



(12) **CERERE DE BREVET DE INVENȚIE**

(21) Nr. cerere: **a 2010 01355**

(22) Data de depozit: **16.12.2010**

(41) Data publicării cererii:
28.02.2012 BOPI nr. **2/2012**

(71) Solicitant:
• **INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU
MICROTEHNOLOGIE,**
STR.EROU IANCU NICOLAE NR.32B,
VOLUNTARI, IF, RO

(72) Inventatori:
• **MOLDOVAN CARMEN AURA,**
BD. ION MIHALACHE NR.166, BL.2, SC.B,
AP.35, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;
• **FIRTAT BOGDAN IONUȚ,**
STR. DRUMUL TABEREI NR. 74, BL. M37,
AP. 52, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;

• **IOSUB RODICA, ȘOS.MIHAI BRAVU**
NR.42-62, BL.P8, SC.4, ET.8, AP.166,
SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;
• **NECULA DANIEL,**
STR. CETATEA HISTRIA NR.3, BL.M 14,
SC.A, AP.1, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B,
RO;
• **RADU CORNEL, BD. GHEORGHE ȘINCAI**
NR. 6, BL. 2, SC. 2, ET. 4, AP. 41,
SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;
• **CODREANU CECILIA,**
ALEEA CÂMPUL MOȘILOR NR. 1, BL.2,
AP.22, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO

(54) **SENZOR IMPEDIMETRIC MINIATURIZAT PENTRU DETECȚIA
PESTICIDELOR**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui senzor pentru detectarea unor compuși organofosforici din pesticide. Procedeu conform invenției constă din aceea că, pe un substrat de siliciu, se crește un oxid termic de 0,8 μm, după care, pentru izolarea electrozilor față de substratul semiconductor, pe oxid se depune, prin evaporare în vid înalt, un strat metalic compus din 15 nm Ti/200 nm Au, care se configurează prin litografiere și corodare, pentru a forma structura planară a senzorilor, peste care se depune un strat PSG de pasi-

vare/protecție de 1 μm, care se configurează, rezultând o structură 2D, pe care se depune un strat biosenzitiv, reprezentat de o soluție de acetilcolinesterază (AChE), imobilizată pe electrozi de aur, după care senzorul rezultat se activează în sistem microfluidic, conceput sub o formă modulară, cu două unități care permit montarea la modulele electronice a doi senzori, simultan.

Revendicări: 3
Figuri: 7



Brevet “Senzor impedimetric miniaturizat pentru detectia pesticidelor”

Descriere brevet

Starea artei

Un studiu recent a aratat ca 71% din cetatenii Uniunii Europene sunt ingrijorati in legatura cu reziduurile de pesticide din fructe, legume sau cereale. In industria alimentara sau agricultura, calitatea unui produs este evaluata prin analize periodice, chimice si microbiologice, care sunt scumpe, lente, necesita operatori bine instruiti si, in unele cazuri, necesita pasi suplimentari de pre-tratament al mostrelor. Biosenzorii pot oferi metode rapide, ne-distructive si convenabile din punctul de vedere al costurilor pentru monitorizarea unui produs.

Potrivit rapoartelor Comisiei Europene (<http://cordis.europa.eu/tdsp/en/sat/05.htm>), chiar daca pesticidele sunt aplicate in conformitate cu instructiunile, efectul acestora asupra plantelor si animalelor nu poate fi evitat. Multe dintre ele persista in aer, sol si apa. Odata intrate in lantul alimentar, acestea sunt greu de indepartat; cele mai persistente pesticide pot rezista pana la 50-100 de ani. Pesticidele au redus populatia multor specii de plante si animale.

Pesticidele provoaca cele mai mari pagube mediilor acvatice, acestea ajungand astfel in apele marine, alimente si apa potabila. Pesticidele sunt utilizate pentru a proteja culturile de infestarea cu daunatori sau boli ale plantelor. O posibila consecinta a utilizarii acestora este prezenta reziduurilor de pesticide in produse. De aceea, este nevoie de asigurari ca astfel de reziduuri nu se gasesc in produsele alimentare la niveluri inacceptabile din punctul de vedere al riscului asupra sanatatii umane. Nivelurile maxime de reziduuri (**Maximum residue levels - MRLs**) sunt astfel stabilite de catre Comisia Europeana, pentru a proteja consumatorii de expunerea la niveluri inacceptabile de reziduuri de pesticide in produsele alimentare.

In Uniunea Europeana a fost aplicata, de la 1 Septembrie 2008 o noua legislatie privind reziduurile de pesticide, care ofera o baza de date cuprinzatoare cu MRL pentru fiecare produs alimentar.

Cei mai toxici compusi organofosforici sunt reprezentati de familia organofosforicelor fluorinate: ciclohexil metilfosfonofluorinat, o-izopropil metilfosfono- fluorinat si -pinacolil metilfosfonofluorinat. O-izopropil metilfosfono- fluorinat are structura si activitate biologica similare cu unele insecticide uzuale, cum ar fi Malathion, sau carbamati folositi ca insecticide (Sevin) si medicamente (Mestion, Antilirium). Concentratii foarte mici din astfel de organofosfati pot fi fatale (de exemplu decesul poate surveni in cateva minute dupa ingerarea directa a 0,01 miligrame pe kilogram corp). se estimeaza ca O-izopropil metilfosfono- fluorinat este de 500 de ori mai toxic decat cianura.

In acest context, o serie de proiecte de cercetare finantate de Comisia Europeana incearca sa rezolve problemele curente ale detectiei pesticidelor.

Proiecte (cordis.europa.eu) cum ar fi FOOD-BIOSENS (Noi senzori chimici si biochimici pentru analizarea alimentelor, mediului si probelor medicale), BIODET (Networking in aplicatii ale biosenzorilor pentru detectia pesticidelor din fructe si legume), ACHEB (Noi biosenzori pentru detectia imbunatatita a contaminarii mediului cu pesticide de tip anticolinesteraza) au ca scop dezvoltarea de unelte noi pentru determinarea rapida a componentelor periculoase din alimente, apa si sol. Mecanismele de detectie ale multor astfel de senzori se bazeaza pe procesele de recunoastere moleculara, avand ca tinta cele mai periculoase pesticide utilizate in momentul de fata.

Principalii beneficiari:

Unitati de productie din industria alimentara (procesare de lapte, fructe, legume), laboratoare de analize a calitatii alimentelor, institutul de sanatate publica.

Exista raportate mai multe tehnologii de realizare de senzori pe siliciu sau pe alt substrat .

Aceste tehnici sunt cunoscute, au rezultate bune cu avantaje* si dezavantaje**, ceea ce propunem in brezentul brevet este o tehnica mai simpla, perfect reproductibila, ieftina si versatila. Metoda prezentata poate fi extinsa la o gama larga de aplicatii in afara celor mentionate mai sus.

Avantajele metodei propuse:

1. Utilizeaza microtehnologia pe siliciu ceea ce permite obtinerea de senzori miniaturizati (de dimensiuni mici), perfect reproductibili din punct de vedere tehnologic si ieftini.
2. Utilizeaza depuneri metalice prin evaporare in vid care sunt perfect controlate si reproductibile, straturile depuse fiind de grosime in domeniul a 200 nm.
3. Utilizeaza depuneri electrochimice de polimeri, perfect controlate ca grosime si calitate, sub forma de nanofibre, utilizand voltmetria ciclica.

1. Metoda tehnologica

Metoda de realizare a traductorului interdigital pe substrat de siliciu cu conectare electrica si fluidica

Inventia se refera la un procedeu de obtinere a unor biosenzori semiconductori pe substrat de siliciu integrati in canale microfluidice si cu interfete electrice, fluidice si grafice cu aplicatii in monitorizarea produselor alimentare, a fructelor si vegetalelor

Un substrat de siliciu (Fig.1A) care este de fapt o placheta de siliciu de 3" sau 4", este folosita pentru realizarea senzorilor miniaturizati pentru detectie pesticide. Substratul are o grosime de 350 microni in cazul plachetei de 3" si 500 Microni in cazul plachetei de 4".

Pe acest substrat, de tip p, <100>, 14-16 ohmi cm am crescut un oxid termic de 0.8 microni cu rol de izolare electrica a electrozilor senzorilor fata de substratul semiconductor.



Pe oxid se depune un strat metalic de tip sandwich format din 15nm Ti/ 200nm Au realizat prin evaporare in vid inalt.

Acest sandwich metalic se configureaza pentru a forma structura planara a senzorialor. Configurarea se realizeaza prin litografie si apoi corodarea stratului metalic (Fig. 1D) in urmatoarele solutii chimice:

- a) pentru corodare titan: HF: HO(CH₂)₂OH=1:6, timp de corodare cinci secunde;
- b) pentru corodare aur: KI(4g):I₂(1g):H₂O(40 ml), cu o rata de corodare de 0,5÷1µm/min

Structura planara a electrozilor este prezentata in figura 2.

Urmeaza apoi depunerea unui strat de pasivare/ protectie a traseelor de metal contra actiunii unor factori externi (umiditate, ioni metalici, alti contaminanti organici si anorganici). Acest strat este un strat de PSG (sticla de fosfor) (Fig. 1.E) cu grosimea de 1 micron. Acest strat este apoi configurat prin procesul de litografie si corodat chimic (Fig 1F) intr-o solutie de CH₃COOH – NH₄F 4:1.

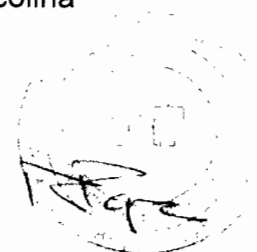
Structura 2D a stratului de PSG este prezentata in figura 3. Stratul acopera trasele metalice si lasa descoperite in urma corodarii padurile pentru contactarea electrica si aria activa a electrozilor, adica aria pe care se depune stratul biologic senzitiv cu rol in detectia pesticidelor din probele analizate.

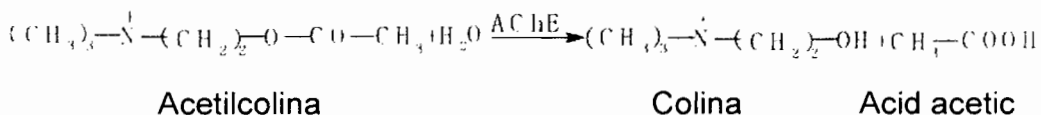
Solutiile de curatire sunt urmatoarele:

- Curatire pentru depunere Ti/Au in plasma RIE (plasma de corodare cu ioni reactivi) cu urmatorii parametrii: P=50W, p=20 Pa, pe gazul O₂ =99 sccm, Timp= 20s

2. Metoda de preparare biosenzor cu imobilizare de acetilcolinesteraza pe substrat PEG si activare senzor in sistem microfluidic

Inaintea etapei de depunere enzima AChE are loc pregatirea *ariei active a microelectrodului interdigital*, constand intr-o activare chimica a suprafetei pentru a putea reactiona cu gruparile reactive libere din moleculele enzimei. *Pregatirea ariei active* consta in: proces de curatire chimica in solutie pirania: H₂SO₄: H₂O₂, uscare in azot si tratament in *plasma de oxigen*, urmata imediat de operatia depunere polietilenglicol PEG 300. Se ia o cantitate de 0.2µl cu micropipeta din amestecul PEG:C₂H₅OH in raport de 1:1 si se pipeteaza pe aria activa, se obtine *aria activa functionalizata*. *Imobilizarea AChE* pe membrana PEG se face prin *legaturi covalente si prin absorbtie* datorita suprafetei active extrem de mici 10µm are loc o crestere a presiunii de scurgere prin patul de material enzimatic depus. Pe substratul astfel functionalizat se imobilizeaza enzima AChE, folosind protocolul descris in manualul Worthington, unde tehnica de depunere material biologic permite o monitorizare selectiva si o caracterizare a materialului biologic depus pe microelectrozii configurati pe substrat de siliciu. Enzima AChE actioneaza rapid asupra acetilcolinei care este rapid hidrolizata in acid acetic si colina inactiva.





Metoda de detectie a pesticidelor organofosforice bazata pe inhibitia acetilcolinesterazei AChE are la baza masuratori de impedanta: de capacitate (C_p) si de conductanta (G) in gol, valorile masurate sunt stabile; dupa injectia solutiei substratului in amestec cu pesticidul, valorile prezinta o variatie slaba timp de 5 minute si apoi raman constante, minutele 5÷15 de monitorizare. Determinarea activitatii enzimei, acetilcolinesteraza, ramasa dupa incubarea cu inhibitor (insectid) permite calcularea procentului de inhibitie care este corelat cu concentratia insecticidului organofosforic.

Reactivi

S-au utilizat solutii de:

- Enzima AChE extrasa din tipar electrica, activitate 0,3U/mg: 10mg/mL preparata in solutia tampon fosfat de potasiu 0.02M KH_2PO_4 , pH 7;
- Solutie substrat: iodura acetilcolina 0,001M ($1 \times 10^{-3}\text{M}$), preparata in solutia tampon fosfat de potasiu 0.02M, pH 7.0;
- Solutie tampon: fosfat diacid de potasiu KH_2PO_4 0,02M;
- Solutie NaOH 0,002M folosita pentru reglarea solutiei tampon la pH 7;
- Solutie electrolit preparata din: solutie gelatina 0,01% cu MgCl_2 0,4M si HgCl 0,2M;
- Pesticid 10^{-6}M .

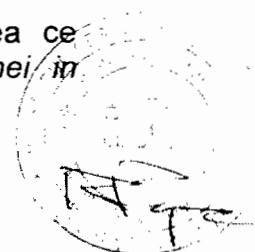
Metoda de lucru

Detectia pesticidelor organofosforice bazata pe inhibitia AChE are la baza masuratori de impedanta si depind de frecventa de lucru, temperatura, de geometria stratului de PEG captiv in camera de reactie si de cantitatea de AChE care a fost retinuta in PEG. Variatia C_p si mai ales G in cazul enzimei active se explica prin modificarea proprietatilor electrice ale stratului de polimer in conditiile in care in solutia adiacenta reactia enzimatica modifica concentratia si natura speciilor ionice: acetilcolina si colina sunt la pH 7 specii ionice, dar cu mobilitati diferite. O absorbtie reversibila a acestora in PEG este de presupus.

Pentru masuratori microsenzorul a fost plasat intr-o capsula care asigura contactele electrice, injectia si/sau circulatia fluidelor si o camera de reactie cu volumul de 2,5 μL . Pe cipul functionalizat cu PEG s-au depus 0,2 μL AChE.

Protocol de lucru

- Se masoara valorile de impedanta de referinta pe cip: C_p si G (valori stabile);
- Se injecteaza solutia tampon pH 7 si se masoara C_p si G (valori stabile);
- Se injecteaza solutia substrat si se masoara C_p si G (valori initiale) cu o monitorizare de 15 minute;
- Se reinjecteaza solutia tampon: C_p si G (valori stabile) ceea ce demonstreaza ca, *senzorul este sensibil la activitatea enzimei in*



prezenta substratului. Hidroliza substratului produce modificari masurabile ale impedantei in stratul de polimer PEG;

- Se injecteaza solutia cu toxic, cu timp de incubare 10 minute;
- Se injecteaza apoi din nou solutia de substrat, valorile masurate au ramas constante, ceea ce demonstreaza ca, *activitatea enzimei a fost blocata ireversibil de prezenta pesticidului*;
- Temperatura de lucru: $T = 25^{\circ}\text{C}$ sau temperatura de $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$;
- Se determina semnalul de excitare pentru un interval al frecventei cuprins intre: $100\text{Hz} \div 100\text{KHz}$ pentru amplitudinea semnalului la tensiunea de 50mV sau la $1\ 000\text{mV}$; se aleg frecventa si tensiunea pentru care valorile G sunt mai mari.

Nota: Introducerea simultana a pesticidului si a substratului face posibila manifestarea unei activitati enzimatice reziduale limite in timp. *Procedura mai eficienta este introducerea succesiva mai intai a toxicului si, dupa o pauza, a substratului.*

Acest experiment a dovedit faptul ca, microelectrozii interdigitati folositi ca microsenzori enzimatici sunt senzitivi la activitatea enzimei imobilizate in prezenta substratului, si permit monitorizarea reactiilor biocatalitice. Hidroliza substratului produce de asemenea modificari masurabile ale impedantei stratului polimeric PEG, vazute ca o variatie de capacitate ca in Figura 7.

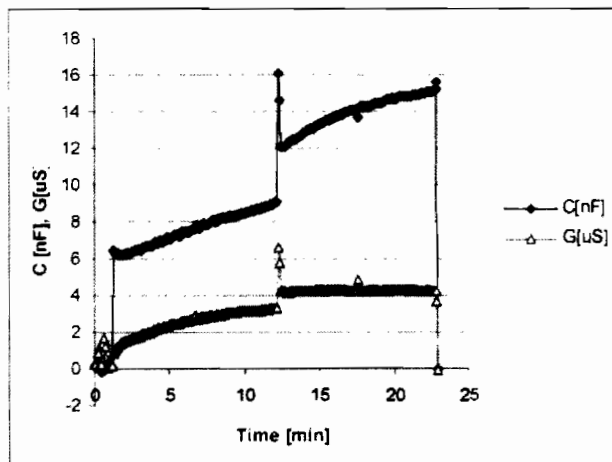


Figura 7. Conductanta si capacitanta
A-injectie substrat, B-injectie inhibitor

Am ales aceasta metoda de imobilizare a enzimei AChE pe substrat functionalizat cu PEG, fiindca am avut in vedere urmatoorii factori care pot influenta functionarea biosenzorului integrat pe siliciu: natura enzimei, proprietatile fizico-chimice ale substratului, densitatea si distributia centrilor activi din enzima, activitatea enzimatica initiala, variatia activitatii enzimatice in timp, stocarea si conditiile de utilizare ale biosenzorului. Consideram ca toate aceste cerinte sunt satisfacuate in conditii bune de catre biosenzorul integrat pe siliciu realizat.



3. Metoda de montaj biosenzor in sistemul microfluidic si de preluare semnal electric

Montajul prezent este conceput de o forma modulara cu doua unitati (celule) de lucru, care permit montarea a doua traductoare (CIP-uri) simultan in vederea monitorizarii fenomenelor electrochimice din zona activa a acestora, in conditiile in care o cultura de tip enzima este inundata cu un fluid de lucru normal (baza) respectiv cu un fluid contaminat intr-un anumit procent cu o substanta toxica.

Structura modulara, constituie o cerinta pentru construirea unei platforme cu mai multe unitati de lucru ce permit masurari paralele asupra fenomenelor electrochimice la nivelul enzimelor supuse unor contaminari in proportii diferite sau cu toxine diferite.

Descrierea modulului:

Pe o placa intitulata "portamprenta" - v. fig.4, au fost realizate prin prelucrare mecanica doua locase dreptunghiulare de marimea cipurilor realizate pe suport de Siliciu. In interiorul locasurilor, s-au practicat niste spatii pentru montarea unor garnituri inelare in vederea izolarii si delimitarii camerei fluidice. In locasuri se plaseaza cipurile aferente, cu fata activa orientata in jos astfel incat zona activa a cipurilor sa fie bine izolata si cuprinsa in spatiul fluidic.

Acest lucru permite de asemenea ca cei patru pini telescopici sa fie asezati pe zonele de contact metalizate, aferente si in acelasi timp sa fie izolati de fluidul de lucru.

Pe suprafata opusa celei cu amprente, au fost practicate doua camere pentru etansare cu O-ringuri a cailor de acces cu fluidul de lucru.

Fig.5 detaliaza forma geometrica a amprentelor (celulelor) precum si pozitionarea gaurilor pentru contactele electrice si pentru fluidica.

Ansamblul montat si prezentat in Fig. 6, pune in evidenta elementele componente ale modulului care permite racordarea acestuia la sistemul de micropompe pentru injectarea si recuperarea fluidelor de lucru precum si interconectarea la un aparat de masura de inalta fidelitate in vederea realizarii masuratorilor electrice si prelucrarii acestora cu un computer.

Dimensiunile si greutatea dispozitivului, sunt compatibile cu cerintele ulterioare care implica introducerea acestuia intr-un ansamblu mai mare, cu mai multe module, cu sistem microfluidic complex, sistem vibrator pentru mentinerea si intretinerea emulsiilor port enzime, incinta termostata, etc.



Brevet “Senzor impedimetric miniaturizat pentru detectia pesticidelor”

Revendicari

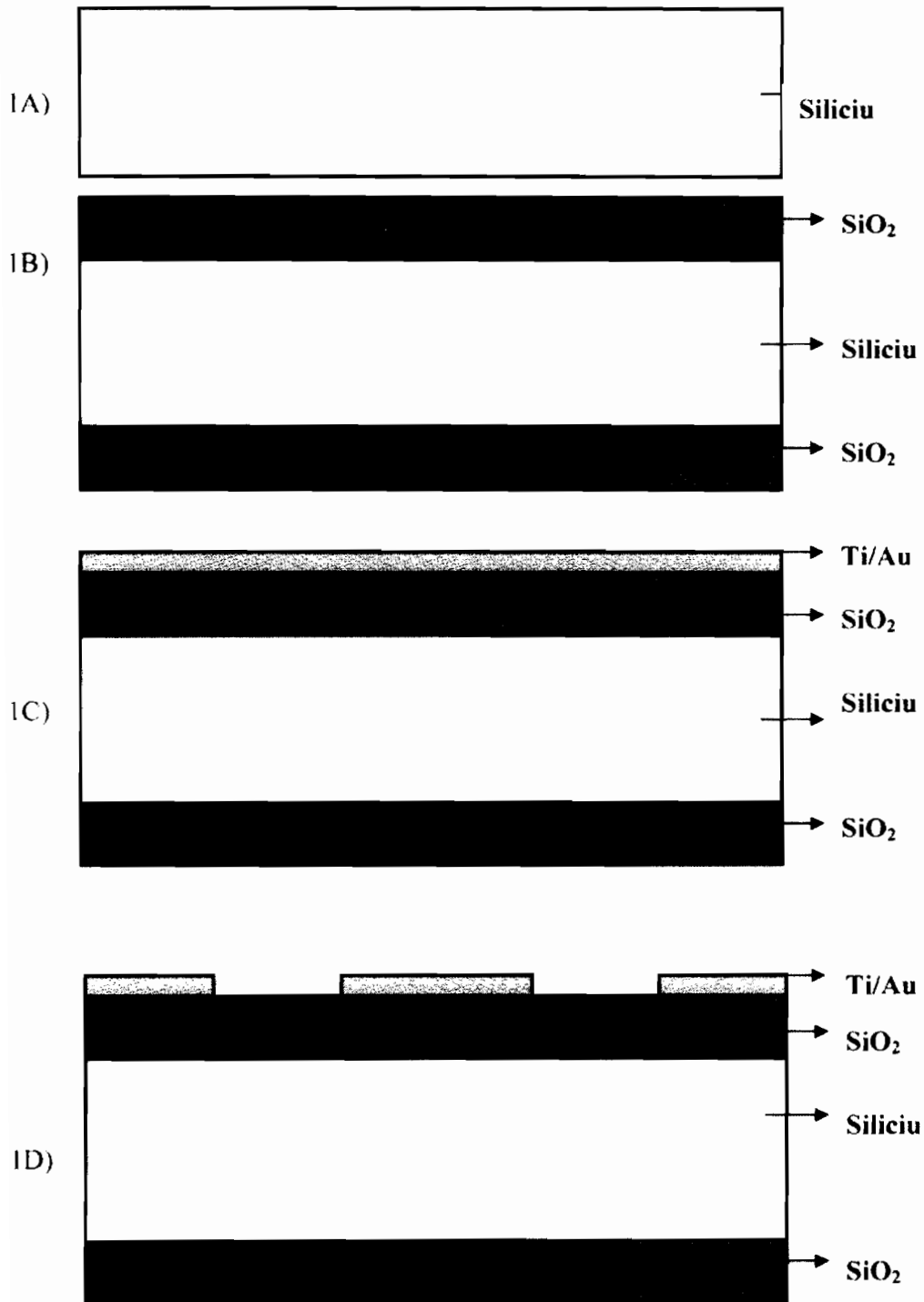
1. Metoda de realizare a traductorului interdigital pe substrat de siliciu cu conectare electrica si fluidica
2. Metoda de preparare biosenzor cu imobilizare de acetilcolinesteraza pe substrat PEG si activare senzor in sistem microfluidic
3. Metoda de montaj biosenzor in sistemul microfluidic si de preluare semnal electric

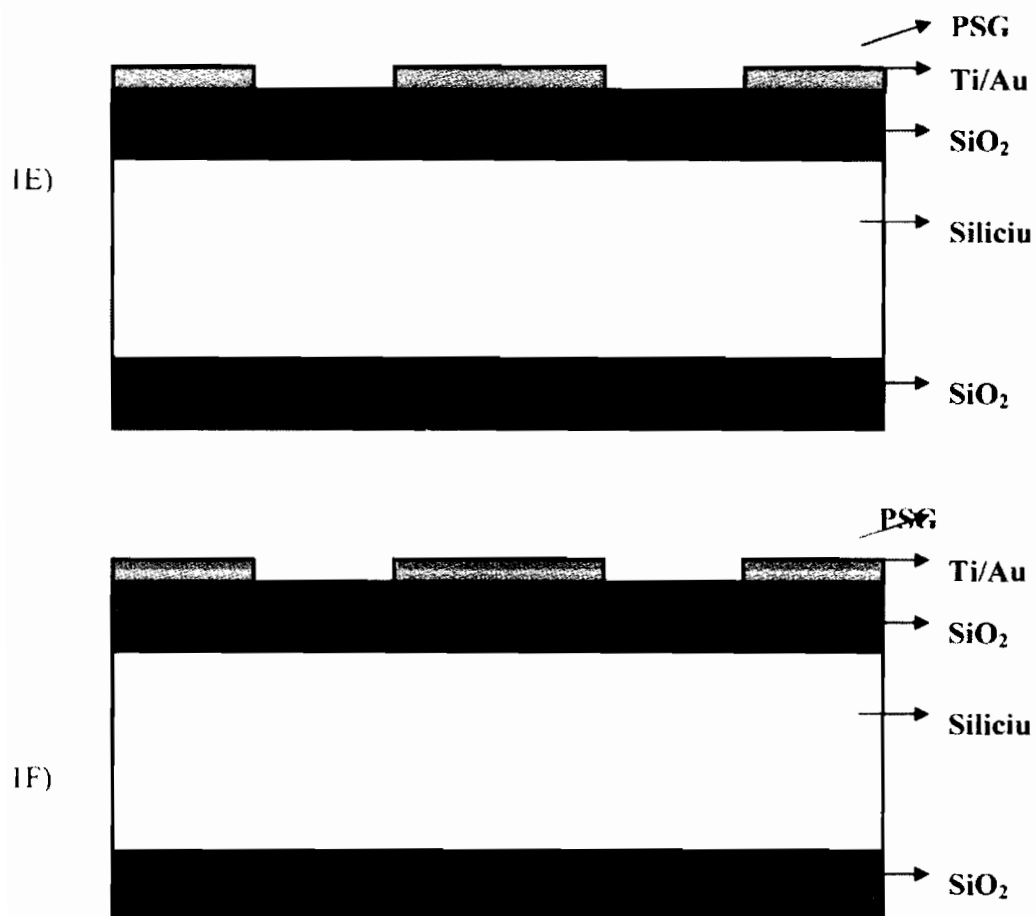


SCHEME

Brevet "Senzor impedimetric miniaturizat pentru detectia pesticidelor"

Scheme





Legenda: Si – siliciu, placheta suport pentru senzori
SiO₂ - dioxid de siliciu
Ti/Au - strat de Titan-Aur cu rol de strat conductor pt. senzori
PSG - oxid depus, dopat cu fosfor cu rol de strat de pasivare

Figura 1. Descriere metoda tehnologica prin sectiunea transversala in etapele principale de procesare:

- 1A) Sectiune transversala placheta de siliciu
- 1B) Sectiune transversala placheta de siliciu oxidata
- 1C) Depunere metal (Ti15nm/ Au 200nm)
- 1D) Fotolitografie metal
- 1E) Depunere strat de pasivare (PSG)
- 1F) Fotolitografie PSG



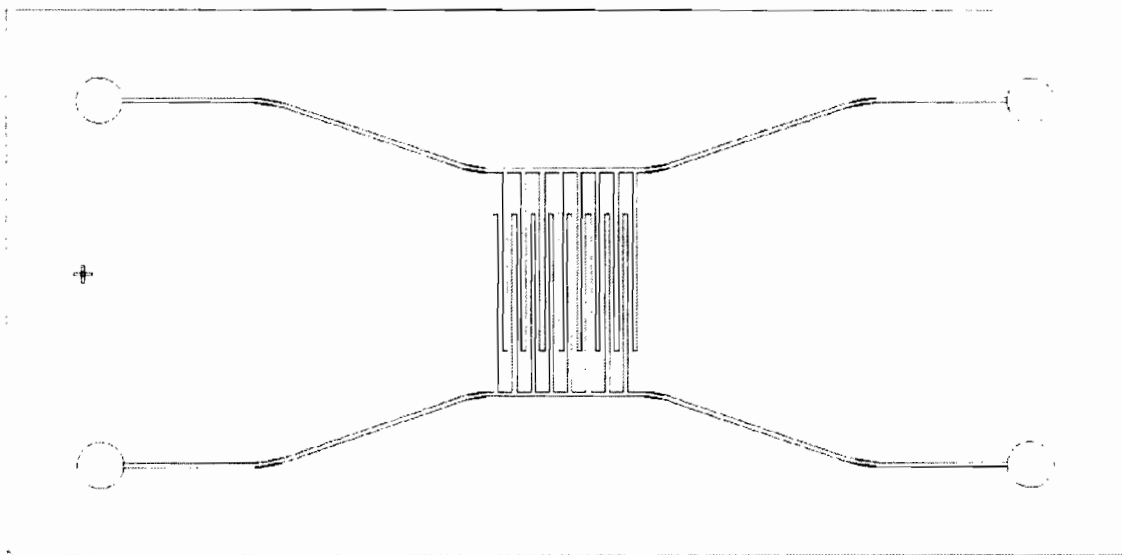


Figura 2 Schema 2D a traductorului interdigital – Masca 1 metalizare

Figura 3 Schema 2D a traductorului interdigital – Masca 2 pasivare



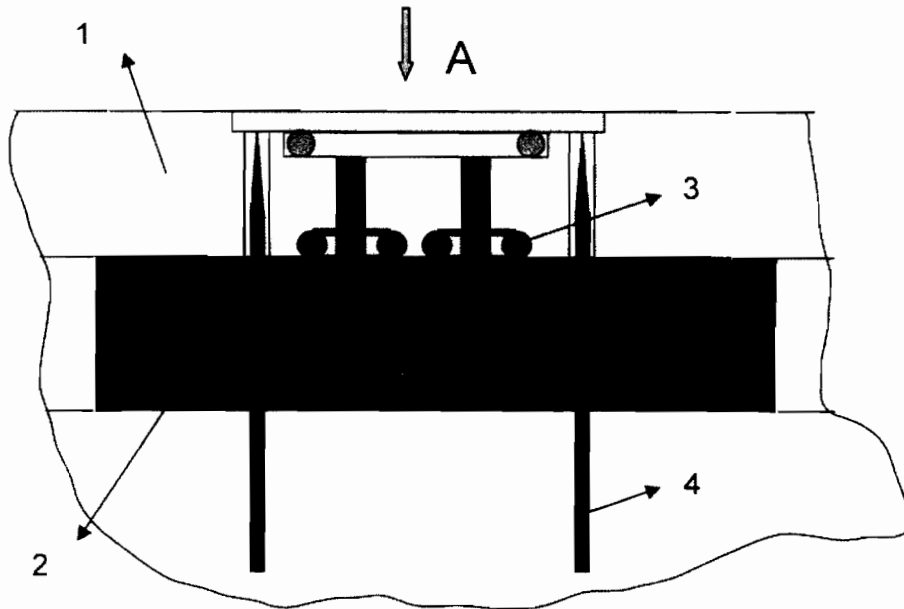
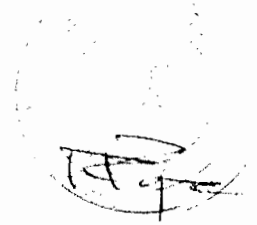


Figura 4. Schema montajului pentru plasarea senzorului in camera de reactie, interconectat electric si fluidic.

Legenda:

- 1- placa port amprenta
- 2- Placa fluidica
- 3- Oring (garnitura)
- 4- Pin telescopic



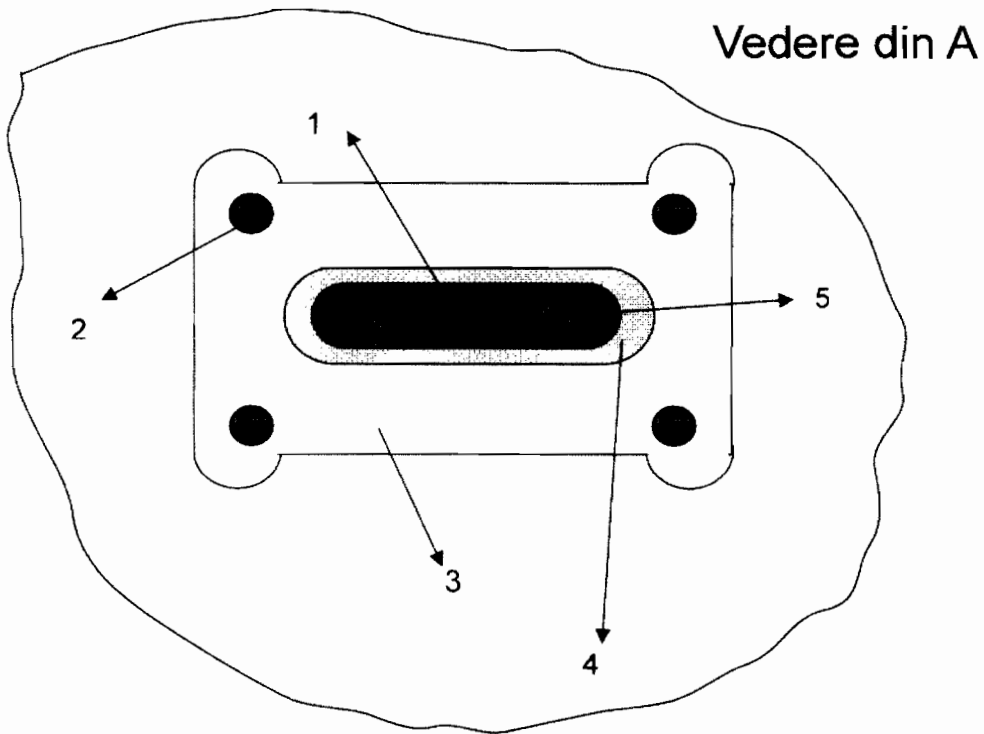


Figura 5. Vedere din A a montajului pentru plasarea senzorului in camera de reactie, interconectat electric si fluidic

Legenda:

- 1- Locas fluidic
- 2- Gaura pin
- 3- Locas cipuri
- 4- Garnitura inelara
- 5- Intrare/evacuare fluid

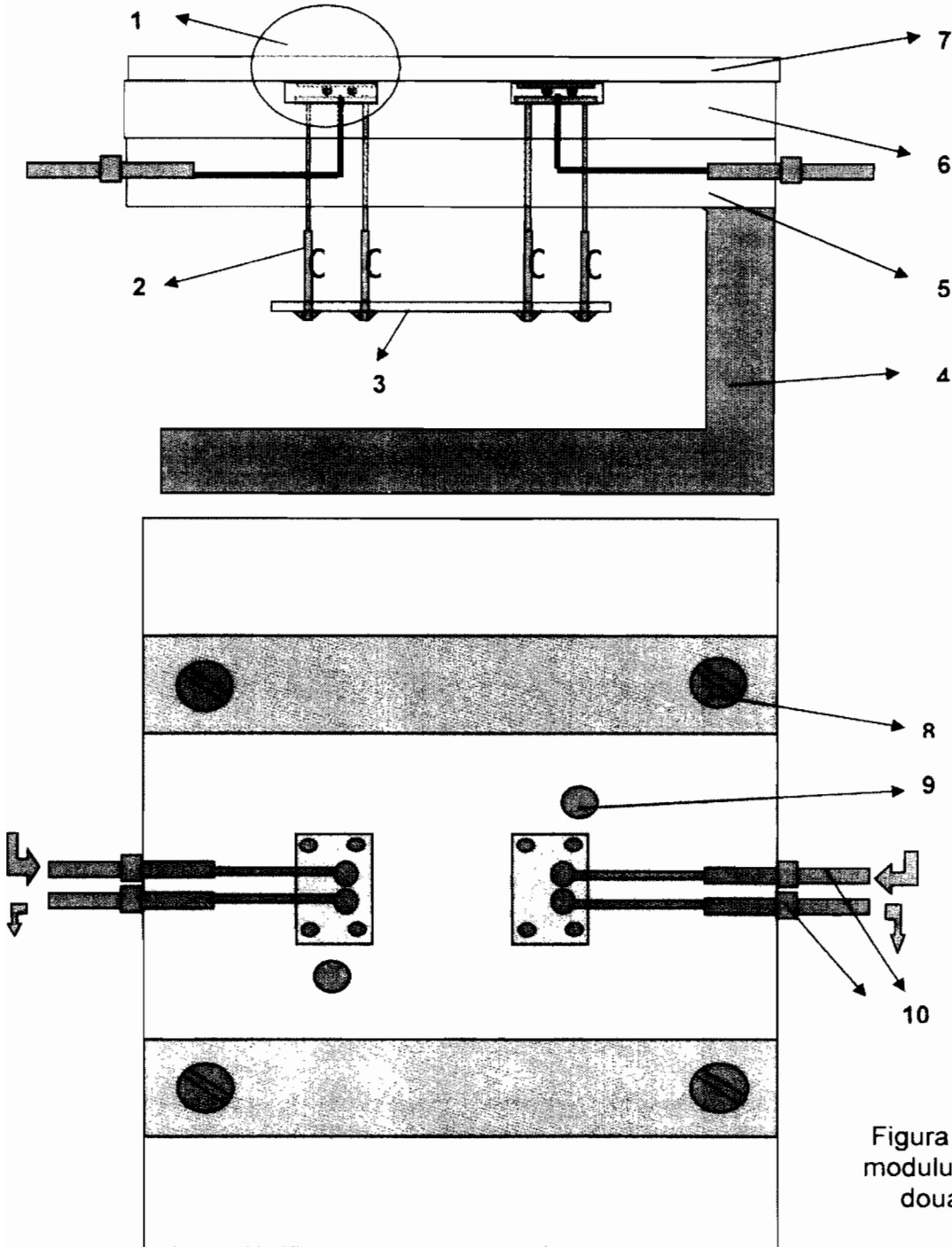


Figura 6. Schema
modulului fluidic cu
doua module

Legenda (Fig. 6)

- 1- Celula
- 2- Pin telescopic
- 3- Miccablaj
- 4- Suport
- 5- Placa fluidica

- 6- Placa portamprenta
- 7- Element de inchidere
- 8- Surub de fixare
- 9- Centrator
- 10-Fitinguri fluidice

