



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2018 00976

(22) Data de depozit: 28/11/2018

(41) Data publicării cererii:  
30/06/2020 BOPI nr. 6/2020

(71) Solicitant:  
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE  
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU  
TEHNOLOGII IZOTOPICE ȘI  
MOLECULARE, STR.DONAT NR.67-103,  
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;  
• UNIVERSITATEA "BABEȘ-BOLYAI" DIN  
CLUJ-NAPOCA,  
STR.MIHAIL KOGĂLNICEANU NR.1,  
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO

(72) Inventatori:  
• DINA NICOLETA ELENA,  
STR.ȘESUL DE SUS NR.11B, FLOREȘTI,  
CJ, RO;

• COLNIȚĂ ALIA, STR.URUȘAGULUI  
NR.19A, FLOREȘTI, CJ, RO;  
• MARCONI SORIN DANIEL,  
STR.PRICAZULUI, BL.35, AP.3, ORĂȘTIE,  
HD, RO;  
• SZOKE-NAGY TIBERIU,  
STR.IOSIF VULCAN NR.3, AP.1, BISTRIȚA,  
BN, RO;  
• GHERMAN ANA-MARIA RALUCA,  
STR.CORNELIU COPOSU NR.171, BL.C2,  
AP.56, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;  
• LEOPOLD NICOLAE, STR.ALMAȘULUI  
NR.5, AP.13, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;  
• ȘTEFANCU ANDREI, SAT MÎNĂSTIRENI,  
COMUNA UNȚENI, BT, RO

(54) **PROCEDEU DE DETECȚIE PRIN SPECTROSCOPIE RAMAN  
AMPLIFICATĂ DE SUPRAFAȚĂ (SERS) ÎNTR-UN SISTEM  
DE CURGERE MICROFLUIDIC UTILIZÂND UN SPOT  
DE ARGINT CA SUBSTRAT AMPLIFICATOR SERS**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de detecție în timp real a unor microorganisme, în particular bacterii, prin spectroscopie Raman amplificată de suprafață (SERS), într-un sistem microfluidic închis, prin utilizarea ca substrat SERS amplificator a unui spot de argint, sintetizat *in situ*, sub acțiunea unei radiații laser cu lungime de undă de 532 nm. Procedeu de detecție, conform invenției, cuprinde următoarele etape:

1. asamblarea celulei microfluidice alcătuită dintr-o placă de plexiglas pe suprafața căreia a fost gravat un sistem de canale microfluidice cu joncțiune de tip Y care cuprinde două intrări și o ieșire, cele două intrări fiind conectate, prin intermediul unor tuburi capilare, la câte o seringă cu soluție de  $AgNO_3$  și citrat de Na, iar ieșirea fiind conectată la un furtun pentru evacuarea analiților și a probei biologice, celula de plexiglas fiind acoperită ermetic cu o lamă de microscop și sigilată prin acoperirea cu un capac metalic prins în șuruburi,  
2. poziționarea celulei microfluidice pe masa unui microscop și focalizarea obiectivului, cu mărirea de 20

de ori, în interiorul canalului microfluidic, în locul în care se dorește formarea spotului de Ag,

3. setarea parametrilor de curgere, în pompa de injecție cu seringi: debitul de 0,25 ml/min, diametrul seringilor 12,97 mm și volumul debitat 5 ml,

4. setarea puterii laserului la valoarea de 5 mW,

5. pornirea concomitentă a laserului și pompei cu seringi, etapă în care are loc umplerea canalului microfluidic cu cele două componente, iar sub acțiunea laserului are loc reducerea Ag la  $Ag^0$  și apariția spotului de Ag cu proprietăți de amplificare SERS,

6. injectarea probei de bacterii test pentru a demonstra protocolul de detecție și

7. înregistrarea de spectre SERS și optimizarea detecției prin determinarea timpului de achiziție și a puterii laser care să mențină viabilitatea probei biologice de testare.

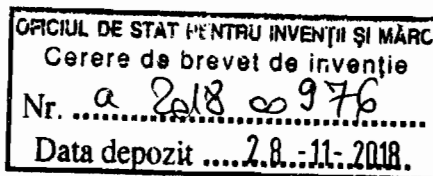
Revendicări: 3

Figuri: 6

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



36



a) Titlu

**PROCEDEU DE DETECȚIE PRIN SPECTROSCOPIE RAMAN AMPLIFICATĂ DE SUPRAFAȚĂ (SERS) ÎNTR-UN SISTEM DE CURGERE MICROFLUIDIC UTILIZÂND UN SPOT DE ARGINT CA SUBSTRAT AMPLIFICATOR SERS**

b) **Precizarea domeniului tehnic în care poate fi folosită invenția**

Invenția se referă la un procedeu de detecție în timp real a microorganismelor, în particular a bacteriilor Gram-pozitive și Gram-negative, prin spectroscopie Raman amplificată de suprafață (SERS), într-un sistem microfluidic închis, utilizând ca substrat SERS amplificator un spot de argint, sintetizat *in situ* în interiorul canalului microfluidic. Procedeu propus va putea fi aplicat cu scopul detecției în timp real a microorganismelor patogene și nepatogene, utilizând un spectrometru Raman portabil. Procedeu pe care îl propunem își găsește numeroase aplicații în domeniul de biosenzoristică și detectarea în timp real a probelor biologice contaminate cu bacterii Gram pozitive sau Gram negative.

c) **Indicarea stadiului anterior al tehnicii și indicarea documentelor care stau la baza acestuia**

Detecția de sisteme sau organisme biomoleculare prin spectroscopie Raman amplificată la suprafață (SERS) a devenit o metodă populară de detecție în ultima decadă datorită ultrasensibilității sale, a limitei joase de detecție (concentrații mici ai analiților) și specificității de care dă dovadă. Spectroscopia SERS se bazează pe fenomenul de amplificare cu câteva ordine de mărime a semnalului, în cazul moleculelor Raman active, atunci când acestea se află în vecinătatea unei suprafețe metalice (de obicei aur, argint, aluminiu) nanostructurate. Această amplificare se datorează câmpului electric puternic localizat de plasmoni de suprafață care în apropierea analitului, furnizează un factor de amplificare care poate ajunge la  $10^{11}$  și care e dependent de anumiți factori (forma, dimensiunea, orientarea, porozitatea, natura materialului nanostructurat sau tipul substratului pe care a fost depus materialul activ SERS) [1-3].

Recent, sistemele microfluidice au început să fie încorporate în cadrul experimentelor de detecție Raman cu aplicații în lumea reală, datorită atributelor sale, cum ar fi modul controlat și flexibil de manipulare a lichidelor, particulelor în diferite suspensii, îmbunătățirea mobilității probei sau scăderea volumului de probă necesar dar și a compatibilității mari cu spectroscopia Raman. Astfel, detecția, monitorizarea și analiza prin spectroscopie Raman a unei game largi de probe devine mai precisă [4]. În particular, utilizarea integrativă ale sistemelor microfluidice și cele SERS e favorizată de (i) posibilitatea creării unor probe cu volume mici, (ii) pentru a controla modul de interacțiune substrat SERS – analit în timpul măsurătorilor SERS, (iii) a distanței nanomaterial-analit pentru a maximiza semnalul SERS [5, 6], (iv) eliminarea problemei timpilor diferiți de amestec, (v) problema de încălzire locală sau (vi) fotodisocierea [7, 8]. Pe de o parte, măsurătorile SERS sunt mult simplificate, deoarece etapele experimentale realizate anterior în laborator, de către personal pregătit sunt acum automatizate, reproductibile și realizabile cu

38

probe în cantități micrometrice. Pe de altă parte, platformele microfluidice au nevoie de metode de detecție ultrasenzitive, la nivel de o singură moleculă și în volume mici, iar SERS întrunește toate aceste caracteristici [9].

În momentul de față, atât substraturi SERS coloidale de Ag sau Au, cât și nanosuprafețe solide obținute prin metode de fabricație convenționale sau sofisticate au fost integrate în canale microfluidice de diverse dimensiuni și geometrii. Printre substraturile SERS sintetizate chimic se numără și spoturile de Ag [10, 11] care pot fi utilizate de mai multe ori datorită posibilității de spălare și îndepărtare a analitului organic, fără a distruge puterea de amplificare SERS. În ceea ce privește detecția SERS de microorganisme într-un sistem microfluidic, folosind un spot de argint sintetizat *in situ* ca și substrat amplificator SERS, la ora actuală, nu există nicio referire, atât pe plan național cât și internațional.

Câteva exemple de detecție prin spectroscopie optică în canale microfluidice sau de fabricare și utilizare a celulelor microfluidice pentru detecție și caracterizare sunt descrise în câteva brevete interne și internaționale. Brevetul de invenție **WO2017164815A1** în care este revendicat un biosenzor microfluidic și utilizarea SERS pentru detectarea analiților individuali și / sau multipli. Biosenzorul include un substrat activ SERS și un dispozitiv de circuit microfluidic aranjat pentru a fi în comunicare cu fluidul substratului activ SERS. Sunt de asemenea furnizate metoda de fabricare a unui biosenzor și metodele de detectare a unui analit folosind biosenzorul, în care analitul poate fi haptoglobină.

Brevetul de invenție **US9546958B2** se referă la imagistică moleculară multiplexată, detectare moleculară de mare rezoluție prin SERS, pe o suprafață flexibilă, non-plasmonică, fără transfer de molecule în fază de soluție pe suprafețe nanopaternate. Această invenție prezintă o abordare fizică cu sensibilitate bună și uniformitate imagistică.

Pe plan național brevetul de invenție numărul **RO130525A2** revendică un procedeu care folosește canale microfluidice. Invenția se referă la un procedeu de obținere a picăturilor cu dimensiuni controlate, utilizând fluide imiscibile, dar și pentru crearea altor formațiuni biocompatibile, cum ar fi lipozomii. Procedeu conform invenției constă în realizarea microcanalelor fluidice, dispuse sub formă de joncțiuni de tip "Y" și "T", și asigurarea controlului dimensional ale picăturilor fluidului de lucru, prin variația rapoartelor debitelor pe cele două intrări ale joncțiunii de tip "Y". Acest lucru este făcut cu ajutorul unei instalații micro-PIV bazată pe un dispozitiv microscopic optic. Ea constă dintr-o cameră CCD care este atașată la un obiectiv al unui microscop inversat, pentru a se obține vizualizări directe și observații cantitative.

Un alt exemplu se regăsește în brevetul de invenție numărul **RO122449B1** care revendică un procedeu de realizare a dispozitivelor microfluidice prin microprocesarea de suprafață a unui substrat de siliciu, sticlă, ceramică sau cuarț, a unui fotorezist pozitiv ca strat de sacrificiu și metale de tipul Cr/Ni, Cr/Cu sau Cr/Au și un metal ce formează o configurație de microradiator,

H

care poate fi Ni, Cu sau Au. Problema tehnică pe care o rezolvă această invenție este obținerea dispozitivelor microfluidice sub formă de microcanale microprocesate printr-un procedeu îmbunătățit.

Invenția revendicată în brevetul național cu numărul **RO130562A2** se referă la un dispozitiv microfluidic pentru caracterizarea dielectrică a lipozomilor autoasamblați în canale microfluidice. Conform invenției, dispozitivul este constituit dintr-un senzor impedimetric cu niște microelectrozi de lucru interdigitați, un electrod de referință și un electrod auxiliar, integrați într-o cameră de reacție, și un sistem de canale microfluidice, pentru alimentarea camerei de reacție cu fluide și exhaustarea camerei de reacție.

**d) Expunerea invenției în termeni care să permită înțelegerea problemei tehnice și a soluției așa cum este revendicată precum și avantajele invenției în raport cu stadiul actual al tehnicii**

Problema tehnică pe care o rezolvă procedeul propus spre brevetare este scăderea semnificativă a timpului de pregătire a probei la mai puțin de 30 de minute, și minimizarea la 15 minute a timpului efectiv de detecție. De asemenea, măsurătorile SERS sunt mult simplificate, deoarece etapele experimentale realizate anterior în laborator, de către personal pregătit sunt acum automatizate, reproductibile și realizabile cu probe în cantități micrometrice.

Soluția propusă de noi constă în aplicarea unui procedeu de detecție a microorganismelor prin SERS în interiorul unei celule microfluidice și folosește ca și substrat amplificator SERS un spot de Ag sintetizat *in situ*, sub acțiunea radiației laser cu lungimea de undă de 532 nm. Pe scurt, procedeul de detecție cuprinde câteva etape:

1. Asamblarea celulei microfluidice – care presupune îndepărtarea impurităților din interiorul sistemului microfluidic și de pe lama de microscop; montarea sticlei de microscop deasupra sistemului de canale microfluidice, astfel încât zona microfluidică să fie perfect etanșată și acoperită; lama de microscop este fixată cu ajutorul unui capac metalic, care se prinde de componenta de Plexiglas cu ajutorul unor șuruburi; conectarea celor trei tuburi (două capilare pentru inlet și un capilar de outlet) la celula microfluidică asamblată cu ajutorul a trei elemente de fixare; tuburile capilare pentru inlet sunt conectate la seringile cu soluțiile de  $\text{AgNO}_3$  și citrat de Na folosite pentru sinteza spotului amplificator de Ag; cele două seringi sunt poziționate în locașele existente pe pompă; tubul capilar pentru outlet este poziționat pentru a facilita scurgerea și eliminarea lichidelor din interiorul sistemului microfluidic.
2. Poziționarea celulei microfluidice pe masa de microscop și focalizarea obiectivului cu mărirea de  $20\times$  în interiorul canalului microfluidic, în locul în care se dorește formarea spotului de Ag.
3. Setarea parametrilor de curgere în pompa de injecție cu seringi: debitul de 0,25 ml/min; diametrul seringilor: 12,97 mm; volumul debitat: 5 ml.

4. Setarea puterii laserului la valoarea de 5 mW și pornirea lui din programul BW-TEC compatibil cu spectrometrul portabil i-Raman BW-TEK conectat la microscopul BW-TEC printr-o fibră optică.
5. Pornirea concomitentă a laserului și a pompei de injecție cu seringi – în acest pas are loc umplerea canalului microfluidic cu cele două componente, iar sub acțiunea de încălzire locală a laserului, are loc reducerea Ag la Ag<sup>0</sup> și apariția spotului de Ag cu proprietăți de amplificare SERS.
6. După finalizarea procesului de formare al spotului de Ag, are loc injecția probei de bacterii test pentru a valida protocolul de detecție.
7. Înregistrarea de spectre SERS și optimizarea detecției prin găsirea timpului de achiziție și a puterii laser care să mențină viabilitatea probelor biologice de test.

#### e) Prezentarea pe scurt a desenelor explicative

**Figura 1** prezintă desenul tehnic și reprezentarea 3D a celulei microfluidice

**Figura 2** prezintă sistemul microfluidic integrat în configurația experimentală

**Figura 3** prezintă montajul experimental utilizat în procesul de detecție

**Figura 4** prezintă imaginea de microscopie optică a spotului de argint folosit în procedeul de detecție SERS

**Figura 5** prezintă spectre SERS demonstrative efectuate pe bacteria Gram-positivă *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) și gradul de reproductibilitate (obiectiv: 50×, putere laser la sursă: 20 mW, perioada de acumulare a unui spectru: 3 acumulări a câte 8 secunde fiecare)

**Figura 6** prezintă spectre SERS demonstrative efectuate pe bacteria Gram-negativă *Escherichia coli* (*E. coli*) JM 109 și gradul de reproductibilitate (obiectiv: 50×, putere laser la sursă: 20 mW, perioada de acumulare a unui spectru: 3 acumulări a câte 8 secunde fiecare)

#### f) Expunerea detaliată a invenției pentru care se solicită protecția

Prezentăm mai jos elementele constitutive ale sistemului microfluidic integrat care permite detecția în timp real de microorganisme prin spectroscopie SERS.

##### 1. Celula microfluidică

Detecția de microorganisme are loc în interiorul unei celule microfluidice cu aspectul prezentat în **Figura 1**. Ea este fabricată dintr-un lot de material transparent de Plexiglas cu dimensiunea de 38 mm × 76 mm × 10 mm. Pe suprafața ei a fost gravat prin frezare mecanică cu ajutorul frezei cu comandă numerică la o adâncime de 500 μm, un sistem de canale microfluidice cu joncțiune de tip Y. Acesta cuprinde două inleturi și un outlet. Cele două inleturi (numerotate **1** și **2**, **Figura**

2) au fost conectate, prin intermediul unor tuburi capilare cu diametrul extern de 1,58 mm și cel intern egal cu cel al canalului microfluidic de 500  $\mu\text{m}$  la câte o seringă cu un volum de 6 ml. La outlet (3 din **Figura 2**) a fost conectat un furtun pentru evacuarea analiților și a probei biologice. Pentru a asigura o închidere ermetică, celula de Plexiglas a fost acoperită cu o lamă de microscop Celestron cu dimensiunile de 25,4 mm  $\times$  76,2 mm  $\times$  1 mm și sigilată prin acoperirea cu un capac metalic prins în 8 șuruburi.

## 2. Sinteza spotului de argint

În prepararea substratului amplificator SERS s-a urmat rețeta publicată de către K. Herman et al. [11], cu câteva modificări: în timp ce spotul a fost obținut de către autorii articolului în interiorul unui tub capilar de sticlă prin injectarea unui amestec din cele două componente, în cazul nostru, am folosit o pompa de injecție care permite injectarea simultană, cu același debit, a azotatul de argint ( $\text{AgNO}_3$ ) și citratul de sodiu (Na) (**Figura 3**) în interiorul canalului din celula microfluidică. Pentru a permite formarea unui spot de argint (Ag) cât mai bine definit, s-a ales un debit constant de 0,25 ml/min și un volum de 5 ml de  $\text{AgNO}_3$  (concentratia de 1 mM) și de 5 ml amestec de citrat de Na (concentratia de 10 mM) și NaOH 1%. Ca și sursă de iradiere s-a folosit un laser cu lungimea de undă de 532 nm, cu o putere totală la sursă de 50 mW. La formarea spotului, puterea laserului la sursă a fost setată la 5 mW, și un obiectiv de microscop cu mărire de 20 $\times$ . După aproximativ 30s, am putut observa formarea spotului de argint, iar după injectarea completă a celor doi analiți s-a format spotul de argint cu diametrul de  $\approx 230 \mu\text{m}$ . O imagine de microscopie optică a spotului de argint este prezentată în **Figura 4**.

## 3. Detecția de microorganisme în celula microfluidică

Procedeele de detecție de microorganisme în celula microfluidică a fost validat utilizând tulpinile bacteriene de *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC 25923 (numită în continuare *S. aureus*) și *Escherichia coli* (denumită în continuare *E. coli*) JM 109. *S. aureus* este o bacterie Gram-pozitivă de formă rotundă și care tinde să se aranjeze în clusteri de tipul ciorchinilor de struguri. Ea se regăsește atât în mediul înconjurător, cât și în flora umană, pe piele și pe mucoasele membrilor, în special pe mucoasa nazală. *E. coli* este o bacterie Gram-negativă cu forma de bastonaș și care populează atât corpul uman, în principal colonul, cât și mediul înconjurător. Majoritatea tulpinilor sunt inofensive pentru om, altele putând provoca diaree, infecții ale tractului urinar sau probleme respiratorii.

### 3.1 Activarea tulpinii bacteriene

Alicotele conținând tulpina *S. aureus* sau *E. coli*, păstrate în congelator la  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  (Fryka Kaltetechnik GmbH, Esslingen am Neckar, Germania, Model B-35-85) au fost dezghețate pe gheață. După dezghețarea completă a suspensiei bacteriene, aceasta a fost omogenizată prin pipetare și 50  $\mu\text{l}$  suspensie bacteriană s-a transferat peste 450  $\mu\text{l}$  mediu lichid Luria-Bertani (LB) de la Liofilchem (Piane Vamano, Italia), autoclavat în prealabil și având compoziția tipică raportată la 1L de mediu astfel: 10 grame Triptonă, 5 grame Extract de drojdie și 5 grame de



clorură de sodiu (NaCl). Suspensia astfel obținută a fost preincubată 1 oră la 37 °C (Incubator Memmert UNB-100, Schwabach, Germania). Inoculul astfel obținut a fost folosit pentru inocularea tulpinilor pe mediu LB suplimentat cu 1% Agar (VWR International, Leuven, Belgia). După inoculare, plăcile au fost incubate la 37 °C timp de 20 de ore.

### 3.2 Realizarea diluțiilor seriale

În vederea obținerii coloniilor bacteriene pure pentru analizele ulterioare s-au realizat diluții seriale. Astfel din pre culturile anterioare se raclează cu anșa biomasă bacteriană care este transferată într-un tub Eppendorf cu 1 ml tampon salin 0,9% (NaCl). Din acest inocul se realizează apoi diluții seriale de până la  $10^{-6}$ . Pentru obținerea coloniilor pure de *S. aureus* sau *E. coli* au fost inoculate pe mediu diluțiile  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  și  $10^{-6}$ . După inocularea plăcilor cu diluțiile seriale dorite, acestea au fost incubate 15 minute la temperatura camerei după care au fost transferate în incubator la 37 °C timp de 24 de ore.

### 3.3 Creșterea și pregătirea tulpinii pentru măsurători

Din cultura precedentă se transferă folosind anse sterile o colonie bacteriană peste 50 ml mediu LB lichid, sterilizat în prealabil, după care se incubează la 37°C timp de 14 de ore. După incubare cultura a fost centrifugată 5 minute, 4000 rpm la 4°C (Eppendorf 5430R, Hamburg, Germania). După centrifugare supernatantul a fost înlăturat, peletul fiind apoi resuspendat în 10 ml tampon salin 0,9% steril și agitat 1 minut pentru resuspendare (Vortex V1-plus, Biosan, Riga, Letonia), urmat de centrifugare 5 minute, 4000 rpm la 4°C. Etapa de spălare în tampon salin s-a realizat de 3 ori consecutiv pentru a elimina resturile de mediu și substanțe care ar putea interfera cu măsurătorile ulterioare. La final, peletul obținut a fost resuspendat în 5 ml tampon salin 0,9% și păstrat la 4 °C.

Imediat după etapa de îndepărtare a mediului de creștere, o seringă cu 3 ml din proba de *S. aureus* sau *E. coli*, spălate și resuspendate, a fost atașată la pompă și injectată în interiorul canalului microfluidic folosind un debit de 0,5 ml/min. Măsurătorile SERS au fost efectuate la suprafața spotului de Ag creat anterior folosind laserul cu lungimea de undă 532 nm, un obiectiv cu mărirea de 50× și o putere a laserului la sursă de 20 mW, durata de acumulare a unui spectru: 3 acumulări a câte 8 secunde fiecare. În **Figurile 5 și 6** este pusă în evidență reproductibilitatea semnalului, prin acumularea consecutivă de spectre identice, în care apare amprenta spectrală specifică bacteriilor Gram-pozitive sau Gram-negative (benzile spectrale SERS de la  $730\text{ cm}^{-1}$  și  $1318/1313\text{ cm}^{-1}$  sunt caracteristice vibrației inelului purinic și mișcării de întindere a adeninei din moleculele de adenină prezente în stratul lipidic al peretelor celular [12]; la  $995\text{ cm}^{-1}$  apare banda vibrațională atribuită "respirației" inelelor aromatice [13]; banda de la  $1221/1313\text{ cm}^{-1}$  provine de la gruparea amidică III [14]; banda SERS de la  $1593/1548\text{ cm}^{-1}$  atribuită vibrației de întindere din ADN [15]).

### 3.4 Detecția SERS selectivă acizi nucleici/metaboliți purinici - proteine

Structurile nanometrice de argint, ce conțin ioni de clor facilitează înregistrarea spectrului SERS al bacteriilor, semnalul fiind dominat de benzi caracteristice acizilor nucleici și/sau metaboliților acestora. Benzi marker se observă în jurul valorilor 728, 1327, 1460  $\text{cm}^{-1}$ . În cazul adăugării de ioni de iod la suprafața metalică ce amplifică semnalul SERS, semnalul SERS al bacteriilor este dominat de benzi specifice proteinelor, cu benzi marker în jurul valorilor 1002, 1030, 1440 1656  $\text{cm}^{-1}$ . De asemenea, prezența ionilor de  $\text{Ca}^{2+}$  sau  $\text{Mg}^{2+}$ , sub formă de sare nitrat sau sulfat, la suprafața metalică ce amplifică semnalul SERS, facilitează chemisorbția ionilor de clor sau iod, facilitând un semnal mai intens al spectrelor SERS a bacteriilor, comparativ cu spectrele obținute în lipsa acestor ioni.

### Bibliografie

- [1] S. K. Srivastava et al., *Analyst* 140 (2015) 3201.
- [2] M. Moskovits, *Rev. Mod. Phys.* 57 (1985) 783–826.
- [3] P. L. Stiles et al., *Annu. Rev. Anal. Chem.* 1 (2008) 601–626.
- [4] A.F. Chrimes et al., *Chem. Soc. Rev.* 42 (2013) 5880-5906.
- [5] K.-h. Yea et al., *Analyst* 130 (2005) 1009–1011.
- [6] A. F. Chrimes et al., *Anal. Chem.* 84 (2012) 4029–4035.
- [7] L Chen et al., *Electrophoresis* 29 (2008) 1815–1828.
- [8] J.J. Laserna, *Anal. Chim. Acta* 283 (1993) 607–622.
- [9] I.J. Jahn et al., *Analyst* 142 (2017) 1022-1047.
- [10] N. Leopold et al., *Anal. Bioanal. Chem.* 396 (2010) 2341–2348.
- [11] K. Herman et al., *Anal. Bioanal. Chem.* 400 (2011) 815–820.
- [12] T.-T. Liu et al., *PLoS ONE* 4(5) (2009) e5470.
- [13] D. Lin-Vein et al., *The Handbook of Infrared and Raman Characteristic Frequencies of Organic Molecules* 1991: Academic Press Limited.
- [14] M. Kahraman et al., *Langmuir* 24 (3) (2008) 894-901
- [15] A. Walter et al., *Lab on a Chip* 11(6) (2011) 1013-1021.



**Revendicări**

1. Procedeu de detecție a microorganismelor patogene sau nepatogene prin spectroscopie Raman amplificată de suprafață (SERS) într-un sistem de curgere microfluidic utilizând un spot de Argint ca substrat amplificator SERS.
2. Celulă microfluidică din Plexiglas cu 3 canale microfluidice cu joncțiune de tip Y, cu configurația și dimensiunile din **Figura 2**, acoperite cu o lamă de microscop și fixată cu un capac metalic cu acces la sticlă și canal microfluidic.
3. Celulă microfluidică din Plexiglas cu 3 canale microfluidice cu joncțiune de tip Y conform cu revendicarea 2 și cu un spot de Argint obținut în interiorul canalului microfluidic prin reducerea  $\text{AgNO}_3$  cu citrat de sodiu cu pH bazic sub acțiunea radiației laser cu lungimea de undă 532 nm.

28

Desene explicative

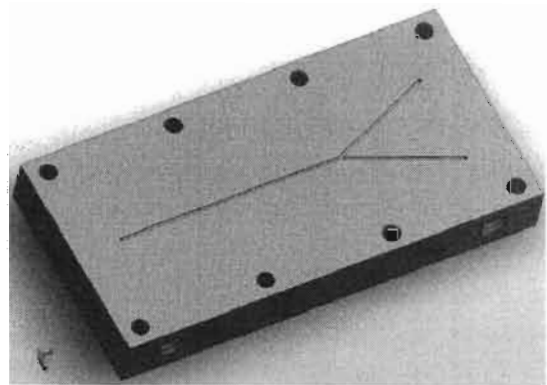
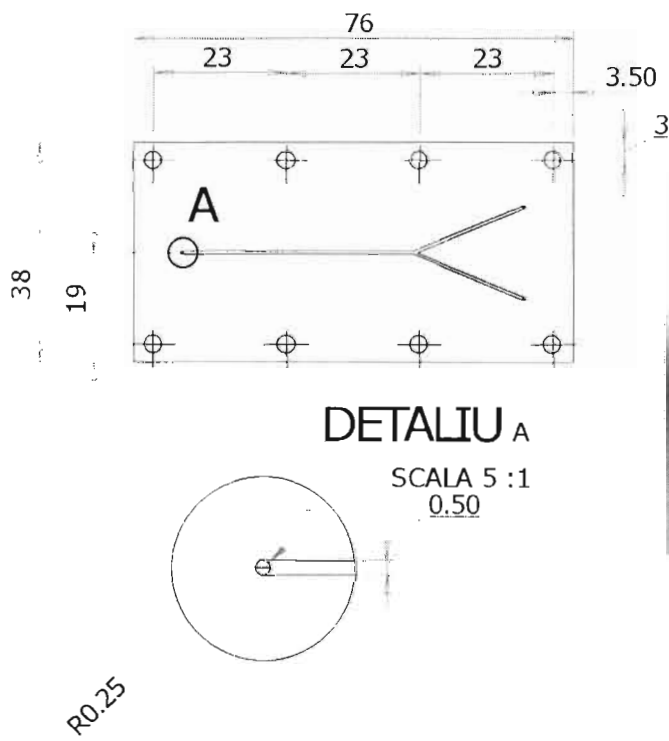


Figura 1

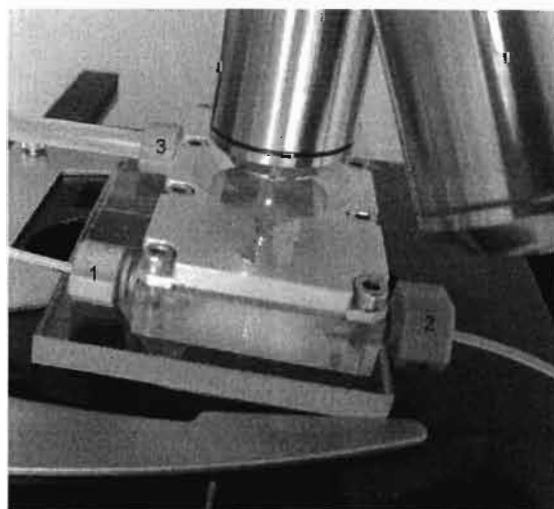
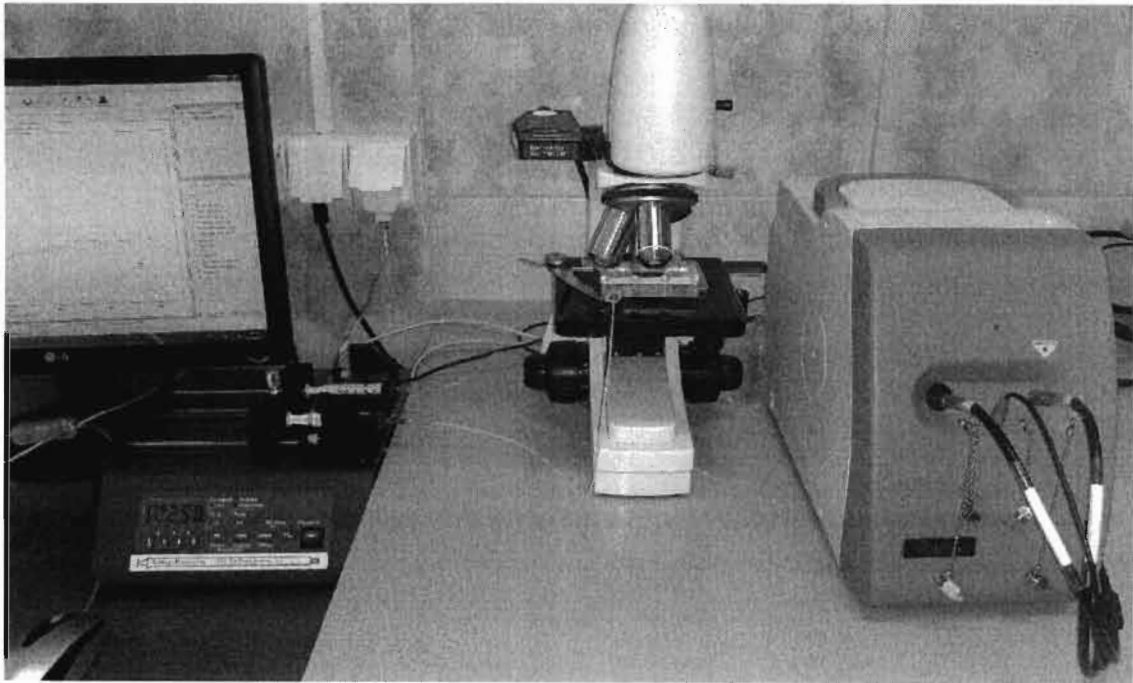
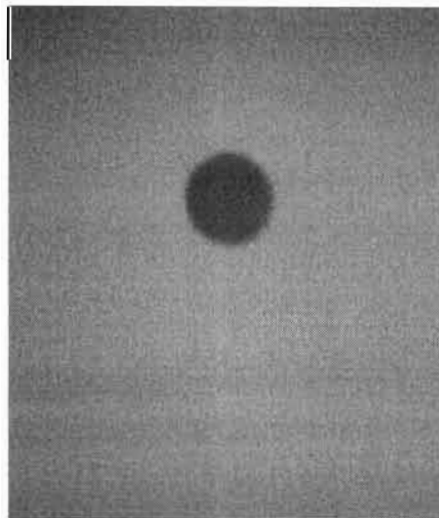


Figura 2

dlr



**Figura 3**



**Figura 4**

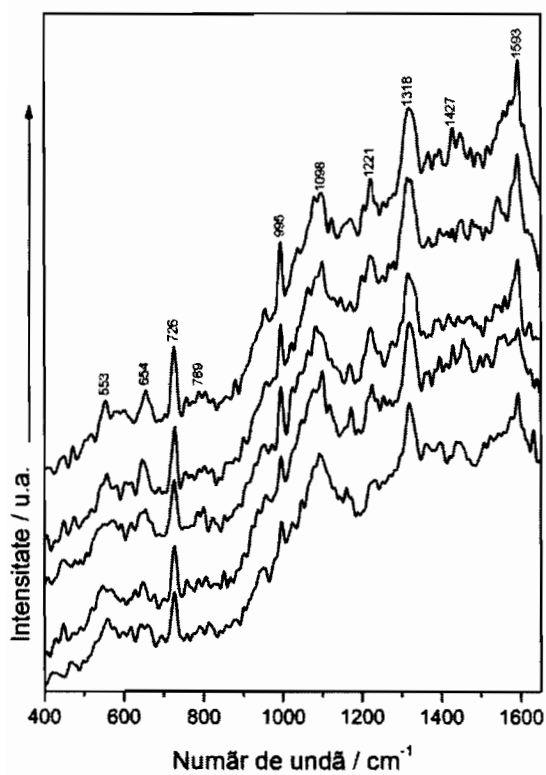


Figura 5

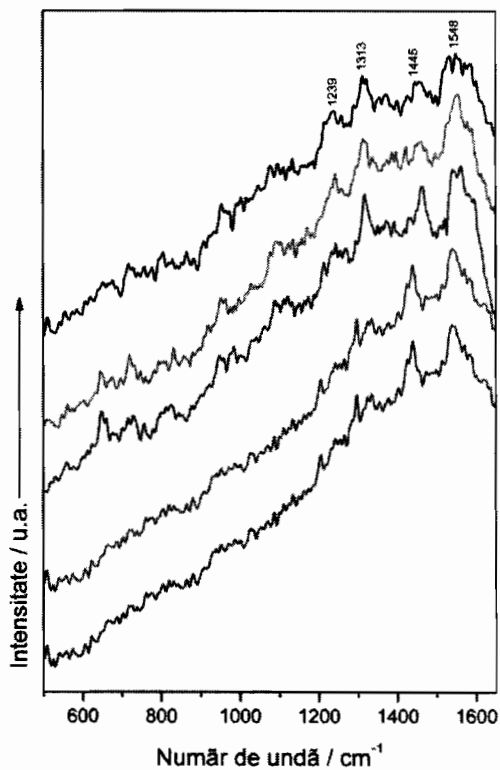


Figura 6