



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2019 00392

(22) Data de depozit: 27/06/2019

(41) Data publicării cererii:
30/12/2020 BOPI nr. 12/2020

(71) Solicitant:
• UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI
FARMACIE "IULIU HAȚIEGANU" DIN
CLUJ-NAPOCA, STR. VICTOR BABEȘ
NR. 8, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO

(72) Inventatori:
• TOMA VALENTIN, STR.ROVINE NR.8,
AP.8, CLUJ- NAPOCA, CJ, RO;

• PAVEL IOANA, ALEEA MEZIAD NR.1,
BL.L2, AP.18, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
• LEOPOLD NICOLAE, STR.ALMAȘULUI
NR.5, AP.13, CLUJ- NAPOCA, CJ, RO;
• LUCACIU CONSTANTIN MIHAI,
STR. ROMULUS VUIA NR.76,
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
• ȘTIUFUIC RAREȘ IONUȚ,
STR.SIGHIȘOAREI NR.29, CLUJ-NAPOCA,
CJ, RO

(54) **SUBSTRAT PLASMONIC SOLID PE BAZĂ
DE NANOPARTICULE DE ARGINT UTILIZAT
ÎN SPECTROSCOPIA RAMAN AMPLIFICATĂ
DE SUPRAFAȚĂ**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un substrat plasmonic solid pe bază de nanoparticule de Ag filtrate utilizat în spectroscopia Raman amplificată de suprafață - SERS, substratul fiind capabil să genereze spectre vibraționale reproductibile în cazul unor molecule test de analit, a unor compuși farmaceutici sau a fluidelor biologice cum sunt serul, plasma sangvină, saliva, urina și altele asemenea. Substratul plasmonic conform invenției este constituit dintr-un suport din sticlă de CaF_2 care nu prezintă semnal Raman la excitare cu un laser din domeniul vizibil și infraroșu apropiat pe care este depus un coloid de Ag filtrat și concentrat obținut prin reducerea ionilor de Ag^+ cu hidroxil amină în mediu bazic, concentrarea și purificarea coloidului de nanoparticule de AgNP_s realizându-se prin metoda filtrării prin curgere tangențială, coloidul de AgNP_s fiind depus ulterior pe suportul de sticlă de CaF_2 , degresat și curățat în prealabil și preîncălzit la o temperatură cuprinsă între $40...60^\circ\text{C}$, nanoparticulele de Ag filtrate având dimensiuni cuprinse între $20...30\text{ nm}$, suspensia coloidală conținând nanoparticule de Ag este concentrată prin filtrare tangențială între 10 și 100 de ori cu filtre de $10...100\text{ kDa}$, volumul de suspensie coloidală depus pe sticla de CaF_2 fiind de ordinul $0,5...2,0\ \mu\text{L}$ care, după

uscarea și formarea stratului plasmonic, ocupă o suprafață aproximativ circulară având un diametru cuprins între $1...3\text{ mm}$, iar înaintea depunerii soluției coloidale, suportul de sticlă de CaF_2 este preîncălzit timp de $10...120\text{ s}$ până la o temperatură cuprinsă între $30...80^\circ\text{C}$.

Revendicări: 6
Figuri: 10

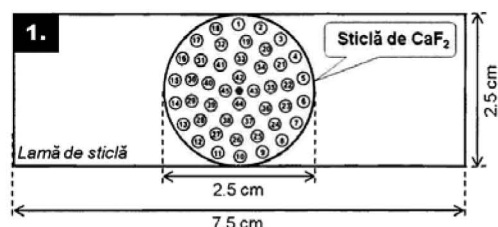
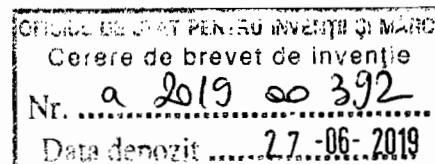


Fig. 3

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).





Descrierea invenției

“Substrat plasmonic solid pe bază de nanoparticule de argint utilizat în spectroscopia Raman amplificată de suprafață „

Invenția se referă la producerea unui substrat plasmonic solid având la bază nanoparticule de argint (AgNPs) reduse cu hidroxilamină, purificate și concentrate folosind o tehnică de filtrare prin curgere tangențială. Substratul este utilizat în spectroscopia Raman amplificată de suprafață (SERS) fiind capabil să genereze spectre vibraționale reproductibile în cazul unor molecule de analit cum ar fi (dar nelimitativ) molecule test, compuși farmaceutici sau fluide biologice (ser și plasmă sangvină, salivă, urină, etc). Substratul se formează prin auto asamblarea nanoparticulelor sferice de argint pe suprafața unei sticle de CaF₂. Soluțiile coloidale conținând nanoparticule de argint sintetizate prin reducerea azotatului de argint (AgNO₃) cu hidroxilamină (NH₂OH) sunt filtrate, purificate și concentrate în prealabil printr-un procedeu de tip Tangential Flow Filtering (TFF – filtrare prin curgere tangențială).

Interacțiunea unei radiații laser cu o moleculă va genera în imensa majoritate a cazurilor producerea unor fotoni de energie egală cu cea a fotonilor incidenți. Vorbim în acest caz de un fenomen de împrăștiere elastică. Totuși, aproximativ 1 foton dintr-un milion de fotoni incidenți va interacționa cu stările vibraționale ale moleculei, generând fotoni împrăștiați inelastic, de energie diferită în raport cu cea a fotonilor incidenți. Prin înregistrarea acestor fotoni împrăștiați inelastic se obține spectrul vibrațional al moleculei (denumit și spectru Raman), care este un spectru specific fiecărei structuri moleculare. De aceea spectrul vibrațional Raman mai poartă denumirea și de „amprentă” moleculară (molecular fingerprint). Tehnica care permite înregistrarea unui astfel de spectru poartă denumirea de spectroscopie Raman.

În anul 1974 s-a observat faptul că spectrul Raman al unei molecule test poate fi amplificat cu mai multe ordine de mărime atunci când această moleculă se află în proximitatea unui suprafețe metalice nanorugoase (Fleischmann M, Hendra PJ, McQuillan AJ, Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode, *Chem Phys Lett*, 1974, 26, 163–166). Spre exemplu, spațiile interstițiale ale AgNPs pot conduce la o amplificare a secțiunilor eficace Raman (10^{-30} - 10^{-25} cm² pe moleculă) de până la 14 ordine de mărime. Aceste locații favorabile amplificării semnalului sunt cunoscute sub denumirea de „hot spot-uri”. Studiile SERS (teoretice și experimentale) au demonstrat că AgNPs generează factori de amplificare de 10 până la 100 de ori mai mari decât nanoparticule de aur (AuNPs) similare. În plus spectroscopia Raman amplificată de suprafață (SERS) este o tehnică spectroscopică de o sensibilitate extrem de ridicată care are avantajul de a fi specific moleculară.

Cele două mecanisme principale care explică apariția efectului SERS sunt:

Mecanismul de amplificare electromagnetică: Semnalul foarte amplificat, observat în vecinătatea hot-spoturilor SERS, se datorează în principal creșterii intensității atât a câmpului electromagnetic incident cât și a celui împrăștiat ca urmare a excitării rezonanțelor plasmonice localizate (LSPR) prezente în nanostructurile de argint și de aur.

Mecanismul de amplificare prin transfer de sarcină: O contribuție mai mică la mecanismul general de amplificare SERS (aproximativ trei ordine de mărime) poate fi atribuită unui mecanism de transfer de sarcină (CT - Charge Transfer). Acest mecanism se bazează pe faptul că o moleculă chemisorbită (prin formarea unor complecși de suprafață) pe suprafața plasmonică împrăștie lumina incidentă mult mai eficient decât o moleculă liberă.

SERS permite detecția într-o manieră rapidă, minim invazivă și specifică a unor analiți aflați în concentrații extrem de mici (până la nivel femtomolar) iar aplicațiile vizate de această tehnică sunt medicină, științe farmaceutice, securitate militară, criminalistică, artă, etc. Un exemplu elocvent în acest sens îl reprezintă fluidele biologice. Prin colectarea unor spectre SERS ale probelor de fluide biologice (ser, plasma, urină, salivă, etc) se pot obține informații relevante legate de existența unor boli, stadiul și evoluția acestora. Prin detectarea SERS a unor biomarkeri specifici, se poate urmări eficiența unei terapii prin detectarea și cuantificarea concentrației unor medicamente, care trebuie să fie în intervalul terapeutic, respectiv sub limita de toxicitate dar, în același timp, peste concentrația la care acestea sunt eficiente (McAughtrie S, Faulds K, Graham D, Surface enhanced Raman spectroscopy (SERS): Potential applications for disease detection and treatment, *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, **2014**, 21, 40–53).

”Biopsia lichidă”, definită ca fiind detectarea de biomarkeri ce pot furniza informații despre cancer sau alte boli din probe lichide, a fost intens studiată devenind tot mai populară în raport cu biopsia solidă, datorită faptului că este ușor de implementat (minim invazivă), costurile de operare sunt mici și permite o analiză personalizată a pacientului (Tadimety A, Closson A, Li C, Yi S, Shen T, Zhang JXJ, Advances in liquid biopsy on-chip for cancer management: Technologies, biomarkers, and clinical analysis, *Crit Rev Clin Lab Sci*, **2018**, 55, 140-162; Wan JCM, Massie C, Garcia-Corbacho J, Mouliere F, Brenton JD, Caldas C, Pacey S, Baird R, Rosenfeld N, Liquid biopsies come of age: towards implementation of circulating tumour DNA, *Nat Rev Cancer*, **2017**, 17, 223-238). Printre moleculele de interes pot fi menționate cele care se găsesc în celulele tumorale desprinse din țesutul tumoral: proteine, vezicule extracelulare (exozomi), acizi nucleici și alte molecule de masă moleculară mai mică care se varsă din tumoare în lichidele corporale (sânge, salivă, urină sau lichidul cefalorahidian). S-a demonstrat că nivelul de concentrație al acestor biomarkeri crește semnificativ la pacienții cu tumori maligne severe, incluzând aici cancerul de sân, stomac, plămâni, prostată, etc. (Tu M, Chia D, Wei F, Wong D, Liquid biopsy for detection of actionable oncogenic mutation in human cancer and electric field induced release and measurement liquid biopsy (eLB), *Analyst*, **2016**, 141, 393-402; Perakis S, Speicher MR, *BMC Med*, **2017**, 15, 75)

Celulele tumorale desprinse din tumoarea propriu-zisă pătrund în sânge și pot furniza informații valoroase privind caracteristicile bolii fără a accesa locul unde este situată tumoarea. O provocare în captarea lor o reprezintă raritatea lor, întrucât ele se găsesc într-un raport de una la un milion sau miliard printre celelalte celule, dar și eterogenitatea lor. De cele mai multe ori aceste celule circulă prin sânge sub formă de clusteri și pot fi captați prin metode cum ar fi separarea pe baza mărimii sau a rigidității (Marrugo-Ramirez J, Mir M, Samitier J, Blood-based cancer biomarkers in liquid biopsy: A promising non-invasive alternative to tissue biopsy, *Int J Mol Sci*, **2018**, 19, E2877; Tadimety A, Closson A, Li C, Yi S, Shen T, Zhang JXJ, Advances in liquid biopsy on-chip for cancer management: Technologies, biomarkers, and clinical analysis, *Crit Rev Clin Lab Sci*, **2018**, 55, 140-162).

Exozomii sunt vezicule membranare mici (având diametrul cuprins între câțiva zeci și câteva sute de nm) care conțin biomolecule precum acizii nucleici și proteinele. Conținutul lor este ferit de degradare datorită prezenței membranei lipidice. În sânge se poate regăsi o concentrație de $\sim 10^9$ exozomi individuali/mL iar cantitatea lor totală este dependentă de gravitatea tumorii (Marrugo-Ramirez J, Mir M, Samitier J, Blood-based cancer biomarkers in liquid biopsy: A promising non-invasive alternative to tissue biopsy, *Int J Mol Sci*, **2018**, 19, E2877; Tadimety A, Closson A, Li C, Yi S, Shen T, Zhang JXJ, Advances in liquid biopsy on-chip for cancer management: Technologies, biomarkers, and clinical analysis, *Crit Rev Clin Lab Sci*, **2018**, 55, 140-162).

Acizii nucleici se varsă în sânge în timpul apoptozei și a necrozei celulare. Într-un test ce a inclus peste 150 pacienți bolnavi de cancer respectiv 50 de voluntari sănătoși s-a demonstrat faptul că sângele persoanelor bolnave conține ADN în concentrație de 10 ori mai mare față de cel al persoanele sănătoase (180 ng/mL vs. 13 ng/mL). Mai mult, studii recente, au raportat prezența ARN-ului atât în plasmă cât și în ser, fapt ce întărește ideea că atât ADN-ul cât și ARN-ul pot fi considerați biomarkeri de interes prezenți în probele lichide care pot fi utilizați pentru detectarea unor maladii (Tadimety A, Closson A, Li C, Yi S, Shen T, Zhang JXJ, *Advances in liquid biopsy on-chip for cancer management: Technologies, biomarkers, and clinical analysis*, *Crit Rev Clin Lab Sci*, **2018**, 55, 140-162; Garcia-Olmo DC, Ruiz-Piqueras R, Garcia-Olmo D, *Circulating nucleic acids in plasma and serum (CNAPS) and its relation to stem cells and cancer metastasis: state of the issue*, *Histol Histopathol*, **2004**, 19, 575-583).

Sângele integral este cea mai frecventă și convenabilă formă de biofluid care poate fi utilizat pentru analize medicale. Astfel se poate efectua o analiza imediată, care să nu necesite etape intermediare de pregătire între momentul recoltării și analiza propriu zisă. Lichidele cele mai utilizate pentru biopsia lichidă sunt plasma și serul, ambele obținute prin centrifugarea sângelui. Acestea permit captarea și analiza exozomilor și a acizilor nucleici circulanți (Witwer KW, Buzas EI, Bemis LT, Bora A, Lasser C, Lotvall J, Nolte-t Hoen EN, Piper MG, Sivaraman S, Skog J, Thery C, Wauben MH, Hochberg F, *Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research*, *J Extracell Vesicles*, **2013**, 2, 1-25)

În ultimii ani numeroase grupuri de cercetare au demonstrat potențialul aplicativ enorm pe care tehnica SERS îl poate avea în domeniul analizei biofluidelor. Principalul factor care limitează introducerea spectroscopiei Raman amplificată de suprafață pe scară largă în practica clinică curentă este reprezentată de lipsa unor substraturi plasmonice standardizate (și în același timp a unor protocoale standardizate) care să asigure colectarea unor spectre SERS cu un factor de amplificare cât mai mare dar care, în același timp, să furnizeze spectre SERS cu un înalt grad de reproductibilitate. Până în prezent, numeroase grupuri de cercetare au utilizat în aplicațiile biomedicale propriile substraturi SERS, preparate după diferite protocoale experimentale. Mai mult, sunt foarte puține cazurile în care același tip de substrat a fost folosit pentru diferite lichide biologice sau pentru detectarea unor analiți diferiți (Jaworska A, Fornasaro S, Sergio V, Bonifacio A, *Potential of Surface Enhanced Raman Spectroscopy (SERS) in Therapeutic Drug Monitoring (TDM). A Critical Review*, *Biosensors*, **2016**, 6, 47).

Pe de altă parte, aplicarea pe scară largă a metodei SERS în practica clinică implică anumite caracteristici care sunt necesare pentru o utilizare de rutină cum ar fi: robustețea (adică să nu implice o instrumentație prea complexă sau delicată), costul (în sensul de a fi competitiv cu metodele existente) și nu în ultimul rând ușurința de a fi operată (sa nu necesite personal ultraspecializat) respectiv ușurința de a interpreta rezultatele obținute.

În cazul fluidelor biologice, obținerea de semnale SERS intense și detaliate, ca rezultat al interacțiunii nanoparticulelor cu toate tipurile de molecule prezente în fluid, este dificilă mai ales din cauza compoziției lor complexe. Experimental s-a observat faptul că în cazul coloizilor de aur sau argint nanoparticulele sunt acoperite de un strat de proteine, numite opsonine, care împiedică apropierea de suprafața metalică a altor molecule și în acest fel conduc la un semnal SERS de intensitate redusă, caracteristic proteinelor (peptidelor). Din aceasta cauză metoda SERS a fost puțin aplicată pe lichide biologice iar aplicațiile relevante au implicat tehnici destul de complexe de deproteinizare a lichidelor biologice (fie prin metode fizice de ultrafiltrare sau metode chimice de precipitare a proteinelor) (Bonifacio A, Dalla Marta S, Spizzo R, Cervo S, Steffan A, Colombatti A,

Sergo V, Surface-Enhanced Raman Spectroscopy of blood plasma and serum using Ag and Au nanoparticles: a systematic study, *Anal Bioanal Chem*, **2014**, 406, 2355-2365).

În această invenție prezentăm o procedură simplă de obținere a unor substraturi SERS solide, la un cost scăzut, capabile să furnizeze semnale SERS ale moleculelor de masă moleculară mică de intensitate ridicată pe lichide biologice (plasmă, ser, salivă, lizate celulare), fără a necesita o procedură preliminară de deproteinizare. Substraturile propuse oferă un grad înalt de reproductibilitate. Metoda implică autoasamblarea unor nanoparticule de argint (AgNPs) obținute prin reducerea ionilor de argint cu hidroxilamina, concentrate și purificate prin filtrare tangențială, pe o sticlă Raman inactivă de CaF₂.

Coloidul de argint utilizat la prepararea substraturilor a fost obținut pe baza metodei Leopold-Lendl (Leopold N, Lendl B, A new method for fast preparation of highly Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) active silver colloids at room temperature by reduction of silver nitrate with hydroxylamine hydrochloride, *J Phys Chem B*, **2003**, 107, 5723-5727). Metoda se bazează pe reducerea ionilor de argint rezultați din dizolvarea azotatului de argint (AgNO₃) în apă distilată cu clorhidrat de hidroxil amina (HONH₂·HCl) în mediu alcalin. Coloidul obținut a fost ținut la întuneric timp de 24 h. Un spectru tipic de absorbție UV-Vis al unui coloid de argint astfel obținut este prezentat în figura 1, alături de imaginea optică a acestuia. Absorbanța maximă asociată rezonanței plasmonice se obține la lungimi de unde de circa 408 nm, analiza prin microscopie electronica de transmisie (TEM) demonstrând formarea unor nanoparticule de argint sferice cu dimensiuni cuprinse între 20 și 50 nm (figura 2). Măsurători ale potențialului Zeta au indicat o sarcină negativă de aproximativ -66 mV la suprafața AgNPs.

Purificarea și concentrarea coloidului de argint s-a realizat cu ajutorul unui sistem de filtrare prin curgere tangențială (Pall Minimate™ TFF System) prevăzut cu capsule de filtrare cu pori de diferite dimensiuni (10-100 kDa.) Acest procedeu a fost repetat de 3 ori în vederea eliminării produșilor secundari de reacție și a reactivilor neconsumați din coloid. După finalizarea celui de-al treilea ciclu de filtrare nu a mai fost adăugată apă în rezervor colectându-se într-un recipient de sticlă, coloidul concentrat între 10 și 100 de ori. Coloidul concentrat a fost depus pe sticle Raman de CaF₂ care au fost preîncălzite pe plăci metalice la temperaturi cuprinse între 30 și 80 °C. O imagine tipică a unui astfel de substrat este prezentată în figura 3. Au fost testate diferite temperaturi și diferite volume de coloid la diferite concentrații pentru obținerea substraturilor cu o depunere cât mai uniformă, testată prin microscopie optică (figura 4) și microscopie de forță atomică (AFM) (figura 5) cu performanțe (amplificare SERS, reproductibilitate) maxime.

Testarea performanțelor SERS a fost efectuată pe molecule analizate cu secțiune eficientă Raman ridicată cum ar fi albastrul de metilen (figura 6), R6G (rodamină 6G) (figura 7) și lichide biologice (plasmă și ser sanguin, salivă, lizate celulare din culturi de celule) (figurile 8-10).

În figura 6 este prezentat spectrul SERS al moleculei de albastru de metilen (una din moleculele test folosite în spectroscopia SERS) împreună cu harta de distribuție a intensității semnalului SERS înregistrat prin poziționarea radiației laser incidente în diferite puncte ale substraturii. Coeficientul de variație al semnalului SERS astfel detectat este mai mic de 10%. Exemplificăm de asemenea sensibilitatea substraturii care face obiectul prezentei invenții cu semnalul SERS al moleculei de R6G (figura 7).

Principala aplicație vizată în cazul unor noi substraturi SERS este legată de obținerea unor semnale SERS din lichide complexe, obținute prin „biopsie lichidă” cum ar fi plasma sanguină. Inconvenientul major este reprezentat de faptul că spectrele SERS obținute prin utilizarea suspensiilor coloidale sau a agregatelor sunt foarte similare cu semnalele Raman ale proteinelor.

Pentru a demonstra capabilitățile substratului, în figura 8 sunt prezentate spectrele SERS obținute folosind noul substrat ale plasmei nefiltrate (având un conținut proteic ridicat) respectiv ale plasmei deproteinizată prin filtrare.

Deproteinizarea serului s-a efectuat prin două metode:

1. Precipitarea proteinelor din soluție cu solvent organic: peste proba de ser uman s-a adăugat metanol (purtate 99%), astfel încât concentrația finală să fie 90%. Precipitarea proteinelor a fost instantanee, iar etapa imediat următoare a fost centrifugarea, realizată la 8000 g, timp de 10 minute.

Concentrația de proteine din supernatantul colectat după centrifugare a fost verificată utilizând metoda Bradford și Spectroscopia de absorbție UV-Vis. Ambele metode au confirmat faptul că în urma precipitării cu metanol s-a reușit îndepărtarea unei cantități semnificative de proteine, concentrația acestora scăzând de aproximativ 500 ori față de cea din serul nativ.

2. Deproteinizarea prin filtrare utilizând filtre cu mărimea porilor foarte mică - 3 kDa, care să rețină proteinele. Filtrarea s-a realizat sub influența forței centrifuge, 2150 g, timp de aproximativ 40 minute. Filtratului i s-a măsurat concentrația de proteine prin metoda Bradford, unde valoarea obținută a fost zero și, de asemenea, i s-a înregistrat spectrul UV-vis unde se observă apariția unui maxim de absorbție la 292 nm caracteristic acidului uric. Este cunoscut faptul că produsul final al metabolismului purinelor este acidul uric, iar date din literatură prezintă pentru acesta un maxim de absorbție la 292 nm. Mai mult, masa moleculară a acidului uric este foarte mică (169 Da), prin urmare este justificată trecerea lui prin filtru și prezența lui în probă. Drept referință s-a înregistrat un spectru pentru acidul uric nativ, folosind un stoc preparat la o concentrație din domeniul fiziologic (250 μ M), care confirmă cele spuse mai sus.

După cum se poate observa în figura 8, spectrele obținute pe substratul nostru pe plasma nedeproteinizată sunt similare cu cele obținute pe plasma deproteinizată. Se observă astfel vibrațiile la 640 cm^{-1} , 1132 cm^{-1} , atribuibile acidului uric, 726 cm^{-1} atribuibil adeninei sau hipoxantinei, precum și 1002 cm^{-1} , 1653 cm^{-1} , atribuibile aminoacizilor (de completat).

Substratul propus în prezenta invenție a fost testat și pe alte lichide biologice cum ar fi saliva (figura 9) și lizat celular (figura 10).

În figurile anexate acestui brevet (care constituie o parte integrantă a acestuia) sunt prezentate următoarele:

- figura 1 prezintă spectrul de absorbție UV-VIS și imaginea optică a soluției coloidale conținând nanoparticule de argint sintetizate prin metoda reducerii cu hidroxilamină și purificate și concentrate prin metoda filtrării prin curgere tangențială (TFF)
- figura 2 prezintă o imagine TEM a nanoparticulelor de argint după filtrare și o distribuție statistică a diametrului lor obținută prin analiza imaginilor TEM
- figura 3 prezintă schematic modul de realizare a substratului SERS propus care conține 46 de spoturi de măsură
- figura 4 prezintă o imagine optică a substratului SERS propus obținută cu ajutorul unui obiectiv de 100x
- figura 5 prezintă o imagine obținută prin microscopie de forță atomică (AFM – atomic force microscopy) în modul contact intermitent (tapping mode) a substratului plasmonic
- figura 6 prezintă spectrul SERS al moleculei de albastru de metilen împreună cu harta distribuției statistice a celui mai intens mod de vibrație
- figura 7 prezintă spectrul SERS al moleculei de R6G împreună cu harta distribuției statistice a celui mai intens mod de vibrație

- figura 8 prezintă spectrele SERS pe plasmă nativă (nefiltrată) respectiv deproteinizată prin filtrare cu ajutorul unui filtru de 3kDa
- figura 9 prezintă spectrul SERS al salivei integrale
- figura 10 prezintă spectrul SERS caracteristic unui lizat celular

Prezentăm în continuare un **exemplu** concret, nelimitativ de realizare a invenției.

Sinteză nanoparticule de argint:

Într-un pahar Erlenmeyer s-a preparat o soluție apoasă prin dizolvarea a 10.5 mg hidroxilamină (NH_2OH) și a 12 mg hidroxid de sodiu (NaOH) în 90 mL apă ultrapură. Peste această soluție au fost adăugați rapid, sub agitare mecanică, 10 mL soluție apoasă conținând 17 mg azotat de argint (AgNO_3). Coloidul se obține instantaneu, și se menține sub agitare încă 10 minute.

Purificare și concentrare nanoparticule de argint:

S-au introdus 100 mL coloid de argint în rezervorul unui sistem de filtrare prin curgere tangențială (Pall Minimate™ TFF System) prevăzut cu o capsulă de filtrare cu pori de 100 kDa. Viteza de rotație a pompei peristaltice a fost setată 100 RPM. Filtrarea a fost oprită în momentul în care volumul coloidului din sistem a ajuns la 10 mL, moment în care a fost adăugată apă ultrapură în rezervor până la 100 mL, după care s-a reluat filtrarea. Acest procedeu a fost repetat de 3 ori în vederea eliminării produșilor secundari de reacție și a reactivilor neconsumați din coloid. După finalizarea celui de-al treilea ciclu de filtrare nu a mai fost adăugată apă în rezervor colectându-se într-un recipient de sticlă coloidul concentrat.

Realizare substrat plasmonic solid

Un microlitru de coloid concentrat se depune pe o sticla de CaF_2 încălzită pe o plită metalică la 40-50°C obținându-se un spot cu reflexe metalice de circa 100 μm în diametru.

REVENDICĂRI

1. Invenția se referă la un substrat pentru Spectroscopia Raman Amplificata de Suprafață (Surface Enhanced Raman Spectroscopy sau prescurtat SERS) conținând:

- un suport din sticla de CaF_2 care nu prezinta semnal Raman la excitare cu un laser din domeniul vizibil și infraroșu;
- un coloid de argint obținut prin reducerea ionilor de Ag^+ cu hidroxil amină în mediu bazic;
- concentrarea și purificarea coloidului de nanoparticule de argint (AgNPs) prin filtrare tangențială;
- depunerea coloidului de AgNPs pe suportul de sticlă de CaF_2 degresat și curățat în prealabil și preîncălzit la o temperatură de 40-60 °C;

2. Substrat SERS conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** nanoparticulele de argint au o dimensiune cuprinsa între 20 și 30 nm. Alte dimensiuni pot fi de asemenea selectate în funcție de aplicația SERS vizată.

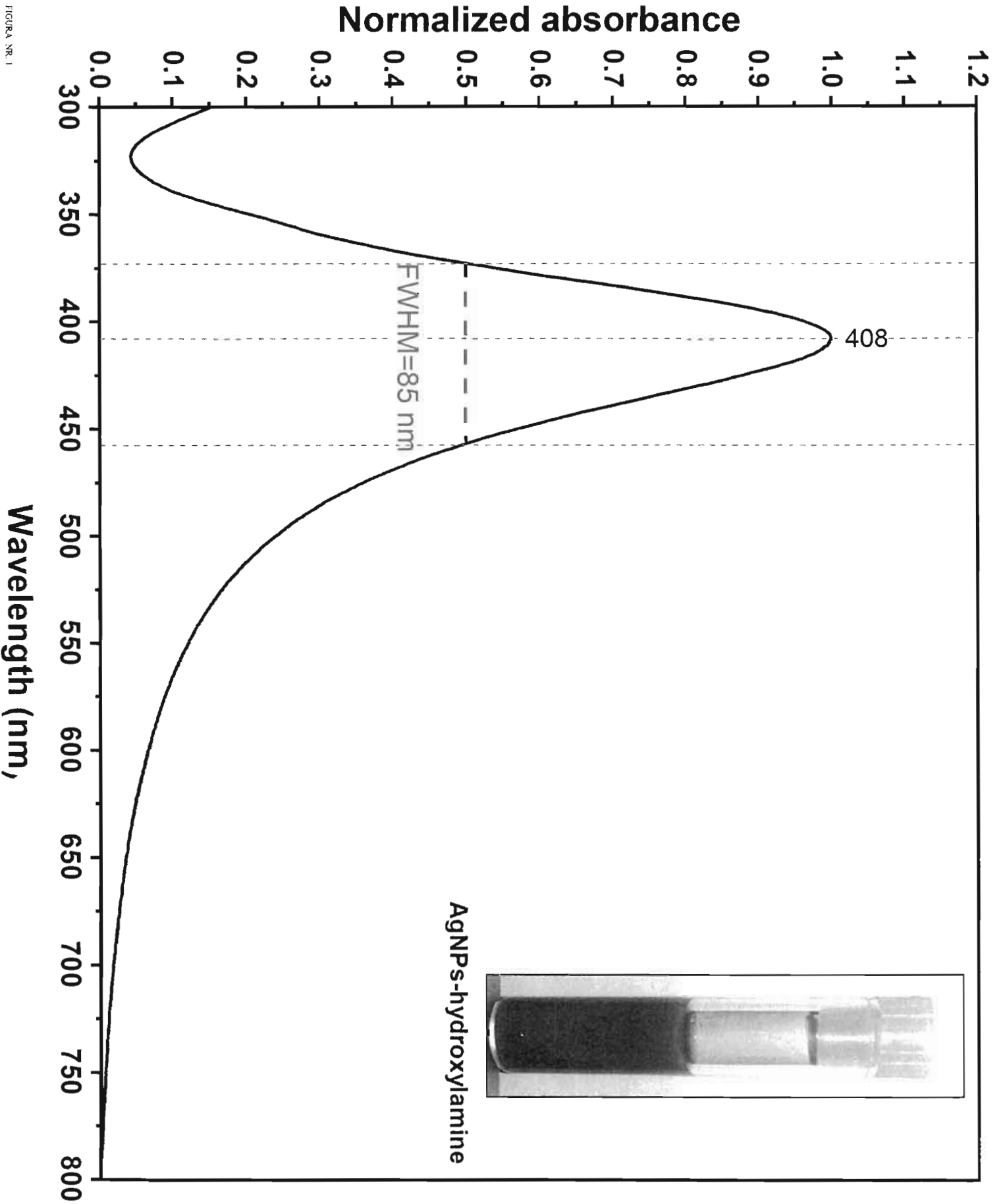
3. Substrat SERS conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** suspensia de nanoparticule de argint este concentrată prin filtrare tangențială între 10 și 100 de ori, cu filtre de 10-100 kDa;

4. Substrat SERS conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** volumul de suspensie coloidală depus este de ordinul 0.5-2.0 μL care după uscare ocupa o suprafață cuprinsă între 50-150 μm^2 ;

5. Substrat SERS conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** suportul din sticlă de CaF_2 este preîncălzit la o temperaturi cuprinse între 30-80 °C timp de 10-120 s;

6. Substrat SERS conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** poate detecta semnalul SERS al unor molecule din lichide biologice complexe (plasma sanguina, ser sanguin, saliva, lizate celulare, etc) cu o masa moleculara mica (sub 3 kDa) fără necesitatea unei deproteinizari.

FIGURA NR. 1



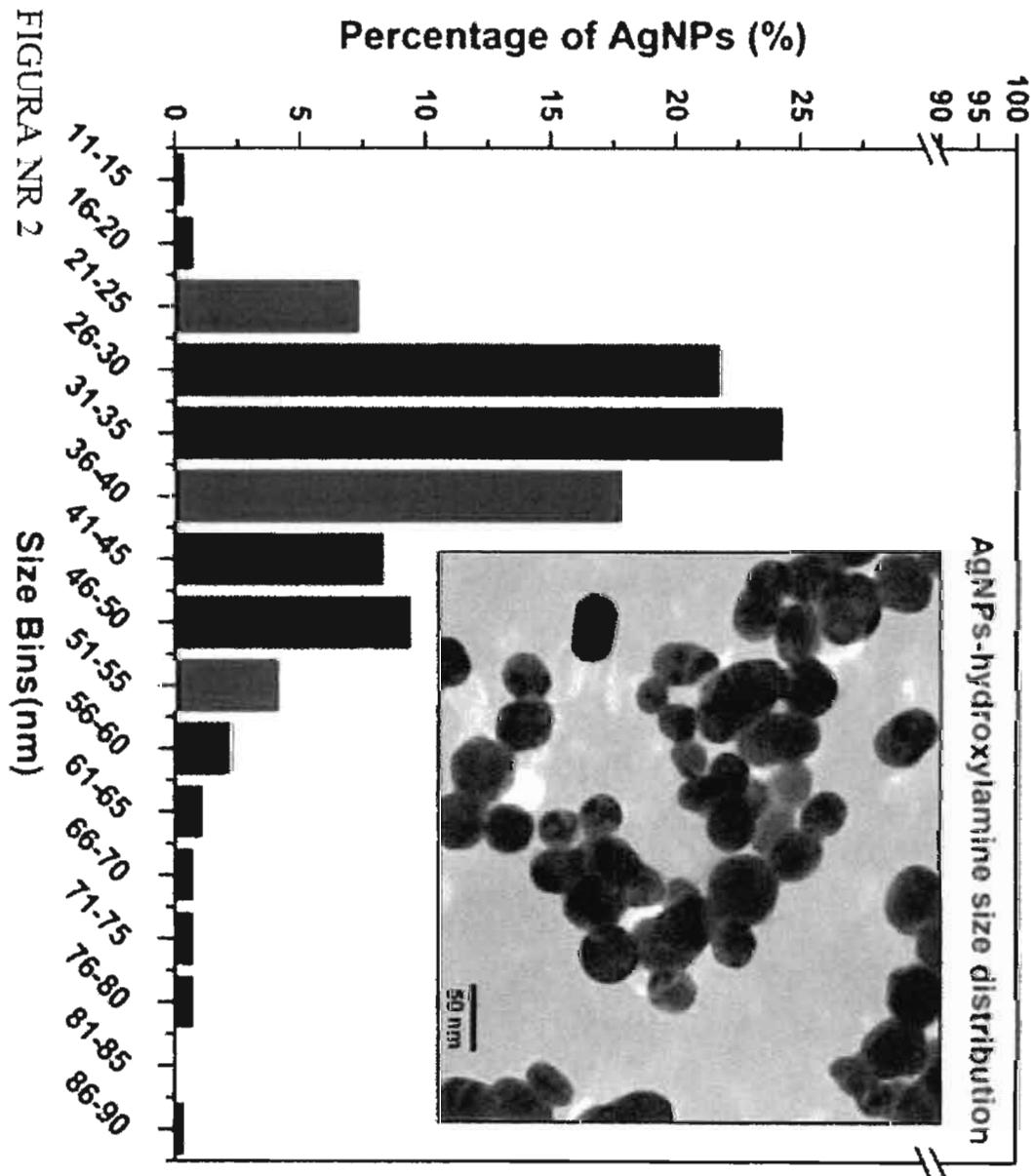


FIGURA NR 2

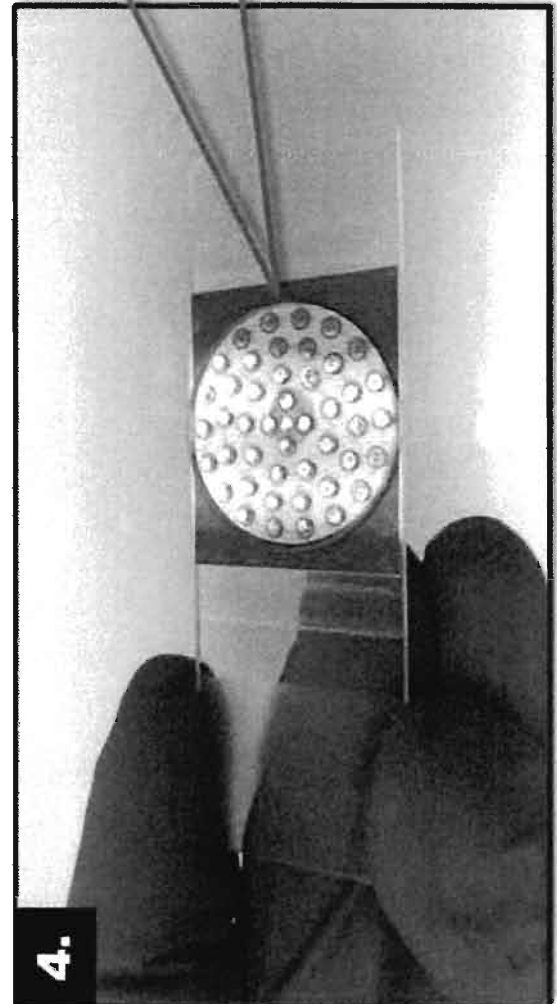
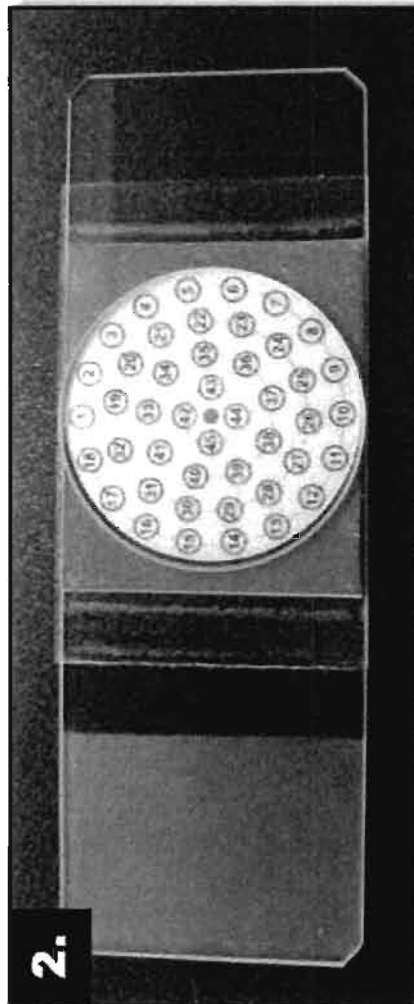
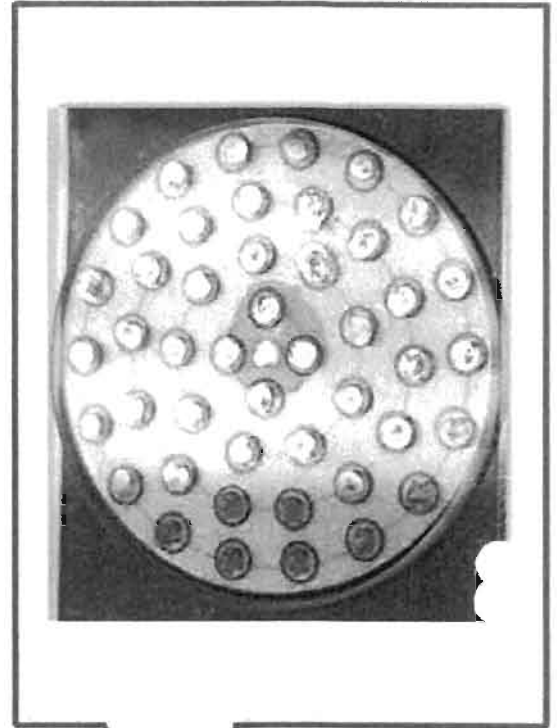
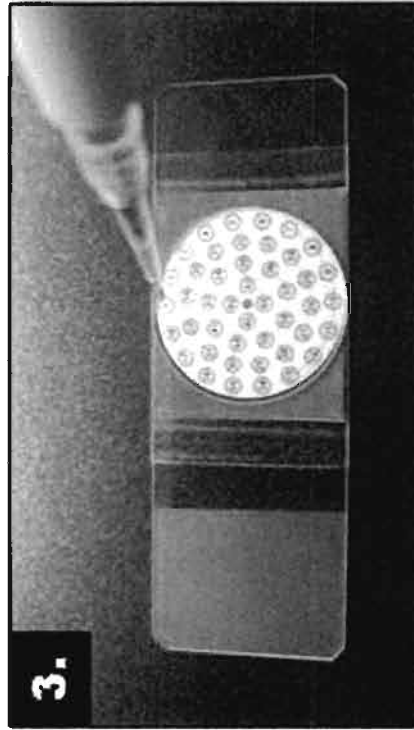
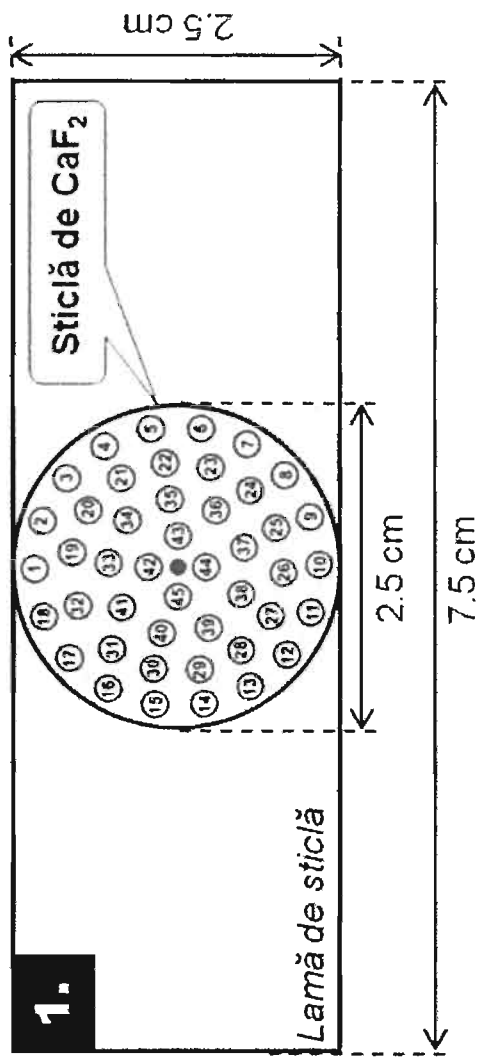
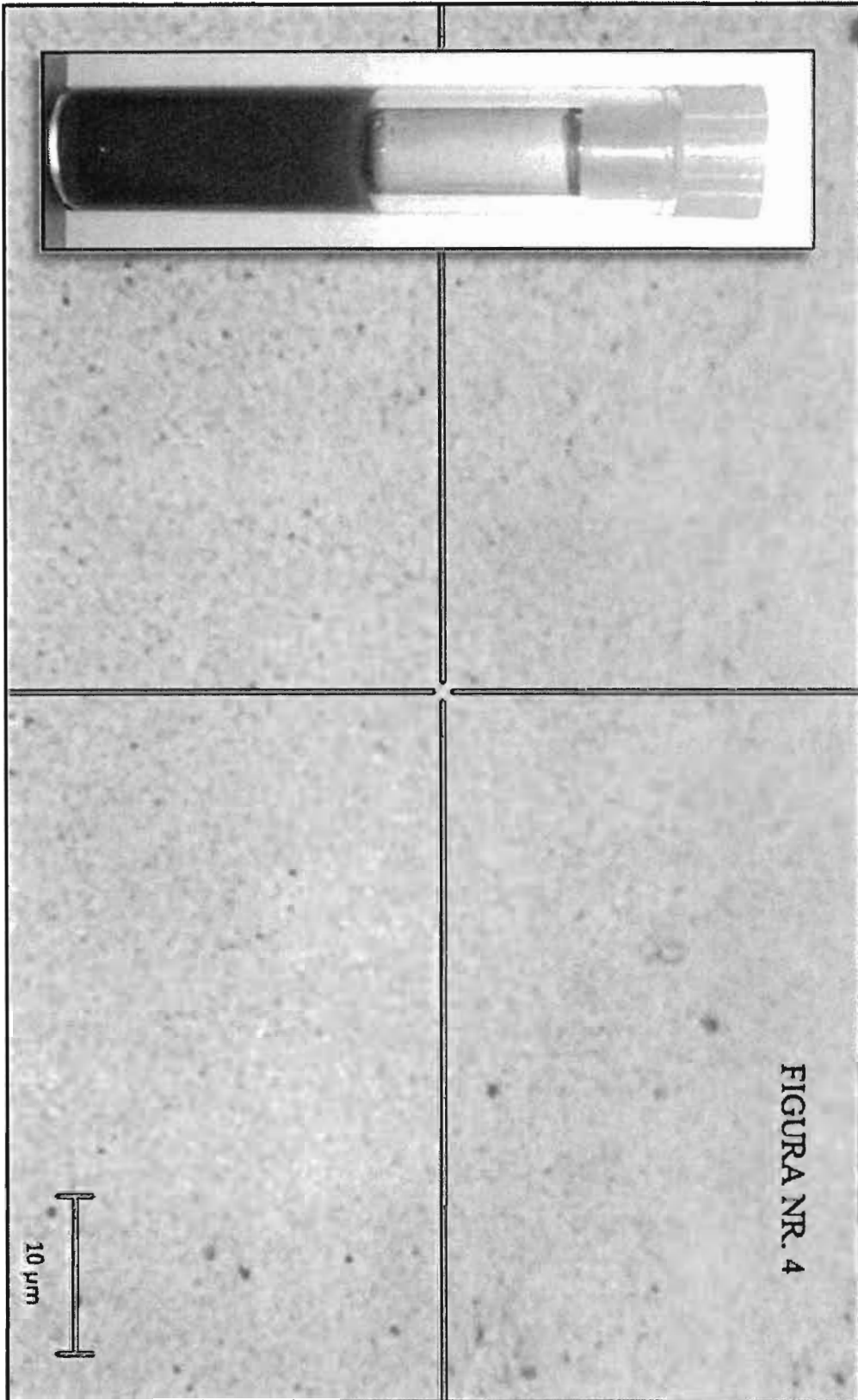


FIGURA NR. 3



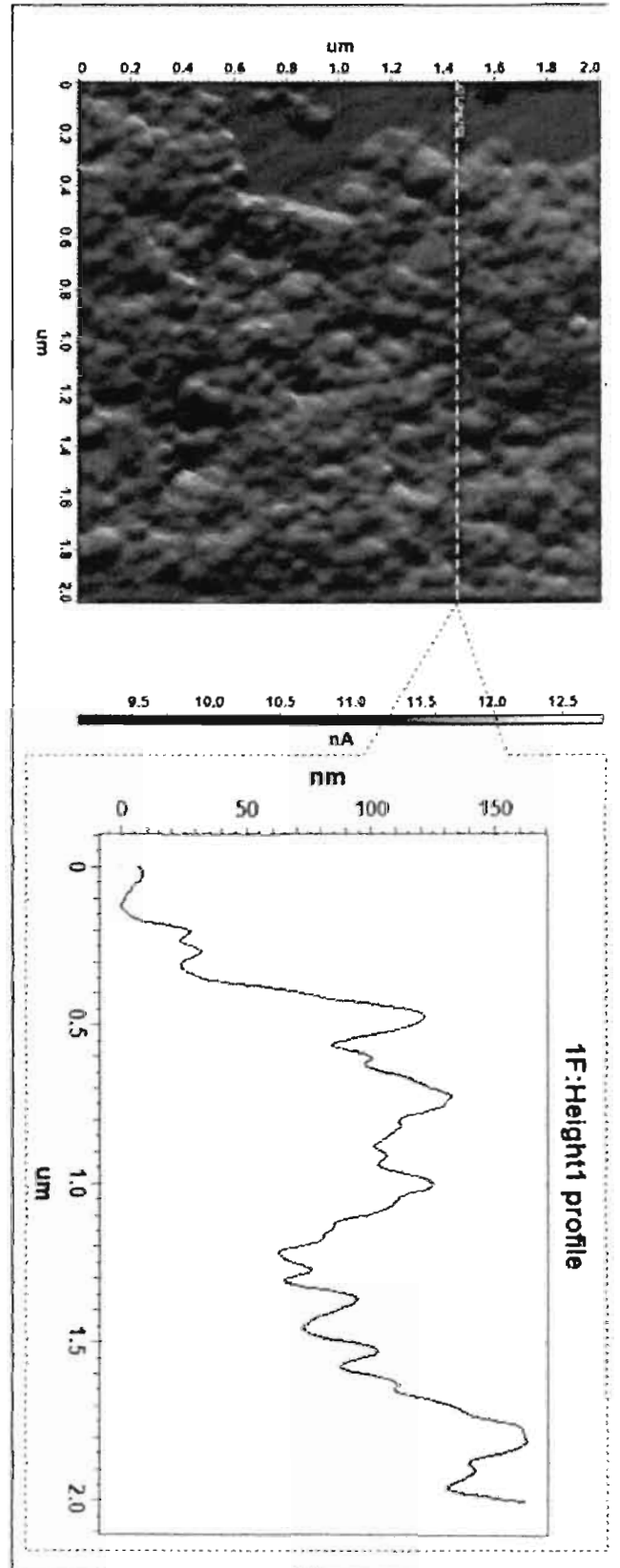


FIGURA NR. 5

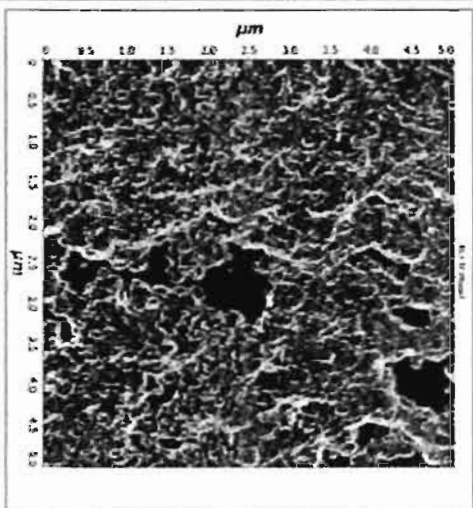
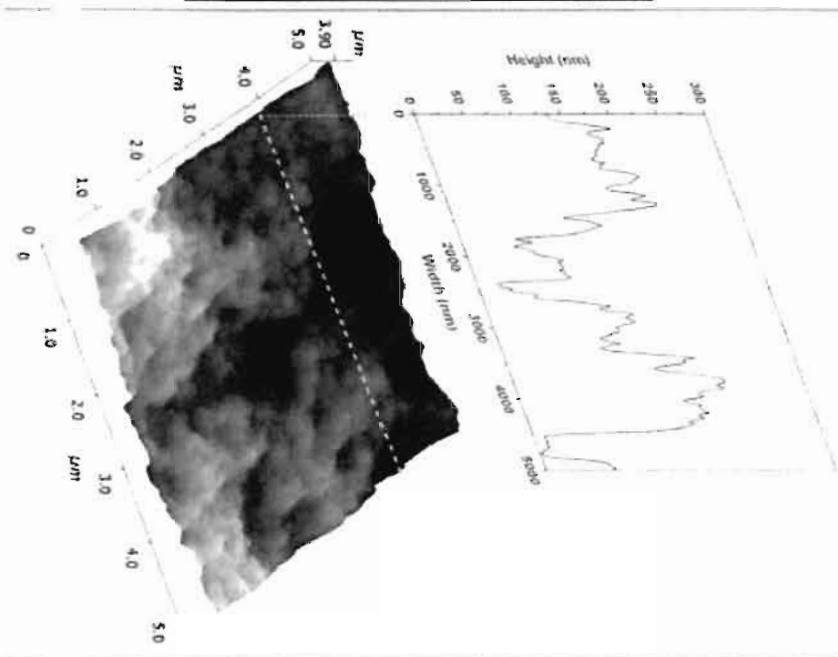
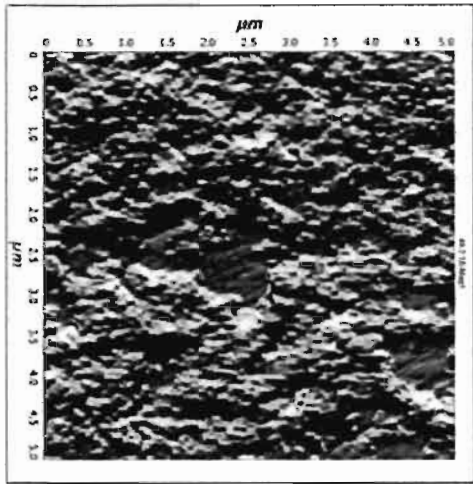
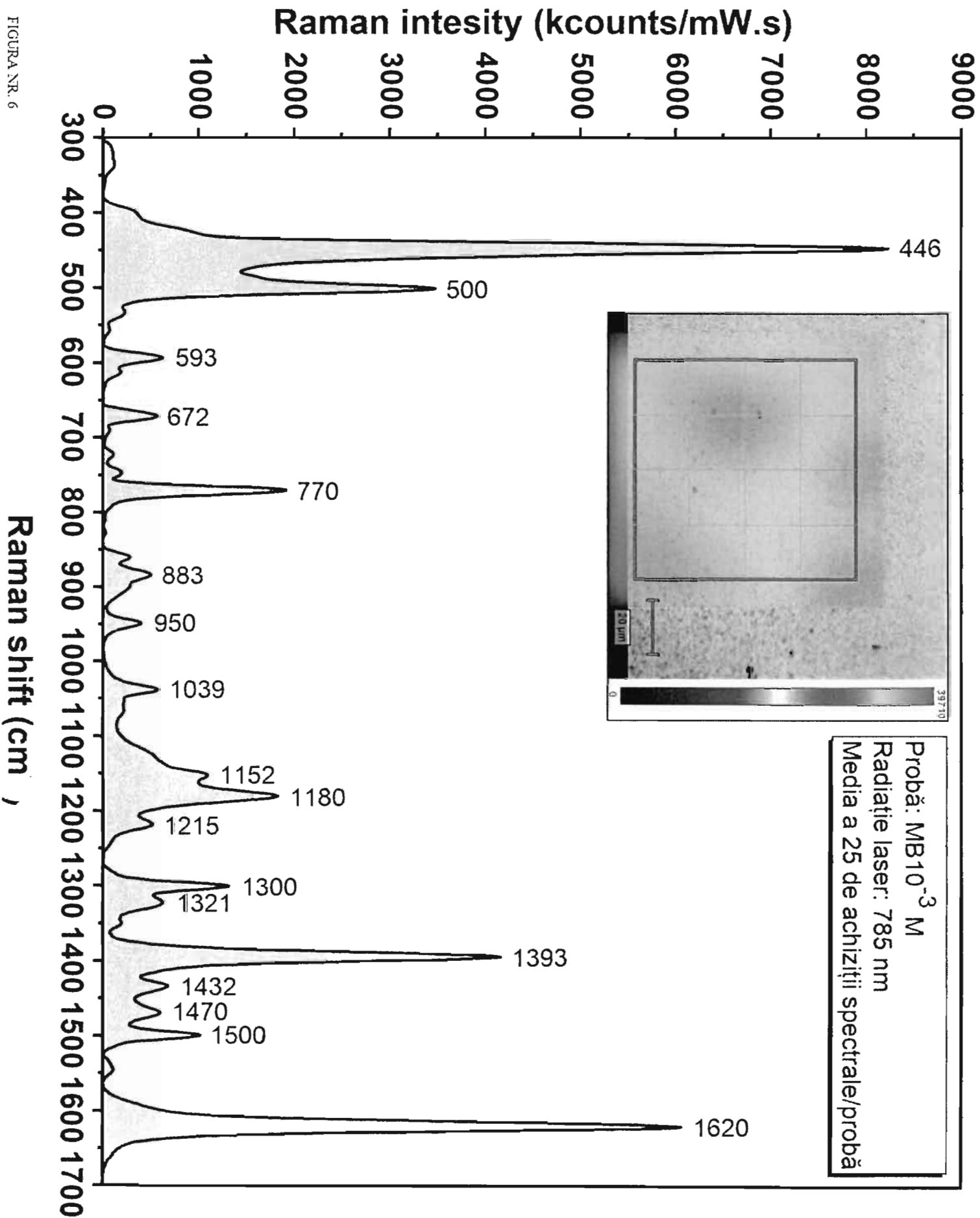
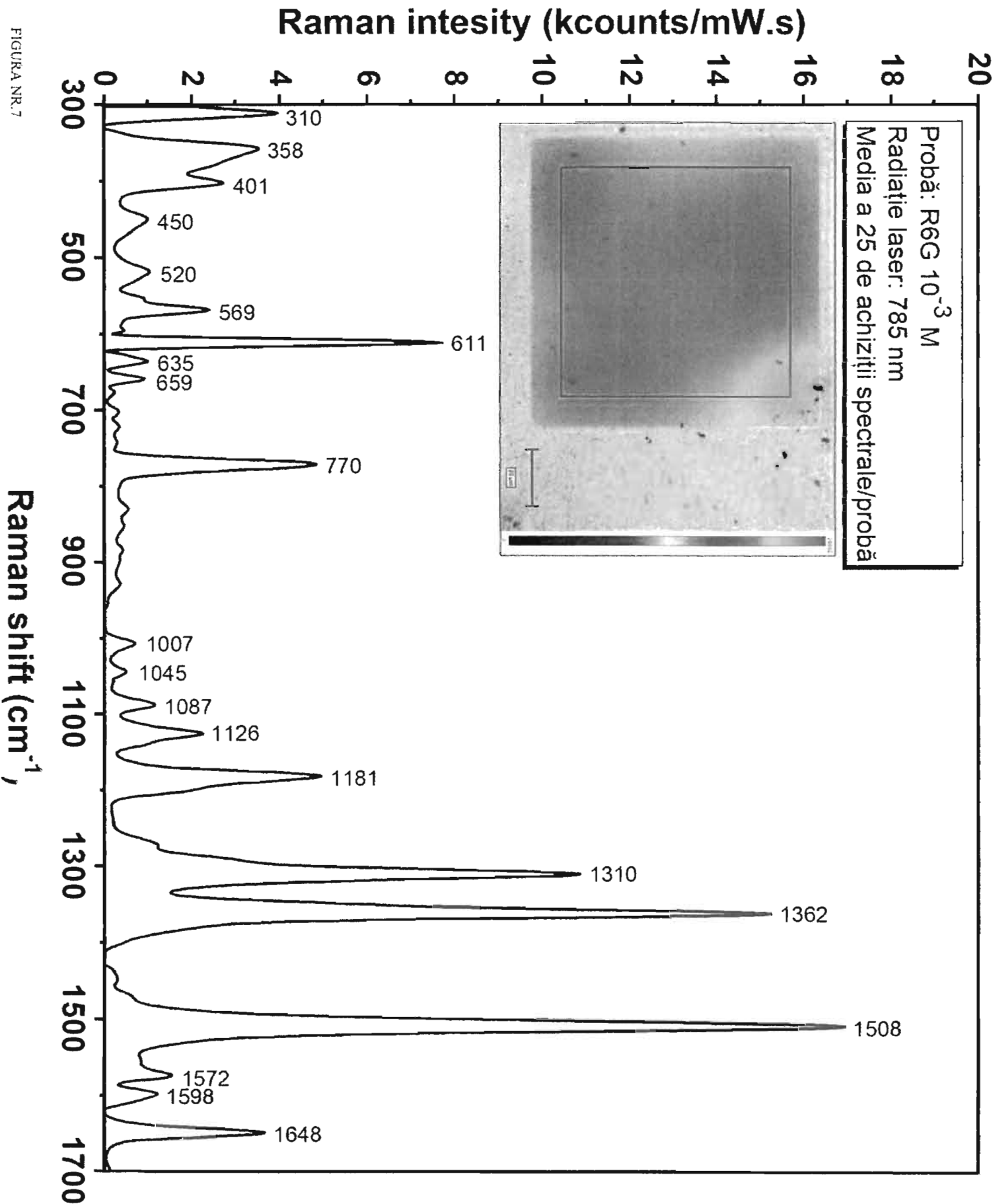


FIGURA NR. 6



5

FIGURA NR.7



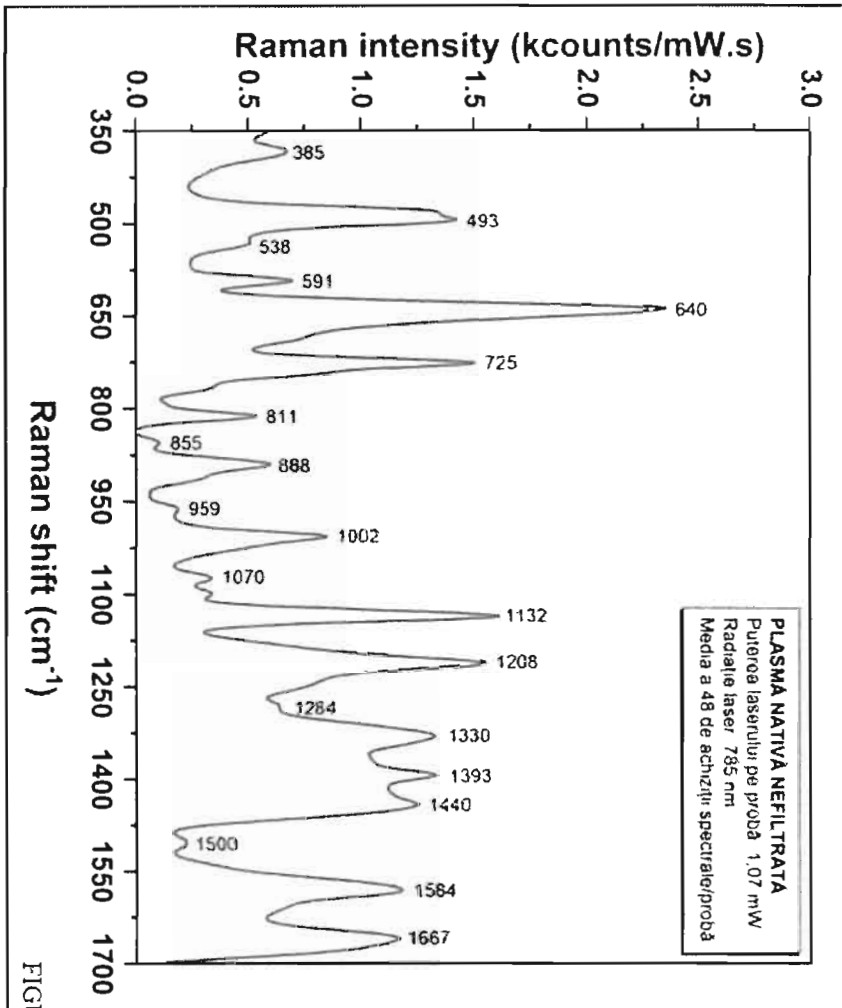
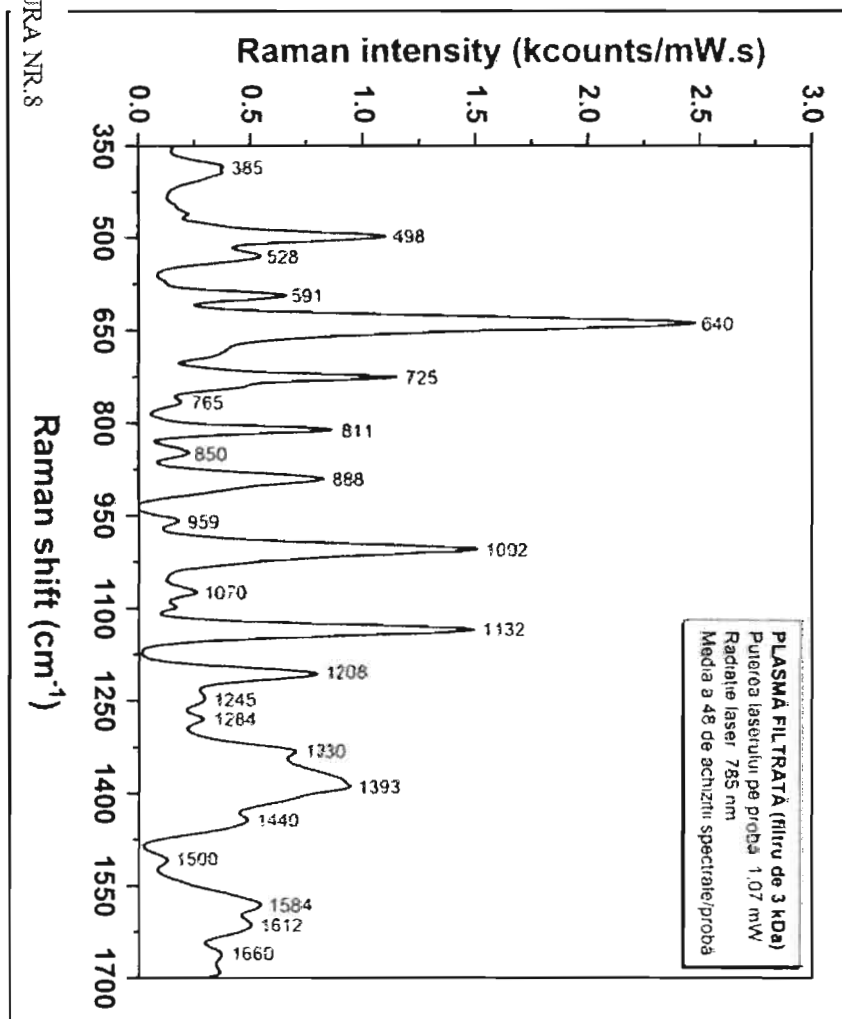


FIGURA NR.8



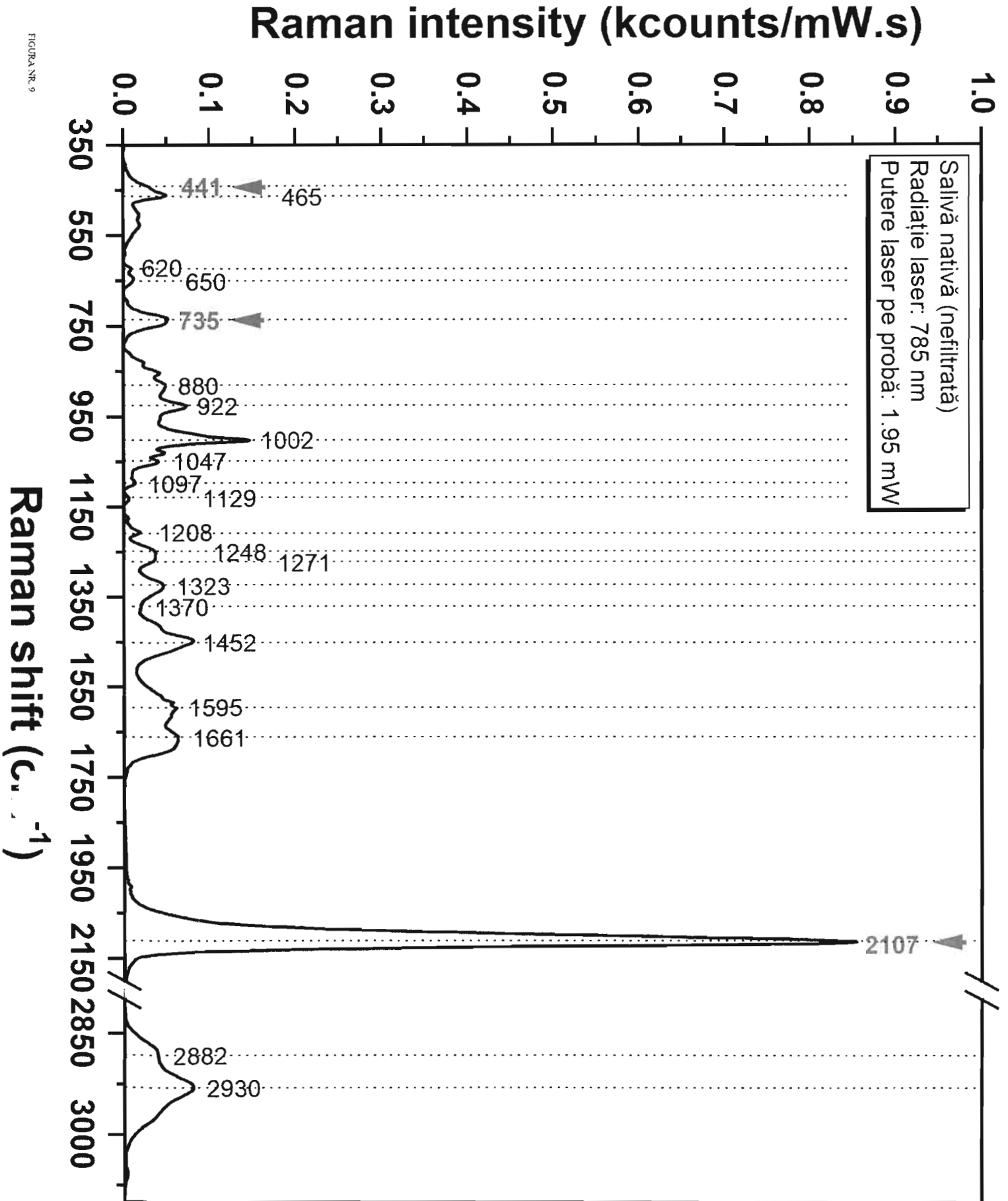


FIGURA NR. 9

