



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2022 00293

(22) Data de depozit: 30/05/2022

(41) Data publicării cererii:
28/10/2022 BOPi nr. 10/2022

(71) Solicitant:
• UNIVERSITATEA "BABEȘ-BOLYAI" DIN
CLUJ-NAPOCA,
STR. MIHAIL KOGĂLNICEANU NR.1,
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
• UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI
FARMACIE "IULIU HAȚIEGANU"
CLUJ-NAPOCA, STR. VICTOR BABEȘ
NR. 8, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO

(72) Inventatori:
• CÂMPU ANDREEA- MARIA,
STR. RAHOVEI, NR.10, AP.34, SIBIU, SB,
RO;

• MUREȘAN ILINCA-TEODORA,
STR. FAGULUI, NR.10, SAT VIIȘOARA,
COMUNA VIIȘOARA, CJ, RO;
• POTARA MÓNICA, STR. POET GR.
ALEXANDRESCU, NR.29, AP.24,
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
• AȘTILEAN SIMION, CALEA MANĂȘTUR,
NR.99, AP.39, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
• CĂINAP SIMONA SORANA,
STR. ION C. BRĂȚIANU, NR.4, ET.2, AP.8,
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
• FOCȘAN MONICA-OLIVIA,
ALEEA NECTARULUI, NR.6,
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO

(54) NANOSENZOR PLASMONIC EFICIENT PE BAZĂ
DE NANOBIPIRAMIDE DE AUR PENTRU DETECȚIA
MULTIMODALĂ A BIOMARKER-ULUI CARDIAC
TROPONINĂ I

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui nanosenzor plasmonic pe bază de nanobipiramide de aur cu suprafață chimică versatilă care permite legarea covalentă a elementului de recunoaștere specific al biomarkerului cardiac troponină I, și implicit detecția multimodală specifică și în timp real a acestuia prin exploatarea nanoparticulelor metalice ca nanoantene și generatori termoplasmonici eficienți. Procedeu conform invenției are următoarele etape de realizare:

1) obținerea substratului plasmonic prin depunerea prin picurare controlată a AuBPs coloidale pe o lamelă de sticlă pre-silanizată,

2) funcționalizarea substratului plasmonic cu molecula reporter Raman para-aminotiofenol și a agentului de crosslinking pentru proteine, respectiv glutaraldehida, pentru a asigura legarea anticorpului specific troponinei I,

3) biofuncționalizarea cu anticorpul monoclonal anti-cTnI și captarea eficientă și specifică de către acesta a biomarkerului cardiac troponină I și

4) detectarea multimodală eficientă și specifică a biomarkerului cTnI prin implementarea a trei tehnici de detecție complementare, respectiv Rezonanță

Plasmonică de Suprafață Localizată (LSPR), Spectroscopie Raman Amplificată de Suprafață (SERS) și detecție termoplasmonică prin colectarea de hărți termografice.

Revendicări: 4
Figuri: 7

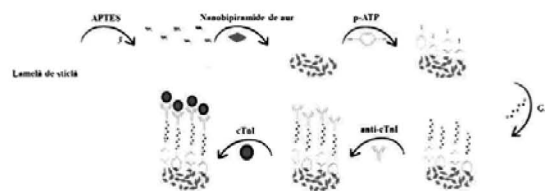


Fig. 3

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).



OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MARCI	
Cerere de brevet de invenție	
Nr.	022200293
Data depozit	30-05-2022

15

Descrierea invenției

Titlul invenției

Nanosenzor plasmonic eficient pe bază de nanobipiramide de aur pentru detecția multimodală a biomarker-ului cardiac troponină I

Precizarea domeniului tehnic în care poate fi folosită invenția

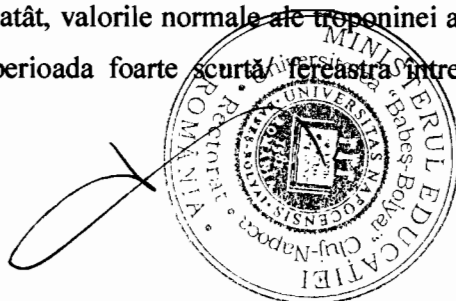
Troponina este un biomarker esențial atât pentru diagnosticarea infarctului miocardic acut (IMA), cât și a altor patologii, ca de exemplu: tromboembolismul pulmonar, bolile cardiace congenitale, endocardita infecțioasă, șocul septic, traumatisme multiple, hemoragii intracerebrale, insuficiență cardiacă acută.

Un grup special îl reprezintă populația pediatrică; chiar dacă numărul sindroamelor coronariene acute este redus, determinarea nivelului troponinei aduce informații importante în diferite patologii: tahicardia paroxistică supraventriculară, cardiotoxicitatea indusă de chimioterapie, asfizia neonatală, cardiomiopatii, miocardite, boala Kawasaki. Monitorizarea troponinei la pacienții cu boli cardiace congenitale permite un triaj mai bun al acestora în vederea stabilirii momentului operator.

Troponina ocupă un loc special în contextul actual al pandemiei COVID, creșterea valorilor acesteia fiind confirmate ca factor de prognostic negativ în evoluția pacienților cu MSOF (insuficiență multiplă de organ), tromboembolism pulmonar, sepsis, insuficiență renală acută. De asemenea, troponina are un rol important în diagnosticul și evaluarea riscului la pacienții cu Sindrom inflamator multisistemic postCOVID, pacienții cu miocardită asociată infecției COVID sau postvaccinare.

Conform recomandărilor celui mai recent ghid al Societății Europene de Cardiologie (*ESC Scientific Document Group, "Fourth universal definition of myocardial infarction" (2018)*), determinarea troponinei prin testul hs-cTN (high sensitivity troponin assay) are un rol central în diagnosticul IMA, valorile crescute ale troponinei reprezentând unul dintre criteriile obligatorii de diagnostic.

Datorită specificității și sensibilității ridicate a acestui biomarker cardiac, creșterea sau modificările în dinamică ale valorilor troponinei reprezintă un indicator pentru diagnosticul precoce al infarctelor de mici dimensiuni, care ar fi dificil de diagnosticat în alte condiții. Mai mult decât atât, valorile normale ale troponinei au o înaltă valoare predictivă negativă pentru IMA, iar perioada foarte scurtă, fereastra între debutul leziunilor miocardice și creșterea

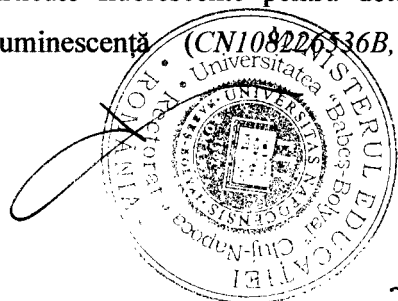


valorilor troponinei, a permis dezvoltarea unui algoritm "0/1h rule-in/rule -out" al IMA. Acest lucru se traduce în practică prin reducerea semnificativă a timpului de așteptare în serviciile de urgență, scăderea implicită a costurilor, dar mai ales prin creșterea ratei de detecție a IMA și reducerea semnificativă a intervalului de timp până la instituirea tratamentului optim, respectiv intervenția coronariană percutană. Toate aceste aspecte sunt deosebit de importante, nu numai pentru managementul pacientului în faza acută, dar și pentru stabilirea prognosticului acestuia.

În acest context, prezenta invenție cu titlul *Nanosenzor plasmonic eficient pe bază de nanobipiramide de aur pentru detecția multimodală a biomarker-ului cardiac troponină I* se referă la dezvoltarea unui nanosenzor plasmonic robust cu abilități de detecție multimodală eficientă și specifică în timp real a biomarker-ului cardiac troponină I (cTnI) cu aplicație directă în diagnosticul afecțiunilor cardiace. Această nanoplatformă exploatează cu succes proprietățile optice unice ale nanobipiramidelor de aur (AuBPs), utilizate atât ca nanoantene, cât și ca generatori termoplasmonici eficienți. Pe lamele de sticlă pre-tratate prin procesul de silanizare s-au imobilizat AuBPs obținute în soluție coloidală, astfel obținându-se substraturi plasmonice cu proprietăți optice și capacități de conversie a luminii în căldură modulabile. Nanoplatforma plasmonică fabricată a fost apoi funcționalizată folosind un protocol de detecție de tip „sandwich”, dezvoltându-se astfel o metodă simplă și rapidă de detecție multimodală specifică a cTnI ce poate fi implementată cu ușurință în diagnosticul afecțiunilor cardiace sau a celor în care cTnI reprezintă un factor de prognostic esențial fără a fi nevoie de personal medical specializat și procese complexe de prelucrare a probelor.

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

Un obiectiv prioritar al comunității științifice este de a dezvolta metode și tehnologii noi care să depășească limitările metodelor disponibile la momentul actual și să ofere posibilitatea de a diagnostica rapid și specific afecțiunile medicale în stadiile incipiente ale acestora. În prezent, metodele, ce stau la baza analizelor medicale existente, constau în etape laborioase de pregătire care necesită mult timp, un volum mare de consumabile și proba precum și un laborator special echipat și personal instruit, devenind astfel foarte costisitoare. De asemenea, acestea prezintă unele dezavantaje în ceea ce privește specificitatea, sensibilitatea și acuratețea detecției. În mod specific, pentru detecția biomarker-ului cardiac troponină se dezvoltă dispozitive și protocoale de detecție indirectă prin marcarea anticorpilor cu molecule sau particule fluorescente pentru detecția prin imunocromatografie, electrochimie sau chemiluminescență (CN108226536B, CN108375559B, CN102520192B). Majoritatea



metodelor au la bază protocoale de detecție de tip „double anti-body sandwich assay” care presupun pași laborioși de marcare și activare a anticorpilor pentru a evita legarea nespecifică, conducând astfel la un timp lung de pregătire a testelor. În acest context clinic, prezenta invenție propune un nanosenzor plasmonic ușor de fabricat și utilizat pentru detecția multimodală în timp real a biomarker-ului cardiac troponină I cu aplicație directă în mediul clinic pentru diagnosticul patologiilor cardiace.

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

Prezenta invenție constă în dezvoltarea unui nanosenzor plasmonic pe bază de nanobipiramide de aur (AuBPs) ce permite detecția multimodală în timp real a biomarker-ului cardiac troponină I (cTnI). Nanoplatforma propusă în cadrul acestei invenții depășește limitările metodelor convenționale eliminând procesele complexe și laborioase de fabricare și pregătire a probelor, rezultând astfel un nanosenzor cu avantaje evidente precum fabricare simplă cu costuri reduse, stabilitate chimică și termică, utilizare facilă și imediată în condiții non-laborator, volum redus de probă, timp redus de analiză și detecție rapidă la fața locului. Nanosenzorul plasmonic dezvoltat prezintă proprietăți optice și termice ce oferă posibilitatea unei detecții multimodale prin implementarea a trei tehnici de detecție a biomarker-ului de interes, și anume spectroscopia de Rezonanță Plasmonică de Suprafață Localizată (eng. LSPR), Spectroscopia Raman Amplificată de Suprafață (eng. SERS) și detecția termoplasmonică prin termoviziune în infraroșu.

În vederea fabricării nanosenzorului plasmonic propus, primul pas a fost de a sintetiza chimic nanobipiramide de aur coloidale prin metoda de sinteză asistată de germeni de creștere (*Anal. Chem.* **2018**, 90, 14, 8567–8575). Această metodă presupune doi pași, anume prepararea germenilor de creștere și creșterea controlată a acestora astfel încât să obținem AuBPs cu răspuns LSPR transversal la 520 nm și longitudinal la 830 nm (**Figura 1** – spectrul roșu). Spectrul de extincție a AuBPs în soluție coloidală a fost înregistrat folosind un spectrofotometru UV-Vis-NIR Jasco cu o rezoluție spectrală de 1 nm. Aceste nanoparticule au fost apoi utilizate pentru a obține substratul plasmonic. Concret, lamelele de sticlă au fost spălate succesiv prin imersie în baie de ultrasunete timp de 20 de minute cu detergent alcalin, apă ultra-pură, acetonă și etanol. După ce au fost extrase din etanol, acestea au fost tratate termic la 90 °C timp de 10 de minute și expuse unui tratament în ozon pentru 5 minute, pentru a obține o suprafață hidrofilă prin formarea de grupări funcționale de hidroxil, care să



interacționeze și să lege covalent molecula linker (3-aminopropil)-trietoxisilan (APTES). Astfel, următorul pas a fost de a incuba lamelele într-o soluție etanolică de APTES de concentrație de 1 % peste noapte în condiții de întuneric și temperatura camerei. Excesul de APTES a fost îndepărtat folosind etanol, urmând ca substratele astfel funcționalizate să fie lăsate să se usuce la temperatura camerei. Un volum de 300 μ l de AuBPs în soluție coloidală au fost apoi picurați și lăsați peste noapte pentru a se depune (RO 133447 B1).

Substratele plasmonice fabricate au fost apoi caracterizate atât optic, cât și morfologic. În primul rând, s-a monitorizat răspunsul LSPR al AuBPs după fiecare pas al protocolului de detecție prin înregistrarea spectrului de extincție utilizând un spectrofotometru UV-Vis-NIR portabil Ocean Optics USB 4000 cuplat la un microscop inversat ZEISS Axio Observer Z1, folosind un obiectiv ZEISS cu mărire de 10x (NA = 0.45) și o fibră optică cu diametrul de 600 μ m. În urma procesului de depunere, se observă că forma răspunsului caracteristic LSPR al AuBPs se păstrează, dar, ca urmare a modificării indicelui de refracție din imediata vecinătate a nanoparticulelor de la 1.333 (apă) la 1 (aer), banda longitudinală suferă o deplasare spre lungimi de undă mai mici, maximul de extincție fiind la 789 nm. De asemenea, ca urmare a procesului de imobilizare pe substratul de sticlă, apare o bandă la lungimi de undă mai mari în jurul valorii de 900 nm și puțin intensă asociată cu formarea de nanoparticule autoasamblate sub formă de lanțuri (*Nanotechnology* 2020, 31, 335502). Morfologia substratului plasmonic obținut a fost studiată prin microscopie electronică de baleaj (eng. SEM) și microscopie de forță atomică (eng. AFM). Imaginile SEM au fost colectate cu un microscop FEI Quanta 3D FEG operând la un voltaj de accelerare de 30 kV, iar studiul AFM a fost efectuat cu ajutorul unui microscop de forță atomică Witec Alpha300A. În **Figura 2A** este prezentată o imagine SEM reprezentativă a substratului plasmonic, în care se poate observa prezența atât a AuBPs individuale, cât și a nanoparticulelor autoasamblate în lanțuri de diferite lungimi. Aceste concluzii sunt susținute și de imaginile AFM obținute (**Figura 2B**), fiind în concordanță cu determinările spectroscopice. Astfel, am obținut un substrat plasmonic cu proprietăți optice ce favorizează atât implementarea spectroscopiei LSPR datorită nanoparticulelor individuale, cât și a spectroscopiei SERS datorită „hot-spot-urilor” generate de către AuBPs autoasamblate.

Următorul pas după fabricarea substratului plasmonic a fost de a folosi protocolul de detecție de tip „sandwich” ilustrat schematic în **Figura 3**. Substratul plasmonic a fost incubat succesiv câte o oră la temperatura camerei cu: soluție etanolică de para-aminotiofenol 10^{-3} M (p-ATP), glutaraldehidă 25% (GA), anticorpus monoclonal 5 μ g/mL (anti-cTnI) specific pentru captarea ulterioară a biomarker-ului troponină I 1 μ g/mL (cTnI). În mod specific, pe suprafața nanobipiramidelor de aur s-a greșit prima dată p-ATP, un bine cunoscut reporter Raman, care

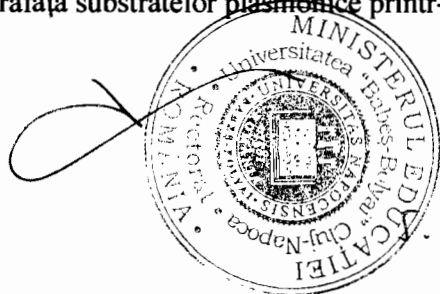


datorită grupării funcționale tiol din structura sa chimică asigură o legare covalentă cu suprafața de aur, iar prin intermediul grupării active amino interacționează cu grupările amino ale GA formând punți de nitrogen. GA este o moleculă de tip „crosslinker” care imobilizează eficient proteine prin interacțiunea grupării amino cu lanțurile proteice laterale din structura proteinelor, astfel asigurând legarea eficientă a anticorpului monoclonal anti-cTnI utilizat pentru captarea specifică a biomarker-ului cTnI.

Pentru a valida capacitatea nanoplatformei plasmonice obținute de a detecta eficient și specific cTnI, s-au implementat trei tehnici complementare de detecție. În primul rând, s-au înregistrat spectrele de extincție cu ajutorul spectrofotometrului UV-Vis-NIR portabil Ocean Optics și au fost reprezentate comparativ în **Figura 4**. În urma legării moleculei de p-ATP, banda longitudinală a nanoplatformei fabricate se deplasează spre lungimi de undă mai mari cu 46 nm, demonstrând legarea covalentă a p-ATP-ului ca urmare a modificării indicelui de refracție din imediata apropiere a AuBPs imobilizate pe substratul plasmonic. În urma legării anti-cTnI prin intermediul GA, care formează legături chimice atât cu gruparea amino a p-ATP-ului, cât și a anti-cTnI, banda longitudinală LSPR suferă o translatare adițională de 21 nm spre roșu. Odată ce cTnI este captat de către anti-cTnI, răspunsul optic suferă încă o deplasare de 7 nm spre roșu, confirmând astfel legarea specifică și, implicit, captarea biomarker-ului cardiac cTnI de către elementul de recunoaștere moleculară anti-cTnI.

Interacțiunea de recunoaștere moleculară specifică anticorp-antigenă a fost pusă în evidență prin măsurătorile SERS. Această tehnică prezintă o specificitate ridicată datorită capacitații de a identifica structura moleculară pe baza așa-numitelor amprente spectrale (eng. fingerprint) caracteristice fiecărei molecule. Mai mult, tehnica SERS prezintă o sensibilitate foarte ridicată, fiind capabilă să detecteze chiar și o singură moleculă. Acest lucru este posibil prin formarea așa-numitelor puncte fierbinți (hot-spots) între nanoparticulele interconectate sau agregate. Aceste hot-spot-uri produc o amplificare puternică a câmpului electromagnetic care determină o amplificare uriașă a semnalului Raman al moleculelor situate în aceste spoturi. În cazul de față, AuBPs autoasamblate pe substratul de sticlă favorizează generarea de ”hot-spoturi” conducând astfel la amplificarea semnalului Raman al moleculelor localizate în aceste zone.

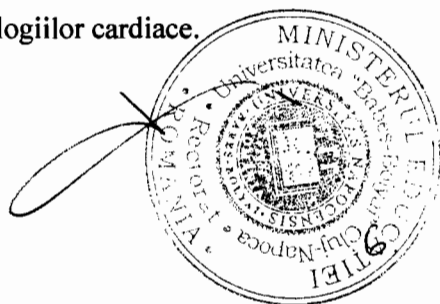
Înregistrarea spectrelor SERS s-a realizat cu Microscopul Raman Confocal Alpha300R Witec GmbH, Ulm, Germania. Pentru excitarea probelor am utilizat două linii laser: (i) una în domeniul vizibil la 633 nm emisă de un laser He-Ne; și (ii) o alta în domeniul spectral infraroșu apropiat „near-infrared” (NIR) la 785 nm emisă de o diodă laser. Lumina a fost focalizată pe suprafața substratelor plasmonice printr-un obiectiv cu mărirea 100x și apertură numerică NA



A handwritten signature or mark, possibly a stylized letter 'f' or a similar character, located at the bottom right of the page.

= 0.9. Puterea laser la ieșirea din obiectiv a fost de 2.3 mW pentru măsurătorile în domeniul vizibil și 8.9 mW pentru măsurătorile în domeniul NIR. Lumina împrăștiată Raman a fost colectată printr-o fibră optică cu diametrul de 100 μm și transmisă spre analiză la spectrometrele Raman (UHTS 300) echipate cu câte o cameră CDD care operează la $-60\text{ }^\circ\text{C}$ (1024 x 128 pixeli, DV₄₀₁-BV, Andor pentru vizibil și DU₄₀₁-BR-DD, Andor pentru NIR). În cazul măsurătorilor în domeniul vizibil, fiecare spectru a fost înregistrat cu un timp de integrare de 10 secunde și 1 acumulare. Pentru înregistrarea fiecărui spectru în domeniul NIR, s-au realizat 3 acumulări succesive cu un timp de integrare 20 secunde/acumulare. Pentru analiza spectrală, a fost utilizat software-ul Witec Project Four Plus. **Figura 5A** prezintă spectrele SERS înregistrate după fiecare pas al protocolului de detecție obținute în urma excitării cu linia laser la 633 nm.

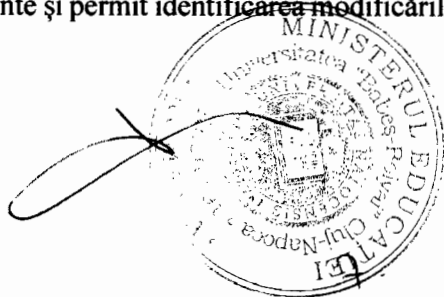
În urma grefării p-ATP-ului pe suprafața AuBPs apar benzile vibraționale caracteristice ale acestuia la 1073, 1141, 1173 și 1437 cm^{-1} atribuite vibrațiilor de alungire C-S, deformare C-H și balansare N-H₂, deformare C-H, respectiv alungire C-N și deformare a inelului fenol (*J. Optoelectron. Adv. Mater.* **2007**, 9, 3, 733-736). După legarea GA, apar primele modificări ale spectrului p-ATP-ului: vibrațiile de la 409 și 1574 cm^{-1} devin vizibile, iar banda de la 1073 cm^{-1} este semnificativ amplificată. În plus, lipsa benzii vibraționale caracteristice grupării amino confirmă legarea moleculei GA. În urma incubării cu anti-cTnI, se remarcă o scădere a semnalului SERS al p-ATP, fără modificări semnificative în ceea ce privește forma spectrului. Însă, atunci când biomarker-ul este captat, spectrul suferă modificări semnificative. Benzile deja identificate ale p-ATP-ului sunt amplificate și, mai mult decât atât, apar modurile vibraționale ale biomarker-ului de interes. Astfel, cTnI este identificat specific prin vibrațiile caracteristice ale reziduurilor aminoacizilor din componența sa: triptofan la 723 cm^{-1} , triptofan și fenilalanină la 1001 cm^{-1} , triptofan și tirozină la 1313 cm^{-1} , acid aspartic și glutamic la 1398 cm^{-1} , triptofan la 1423 cm^{-1} și fenilalanină, triptofan și tirozină la 1494 cm^{-1} (*Nanotechnology* **2020**, 31, 505505). În urma excitării cu linia laser la 785 nm (**Figura 5B**), se remarcă modificări ale benzilor specifice ale p-ATP-ului după fiecare pas al protocolului de detecție. Deși modurile vibraționale ale aminoacizilor implicați în reacția de recunoaștere moleculară anticorp-antigenă nu mai sunt vizibile, captarea cu succes a cTnI este demonstrată prin modificarea raportului dintre benzile de la 1004 și 1030 cm^{-1} , cea din urmă scăzând în intensitate considerabil atunci când reacția imunologică are loc. Astfel, s-a demonstrat cu succes capacitatea de a detecta eficient și specific biomarkerul cardiac cTnI prin două metode spectroscopice complementare, validând nanosenzorul plasmonic dezvoltat în vederea implementării acestuia în diagnosticul patologiilor cardiace.



A handwritten signature in black ink, consisting of a stylized 'R' followed by a dot.

Mai mult, am implementat o nouă metodă de detecție, și anume detecția termoplasmonică. Această tehnică se bazează pe capacitatea AuBPs de a converti lumina absorbită în căldură. Prin monitorizarea modificărilor de temperatură care apar după fiecare pas al protocolului de detecție (ex. funcționalizare, modificarea mediului din jurul AuBPs) se realizează o detecție indirectă a analiților de interes.

Concret, s-a monitorizat variația de temperatură extrasă din hărțile termografice colectate după fiecare pas al protocolului de detecție. AuBPs au fost validate ca agenți termoplasmonici eficienți fiind capabile să convertească lumina în căldură demonstrând performanțe termice crescute atunci când sunt expuse unei surse de lumină (în rezonanță cu banda plasmonică longitudinală) (*Nanotechnology* 2019, 30, 405701). Astfel, nanoplatforma plasmonică a fost expusă unui laser în NIR la 785 nm pentru 30 de secunde, utilizând o putere de 190 mW. În timpul iradierii s-au achiziționat hărți termografice folosind o cameră infra-roșu (IR) cu termoviziune Optris PI 450. **Figura 6** prezintă hărțile termografice înregistrate la t_0 , 10, 20, respectiv 30 secunde în timpul expunerii la laser. Pe baza hărților achiziționate se pot extrage temperaturile în orice moment al iradierii. În toate cazurile studiate, se observă că temperatura cea mai mare este înregistrată în punctul de contact cu laserul și apoi se disipă pe întreaga suprafață. Substratul plasmonic se încălzește rapid până la aproximativ 44 °C, indicând faptul că, în urma imobilizării pe substratul de sticlă, nanoparticulele își păstrează capacitatea de a converti lumina în căldură în mod eficient. Însă atunci când p-ATP-ul este grefat pe suprafața metalică are loc o scădere a capacității de conversie ajungând până la o temperatură de aproximativ 41 °C. Funcționalizarea cu anti-cTnI nu induce o modificare a capacităților termice, însă odată ce cTnI este captat temperatura maximă este scăzută cu aproximativ 2 °C. Datorită mediului înconjurător și a erorii camerei IR, temperaturile afișate pe hărți fluctuează și depind de momentul înregistrării. Astfel, pentru a evalua cu acuratețe comportamentul termic, se determină diferențele de temperatură ΔT în fiecare secundă din timpul iradierii în raport cu temperatura mediului ambiant și se reprezintă grafic ca funcție de timp. Acestea sunt apoi fitate folosind un model exponențial ce caracterizează ΔT din punct de vedere analitic, obținându-se curbele termice corespunzătoare nanoplatformei plasmonice după fiecare pas al protocolului de detecție cu coeficienți de determinare (R^2) având valori foarte apropiate de 1 sugerând o precizie crescută a fitărilor exponențiale efectuate (**Figura 7**). Din studiul curbelor termice observăm că toate sistemele se încălzesc foarte repede și ating platoul de saturație în primele 10 secunde de la începerea iradierii. Diferențele de temperatură sunt însă mult mai evidente și permit identificarea modificărilor termice induse odată cu funcționalizarea acestora.



A handwritten signature in black ink, consisting of a stylized 'F' followed by a dot.

8

Aceste determinări demonstrează capacitatea nanosenzorului plasmonic dezvoltat de a detecta eficient indirect biomarker-ul cTnI și de a permite o detecție multimodală LSPR-SERS-termoplasmonic pe aceeași nanoplatformă.

7



8

Desene/Figuri

Figura 1. Spectrul de extincție al AuBPs cu răspuns LSPR la 830 nm sintetizate în soluție coloidală (spectrul negru) și după depunerea acestora pe substratul de sticlă (spectrul roșu).

Figura 2. Imagini reprezentative de microscopie SEM (A) și AFM (B) a substratului plasmonic dezvoltat.

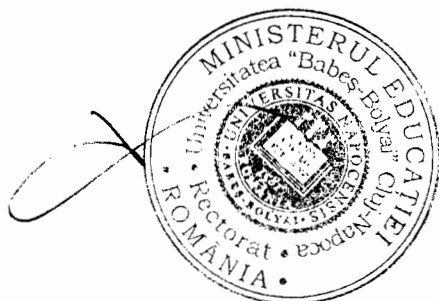
Figura 3. Ilustrarea schematică a protocolului de detecție propus.

Figura 4. Monitorizarea în timp real a răspunsului LSPR al nanoplatfomei plasmonice înainte (spectru roșu) și după legarea p-ATP-ului (spectru albastru), a anticorpului anti-cTnI (spectru magenta) și după captarea biomarkerului cardiac troponină I (spectru portocaliu).

Figura 5. Spectrele SERS obținute în urma excitării cu două linii laser, 633 (A) respectiv 785 nm (B), după fiecare pas al protocolului de detecție.

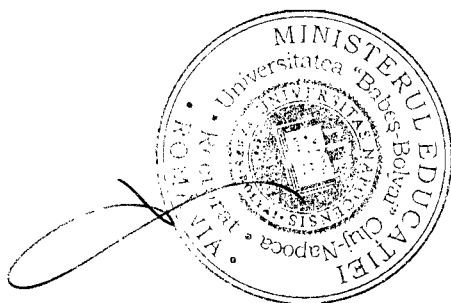
Figura 6. Imagini termografice înregistrate la 0, 10, 20 și 30 secunde de expunere a nanoplatfomei plasmonice la un laser cu lungime de undă excitatoare de 785 nm înregistrate înainte și după legarea p-ATP-ului, a anticorpului anti-cTnI și după captarea cTnI.

Figura 7. Curbele termice obținute în urma analizei imaginilor termice prin extragerea temperaturii și determinarea creșterii acesteia în raport cu temperatura ambientală pe durata expunerii la laser. Punctele experimentale obținute au fost fitate exponențial (linii continue).



Revendicări:

1. Nanosenzor plasmonic de detecție specifică a biomarker-ului cardiac troponină I utilizând o nanoplatformă plasmonică pe bază de nanobipiramide de aur pentru a imobiliza agentul de recunoaștere, anticorpu monoclonal anti-cTnI, **caracterizat prin aceea că** nanoplatforma plasmonică obținută prezintă proprietăți optice și termoplasmonice controlabile, un grad ridicat de stabilitate chimică, termică și reproductibilitate.
2. Nanosenzor plasmonic de detecție conform cu revendicarea 1, **caracterizat prin aceea că** permite folosirea imediată și directă pentru detecția simplă, rapidă, specifică și în timp real cu volume reduse de reactanți și probă biologică a biomarker-ului cardiac troponină I.
3. Nanosenzor plasmonic de detecție conform cu revendicarea 1, **caracterizat prin aceea că** utilizarea nanobipiramidelor de aur permite implementarea pe aceeași nanoplatformă a trei metode de detecție în timp real și la fața locului, anume spectroscopie de Rezonanță Plasmonică de Suprafață Localizată (LSPR), Spectroscopie Raman Amplificată de Suprafață (SERS) și detecție termoplasmonică prin imagistică termografică.
4. Nanosenzor plasmonic de detecție conform cu revendicarea 1, **caracterizat prin aceea că**, datorită capacității nanobipiramidelor de aur de a opera ca nanoantene plasmonice eficiente, permite identificarea specifică a biomarker-ului cardiac troponină I prin evidențierea modurilor vibraționale caracteristice reziduurilor aminoacizilor implicați în reacția de recunoaștere anticorp-antigenă.



f.

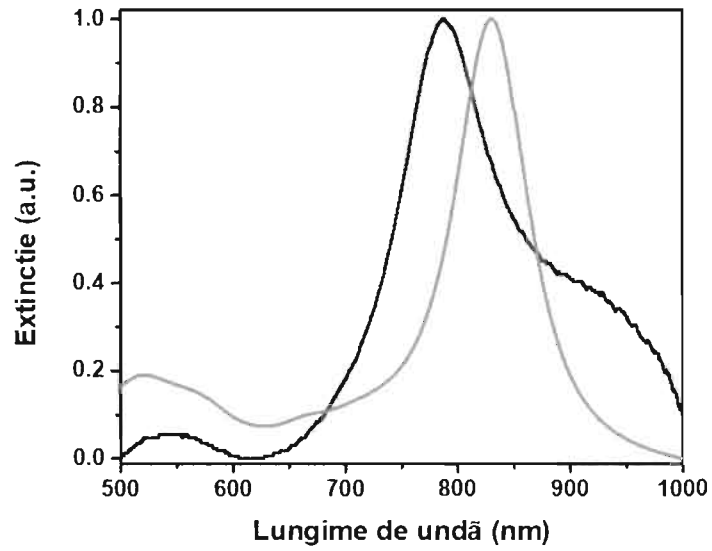


Figura 1. Spectrul de extincție al AuBPs cu răspuns LSPR la 830 nm sintetizate în soluție coloidală (spectrul negru) și după depunerea acestora pe substratul de sticlă (spectrul roșu).

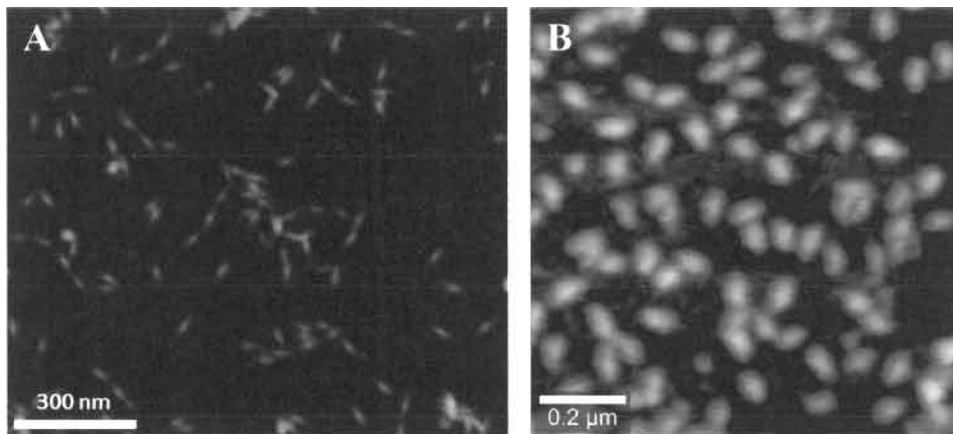
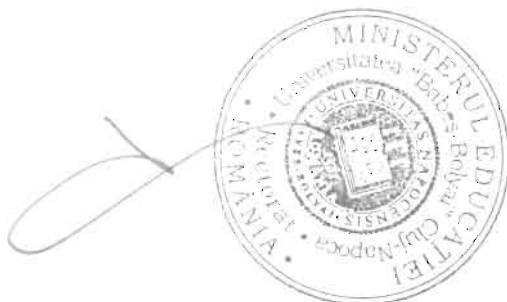


Figura 2. Imagini reprezentative de microscopie SEM (A) și AFM (B) ale substratului plasmonic dezvoltat.



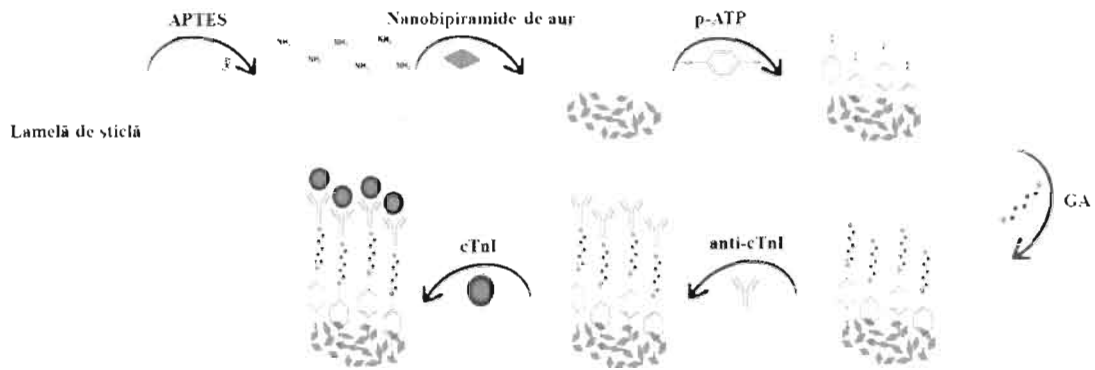


Figura 3. Ilustrarea schematică a protocolului de detecție propus.

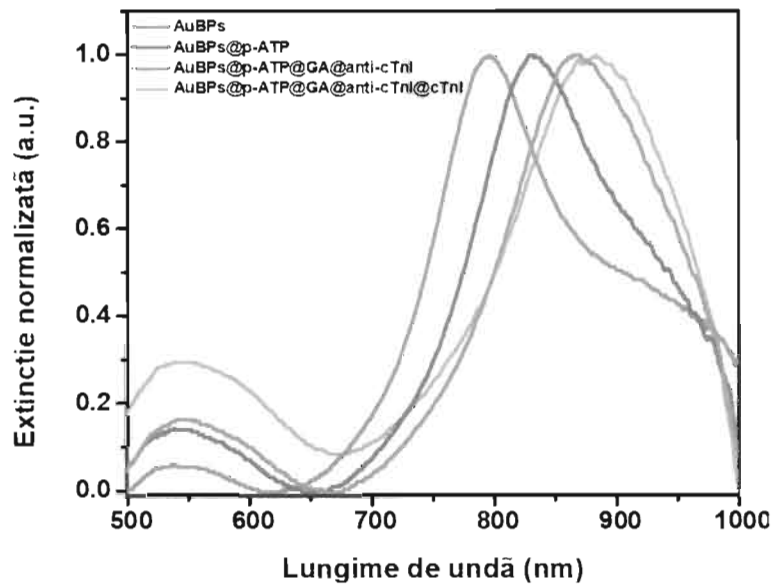


Figura 4. Monitorizarea în timp real a răspunsului LSPR al nanoplatfomei plasmonice înainte (spectru roșu) și după legarea p-ATP-ului (spectru albastru), a anticorpului anti-cTnI (spectru magenta) și după captarea biomarkerului cardiac troponină I (spectru portocaliu).



[Handwritten signature]

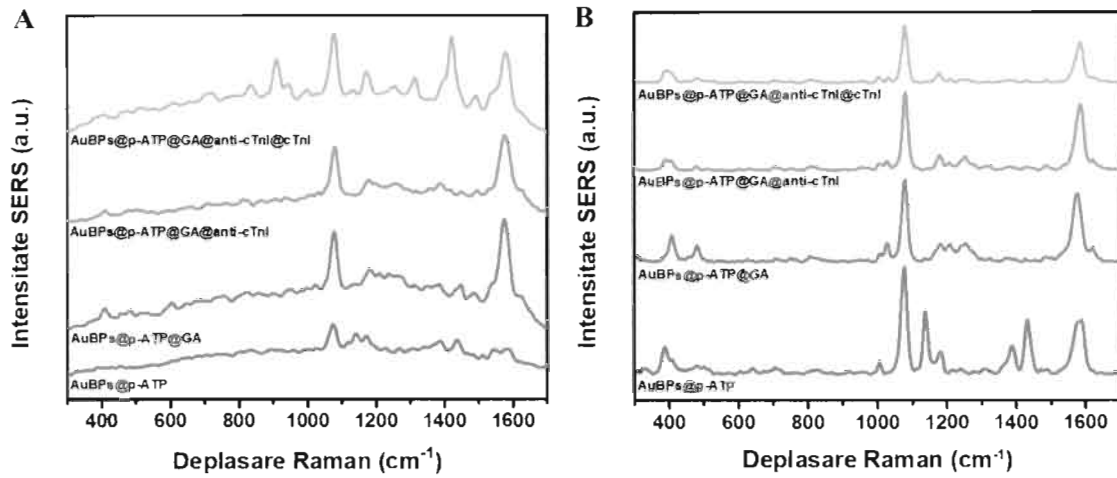


Figura 5. Spectrele SERS obținute în urma excitării cu două linii laser, 633 (A) respectiv 785 nm (B), după fiecare pas al protocolului de detecție.

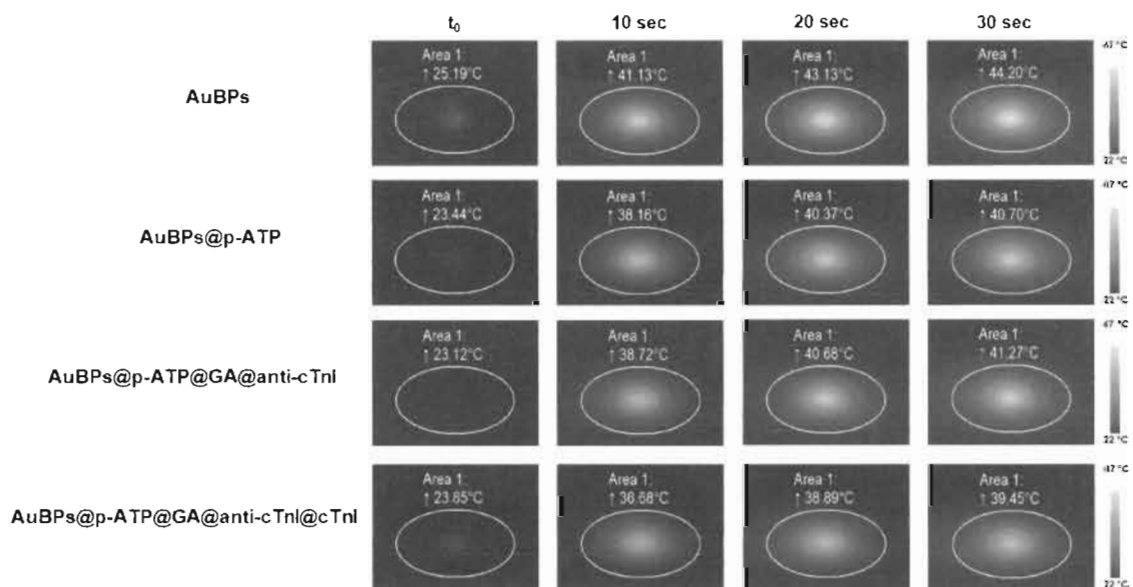


Figura 6. Imagini termografice înregistrate la 0, 10, 20 și 30 secunde de expunere a nanoplatforme plasmonice la un laser cu lungime de undă excitatoare de 785 nm înregistrate înainte și după legarea p-ATP-ului, a anticorpului anti-cTnl și după captarea cTnl.



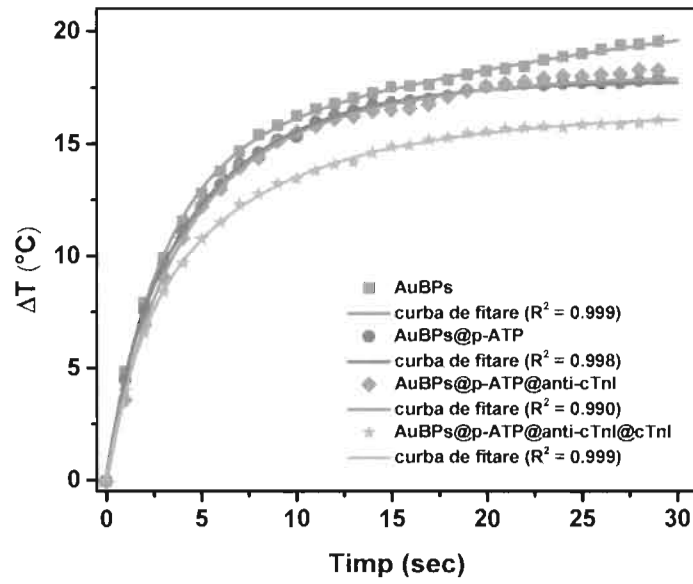


Figura 7. Curbele termice obținute în urma analizei imaginilor termice prin extragerea temperaturii și determinarea creșterii acesteia în raport cu temperatura ambientală pe durata expunerii la laser. Punctele experimentale obținute au fost fitate exponențial (linii continue).

