

(12)

## CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

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

(22) Data de depozit: **16.01.2014**

(41) Data publicării cererii:  
**30.09.2015** BOPI nr. **9/2015**

(71) Solicitant:  
• **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. OLTENEIȚEI NR. 224, BL. 6, SC. 2,  
ET. 8, AP. 105, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B,  
RO**

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

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un dispozitiv microfluidic pentru caracterizarea dielectrică a lipozomilor autoasamblați în canale microfluidice. Dispozitivul conform invenției este constituit dintr-un senzor impedimetric cu niște microelectrozi de lucru interdigitați, un electrod de referință și un electrod auxiliar, integrați într-o cameră de reacție, și un sistem de canale microfluidice, pentru alimentarea camerei de reacție cu fluide, și exhaustarea camerei de reacție.

Revendicări: 4  
Figuri: 4

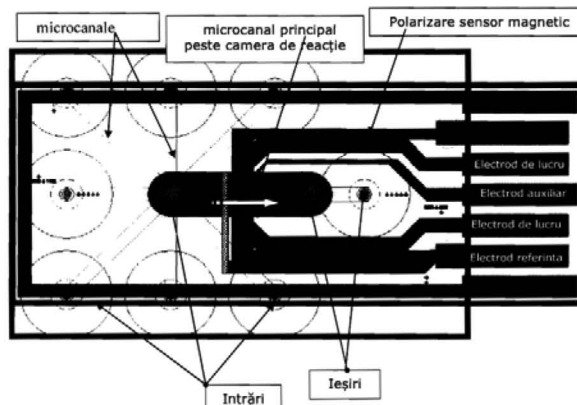
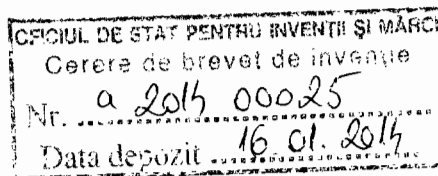


Fig. 1

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).





## PROCEDEU DE REALIZARE A DISPOZITIVULUI DIELECTROFORETIC PENTRU CARACTERIZAREA DIELECTRICA A LIPOZOMILOR AUTOASAMBLATI IN CANALE MICROFLUIDICE

**Autori: Marioara Avram, Antonio Rădoi, Andrei Avram, Cătălin Mărculescu, Cătălin Bălan**

Invenția se referă la un dispozitiv microfluidic de tipul „lab-on-a-chip”, compus dintr-o platformă microfluidică și un senzor de impedanță electrochimică.

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 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 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 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 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 dintr-un număr de faze diferite incluzând regiuni apoase și lipide cu proprietăți electrice foarte diferite.

Rezultatul interacției lipozomilor cu câmpul electric local, prin inducerea unei separări a sarcinilor cu formarea unor noi dipoli, apare polarizarea indusă. În sistemele biologice există două exemple importante de polarizare indusă: migrarea ionilor pe suprafața macromoleculilor, cu alte cuvinte migrarea indusă de câmpul electric și polarizarea interfacială Maxwell – Wagner a suprafețelor neconductive. Biomaterialele sunt compuse din molecule care prezintă diferențe mari de permitivitate și conductivitate. Când se aplică un câmp electric unui astfel de material, mobilitatea purtătorilor de sarcină, cum ar fi ionii, este considerabil 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 neconductive. Astfel de sisteme heterogene prezintă proprietăți puternic dependente de frecvență, care sunt diferite de proprietățile constituenților fazei. În concluzie, acumularea sarcinilor electrice la membrana lipidică poate produce un proces de relaxare interfacial de tip Maxwell-Wagner. Acest fapt este observat experimental, cu ajutorul dispozitivului dezvoltat conform invenției, prin centrarea dispersiei, din curba permitivității imaginare, în zona frecvențelor scăzute (Fig. 4). În trecut, modelul principal pentru simularea relaxării interfaciale 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 dielectric al lipozomilor (Stephen Bone și Bogumil Zaba, „Bioelectronics”, Ed. John Wiley & Sons, ISBN 0471932965, pag. 77-84.

Pentru veziculele în care membrana lipidică conține fosfolipide încărcate electric, devine importantă și dispersia dielectrică la frecvențe mari, dar sub 1 MHz. Prezența fosfolipidelor încărcate atrage populațiile de ioni, încărcăți cu semn opus, din vecinătatea grupelor lipidice. Această dispersie este asociată atât cu mișcarea ionilor tangențial la 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 apropiere, în timp ce incrementul dielectric este proporțional cu raza și cu concentrația veziculelor („Probing the membrane potential of living cells by dielectric spectroscopy” 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 cells în suspension: an analytic solution” Biophys J 95:4174–4182; Prodan E, Prodan C, Miller JH (2008) „The dielectric response of spherical live cells în suspension: an analytic solution”, Biophys J 95:4174–4182)

Proiectul de layout al dispozitivului se prezintă în figura 1. Senzorul impedimetric, conform invenției, constă dintr-o pereche de electrozi de lucru, 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 μm lățime cu 5 μm spațiere), electrodul auxiliar (100 μm) și electrodul de referință (300 μm). 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.

Etapele principale de realizare a dispozitivului sunt schematizate în figura 2.

**Fabricația microelectrozilor, conform invenției:**

Perechea de electrozi de lucru interdigitați: Cr (30 nm)/Au (300 nm), 40 perechi digiți cu lățimea de 5 μm și spațiere 5 μm), electrodul auxiliar (Cr/Au; 100 μm lățime ) și electrodul de referință (Ag/AgCl; 300 μm lățime) se realizează prin litografie UV și depunere prin 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.

**Fabricația canalelor microfluidice și a rezervoarelor, conform invenției:**

Pereții canalului microfluidic sunt realizați din SU8 și au înălțimea de 20  $\mu\text{m}$ . Orificiile rezervoarelor de intrare – ieșire a fluidelor și capacul dispozitivului se gravează în sticlă Corning 7740.

S-au folosit plachete de sticlă care au suferit tratament termic înainte de corodare la 560°C timp de 6 ore în atmosferă de  $\text{N}_2$ . Stratul de mascare, siliciu amorf, a fost depus în sistemul PECVD de la SPTS. Depunerea PECVD a fost realizată la 300°C, 60W,  $\text{SiH}_4$  debit: 60 sccm, presiune=580 mTorr, stratul de mascare nu a suferit tratament termic. Corodarea 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 între 500-600MPa. 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 întindere, astfel încât stresul total să fie în jurul valorii "zero", utilizând și o modelare a parametrilor de depunere PECVD. Siliciul amorf ca strat de mascare prezintă trei avantaje 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 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 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 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 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 generatorul de înaltă frecvență (13.56MHz), la nivel relativ scăzut de temperatură (200°C) și, de asemenea, o densitate de putere relativ scăzută (în jur de 0,3Wcm<sup>-2</sup>). Pentru a obține 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 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 500 $\mu\text{m}$ , iar generarea defectelor se poate evita.

**Prepararea lipozomilor folosiți pentru testarea funcționării dispozitivului:**

Au fost elaborate 3 metode de preparare a lipozomilor: (a) lipozomi încărcăți cu nanoparticule de  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ , (b) lipozomi tricomponent marcați cu rodamina B și (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:

a) lipozomi încărcăți cu nanoparticule de  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

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 presiune scăzută (100 mbar), pe baie de apă, la 40°C, timp de 6 h. O cantitate, în exces, de nanoparticule de  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (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 oră, la presiune atmosferică. Excesul de nanoparticule a fost înlăturat prin decantare, în faza de supernatant rămânând doar lipozomii cu nanoparticulele încapsulate.

## b) lipozomi tricomponent marcați cu rodamina B

Într-un volum de 10 mL de CHCl<sub>3</sub>:CH<sub>3</sub>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 rodamină 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 fluorescență.

## c) lipozomi bicomponent marcați cu rodamină B

Intr-un volum de 6 mL de CHCl<sub>3</sub>:CH<sub>3</sub>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), continand 5.5 mM rodamina B. Procesul de rehidratare și formare a lipozomilor a decurs pentru încă o oră, 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 +350mV și respectiv -350mV, 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.

## REVEDICĂRI

1. Procedeu de realizare a dispozitivului dielectroforetic de tipul lab-on-a-chip reutilizabil **caracterizat prin aceea că**, este constituit dintr-un senzor impedimetric cu microelectrozi de lucru interdigitați, electrod de referință, electrod auxiliar integrați în camera de reacție și un sistem de canale microfluidice pentru alimentarea camerei de reacție cu fluide și exhaustarea camerei de reacție.

2. Procedeu de realizare a senzorului impedimetric miniaturizat definit în revendicarea 1, **caracterizat prin aceea că**, microelectrozilor interdigitați sunt proiectați astfel încât la același potențial aplicat curentul este amplificat cu trei ordine de mărime față de cei existenți în literatura de specialitate, dimensiunile lor fiind 80 mm lungime, 5 μm lățime și 330 nm grosime.

3. Procedeu de realizare a sistemului microfluidic definit la revendicarea 1 **caracterizat prin aceea că**, microcanalele fluidice și orificiile de intrare – ieșire se realizează prin îmbinarea tehnologiei de microprelucrare a sticlei cu tehnologia transparentă pe bază de SU8.

4. Procedeu de interpretare a curbelor de variație a impedanței ale dispozitivului definit în revendicarea 1, curbe obținute prin măsurători de spectroscopie electrochimică și **caracterizat prin**, determinarea variației în funcție de frecvență a permitivității dielectrice reale și imaginare a lipozomilor din măsurători de impedanță.



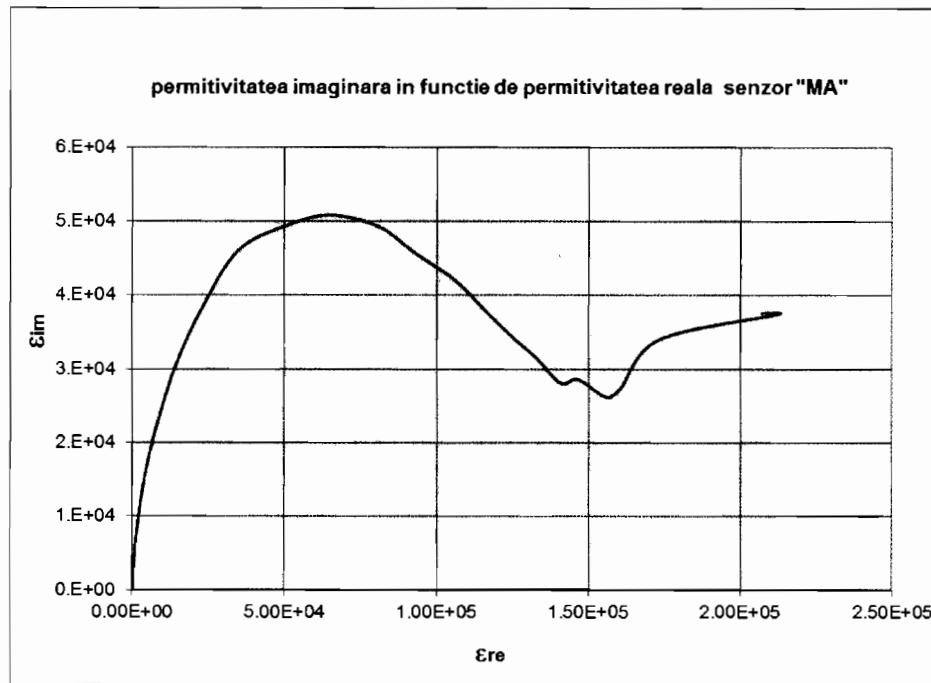


Figura 3. Diagrama Nyquist a permitivităților determinate din măsurători de impedanță. În semiplanul din stânga sunt permitivitățile la frecvențele mari, unde preponderent este transferul de sarcini, iar în semiplanul din stânga sunt permitivitățile la frecvențele mici unde domină difuzia speciilor

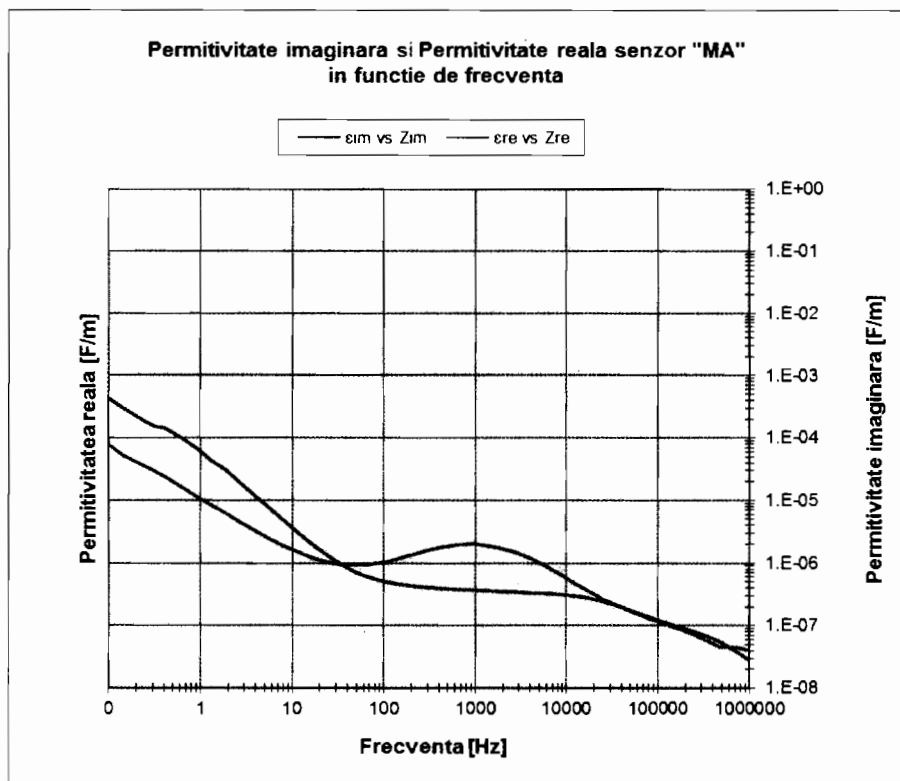


Figura 4. Modelarea experimentală a comportamentului dielectric al lipozomilor pe baza mecanismelor de relaxare interfacială de tip Maxwell-Wagner, observat experimental prin centrarea dispersiei permitivității imaginare în zona frecvențelor mai mici de 1 MHz.