



(12)

## CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2018 00958**

(22) Data de depozit: **25/01/2019**

(41) Data publicării cererii:  
**28/06/2019** BOPI nr. **6/2019**

(71) Solicitant:

- UNIVERSITATEA "BABEŞ-BOLYAI" DIN CLUJ-NAPOCA, STR.MIHAIL KOGĂLNICEANU NR.1, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
- INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU TEHNOLOGII IZOTOPICE ȘI MOLECULARE, STR.DONAT NR.67-103, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO

(72) Inventatori:

- FOCŞAN MONICA, STR.LUNII, NR.14, AP.19, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
- CÂMPU ANDREEA, STR.RAHova, NR.10, SC.B, ET.3, AP.34, SIBIU, SB, RO;
- AŞTILEAN SIMION, CALEA MANĂSTUR, NR.99, AP.39, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
- MURARIU TEODORA, STR. CERNĂUȚI, NR.17-21, BL.E, AP.7, CLUJ NAPOCA, CJ, RO;
- TURCU IOAN, STR.TITU MAIORESCU, NR.7, AP.4, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO

(54) **DISPOZITIV MICROFLUIDIC PLASMONIC PE BAZĂ DE NANOPARTICULE BIPIRAMIDICE DE AUR**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui dispozitiv microfluidic plasmonic utilizat în domeniul biosenzoristicii. Procedeul, conform invenției, constă în integrarea în interiorul unui canal microfluidic de polidimetilsiloxan a unui film nanoparticulat format pe un substrat de sticlă aminosilanizată printr-un proces de autoasamblare de nanoparticule de formă piramidală

din Au, disponibile în soluție apoasă cu proprietăți optice și capacitate senzoriale controlabile, dispozitivul rezultat fiind corespunzător pentru detectia și identificarea simultană în timp real a moleculelor de interes.

Revendicări: 5

Figuri: 7

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozitivelor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de inventie a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de inventie este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).



## DESCRIEREA INVENTIEI

48

OPICIUL DE STAT PENTRU INVENTII SI MARC
Cerere de brevet de inventie
Nr. .... A 2018 00 958
Data depozit 25 -01- 2019

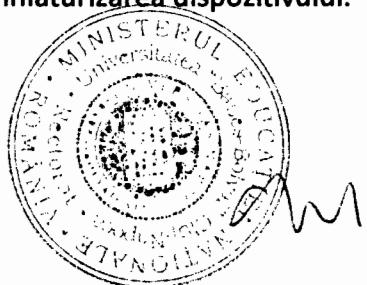
Prezenta inventie cu titlul *Dispozitiv microfluidic plasmonic pe bază de nanoparticule bipiramidice de aur* se referă la o metodă originală de fabricare a unui dispozitiv miniaturizat cu aplicabilitate în domeniul biosenzoristicii, realizat prin integrarea în interiorul unui canal microfluidic din polidimetilsiloxan (PDMS) a unui film nanoparticulat format din nanoparticule de formă bipiramidală din aur (AuBPs). Metoda de fabricare și natura nanomaterialelor plasmonice utilizate în realizarea dispozitivului asigură pe de o parte circulația continuă în flux laminal a unui fluid biologic și pe de altă parte posibilitatea de a înregistra semnale optice specifice (spectre) care traduc prezența și identitatea moleculelor de interes (bioanalizați și biomarkeri) din fluidul biologic.

**Noutatea inventiei** constă în utilizarea pentru prima dată în canale microfluidice de elemente trasductoare plasmonice de tipul nanoparticulelor de aur de formă bipiramidală, care prin forma lor particulară permit implementarea simultană în timp real a două metode de sensing, una pentru detecția de material biologic molecular sau macromolecular atașat la suprafața nanoparticulelor prin Rezonanță Plasmonică de Suprafață Localizată (engl. Localized Surface Plasmon Resonance - LSPR) și cealaltă metodă pentru identificare moleculară prin amprenta spectrală a fiecărei molecule dată de Spectroscopia Raman Amplificată de Suprafață (engl. Surface-Enhanced Raman Spectroscopy -SERS).

Miniaturizarea, portabilitatea, identificarea rapidă și precisă a agentilor patogeni califică inventia propusă pentru implementare în aplicații biomedicală de detecție, identificarea și inactivarea agentilor patogeni în mediul spitalicesc sau în alte aplicații de biosenzoristică de interes.

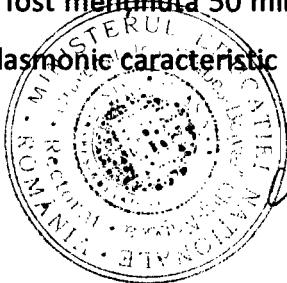
În acest context, dezvoltarea unui asemenea biosensor plasmonic integrat în dispozitiv microfluidic prezintă un potențial real prin:

- Timp de analiză scăzut în interiorul canalului microfluidic.
- Volum de probă redus folosit pentru detecție în canal microfluidic.
- Abilitatea dispozitivului de a investiga în timp real.
- Portabilitatea dispozitivului.
- Miniaturizarea dispozitivului.



- Automatizarea necesară manipulării fluxului de lichid biologic investigat, evitând contaminarea probei.
- Posibilitatea de a detecta simultan multiple molecule de interes în canal microfluidic .
- Nanoparticulele bipiramidice de aur prezintă de asemenea un grad ridicat de stabilitate structurală și chimică în diferite fluide biologice, ca urmare pot fi implementate direct în aplicații specifice de biosenzoristică.
- Nanoparticulele de formă bipiramidică generează la extremități câmpuri electromagnetice intense (hot-spot) pentru implementarea detecției prin spectroscopie Raman amplificată de suprafață (SERS).
- Introducerea unor proceduri neinvazive sau putin invazive pentru detecția specifică de analiți de interes.
- Efectuarea de analize rapide și ultrasensibile.
- Investigarea în timp real în fluide biologice.

Primul pas pentru fabricarea dispozitivului microfluidic plasmonic a fost acela de a sinteza AuBPs în soluție apoasă prin procesul chimic de creștere asistată de germenii (eng. seed-mediated growth approach) bazat pe reacția de reducere a ionilor de aur în prezența unui agent reducător, putându-se astfel obține AuBPs cu răspunsul optic controlat între domeniul vizibil și cel infraroșu apropiat, prin manipularea raportului de aspect al AuBPs. Sinteza constă în doi pași: i) prepararea germenilor și ii) prepararea soluției de creștere (*Nanotechnology 2012, volumul 23 145707*). Pe scurt, 1 M de clorură aurică a fost adăugat în 25 % wt soluție de clorură de cetiltrimetilamoniu (CTAC), 0.25 M acid nitric, 50 mM borohidrură de sodiu și 1 M de acid citric, utilizate pentru reducerea ionilor de aur și stabilizarea germenilor. Reacțiile s-au realizat la temperatura camerei prin agitare puternică. Soluția finală s-a păstrat la 80 °C, timp de 90 minute. 45 µL din germenii rezultați au fost adăugați soluției de creștere formată din agentul stabilizator bromura de cetiltrimetilamoniu (CTAB) 45 mM, 25 mM clorură aurică, 5 mM ioni de argint și 0.4 M hidroxichinolină (HQL). Mixtura a fost menținută 50 minute la 40 °C. Astfel, am obținut AuBPs în soluție apoasă cu răspuns plasmonic caracteristic nanostructurilor anizotrope ce prezintă o bandă plasmonică



transversală la 515 nm datorată oscilațiilor transversale ale electronilor de suprafață și o bandă la 776 nm datorată oscilațiilor longitudinale ale electronilor de suprafață. Figura 1A prezintă spectrul de extincție al AuBPs înregistrat cu ajutorul unui spectrofotometru Jasco V 670 UV-VIS NIR cu rezoluție spectrală de 1 nm. Morfologia AuBPs a fost investigată prin microscopie electronică în transmisie (TEM, Figura 1B) cu ajutorul căruia am stabilit dimensiunea nanostructurilor ca fiind  $85 \pm 2.3$  nm lungime și  $26 \pm 4.1$  nm lățime. Pentru determinarea monodispersității soluției, precum și distribuției dimensionale și morfologice a AuBPs s-a folosit microscopul de înaltă rezoluție FEI Tecnai F20, ce funcționează cu un voltaj de 200 kV și este echipat cu o cameră CCD Eagle 4k. Dimensiunea obținută prin analiza imaginilor TEM a fost confirmată și prin măsurarea diametrului hidrodinamic al nanoparticulelor prin tehnica de împrăștiere dinamică a luminii (DLS, Dynamic Light Scattering) cu ajutorul instrumentului Malvern Zetasizer Nano-ZS 90 la temperatura camerei de  $25^{\circ}\text{C}$  (Figura 1C). În vederea autoasamblării controlate a AuBPs pe substrate solide de sticlă, acestea au fost suspuse unei centrifugări la 8000 RPM timp de 15 min fiind redispersate în apă ultra-pură pentru a îndepărta excesul de reactanți rămași în urma procesului de sinteză.

Așadar, mai departe am fost interesați în realizarea autoasamblării a AuBPs sintetizate în soluție coloidală pe un substrat de sticlă într-o manieră controlată și reproductibilă, prin dezvoltarea unui protocol de depunere a acestora pe substrate de sticlă. În mod specific, substratele de sticlă au fost spălate folosind detergent alcalin, apă ultra-pură, acetonă și metanol și au fost supuse unui tratament în ozon. Apoi, aşa cum este ilustrat schematic în Figura 2, substratele au fost imersate pentru 24 h la temperatura camerei în soluție etanoică de (3-aminopropil)-triethoxsilan (APTES) 10%. Excesul de APTES a fost îndepărtat folosind etanol, iar substrațele au fost lăsate la uscat la temperatura camerei, urmând ca 300  $\mu\text{l}$  de coloid să fie picurați pe substratul de sticlă.

În urma imobilizării pe substrat, răspunsul optic al AuBPs își păstrează forma benzii plasmonice longitudinale din soluție, acesta fiind prezentat în Figura 3A. În plus, o nouă bandă plasmonică apare în spectru, la lungimi de undă mai mari în jur de 825 nm, bandă ce este atribuită asamblării controlate a AuBP sub formă de lanțuri. Demonstrarea reproductibilității nanoplatformei platformice a fost confirmată prin colectarea spectrelor de extincție în diferite poziții pe același substrat plasmonic, spectre ce prezintă un răspuns



plasmonic similar. Imobilizarea AuBP atât individuale cât și sub formă de lanțuri este confirmată și de imaginea electronică de baleaj (SEM) prezentată în Figura 3B, utilizând un microscop electronic de baleaj FEI Quanta 3D FEG precum și prin microscopie de forță atomică (AFM), prezentată în Figura 3C cu ajutorul unui sistem Witec alpha 300Asystem.

Ulterior am fabricat sistemul de microcanale în care se va realiza interfața între fluidul ce conține analitul de interes investigat și componenta senzoristică formată de AuBPs imobilizate și prezente anterior. Ca urmare, am demarat fabricarea de canale microfluidice și integrarea biosenzorilor plasmonici în aceste dispozitive. În mod specific, dispozitivele microfluidice au fost fabricate prin legarea polydimethylsiloxane (PDMS) - transparent din punct de vedere optic- de componenta plasmonică printr-o procedură ce constă în replicare prin folosirea unei măști comerciale achiziționate de la BlackHole Lab. Masca folosită conține un canal cu o lățime de 50  $\mu\text{m}$  și o adâncime de 50  $\mu\text{m}$ . PDMS-ul obținut în urma amestecării unei baze polimerice cu un agent de întărire în raport de 10:1 este turnat peste mătriță și tratat la 65°C timp de 1 oră. După tratament, microcanalul a fost îndepărtat de pe mătriță iar PDMS-ul și componenta plasmonică au fost tratate în plasmă cu ajutorul sistemului Tetra 30 PC/PPCE la o presiune constantă de 0,2m Bar și o putere de 60 W din totalul de 300 de W al generatorului de RF de 13,56 MHz timp de 40 secunde. Imediat după această procedură cele două componente au fost aduse în contact pentru a crea o legătură permanentă (*Lab. Chip 2005 5 1173-1177*). Schema ilustrativă a dispozitivului microfluidic plasmonic astfel obținut este prezentat în Figura 4 și prezintă integrarea în interiorul canalului microfluidic de polidimetilsiloxan (PDMS) (3) a unui film nanoparticulat format pe un substrat de sticlă aminosilanizată (1). De asemenea, imaginea optică a dispozitivului microfluidic plasmonic final fabricat este ilustrată în Figura 5.

În vederea utilizării ulterioare a dispozitivului microfluidic plasmonic ca și nanosensor plasmonic integrat, mai departe am investigat sensibilitatea bulk (S) la modificarea indicelui de refracție al mediului de dispersie (RI). În general, sensibilitatea S a unei nanostructuri plasmonice este dependentă de forma, dimensiunea, precum și de compoziția materialului și se definește prin deplasarea valorii lungimii de undă a peak-ului LSPR în funcție de indicele de refracție a mediului înconjurător (*J. Chem. Sci, 2003, 115, 147-154*). Cu acest scop am preparat diferite concentrații de glicerol (0%, 20%, 40%, 60% și 80%) cu diferenți indici de refracție pe care ulterior le-am injectat în interiorul canalului microfluidic cu ajutorul unei



siringi NE-4000 NEW Era prin tubul PTFE (Elveflow). În urma înregistrării spectrelor UV-Vis-NIR înregistrate sub microscopul inversat Zeiss Axio Observer Z1 utilizând un spectrofotometru portabil Ocean Optics 4000, s-a observat că banda plasmonică longitudinală a AuBPs se deplasează spre valori mai mari odată cu creșterea indicelui de refracție. Prin plotarea valorii benzii plasmonice longitudinale în funcție de indicele de refracție utilizat am putut determina prin analiza lineară de regresie indicele de sensibilitate bulk de 243 nm/ unitate de indice de refracție ( $S = 243 \text{ nm/RIU}$ ) cu un coeficient de determinare ( $R^2$ ) de 0.997. În acest context, dispozitivul dezvoltat prezintă un potențial crescut pentru a fi utilizat ca senzor LSPR integrat.

În final, dispozitivul microfluidic plasmonic a fost testat pentru detecția duală LSPR-SERS în timp real a analitului de interes, molecula para-aminotiofenol (p-ATP) un bine cunoscut și studiat reporter Raman al cărui spectru vibrațional nu interferează cu spectrul caracteristic al PDMS-ului, astfel identificarea acestuia din spectrul compus nu reprezintă un risc (Figura 7). Cele două tehnici de detecție ultrasensibilă oferă informații complementare, pe de o parte privind atașarea moleculelor pe suprafața AuBPs (prin modificarea indicelui de refracție al mediului din jurul nanoparticulelor, ceea ce determină deplasarea LSPR spre lungimi de undă mai mari) și pe de altă parte privind identificarea moleculei și orientarea acesteia față de suprafața AuBPs, prin analiza spectrului SERS. Astfel, o soluție stock concentrată de p-ATP de  $10^{-5} \text{ M}$  a fost utilizată pentru a pune în evidență capacitatea de detecție a dispozitivului. În acest context s-a dezvoltat un sistem experimental ce permite detecția în flux continuu format din două siringi automatizate, una pentru injectarea analitului în interiorul canalului microfluidic cu o rată de infuzie de  $1 \mu\text{L} / \text{min}$  și una pentru colectarea controlată a probei.

Menționăm faptul că AuBPs prezintă capacități senzoristice remarcabile datorită benzilor de extincție mai înguste ce permit distingerea unei deplasări spre lungimi de undă mai mari indusă de o mică modificare a indicelui de refracție a mediului în imediata apropiere a nanostructurii, asigurându-le astfel sensibilitate LSPR crescută. Mai mult decât atât, datorită formei, acestea prezintă un câmp electromagnetic localizat concentrat la vârfurile ascuțite ale celor două capete, astfel încât se observă o amplificare a acestuia, AuBPs dovedindu-se a fi substrate SERS eficiente și ultrasensibile.



Astfel, soluția de p-ATP a fost injectată în dispozitivul microfluidic plasmonic fabricat, care datorită grupării active thiol (-SH) se leagă covalent de suprafețele de aur rămase expuse. Spectrele de extincție înregistrate după grefarea cu p-ATP (Figura 7A) arată o deplasare spre lungimi de undă mai mari ca urmare a modificării indicelui de refracție al mediului învecinat nanostructurilor, indicând detectarea cu succes a moleculei de p-ATP.

Informații suplimentare, privind identitatea moleculei de p-ATP atașate de suprafața nanoparticulelor bipiramidice de aur sunt furnizate de spectrele SERS achiziționate (Figura 7B) cu spectrometrul Raman portabil Raman Systems R3000CN echipat cu o diodă laser la 785 nm ca sursă de excitație. Identificarea spectroscopică și atribuirea benzilor p-ATP s-a făcut în acord cu datele din literatură (*S. Chem. Phys. Lett.* 2006 422 (1-3) 127-132), asigurând identificarea moleculei prin evidențierea benzilor acesteia vibraționale caracteristice, situate la 1079 și 1585 cm<sup>-1</sup> datorită vibrațiilor de întindere C-S, respectiv, C-C, demonstrând detecția cu succes a moleculelor de p-ATP în flux laminar datorită amplificării semnalului de către câmpul electromagnetic generat de AuBPs.



## DESENE

**Figura 1.** Spectrul de extincție UV-Vis-NIR al nanobipiramidelor de aur sintetizate în soluție coloidală (A), împreună cu o imagine reprezentativă de microscopie electronică în transmisie (TEM) (B) și analiza de împrăștiere dinamică a luminii (DLS) corespunzătoare nanobipiramidelor de aur sintetizate (C).

**Figura 2.** Schemă ilustrativă a procesului de autoasamblare controlată de nanobipiramide de aur sintetizate în soluție coloidală pe un substrat de sticlă prefuncționalizat cu (3-Aminopropyl) triethoxysilane (APTES).

**Figura 3.** Demonstrarea reproductibilității nanoplatormei plasmonice prin colectarea spectrelor de extincție în diferite poziții (A) împreună cu imagini reprezentative de microscopie electronică în baleaj (SEM) (B) și microscopie de forță atomică (AFM) (C).

**Figura 4.** Schema ilustrativă a dispozitivului microfluidic plasmonic obținut prin integrarea în interiorul canalului microfluidic de polidimetilsiloxan (PDMS) (3) a unui film nanoparticulat format pe un substrat de sticlă aminosilanizată (1) printr-un procedeu de autoasamblare de nanoparticulelor bipiramidice de aur (2) disponibile în soluție apoasă.

**Figura 5.** Imagine optică a dispozitivului microfluidic plasmonic final fabricat.

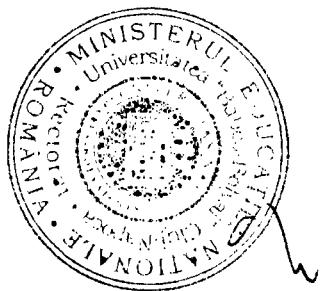
**Figura 6.** Curba de regresie lineară care determină indicele de sensibilitate bulk luând în considerare banda longitudinală LSPR a bipiramidelor asamblate pe substrat.

**Figura 7.** Testarea dispozitivului microfluidic plasmonic fabricat prin detectarea duală LSPR (A) și SERS (B) a moleculei de analit p-ATP în flux laminar.

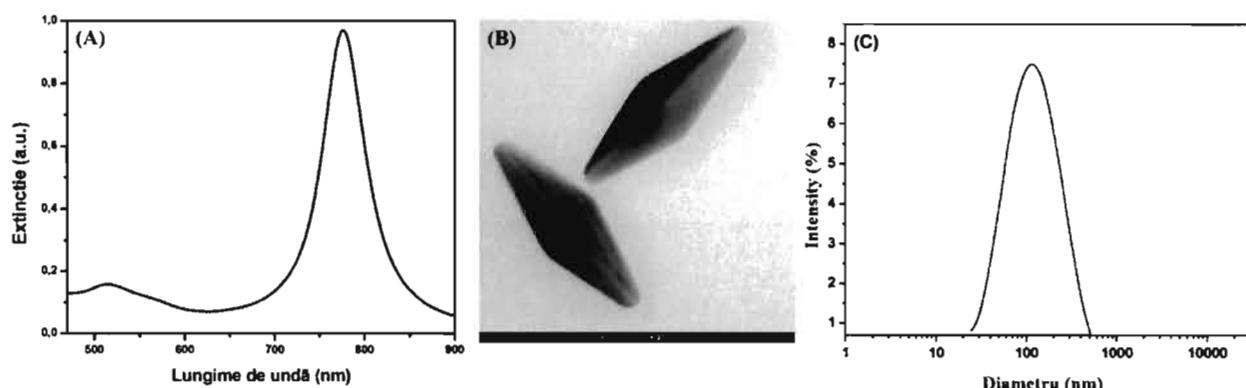


## REVENDICĂRI

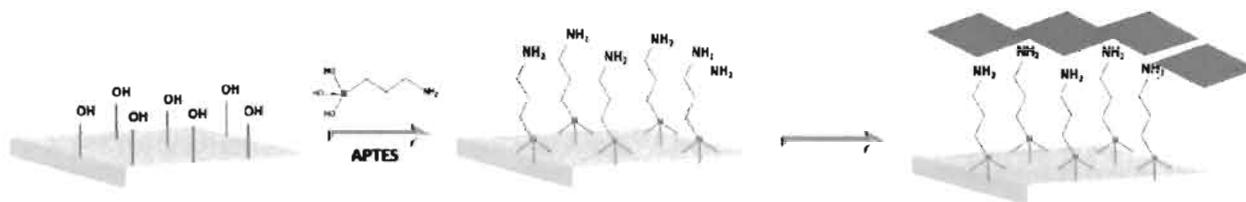
1. Dispozitiv microfluidic plasmonic pe bază de nanoparticule bipiramidice de aur alcătuit dintr-un substrat de sticlă aminosilanizată pe care se asamblează controlat un film de nanoparticule bipiramidice de aur pentru a fi integrat într-un circuit microfluidic de polidimetilsiloxan (PDMS) caracterizat prin aceea că filmul de nanoparticule prezintă un grad ridicat de stabilitate structurală și chimică în diferite fluide biologice;
2. Dispozitiv microfluidic plasmonic pe bază de nanoparticule bipiramidice de aur conform cu revendicarea 1, caracterizat prin aceea că nanoparticule de formă bipiramidică generează rezonanțe plasmonice (LSPR) individuale intense la lungimi de undă mari (NIR) în zona de sensibilitate maximă;
3. Dispozitiv microfluidic plasmonic pe bază de nanoparticule bipiramidice de aur conform cu revendicarea 1, caracterizat prin aceea că metoda de autoasamblare asigură o bandă transversală și longitudinală LSPR îngustă și reproductibilă datorată nanoparticulelor bipiramidice de aur individuale și o bandă LSPR datorată asamblării liniare a acestora;
4. Dispozitiv microfluidic plasmonic pe bază de nanoparticule bipiramidice de aur conform cu revendicarea 1, caracterizat prin aceea că nanoparticule de formă bipiramidică generează la extremități câmpuri electromagnetice intense (hot-spot) pentru implementarea detecției prin spectroscopie Raman amplificată de suprafață (SERS);
5. Dispozitiv microfluidic plasmonic pe bază de nanoparticule bipiramidice de aur conform cu revendicarea 1, caracterizat prin aceea că dispozitivul permite implementarea a două metode de detecție în circuit microfluidic, LSPR și SERS.



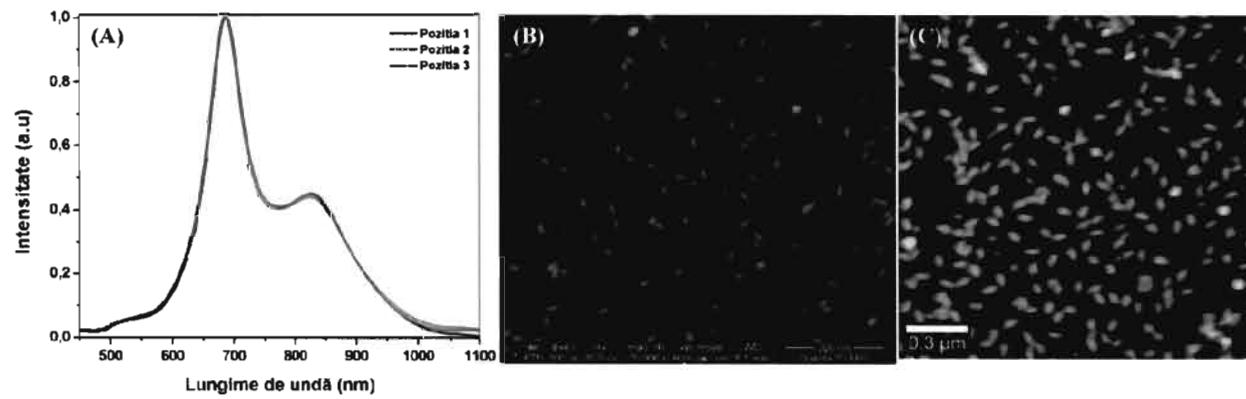
A handwritten signature in black ink, appearing to read "Ivan" or a similar name.



**Figura 1.**



**Figura 2.**



**Figura 3.**



### Dispozitiv microfluidic plasmonic

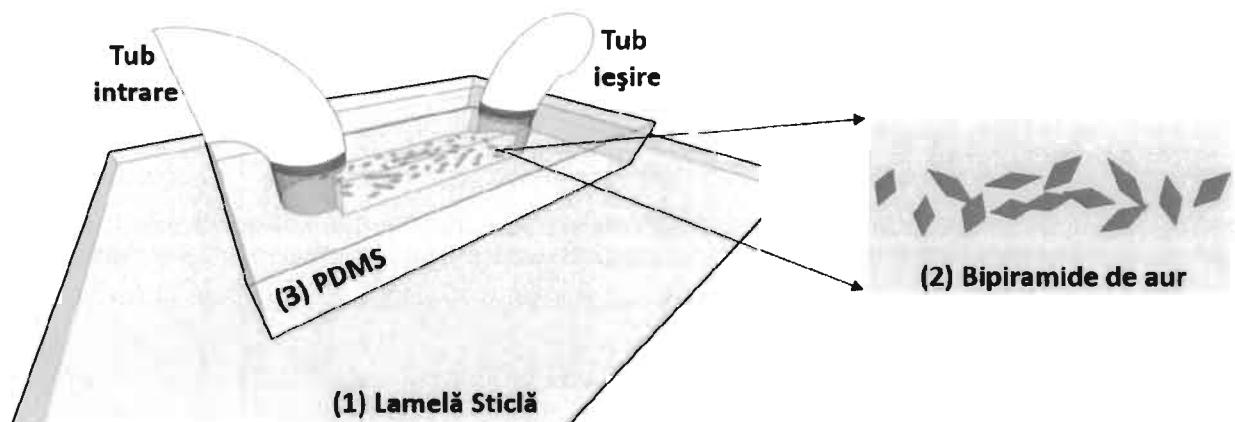


Figura 4.

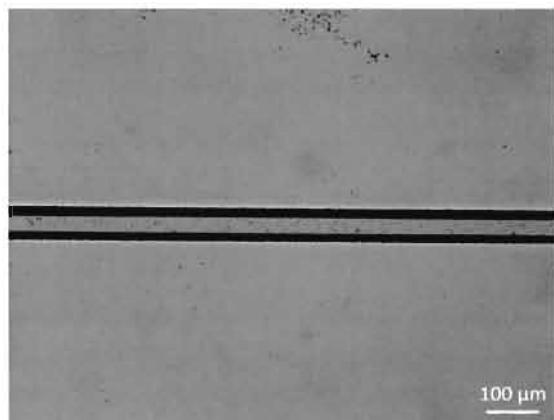


Figura 5.



10

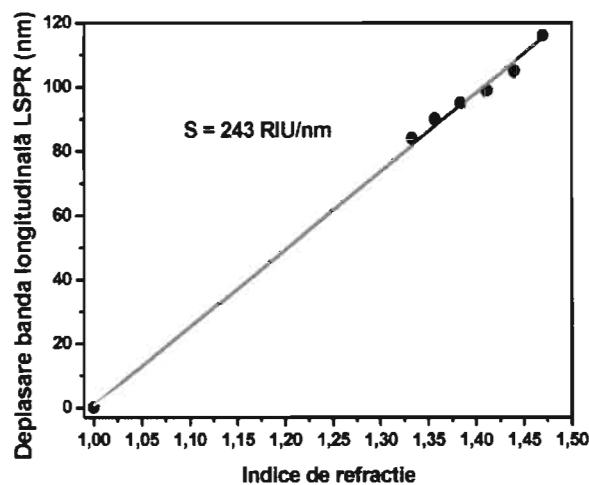


Figura 6.

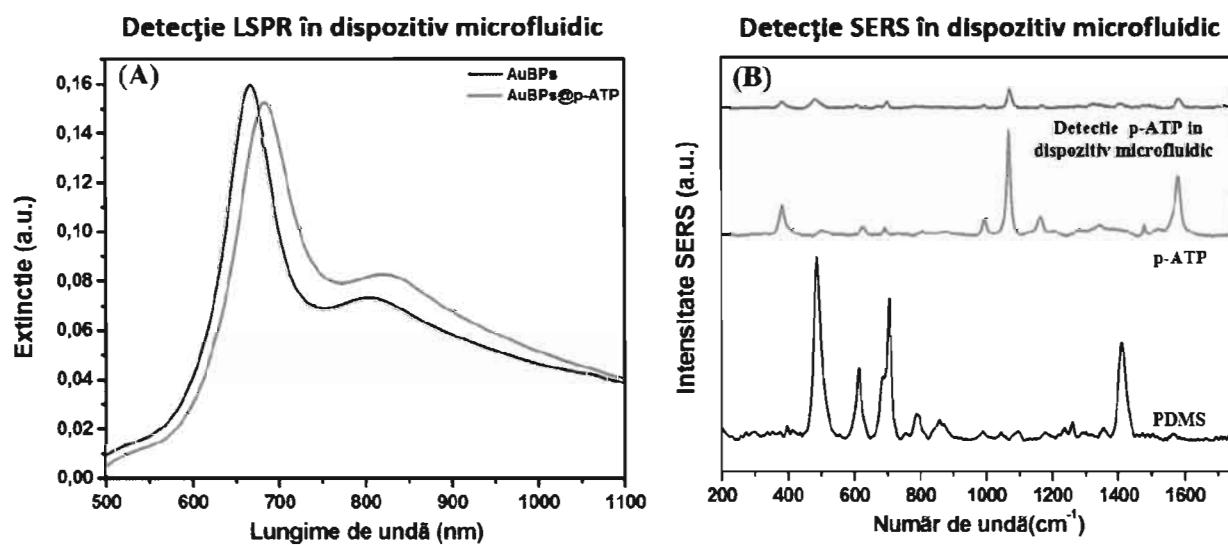


Figura 7.

