

(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2022 00024

(22) Data de depozit: 25/01/2022

(41) Data publicării cererii:
30/09/2022 BOPi nr. 9/2022

(71) Solicitant:
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU
MICROTEHNOLOGIE-IMT BUCUREȘTI,
STR.EROU IANCU NICOLAE 126A,
VOLUNTARI, IF, RO

(72) Inventatori:
• AVRAM MARIOARA, STR.FELEACU
NR.19, BL.12 C, SC.3, AP.31, SECTOR 1,
BUCUREȘTI, B, RO;
• ADIACONIȚĂ BIANCA CĂȚĂLINA,
STR.POPEȘTI-VEST, NR.31, BL.C4, ET.3,
AP.24, POPEȘTI-LEORDENI, IF, RO;

• AVRAM MARIUS ANDREI, STR.FELEACU
NR.19, BL.12 C, SC.3, AP.31, SECTOR 1,
BUCUREȘTI, B, RO;
• PREDA PETRUȚA, BD. 1 DECEMBRIE
NR. 52, BL. A2, SC. E, AP. 13, OLTENIȚA,
CL, RO;
• VOIȚINCU CORNELIU,
STR.SG. MAJ.EROU SIMION I.BUSUIOC
NR.98, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;
• CHIRIAC EUGEN, STR. TELEGRAF SUD,
NR.58, COMUNA JIJILIA, TL, RO;
• BURINARU TIBERIU ALECU, STR.TÂRGU
NEAMȚ NR.12, BL.TD24, SC.1, ET.7, AP.44,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
• MĂRCULESCU CĂTĂLIN VALENTIN,
ȘOS. OLTENIȚEI NR. 224, BL. 6, SC. 2,
ET. 8, AP. 105, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B,
RO

(54) **SENZOR ELECTROCHIMIC PE BAZĂ DE GRAFENĂ
VERTICALĂ PENTRU DETECȚIA CELULELOR TUMORALE
CIRCULANTE PRIN SPECTROSCOPIE DE IMPEDANȚĂ
ELECTROCHIMICĂ**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un senzor electrochimic pe bază de grafenă verticală pentru detecția celulelor tumorale circulante prin spectroscopie de impedanță electrochimică. Senzorul conform invenției este constituit din microelectrozi de lucru interdigitați, modificați cu grafenă verticală decorată cu nanoparticule de aur, un electrod de referință și un electrod auxiliar, în care decorarea cu nanoparticule de aur (AuNPs) a electrozilor de lucru se realizează prin imobilizarea covalentă a AuNPs pe suprafața grafenei după silanizarea suprafeței în soluție apoasă de (3-Aminopropil) trietoxisilan (APTES), iar atașarea AuNPs se realizează prin interacțiuni electrostatice între sarcina electrică negativă a AuNPs și sarcina electrică pozitivă a grupării amino din structura APTES, urmată de o etapă de imobilizare specifică a unor anticorpi EpCAM pe suprafața AuNPs, pentru a facilita detecția celulelor tumorale circulante prin spectroscopie de impedanță electrochimică. Pentru detecția celulelor tumorale circulante se folosesc două linii celulare de adenocarcinom de colon.

Revendicări: 5
Figuri: 6

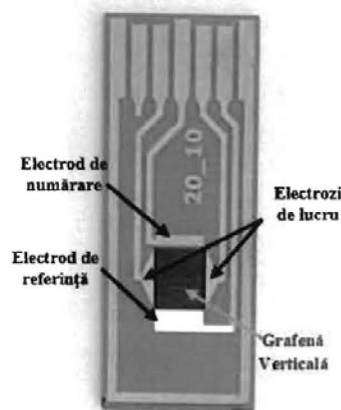
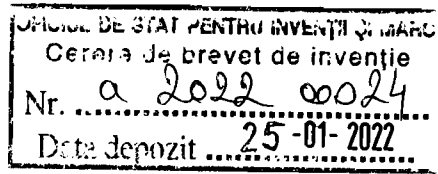


Fig. 3

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).





45

SENZOR ELECTROCHIMIC PE BAZĂ DE GRAFENĂ VERTICALĂ PENTRU DETECȚIA CELULELOR TUMORALE CIRCULANTE PRIN SPECTROSCOPIE DE IMPEDANȚĂ ELECTROCHIMICĂ

Autori: Marioara AVRAM, Bianca Cătălina (ȚÎNCU) ADIACONIȚEI, Andrei Marius AVRAM, Petruța PREDA, Corneliu VOIȚINCU, Eugen CHIRIAC, Tiberiu Alecu BURINARU, Cătălin Valentin MĂRCULESCU

Descriere:

Invenția se referă la un procedeu de realizare a unui senzor electrochimic ai cărui microelectrozi de lucru interdigitați se modifică cu grafenă verticală decorată cu nanoparticule de aur în vederea creșterii conductibilității electrice și implicit mărirea sensibilității de biodetecție a celulelor tumorale circulante.

Senzorul construit, conform invenției, este mult mai sensibil prin comparație cu senzorii electrochimici ai căror microelectrozi interdigitați sunt metalici. Creșterea sensibilității se datorează creșterii conductibilității electrice care este direct proporțională cu mobilitatea și concentrația electronilor, și se obține prin modificarea controlată a microelectrozilor din aur cu grafenă verticală decorată cu nanoparticule de aur. Grafena verticală este formată din foi grafenice de grosime atomică orientate perpendicular pe suprafața electrozilor. Grafena este cunoscută ca fiind materialul cu mobilitatea electronilor foarte mare. Grafena se decorează cu nanoparticule de aur pentru a crește suprafața de biodetecție și concentrația superficială a electronilor.

În procesul de metastazare celulele tumorale părăsesc tumora primară și intră în sistemele limfatic și sanguin. Aceste celule care metastazează sunt numite celule tumorale circulante (CTC). CTC-urile se deplasează în fluxul sanguin de unde pot recoloniza diferite țesuturi în care formează tumori secundare [1]. CTC-urile provenite din cancerle epiteliale sunt considerate a fi EpCAM+/ CK+/ DAPI+/ CD45. Acești markeri pot fi utilizați pentru a detecta CTC-urile și pentru a le diferenția de celelalte celule sanguine. CTC-urile pot fi folosite în medicina de precizie pentru detecția precoce, alegerea strategiei de tratament și evaluarea eficienței tratamentului. Datorită unor factori biologici sau fizici majoritatea celulelor tumorale eliberate în fluxul sanguin sunt distruse, astfel încât doar un număr foarte



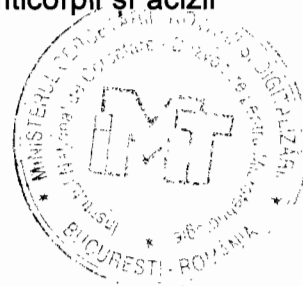
mic de CTC-uri (0,01%) supraviețuiesc și pot fi detectate [2]. Celulele tumorale circulante sunt o populație de celule foarte slab reprezentate în fluxul sanguin, cu o concentrație de câteva celule tumorale circulante/ml de sânge. Numărul lor este asociat cu prezența și stadiul de dezvoltare al tumorii, un număr mare de CTC-uri într-o probă de sânge fiind corelat cu un prognostic slab. Astfel, dezvoltarea unei tehnologii de depistare precoce a cancerului utilizând tehnici de detecție a CTC-urilor ar putea permite diagnosticarea în stadii incipiente și începerea imediată a tratamentului, fapt care ar reduce fără îndoială mortalitatea cauzată de cancer și creșterea ratei de supraviețuire.

În mod convențional, tumorile au fost diagnosticate în primul rând pe baza biopsiei țesutului tumoral și a examenului anatomopatologic. În comparație cu biopsia tisulară tradițională, biopsia lichidă din probe de sânge este non-invazivă, prin urmare poate fi utilizată pentru a indica stadiul bolii în timp real, putând indica inclusiv informații despre evoluția tumorii și eterogenitatea CTC-urilor și a markerilor de suprafață.

Tehnologiile CTC constau în principal din două etape: detecția și analizarea lor. Prima etapă este detectarea sau capturarea. Metodele bazate pe markeri sunt în principal bazate pe afinitatea de legare între proteinele de suprafață unice exprimate pe suprafața membranei CTC-urilor, cum ar fi molecula de adeziune epitelială (EpCAM) [3].

Biosenzorii sunt dispozitive analitice care convertesc o reacție biologică într-un semnal fizico-chimic măsurabil, care este direct proporțional cu concentrația analitului. Structura tipică a unui biosenzor constă în două elemente: i) o suprafață de contact pe care este legată componenta biologică care interacționează selectiv cu analitul de interes; și ii) un traductor pentru detectarea evenimentului de legare a analiților la suprafața de contact. Receptorul este cea mai importantă componentă pentru proiectarea unui biosenzor electrochimic, ceea ce implică anticorpi, peptide, acid dezoxiribonucleic (ADN), aptameri sau polimeri imprimați molecular [4].

Electrozii modificați cu nanomateriale pot crește suprafața activă a electrozilor și imobilizarea unui număr mai mare de bioreceptori, cum ar fi anticorpii și acizii



nucleici. Nanomaterialele 2D și nanomaterialele metalice sunt cele mai populare pentru modificarea electrozilor. Wang et al. au raportat utilizarea grafenei și a oxidului de grafenă ca nanomateriale 2D în dezvoltarea senzorilor electrochimici pentru diagnosticarea cancerului, datorită performanțelor electrice excelente [5].

Din cauza lipsei celulelor tumorale care exprimă markeri specifici de suprafață (EpCAM este utilizat în cea mai mare parte), metodele bazate pe imunoafinitate pot duce la o rată ridicată de fals-negative. În prezent, doar platforma CellSearch® (Veridex, Huntingdon Valley, PA) este aprobată de FDA pentru utilizarea clinică în stabilirea anumitor tipuri de cancer. Cu toate acestea, tehnica necesită mult timp, echipamente costisitoare și funcționalizare cu anticorpi, ceea ce limitează aplicarea pe scară largă a acestei tehnologii [6].

Microfabricația senzorului electrochimic cu electrozi interdigitați modificați cu grafenă verticală, conform invenției, este schematizată în Figura 1. Pașii de modelare a fluxului tehnologic în vederea fabricării senzorului electrochimic sunt detaliați în Figura 2. Procesul de bază al microfabricației microelectrozilor interdigitați pe bază de grafenă verticală este fotolitografia: transferul optic al geometriei de pe cele 3 măști, pe un substrat acoperit cu un strat de fotorezist. Pașii următori în etapa de fabricație a dispozitivului și de configurare a electrozilor sunt:

1) Pregătirea substratului: curățirea plachetei de Si prin imersare în soluție Piranha, urmată de spălarea cu apă deionizată și uscare prin centrifugare în atmosferă de azot;

2) Bioxidul de siliciu crescut termic în atmosferă umedă cu o grosime de aproximativ 300 nm: oxidare termică la temperatura de 1000°C, curățare în Piranha și ADI, deshidratare film oxidic la 150°C, timp de 30 minute, în hexametildisilazan;

3) Acoperire cu fotorezist și paternare folosind masca M1 – configurația straturilor metalice: procesul de fotogravură M1 pentru configurarea microelectrozilor: 2 electrozi de lucru interdigitați, electrod de numărare, electrod de referință, trasee și pinout-uri, presupune etalarea fotorezistului LOR 5A și fotorezistului AZ 1518, aliniere Masca M1, expunere la UV și dezvoltare;



4) Depunere TiN de 50 nm prin pulverizare catodică RF în vederea realizării unei bariere de difuzie a aurului în substrat, la o temperatură de 50°C, în atmosferă de Ar: 25 sccm și N₂: 10 sccm, timp: 50 min.

5) Metalizare prin depunerea unui film subțire de Cr (10 nm) și a unui film de Au (200 nm);

6) Procesul de Lift-off și curățare plachetă;

7) Creșterea grafenei verticale prin PECVD: temperatura 700°C; timp de creștere 1h; presiune 300 mTorr; fluxul de gaze Ar- 190 sccm, CH₄ -10 sccm.

8) Acoperire cu fotorezist și modelare folosind masca M2 – configurația electrozilor interdigitați cu grafenă verticală: etalare fotorezist AZ4562 prin centrifugare la 3000 rpm; tratament termic pe plită la temperatura de 90°C, timp de 30 min.; aliniere mască M2 cu substratul; expunere la radiații UV 405, timp de 40 sec.; dezvoltare;

9) Corodare grafenă verticală în RIE: în urma acestui proces grafena verticală va fi prezentă doar pe electrozii de lucru. Coorodarea RIE are loc în plasmă O₂, 250 W, 20 Pa, 5 min;

10) Îndepărtare fotorezist și curățare plachetă: Acetonă, alcool izopropilic;

11) Acoperire cu fotorezist și modelare cu ajutorul măștii M3 – pasivarea straturilor metalice: etalare fotorezist LOR 10B prin centrifugare la 3000 rpm, tratament termic la temperatura de 160°C, timp de 5 min, etalare AZ 1518 prin centrifugare la 3000 rpm, tratament termic la temperatura de 100°C, timp de 1 min, expunere Masca M3: 7,8 sec, dezvoltare: 30 sec; Metalizare pentru masca M3: depunere Ag: viteza de depunere: Au: 5Å/sec, grosime film de Ag 200 nm;

12) Depunere Al₂O₃ prin ALD (Atomic Layer Deposition) cu o grosime a stratului de 15 nm;

13) Lift-off metal prin imersie în acetonă încălzită la 50°C, timp de 18 ore; ultrasonare în acetona încălzită la 50°C; spălare în ADI;

După microfabricația senzorilor electrochimici, conform invenției, urmează trasarea senzorilor individuali (Figura 3).

Decorarea cu nanoparticule de aur (AuNPs) a electrozilor de lucru pe bază de grafenă verticală, conform invenției, se realizează prin imobilizarea covalentă a



AuNPs pe suprafața grafenei după silanizarea suprafeței în soluție apoasă de (3-Aminopropil) trietoxisilan (APTES) (10%). Procesul de silanizare realizându-se astfel: suprafața de lucru a senzorilor electrochimici (interdigiții de aur cu GV) a fost tratată cu 20 μ l soluție APTES, timp de 30 min. Ulterior, senzorii au fost riguros spălați cu apă deionizată. Apoi, după uscarea la temperatura camerei senzorii au fost menținuți în etuvă, timp de 10 minute, la 120°C, pentru a preveni eluarea APTES rămas după spălare.

După tratarea cu APTES, senzorii au fost imersați 24 h în soluție coloidală de AuNPs, apoi au fost spălați și uscați la temperatura camerei. Atașarea AuNPs s-a realizat prin interacțiuni electrostatice, realizate între sarcina electrică negativă a AuNPs și sarcina electrică pozitivă a grupării amino din structura APTES.

Procesul de conjugare a AuNPs constă în imersarea senzorului în soluție de clorhidrat de cisteamină (10mM) (Sigma-Algrich, USA), pentru 2 h, la temperatura camerei, apoi, acesta a fost spălat cu apă deionizată (x3), după care cisteamina legată de AuNPs a fost activată prin incubarea timp 1 h a senzorului în soluție 2,5% glutaraldehydă (Sigma-Algrich, USA). Activarea a fost necesară pentru atașarea specifică a anticorpului. După tratarea cu glutaraldehydă s-a spălat senzorul, iar apoi 10 μ l soluție de anticorpi anti-EpCAM (clonă de șoarece, Nordic BioSite) de concentrație 1:100 a fost etalată pe suprafața electrozilor cu GV, suprafața fiind complet acoperită de soluția de anticorpi. Senzorul a fost incubat în atmosferă umedă timp de 1 h, la temperatura camerei. La finalul perioadei de incubare senzorul a fost spălat cu tampon fosfat salin (PBS), pH 7.4. După etapa de spălare senzorul a fost etalat în zona GV cu 10 μ l soluție 1% de albumină serică bovină (Sigma-Aldrich, New Zealand), pentru blocarea grupărilor aldehidă nereacționate, și pentru a minimiza adsorbția nespecifică a anticorpului secundar marcat fluorescent, cu care s-a dorit punerea în evidență a funcționării procesului de imobilizare a anticorpilor EpCAM pe suprafața AuNPs. După spălarea cu PBS a dispozitivului s-au etalat 10 μ l de anticorp secundar (100 μ g/ml) anti-șoarece IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Flour 488 (Invitrogen, ThermoFisher). Condițiile de incubare sunt similare ca în cazul anti-EpCAM, descrise anterior.



Pentru detecția CTC-urilor au fost folosite două linii celulare cu diverse concentrații: Linia celulară umană de adenocarcinom de colon SW-403 (Nr. Cat. 87071008) și linia HT-29 (Nr. Cat. 91072201), achiziționate din Colecția Europeană de Culturi Celulare Autentificate (ECACC). Linia SW-403 a fost cultivată în mediu de cultură RPMI-1640 (Bio Whittaker Lonza), iar linia HT-29 în Mc-Coy's 5A (Bio Whittaker Lonza), suplimentate cu 10% ser fetal bovin (FBS, Euroclone, America de Sud) și 100 UI / ml penicilină + 100 μ g / ml streptomycină (Lonza) (mediu de cultură complet).

Celulele au fost incubate la 37°C într-o atmosferă suplimentată cu 5% CO₂, în recipiente de 75 cm². Linia celulară aderente HT-29 a fost cultivată până la confluență de 85%, apoi spălate cu soluție tampon fosfat salin (PBS, Sigma) și detașate folosind soluție 0,05% de tripsină-EDTA. Celulele au fost apoi suspendate în mediu de cultură complet, separate prin centrifugare la 200 rotații pe minut timp de 10 minute și resuspendate în mediu de cultură complet proaspăt. Celulele au fost spălate o dată cu soluție tampon fosfat salin (PBS) și de două ori cu soluție de zaharoză 250 mM înainte de a fi resuspendate în aceeași soluție de zaharoză pentru teste.

Mediul de suspensie cu conductivitate scăzută (250 mM zaharoză, 13 mS/m conductivitate) a fost ales pe baza datelor de viabilitate din experimentele preliminare și preparat prin dizolvarea zaharozei (Sigma) în apă distilată și ajustarea pH-ului la 7,4.

Senzorii funcționalizați au fost incubați timp de 1 h cu linia celulară, la diferite concentrații, după care au urmat măsurători electrochimice de impedanță prin evidențierea diagramei Nyquist și Bode, realizate prin metoda de Spectroscopie de Impedanță Electrochimică cu ajutorul potențostatului PGSTAT204 cu modul FRA32M: modulul de spectroscopie de impedanță electrochimică (EIS).

În diagrama Nyquist (Figura 4) este reprezentată impedanța imaginară ($-Z''$) în funcție de impedanța reală (Z'). Variația liniară a impedanței imaginare în funcție de impedanța reală corespunzătoare frecvențelor mici se datorează difuziei Warburg. Se observă creșterea rezistenței la transfer de sarcină cu mărirea concentrației celulelor.



Curbele de variație din Figura 5, pentru SW403, arată diferit de cele din Figura 4, pentru HT 29, deoarece celulele SW403 se aglomerează formând conglomerate mari.

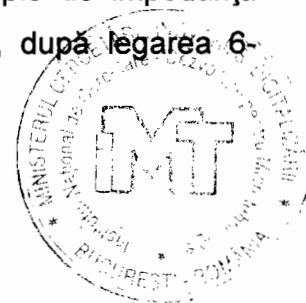
Se observă din Figura 6, atât din diagrama Nyquist, cât și din variația diferenței de fază dintre curent și tensiune, că celulele HT 29 față de SW403 au: rezistența la transferul sarcinii electrice mai mică, permitivitatea și conductivitatea electrică mai mari.

Celulele tumorale din linia HT29 au o suprafața membranară foarte pliată datorită microvililor și deci au o suprafață celulară mult mai mare comparativ cu celulele din linia SW403. În concluzie HT29 au capacitatea membranară mai mare, iar reactanța capacitivă mai mică. Capacitatea membranară mai mare a celulelor HT29 determină stocarea unui număr mai mare de sarcini electrice, ceea ce conduce la o conductivitate mai mare și o rezistență a transferului de sarcină mai mică. La nivelul microvililor există o concentrație foarte mare de punți lipidice în special de colesterol-glicosfingolipide. Dacă suprafața celulelor HT29 este mult mai mare comparativ cu SW403, înseamnă că și concentrația de punți lipidice adică de colesterol-glicosfingolipide este mult mai mare. Celulele tumorale din linia SW403 aderă și formează conglomerate celulare mari.

Până în prezent, nu am identificat brevete care să raporteze obiectivul acestei invenții și anume detecția electrochimică a celulelor tumorale circulante cu ajutorul unui senzor electrochimic pe bază de grafenă verticală. Vom aduce în discuție câteva din brevetele studiate, atât la nivel național cât și internațional, în același domeniu.

Invenția RO133995 (A2) — din Martie 2020 se referă la un procedeu de selecție a celulelor tumorale circulante de adenocarcinom de colon, pentru analiza prin citometrie în flux, prin marcarea acestora cu anticorpi anti-EpCam-FITC, anti-panCK-AF647 și anti-MUC-1-AF750, pentru detecție, și numărate prin citometrie în flux.

În 2016, Shen și colab. au raportat un senzor electrochimic bazat pe identificarea EpCAM pentru detecția CTC prin spectroscopie de impedanță electrochimică. Pentru a atinge cea mai înaltă sensibilitate, după legarea 6-



mercupto-1-hexanolului (MCH) pe electrodul de aur, proba de captură a fost poziționată în interspațiile MCH. LOD a senzorului electrochimic a fost de 10 celule mL^{-1} cu un interval liniar între 30 până la 1×10^6 celule mL^{-1} [7].

Brevetul KR101188172B1 din Octombrie 2012 se referă la un biosenzor electrochimic și la o metodă de fabricare a acestuia, electrodul de lucru fiind îmbunătățit cu un strat de diamant dopat cu impurități, grafenă monostrat format pe stratul de diamant dopat cu impurități și un strat de nanoparticule metalice format pe stratul de grafenă.

Brevetul US10935550B2 din Martie 2021 se referă la un sistem bazat pe oxid de grafenă pentru detectarea celulelor rare, cum ar fi CTC-urile. Sistemul include oxidul de grafenă dispus pe substrat de aur, linkerul GMBS legat de oxidul de grafenă, NeutrAvidin legat de linkerul GMBS, anticorpul EpCAM biotinitat la NeutrAvidin și celula tumorală legată de anticorpul EpCAM biotinitat.



SENZOR ELECTROCHIMIC PE BAZĂ DE GRAFENĂ VERTICALĂ PENTRU DETECȚIA CELULELOR TUMORALE CIRCULANTE PRIN SPECTROSCOPIE DE IMPEDANȚĂ ELECTROCHIMICĂ

Autori: Marioara AVRAM, Bianca Cătălina (ȚÎNCU) ADIACONIȚEI, Andrei Marius AVRAM, Petruța PREDA, Corneliu VOIȚINCU, Eugen CHIRIAC, Tiberiu Alecu BURINARU, Cătălin Valentin MĂRCULESCU

Bibliografie

- [1]. Hu X, Zang X and Lv Y: Detection of circulating tumor cells: Advances and critical concerns (Review). *Oncol Lett* 21: 422, 2021
- [2]. Tayoun T, Faugeron V, Oulhen M, Aberlenc A, Pawlikowska P and Farace F: CTC-derived models: A window into the seeding capacity of circulating tumor cells (CTCs). *Cells* 8: 1145, 2019.
- [3]. Thiele JA, Bethel K, Králíčková M and Kuhn P: Circulating tumor cells: Fluid surrogates of solid tumors. *Annu Rev Pathol* 12: 419-447, 2017.
- [4]. Feiyun Cui, Zhiru Zhou, and H. Susan Zhou, Review—Measurement and Analysis of Cancer Biomarkers Based on Electrochemical Biosensors, *Journal of The Electrochemical Society*, 2020 167 037525.
- [5]. L. Wang, Q. Xiong, F. Xiao, and H. Duan, 2D nanomaterials based electrochemical biosensors for cancer diagnosis. *Biosens. Bioelectron.*, 89, 136 (2017).
- [6]. Kalinich, M., Bhan, I., Kwan, T.T., Miyamoto, D.T., Javaid, S., LiCausi, J.A., Milner, J.D., Hong, X., Goyal, L., Sil, S., An RNA-based signature enables high specificity detection of circulating tumor cells in hepatocellular carcinoma, 2017. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 114 (5), 1123–1128.
- [7]. H. Shen, J. Yang, Z. Chen, X. Chen, L. Wang, J. Hu, F. Ji, G. Xie, W. Feng, A novel label-free and reusable electrochemical cytosensor for highly sensitive detection and specific collection of CTCs, *Biosens. Bioelectron.*, 81 (2016), pp. 495-502

RO133995 (A2)- <https://patents.google.com/patent/RO133995A2>

KR101188172B1- <https://patents.google.com/patent/KR101188172B1>

US10935550B2- <https://patents.google.com/patent/US10935550B2>



**SENZOR ELECTROCHIMIC PE BAZĂ DE GRAFENĂ VERTICALĂ
PENTRU DETECȚIA CELULELOR TUMORALE CIRCULANTE PRIN
SPECTROSCOPIE DE IMPEDANȚĂ ELECTROCHIMICĂ**

Autori: Marioara AVRAM, Bianca Cătălina (ȚÎNCU) ADIACONIȚEI, Andrei Marius AVRAM, Petruța PREDĂ, Corneliu VOIȚINCU, Eugen CHIRIAC, Tiberiu Alecu BURINARU, Cătălin Valentin MĂRCULESCU

Revendicări:

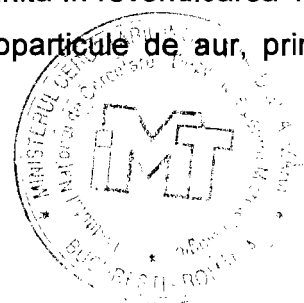
Invenția se referă la un senzor electrochimic cu microelectrozi interdigitați modificați cu grafenă verticală decorată cu nanoparticule de aur pentru caracterizarea prin spectroscopie de impedanță electrochimică a celulelor tumorale circulante. Senzorul conform invenției este constituit din microelectrozi de lucru interdigitați, modificați cu grafenă verticală, un electrod de referință și un electrod auxiliar. Grafena verticală este obținută prin depunere chimică din fază de vapori asistat de plasmă (PE-CVD) pe electrozii interdigitați de aur. Modificarea electrozilor de lucru de aur cu grafenă verticală decorată cu nanoparticule de aur, care duce creșterea conductibilității electrice prin mărirea mobilității și a concentrației superficiale a electronilor.

[1] Procedeu de realizare a senzorului electrochimic caracterizat prin aceea că, este constituit din: doi electrozi de lucru interdigitați, modificați cu grafenă verticală, un electrod de referință și un electrod auxiliar, integrați într-o cameră de reacție;

[2] Microelectrozii interdigitați modificați cu grafenă verticală, definiți în revendicarea 1, caracterizați prin aceea că, grafena verticală este obținută prin metoda de depunere chimică din fază de vapori asistată de plasmă (PECVD), cu rol de îmbunătățire a detecției;

[3] Grafena verticală, depusă peste electrozii de lucru, definită în revendicarea 1, caracterizată prin aceea că este crescută direct pe microelectrozii interdigitați metalici (Au) folosind nitru de titan (TiN) ca barieră de difuzie.

[4] Grafena verticală, depusă peste electrozii de lucru, definită în revendicarea 1, caracterizată prin aceea că este decorată inițial cu nanoparticule de aur, prin



metoda de silanizare pentru a facilita funcționalizarea și pentru a crește semnalul de biodetecție;

[5] Funcționalizarea specifică cu anticorpi anti-EpCAM a electrozilor de lucru, definiți în revendicarea 1, caracterizată prin aceea că facilitează detecția celulelor tumorale circulante prin spectroscopie de impedanță electrochimică.



35

**SENZOR ELECTROCHIMIC PE BAZĂ DE GRAFENĂ VERTICALĂ
PENTRU DETECȚIA CELULELOR TUMORALE CIRCULANTE PRIN
SPECTROSCOPIE DE IMPEDANȚĂ ELECTROCHIMICĂ**

Autori: Marioara AVRAM, Bianca Cătălina (ȚÎNCU) ADIACONIȚEI, Andrei Marius AVRAM, Petruța PREDA, Corneliu VOIȚINCU, Eugen CHIRIAC, Tiberiu Alecu BURINARU, Cătălin Valentin MĂRCULESCU

Desene:

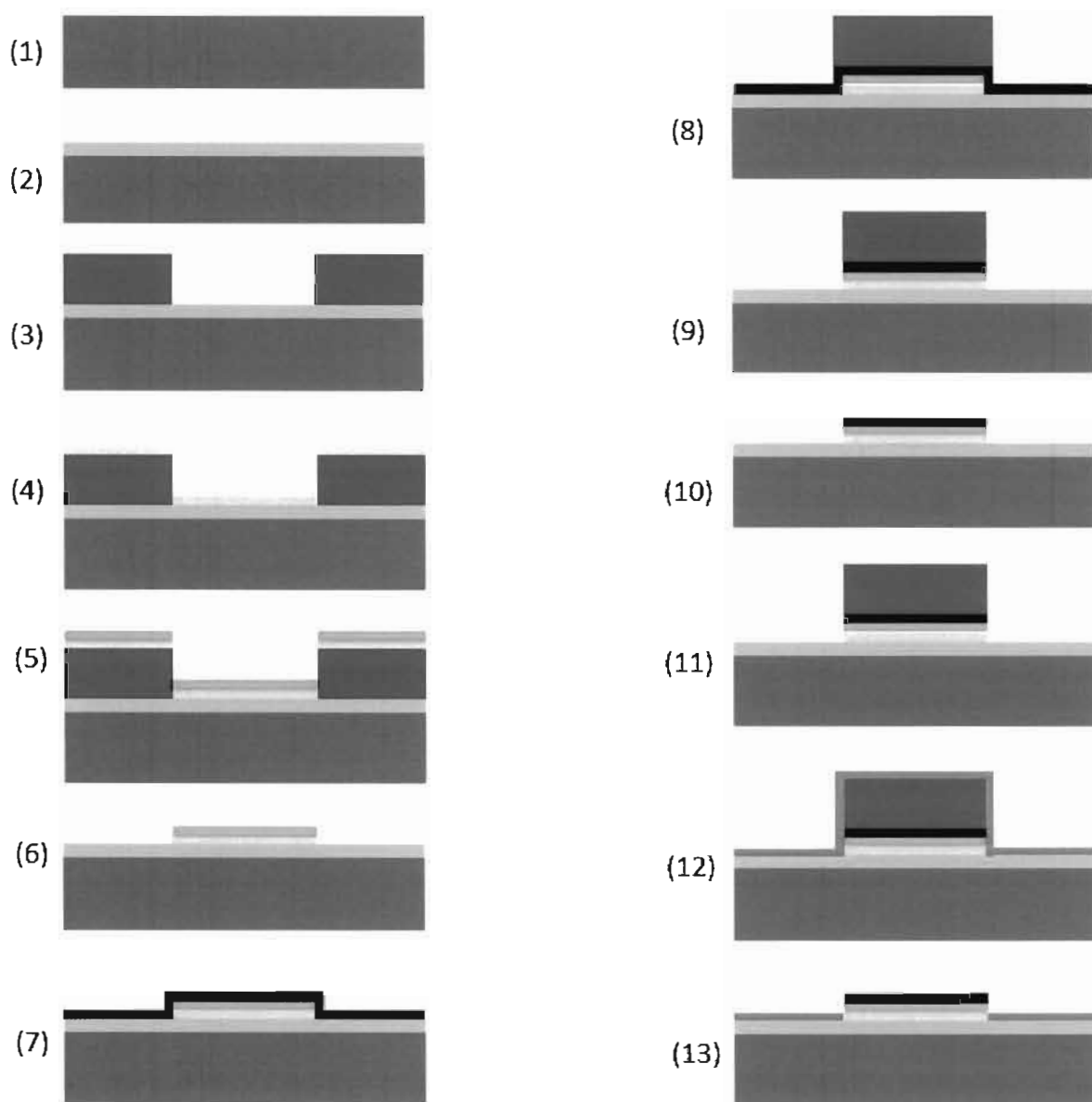


Figura 1. Fluxul tehnologic pentru senzorul electrochimic 1) Placheta de Si; 2) SiO_2 crescut termic în atmosferă umedă; 3) Acoperirea cu fotorezist și paternare folosind masca M1 – configurația straturilor metalice; 4) Depunere TiN de 50 nm prin pulverizare cu magnetron RF; 5) Depunere Cr/Au; 6) Lift-off; 7) creșterea grafenei verticale prin PECVD; 8) Acoperire cu fotorezist și modelare folosind masca M2 – configurația electrozilor interdigitați cu grafenă verticală; 9) corodare grafenă verticală în RIE; 10) îndepărtare fotorezist și curățare plachete; 11) acoperire cu fotorezist și modelare cu ajutorul măștii M3 – pasivarea straturilor metalice; 12) depunere de 15 nm Al_2O_3 prin ALD; 13) Lift-off

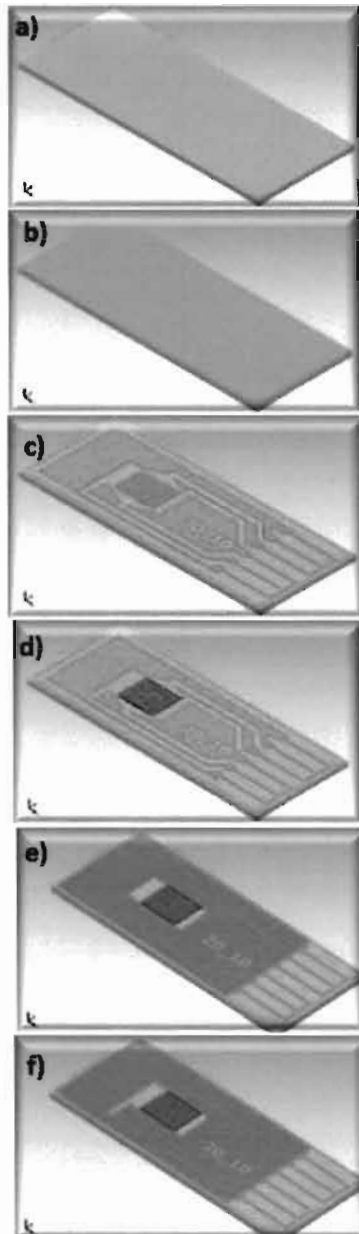


Figura 2. Modelarea fluxului tehnologic în vederea fabricării senzorului electrochimic:
 a) Strat: Si; b) Creștere SiO_2 ; c) Depunere metal electrozi: Cr/Au; d) Creștere GV; e)
 Depunere oxid de pasivare Al_2O_3 ; f) Depunere Ag;

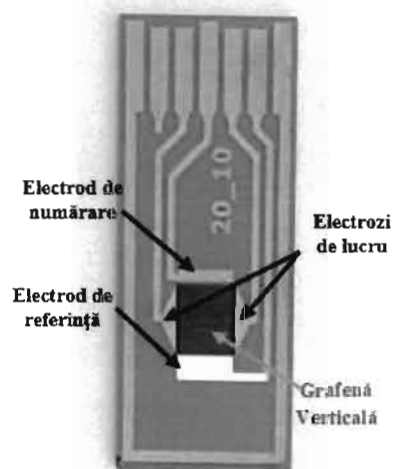


Figura 3- Senzor electrochimic cu electrozi interdigați modificați cu GV

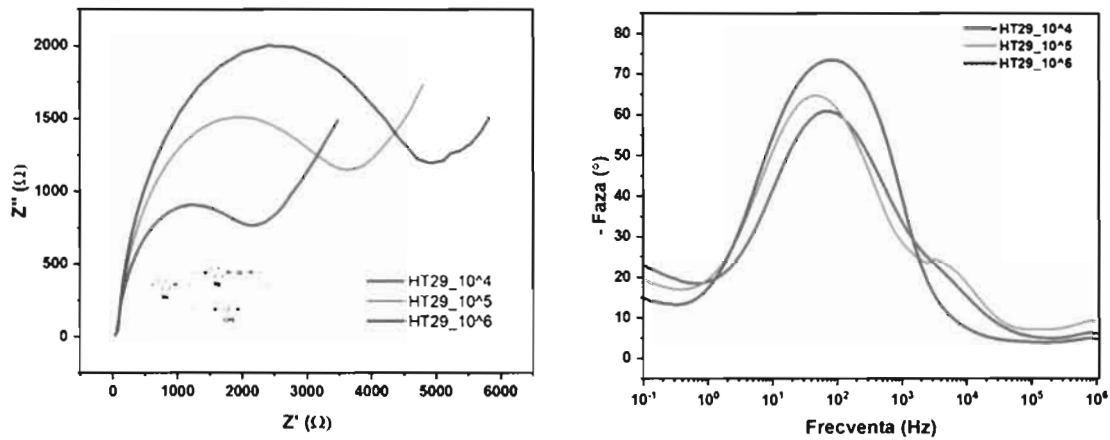


Figura 4. Diagrama Nyquist (stânga) și Diagrama Bode (dreapta) reprezintă: variația impedanței imaginare în funcție de rezistența electrică și respectiv a diferenței de fază dintre curent și tensiune în funcție de frecvență pentru trei concentrații diferite de celule HT 29.

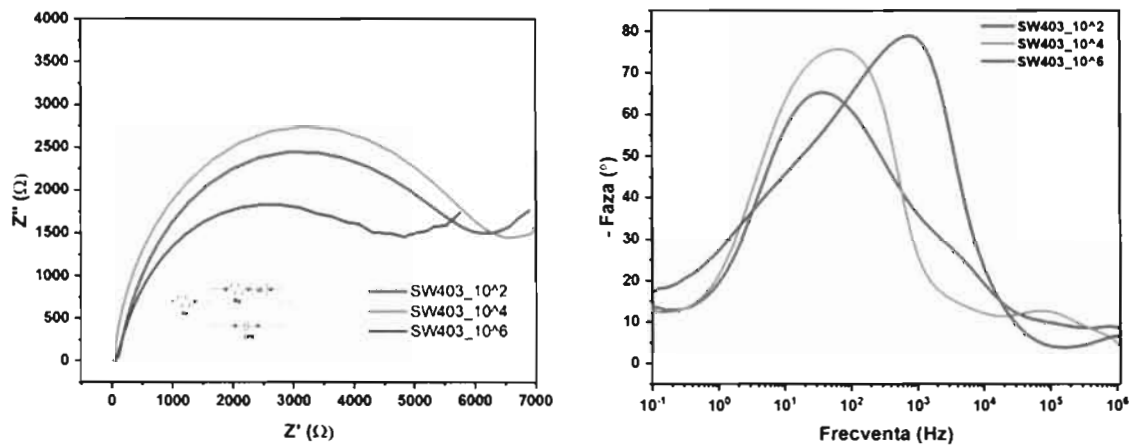


Figura 5. Diagrama Nyquist (stânga) și Diagrama Bode (dreapta) reprezintă: variația impedanței imaginare în funcție de rezistența electrică și respectiv a diferenței de fază dintre curent și tensiune în funcție de frecvență pentru trei concentrații diferite de celule SW 403.

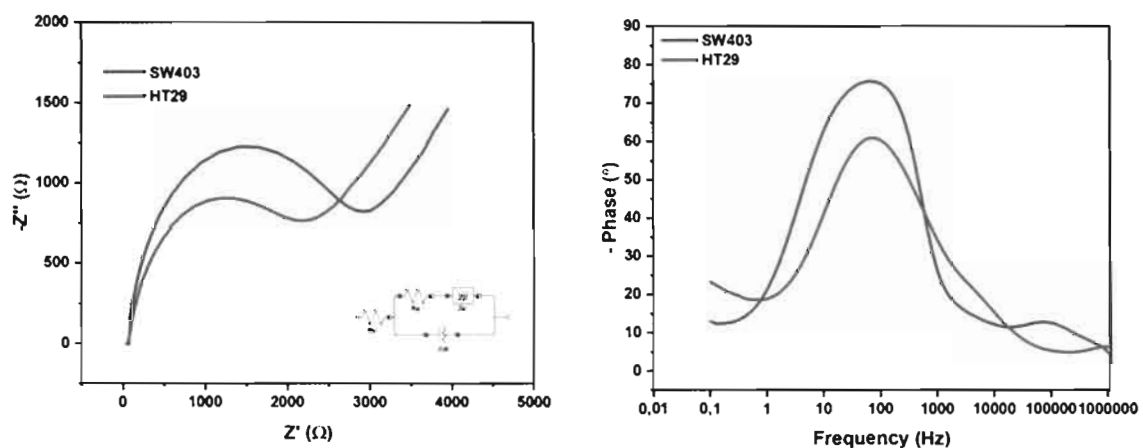


Figura 6. Diagrama Nyquist (stânga) și Diagrama Bode (dreapta): Curbele de variație sunt reprezentate la atașarea celulelor adenocarcinom de colon SW403 și a celulelor HT29 în concentrație 100 celule/ml, sau 10 celule în 100 μ l injectați în camera de reacție.