Bals, S. Electron Tomography Based on a Total Variation Minimization Reconstruction Technique. *Ultramicroscopy* **2012**, *113*, 120–130. <https://doi.org/10.1016/J.ULTRAMIC.2011.11.004>.
- (37) Vanrompay, H.; Skorikov, A.; Bladt, E.; Béché, A.; Freitag, B.; Verbeeck, J.; Bals, S. Fast versus Conventional HAADF-STEM Tomography of Nanoparticles: Advantages and Challenges. *Ultramicroscopy* **2021**, *221*, 113191. <https://doi.org/10.1016/j.ultramic.2020.113191>.
- (38) Altantzis, T.; Lobato, I.; De Backer, A.; Béché, A.; Zhang, Y.; Basak, S.; Porcu, M.; Xu, Q.; Sánchez-Iglesias, A.; Liz-Marzán, L. M.; Van Tendeloo, G.; Van Aert, S.; Bals, S. Three-

- Dimensional Quantification of the Facet Evolution of Pt Nanoparticles in a Variable Gaseous Environment. *Nano Lett.* **2019**, *19* (1), 477–481. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.8b04303>.
- (39) Weyland, M. Two and Three Dimensional Nanoscale Analysis : New Techniques and Applications, University of Cambridge, 2001. <https://doi.org/https://doi.org/10.17863/CAM.19108>.
- (40) Kelvin, W. T. *The Molecular Tactics of a Crystal*; 1894.
- (41) Silvestri, I. P.; Colbon, P. J. J. The Growing Importance of Chirality in 3D Chemical Space Exploration and Modern Drug Discovery Approaches for Hit-ID. *ACS Med. Chem. Lett.* **2021**, *12* (8), 1220–1229. <https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.1c00251>.
- (42) H. Brooks, W.; C. Guida, W.; G. Daniel, K. The Significance of Chirality in Drug Design and Development. *Curr. Top. Med. Chem.* **2011**, *11* (7), 760–770. <https://doi.org/10.2174/156802611795165098>.
- (43) Yewande, E. O.; Neal, M. P.; Low, R. The Hausdorff Chirality Measure and a Proposed Hausdorff Structure Measure. *Mol. Phys.* **2009**, *107* (3), 281–291. <https://doi.org/10.1080/00268970902835611>.
- (44) Winckelmans, N.; Altantzis, T.; Grzelczak, M.; Sánchez-Iglesias, A.; Liz-Marzán, L. M.; Bals, S. Multimode Electron Tomography as a Tool to Characterize the Internal Structure and Morphology of Gold Nanoparticles. *J. Phys. Chem. C* **2018**, *122* (25), 13522–13528. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.7b12379>.
- (45) Heyvaert, W.; Pedraza-Tardajos, A.; Kadu, A.; Claes, N.; González-Rubio, G.; Liz-Marzán, L. M.; Albrecht, W.; Bals, S. Quantification of the Helical Morphology of Chiral Gold Nanorods. *ACS Mater. Lett.* **2022**, *4* (4), 642–649. <https://doi.org/10.1021/acsmaterialslett.2c00055>.
- (46) Milagres de Oliveira, T.; Albrecht, W.; González-Rubio, G.; Altantzis, T.; Lobato Hoyos, I. P.; Béché, A.; Van Aert, S.; Guerrero-Martínez, A.; Liz-Marzán, L. M.; Bals, S. 3D Characterization and Plasmon Mapping of Gold Nanorods Welded by Femtosecond Laser Irradiation. *ACS Nano* **2020**, *14* (10), 12558–12570. <https://doi.org/10.1021/acsnano.0c02610>.
- (47) Otsu, N. A Threshold Selection Method from Gray-Level Histograms. *IEEE Trans. Syst. Man. Cybern.* **1979**, *9* (1), 62–66. <https://doi.org/10.1109/TSMC.1979.4310076>.
- (48) Student. The Probable Error of a Mean. *Biometrika* **1908**, *6* (1), 1. <https://doi.org/10.2307/2331554>.
- (49) Albrecht, W.; Bals, S. Fast Electron Tomography for Nanomaterials. *J. Phys. Chem. C* **2020**, *124* (50), 27276–27286. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.0c08939>.
- (50) Vanrompay, H.; Blatt, E.; Albrecht, W.; Béché, A.; Zakhozheva, M.; Sánchez-Iglesias, A.; Liz-Marzán, L. M.; Bals, S. 3D Characterization of Heat-Induced Morphological Changes of Au Nanostars by Fast in Situ Electron Tomography. *Nanoscale* **2018**, *10* (48), 22792–22801. <https://doi.org/10.1039/C8NR08376B>.
- (51) Tiwari, M. P.; Prasad, A. Molecularly Imprinted Polymer Based Enantioselective Sensing Devices: A Review. *Anal. Chim. Acta* **2015**, *853* (1), 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.06.011>.

- (52) Aboul-Enein, H. Y.; Bounoua, N.; Rebizi, M.; Wagdy, H. Application of Nanoparticles in Chiral Analysis and Chiral Separation. *Chirality*. John Wiley & Sons, Ltd May 1, 2021, pp 196–208. <https://doi.org/10.1002/chir.23303>.
- (53) Hao, C.; Xu, L.; Kuang, H.; Xu, C. Artificial Chiral Probes and Bioapplications. *Adv. Mater.* **2020**, *32* (41), 1802075. <https://doi.org/10.1002/adma.201802075>.
- (54) Yuan, Z.; Zhou, Y.; Qiao, Z.; Eng Aik, C.; Tu, W. C.; Wu, X.; Chen, Y. C. Stimulated Chiral Light-Matter Interactions in Biological Microlasers. *ACS Nano* **2021**, *15* (5), 8965–8975. <https://doi.org/10.1021/acsnano.1c01805>.
- (55) Albrecht, W.; Arslan Irmak, E.; Altantzis, T.; Pedraza-Tardajos, A.; Skorikov, A.; Deng, T. S.; van der Hoeven, J. E. S.; van Blaaderen, A.; Van Aert, S.; Bals, S. 3D Atomic-Scale Dynamics of Laser-Light-Induced Restructuring of Nanoparticles Unraveled by Electron Tomography. *Adv. Mater.* **2021**, *33* (33), 2100972. <https://doi.org/10.1002/adma.202100972>.
- (56) Qu, D.; Archimi, M.; Camposeo, A.; Pisignano, D.; Zussman, E. Circularly Polarized Laser with Chiral Nematic Cellulose Nanocrystal Cavity. *ACS Nano* **2021**, *15* (5), 8753–8760. <https://doi.org/10.1021/acsnano.1c01001>.
- (57) González-Rubio, G.; Kumar, V.; Llombart, P.; Díaz-Núñez, P.; Bladt, E.; Altantzis, T.; Bals, S.; Peña-Rodríguez, O.; Noya, E. G.; MacDowell, L. G.; Guerrero-Martínez, A.; Liz-Marzán, L. M. Disconnecting Symmetry Breaking from Seeded Growth for the Reproducible Synthesis of High Quality Gold Nanorods. *ACS Nano* **2019**, *13* (4), 4424–4435. <https://doi.org/10.1021/acsnano.8b09658>.

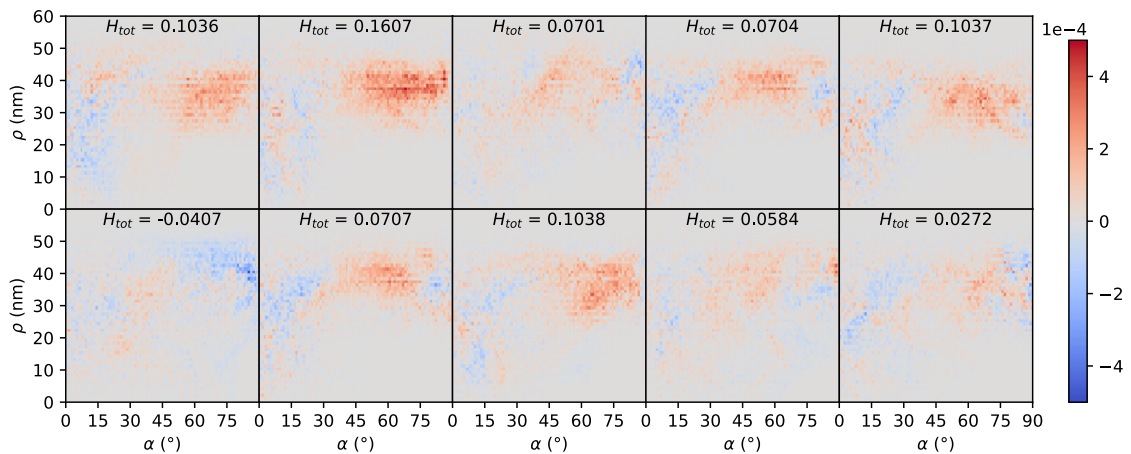
Bijlage A. Synthese van verdraaide Au nanostaafjes

De verdraaide Au nanostaafjes werden geprepareerd door Dr. Bing Ni binnen de onderzoeksgroep van professor Cölfen aan de Universiteit van Konstanz.¹⁹ Meer details over de synthese procedure werden door Dr. Bing Ni voorzien:

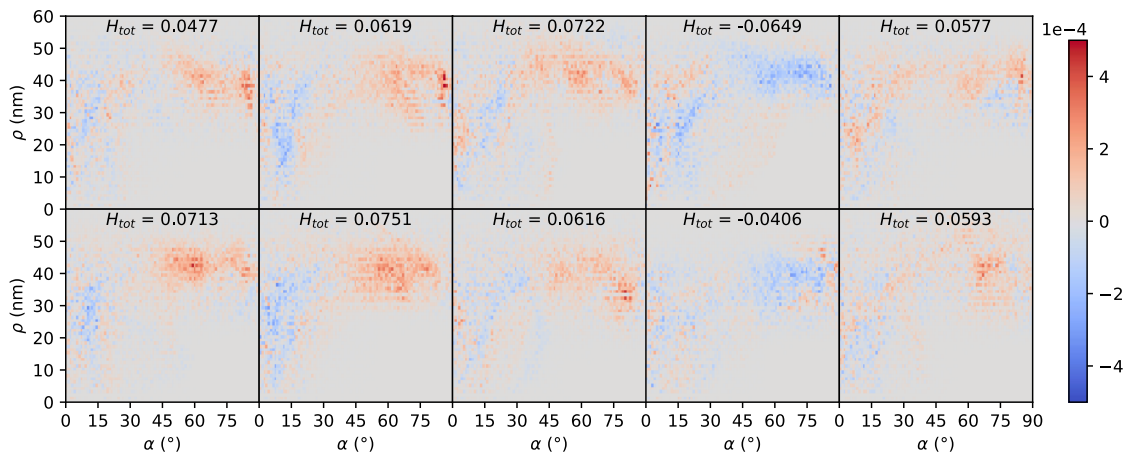
- **Synthesis of {520} facets enclosed Au nanorods:** The procedure was adopted from literature.⁵⁷ In general, 1-2 nm Au seeds were synthesized in the first step; then small Au nanorods (NR) (13.9 nm in length and 4.5 nm in width) were synthesized based on the small Au seeds. The small Au NRs were used as seeds in the following reactions. First, the concentration of the seeds (small Au NRs) was adjusted according to the optical absorption at 400 nm in the UV-vis spectrum, which was tuned to be 10 (optical path length of 1 cm, corresponding to a concentration of ~4 mM). In a standard procedure to synthesize larger Au NRs, 1500 μL of AgNO_3 (0.01 M) and 1000 μL of HAuCl_4 (0.05 M) were added into 100 mL of CTAB/decanol solution (CTAB: 50 mM, decanol: 11 mM) in a 250 mL Erlenmeyer flask and sonicated to get a transparent solution. Then 800 μL of AA (0.1 M) was added into the solution. In the following steps, 500 μL of seeds and 10 mL of HCl (1 M) were injected into the solution. The solution was vigorously shaken and quickly put into a water bath at 16 °C. Finally, the obtained NRs were centrifuged at 6000 rpm (15 min) and redispersed in CTAC (10mM). This step was repeated three times to remove excess Ag^+ , which was found to be quite detrimental to the preparation of twisted rods.
- The concentration of the Au NR seed was adjusted to 0.8 mM according to the optical absorption. Then 20mL of CTAC (40mM) was put into a tube, which was followed by adding 50 μL of HAuCl_4 (3 mM) and 2.4 mL of AA (0.1 M) into the solution. The solution was sonicated for around 30 s. The solution was then separated into several parts (2 mL each) and put into PE tubes. Then 30 μL of cys solution (5 μM) was added into the PE tube. 7 μL of seed solution was added into the PE tube. Then the PE tube was shaken several times and stored at 23 °C (this step is the first addition). After 50 min, 5 μL of HAuCl_4 (3 mM) was added into the PE tube. The addition was repeated several times. From the 6th addition on, the growth temperature was tuned to 16 °C for sample 1, while the growth temperature for sample 2 was maintained at 23 °C. After 9 additions, the PE tube was centrifuged (6000 rpm, 5 min) and washed twice with H_2O . The obtained particles were dispersed in H_2O .

Bijlage B. Additionele resultaten van verdraaide Au nanostaafjes met een verschillende synthese

Bij de analyse van de twee verschillende samples van verdraaide Au nanostaafjes werden de boven- en onderkanten van de staafjes niet meegerekend. Deze voldoen namelijk niet aan de aanname dat de helische as overeenkomt met de longitudinale as van het nanostaafje. Indien deze wel worden meegerekend, zijn er kwantificatie-artefacten zichtbaar in de heliceitsfuncties, zoals getoond wordt in **Figuur B.1** en **Figuur B.2**. De artefacten uiten zich als willekeurige contributies bij lage inclinatiehoeken (tussen 0° en 30°).



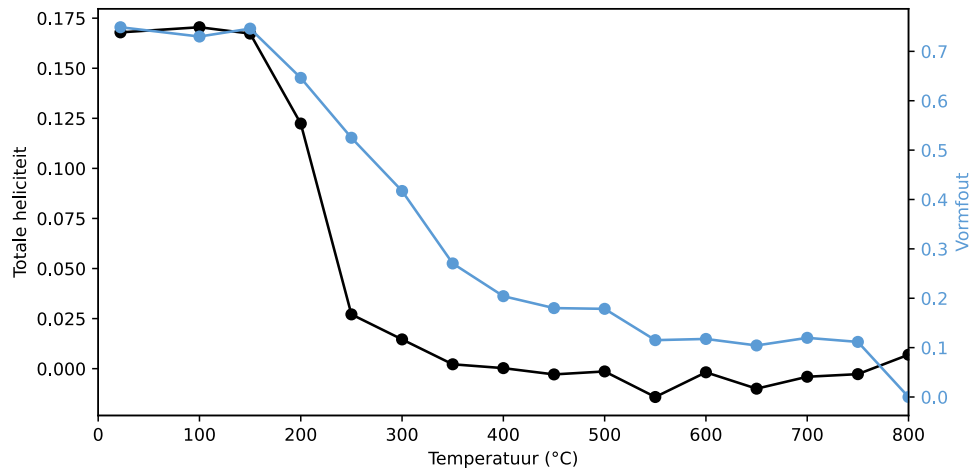
Figuur B.1. Heliceitsfuncties en totale heliceit van de tien individuele nanostaafjes uit sample 1 waarbij de boven- en onderkanten wel mee in rekening genomen werden. De volgorde van de heliceitsfuncties komt overeen met **Figuur 4.3**.



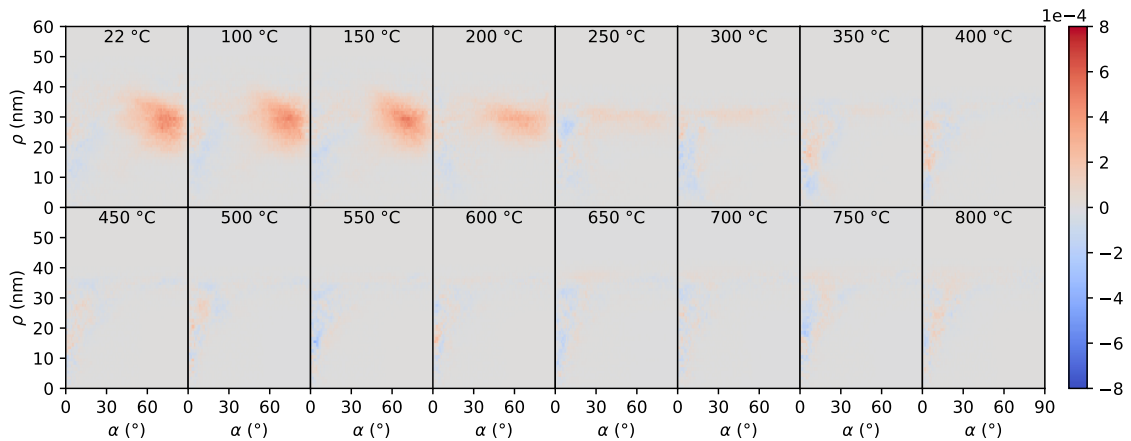
Figuur B.2. Heliceitsfuncties en totale heliceit van de tien individuele nanostaafjes uit sample 2 waarbij de boven- en onderkanten wel mee in rekening genomen werden. De volgorde van de heliceitsfuncties komt overeen met **Figuur 4.4**.

Bijlage C. Additionele resultaten van het verdraaide Au nanostaafje bij opwarming

Ook in Sectie 4.2 werden de boven- en onderkanten van de reconstructies niet meegerekend bij de kwantificatie van de heliceiteit. **Figuur C.1** en **Figuur C.2** tonen respectievelijk de totale heliceiteit en heliceiteitsfuncties van de volledige reconstructies. Er dient opgemerkt te worden dat er in dit geval weinig verschil is tussen de resultaten met of zonder de boven- en onderkanten van de reconstructies.



Figuur C.1. Totale heliceiteit en vormfout van de volledige reconstructies van het verdraaide nanostaafje op verschillende momenten tijdens de *in-situ* opwarmingsprocedure. De vormfout werd berekend ten opzichte van de laatste reconstructie (bij 800 °C).



Figuur C.2. Heliceiteitsfuncties van de volledige reconstructies van het verdraaide nanostaafje op verschillende momenten tijdens de *in-situ* opwarmingsprocedure.

Bijlage D. Synthese van Au kern-schil nanostaafjes

De Au kern-schil nanostaafjes werden gesynthetiseerd in de onderzoeksgroep van professor Luis M. Liz-Marzán in het CIC biomaGUNE instituut in Spanje.¹³ De volgende gedetailleerde uitleg over de synthese van de vijf nanostaafjes die in deze thesis onderzocht werden, werd door hen voorzien:

Materials

All starting materials were obtained from commercial suppliers and used without further purification: 1-decanol (n-decanol, 98%), cetyltrimethylammonium bromide (CTAB, ≥99%), (R)-(+)-1,1'-Bi(2-naphthol) ((R)-BINOL, 99%), (R)-(+)-1,1'-binaphthyl-2,2'-diamine ((R)-BINAMINE, 99%), (S)-(-)-1,1'-binaphthyl-2,2'-diamine ((S)-BINAMINE, 99%), hydrogen tetrachloroaurate trihydrate (HAuCl₄·3H₂O, ≥99.9%), silver nitrate (AgNO₃, ≥99.0%), L-ascorbic acid (≥99%), L-cysteine (97%), hydrochloric acid (37%) and sodium borohydride (NaBH₄, 99%) were purchased from Aldrich. Cetyltrimethylammonium chloride (CTAC, 99%) was purchased from ACROS Organics. Nanopure water (resistivity >18.2 MΩ·cm at 25 °C) was used in all experiments.

Synthesis of nanorod seeds

Gold nanorods were prepared using the multistep seed-mediated growth method with minor modifications:¹³

- **Synthesis of 1–2 nm gold seeds:** 20 mL of a freshly prepared n-decanol/CTAB (13.5 mM/ 50 mM) solution was placed in a 50 mL glass beaker at 25–27 °C and then 200 μL of HAuCl₄ (0.05 M) and 100 μL of ascorbic acid (0.1 M) were added. After 1–2 min, 800 μL of a freshly prepared 0.02 M NaBH₄ solution was injected under vigorous stirring into the colorless solution (1000 rpm using a PTFE plain magnetic stirring bar: 30 × 6 mm, at 25–27 °C). A brownish-yellow solution was obtained, which was aged for at least 60 min at 25–27 °C (using a water bath) prior to use.
- **Synthesis of small anisotropic seeds (21 nm long, 7.5 nm wide):** In a 500 mL Erlenmeyer flask, 3.0 mL of HAuCl₄ (0.05 M), 2.4 mL of AgNO₃ (0.01 M), 21.0 mL of HCl (1 M), and 3.9 mL of ascorbic acid (0.1 M) were added to 300 mL of a freshly prepared n-decanol/CTAB (13.5 mM/ 50 mM) solution at exactly 25 °C (using a water bath). Under stirring, 18 mL of the seed solution was then added, and the mixture was left undisturbed for 4 h at 25 °C. The obtained small gold nanorods were centrifuged at 14000–15000 rpm for 45–60 min using 2 mL Eppendorf tubes. The supernatant was discarded, and the precipitate was collected and redispersed in 30 mL of a CTAB (10 mM) solution. The concentrated gold nanorod solution was centrifuged again at 14000–15000 rpm for 45–60 min and the precipitate was redispersed in 30 mL of a CTAB (10 mM) solution. This step was repeated one more time. Gold concentration was fixed to 4.65 mM (abs at 400nm: 1.0, optical path: 0.1 cm) by adjusting the volume of the CTAB solution added to redisperse the small nanorods precipitated in the last centrifugation step.

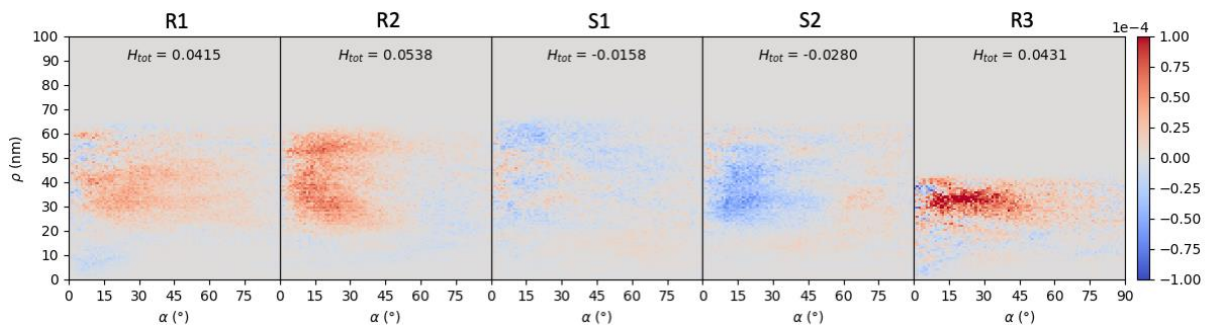
- **Gold nanorods of 29 nm in width and 130 nm in length:** In a 250 mL Erlenmeyer flask, 100 mL of n-decanol/CTAB (13.5 mM/ 50 mM), 1.0 mL of HAuCl_4 (0.05 M) and 1.5 mL of AgNO_3 (0.01 M) were mixed under magnetic stirring. The mixture was kept undisturbed for an hour at 16 °C (using a Julabo F-25 refrigerator/heating circulator). Then, 3 mL of HCl (1M), 800 μL of ascorbic acid (100 mM) and (once the mixture turned colorless) 45 μL of small gold nanorod solution were added under stirring. The mixture was kept undisturbed overnight at 16 °C for growth of gold nanorods. Finally, the obtained nanorods were centrifuged at 3000-6000 rpm (10-15 min) and redispersed in 10 mL of CTAC (10 mM). This step was repeated twice to remove excess CTAB.

Growth of chiral gold nanoparticles

- **Preparation of chiral co-surfactant/CTAC solution:** In a 50 mL glass vial, 35.55 mg of BINAMINE (35.79 mg in the case of BINOL) and 1600 mg of CTAC were weighed. Then, 50 mL of water was added, and the mixture was vigorously stirred at 60 °C until complete dissolution of the co-surfactant (ca. 3h). The solution was then allowed to cool down to room temperature before further use. The concentration of CTAC and co-surfactant were 100 mM and 2.5 mM, respectively.
- **Washing of the nanoparticles:** To properly remove impurities coming from the nanorod synthesis (e.g., Ag^+), 2 mL solution of gold nanorods used as seeds ($[\text{Au}(0)] = 10$ mM) was washed twice with 2 mL of a 10 mM CTAC (purity 99%) aqueous solution, followed by two more washes with chiral co-surfactant/CTAC solution. The nanorods were then redispersed in the chiral co-surfactant/CTAC solution (final $[\text{Au}(0)] = 10$ mM) and aged overnight prior to use. In the case of BINAMINE, a slightly supersaturated solution (maximum CTAC:BINAMINE ratio of 40, excess of 0.1- 0.2 mg/mL) was used for chiral growth, as it provided better reproducibility and higher quality chiral nanoparticles.
- **Preparation of chiral gold nanorods:** In a 2 mL Eppendorf tube, 600 μL of milli-Q water was mixed with 200 μL of ((R)- or (S)-) BINAMINE/CTAC and 10 μL of a 50 mM Au (III) solution. The mixture was vigorously shaken and allowed to rest at room temperature for five minutes to favor the complexation of Au(III) with CTAC. Then, for the preparation of samples R1, R2, S1, and S2, 13.5 μL of gold nanorod (29 nm in width and 130 nm in length) dispersion and 200 μL of ascorbic acid (0.8 M) were added to the above mixture, which was then shaken vigorously for 5-10 seconds. For R3, the amount of gold nanorod dispersion was increased to 38 μL . The solution was allowed to rest for 10–15 minutes. Finally, it was centrifuged and redispersed in 1 mL of cysteine/CTAC (2mM/10 mM) stock solution.

Bijlage E. Additionele resultaten van Au kern-schil nanostaafjes

Bij de kwantificatie van de chirale Au kern-schil nanostaafjes in Sectie 4.3 werden zowel de achterkant als de boven- en onderkant van de ET reconstructies niet mee in rekening gebracht. De achterkant werd niet meegerekend omdat de ET reconstructie in dat deel onvoldoende kwaliteit vertoont. De boven- en onderkant werden daarentegen niet meegerekend omdat de helische as daar ogenschijnlijk niet overeenkomt met de longitudinale as van de nanostaafjes. Als de helische as niet correct is voor de boven- en onderkant, dan zouden deze ongewenste artefacten introduceren in de heliceitsfunctie en totale heliceit. Het is echter niet evident om te bepalen wat de juist helische as is voor deze delen van de nanostaafjes. Ter volledigheid worden de resultaten waarbij de boven- en onderkant wel werden meegerekend daarom getoond in **Figuur E.1**. Hier kan opgemerkt worden dat de heliceitsfuncties nu meer contributies bevatten van elementen met de tegengestelde handigheid (er zijn meer linkshandige contributies in de heliceitsfuncties van rechtshandige nanostaafjes en omgekeerd).



Figuur E.1. Heliceitsfuncties en totale heliceit van de chirale Au kern-schil nanostaafjes waarbij de boven- en onderkant van de nanostaafjes wel in rekening werden gebracht.