



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2021 00061

(22) Data de depozit: 18/02/2021

(41) Data publicării cererii:  
30/09/2021 BOPI nr. 9/2021

(71) Solicitant:  
• UNIVERSITATEA "BABEȘ-BOLYAI" DIN  
CLUJ-NAPOCA,  
STR. MIHAIL KOGĂLNICEANU NR.1,  
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO

(72) Inventatori:  
• FOCȘAN MONICA, ALEEA NECTARULUI,  
NR.6, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;

• CÂMPU ANDREEA, STR. RAHOVEI,  
NR.10, AP.34, SIBIU, SB, RO;  
• CRĂCIUN ANA MARIA,  
STR. EUGEN LOVINESCU, NR.10A, C2,  
AP.3, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;  
• AȘTILEAN SIMION, CALEA MANĂȘTUR,  
NR.99, AP.39, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO

(54) DISPOZITIV MICROFLUIDIC DE DETECȚIE FABRICAT  
PRIN INTEGRAREA DE HÂRTIE PLASMONICĂ  
CALIGRAFIATĂ ÎN POLIDIMETILSILOXAN

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un dispozitiv microfluidic hibrid folosit în aplicații de senzorială pentru detecția unor analiți de interes, prin trei metode de detecție în timp real, în flux continuu de analit, și anume: spectroscopia de rezonanță plasmonică localizată de suprafață, spectroscopia Raman amplificată de suprafață și spectroscopia de fluorescență. Dispozitivul microfluidic, conform invenției, este alcătuit din hârtie caligrafiată în joncțiune Y cu ajutorul unui stilou umplut cu cerneală coloidală pe bază de nanoparticule bipiramidale de aur, AuBPs, integrată între două straturi de polidimetilsiloxan, ansamblul astfel creat fiind conectat prin intermediul unor tuburi la un set de seringi automatizate care lucrează în tandem și controlează atât injectarea cât și eliminarea și colectarea controlată a lichidului din interiorul dispozitivului.

Revendicări: 4

Figuri: 6

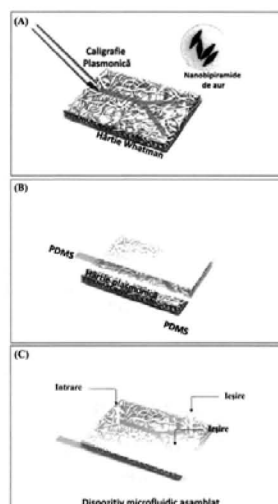


Fig. 1

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).



|  |
|--|
| OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI |
| Cerere de brevet de invenție             |
| Nr. <u>a 2021 00061</u>                  |
| Data depozit <u>18-02-2021</u>           |

## Descrierea invenției

### *Precizarea domeniului tehnic în care poate fi folosită invenția*

Prezenta invenție cu titlul **Dispozitiv microfluidic de detecție fabricat prin integrare de hârtie plasmonică caligrafiată în polidimetilsiloxan** revendică un procedeu original de fabricare a unui dispozitiv care să funcționeze ca senzor plasmonic versatil, flexibil și portabil cu aplicabilitate în detecția spectroscopică a diversilor analiți în condiții impuse la fața locului (point-of-care, POC). Acest dispozitiv combină cu succes injectarea controlată a analiților de interes în flux continuu cu expunerea acestora în imediata vecinătate a nanoparticulelor plasmonice caligrafiate controlat într-o matrice 3D de hârtie de filtru poroasă Whatman Nr. 1. Nanoparticulele plasmonice anizotrope joacă rolul unor (nano)antene plasmonice eficiente care traduc prezența analiților.

În această invenție am propus un procedeu de obținere a unui dispozitiv microfluidic portabil utilizat în domeniul senzoricității ce constă în integrarea între două straturi de PDMS a unei hârtii de filtru, pe care am imobilizat controlat nanoparticule bipiramidale de aur (AuBPs). Procedeu, conform invenției, constă în trasarea pe hârtie Whatman Nr.1, printr-o procedură inovativă de caligrafie plasmonică, a unor linii plasmonice în formă de Y utilizând un stilou Herlitz comercial având cartușul umplut cu AuBPs disponibile în soluție apoasă, cu proprietăți optice și capacități senzoriale controlabile. Hârtia plasmonică astfel caligrafiată se integrează ulterior între două straturi de PDMS, rezultând așadar dispozitivul plasmonic hibrid final, corespunzător pentru detecția și identificarea simultană, în timp real, în flux laminal a unor analiți de interes. Hârtia, datorită capacităților de absorbție a lichidelor, acționează ca un canal microfluidic natural combinând astfel avantajele acesteia precum flexibilitate, biocompatibilitate, portabilitate, miniaturizare, suprafața de contact generoasă, cu cele ale canalelor microfluidice ce permit un flux laminal și un volum redus al probei testate, dar și un timp redus de analiză.

### *Indicarea stadiului anterior al tehnicii și indicarea documentelor care stau la baza acesteia*

Un efort deosebit continuă să fie acordat în lumea științifică dezvoltării de dispozitive inovatoare ieftine, dar eficiente, de tip Point-of-Care (POC) pentru implementarea lor directă și imediată în diferite aplicații specifice (bio)medicale de interes, în vederea îmbunătățirii calității vieții (*Sensors* **2020**, 20, 1951; *Biosensors and Bioelectronics* **2016**, 77, 774-789). În

prezent, dispozitivele existente prezintă propriile lor avantaje și limitări. Problemele importante pentru care încă se caută o soluție viabilă sunt legate de flexibilizarea acestora, miniaturizarea, portabilitatea, diminuarea efectelor invazive, reducerea costurilor de fabricare, stabilitatea pe termen lung, capacitatea de biodetecție în timp real, direct la fața locului, etc. Momentan, pentru fabricarea de dispozitive microfluidice de tip POC se folosește PDMS, dar, din păcate, pentru a integra biosenzori într-un astfel de dispozitiv, sunt necesare strategii laborioase în mai mulți pași de pre-activare a suprafeței, de funcționalizare și imobilizare a transductorilor plasmonici (*Nanotechnology* **2020**, 31, 335502).

***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***

Prin procedeul propus de noi, de obținere a dispozitivului microfluidic hibrid, am eliminat metoda clasică, complicată și laborioasă, de integrare a nanoparticulelor plasmonice într-un canal microfluidic, rezultând astfel un dispozitiv hibrid flexibil, stabil, reproductibil, portabil și miniaturizat, cu capacități de detecție multimodală în timp real. Pe scurt, dispozitivul a fost implementat pentru trei metode de detecție în timp real, în flux continuu de analit, și anume spectroscopie de Rezonanță Plasmonică Localizată de Suprafață (eng. LSPR), Spectroscopie Raman Amplificată de Suprafață (eng. SERS) și spectroscopie de fluorescență.

Primul pas efectuat a fost obținerea hârtiei plasmonice (**Figura 1A**) prin i) producerea „cernelii plasmonice” conținând suspensii coloidale de AuBPs preparate printr-o metodă de sinteză chimică în doi pași (*Anal. Chem.* **2018**, 90, 14, 8567–8575) și ii) depunerea și imobilizarea AuBPs pe hârtie de filtru (Whatman No.1) realizată prin caligrafie plasmonică folosind un stilou comercial încărcat cu „cernela plasmonică”. Hârtie de filtru (Whatman No.1) asigură interferență neglijabilă cu alți compuși utilizați în fabricarea acesteia, datorită conținutului de 98%  $\alpha$ -celuloză. De asemenea, datorită atracției electrostatice dintre fibrele de celuloză și stratul de surfactant CTAB ce acoperă suprafața nanoparticulelor în urma sintezei, acestea sunt adsorbite eficient pe fibrele de celuloză. În plus, structura sa 3D de micro-nanofibre interconectate îi conferă acesteia atât flexibilitatea cât și abilitatea de a funcționa ca un canal microfluidic natural. Menționăm faptul că am ales nanoparticule anizotrope de formă bipiramidală pe post de cerneală plasmonică deoarece vârful lor extrem de ascuțite

la cele două capete concentrează un câmp electromagnetic localizat amplificat, oferindu-le astfel avantajul de a putea fi implementate ca nanosenzori plasmonici versatili și ultrasensibili în aplicații spectroscopice amplificate de plasmoni (*Acc. Chem. Res.* **2019**, 52, 2136–2146). Așadar, am trasat controlat o linie plasmonică activă și extrem de eficientă în formă de „Y” cu lățimea de 1 mm pe substratul de hârtie de filtru. Apoi, acest protocol de caligrafie a fost repetat prin patru retrăsări succesive a mai multor linii plasmonice pe aceeași joncțiune inițială în Y pentru a controla densitatea optică a nanoparticulelor pe hârtie, obținând astfel o concentrație mai mare de nanoparticule imobilizate fără a avea modificări majore în spectrele de extincție. De reținut faptul că joncțiunea plasmonică în Y permite pe viitor personalizarea platformei pentru detecție multiplexată de analiți, sau pentru funcționalizarea selectivă a liniei plasmonice cu diferite elemente de recunoaștere pentru a detecta biomarkeri specifici ai cancerului prin interacțiuni specifice de tip anticorp-antigen, putându-se astfel transfera dispozitivul direct într-o varietate de aplicații de tip POC .

Următorul pas tehnologic în procesul de proiectare a dispozitivului a fost de a integra hârtia caligrafiată plasmonic, obținută în etapa anterioară între două straturi de PDMS, cunoscut ca fiind un elastomer transparent din punct de vedere optic și biocompatibil (**Figura 1B**). Așadar, am folosit un kit SYLGARD 184 de la Dow Corning, format din pre-polimer și agent de întărire, pe care le-am amestecat într-un raport de 10:1, pentru a obține cele două straturi de PDMS identice. Cel folosit ca strat inferior a fost tratat termic pentru 15 minute la 65 °C, pe când cel folosit ca strat superior a fost tratat termic pentru 25 minute la 65 °C. Pentru asamblarea finală a dispozitivului, am integrat hârtia caligrafiată între cele două straturi de PDMS și am continuat tratamentul pentru încă 30 de minute. **Figura 1C** prezintă schema ilustrativă 3D finală a dispozitivului microfluidic hibrid asamblat, în care se poate evidenția un tub de intrare prin care se va injecta soluția de analizat și două tuburi de ieșire care vor permite scurgerea, respectiv eliminarea acesteia din interiorul dispozitivului microfluidic. Comparativ, **Figura 2** ilustrează imaginea digitală a dispozitivului microfluidic hibrid final obținut în configurația experimentală având integrată hârtia Whatman caligrafiată între cele două straturi de PDMS, evidențiind astfel flexibilitatea dar și robustețea acestuia.

Așa cum este prezentat în **Figura 3**, dispozitivului microfluidic hibrid asamblat este conectat prin tuburi PTFE (Elveflow) la un set de seringi automatizate NE-4000 NEW Era ce lucrează în tandem și controlează atât injectarea cât și eliminarea și colectarea controlată a lichidului din interiorul dispozitivului. Această configurație experimentală permite

implementarea a trei metode de detecție în timp real, în flux continuu de analit injectat, și anume spectroscopia de Rezonanță Plasmonică Localizată de Suprafață (eng. LSPR), Spectroscopia Raman Amplificată de Suprafață (eng. SERS) și spectroscopia de fluorescență.

Pentru testarea dispozitivului microfluidic plasmonic hibrid fabricat, am injectat în flux continuu albastru de metilenă (eng. MB, concentrație de  $10^{-5}$  M), cu un flux de infuzie de  $1 \mu\text{L} / \text{min}$ , și am urmărit detecția LSPR în timp real a moleculelor de analit ca și *proof-of-concept*. Joncțiunea plasmonică în Y din interiorul dispozitivului microfluidic a fost caracterizată optic folosind un spectrometru portabil OceanOptics USB 4000 cuplat la un microscop optic inversat Zeiss Axio Observer Z1 printr-o fibră optică de  $600 \mu\text{m}$ . În **Figura 4** sunt prezentate spectrele de extincție normalizate ale AuBPs înainte (în stare coloidală, spectrul negru) și după caligrafierea acestora (spectrul roșu) pe fibrele de celuloză prin noua metodă de caligrafie propusă. Din spectrele de extincție colectate putem observa că AuBPs își conservă proprietățile optice după caligrafie pe hârtie, în spectru fiind vizibile ambele lor benzi plasmonice caracteristice, dar și o deplasare așteptată a benzii longitudinale către lungimi de undă mai mici (de la  $813$  la  $777$  nm) datorită scăderii indicelui de refracție al mediului din jurul nanoparticulelor, de la  $1.333$  (indicele de refracție al apei) la  $1$  (indicele de refracție al aerului). Mai departe, după injectarea soluției de MB în dispozitivul proiectat și fabricat, spectrul de extincție colectat de pe linia plasmonică caligrafiată după grefarea MB (Figura 4, spectrul albastru) arată o deplasare suplimentară a benzii longitudinale spre lungimi de undă mai mari ( $817$  nm) ca urmare a modificării indicelui de refracție al mediului învecinat AuBPs, concomitent cu apariția în spectru în jurul valorii de  $675$  nm a benzii electronice de absorpție a moleculelor de MB, demonstrând astfel detecția LSPR în timp real a analitului MB în flux laminal.

Mai departe, capacitatea dispozitivului de detecție multimodală în timp real a moleculelor de MB este demonstrată prin măsurători SERS, o tehnică ultrasenzitivă și ultrasensibilă utilizată intensiv în ultima decadă pentru identificarea amprenteii vibraționale a moleculelor de interes situate în vecinătatea nanoparticulelor, aducând informații complementare față de tehnică precedentă. Așadar, **Figura 5** prezintă comparativ spectrele Raman ale hârtiei Whatman, stratului de PDMS, hârtiei Whatman integrată în PDMS, moleculelor de MB pe hârtia integrată în PDMS, lângă linia caligrafiată plasmonic, precum și spectrul SERS ale moleculelor de MB captate pe suprafața AuBPs imobilizate în prealabil pe hârtie prin caligrafie, utilizând ca și sursă de excitație o diodă laser la lungimea de undă  $785$

nm, parte integrantă a unui spectrometru Raman portabil Raman Systems R3000CN. Așa cum ne așteptam, prezența modurilor vibraționale caracteristice moleculei MB la  $1071\text{ cm}^{-1}$  (C – H in-plane bending),  $1139\text{ cm}^{-1}$  (C – H out-of-plane bending),  $1356\text{ cm}^{-1}$  (C—H in-plane ring deformation),  $1422\text{ cm}^{-1}$  (C – N asym. stretching),  $1497\text{ cm}^{-1}$  (C – C ring stretching), atribuite conform datelor din literatura de specialitate (*Chemical Physics Letters* **2007**, 447, 305-309; *Thin Solid Films*, **2010**, 518, 7128-7132), demonstrează identificarea cu succes a analitului MB în flux laminal datorită amplificării semnalului de către câmpul electromagnetic generat de către AuBPs caligrafiate pe hârtie.

În final, am exploatat spectroscopia de fluorescență, o altă metodă spectroscopică bine cunoscută ce a stârnit în ultimii ani un interes considerabil în cadrul comunității științifice datorită rolului ei important în detecția ultrasensibilă (*Chem Asian J.* **2020**, 15, 3180 – 3208). Prezența nanostructurilor de metal nobil, poate influența semnalul de fluorescență al fluoroforilor de interes situați în vecinătatea acestora. Așadar, capacitatea dispozitivului hibrid proiectat de a detecta semnale de fluorescență în flux continuu a fost mai departe testată utilizând un accesoriu de epifluorescență, și anume modulul EFA 383, atașat unui spectrofluorimetru Jasco LP 6500, cu o rezoluție spectrală de 1 nm și echipat cu o lampă de Xenon ca sursă de excitație. **Figura 6** prezintă spectrul de emisie de fluorescență a moleculelor MB injectate în dispozitiv, colectat lângă linia plasmonică, pe hârtie, ca și spectru de referință (spectrul negru) comparativ cu spectrul colectat pe linia plasmonică caligrafiată (spectrul albastru), folosind o lungime de undă de excitație de 670 nm. Spectrele de fluorescență colectate în timp real demonstrează atât capilaritatea dispozitivului, precum și abilitatea lui de detecție de fluorofori în flux laminal în timp real. Prin personalizare, acest dispozitiv portabil și versatil poate fi transferat direct în aplicații specifice de biosenzoristică de tip POC.

## Desene

**Figura 1** reprezintă schema ilustrativă 3D a dispozitivului microfluidic plasmonic integrat, prezentând pașii tehnologici urmați în procesul de asamblare al acestuia.

**Figura 2.** Imaginea digitală a dispozitivului microfluidic hibrid final obținut în configurația experimentală prin integrarea unei hârtii Whatman numărul 1 -caligrafiată cu nanoparticule bipiramidale de aur disponibile în soluție apoasă- între două straturi de polidimetilsiloxan (PDMS), evidențiând astfel (A) flexibilitatea și (B) profilul dispozitivului hibrid.

**Figura 3** prezintă montajul experimental implementat în procesul de detecție multiplă în interiorul dispozitivului microfluidic hibrid dezvoltat.

**Figura 4.** Testarea dispozitivului microfluidic plasmonic hibrid fabricat pentru detectarea LSPR în timp real a moleculei de analit, albastru de metilenă (MB), în flux laminar. Spectrul de extincție normalizat UV-Vis-NIR al nanobipiramidelor de aur sintetizate în soluție coloidală înainte (spectrul negru) și după imobilizarea pe hârtie prin caligrafie plasmonică (spectrul roșu), respectiv după injectarea MB în interiorul dispozitivului (spectrul albastru).

**Figura 5.** Testarea dispozitivului microfluidic plasmonic hibrid fabricat pentru detectarea SERS în timp real a moleculei de analit, albastru de metilenă (MB), în flux laminar.

**Figura 6.** Testarea dispozitivului microfluidic plasmonic fabricat pentru detectarea emisiei de fluorescență a moleculei de analit albastru de metilenă (MB) în flux laminar. Spectrul de emisie de fluorescență a MB injectată în dispozitiv, colectat lângă linia plasmonică, pe hârtie ca și spectru de referință (spectrul negru) comparativ cu spectrul colectat pe linia plasmonică caligrafiată (spectrul albastru).

**Revendicări:**

1. Dispozitiv microfluidic hibrid bazat pe hârtie caligrafiată cu ajutorul unui stilou umplut cu cerneală coloidală pe bază de nanoparticule bipiramidale de aur (AuBPs) în joncțiune Y și apoi integrată între două straturi de polidimetilsiloxan (PDMS), **caracterizat prin aceea că** liniile plasmonice caligrafiate și immobilizate controlat pe fibrele de celuloză prezintă un grad ridicat de stabilitate, eficiență și reproductibilitate.
2. Dispozitiv microfluidic hibrid conform cu revendicarea 1, **caracterizat prin aceea că** permite injectarea, scurgerea precum și eliminarea controlată a analiților de interes în flux continuu din circuitul microfluidic proiectat.
3. Dispozitiv microfluidic hibrid conform cu revendicarea 1, **caracterizat prin aceea că** analiții injectați în dispozitiv sunt expuși în imediata vecinătate a AuBPs caligrafiate, folosite ca și (nano)antene plasmonice eficiente datorită proprietăților optice și capacităților senzoriale controlabile.
4. Dispozitiv microfluidic hibrid conform cu revendicarea 1, **caracterizat prin aceea că**, gradul de capilaritate al dispozitivului permite implementarea detecției în timp real prin spectroscopie de Rezonanță Plasmonică Localizată de Suprafață (LSPR), Spectroscopie Raman Amplificată de Suprafață (SERS) și spectroscopie de fluorescență, în flux laminar de lichid în circuit microfluidic.



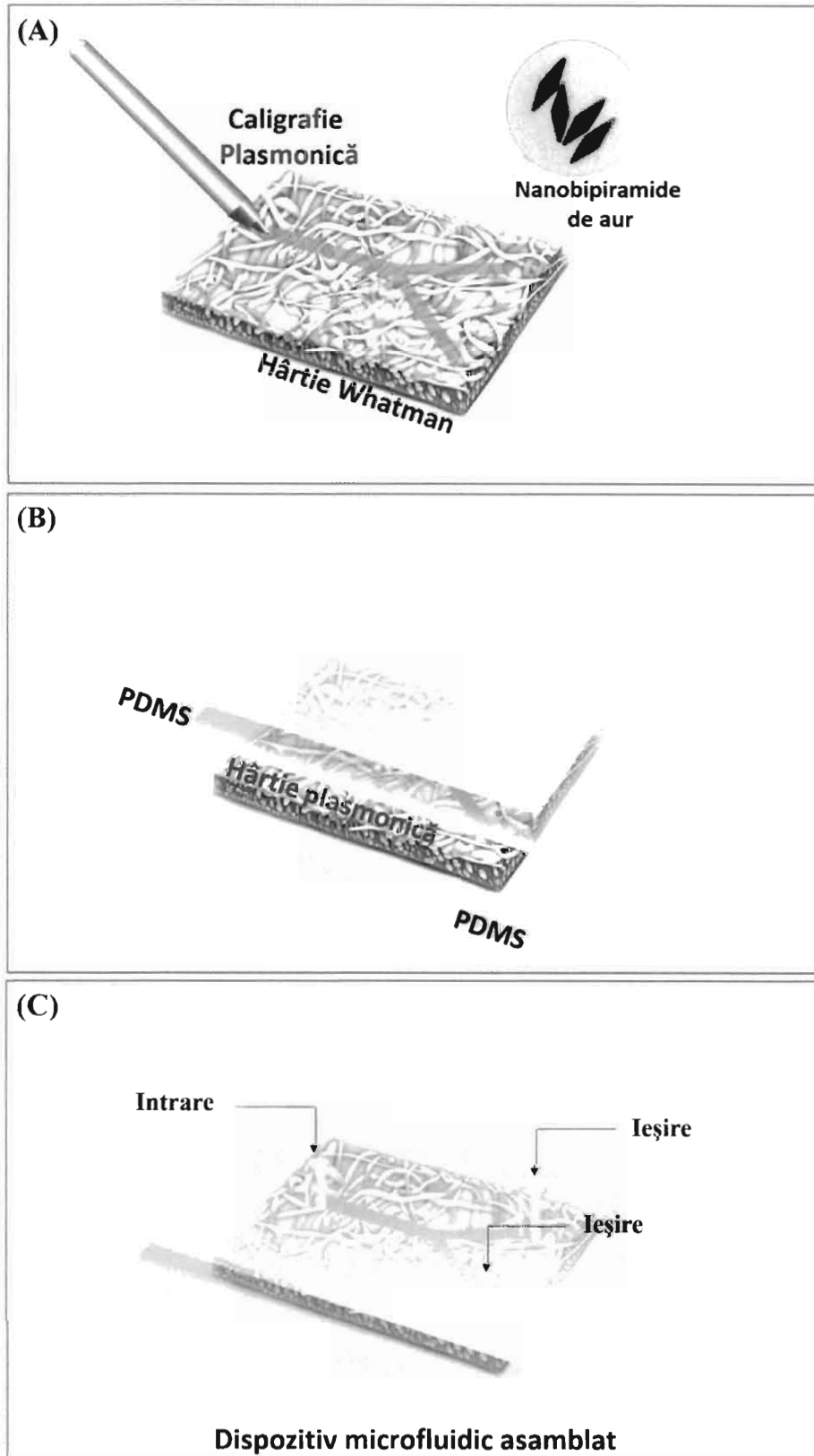


Figura 1.

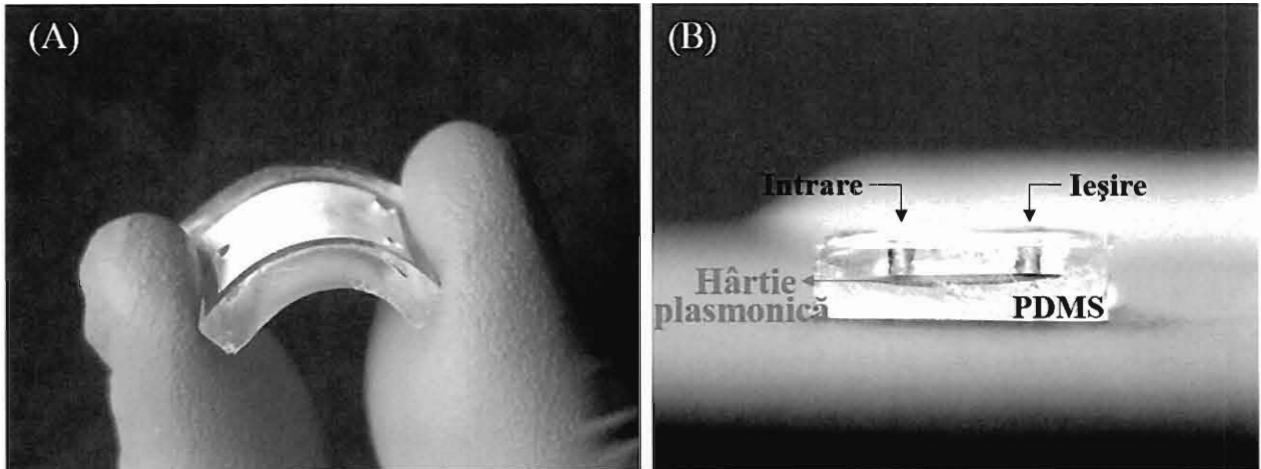


Figura 2.

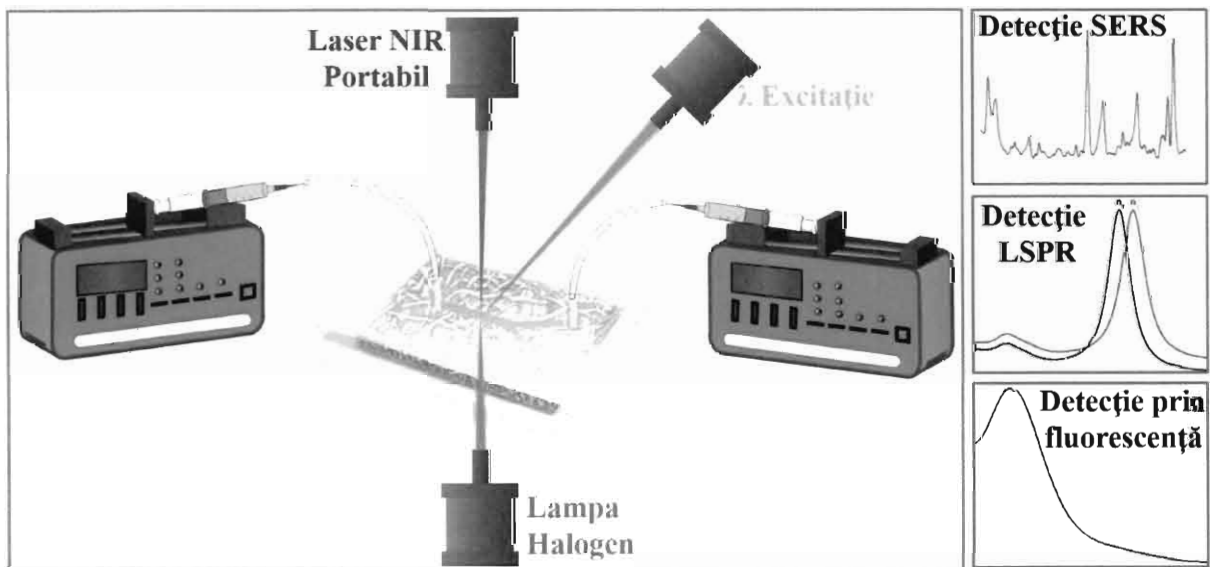
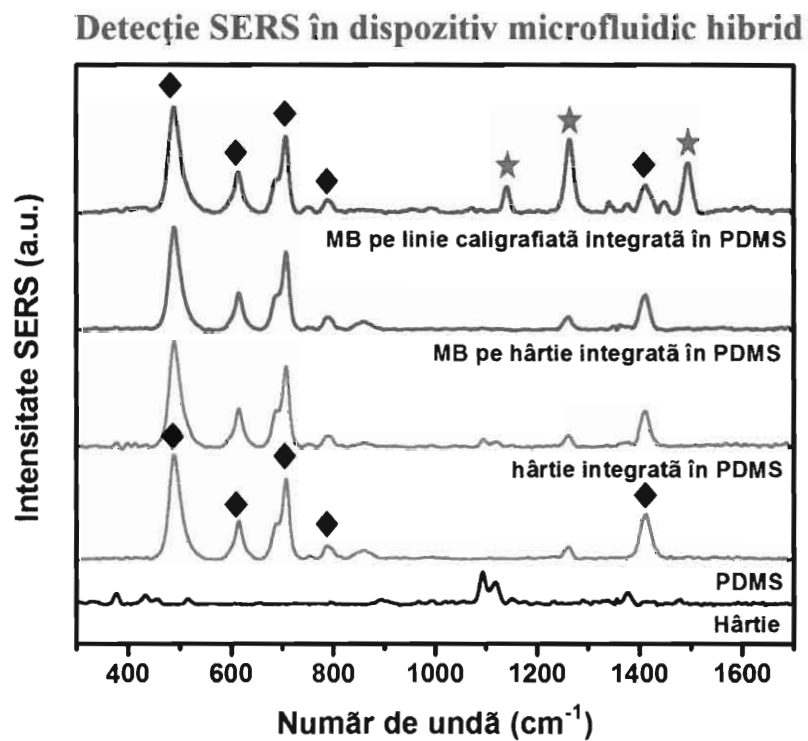
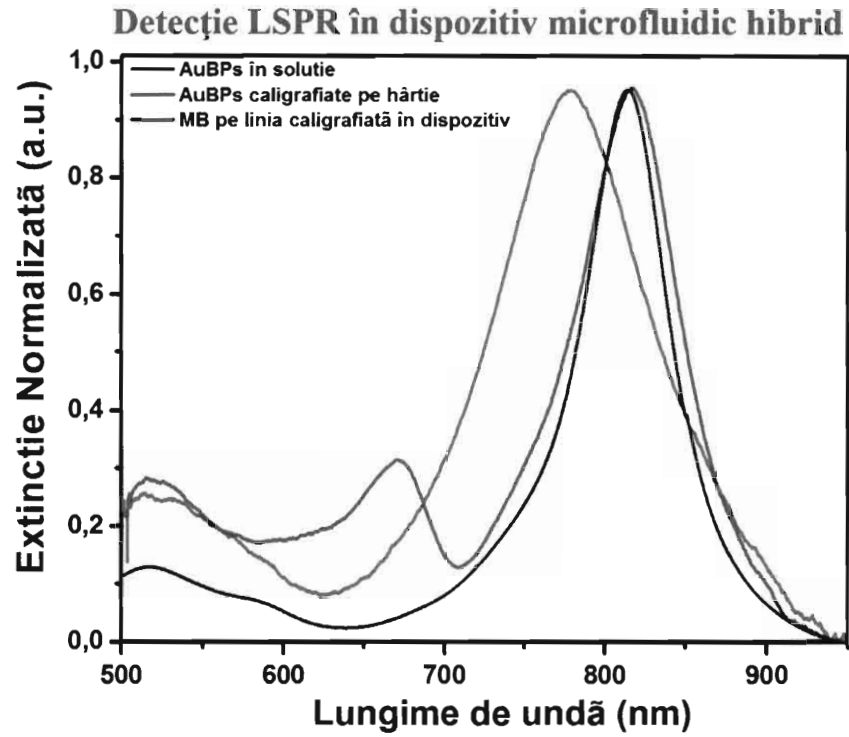


Figura 3.



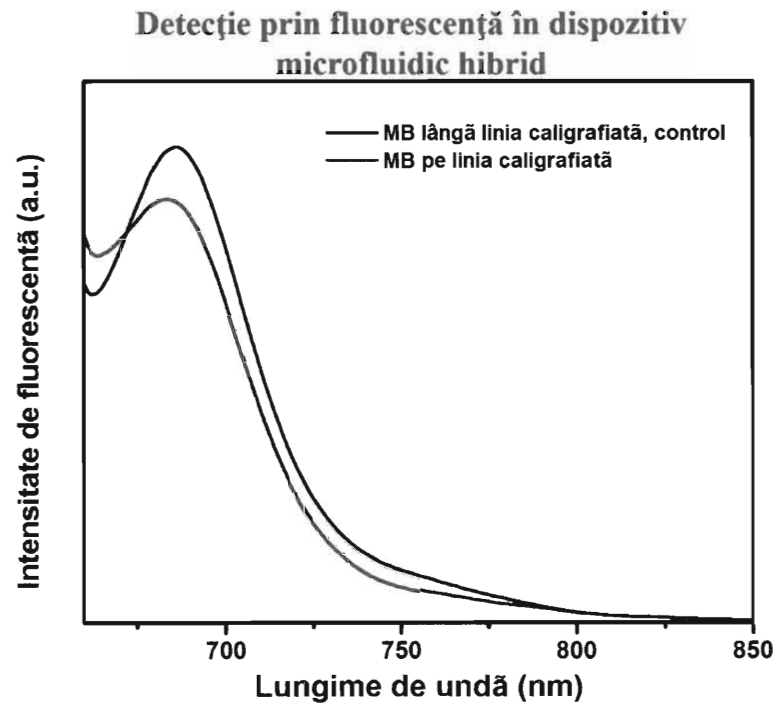


Figura 6.