



(12)

## BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2009 00856**

(22) Data de depozit: **23.10.2009**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30.03.2015** BOPI nr. **3/2015**

(41) Data publicării cererii:  
**29.07.2011** BOPI nr. **7/2011**

(73) Titular:  
• **UNIVERSITATEA "ȘTEFAN CEL MARE"**  
**DIN SUCEAVA, STR.UNIVERSITĂȚII NR.13,**  
**SUCEAVA, SV, RO**

(72) Inventatori:  
• **GUTT SONIA, STR.VICTORIEI**  
**NR.185 BIS, SAT SFÂNTU ILIE, SV, RO;**

• **GUTT GHEORGHE, STR.VICTORIEI**  
**NR.185 BIS, SAT SFÂNTU ILIE, SV, RO;**  
• **GUTT ANDREI, STR.VICTORIEI**  
**NR.185 BIS, SAT SFÂNTU ILIE, SV, RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:  
**EP 0326291 A1; CN 2800268 Y;**  
**WO 9522754 A1**

(54) **ECHIPAMENT PENTRU DETERMINAREA VARIAȚIEI DE  
MASĂ ȘI A GROSIMII DE STRAT**



# RO 126496 B1

1 Inventția se referă la un echipament optoelectronic, pentru determinarea variațiilor  
extrem de mici de masă și/sau de grosime activă de strat biologic, cu ajutorul rezonanței  
3 plasmonice de suprafață și constituie o aplicație de biosenzor.

În vederea determinării modificărilor masice și, implicit, a grosimii filmelor în zona activă  
5 a biosenzorilor, este folosită, la ora actuală, așa numita balanță piezoelectrică, bazată pe  
corelarea frecvenței de rezonanță a unei plăcuțe de cuarț, cu masa depusă pe cele două fețe  
7 plan paralele ale acesteia. Pe cele două fețe, se găsește depus un strat subțire de aur, iar  
peste acesta, o substanță biologic activă. La scufundarea într-un mediu biologic a plăcuței  
9 piezoelectrice, substanța activă de pe fețele plan paralele ale acesteia interacționează cu  
specia urmărită, cea din urmă fiind reținută pe cele două fețe ale plăcuței piezoelectrice, pe  
11 care o îngreunează, provocând o abatere a frecvenței de rezonanță de ordinul MHz, pentru  
creșteri de masă de ordinul mg, ceea ce asigură o rezoluție finală și o limită de detecție foarte  
13 bune ale metodei. Dezavantajul metodei balanței cu cristal de cuarț constă în prețul de cost  
relativ mare al piezooscilatoarelor aurite pe două fețe, acestea fiind elemente de uzură, putând  
15 fi refolosite un număr limitat de ori, iar lipsa standardizării dimensionale a piezooscilatoarelor  
duce la dependența de anumiți producători și, prin aceasta, implicit, la prețuri mari. La aceasta,  
17 se mai adaugă faptul că piezosenzori sunt deosebit de sensibili la variații de temperatură,  
determinări exacte necesitând termostatări avansate și scumpe, de asemenea, nu pot fi  
19 utilizați ca detectori în celule de curgere, pentru analiza continuă în by-pass, deoarece traduc  
cele mai mici variații de presiune sau de debit în indicații eronate de variație de masă ale  
21 speciei urmărite.

Tot în scopul determinării grosimii filmelor, în zona activă a biosenzorilor, mai sunt  
23 folosite aparate și echipamente bazate pe rezonanța plasmonică de suprafață (SPR), ce  
permite măsurarea unor variații de masă în domeniul  $10^{-15}$  g sau a unor grosimi de strat în  
25 domeniul nm. Tehnica folosirii rezonanței plasmonice de suprafață (SPR), pentru determinarea  
de creșteri de masă și de grosimi de strat, este relativ simplă și constă în transmiterea unei  
27 radiații monocromatice, emisă de o diodă laser sau de un LED, perpendicular pe latura unei  
prisme echilaterale din sticlă, latură care este acoperită cu un strat foarte subțire de metal  
29 (zeci de nm), de regulă, aur sau argint. Aceste metale au un nor de electroni liberi la suprafață,  
denumiți plasmoni. Fotonii de iradiere ai radiației monocromatice interferează energetic cu  
31 acești electroni, iar dacă sunt îndeplinite condițiile rezonanței, o parte din energia radiației  
monocromatice incidente este consumată, pentru menținerea stării de rezonanță, radiației  
33 reflectate lipsindu-i această energie și, ca atare, aceasta se abate cu un anumit unghi de la  
valoarea unghiului normal de reflexie. Valoarea acestui unghi de refracție este direct  
35 proporțională cu intensitatea rezonanței plasmonice de suprafață. Rezonanța plasmonică de  
suprafață are efecte și interferențe energetice și pe fața exterioară a metalului depus pe  
37 prismă, prin așa numitul câmp evanescent, orice modificare de masă extrem de mică, pe  
această față a prisme, se reflectă în modificarea condițiilor de rezonanță și se manifestă prin  
39 deplasarea peak-urilor din poziția 1 în poziția 2 (fig. 1), deplasarea acestor peak-uri fiind  
proporțională cu creșterea de masă (de grosime de strat) pe suprafața exterioară a stratului  
41 metalic. Rezonanța plasmonică de suprafață are utilizări importante în bioanalitică, în special,  
ca senzori de afinitate în analiza de interacțiune biomoleculară fără markeri (BIA), pe suprafața  
43 stratului metalic pot fi imobilizați parteneri de legare foarte diferiți. În cazul clasic, acesta este  
un anticorp orientat spre o anumită proteină pe care o leagă, rezultând produse ce provoacă  
45 creșteri masice pe suprafața metalizată a prisme, modificări care sunt sesizate prin fenomenul  
de rezonanță plasmonică, care se materializează în modificări ale unghiului de refracție al  
47 unei radiații monocromatice incidente, în funcție de masa speciei ce s-a depus pe suprafața  
exterioară a metalului de pe prismă. Spre deosebire de piezobalanță, aplicația rezonanței

# RO 126496 B1

plasmonice de suprafață poate fi extinsă și la celule de curgere, cu ajutorul acesteia putându-se urmări cinetica diferitelor aplicații biochimice. În cazul unor măsurări unice expresiile grafice se prezintă sub forma unor reprezentări în coordonate: unități ale intensității radiației reflectate ( <i>URI</i> ) în funcție de unghiul de refracție ( $\theta$ ), iar în cazul unor fenomene dinamice, măsurate prin intermediul unor celule de curgere, expresiile grafice se prezintă sub forma unor reprezentări în coordonate, unități ale intensității radiației reflectate ( <i>URI</i> ) în funcție de timpul $t$ . Dezavantajul pe care-l prezintă acest procedeu îl constituie faptul că activarea suprafeței prisme cu un ligand specific este greoaie, operația necesită de regulă demontarea, urmată de timpi de uscare, care duc la scăderea productivității procesului. De asemenea, uzura cauzată stratului de aur cu ocazia acestor manipulări duce, după un timp, la necesitatea remetalizării în vacuum a suprafeței prisme, operație care este scumpă și greoaie.	1 3 5 7 9 11
Problema tehnică pe care o rezolvă invenția constă în determinarea rapidă și precisă a creșterii grosimii de strat, la măsurări succesive independente.	13
În scopul materializării invenției, este folosită o structură modificată a aparatului clasic de rezonanță plasmonică de suprafață, astfel:	15
- în loc ca aurirea să fie realizată pe o față a unei prisme optice, aceasta se realizează pe una dintre fețele plan paralele ale mai multor lamele din sticlă optică, lamele ce au suprafața aurită egală cu cea a unei laturi a prisme. În funcție de situațiile analitice concrete, partea aurită a lamelor se tratează cu același sau cu mai mulți liganzi biologici, specifici, după care sunt fixate, pe rând, pe prisma de măsurare, folosindu-se, pentru cuplarea optică, un ulei cu indice de refracție mare;	17 19 21
- în locul unui goniometru electronic de mare precizie, echipat cu detector optic, singular, specific aparatelor clasice, ce are, ca sarcină, căutarea manuală a unghiului de refracție, obținut ca urmare a modificării rezonanței plasmonice de suprafață, este folosit un detector optoelectronic de tip diode-array, care determină indicele de refracție instantaneu, fără căutare unghiulară, cu o rezoluție foarte mare.	23 25 27
Din montajul experimental, pentru măsurători succesive și independente, fac parte o sursă de radiație monocromatică de tip diodă laser sau LED prevăzută cu un sistem de rotație fără divizare unghiulară, un detector optic de tip diode-array și o unitate de calcul cu un program de achiziție și de prelucrarea datelor, iar la măsurători continue în by-pass, mai sunt folosite suplimentar o pompă peristaltică, o celulă de curgere și furtunuri siliconice, transparente, cu diametrul interior mic. Prin aplicarea invenției, se obțin următoarele avantaje:	29 31 33
- folosirea unor plăcuțe din sticlă optică, cu fețe plan paralele, din care o față este aurită, fixate, pe o prismă din sticlă, cu un material lichid transparent, cu indice de refracție mare, dă posibilitatea folosirii succesive și rapide a mai multor lamele, pregătite, în prealabil, cu material biologic și prin aceasta crește mult productivitatea procesului de analiză;	35 37
- evitarea auririi directe a suprafeței prisme scade costurile și timpii morți, datorată nefolosirii acesteia în timpul procesului de aurire și crește totodată durata de viață a prisme optice;	39
- face posibilă folosirea aceleiași echipări a prisme atât la măsurători succesive independente, cât și la măsurători <i>in situ</i> continue, în regim de by-pass;	41
- folosirea unui detector optoelectronic de tip diode-array, în locul unui fotodetector monocelular, montat pe un sistem goniometric de precizie, duce la eliminarea celui din urmă, al cărui preț reprezintă circa 2/3 din prețul unui aparat actual de rezonanță plasmonică de suprafață. În plus un detector diode-array face posibilă preluarea instantanee a tuturor unghiurilor de refracție, eliminând timpii necesari pentru căutarea și măsurarea unghiului de refracție. De asemenea, detectorul de tip diode-array face posibilă urmărirea automată a unor cinetici chimice sau chimico-biologice.	43 45 47 49

# RO 126496 B1

1 Se dă, în continuare, un exemplu de realizare a invenției, în legătura cu fig. 1, 2 și  
3, care reprezintă:

3 - fig. 1, schema de principiu a fenomenului rezonanței plasmonice de suprafață;

5 - fig. 2, schema de principiu la folosirea echipamentului pentru determinarea variației  
de masă la măsurători succesive, independente, pe baza rezonanței plasmonice de suprafață;

7 - fig. 3, schema de principiu la folosirea echipamentului pentru determinarea variației  
de masă, la măsurători continue în regim de by-pass, pe baza rezonanței plasmonice de  
suprafață.

9 Echipamentul conform fig. 2, pentru determinarea masei (sau a grosimii de strat) sau  
a urmării variației acestor mărimi în timp, este format dintr-o prismă **1**, din sticlă optică, o  
11 lamelă **2**, din sticlă optică, având o depunere **3**, de aur subțire de înaltă puritate pe una dintre  
fețe, un strat **4**, biologic activ, depus pe stratul de aur, un strat **5**, subțire, de ulei special, cu  
13 indice de refracție ridicat, folosit pentru cuplarea prisme cu lamela din sticlă, un sistem **6** și  
**7**, de strângere, un corp **8**, o sursă **9**, de radiație monocromatică, de tip diodă laser sau LED,  
15 un detector **10**, optoelectronic, de tip diode-array, pentru măsurarea unghiului de refracție  
**6**, o unitate **11**, electronică, centrală, și o unitate **12**, de calcul, ce dispune de un soft specific  
17 pentru achiziția și prelucrarea datelor.

19 Echipamentul pentru determinarea variației grosimii de strat, conform fig. 3, este format  
dintr-o prismă **1**, optică, din sticlă, o lamela **2**, optică, având o depunere **3**, de aur subțire, de  
înaltă puritate, pe una dintre fețe, un strat **4**, biologic activ, depus pe stratul de aur, un strat  
21 **5**, subțire, de ulei special, cu indice de refracție ridicat, un sistem **6** și **7**, de strângere cu colier,  
un corp **8**, o sursă **9**, de radiație monocromatică, de tip diodă laser sau LED, un detector **10**,  
23 optoelectronic, de tip diode-array, pentru măsurarea unghiului de refracție **6**, o unitate **11**,  
electronică, centrală și o unitate **12**, de calcul, ce realizează preluarea și prelucrarea infor-  
25 mațiilor de la detectorul (**10**), optoelectronic, o celulă **13**, de curgere, un recipient sau reactor  
**14** cu speciile biologice urmărite, o pompă **15**, peristaltică, acționată cu un motor **16** electric.

# RO 126496 B1

## Revendicare

	1
Echipament pentru determinarea variației masei și a grosimii de strat, alcătuit dintr-o sursă (9) de radiație monocromatică de tip diodă laser sau LED, o prismă optică (1), un detector (10) optoelectronic de tip diode-array, pentru măsurarea unghiului de refracție, o unitate (11) electronică centrală și o unitate (12) de calcul ce realizează preluarea și prelucrarea informațiilor de la detectorul (10) optoelectronic, <b>caracterizat prin aceea că</b> , în vederea măsurării succesive, independente, a creșterii de masă sau de grosime de strat activ la biosenzori, este folosită o structură bazată pe fenomenul de rezonanță plasmonică de suprafață, în care prisma (1) optică este lipită, prin intermediul unui strat (5) subțire de ulei, cu indice de refracție ridicat, de o lamelă (2) din sticlă optică pe care este depus un strat (3) subțire din aur pur, iar pe acesta, un strat (4) subțire din material biologic activ, <b>și prin aceea că</b> , în cazul folosirii structurii pentru măsurări continue a grosimii de strat, este montată o celulă (13) de curgere, alimentată de o pompă (15) peristaltică, legată în by-pass cu un recipient sau un reactor (14) ce conține materialul biologic analizat.	3 5 7 9 11 13 15

(51) Int.Cl.  
**G01N 21/43** (2006.01),  
**G01N 21/55** (2006.01),  
**G01B 7/06** (2006.01)

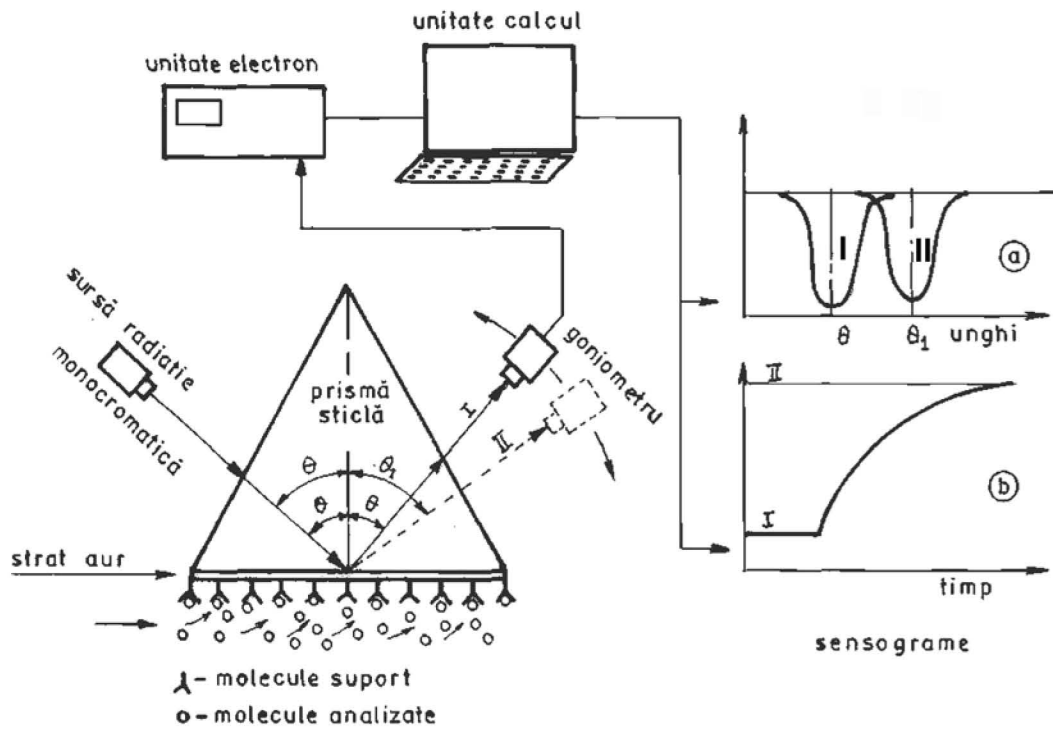


Fig. 1

(51) Int.Cl.  
**G01N 21/43** (2006.01);  
**G01N 21/55** (2006.01);  
**G01B 7/06** (2006.01)

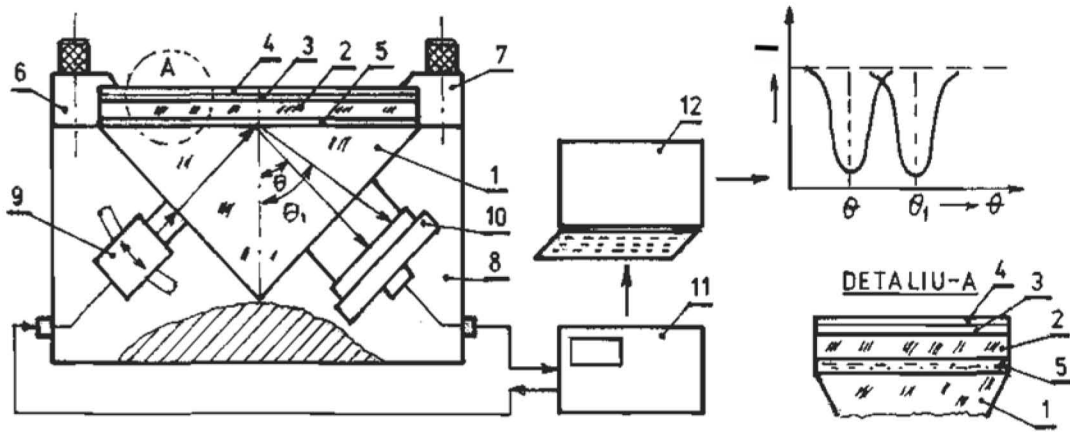


Fig. 2

(51) Int.Cl.  
**G01N 21/43** (2006.01),  
**G01N 21/55** (2006.01),  
**G01B 7/06** (2006.01)

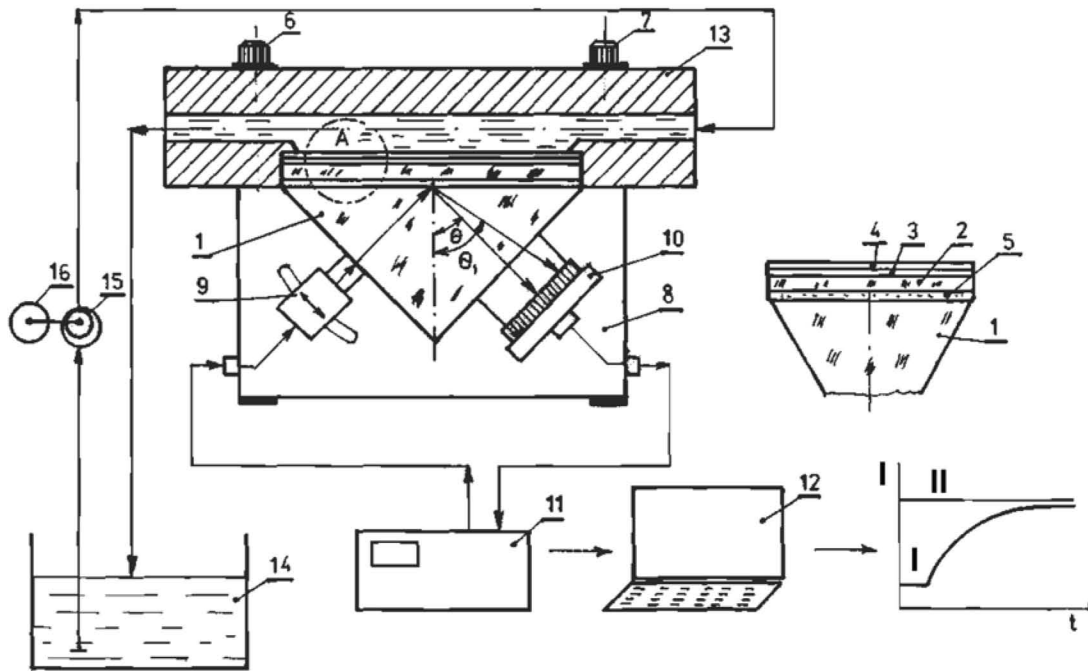


Fig. 3



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM  
 Tipărit la: Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci  
 sub comanda nr. 129/2015