



(12)

## BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2014 00025**

(22) Data de depozit: **16/01/2014**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **28/05/2021** BOPI nr. **5/2021**

(41) Data publicării cererii:  
**30/09/2015** BOPI nr. **9/2015**

(73) Titular:  
• **INSTITUTUL NAȚIONAL DE  
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU  
MICROTEHNOLOGIE,  
STR.EROU IANCU NICOLAE NR.126 A,  
BUCUREȘTI, B, RO**

(72) Inventatori:  
• **AVRAM MARIOARA, STR.FELEACU  
NR.19, BL.12 C, SC.3, AP.31, SECTOR 1,  
BUCUREȘTI, B, RO;**  
• **RĂDOI ANTONIO MARIAN, ALEEA ISTRU  
NR.7, BL.A 3, SC.E, ET.4, AP.75,  
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**

• **AVRAM MARIUS ANDREI, STR.FELEACU  
NR.19, BL.12 C, SC.3, AP.31, SECTOR 1,  
BUCUREȘTI, B, RO;**  
• **BĂLAN CĂTĂLIN MIHAI,  
ALEEA CRĂIEȘTI NR. 6, BL. D41, SC.B,  
ET. 1, AP. 20, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B,  
RO;**  
• **MĂRCULESCU CĂTĂLIN VALENTIN,  
ȘOS. OLTEȚI NR. 224, BL. 6, SC. 2,  
ET. 8, AP. 105, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B,  
RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:  
**CLAUDIA GARCIA ET. ALL.,  
"FABRICATION OF MICROFLUIDIC  
DEVICES USING SU-8 FOR DETECTION  
AND ANALYSIS OF VIRUSES", SENSOR +  
TEST CONFERENCE - SENSOR  
PROCEEDINGS I., 2009**

(54) **PROCEDEU DE REALIZARE A DISPOZITIVULUI  
DIELECTROFORETIC PENTRU CARACTERIZAREA  
DIELECTRICĂ A LIPOZOMILOR AUTOASAMBLAȚI  
ÎN CANALE MICROFLUIDICE**



# RO 130562 B1

1           Invenția se referă la un procedeu de realizare a unui dispozitiv dielectroforetic de tipul  
„lab-on-a-chip”, compus dintr-o platformă microfluidică și un senzor de impedanță electro-  
3 chimică.

5           Lipozomii, sau vehicule lipidice, sunt sfere apoase închise printr-o membrană lipidică  
dublă, formată prin sonicarea unui lipid într-un mediu apos. Lipozomii sunt utilizați pentru  
7 studierea lipidelor și a proprietăților membranelor, deoarece compoziția lor poate fi controlată  
foarte bine prin contrast cu celulele ale căror membrane sunt foarte heterogene cu conținut  
9 variat de lipide și proteine. În majoritatea lucrărilor de specialitate studiile sunt efectuate pe  
celule de drojdie și bacterii. În plus față de stratul lipidic, aceste celule posedă și pereți  
11 celulari care le conferă structură și formă bine definite. Cele mai importante tipuri de bacterii  
sunt clasificate ca fiind Gram pozitive, cu peretele celular gros de 25 nm și bogat în  
13 peptidoglican, sau Gram negative, cu peretele celular de peptoglican gros de 3 nm dublat  
de un perete de proteine, lipide și lipopolizaharide gros de 8 nm. Lipozomii sunt compuși  
15 dintr-un număr de faze diferite incluzând regiuni apoase și lipide cu proprietăți electrice foarte  
diferite.

17           Rezultatul interacției lipozomilor cu câmpul electric local, prin inducerea unei separări  
a sarcinilor cu formarea unor noi dipoli, apare polarizarea indusă. În sistemele biologice  
19 există două exemple importante de polarizare indusă: migrarea ionilor pe suprafața macro-  
moleculilor, cu alte cuvinte migrarea indusă de câmpul electric și polarizarea interfacială  
Maxwell-Wagner a suprafețelor neconductive. Biomaterialele sunt compuse din molecule  
21 care prezintă diferențe mari de permitivitate și conductivitate. Când se aplică un câmp elec-  
tric unui astfel de material, mobilitatea purtătorilor de sarcină, cum ar fi ionii, este considerabil  
23 mai mare în unele regiuni (de exemplu fazele apoase) în comparație cu alte regiuni (cum ar  
fi fazele lipide). Aceasta duce la apariția unei distribuții de sarcină neuniformă pe suprafețele  
25 neconductive. Astfel de sisteme heterogene prezintă proprietăți puternic dependente de  
frecvență, care sunt diferite de proprietățile constituenților fazei. În concluzie, acumularea  
27 sarcinilor electrice la membrana lipidică poate produce un proces de relaxare interfacial de  
tip Maxwell-Wagner. Acest fapt este observat experimental, cu ajutorul dispozitivului dezvol-  
29 tat conform invenției, prin centrarea dispersiei, din curba permitivității imaginare, în zona  
frecvențelor scăzute (fig. 4). În trecut, modelul principal pentru simularea relaxării interfaciale  
31 era modelul unilamelar, care lua în considerare numai membrana lipidică, interiorul apos și  
mediul de suspensie. Acest model a fost folosit cu succes pentru a prezice comportamentul  
33 dielectric al lipozomilor (**Stephen Bone și Bogumil Zaba, „Bioelectronics”, Ed. John  
Wiley & Sons, ISBN 0471932965, pag. 77-84).**

35           Pentru veziculele în care membrana lipidică conține fosfolipide încărcate electric,  
devine importantă și dispersia dielectrică la frecvențe mari, dar sub 1 MHz. Prezența  
37 fosfolipidelor încărcate atrage populațiile de ioni, încărcăți cu semn opus, din vecinătatea  
grupelor lipidice. Această dispersie este asociată atât cu mișcarea ionilor tangențial la  
39 suprafața veziculei cât și cu polarizarea radială a straturilor ionice din jurul acesteia. Teoria  
prezice că timpul de relaxare este proporțional cu raza veziculei și cu mobilitatea ionilor din  
41 apropiere, în timp ce incrementul dielectric este proporțional cu raza și cu concentrația  
veziculelor („**Probing the membrane potential of living cells by dielectric spectroscopy**”  
43 **Corina Bot, C. Prodan, Eur Biophys J (2009) 38:1049-1059, DOI 10.1007/s00249-009-  
0507-0; Prodan E, Prodan C, Miller JH (2008) „The dielectric response of spherical live  
45 cells in suspension: an analytic solution” Biophys J 95:4174-4182; Prodan E, Prodan  
C, Miller JH (2008) „The dielectric response of spherical live cells in suspension: an  
47 analytic solution”, Biophys J 95:4174-4182). Tot în literatura de specialitate este prezen**

# RO 130562 B1

tată realizarea unui dispozitiv microfluidic în care este folosit SU-8. Dispozitivul este compus din microstructuri SU-8 care au fost fabricate prin intermediul fotolitografiei, folosind sticlă și siliciu ca materiale de substrat. Pe lângă fabricarea microcanalelor prin intermediul SU-8, s-a folosit și SU-8 ca strat adeziv (**Claudia Garcia et al, Fabrication of Microfluidic Devices using SU-8 for Detection and Analysis of Viruses, SENSOR+TEST Conference 2009 - SENSOR 2009 Proceedings I**).

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția este realizarea unui dispozitiv portabil și reutilizabil pentru diagnostic molecular.

Procedeul de realizare a dispozitivului dielectroforetic de tipul "lab-on-a-chip" reutilizabil conform invenției, se realizează un senzor impedimetric care este compus dintr-o pereche de electrozi de lucru interdigitați Cr /Au, 40 perechi digiți cu lățimea de 5 μm și spațiere 5 μm, un electrod auxiliar Cr/Au și un electrod de referință Ag/AgCl care se realizează prin fotolitografie UV și depunere prin pulverizare catodică, electrozii astfel obținuți sunt integrați într-o cameră de reacție cu un sistem de canale microfluidice, canalele microfluidice fiind realizate din plachete de sticlă care au fost tratate termic înainte de corodare la o temperatură de 560°C, timp de 6h, în atmosferă de N<sub>2</sub>, stratul de mascare, siliciu amorf, se depune chimic din fază de vapori asistată de plasmă la o temperatură de 300°C, cu o putere de 60W, cu un debit de SiH<sub>4</sub> de 60 sccm, corodarea umedă a sticlei fiind făcută în HF cu o concentrație de 49%, timp de 10 min, iar pereții canalelor microfluidice fiind realizați din SU8.

În procedeul de realizare a dispozitivului dielectroforetic, pentru a obține straturi de siliciu amorf cu tensiuni interne cât mai mici, se fac depuneri multiple la frecvențe înalte de 13,56 MHz și joase de 350 kHz, ale generatorului RF, cu următorii pași de proces: temperatură 300°C, putere 60 W, precursor SiH<sub>4</sub> cu debitul 60 sccm, presiune 580 mTorr și fără tratament termic al stratului de mascare.

Procedeul, conform invenției invenției, prezintă următoarele avantaje: permite realizarea unui dispozitiv de tipul „lab-on-a-chip” portabil și reutilizabil pentru diagnostic molecular al tipului și integrității celulelor în funcție de variația permitivității dielectrice a celulelor cu frecvența. În prezent pentru diagnosticul celular se folosesc echipamente scumpe, cum ar fi flowcitometrul, care nu sunt portabile și trebuie gestionate de persoane calificate. Dispozitivul realizat potrivit invenției este portabil, cu dimensiuni mici (25 mm - 15 mm - 5mm), pin-out potrivit cu USB SATA II, graficele se pot citi pe o tabletă, iar persoanele care interpretează rezultatele obținute nu trebuie să fie calificate.

În continuare se prezintă pe larg invenția și în legătură cu fig. 1...4 care reprezintă:

- fig. 1, proiectul de layout al dispozitivului;
- fig. 2, etapele principale de realizare a dispozitivului;
- fig. 3, diagrama Nyquist a permitivității determinate din măsurători de impedanță;
- fig. 4, modelarea experimentală a comportamentului dielectric al lipozomilor.

Senzorul impedimetric, conform invenției, constă dintr-o pereche de electrozi de lucru interdigitați, un electrod de referință și un electrod auxiliar. Dispozitivul integrat are lungimea de 2 cm și lățimea de 1 cm. Camera de reacție are lungimea de 2 mm, lățimea de 1 mm, iar ea conține 40 perechi microelectrozi interdigitați (5 pm lățime cu 5 pm spațiere), electrodul auxiliar (100 pm) și electrodul de referință (300 pm). Microcanalele fluidice, conform invenției, au fost proiectate astfel încât interacțiile dintre reactivii biochimici să fie minime, iar selectivitatea de detecție și analiză să fie maximă. Șapte microcanale independente sunt atribuite pentru fiecare soluție de testare în funcție de succesiunea lor de injecție. Microcanalul atribuit fluidului de care este nevoie în ultimul pas al analizei este poziționat la distanța cea mai scurtă față de camera de reacție, în opoziție față de microcanalele pe care se vor transporta soluțiile tampon, de care este nevoie în primul pas și care se poziționează pe distanța cea mai mare. Fiecare microcanal are lățimea de 150 μm și adâncimea de 100 μm.

# RO 130562 B1

## 1 *Fabricația microelectrozilor, conform invenției*

3 Perechea de electrozi de lucru interdigitați: Cr (30 nm)/Au (300 nm), 40 perechi digiți  
cu lățimea de 5 pm și spațiere 5 pm), electrodul auxiliar (Cr/Au; 100 pm lățime) și electrodul  
5 de referință (Ag/AgCl; 300 pm lățime) se realizează prin litografie UV și depunere prin  
7 pulverizare catodică. Pe o plachetă de siliciu monocristalin se crește un strat de oxid de  
siliciu de 2 μm; se depune un strat de Cr/Au (30nm/300nm) prin pulverizare catodică pe  
suprafața bioxidului de siliciu (SiO<sub>2</sub>), apoi un strat de fotorezist pozitiv pentru imprimarea  
măștii fotolitografice, și modelarea stratului de Cr/Au prin mască de fotorezist.

## 9 *Fabricația canalelor microfluidice și a rezervoarelor, conform invenției*

11 Pereții canalului microfluidic sunt realizați din SU8 și au înălțimea de 20 μm. Orificiile  
rezervoarelor de intrare-ieșire a fluidelor și capacul dispozitivului se gravează în sticlă  
Corning 7740.

13 S-au folosit plachete de sticlă care au suferit tratament termic înainte de corodare la  
560°C timp de 6 h în atmosferă de N<sub>2</sub>. Stratul de mascare, siliciu amorf, a fost depus în sis-  
15 temul PECVD de la SPTS. Depunerea PECVD a fost realizată la 300°C, 60 W, SiH<sub>4</sub> debit:  
60 sccm, presiune = 580 mTorr, stratul de mascare nu a suferit tratament termic. Corodarea  
17 umedă a sticlei a fost realizată în HF 49% timp de 10 min cu agitare magnetică.

Stratul de mascare de siliciu amorf prezintă o tensiune internă de compresie cu valori  
19 între 500...600 MPa. Un strat de mascare care prezintă stres de comprimare (caracteristică  
generală pentru siliciu amorf și polisiliciu) este de preferat o mască ce prezintă stres de  
21 întindere, astfel încât stresul total să fie în jurul valorii "zero", utilizând și o modelare a para-  
metrilor de depunere PECVD. Siliciul amorf ca strat de mascare prezintă trei avantaje  
23 principale: este inert în soluțiile pe bază de HF; este hidrofob, astfel încât soluțiile de  
corodare penetrează greu prin eventualele goluri apărute la depunere; se pot controla foarte  
25 bine tensiunile interne ale stratului de siliciu amorf printr-o arhitectură adecvată a condițiilor  
de depunere asistată de plasmă (temperatură joasă, presiune și putere mică), dar și printr-un  
27 tratament termic după depunere. Pentru a obține straturi de siliciu amorf cu tensiuni interne  
cât mai mici posibil se face depunerea în doi pași: la frecvență mică și apoi la frecvență  
29 mare. Tratamentul termic poate reduce tensiunile interne în stratul depus, dar poate  
îmbunătăți foarte mult și anizotropia corodării. Straturi de siliciu amorf PECVD cu tensiuni  
31 interne foarte mici se pot realiza prin optimizarea parametrilor de depunere în sistemului  
PECVD. Depunerea stratului de siliciu amorf cu stres scăzut se poate obține folosind  
33 generatorul de înaltă frecvență (13,56 MHz), la nivel relativ scăzut de temperatură (200°C)  
și, de asemenea, o densitate de putere relativ scăzută (în jur de 0,3 W cm<sup>2</sup>). Pentru a obține  
35 tensiuni reziduale aproape de valoarea "zero", se folosesc depuneri multiple la frecvențe  
înalte și joase ale generatorului RF, în scopul de a acoperi eventualele defecte de depunere  
37 și transformarea într-o suprafață un hidrofobă. Folosind și masca de fotorezist peste siliciu  
amorf, calitatea gravurii în termeni de profunzime poate fi semnificativ îmbunătățită până la  
39 500 μm, iar generarea defectelor se poate evita.

Prepararea lipozomilor folosiți pentru testarea funcționării dispozitivului:

41 Au fost elaborate 3 metode de preparare a lipozomilor:

- 43 a. lipozomi încărcăți cu nanoparticule de γ-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>;
- b. lipozomi tricomponent marcați cu rodamina B;
- 45 c. lipozomi bicomponent marcați cu rodamina B.

În cele ce urmează sunt descrise cele trei tehnici folosite pentru obținerea lipozomilor  
caracterizați cu ajutorul dispozitivului, și anume:

- 47 a. lipozomi încărcăți cu nanoparticule de γ-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

49 Într-un volum de 100 mL de CHCl<sub>3</sub>:CH<sub>3</sub>OH = 2:1 (v/v) au fost dizolvate 0,2 g de  
fosfatidil colină (PC), colesterol (Chol) și 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE)  
aflate în raport molar 7:7:1. Ulterior solubilizării, amestecul a fost supus evaporării la

# RO 130562 B1

presiune scăzută (100 mbar), pe baie de apă, la 40°C, timp de 6 h. O cantitate, în exces, de nanoparticule de  $\nu\text{-Fe}_2\text{O}_3$  (0,2 g) a fost resuspendată în 100 soluție tampon fosfat salin (10 mM, pH 7,40). Această dispersie a fost adusă la 37°C și apoi folosită drept mediu de hidratare pentru filmul lipidic, timp de 1 h, la presiune atmosferică. Excesul de nanoparticule a fost înlăturat prin decantare, în faza de supematant rămânând doar lipozomii cu nanoparticulele încapsulate.

b. lipozomi tricomponent marcați cu rodamina B

Într-un volum de 10 mL de  $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH} = 1:1$  (v/v) au fost dizolvate 18 mg de 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE), 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DPPC) și colesterol (Chol) aflate în raport molar 12:6:12. Ulterior solubilizării, amestecul a fost supus evaporării la presiune scăzută (70 mbar), pe baie de apă, la 40°C, timp de 6 h. După evaporarea amestecului de solvenți au fost adăugați 3 ml de eter etilic, și s-a așteptat până când filmul lipidic s-a solubilizat complet. O cantitate, în exces, de rodamina B (0,5 mg) solubilizată într-un 1 ml soluție tampon fosfat salin (10 mM, pH 7,40) a fost adăugată peste soluția lipidică. Această soluție a fost omogenizată timp de 30 min (prin agitare mecanică), eterul fiind înlăturat (la 50°C și 200 mbar). A fost astfel obținută o emulsie de tip apă-în-ulei, lipozomii astfel obținuți având încorporat marker-ul de fluorescentă.

c) lipozomi bicomponent marcați cu rodamina B

Într-un volum de 6 mL de  $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}=6:1$  (v/v) au fost dizolvate 46.4 mg de 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DPPC) și colesterol (Chol) aflate în raport molar 4:2. Ulterior solubilizării, amestecul a fost supus evaporării la presiune scăzută (50 mbar), pe baie de apă, la 55°C, timp de 6 h. După evaporarea amestecului de solvenți au fost adăugați 10 ml de soluție tampon fosfat salin (10 mM, pH 7,40), conținând 5,5 mM rodamina B. Procesul de rehidratare și formare a lipozomilor a decurs pentru încă 1 h, la 55°C, la presiune atmosferică.

Caracterizarea lipozomilor cu ajutorul dispozitivului dezvoltat conform invenției a fost realizată prin spectroscopie de impedanță electrochimică. La aplicarea unei tensiuni electrice între electrozii de lucru ai senzorului de +350 mV și respectiv -350 mV, pe digiții unuia dintre electrozi, anodul, se produce o reacție de oxidare cu eliberare de electroni, iar pe digiții celuilalt are loc o reacție de reducere cu captare de electroni, iar interfața solid-lichid se comportă ca un condensator. Cu cât interfața este mai mare, cu atât capacitatea crește, ceea ce determină o aplatizare a picăturii inițiale, respectiv o scădere a unghiului de contact.

# RO 130562 B1

## Revendicări

1

3

1. Procedeu de realizare a dispozitivului dielectroforetic de tipul "lab-on-a-chip" reutilizabil, **caracterizat prin aceea că** se realizează un senzor impedimetric care este compus dintr-o pereche de electrozi de lucru interdigitați Cr/Au, 40 perechi digiți cu lățimea de 5  $\mu\text{m}$  și spațiere 5  $\mu\text{m}$ , un electrod auxiliar Cr/Au și un electrod de referință Ag/AgCl care se realizează prin fotolitografie UV și depunere prin pulverizare catodică, electrozii astfel obținuți sunt integrați într-o cameră de reacție cu un sistem de canale microfluidice, canalele microfluidice fiind realizate din plachete de sticlă care au fost tratate termic înainte de corodare la o temperatură de 560°C, timp de 6 h, în atmosferă de N<sub>2</sub>, stratul de mascare, siliciu amorf, se depune chimic din fază de vapori asistată de plasmă la o temperatură de 300°C, cu o putere de 60 W, cu un debit de SiH<sub>4</sub> de 60 sccm, corodarea umedă a sticlei fiind făcută în HF cu o concentrație de 49%, timp de 10 min, iar pereții canalelor microfluidice fiind realizați din SU8.

11

13

15

2. Procedeu de realizare a dispozitivului dielectroforetic definit în revendicarea 1, **caracterizat prin aceea că** pentru a obține straturi de siliciu amorf cu tensiuni interne cât mai mici, se fac depuneri multiple la frecvențe înalte de 13,56 MHz și joase de 350 kHz, ale generatorului RF, cu următorii pași de proces: temperatură 300°C, putere 60 W, precursor SiH<sub>4</sub> cu debitul 60 sccm, presiune 580 mTorr și fără tratament termic al stratului de mascare.

17

19

(51) Int.Cl.  
**B81C 1/00** (2006.01),  
**G01N 27/30** (2006.01)

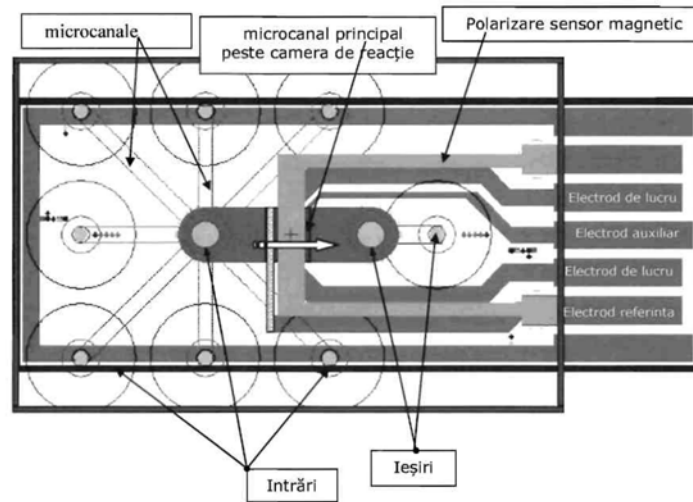


Fig. 1



Fig. 2

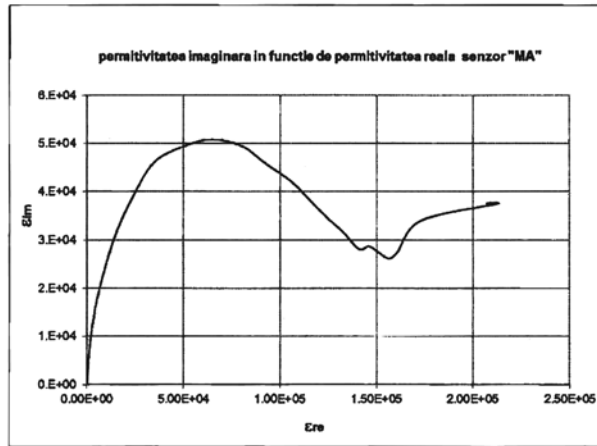


Fig. 3

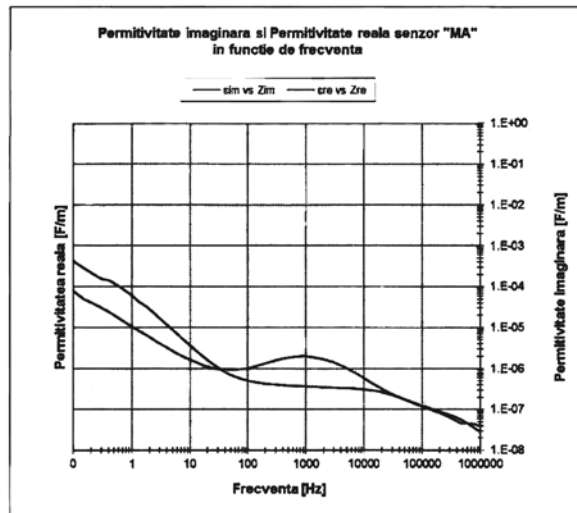


Fig. 4

