



**MINISTERUL EDUCAȚIEI**  
**Universitatea POLITEHNICA din București**  
**Școala Doctorală de**  
**Inginerie Industrială și Robotică**

**Maria-Roxana N.I. MARINESCU**

**REZUMAT TEZĂ DE DOCTORAT**

**PROCESE DE FABRICAȚIE A**  
**SISTEMELOR MICRO-ELECTRO-**  
**MECANICE CU APLICAȚII ÎN**  
**MEDICINĂ**

***Conducător științific,***  
**Prof.univ.dr.ing. Liviu-Daniel GHICULESCU**

**- 2021-**



## Universitatea POLITEHNICA din București

**Maria-Roxana N.I. MARINESCU**

# REZUMAT TEZĂ DE DOCTORAT

**PROCESE DE FABRICAȚIE A SISTEMELOR MICRO-  
ELECTRO-MECANICE CU APLICAȚII ÎN MEDICINĂ /**

**MANUFACTURING PROCESSES OF MICRO-ELECTRO-  
MECHANICAL-SYSTEMS WITH APPLICATIONS IN  
MEDICINE**

### COMISIA DE DOCTORAT

Președinte	Prof.univ.dr.ing. Cristian-Vasile DOICIN	Universitatea POLITEHNICA din București
Conducător științific	Prof.univ.dr.ing. Liviu-Daniel GHICULESCU	
Referent	Prof.univ.dr.ing. Nicolae IONESCU	Universitatea POLITEHNICA din București
Referent	Prof.univ.dr.ing. Oana DODUN- DES-PERRIERES	Universitatea Tehnică “Gheorghe Asachi” din Iași
Referent	CS 1, dr.fiz.ing. Mărioara AVRAM	Institutul Național de Cercetare-Dezvoltare pentru Microtehnologie – IMT București

CUPRINS

	Teza	Rezumat
<b>CUVÂNT ÎNAINTE</b> .....	7	
<b>INTRODUCERE</b> .....	10	6
<b>PARTEA ÎNTÂI. ANALIZA STADIULUI ACTUAL PRIVIND DEZVOLTAREA SISTEMELOR MICRO-ELECTRO-MECANICE</b> .....	13	8
<b>CAPITOLUL 1. CONCEPTE TEORETICE PRIVIND SISTEMELE MICRO-ELECTRO-MECANICE</b> .....	13	8
<b>1.1. Clasificarea componentelor Sistemelor Micro-Electro-Mecanice</b> .....	16	9
1.1.1. Microsenzori.....	17	
1.1.2. Microactuatoe .....	17	
1.1.3. Microsisteme integrate .....	17	
<b>1.2. Sisteme Micro-Electro-Mecanice cu funcții biologice integrate</b> .....	18	9
<b>1.3. Efecte ale mediului înconjurător asupra sistemelor micro-electro-mecanice</b> .....	21	
<b>1.4. Concluzii</b> .....	21	
<b>CAPITOLUL 2. MATERIALE FOLOSITE PENTRU FABRICAREA SISTEMELOR MICRO-ELECTRO-MECANICE</b> .....	22	9
<b>2.1. Materiale utilizate ca substrat</b> .....	23	9
<b>2.2. Materiale utilizate pentru depuneri</b> .....	24	10
<b>2.3. Concluzii</b> .....	26	
<b>CAPITOLUL 3. TEHNOLOGII DE FABRICARE A SISTEMELOR MICRO-ELECTRO-MECANICE</b> .....	27	10
<b>3.1. Fotolitografia</b> .....	27	
3.1.1. Considerații generale .....	27	
3.1.2. Fenomene specifice și factorii de performanță ai fotolitografiei .....	28	
3.1.3. Aplicații specifice privind tehnica fotolitografiei .....	29	
3.1.4. Instalații și echipamente pentru procesul de fotolitografie.....	30	
<b>3.2. Tehnologii de microprelucrare chimice</b> .....	33	
3.2.1. Considerații generale .....	33	
3.2.2. Fenomene specifice și factorii de performanță ai prelucrării prin corodare chimică .....	33	
3.2.3. Aplicații specifice privind corodarea .....	34	
<b>3.3. Tehnologii de prelucrare cu laser</b> .....	35	
3.3.1. Considerații generale .....	35	
3.3.2. Fenomene specifice ale prelucrării cu laser .....	36	
3.3.3. Aplicații specifice ale laserului.....	37	
3.3.4. Instalații și echipamente laser.....	38	
<b>3.4. Tehnologii de prelucrare cu fascicule de electroni</b> .....	40	
3.4.1. Considerații generale .....	40	
3.4.2. Fenomene specifice.....	40	
3.4.3. Aplicații specifice.....	41	
3.4.4. Instalații și echipamente de prelucrare cu fascicule de electroni .....	42	
<b>3.5. Tehnologii de prelucrare cu fascicule de ioni</b> .....	42	
3.5.1. Considerații generale .....	42	
3.5.2. Fenomene fizico-chimice la prelucrarea cu fascicule de ioni .....	43	
3.5.3. Aplicații ale prelucrării cu fascicule de ioni .....	44	
3.5.4. Echipamente și instalații.....	44	
<b>3.6. Tehnologii de prelucrare cu plasmă</b> .....	45	
3.6.1. Considerații generale .....	45	
3.6.2. Fenomene specifice.....	45	
3.6.3. Aplicații specifice.....	46	
3.6.4. Echipamente și instalații.....	47	

<b>CAPITOLUL 4. MICROFLUIDICA ȘI DISPOZITIVELE “LAB-ON-A-CHIP”</b> .....	49	11
<b>4.1. Microfluidica folosită pentru separarea celulelor</b> .....	49	11
4.1.1. Clasificarea și numărul celulelor din sânge .....	49	11
4.1.2. Importanța limfocitelor din sânge.....	53	11
<b>4.2. Construcția dispozitivelor microfluidice</b> .....	54	12
<b>4.3. Tipuri de circuite microfluidice</b> .....	56	12
<b>4.4. Stadiul actual al dispozitivelor “Lab-On-a-Chip”</b> .....	57	
4.4.1. Dispozitive „Lab-On-a-Chip” pentru determinarea limfocitelor T.....	60	
4.4.2. Dispozitive „Lab-On-a-Chip” pentru determinarea celulelor tumorale circulante.....	63	
<b>4.5. Concluzii</b> .....	65	
<b>PARTEA A DOUA. CONTRIBUȚII PRIVIND DEZVOLTAREA UNOR SISTEME MICRO-ELECTRO-MECANICE CU APLICAȚII ÎN MEDICINĂ</b> .....	66	12
<b>CAPITOLUL 5. OBIECTIVELE, DIRECȚIILE DE CERCETARE ȘI METODOLOGIA ABORDATE ÎN TEZA DE DOCTORAT</b> .....	66	12
<b>5.1. Sinteza aspectelor critice privind stadiul actual al sistemelor micro-electro-mecanice cu aplicații în medicină</b> .....	66	12
<b>5.2. Obiective ale tezei de doctorat</b> .....	67	14
<b>5.3. Direcții de cercetare și metodologia de cercetare ale tezei de doctorat</b> .....	69	15
<b>CAPITOLUL 6. CERCETĂRI PRIVIND PROIECTAREA, MODELAREA ȘI SIMULAREA UNUI DISPOZITIV MICRO-ELECTRO-MECANIC DE DETERMINARE A LIMFOCITELOR T, MODEL EXPERIMENTAL</b> .....	70	16
<b>6.1. Date generale</b> .....	70	16
<b>6.2. Stabilirea funcțiilor și structurii funcționale ale produsului</b> .....	70	16
<b>6.3. Date tehnologice obținute în laborator</b> .....	74	17
<b>6.4. Stabilirea formei traseelor microfluidice</b> .....	74	17
<b>6.5. Proiectarea dispozitivului micro-electro-mecanic, model experimental</b> .....	76	18
<b>6.6. Modelarea procesului de fabricație a dispozitivului micro-electro-mecanic, model experimental</b> .....	92	20
<b>6.7. Modelarea și simularea computerizată a curgerii microfluidice în dispozitivul micro-electro-mecanic, model experimental</b> .....	100	20
<b>6.8. Concluzii</b> .....	104	
<b>CAPITOLUL 7. FABRICAREA UNUI DISPOZITIV MICRO-ELECTRO-MECANIC, MODEL EXPERIMENTAL</b> .....	105	22
<b>7.1. Scrierea măștilor</b> .....	105	
<b>7.2. Fabricarea propriu-zisă a dispozitivului, model experimental</b> .....	108	22
7.2.1. Placheta de siliciu folosită ca substrat.....	108	22
7.2.2. Depunerea stratului de oxid de siliciu .....	109	22
7.2.3. Fotolitografia pentru prima mască.....	111	23
7.2.4. Depunerea stratului de titan-aur .....	117	24
7.2.5. Îndepărtarea fotorezistului prin lift-off pentru prima mască.....	119	24
7.2.6. Procesul de fotolitografie pentru a doua mască .....	120	25
7.2.7. Depunerea stratului de argint .....	121	25
7.2.8. Îndepărtarea fotorezistului prin lift-off pentru a doua mască .....	121	25
7.2.9. Procesul de fotolitografie pentru a treia mască.....	129	26
7.2.10. Depunerea capacului de polidimetilsiloxan .....	134	28
<b>7.3. Concluzii</b> .....	138	
<b>CAPITOLUL 8. TESTAREA DISPOZITIVULUI, MODEL EXPERIMENTAL</b> .....	140	29
<b>8.1. Metodologia de testare</b> .....	140	29
<b>8.2. Verificarea trecerii curentului electric</b> .....	142	
<b>8.3. Spectroscopia de impedanță electrochimică</b> .....	143	30
<b>8.4. Concluzii</b> .....	149	

<b>CAPITOLUL 9. FABRICAREA ȘI TESTAREA PROTOTIPULUI ÎMBUNĂȚĂȚIT AL DISPOZITIVULUI MICRO-ELECTRO-MECANIC</b> .....	151	33
<b>9.1. Probleme apărute la fabricarea dispozitivului micro-electro-mecanic, model experimental</b> .....	151	33
<b>9.2. Îmbunătățiri ale procesului de fabricație a dispozitivului micro-electro-mecanic</b> .....	152	33
9.2.1. Îmbunătățiri ale depunerii argintului .....	152	34
9.2.2. Îmbunătățiri necesare pentru creșterea aderenței fotorezistului SU-8 .....	152	34
<b>9.3. Realizarea prototipului îmbunătățit al dispozitivului micro-electro-mecanic</b> .....	152	34
9.3.1. Proiectarea dispozitivului micro-electro-mecanic, prototip îmbunătățit .....	154	35
9.3.2. Modelarea procesului de fabricație a dispozitivului micro-electro-mecanic, prototip îmbunătățit.....	160	37
9.3.3. Procesul de fabricație a măștilor .....	165	37
9.3.4. Execuția dispozitivului micro-electro-mecanic, prototip îmbunătățit.....	167	38
<b>9.4. Testarea prototipului îmbunătățit al dispozitivului micro-electro-mecanic</b> .....	175	41
9.4.1. Stabilitatea senzorilor .....	176	42
9.4.2. Testarea curgerilor microfluidice .....	177	43
9.4.3. Testarea funcționalității senzorilor cu ajutorul spectroscopiei de impedanță electrochimică .....	178	43
<b>9.5. Integrarea cipului microfluidic într-un dispozitiv portabil</b> .....	180	44
<b>9.6. Teste mecano-climatice de fiabilitate pentru dispozitivul micro-electro-mecanic</b> .....	181	45
<b>9.7. Realizarea unui senzor de umiditate pentru monitorizarea condițiilor de păstrare a dispozitivului micro-electro-mecanic</b> .....	188	48
<b>9.8. Concluzii</b> .....	197	
<b>CAPITOLUL 10. CONCLUZII FINALE, CONTRIBUȚII ORIGINALE ȘI DIRECȚII VIITOARE DE CERCETARE</b> .....	200	48
<b>10.1. Concluzii finale</b> .....	200	48
<b>10.2. Contribuții originale</b> .....	202	50
<b>10.3. Direcții viitoare de cercetare</b> .....	205	54
<b>10.4. Valorificarea rezultatelor cercetării</b> .....	206	54
<b>BIBLIOGRAFIE</b> .....	207	55
<b>ANEXA 1. LISTĂ ABREVIERI</b> .....	220	58
<b>ANEXA 2. TERMENI SPECIFICI</b> .....	224	
<b>ANEXA 3. LISTA FIGURILOR</b> .....	225	
<b>ANEXA 4. LISTA TABELELOR</b> .....	233	
<b>ANEXA 5. LUCRĂRI PUBLICATE ÎN VOLUMELE UNOR CONFERINȚE INDEXATE ISI</b> .....	234	
<b>ANEXA 6. LUCRĂRI PUBLICATE ÎN REVISTE INDEXATE ISI</b> .....	235	
<b>ANEXA 7. LUCRĂRI PUBLICATE ÎN VOLUMELE UNOR CONFERINȚE INDEXATE ÎN BAZE DE DATE INTERNAȚIONALE</b> .....	236	
<b>ANEXA 8. LUCRĂRI PUBLICATE ÎN REVISTE INDEXATE ÎN BAZE DE DATE INTERNAȚIONALE</b> .....	237	
<b>ANEXA 9. CĂRȚI / CAPITOLE DE CĂRȚI</b> .....	239	
<b>ANEXA 10. PARTICIPĂRI LA CONFERINȚE – POSTERE, BOOK OF ABSTRACTS</b> .....	240	
<b>ANEXA 11. CERERI DE BREVET DE INVENȚIE</b> .....	242	
<b>ANEXA 12. PREMII</b> .....	243	

## INTRODUCERE

Tehnologia reprezintă ansamblul proceselor, metodelor și operațiilor utilizate pentru obținerea unui anumit produs. Microelectronica și nanoelectronica sunt două domenii cu o contribuție semnificativă la progresul tehnologic. Activitățile de cercetare-dezvoltare-inovare desfășurate în cadrul celor două domenii, au produs rezultate valoroase, de referință pentru actuala teză de doctorat: sistemele-micro-electro-mecanice (MEMS).

MEMS-urile sunt sisteme miniaturizate, cu dimensiuni și greutatea reduse care pot fi integrate ușor în diverse aplicații comerciale. Aceste ajutoare de mici dimensiuni și tehnologie înaltă sunt prezente din ce în ce mai mult în viața noastră cotidiană. Structurile inteligente ne permit să controlăm mai bine mediul și ne ajută să creștem eficiența energetică a dispozitivelor. Toate aplicațiile aparținând epocii actuale, Industria 4.0 (a patra revoluție industrială) integrează următoarele tipuri de elemente: senzor, microprocesor, bază de date și actuator.

În cadrul tezei de doctorat **“Procese de fabricație a sistemelor micro-electro-mecanice cu aplicații în medicină”** din domeniul Inginerie Industrială a fost proiectat, modelat, simulat și fabricat un dispozitiv de tip “lab-on-a-chip”, cu ajutorul căruia pot fi determinate limfocitele T din sânge. Prin urmare, lucrarea de doctorat poate fi încadrată în domeniul bioingineriei. În această ramură a științei, se elaborează concepte pornind de la nivel molecular până la nivel sistemic, având rolul de a dezvolta produse biologice noi, materiale, dispozitive medicale pentru diagnosticul, prevenirea și tratarea unor boli, cum este și cazul dispozitivului rezultat din această lucrare de doctorat. Domeniul ingineriei medicale se află în strânsă legătură cu următoarele subdomenii: biomecanică, biomateriale, electronică, mecatronică, biofizică, imagistică medicală, telemedicină, nanotehnologie, inginerie celulară și genetică, prin urmare, este un domeniu cu evident caracter multidisciplinar.

Lucrarea de doctorat este organizată în două părți principale: (1) stadiul actual și (2) contribuții privind dezvoltarea unor sisteme micro-electro-mecanice cu aplicații în medicină și este structurată în 10 capitole, cuprinzând 219 pagini, 286 figuri, 28 tabele, 248 referințe bibliografice și 12 anexe, în total, 244 pagini.

Dispozitivele micro-electro-mecanice din cadrul tezei, au fost realizate în cadrul Institutului Național de Cercetare - Dezvoltare pentru Microtehnologie – IMT București.

Primul capitol: **“Concepte teoretice privind sistemele micro-electro-mecanice”** prezintă evoluția cercetărilor în domeniul dispozitivelor micro-electro-mecanice și, implicit, unele domenii de cercetare și aplicații în producția dispozitivelor MEMS.

În cel de al doilea capitol al tezei: **“Materiale folosite pentru fabricarea sistemelor micro-electro-mecanice”**, sunt descrise și analizate atât materialele utilizate ca substrat, cât și cele utilizate pentru depunere în construcția MEMS-urilor.

O atenție deosebită se acordă capitolului trei, care este constituit din **“Tehnologii de fabricare a sistemelor micro-electro-mecanice”**. În acest capitol, sunt descrise tehnologiile specifice de fabricare a micro și nanostructurilor: prelucrarea prin tehnici fotolitografice, prelucrarea cu laser, prelucrarea cu plasmă, prelucrările chimice, prelucrările cu fascicule de ioni și electroni. Pentru fiecare tip de prelucrare, sunt descrise fenomenele specifice, factorii de performanță, aplicațiile specifice și sunt prezentate modele de echipamente și instalații de lucru moderne.

Cel de al patrulea capitol al lucrării: **“Microfluidica și dispozitivele “Lab-On-a-Chip”** se dorește a fi o sinteză a analizei efectuate asupra celor mai noi lucrări publicate în domeniu. Sunt prezentate dispozitivele microfluidice pentru două tipuri de celule care pot fi detectate: celule tumorale circulante (CTC) și limfocitele T. S-a efectuat un studiu bibliografic în ceea ce privește dispozitivele microfluidice de tip Lab-On-a-Chip. Astfel, s-au identificat principalele cerințe impuse atât materialelor cât și tehnologiilor de obținere, în vederea realizării unui

dispozitiv de detecție a limfocitelor T din sânge. Sunt evidențiate avantajele utilizării dispozitivelor de detecție celulară.

Capitolul cinci: “**Obiectivele, direcțiile de cercetare și metodologia abordate în teza de doctorat**” prezintă în prima parte sinteza aspectelor critice rezultate din studiul dispozitivelor MEMS din stadiul actual. Pe această bază, au fost stabilite obiectivele tezei, direcțiile și metodologia de cercetare, care au condus la obținerea acestor obiective.

Capitolul șase al tezei: “**Cercetări privind proiectarea, modelarea și simularea unui dispozitiv micro-electro-mecanic de determinare a limfocitelor T, model experimental**” prezintă elementele de proiectare, modelare și simulare ale dispozitivului. Înainte de realizarea acestor etape de cercetare-dezvoltare, este necesară cunoașterea anumitor elemente esențiale cu privire la celule. Aceste date au fost obținute prin studii chimice experimentale din cadrul INCD pentru Microtehnologie - IMT. Proiectarea dispozitivului a fost realizată cu ajutorul programului CleWin5, după ce au fost stabilite în prealabil dimensiunile și încadrarea elementelor componente pe platforma microfluidică. Elementele de modelare s-au obținut prin utilizarea programului SEMulator 3D, cu ajutorul căruia, s-a demonstrat corectitudinea proiectării în vederea fabricării dispozitivului și s-au validat parametrii stabiliți în faza de proiectare pentru realizarea dispozitivului de detecție a limfocitelor T. Simularea cu metoda elementelor finite, s-a realizat în programul dedicat, Comsol Multiphysics. Aceasta s-a efectuat pentru curgerile microfluidice ale dispozitivului. Rezultatele au condus la fabricarea adecvată a dispozitivului micro-electro-mecanic, validând modelul obținut.

Capitolul șapte: “**Fabricarea unui dispozitiv micro-electro-mecanic, model experimental**” reprezintă cel mai semnificativ capitol al tezei. În acest capitol sunt caracterizate pe larg toate etapele de fabricare ale dispozitivului micro-electro-mecanic. Sunt descrise materialele folosite, cu detalii privind selectarea acestora, echipamentele care au fost folosite la fiecare etapă, rezultatele inspecțiilor intermediare care au avut loc la fiecare etapă parcursă precum și concluziile finale privind dispozitivul obținut.

Capitolul opt: “**Testarea dispozitivului, model experimental**” prezintă testările realizate atât cu privire la răspunsul electric, cât și la răspunsul dat de antigene și anticorpi. Aceste teste au demonstrat funcționalitatea dispozitivului.

Capitolul nouă: “**Fabricarea și testarea prototipului îmbunătățit al dispozitivului micro-electro-mecanic**” este un capitol amplu, care prezintă realizarea prototipului îmbunătățit al dispozitivului micro-electro-mecanic, în urma analizării problemelor identificate în cadrul procesului de fabricație realizat al modelului experimental și stabilirii noilor etape de lucru.

Pentru prototipul îmbunătățit al dispozitivului micro-electro-mecanic, se prezintă etapele de proiectare-modelare, etapele de fabricare, cu materialele și echipamentele folosite și etapele de testare. Au fost efectuate teste ale curgerii fluidului și ale verificării funcționalității senzorilor, precum în faza precedentă de model experimental. Mai mult, s-a prezentat ideea de portabilitate a dispozitivului, ceea ce îi oferă un avantaj enorm pe piața dispozitivelor medicale. Pentru verificarea rezistenței acestuia la mediu, s-au efectuat teste de vibrații și de șocuri termice, teste care sunt necesare pentru toate dispozitivele portabile.

În ceea ce privește condițiile de păstrare a dispozitivelor medicale, s-a analizat factorul de umiditate și s-a propus folosirea unui nou senzor de umiditate. Și pentru acest senzor au fost efectuate testări mecano-termice. Răspunsul dat de senzor a fost unul care permite ținerea sub control a condițiilor de depozitare a dispozitivului micro-electro-mecanic realizat.

Capitolul zece, “**Concluzii finale, Contribuții originale și Direcții viitoare de cercetare**” este dedicat concluziilor rezultate la finalizarea tezei de doctorat, precum și contribuțiilor originale teoretice și aplicative. Sunt prezentate de asemenea și viitoarele direcții de cercetare și valorificarea rezultatelor cercetării-dezvoltării de produs și proces de fabricație.

*Cuvinte-cheie: sisteme micro-electro-mecanice, bio-dispozitive microfluidice, lab-on-a-chip, fabricație, tehnologii neconvenționale.*

## PARTEA ÎNTÂI. ANALIZA STADIULUI ACTUAL PRIVIND DEZVOLTAREA SISTEMELOR MICRO-ELECTRO-MECANICE

### CAPITOLUL 1. CONCEPTE TEORETICE PRIVIND SISTEMELE MICRO- ELECTRO-MECANICE

Sistemele micro-electro-mecanice (MEMS) reprezintă dispozitive mici integrate sau sisteme ce combină componente mecanice și electrice create prin utilizarea proceselor microtehnologice. Aceste microsisteme sunt dispozitive de mărimea unui cip (mărimile pot varia de la câțiva micrometri la câțiva milimetri) care au capacitatea de a sesiza date, de a le prelucra și de a transmite informații. Ele pot acționa la scară micro sau chiar nano și pot genera efecte la scară macro [M4], [P10]. MEMS-urile fac parte din ramura Nanotehnologiei, ele realizându-se folosind elemente de ordinul nano și micro.

Micro și nanostructurile au o gamă largă de aplicații în cele mai diverse domenii (electric, mecanic, biologic, optic etc.). Aceste dispozitive de mici dimensiuni, ce utilizează tehnologii de vârf, se află în aproape tot ce ne înconjoară. Primul sector ocupat de dispozitivele MEMS este cel al industriei electronice, urmat de cea de-a doua piață majoră: sectorul auto. (Fig. 1.2) [M20].

Dispozitivele MEMS cu funcții biologice integrate folosite pentru aplicații medicale poartă denumirea de **bioMEMS-uri**. În domeniul chirurgical, tehnologia MEMS are potențialul de a îmbunătăți nu numai funcționalitatea dispozitivelor existente, ci și de a adăuga noi capacități, care permit medicilor să dezvolte noi tehnici și să efectueze proceduri complet noi [R2]. O cerere uimitoare de micro-dispozitive autonome în domeniul medical crește nevoia de surse de energie miniaturizate. Aplicațiile bioMEMS includ traductoare biomedicale, dispozitive microfluidice, implanturi medicale, instrumente microchirurgicale și inginerie tisulară.

Cu ajutorul tehnologiei moderne, omul folosește aceste microsisteme în scopul simplificării propriei sale vieți. Câteva dintre exemplele folosite în acest scop sunt redată în Fig. 1.2 [B14], [Z2].

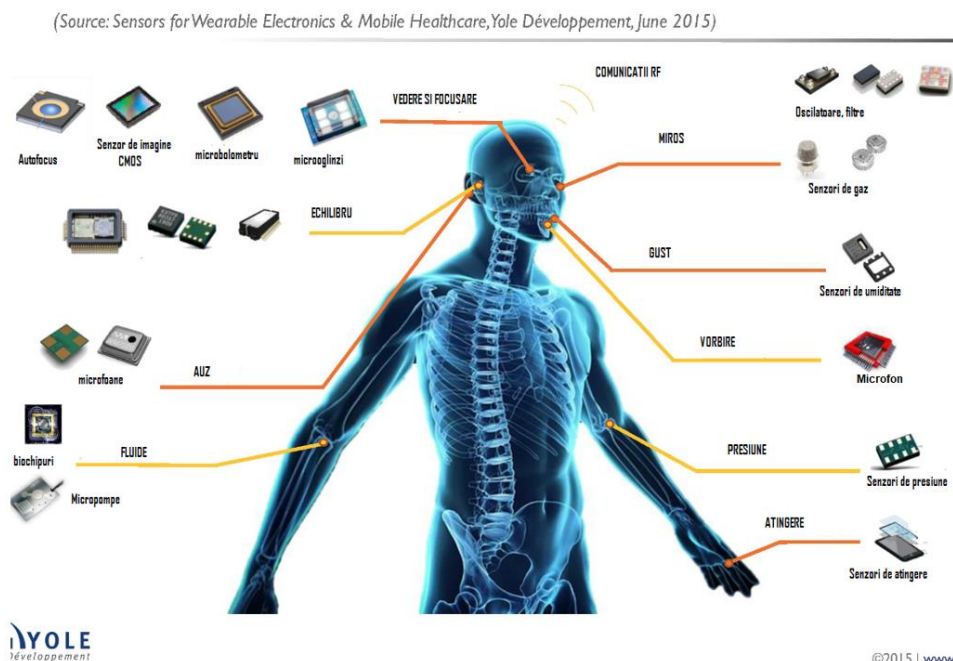


Fig. 1.2. Dispozitive MEMS folosite de om [B14]



## 1.1. Clasificarea componentelor Sistemelor Micro-Electro-Mecanice

La modul general, MEMS sunt compuse din microstructuri mecanice, microsenzori, microactuatori și componente microelectronice, folosind materiale cu proprietăți speciale (fero, piezo- etc.) [P10], [M32], [Z7], [M37].

## 1.2. Sisteme Micro-Electro-Mecanice cu funcții biologice integrate

În proiectarea și dezvoltarea unui microdispozitiv corespunzător ce poate fi folosit cu succes în domeniul medical, este necesar să existe un echilibru între factorii tehnologici (senzori de măsurare și electronică asociată) și factorii umani. Factorii tehnologici sunt reprezentați de senzori ce colectează informațiile despre parametri fiziologici [B15]. Dacă se iau în considerare toți acești factori, se pot dezvolta dispozitive ce asigură siguranță, eficacitate și ușurință în utilizare. Aceste dispozitive care interacționează cu corpul uman pot fi împărțite în două categorii: dispozitive atașabile și dispozitive implantabile [M24].

## CAPITOLUL 2. MATERIALE FOLOSITE PENTRU FABRICAREA SISTEMELOR MICRO-ELECTRO-MECANICE

Proiectarea unui dispozitiv MEMS care să atingă un anumit nivel de performanță presupune alegerea materialelor în mod corect. Selectarea materialelor folosite în fabricarea funcțională a MEMS-urilor are loc după proprietățile acestora: piezoelectricitate, electro- și magneto- stricțiune, fero- și para- electricitate, feroelasticitate, magnetorezistență sau piroelectricitate. Pentru microfabricarea dispozitivelor MEMS folosite în serviciile medicale se evaluează biocompatibilitatea și incompatibilitatea activității antimicrobiene a materialelor [S12]. Din toate studiile efectuate, s-a constatat faptul că două dintre proprietățile care sunt de mare interes în fabricarea MEMS-urilor sunt proprietățile mecano - elastice. Celelalte proprietăți, precum proprietățile termice, electrice, chimice sau optice depind mai mult de aplicațiile specifice pentru care este utilizat dispozitivul MEMS [S12], [M24], [S14].

Materialele care se folosesc în fabricarea MEMS-urilor se împart în două categorii:

- (a) materiale utilizate ca substrat;
- (b) materiale utilizate pentru depunere.

### 2.1. Materiale utilizate ca substrat

Un dispozitiv MEMS este construit din două sau mai multe materiale și foarte rar, dintr-un singur material. Cel mai important material utilizat ca substrat în fabricarea MEMS-urilor este siliciul (Si) [P10].

Pentru realizarea MEMS-urilor, pe lângă siliciu (Fig. 2.3.) se pot utiliza și alte materiale: cuarț; sticlă; polimeri; materiale ceramice; metale. În Figurile 2.3 - 2.6 sunt redată imagini ale plachetelor realizate din diferite materiale.



Fig. 2.3. Plachete de Si [\*23]

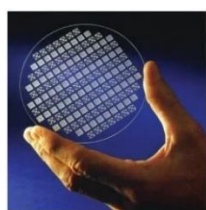


Fig. 2.4. Placheta de sticlă [\*18]



Fig. 2.5. Plachete de SiC [\*23]



Fig. 2.6. Plachete de GaP [\*23]

## 2.2. Materiale utilizate pentru depuneri

Materialele folosite ca substrat se depun pe plachetele utilizate în straturi succesive, cu grosimi de ordinul nanometrilor până la ordinul micrometrilor. Materialele cele mai utilizate sunt:

- siliciul și materialele sale conexe;
- metale - cupru (Cu), aluminiu (Al), aur (Au), nichel (Ni), titan (Ti);
- compuși metalici - nitrura de titan (TiN), oxid de zinc (ZnO) sau aliaje titan-nichel (TiNi);
- materiale ceramice – oxid de zirconiu, nitrura de siliciu, alumina;
- polimeri - polimetacrilat de metil (PMMA), polidimetilsiloxan (PDMS) [R4], [P10].

Microdispozitivele pot fi fabricate din materiale durabile, dure, dar flexibile și de asemenea, materiale ușor de utilizat. Materialele pe bază de carbon sunt cele mai noi materiale folosite în construcția MEMS-urilor.

Materialele carbonice sunt studiate intens datorită proprietăților lor termice, optice, mecanice și electrice, prezintă rezistență mecanică și conductivitate ultra-ridică [B4], [S5], [K5], [M24], [M18], [M19] [S2].

## CAPITOLUL 3. TEHNOLOGII DE FABRICARE A SISTEMELOR MICRO-ELECTRO-MECANICE

Obținerea și prelucrarea micro și nanostructurilor nu se poate realiza fără tehnologii specifice neconvenționale: tehnologia de prelucrare cu laser (Laser Beam Machining - LBM), tehnologia de prelucrare cu plasmă (Plasma Machining - PM), tehnologia de prelucrare cu ultrasunete (Ultrasonic Machining - USM), tehnologia de prelucrare cu fascicule de electroni (Electron Beam Machining - EBM) și ioni (Ion Beam Machining - IBM) etc. Extinderea acestor tipuri de tehnologii avansate se constituie într-un răspuns dat principalelor tendințe ale pieței, corelat cu interesele în obținerea rentabilității, stabilității și dezvoltării. Importanța crescută a acestor tehnologii de prelucrare este dată de performanța lor tot mai ridicată și de caracteristicile superioare care le definesc.

Modelarea geometriei este un pas esențial în procesul de fabricare a dispozitivelor pentru microelectronică și MEMS. Procesul de transfer al unei imagini/unui model geometric de pe șablon (mască fizică sau virtuală) pe plachetă (de obicei, se folosește o plachetă din siliciu) poartă numele de **litografie**.

Atunci când acest transfer al imaginii se realizează cu ajutorul luminii, procesul este numit **proces fotolitografic** (Fig. 3.5). Acest proces poartă și denumirea de **fotolitografie**.

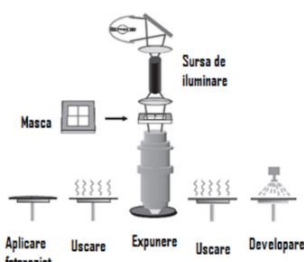


Fig. 3.5. Etapele procesului de fotolitografie [M3]

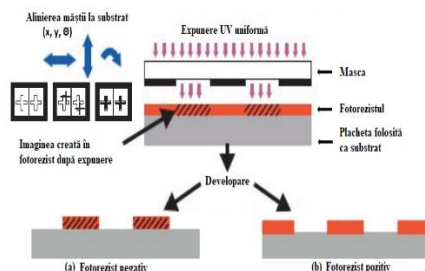


Fig. 3.2. Straturile fotorezistului [adaptată după M5]

**Fotolitografia** este procesul ce reprezintă primul pas în realizarea microfabricării, pregătind zona de depunere a materialelor. Fotolitografia permite protejarea anumitor zone de pe care nu se dorește îndepărtarea materialului sau protejarea unor zone de pe care materialul a fost îndepărtat deja. Fotolitografia se realizează pe baza reacțiilor fotochimice care au loc în amestecuri de substanțe organice. Aceste substanțe se activează sub acțiunea radiației.

Substanțele organice folosite sunt polimeri fotosensibili numiți **fotoreziști** („photoresist” sau „resist”) și permit erodarea materialului situat în afara zonei de protecție (Fig. 3.2) [M2], [M20].

## CAPITOLUL 4. MICROFLUIDICA ȘI DISPOZITIVELE “LAB-ON-A-CHIP”

### 4.1. Microfluidica folosită pentru separarea celulelor

Microfluidica reprezintă un domeniu multidisciplinar, care investighează dinamica fluidelor la scară micrometrică, cu fenomene și procese proprii precum: pompare, curgere, difuzie, dozare, mixare etc. **MEMS-urile ce folosesc microfluidica în fabricarea lor se numesc dispozitive “lab-on-a-chip”** [D1].

Microfluidica este considerată a fi o tehnologie cu un potențial enorm în ceea ce privește echipamentele și tehnologiile convenționale. Aceasta are la bază numeroase avantaje: reducerea volumelor de eșantioane; timp de reacție scurt la viteză maximă; procesarea rapidă a probelor; sensibilitate ridicată; costuri reduse ale dispozitivelor; portabilitatea dispozitivelor [A14].

#### 4.1.1. Clasificarea și numărul celulelor din sânge

**Sângele** este compus din două componente principale: **plasmă** și **elemente figurate** (Fig. 4.1.). **Plasma sanguină** se regăsește în sânge în proporție de 40 - 45%. **Elementele figurate** sunt reprezentate de celulele sângelui care plutesc în plasma sanguină. Ele sunt împărțite în 3 categorii: eritrocite, leucocite și trombocite.

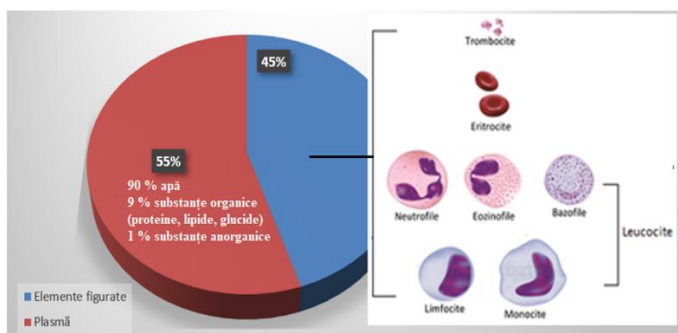


Fig. 4.1. Proporțiile aproximative ale elementelor componente ale sângelui

Leucocitele (**globulele albe**) au **rolul** de a asigura protecția organismului prin **imunitate**, prin **producerea de anticorpi**. Datorită dimensiunilor mai mari decât ale globulelor roșii și a faptului că ele se pot mișca independent în fluxul sanguin, au posibilitatea de a ajunge rapid la locul rănii sau al infecției. Clasificarea leucocitelor este următoarea (Fig. 4.2) [M33], [\*20]:

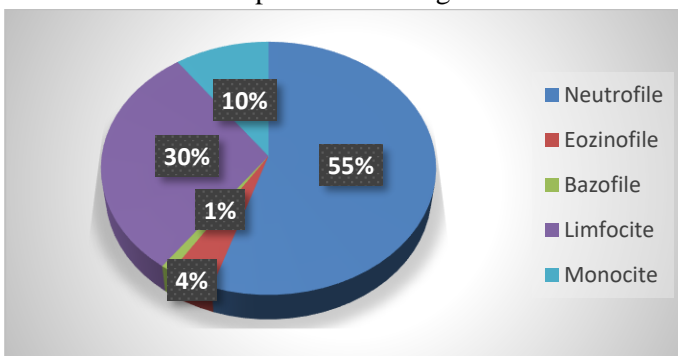


Fig. 4.2. Proporțiile aproximative ale leucocitelor din sânge

#### 4.1.2. Importanța limfocitelor din sânge

**Limfocitele** sunt celule ale sistemului imunitar, responsabile cu reacțiile de apărare ale organismului față de substanțele considerate străine și totodată coordonează activitățile altor celule în sistemul imunitar. Ele luptă împotriva agenților patogeni: viruși, bacterii, paraziți, fungi. Limfocitele umane se împart în funcție de acțiunea lor biologică și de prezența unor markeri de suprafață (de pe suprafața membranei celulare), în trei mari clase (populații): Limfocite Natural Killer - NK; Limfocite B; Limfocite T [Z4], [\*20].

## 4.2. Construcția dispozitivelor microfluidice

În ceea ce privește materialele folosite în construcția microfluidicii, acestea sunt foarte puține. Istoria acestora a început odată cu corodarea canalelor direct în siliciu. Totuși, dat fiind faptul că aplicațiile biologice implică microscopia, s-a căutat înlocuirea acestui material cu unul care să prezinte transparență și care să aibă proprietăți optice remarcabile. Acest material este sticla. Pe lângă cele două avantaje majore pe care le are în comparație cu siliciul, aceasta prezintă și rezistență [J3]. În timp, au început să se folosească și alte tipuri de materiale. Dintre aceste materiale, cele mai uzuale sunt: polimeri: a.) elastomeri (ex. PDMS); b.) termoplastici (ex. PMMA); hârtie.

## 4.3. Tipuri de circuite microfluidice

În urma cercetărilor efectuate, s-a studiat problema unghiului de intersecție dintre canale. Mai precis, s-au studiat microcanale dispuse sub formă de joncțiuni de tip „Y” și „T” - două intrări și o ieșire [M30], [\*16]. S-a constatat astfel, că unghiul de 60° este unghiul optim prin care soluțiile vor curge simultan (Fig. 4.7.a). Canalele microfluidice prin care vor circula celulele/soluțiile pot avea formă șerpuită (Fig. 4.7.b.) sau pot fi drepte. Pentru introducerea soluțiilor de lizare, în majoritatea cazurilor se folosesc canale cu bifurcație laterală, precum cele prezentate în Fig. 4.7.c.

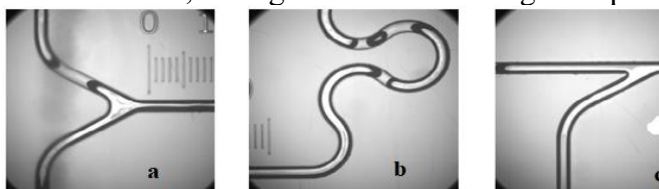


Fig. 4.7. Circuite microfluidice: a.) canale drepte cu bifurcație la 60°; b) microcanale șerpuite; c) microcanale drepte cu bifurcație laterală [\*33]

# PARTEA A DOUA. CONTRIBUȚII PRIVIND DEZVOLTAREA UNOR SISTEME MICRO-ELECTRO-MECANICE CU APLICAȚII ÎN MEDICINĂ

## CAPITOLUL 5. OBIECTIVELE, DIRECȚIILE DE CERCETARE ȘI METODOLOGIA ABORDATE ÎN TEZA DE DOCTORAT

### 5.1. Sinteza aspectelor critice privind stadiul actual al sistemelor micro-electro- mecanice cu aplicații în medicină

Din analiza critică a stadiului actual al sistemelor micro-electro-mecanice cu aplicații în medicină, s-au desprins anumite concluzii cu aplicabilitate practică, care au permis **formularea obiectivelor și direcționarea cercetărilor** din cadrul tezei, după cum urmează:

1. Tendința actuală majoră, de ultra-miniaturizare, prezentă în toate domeniile tehnologiilor de fabricație, care a condus și la a patra revoluție industrială – Industria 4.0, se manifestă și în domeniul sistemelor micro-electro-mecanice. Acestea au permis dezvoltarea unor bioMEMS-uri de nivel tehnic ridicat, capabile să realizeze anumite operațiuni, imposibil de realizat în mod uzual. Se dau câteva exemple relevante: realizarea de fotografii ale tractului digestiv, înlocuind investigațiile endoscopice, nanoroboții injectați în organism care pot fi propulsați autonom sau telecomandați, capsule care pot fi înghițite de pacienți și care pătrund în circulația sangvină a acestora spre a realiza anumite activități de tratament, monitorizare, de investigare sau implanturi.

2. Sistemele micro-electro-mecanice au în structură microsenzori, microactuatori, elemente de microelectronică. MEMS-urile aplicate în medicină pot îmbrăca diverse forme precum: traductoare biomedicale, dispozitive microfluidice, implanturi medicale, instrumente microchirurgicale etc. Utilizarea microfluidicii la construcția dispozitivelor MEMS le conferă

noi proprietăți și le face pe acestea să se încadreze în categoria specială a biodispozitivelor, denumită bioMEMS, dacă acestea utilizează substanțe și celule din organismul uman.

3. În ceea ce privește materialele folosite în construcția bioMEMS-urilor, acestea sunt clasificate în materiale de substrat sau de depunere. Se evidențiază siliciul folosit pe scară largă sub formă de substrat și metale, compuși metalici, materiale ceramice și polimerice, ca materiale de depunere. A fost identificată și noua tendință de dezvoltare a bioMEMS-urilor, pe bază de materiale carbonice, reprezentate de grafenă și derivatele acesteia, nanohornuri și nanotuburi carbonice, utilizând marile avantaje oferite de aceste materiale, care posedă rezistență mecanică ridicată, dublată de densitate redusă, asociate cu proprietăți excepționale electrice, optice și termice; acestea pot fi combinate cu rezultate remarcabile cu oxidul de zinc, dioxidul de titan și materialele polimerice ca materiale de depunere.

4. Microtehnologiile principale identificate a fi folosite la fabricația bioMEMS-urilor, în *diverse etape*, unele chiar în cadrul tezei, sunt următoarele:

- prelucrările fotochimice se aplică pe scară largă, bazându-se pe procesul de fotolitografie pentru realizarea preciziei; prezintă avantajul productivității ridicate ca urmare a prelevării simultane a materialului pe întreaga suprafață prelucrată, expusă procesului de corodare chimică după aplicarea măștilor, prin substanțe de tip fotorezist;

- prelucrarea cu radiație laser (LBM) este utilizată pentru scrierea directă a măștilor, cu lungime de undă redusă, în domeniul UV, care asigură un diametru al spotului în domeniul micrometric sau submicrometric prin capacitatea de a crea cea mai mare densitate de energie din domeniul industrial;

- prelucrarea cu fascicul de electroni (EBM) este folosită pentru depunerea straturilor subțiri din componența MEMS și la litografie cu precizie micrometrică și submicrometrică în două variante, litografia cu scriere directă prin scanarea matricială a suprafeței materialului și litografia optică prin proiectarea fasciculului, deflexia cu ajutorul lentilelor electromagnetice;

- prelucrarea cu fascicul de ioni (IBM) utilizată la depunerea de materiale în straturi subțiri (placarea ionică) din structura bioMEMS-urilor sau prelevare de material sub forma a două tipuri de corodări uscate, denumite “Reactive Ion Etching” (RIE) și “Deep Reactive Ion Etching” (DRIE);

- prelucrarea cu plasmă (Plasma Enhanced Chemical Vapor Deposition - PECVD) este folosită pentru depunerea filmelor subțiri din structura MEMS-urilor; s-au depus astfel, filme subțiri de SiC amorf (A-Si) și de grafenă verticală (VG), pentru utilizarea ca substraturi de cultură celulară în ceea ce privește aplicațiile bioMEMS;

5. Utilizarea componentei de microfluidică în cadrul sistemelor micro-electro-mecanice, le încadrează pe acestea în categoria cipuri microfluidice sau *lab-on-a-chip* (LOC), ceea ce le permite efectuarea de procese de laborator standardizate și automatizate la scară micrometrică și chiar nanometrică; majoritatea acestei categorii de dispozitive se află în diverse stadii de cercetare și mai puțin în faze de comercializare – niveluri ridicate de maturitate tehnologică; aceste dispozitive prezintă următoarele caracteristici:

- dispozitivele LOC au componente diversificate cum sunt: micropompele și microvalvele, micromixerele, microfiltrele, suprafețele funcționalizate chimic, circuitele de control electric etc.;

- avantajele acestei categorii de bioMEMS-uri, aplicabile și la determinarea limfocitelor T, față de mijloacele de analiză convenționale, sunt: reducerea volumului probelor; procesarea rapidă a probelor datorită timpului de reacție scurt; sensibilitate ridicată; energii consumate și costuri reduse; portabilitatea și reutilizarea dispozitivelor, cu implicații pozitive privind timpul redus de diagnosticare și acordarea rapidă a tratamentului. Spre comparație, metoda actuală (convențională) de numărare a leucocitelor se bazează pe un instrument complex, care trebuie să fie deservit de un personal calificat și bine instruit. Procedura este în același timp una cronofagă, deci are dezavantajul major al întârzierii la diagnosticare și tratament adecvat.

Citometria în flux este metoda standard de numărare a limfocitelor T, metodă ce are nevoie de laboratoare centralizate și de personal instruit;

- în ceea ce privește materialele pentru realizarea circuitelor microfluidice, se folosesc frecvent tehnologii de fabricare hibridă care folosesc mai multe materiale în același MEMS. Dintre acestea se menționează: un sistem flexibil de polimer (polidimetilsiloxan — PDMS) sau un alt polimer, polimetacrilat de metil – PMMA, sticlă și un polimer rigid (SU-8).

- în ceea ce privește forma circuitelor microfluidice, s-a studiat problema unghiului de intersecție dintre canale, respectiv dispunerea sub formă de joncțiuni de tip „Y” și „T” - două intrări și o ieșire, utilizate spre exemplu, pentru introducerea probei și a substanțelor de lizare. Sunt studii care arată că unghiurile între canalele de joncțiune cuprinse între 45 și 60°, valori pentru care soluțiile vor curge simultan în circuitul microfluidic. Canalele pot fi drepte, cu raze de racordare, șerpuite sau în spirală. Însă pentru fiecare dispozitiv în parte, s-a stabilit geometria funcțională a canalelor microfluidice cu ajutorul simulărilor numerice ale curgerii probei și substanțelor folosite la analiza în cadrul LOC, validată ulterior.

Analiza critică a aspectelor relevante din stadiul actual a stat la baza formulării sistemice a obiectivelor tezei.

## 5.2. Obiective ale tezei de doctorat

În urma analizei critice a stadiului actual al dispozitivelor micro-electro-mecanice cu aplicații în medicină au fost stabilite: **un obiectiv principal (Op)** și mai multe **obiective specifice (Os<sub>i</sub>)**. Pentru operaționalizarea acestora, aceste obiective au fost formulate după cum se prezintă în continuare:

**Op: Obiectivul principal al tezei de doctorat este acela de a fabrica pentru prima dată în țara noastră un sistem micro-electro-mecanic cu aplicații în medicină, destinat numărării limfocitelor T.**

*Acest bioMEMS poate fi folosit la diagnosticarea în faze incipiente a unor afecțiuni grave cum sunt HIV sau leucemie.*

Având în vedere complexitatea aspectelor cu privire la fabricația unui bioMEMS destinat numărării limfocitelor T, evidențiate în analiza critică a stadiului actual al domeniului și cercetările direcționate către execuția practică a unui asemenea dispozitiv, s-au previzionat pentru obținerea obiectivului principal, două etape majore de fabricație a dispozitivului microfluidic: realizarea modelului experimental – ME (cercetare industrială) și realizarea prototipului - P (dezvoltare experimentală) îmbunătățit al dispozitivului.

În acest context, s-au considerat următoarele definiții cu privire la etapele de dezvoltare ale fabricației produsului care face obiectul tezei de doctorat [\*37]:

*Model experimental - sistem care integrează părțile componente, care se află în formă funcțională aproape sau chiar în condițiile de operare, conform specificațiilor. Acest model trebuie să asigure demonstrarea capacităților funcționale și de operare ale sistemului final;*

*Prototipul - model fizic necesar pentru evaluarea fezabilității fabricării unui produs, respectiv sistem, în care s-au integrat părțile sale componente.*

S-au stabilit mai multe **obiective specifice** (subordonate) obiectivului principal, grupate în cele două etape majore, menționate anterior, după cum urmează:

**Os<sub>1</sub>:** Formularea funcției generale și funcțiilor principale și secundare ale dispozitivului microfluidic și a structurii corespunzătoare acestuia;

**Os<sub>2</sub>:** Stabilirea formei geometrice și dimensiunilor circuitelor microfluidice;

**Os<sub>3</sub>:** Stabilirea formei și dimensiunilor senzorilor și dispunerii acestora în cadrul dispozitivului microfluidic;

**Os<sub>4</sub>:** Proiectarea dispozitivului microfluidic – model experimental;

**Os5:** Proiectarea procesului tehnologic de fabricație a dispozitivului microfluidic – model experimental;

**Os5:** Modelarea procesului tehnologic de fabricație a dispozitivului microfluidic – model experimental;

**Os6:** Modelarea și simularea curgerii în circuitele microfluidice ale dispozitivului microfluidic – model experimental;

**Os7:** Fabricarea dispozitivului microfluidic – model experimental;

**Os8:** Testarea dispozitivului microfluidic – model experimental;

**Os9:** Identificarea neconformităților și a cauzelor posibile ale acestora la fabricația dispozitivului microfluidic – model experimental;

**Os10:** Proiectarea prototipului îmbunătățit al dispozitivului microfluidic și a procesului tehnologic de fabricație al acestuia;

**Os11:** Modelarea procesului tehnologic de fabricație a prototipului îmbunătățit al dispozitivului microfluidic;

**Os12:** Fabricarea prototipului îmbunătățit al dispozitivului microfluidic;

**Os13:** Testarea prototipului îmbunătățit al dispozitivului microfluidic;

**Os14:** Integrarea dispozitivului microfluidic într-un dispozitiv portabil și efectuarea unor teste specifice de fiabilitate;

**Os15:** Trecerea de la nivelul de maturitate tehnologică, *Technology Readiness Level*, TRL 2 – faza de concept, la faza TRL 4, validarea tehnologiei de fabricație la nivel de laborator;

**Os16:** Crearea condițiilor de trecere la nivelurile următoare, TRL 5 care presupune validarea funcționării întregului sistem al dispozitivului micro-electro-mecanic în condiții de operare de laborator, similare celor reale de funcționare și TRL 6, validarea funcționării într-un mediu relevant, respectiv condiții de funcționare apropiate de cele reale.

### 5.3. Direcții de cercetare și metodologia de cercetare ale tezei de doctorat

**Direcțiile de cercetare majore (D<sub>i</sub>)** pe care se va acționa în cadrul tezei de doctorat vor fi următoarele, cu posibile particularizări ale unor subdirecții, care se vor dovedi importante privitor la creșterea performanțelor biodispozitivului micro-electro-mecanic, așa cum a fost caracterizat anterior:

**(D<sub>1</sub>)** modelarea dispozitivului microfluidic și bazat pe aceasta, studierea comportamentului hidraulic al circuitelor microfluidice prin modelare și simulare numerică și validarea rezultatelor obținute pe cale experimentală;

**(D<sub>2</sub>)** modelarea procesului de fabricație a dispozitivului microfluidic și identificarea unor etape critice care ar putea conduce la disfuncționalități, încă din etapele de proiectare funcțională și tehnologică, care se intercondiționează sinergic;

**(D<sub>3</sub>)** cercetări experimentale cu privire la testarea funcționalității dispozitivului microfluidic în ceea ce privește comportamentul componentelor esențiale ale acestuia: senzori, circuite microfluidice cu elementele specifice, canale de numărare, camera de captură etc.;

**(D<sub>4</sub>)** cercetări experimentale cu privire la îmbunătățirea biodispozitivului micro-electro-mecanic din punct de vedere funcțional și al procesului de fabricație, cu validarea parametrilor constructivi și tehnologici la nivel de laborator;

**(D<sub>5</sub>)** cercetări experimentale referitoare la caracteristicile specifice unui dispozitiv portabil și reutilizabil, care să reproducă condițiile de mediu reale întâlnite în timpul fabricației, funcționării și depozitării.

**Metodologia de cercetare** utilizată în cadrul tezei este structurată după cum urmează:

- Analiza critică a stadiului actual al sistemelor micro-electro-mecanice, utilizate în medicină (bioMEMS) și abordarea unui model inovativ de bioMEMS, aplicat la determinarea limfocitelor T dintr-o probă de sânge;

- Proiectarea conceptuală și de detaliu a dispozitivului microfluidic pentru determinarea limfocitelor T - **TRL 2**;
- Stabilirea rețetelor soluțiilor de lizare a eritrocitelor și de stopare a lizării, pentru determinarea limfocitelor T dintr-o probă de sânge;
- Modelarea procesului de fabricație a unui dispozitiv microfluidic – model experimental pentru determinarea limfocitelor T;
- Modelarea și simularea numerică a curgerii în cadrul dispozitivului microfluidic în următoarele etape: (1) curgerea probei de sânge și a substanței de lizare a eritrocitelor în circuitul de lizare; (2) curgerea substanței de oprire a lizării adăugată la substanțele anterioare, în circuitul de stopare a lizării; (3) curgerea în canalul de numărare și camera de captură;
- Validarea experimentală a rezultatelor modelării și simulării pe baza testării modelului experimental fabricat;
- Fabricarea unui lot de modele experimentale ale dispozitivului microfluidic pentru determinarea limfocitelor T;
- Identificarea neconformităților apărute pe parcursul procesului tehnologic de fabricație a modelului experimental, precum și a cauzelor acestora;
- Înlăturarea cauzelor neconformităților prin găsirea soluțiilor de îmbunătățire și aplicarea acestora la proiectarea prototipului îmbunătățit al dispozitivului microfluidic de determinare a limfocitelor T și a procesului tehnologic de fabricație a acestuia;
- Fabricația prototipului îmbunătățit al dispozitivului microfluidic și testarea sa în vederea validării operării în condiții de laborator, precum și validarea tehnologiei de fabricație a acestuia în laborator - **TRL 4**;
- Integrarea dispozitivului microfluidic într-un dispozitiv portabil și supunerea acestuia la teste de laborator specifice unor asemenea dispozitive, în condiții *similare* cu acelea întâlnite într-un mediu real - **TRL 5 sau apropiate de acesta - TRL 6**.

## CAPITOLUL 6. CERCETĂRI PRIVIND PROIECTAREA, MODELAREA ȘI SIMULAREA UNUI DISPOZITIV MICRO-ELECTRO-MECANIC DE DETERMINARE A LIMFOCITELOR T, MODEL EXPERIMENTAL

### 6.1. Date generale

Dispozitivul micro-electro-mecanic de tip MEMS este un dispozitiv de detecție a numărului de „**limfocite Totale CD3+**” (“cluster of differentiation” 3 – CD3+), „**limfocite T ajutătoare CD4+**” și „**limfocite T supresoare/citotoxice CD8+**”. Limfocitele T prezintă pe suprafața lor membranară diverse categorii de receptori. CD3+, CD4+ și CD8+ sunt subcategoriile receptorilor pentru recunoaștere antigenică [M16], [M20], [M21], [M22].

### 6.2. Stabilirea funcțiilor și structurii funcționale ale produsului

În vederea determinării îndeplinirii tuturor cerințelor funcționale ale unui astfel de dispozitiv microfluidic, s-a conceput structura acestuia din următoarele blocuri specifice (Fig. 6.1):

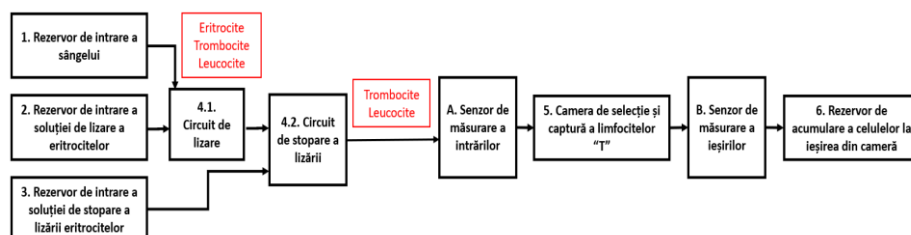


Fig. 6.1. Schema dispozitivului microfluidic pentru determinarea limfocitelor T



Dispozitivul microfluidic microstructurat a fost proiectat astfel încât să prezinte o sensibilitate și specificitate mărită față de alte dispozitive microfluidice cu destinație similară. Acesta este compus din patru elemente specifice:

1. **segmentul de îmbogățire a leucocitelor**, compus din două module:
  - a. **modulul pentru lizarea eritrocitelor;**
  - b. **modulul pentru stoparea lizării;**
2. **segmentul de microcanale;**
3. **segmentul de capturare a leucocitelor;**
4. **segmentul de numărare a leucocitelor**, compus din:
  - A. **Senzorul de măsurare a intrărilor;**
  - B. **Senzorul de măsurare a ieșirilor.**

A fost proiectată o cameră de capturare ce permite selecția specifică a limfocitelor CD3+, CD4+ și CD8+, cu ajutorul anticorpilor specifici anti-CD3+ , anti-CD4+ și anti-CD8+. Anticorpii vor fi imobilizați de pilonii aflați în camera de captură a limfocitelor. Astfel, cei doi senzori electrochimici vor fi amplasați înaintea intrării în camera de captură și la ieșirea din cameră. Aceștia vor număra una câte una leucocitele care pătrund în cameră și pe cele care ies din cameră. Populația de limfocite care se dorește a fi cuantificată va rămâne blocată în camera de captură. Diferența dintre numărul de intrări și numărul de ieșiri din cameră, va reprezenta numărul de limfocite CD3+, CD4+ sau CD8+.

### 6.3. Date tehnologice obținute în laborator

Pentru lizarea eritrocitelor, s-a folosit produsul comercial 10X RBC Lysis Buffer (Multi-species) de la ThermoFisher Scientific, care este special formulat pentru lizarea optimă a eritrocitelor în suspensiile monocelulare de sânge periferic și țesuturi hematopoietice, cum ar fi splina. 10X RBC Lysis Buffer (Multi-species) conține clorură de amoniu, care lizează celulele roșii din sânge cu un efect minim asupra limfocitelor [\*38]. Pentru stoparea lizării se pompează pe microcanalul corespunzător tampon fosfat salin cu pH 7,1.

S-a studiat raportul optim între proba de sânge, soluția de lizare și soluția de stopare. Raportul optim de soluție sânge: liză a fost găsit a fi 1:12. În aceste condiții, debitul de sânge a fost stabilit la 5  $\mu$ l/min și debitul soluției de liză a fost setat la 60  $\mu$ l/min, astfel încât timpul petrecut în secțiunea de liză să nu depășească 6 secunde. Pentru secțiunea de oprire a lizei, raportul dintre amestecul din secțiunea de liză și soluția de oprire a lizei este recomandat să fie 1: 6, astfel încât să dureze cel puțin 30 de secunde pentru ca soluția de oprire să se amestece cu sânge lizat și să permită liza completă a eritrocitelor.

### 6.4. Stabilirea formei traseelor microfluidice

Pentru a stabili dimensiunile canalelor fluidice, s-a realizat o presimulare a elementelor principale cu ajutorul programului ANSYS® FLUENT, dedicat în exclusivitate modelării CFD (Computational Fluid Dynamics).

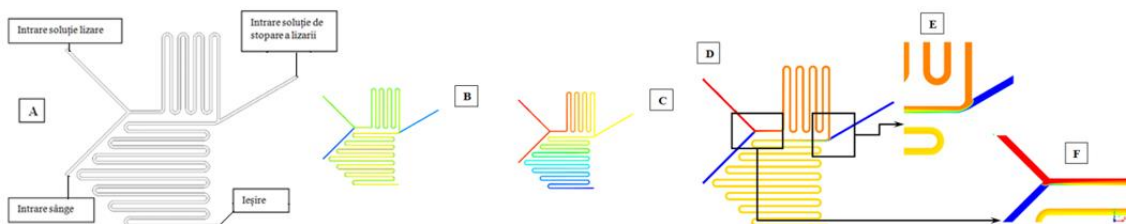


Fig. 6.2. Modelarea și simularea curgerii în sistemul microfluidic: A) Modulul circuitului de lizare a eritrocitelor cuplat cu circuitul de stopare a lizării; B) Distribuție de presiuni; C) Distribuție de viteze; D) Reprezentarea procesului de difuzie; E), F) Detaliu al procesului de difuzie [M16].

## 6.5. Proiectarea dispozitivului micro-electro-mecanic, model experimental

Etapele fluxului tehnologic pentru fabricarea dispozitivului micro-electro-mecanic, model experimental, cuprind o succesiune de depuneri de materiale specifice. Această succesiune de depuneri este prezentată în Fig. 6.4. Se folosește o plachetă de siliciu (1) pe suprafața căreia se va depune un strat de oxid de siliciu (2). Peste acesta se va etala un strat de fotorezist (3), folosit ca strat de sacrificiu pentru expunerea primei măști peste care se va depune un strat de titan-aur (4). Urmează procesul de curățire a zonelor inactive, proces denumit lift-off (5). Se va depune un nou strat de fotorezist (6) peste care se va depune argintul folosit în construcția electrozilor de referință. Apoi va avea loc un alt proces de lift-off (7). Ultimul strat depus va fi cel de fotorezist SU-8 2050, folosit pentru construcția părții microfluidice (circuitele de curgere). În final, dispozitivului i se va atașa un capac de PDMS (10). Materialul intermediar cu ajutorul căruia se realizează aceste depuneri este fotorezistul.

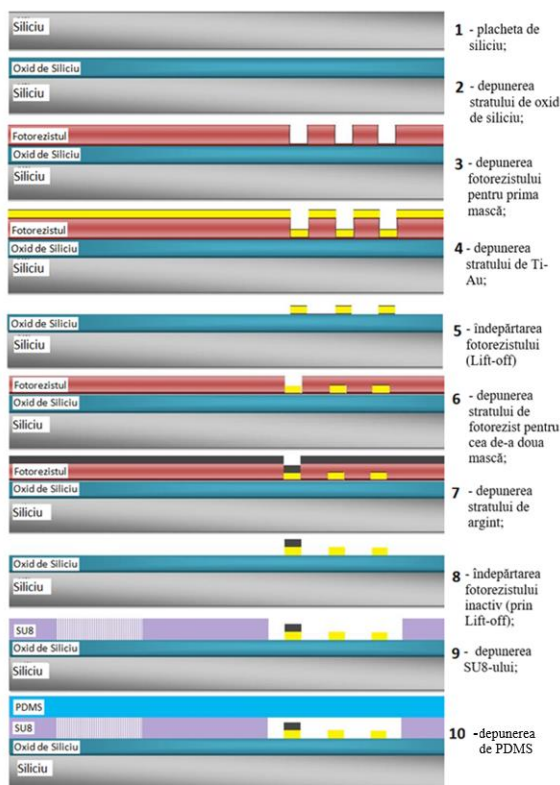


Fig. 6.4. Etapele fluxului tehnologic [M16]

- **Proiectarea primei măști**

Prima mască (M1) se realizează din titan-aur și conține cei doi senzori de măsurare a intrărilor și ieșirilor, precum și marginile de referință ale dispozitivului. Pentru a putea diferenția măștile între ele, este indicat ca fiecare mască să fie realizată folosind altă culoare. Pentru această mască s-a folosit culoarea galbenă (Fig. 6.15). Fiecare plachetă conține patru dispozitive microfluidice.

- **Proiectarea celei de-a doua măști**

Cea de-a doua mască proiectată (M2) (reprezentată cu roșu în Fig. 6.20) este destinată stratului pe care se va depune argintul. Este necesară depunerea de argint pe suprafața unui singur electrod, și anume cel de referință.

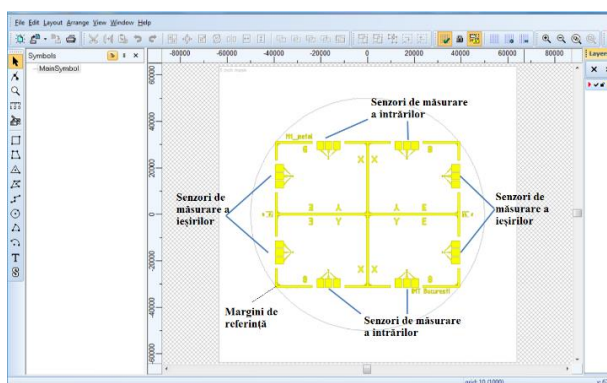


Fig. 6.15. Prima mască specifică dispozitivului

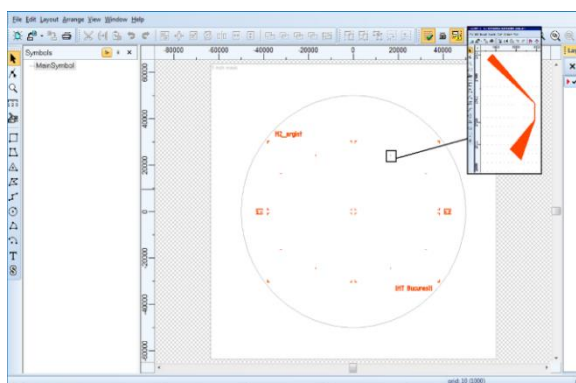


Fig. 6.20. Proiectarea celei de a doua măști

- **Proiectarea celei de-a treia măști (M3)**

Această mască (M3) se realizează pentru depunerea de fotorezist negativ (SU-8), folosit în definirea canalelor microfluidice. Imaginea celei de-a treia măști proiectate poate fi observată în Fig. 6.22. Ea cuprinde patru nanoporturi: A1. pentru sânge; A2. pentru soluția de lizare a eritrocitelor din sânge; A3. pentru soluția de stopare a lizării; A4. pentru stocarea celulelor rămase; precum și B. microcanaele; C. camera de selecție și captură.

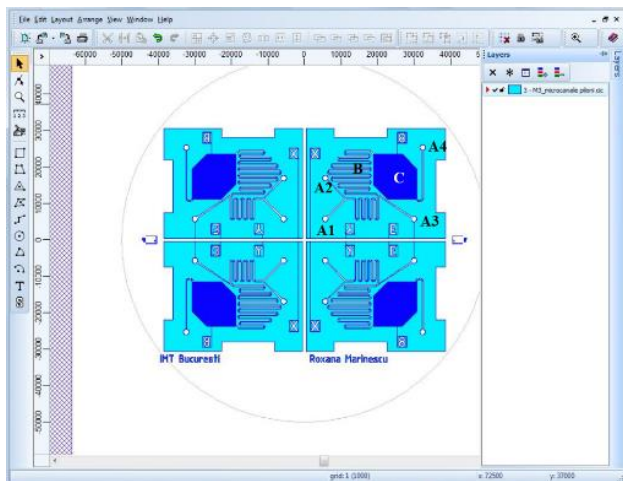


Fig. 6.22. Proiectarea celei de-a treia măști

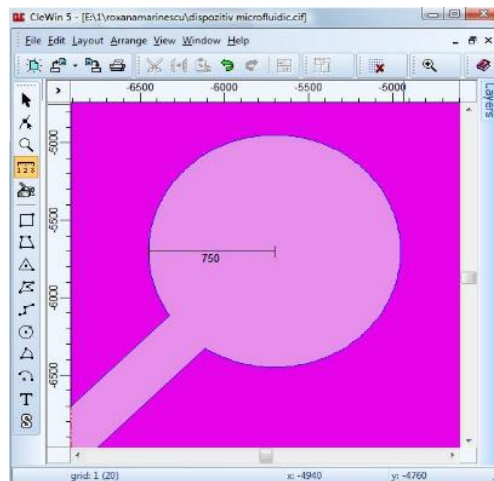


Fig. 6.24. Proiectarea nanoporturilor

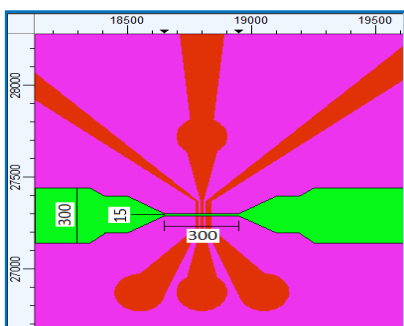


Fig. 6.25. Proiectarea microcanalului de numărare din zona senzorilor

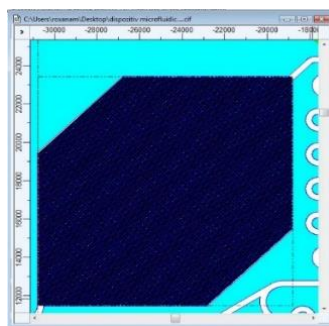


Fig. 6.26. Camera de selecție și captură

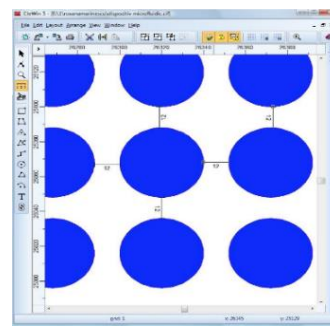


Fig. 6.28. Distanța dintre piloni

Cele patru nanoporturi reprezentate A1, A2, A3, A4 în Fig. 6.20 au raza de 750  $\mu\text{m}$  (Fig. 6.24). Lățimea microcanaelelor este de 300  $\mu\text{m}$ . Canalul microfluidic se îngustează la 15  $\mu\text{m}$  în zona senzorilor electrochimici de numărare a intrărilor și a ieșirilor, pe o distanță de 300  $\mu\text{m}$ , astfel încât celulele să intre pe rând, una câte una, pentru a evita conglomerarea, respectiv erorile de numărare. Acest detaliu poate fi observat în Fig. 6.25. Camera de selecție și captură are forma hexagonală și este reprezentată cu culoarea albastră în Fig. 6.26. Pilonii au diametrul de 40  $\mu\text{m}$  (Fig. 6.27) și distanța de 12  $\mu\text{m}$  între ei care permite trecerea limfocitelor (Fig. 6.28), fiind proiectați 54230 piloni în interiorul camerei de selecție și captură.

- **Măști, aliniere și expunere**

Fabricarea măștilor fotolitografice începe cu proiectarea geometriilor. Măștile conțin geometriile care vor fi transferate în fotorezistul etalat pe plachetă. Fișierul creat în programul specializat CleWin5 este folosit pentru a genera zone transparente sau opace pe mască.

Pentru obținerea unei alinieri corecte a măștilor, este necesară fabricarea unor semne de aliniere care să fie transferate pe substrat. Cu ajutorul semnelor de aliniere, măștile vor fi orientate una în raport cu alta, la fabricarea dispozitivului microfluidic. În Fig. 6.33. se observă imaginea celor trei măști la proiectarea acestora, în faza de suprapunere.

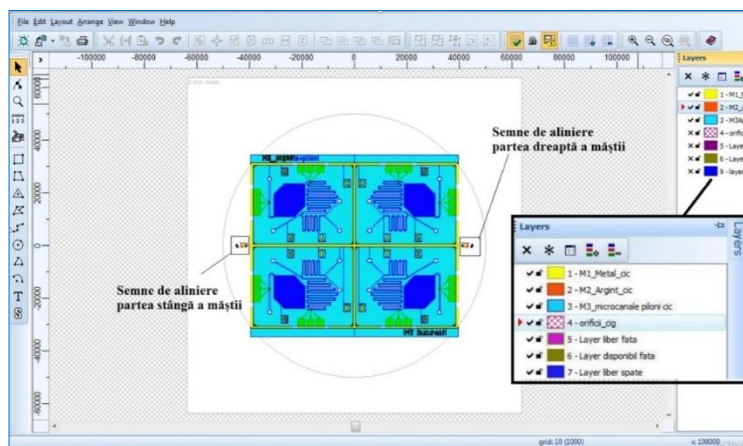


Fig. 6.33. Cele trei măști suprapuse

### 6.6. Modelarea procesului de fabricație a dispozitivului micro-electro-mecanic, model experimental

Folosind programul „SEMulator3D™”, au fost generate modelele 3D pentru modulele care alcătuiesc biocipul pentru determinarea limfocitelor T. Parcurgând etapele de modelare a procesului de fabricație prezentate anterior, configurația dispozitivelor cu rezervoarele (prin care sunt introduse soluțiile) atașate va arăta conform Figurilor 6.37 și 6.52.

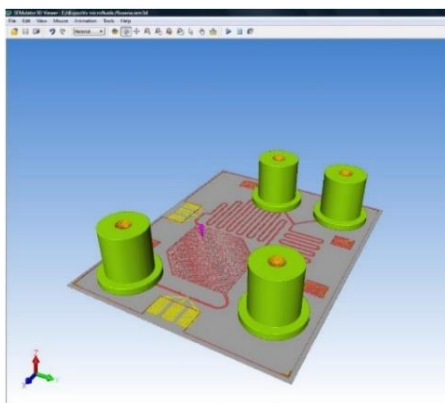


Fig. 6.37. Modelarea rezervoarelor pentru introducerea substanțelor în circuitele microfluidice

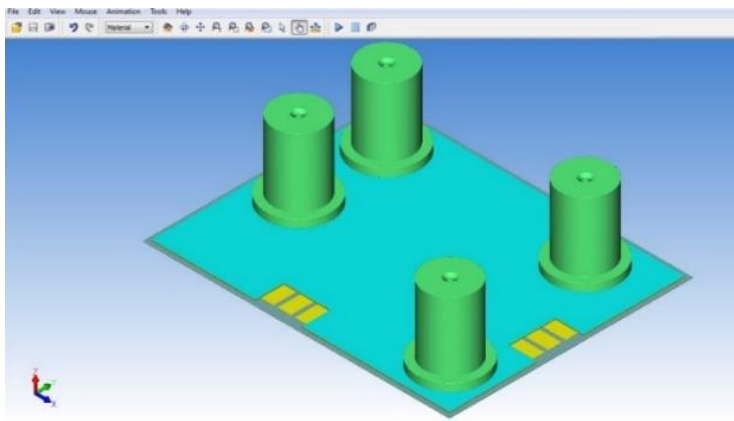


Fig. 6.52. Configurația dispozitivului microfluidic după modelarea etapelor de fabricație

Folosind SEMulator 3D, s-a demonstrat corectitudinea proiectării în vederea fabricării dispozitivului și s-au verificat parametrii stabiliți în faza de proiectare pentru realizarea dispozitivului de detecție a limfocitelor T, care definesc rezultatele preconizate a fi obținute.

Cu ajutorul acestui program se dovedește că succesiunea etapelor standard este conformă procesului de fabricare a dispozitivului prevăzut, realizat cu caracteristicile dorite.

### 6.7. Modelarea și simularea computerizată a curgerii microfluidice în dispozitivul micro-electro-mecanic, model experimental

S-a apelat la softul dedicat de modelare cu elemente finite Comsol Multiphysics [C17] și apoi succesiv au fost selectate modulele, *Fluid Flow*, *Single Phase Flow* și *Laminar Flow* pentru modelarea și simularea fluxului substanțelor folosite în cadrul dispozitivului microfluidic. Datele de intrare prezentate anterior, sunt reproduse în Tabelul 6.3 [G5].

Tabelul 6.3. Datele de intrare pentru realizarea simulării microfluidice

Proporțiile debitului	
Sânge	50 $\mu\text{l}/\text{min}$
Soluție de lizare	1600 $\mu\text{l}/\text{min}$
Soluție de stopare a lizării	265 $\mu\text{l}/\text{min}$

Parametrizarea geometriei modelului după optimizarea constructivă și dimensională iterativă este prezentată în Tabelul 6.4 [G5]. Cu ajutorul acestor parametrii, a fost modelată geometria în Comsol, conform Fig. 6.55.

Tabelul 6.4. Parametrii simulării [G5]

Nume	Expresie	Valoare [ $\mu\text{m}$ ]	Descriere
l1c	40000	40000.0	lungime cip
l2c	30000	30000.0	lățime cip
a	300	300	lățime canal
l1	7300	7300	lungime canal 1
l2	1800	1800	lungime canal 2
rrac	300	300	curbe
l3	4200	4200	lungime canal 3
d1	1000	1000	distanța dintre circuite
l4	7800	7800	lungime canal 4
l5	6600	6600	lungime canal 5
l6	8400	8400	lungime canal 6
l7	10200	10200.0	lungime canal 7
l8	11700	11700.0	lungime canal 8
l9	3000	3000	lungime canal 9
l10	500	500	lungime canal 10
b	300/4	75	lungime țesitură 1
l11	200	200	lungime canal țesit
c	$(a-2*b-d)/2$	67.5	lungime țesitură 2
d	15	15	calcul diametru canal
l12	100	100	lungime de intrare în camera de captură
l13	3000	3000	lungime canal de numărare
lcap	12044	12040.0	lungime latură cameră de captură
distp	12	12	distanța dintre piloni
rp	176/2	88	raza pilonului
xch	-12000	-12000.0	poziția origine cip pe axa x
y ch	12000-30000	-18000.0	poziția origine cip pe axa y

S-a realizat modelarea și simularea curgerilor microfluidice în Comsol Multiphysics. Modelarea cu elemente finite a determinat geometria optimizată a circuitului de curgere a dispozitivului „lab-on-a chip” pe o plachetă de siliciu, pentru numărarea tipurilor de limfocite T de către senzori electrochimici. Modelul realizat în programul Comsol Multiphysics a fost validat prin testarea după fabricație, îndeplinind condițiile de timp de deplasare a probei de sânge și a substanțelor reactive din circuitele de curgere, necesare pentru o analiză adecvată. Dispozitivul reutilizabil are avantajul de a furniza rapid și fiabil rezultatele testelor unei probe de sânge cu volum redus.

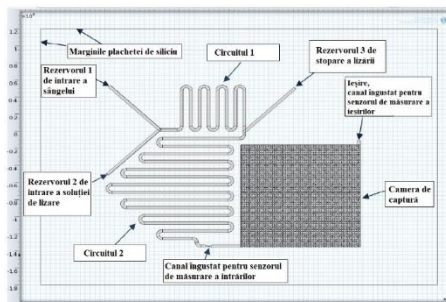


Fig. 6.55. Crearea geometriei dispozitivului microfluidic cu datele rezultate de la proiectare [G5]

Simularea vitezei de curgere a amestecului de fluide este prezentată în Fig. 6.57 [G5]

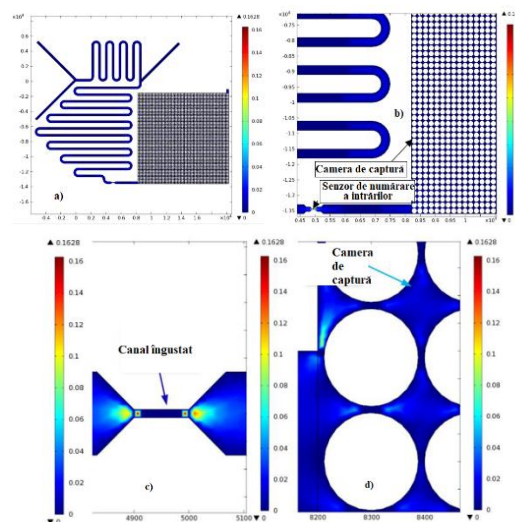


Fig. 6.57. Variația vitezei de curgere [m/s], a) vedere generală, b) detaliu al circuitelor, c) canalul de numărare, d) vedere mărită a camerei de selecție și captură [G5]

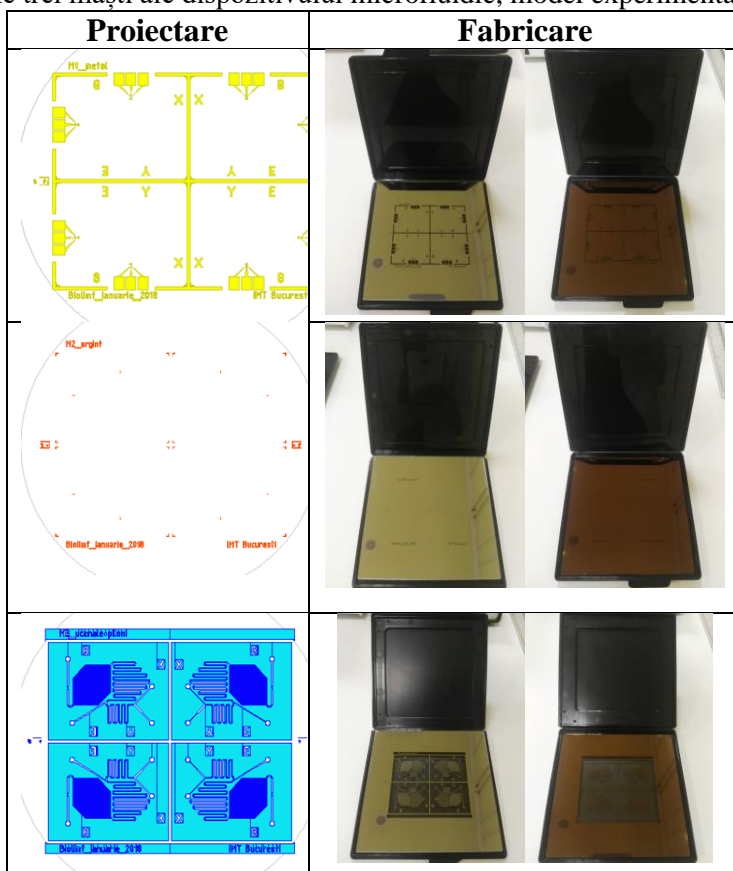
## CAPITOLUL 7. FABRICAREA UNUI DISPOZITIV MICRO-ELECTRO-MECANIC, MODEL EXPERIMENTAL

Tabelul 7.1. Cele trei măști ale dispozitivului microfluidic, model experimental

**Masca 1 (M1)** - folosită pentru depunerea stratului compus din titan și aur, pe care s-a proiectat segmentul de numărare a leucocitelor, format din cei doi senzori: senzorul electrochimic de numărare a intrărilor și senzorul electrochimic de numărare a ieșirilor;

**Masca 2 (M2)** - folosită pentru depunerea argintului; argintul se depune doar pe suprafața unui singur electrod al fiecărui senzor: electrodul de referință.

**Masca 3 (M3)** - folosită pentru depunerea fotorezistivului SU-8, în care au fost realizate prin fotolitografie, canalele microfluidice, orificiile pentru introducerea soluțiilor utilizate în procesul de analiză lab-on-a-chip, precum și camera de selecție și captură.



În Tabelul 7.1 sunt prezentate cele trei măști (vedere din față și vedere din spate – partea dreaptă) realizate cu echipamentul de scriere cu laser DWL 66-fs în corespondență cu desenul proiectat în programul CleWin (stânga) pentru fiecare mască în parte.

### 7.2. Fabricarea propriu-zisă a dispozitivului, model experimental

Pentru fabricarea dispozitivului s-a folosit un lot de cinci plachete de siliciu. Pe fiecare din aceste cinci plachete au fost dispuse patru dispozitive microfluidice. Astfel, lotul de fabricație a fost constituit din 20 de produse.

Executarea efectivă a platformei microfluidice are loc conform fluxului tehnologic stabilit anterior cu următoarele etape, prezentate în continuare.

#### 7.2.1. Placheta de siliciu folosită ca substrat

Fabricarea biodispozitivului microfluidic s-a realizat începând cu alegerea unui substrat. Pentru acest dispozitiv, s-a ales ca substrat placheta de siliciu monocristalin cu diametru de 100 mm.

#### 7.2.2. Depunerea stratului de oxid de siliciu

Prima etapă în realizarea dispozitivului este reprezentată de creșterea unui strat subțire de oxid de siliciu pe suprafața plachetei. Stratul de oxid care a fost depus (Fig. 7.5) are rol de strat izolator între siliciu și stratul metalic ce urmează a fi depus. Acesta constituie o barieră în

calea pătrunderii impurităților în materialul de bază [A12]. După depunerea stratului de oxidare s-a realizat o etapă intermediară de verificare a grosimii depuse (Fig. 7.6) cu ajutorul echipamentului NanoCalc-XR (Ocean Optics, Germania) [\*9], [\*34].

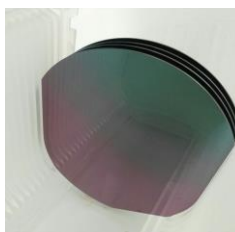


Fig. 7.5. Oxid de siliciu depus pe plachete



Fig. 7.6. Echipament NanoCalc-XR [M20]



Fig. 7.8. Fotorezistul LOR 10B depus pe plachetă



Fig. 7.9. Spinner Suss MicroTec

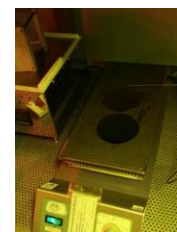


Fig. 7.10. Tratament termic pe plită

### 7.2.3. Fotolitografia pentru prima mască

După creșterea stratului de oxid de siliciu, s-a depus fotorezistul pe întreaga suprafață a plachetei. El este folosit pentru a determina forma geometrică a materialului care urmează a fi depus peste siliciu [M23]. Depunerea fotorezistului trece prin cele trei etape: **etalare** → **xpunere** → **developeare**.

Primul strat de fotorezist care se aplică pe plachetele de siliciu se numește LOR 10B și este un fotorezist pozitiv folosit ca soluție ajutătoare a procesului ulterior de lift-off. Fotorezistul a fost depus pe plachete prin picurare (Fig. 7.8). Acesta a fost etalat pe întreaga suprafață a plachetelor prin centrifugare folosind echipamentul Suss MicroTec (Germania) denumit "spinner" (Fig. 7.9) [\*9], [\*27], alegând viteza de rotație de 3000 rpm și un timp de 30 - 40 s. A rezultat un strat cu grosimea de 1  $\mu\text{m}$ . Pentru solidificarea rășinii, plachetele de siliciu cu stratul de fotorezist depus au fost tratate termic pe o plită preîncălzită. Pentru uscare („pre-baking”), plachetele se țin 3 min la 150 °C pe plita Selecta Combiplac (Barcelona) [\*28] (Fig. 7.10). Apoi, fiecare plachetă a fost expusă la lumină ultravioletă (UV) timp de 50 s. În continuare, s-a depus un al doilea strat de fotorezist pozitiv, numit HPR 504, prin aceeași modalitate: etalare cu ajutorul spinner-ului Suss MicroTec [\*27] la 3000 rpm și un timp de 30 - 40 s. După depunerea fotorezistului HPR 504, plachetele au fost așezate pe o plită termică pentru tratament timp de 1 min la 90 °C.

Pentru transferarea imaginii de pe mască pe suprafața substratului, cu lumină ultravioletă (UV), a fost utilizat echipamentul MA6/BA6 (Suss MicroTec, Germania) [\*27], care este un echipament pentru dublă aliniere (față/spate) a plachetei. Mască se fixează în echipament în vid (Fig. 7.14. a, b.), iar sub mască se fixează placheta (Fig. 7.15. a, b).

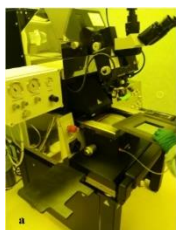


Fig. 7.14. a.) orientarea și b.) fixarea măștii în echipamentul MA6/BA6



Fig. 7.15. a.) orientarea și b.) fixarea plachetei în echipamentul MA6/BA6

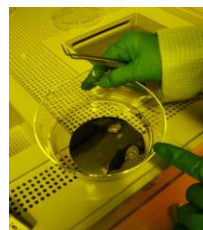
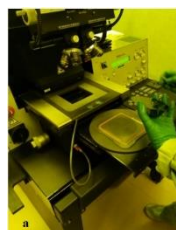


Fig. 7.16. Developarea plachetei în soluție HPRD 402

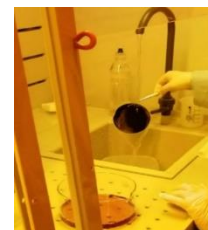


Fig. 7.17. Spălarea plachetei cu apă deionizată

Soluția de developare folosită pentru înlăturarea componentelor acide ale fotorezistului a fost acetona împreună cu substanța HPRD 402. Acest amestec îndepărtează stratul de

fotorezist ce a fost expus, rămânând astfel imaginea transpusă de pe prima mască. După ce fiecare plachetă a fost introdusă în soluție timp de 15-30 secunde (Fig. 7.16), aceasta s-a clătit cu apă deionizată (Fig. 7.17) [M16]. După clătirea plachetei din abundență cu apă deionizată, aceasta a fost uscată cu azot pentru a îndepărta cea mai mare parte din apă și apoi a fost uscată cu ajutorul unei centrifuge [\*9] pentru a îndepărta orice urmă de soluție sau de apă rămasă pe suprafața plachetei.

- **Inspecția intermediară**

Pentru a vedea rezultatele obținute și dacă fotorezistul a fost îndepărtat corespunzător din zonele expuse, s-a realizat inspecția intermediară, folosind un microscop optic Leica, model DM LM (Leica Microsystems, Germania) din dotarea IMT București [\*9], [\*29], ce are obiective de la x5 la x100.

În cazul dezvoltărilor necorespunzătoare, unde fotorezistul a fost îndepărtat parțial, plachetele au fost din nou introduse câteva secunde în soluția de dezvoltare, pentru a îndepărta fotorezistul rămas pe plachetă. După ce s-a realizat cea de-a doua inspecție intermediară, s-a constatat faptul că toate dezvoltările au fost conforme. Astfel, se poate trece la următoarea etapă, cea de depunere a stratului de titan-aur.

#### 7.2.4. Depunerea stratului de titan-aur

Într-o primă etapă, a fost depus un strat de Ti-Au: 30 nm de Ti, apoi 300 nm Au. Stratul de titan este depus între substratul de siliciu (oxidat) și stratul de aur pentru a asigura adeziunea. Această depunere de titan-aur s-a realizat pe întreaga suprafață a plachetei și a fost făcută imediat după procesul de fotolitografie pentru a evita contaminarea. Procesul următor de lift-off limitează grosimea de depunere a straturilor de metal. După îndepărtarea fotorezistului, metalul a rămas doar în ferestrele expuse în etapa anterioară [M16]. Echipamentul pe care se face depunerea în vid se numește Neva-EVD 500A (Neva, Japonia) (Fig. 7.19)



Fig. 7.19. Echipamentul Neva EVD 500 A  
a) vedere de ansamblu a echipamentului;  
b) panou de comandă

#### 7.2.5. Îndepărtarea fotorezistului prin lift-off pentru prima mască

După depunerea stratului de Ti-Au, urmează procesul de lift-off. Plachetele se scufundă într-un vas ce conține acetonă (Fig. 7.20) la temperatura camerei și se agită până când are loc desprinderea fotorezistului împreună cu metalul depus peste el. Această soluție de acetonă trebuie să fie schimbată regulat pentru a evita redepunerea pe electrozi a particulelor de metal care se desprind, dat fiind faptul că acestea pot adera la plachetă [M16].

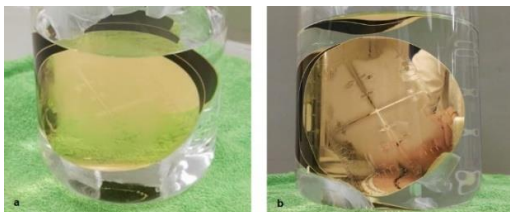


Fig. 7.20. a) Introducerea plachetelor în soluție de acetonă pentru procesul de lift-off; b) activarea procesului de îndepărtare a stratului de aur

Faptul că depunerile de aur peste stratul de oxid de siliciu s-au realizat cu succes se observă atât cu ochiul liber, cât și prin imaginile cu rezoluție de x5 și x10, realizate cu ajutorul microscopului optic Leica DM LM (Leica Microsystems, Germania) (Fig. 7.21) [\*9], [\*29]. În Fig. 7.22 se pot observa imaginile senzorilor de intrare și a senzorilor de ieșire ai unui dispozitiv.



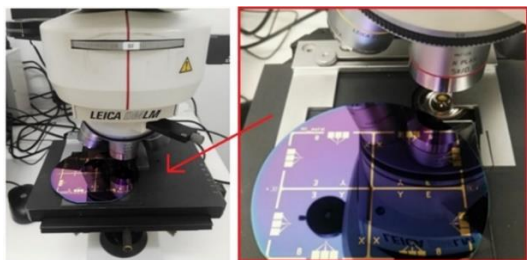


Fig. 7.21. Inspecția la microscop a plachetei după realizarea primei măști

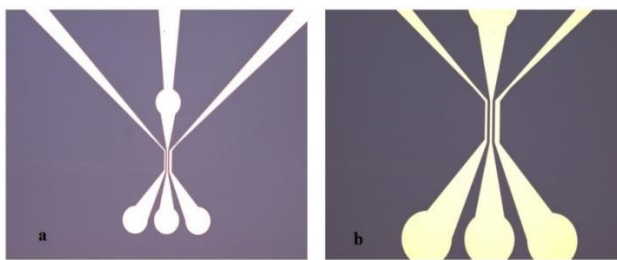


Fig. 7.22. Senzorul de măsurare a intrărilor examinat la microscopul Leica DM LM la dimensiune a) x5 și b) x10

### 7.2.6. Procesul de fotolitografie pentru a doua mască

Depunerea fotorezistului pentru a doua mască s-a realizat folosind aceleași două tipuri de fotoreziști pozitivi LOR 10B și HPR 504, utilizând aceleași echipamente folosite la realizarea primei măști. Singura diferență este aceea că se folosește o altă mască (M2) [M16].

### 7.2.7. Depunerea stratului de argint

A fost depus un strat de argint, gros de 100 nm, pe întreaga suprafață a plachetei, folosind același echipament utilizat pentru depunerea aurului, echipamentul Neva-EVD 500A. Depunerea stratului de argint se realizează pentru a funcționaliza electrodul de referință (RE). Doar acest electrod va rămâne acoperit cu argint după realizarea lift-off-ului [M16].

### 7.2.8. Îndepărtarea fotorezistului prin lift-off pentru a doua mască

Definirea electrozilor de referință (RE) s-a realizat prin lift-off. Soluția folosită pentru lift-off a fost acetona. Plachetele au fost lăsate să se înmoaie în acetona aproximativ o zi întreagă, pentru ca fotorezistul să se desprindă împreună cu metalul nedorit de pe suprafața lor. După realizarea lift-off-ului, argintul trebuie să rămână depus pe un singur electrod [M16]. În Fig. 7.24, sunt prezentate câteva faze din cadrul procesului de îndepărtare a argintului.

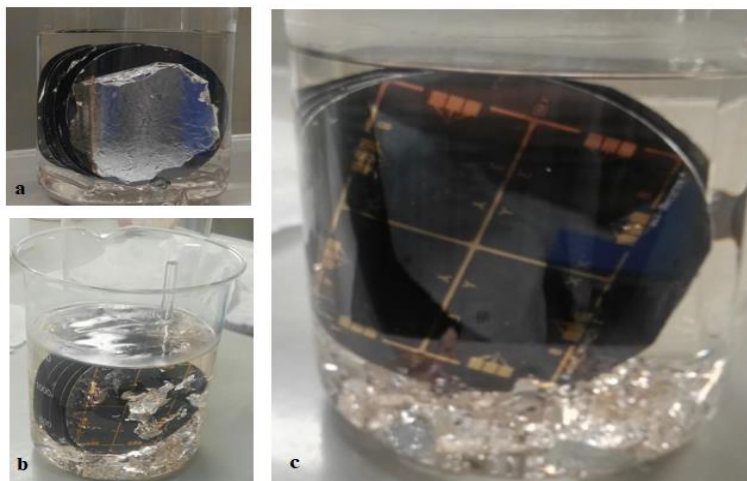


Fig. 7.24. Îndepărtarea prin lift-off a argintului. a) desprinderea argintului începe din margini; b) desprinderea centrală a argintului; c) deprinderea totală a argintului

Inspecția intermediară a constat în verificarea depunerilor cu ajutorul microscopului optic Leica DM LM. Aceasta s-a făcut individual, pentru fiecare plachetă. Fiecare plachetă cuprinde câte patru dispozitive, În urma inspecției intermediare, s-a constat faptul că 11 dispozitive din 20 sunt conforme. În cazul în care unul dintre senzori a fost conform, iar cel de-al doilea neconform, atunci dispozitivul nu va fi folosit deoarece acesta nu este funcțional fără unul dintre senzori. Doar în cazul în care ambii senzori sunt conformi, dispozitivul poate fi folosit. Au mai existat cazuri în care a fost desprinsă o bucată din argint din zone care nu sunt de interes, astfel încât senzorul era funcțional. Selectarea senzorilor funcționali este prezentată în Tabelul 7.9.

Tabelul 7.9. Sensorii electrochimici conformi/neconformi ai celor cinci plachete

	Placheta 1		Placheta 2		Placheta 3		Placheta 4		Placheta 5	
	Senzor intrare	Senzor ieșire	Senzor intrare	Senzor ieșire	Senzor intrare	Senzor ieșire	Senzor intrare	Senzor ieșire	Senzor intrare	Senzor ieșire
Dispozitiv 1:	DA	DA	NU	NU	DA	DA	DA	DA	NU	DA
Dispozitiv 2:	DA	DA	NU	NU	DA	NU	NU	DA	DA	DA
Dispozitiv 3:	NU	DA	NU	NU	DA	NU	DA	DA	DA	DA
Dispozitiv 4:	DA	DA	NU	NU	DA	DA	DA	DA	DA	DA
<b>Dispozitive funcționale</b>	3		0		2		3		3	
<b>Total dispozitive funcționale</b>	11/20 dispozitive conforme									

Simbolizare:

DA – senzor conform;

NU – senzor neconform.

Dispozitivele conforme au în dreptul lor răspunsul „DA”.

Dispozitivele neconforme au în dreptul lor răspunsul „NU”.

Neconformitățile pot avea diverse cauze: contaminarea plachetei; umiditatea ridicată din camera echipamentului; zona de depunere a electrodului are dimensiuni prea mici. În privința eliminării acestor cauze, s-au schimbat dimensiunile electrozilor de referință și s-au efectuat depunerile la un nivel controlat de umiditate din cameră.

#### • Clorurarea argintului

După depunerea argintului, s-a realizat o etapă intermediară a procesului tehnologic, de clorurare, care a avut rolul de a minimiza rezistența de contact a electrodului. Clorurarea argintului este o etapă necesară pentru crearea unui electrod stabil. Argintul poate fi clorurat electrochimic în soluție de clor. Soluția de KCl (clorură de potasiu) este larg utilizată. O metodă alternativă este clorurarea neelectrică cu FeCl<sub>3</sub>.

#### 7.2.9. Procesul de fotolitografie pentru a treia mască

Cea de-a treia mască a fost folosită pentru realizarea părții de microfluidică: microcanalele și pilonii aflați în camera de selecție și captură. Acestea se vor realiza din SU-8-2050 [M23]. Fotorezistul SU-8 se depune parcurgând etapele prezentate în Fig. 7.26 [M23], [P7].

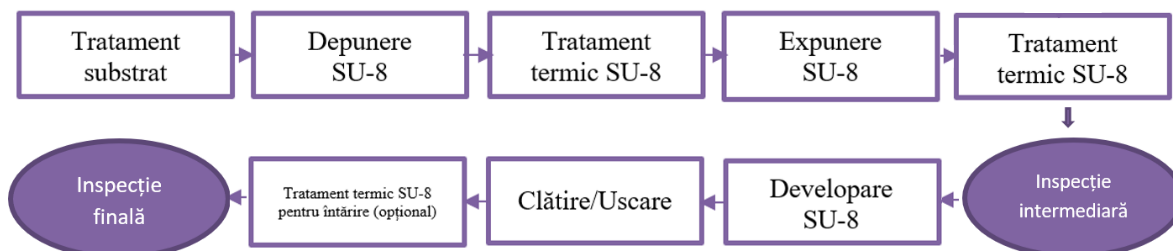


Fig. 7.26. Etapele procesului tehnologic de modelare a circuitelor microfluidice folosind fotorezistul SU-8

După procesul anterior de lift-off al argintului, plachetele s-au deshidratat în etuvă la 100 °C timp de aproximativ 30 de minute - 1 oră. Apoi, pe rând, fiecare plachetă a fost fixată pe spinner-ul Suss MicroTec [\*9] pentru etalarea fotorezistului negativ SU-8 pe întreaga suprafață a acesteia. S-a ales fabricarea din SU-8 a microcanalelor și a pilonilor din camera de

selecție și captură, deoarece acesta prezintă o rezistență chimică excelentă, transparență înaltă, este biocompatibil și prezintă o aderență puternică. S-a depus o grosime a fotorezistului SU-8 de 50 μm, pentru a putea fabrica canalele și pilonii din camera de selecție și captură. Pentru obținerea acestei dimensiuni a fost reglată turația spinner-ului la valoarea de 4000 rotații/min.

După depunerea fotorezistului SU-8, plachetele au fost așezate pe plită pentru tratament termic la temperatura de 65 °C timp de 3 min și 6 minute la temperatura de 45 °C [M16].

În următoarea etapă tehnologică, s-a realizat alinierea și expunerea celei de-a treia măști (M3) la echipamentul MA6/BA 6 (Suss MicroTec).

Apoi, s-a realizat un tratament termic pe plită pentru întărirea fotorezistului (2 min la 65 °C / 7 min la 45 °C). După tratamentul termic, s-a realizat developarea, în soluție de acetonă și HPRD 402 care a durat 1 min 30 s ± 10 s. După ce a avut loc developarea, urmată de uscarea plachetelor, s-a realizat o inspecție intermediară.

Inspecția intermediară s-a realizat cu microscopul optic Leica DM LM [\*9], [\*29]. În urma inspecției, s-a constatat faptul că fotorezistul SU-8 nu a avut aderență la una dintre plachete (placheta numărul 3). În Fig. 7.29 este redată o imagine ce conține neconformități. S-a decis să se continue procesul cu un lot de trei plachete care au fost conforme. Pentru a patra plachetă a fost necesară înlăturarea fotorezistului SU-8 și reluarea procesului.

Durificarea prin tratament termic a fotorezistului la un nivel ridicat joacă un rol important. În primul rând, dacă există defecte de depunere care sunt generate în stratul de siliciu, acestea vor fi umplute cu fotorezist. Mai mult, prin acest tratament termic de durificare a stratului, aderența fotorezistului la siliciu crește [A11]. S-a verificat atât microcanalul din dreptul senzorilor, cât și pilonii din camera de selecție și captură. În Tabelul 7.10 sunt prezentate imagini ale microcanalului, realizate cu microscopul optic Leica DM LM (Leica Microsystems, Germania) [\*9], [\*29], (Fig. 7.33) la scări de mărire de x5 și x10.

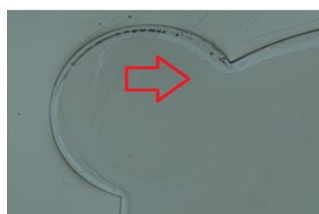


Fig. 7.29. Imagine realizată la mărirea x5 a rezervorului de intrare a soluțiilor neconform

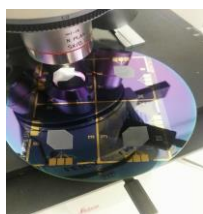
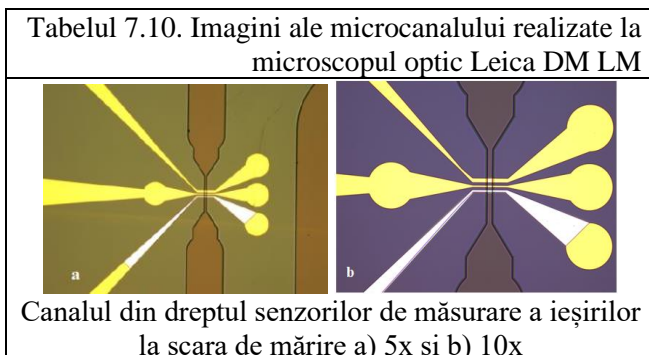


Fig. 7.33. Inspecția finală după realizarea celor trei măști



Înainte de depunerea de PDMS, s-a realizat tăierea în structuri a plachetelor, pentru a putea separa dispozitivele microfluidice. Fiecare plachetă se taie individual. Pentru a putea fi tăiată, placheta se fixează cu ajutorul unui suport, unde va fi lipită exact în centrul acestuia. Operația de tăiere se realizează cu ajutorul echipamentului DAD322 - Disco Automatic Dicing Saw [\*17]. După ce placheta a fost fixată pe suport (Fig. 7.35.a), acesta a fost introdus în echipamentul DAD 322 (Fig. 7.35.b.).

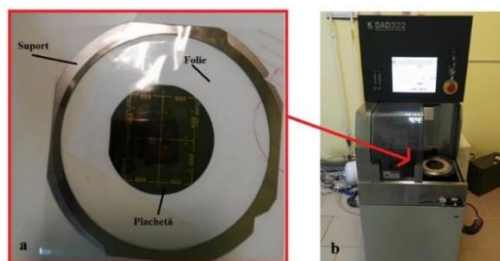


Fig. 7.35. a) fixarea plachetei în suport și b) introducerea suportului în echipamentul DAD 322

Ultima etapă înainte de desprinderea dispozitivelor tăiate de pe folia-suport, a fost expunerea la UV. Folia-suport a plachetei a fost introdusă în cuptorul cu radiații ultraviolete model CL-1000 Ultraviolet Crosslinker, produs de către UVP, LLC - SUA [\*17].

### 7.2.10. Depunerea capacului de polidimetilsiloxan

Dispozitivul a fost încapsulat cu un strat de polidimetilsiloxan (PDMS), fără a se acoperi contactele electrice. Concentrația folosită pentru amestecul PDMS diferă în funcție de grosimea dorită a stratului. Pentru un strat subțire de PDMS (1-2 mm) s-au amestecat 0,7ml substanță Silicone Elastomer Curing Agent și 7ml Silicone Elastomer – Base. Pentru o grosime mai mare ( $\approx 5\text{mm}$ ), s-au amestecat concentrații de 20 ml - 2 ml soluție.

Silanizarea matriței se realizează pentru a preveni lipirea PDMS-ului de matriță. Agentul de demulare (soluția) se depune sub formă de vapori. Silanizarea are loc în incintă închisă, substanța s-a pus în aceeași cutie în care se ține și placheta de siliciu, folosită ca suport pentru turnarea PDMS-ului. Cutia a fost lăsată aproximativ o oră la temperatura camerei (Fig. 7.41). La finalul acestei ore, s-a turnat PDMS-ul în dispozitivul special, peste placheta de siliciu folosită ca suport (Fig. 7.42). Astfel, stratul de PDMS obținut a fost uniform (Fig. 7.43). Pentru funcționalizarea suprafeței, a fost necesar un tratament cu plasmă pentru a atașa capacul de PDMS dispozitivului microfluidic. Echipamentul cu plasmă folosit este unul de tip „Reactive Ion Etching – RIE”, denumit Plasma Etcher – Etchlab 200 de la Sentech (Fig. 7.45).

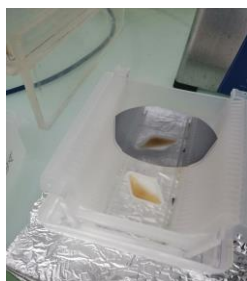


Fig. 7.41. Procesul de silanizare



Fig. 7.42. Turnarea PDMS-ului în suport



Fig. 7.43. Obținerea stratului uniform de PDMS



Fig. 7.45. Atașarea capacului de PDMS

S-a efectuat o inspecție a pilonilor din camera de captură și selecție cu ajutorul unui microscop cu scanare electronică, Nova NanoSEM 630, fabricat de FEI Company, SUA, din dotarea IMT București (Fig. 7.46) [\*17]. Pentru captarea acestor imagini, s-a utilizat un dispozitiv secționat (Fig. 7.47). Dispozitivul ales a fost unul dintre cele a căror depunere de argint a fost neconformă. Acesta a fost un dispozitiv cărui nu i s-a atașat capac de PDMS. În Fig. 7.49 - 7.50 sunt redată două imagini la diferite dimensiuni de referință ( $200\ \mu\text{m}$  și  $50\ \mu\text{m}$ ) ale pilonilor din camera de selecție și captură.

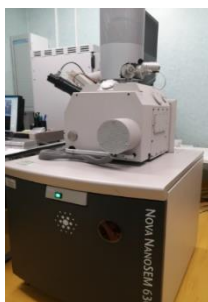


Fig. 7.46. Nova NanoSEM 630

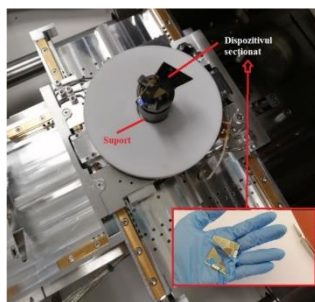


Fig. 7.47. Poziționarea pe suport a probei

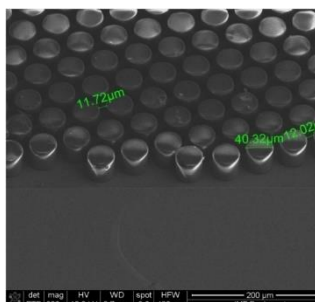


Fig. 7.49. Imagine SEM obținută la dimensiunea de referință  $200\ \mu\text{m}$

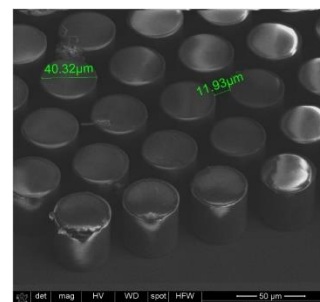


Fig. 7.50. Imagine SEM obținută la dimensiunea de referință  $50\ \mu\text{m}$

Din imaginile SEM a rezultat faptul că pilonii realizați din fotorezist au fost conformi din punct de vedere dimensional și al dispunerii în camera de selecție și captură (poziției reciproce).

## CAPITOLUL 8. TESTAREA DISPOZITIVULUI, MODEL EXPERIMENTAL

### 8.1. Metodologia de testare

A fost elaborată o metodologie de testare a unui dispozitiv microfluidic, încadrată în procesul holistic de fabricație a acestuia – proiectare, modelare, simulare, execuție, testare, livrare. Schema generală a etapelor ce trebuie monitorizate este prezentată în Fig. 8.1.

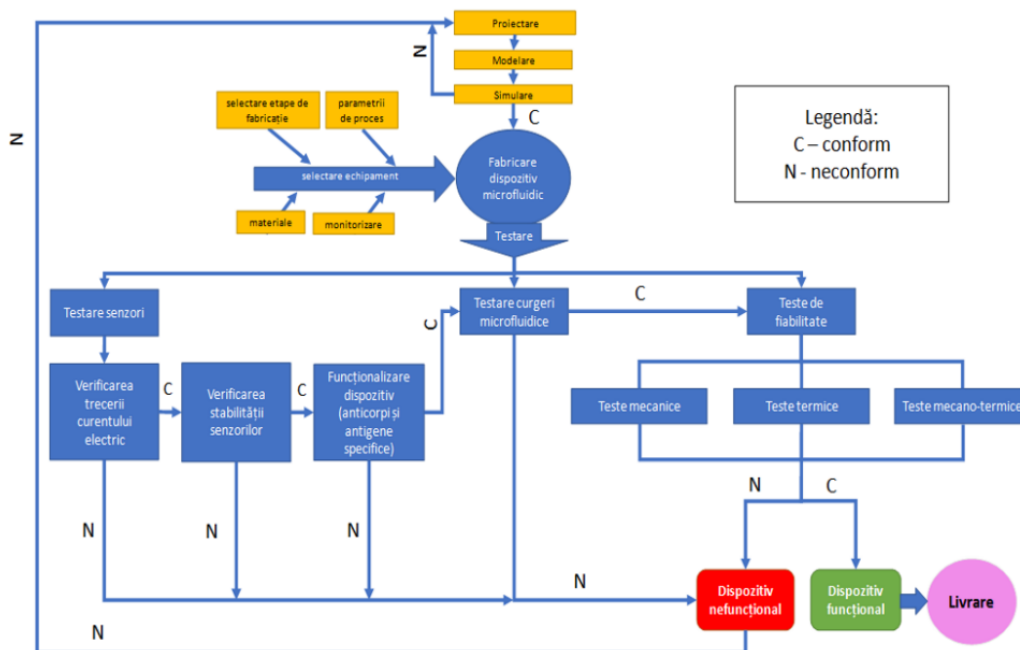


Fig. 8.1. Etapele metodologiei de testare a unui dispozitiv microfluidic

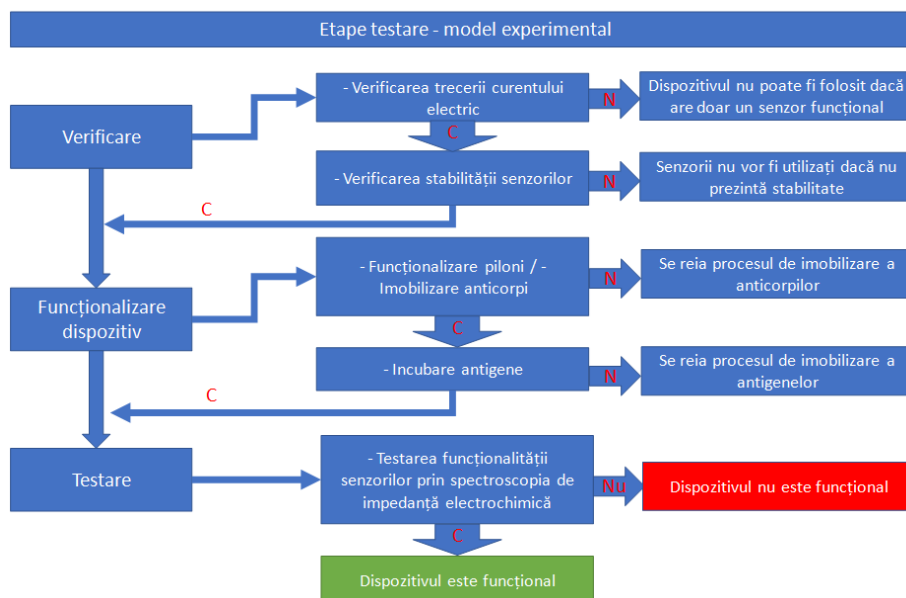
Pentru realizarea unui dispozitiv microfluidic trebuie parcurse etapele clasice de proiectare-modelare-simulare. Rezultatele modelării și simulării urmează să fie validate prin rezultatele obținute la testarea efectuată post-fabricare.

Pentru fabricare vor fi utilizate echipamente specifice, pentru care se selectează etapele de fabricație, parametrii de lucru și materialele folosite. Procesele de fabricare includ etape de inspecția calității, realizate prin testarea parametrilor funcționali.

Testările au loc în etape succesive: (1) testarea senzorilor (pentru a verifica dacă aceștia sunt conducători de electricitate); (2) testarea stabilității în funcționare a senzorilor (în caz de instabilitate, la fiecare testare, senzorii vor da rezultate diferite); (3) teste de funcționalizare a dispozitivului, prin legarea anticorpilor și incubarea antigenelor, pentru captura celulelor care fac obiectul dispozitivului lab-on-a-chip. Doar dacă toate cele trei etape conduc la rezultate conforme, se trece la etapele următoare: (4) testarea curgerilor microfluidice (se vor realiza teste pentru a verifica construcția microcanalelor, care asigură curgerea fluidelor). Dacă aceste testări au rezultate conforme, se trece la testarea finală: (5) testarea fiabilității dispozitivului în condiții de operare apropiate de cele întâlnite într-un mediu real. Fără aceste teste de fiabilitate, nici un dispozitiv nu poate fi livrat (lansat pe piață).

În Fig. 8.1, dacă rezultatele sunt conforme, sunt notate cu „C”, iar rezultatele neconforme cu „N”. Dacă rezultatul unei etape este „N”, dispozitivul nu este funcțional și se revine la etapele anterioare ale procesului holistic de fabricație.

Pentru a testa dispozitivul fabricat și pentru a-i demonstra funcționalitatea, au fost parcurse mai multe etape. Aceste teste au fost efectuate în cadrul IMT înainte de a lipi pe dispozitiv, capacul de PDMS. Schema logică a etapelor de testare pentru dispozitivul micro-electro-mecanic, model experimental, este prezentată în Fig. 8.2.



Legendă: C – conform; N – neconform

Fig. 8.2. Etape de testare a dispozitivului micro-electro-mecanic, model experimental

Într-o primă fază, are loc etapa de „Verificare”, în cadrul căreia au fost selectate dispozitivele lab-on-a-chip cu senzori funcționali care au permis trecerea curentului. Se mai precizează faptul că dispozitivul nu poate fi folosit dacă are doar un singur senzor funcțional.

Apoi, a fost verificată stabilitatea senzorilor electrochimici. În situația în care senzorii nu prezintă stabilitate – dau rezultate diferite pentru fiecare testare - ei nu pot fi utilizați, fiind notați cu „N”.

Dacă răspunsurile au fost conforme (notate cu „C”) se poate trece la etapele următoare, de funcționalizare a dispozitivului. S-au atașat anticorpii și ulterior s-au incubat diferite concentrații de antigene CD3+, CD4+, CD8+ [M27]. Dacă incubarea sau imobilizarea nu s-au realizat, se reia procesul, până se obține un răspuns favorabil.

În continuare, se va testa funcționalitatea senzorilor, iar dacă aceste etape au fost efectuate corespunzător, răspunsurile vor fi date de Diagramele Nyquist. Acestea prezintă variația impedanței imaginare (reactanța capacitivă) în funcție de variația impedanței reale (rezistența electrică). Dacă în urma testărilor, au fost obținute răspunsuri neconforme („N”), dispozitivul nu este funcțional.

### 8.3. Spectroscopia de impedanță electrochimică

Soluția redox folosită pentru cele trei tipuri de celule a fost aceeași: **5mM Fe (CN)<sub>6</sub><sup>4-</sup> și 5mM de Fe (CN)<sub>6</sub><sup>3-</sup>** (ferocianură și fericianură). Totodată, s-a folosit și o **soluție tampon fosfat salin (PBS), pH = 7,1, domeniu de frecvențe: 100 kHz- 0,1 Hz**. Din curbele suprapuse redată în Fig. 8.5, se constată faptul că senzorul prezintă stabilitate, prin faptul că mai multe cicluri măsurate se suprapun perfect.

S-a introdus proteina G (BSA), s-a lăsat la incubat 30 min și apoi s-au clătit cipurile făcând câte două spălări în soluția de tampon fosfat.

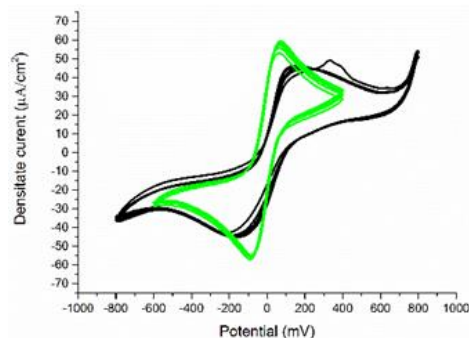


Fig. 8.5. Curbe de voltametrie ciclică

Următoarea etapă a constat în **imobilizarea anticorpilor specifici pentru fiecare subpopulație**. S-au folosit **40  $\mu\text{L}$  anti-CD4** (anti-CD4, anti-CD8 și anti-CD3) concentrație 5  $\mu\text{g/ml}$  care se incubează 18h la 4  $^{\circ}\text{C}$ . În etapa următoare, după adăugarea concentrațiilor de anticorpi, au fost introduse în soluția tampon fosfat (PBS = 7,1) antigenele (CD3+, CD4+ și CD8+) de diferite concentrații cunoscute. Scopul analizei datelor prin EIS este determinarea naturii proceselor de electrod și parametrii lor caracteristici. Pentru CD4+ s-au utilizat concentrații între 0 - 800 ng/ml prezentate în diagrama Nyquist (Fig. 8.6).

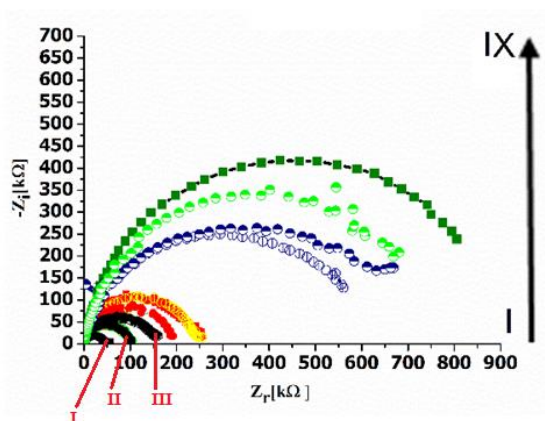


Fig. 8.6. Diagramele Nyquist ( $-Z_i$  vs  $Z_r$ ) după adăugarea de concentrații de CD4+ cunoscute (introduse în soluție tampon fosfat, pH=7,1) [M16]

unde concentrațiile de antigene adăugate sunt:

- I. negru - tampon fosfat salin simplu (0 ng/ml);
- II. negru - 12,5 ng/ml;
- III. negru - 25 ng/ml;
- IV. roșu - 50 ng/ml;
- V. portocaliu - 100 ng/ml;
- VI. albastru deschis - 200 ng/ml;
- VII. albastru închis - 300 ng/ml;
- VIII. vernil - 400 ng/ml;
- IX. verde - 800 ng/ml.

Pentru CD3+ s-au utilizat concentrații între 0 - 100 ng/ml prezentate în diagrama Nyquist (Fig. 8.7). Se poate observa faptul că parabolele au crescut odată cu creșterea concentrațiilor, unde concentrațiile de antigene adăugate sunt:

- I. roșu tampon fosfat salin simplu (0 ng/mL);
- II. . verde - 0,3 ng/ml;
- III. roz - 0,75 ng/ml;
- IV. negru - 1,87 ng/ml;
- V. vernil - 6,25ng/ml;
- VI. maro - 25 ng/ml;
- VII. bleu - 50 ng/ml;
- VIII. gri - 100ng/ml

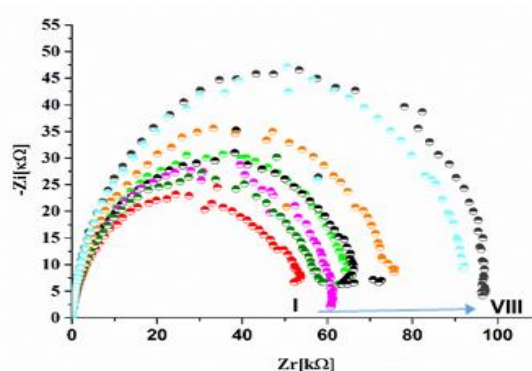


Fig. 8.7. Diagramele Nyquist ( $-Z_i$  vs  $Z_r$ ) după adăugarea de concentrații de CD3+ cunoscute (introduse în soluție tampon fosfat, pH=7,1) [M16]

Toți senzorii s-au comportat similar, valorile medii pentru CD4+ și CD3+  $R_{ct}$  fiind de  $50,16 \pm 5$  k $\Omega$  iar valorile  $R_{ct}$  înregistrate pentru CD8+ fiind de  $10,40$  k $\Omega \pm 0,10$  k $\Omega$ . Aceste valori medii au fost stabilite prin măsurarea a zece electrozi și folosind aceeași procedură. Coeficientul de variație între măsurători a fost mai mic de 15 %. Din diagramele Nyquist, se preiau rezistențele de transfer de sarcină (raza fiecărui semicerc) pentru fiecare concentrație, iar din valoarea reactanței capacitive, se determină capacitatea stratului dublu electric ( $C_{dl}$ ).

Electrozii funcționalizați pentru detecția antigenilor CD8+ au putut decela diferențe de concentrații la nivel de picograme pe mililitru, așa cum se observă în Fig. 8.8.

Pentru subpopulația CD8+, senzorii s-au comportat diferit față de CD3+ și CD4+, în sensul că media rezistenței de transfer a electronilor la interfața electrod-electrolit a fost mai

mică. Acest lucru poate avea loc datorită porozității mai mari a antigenului, pori care permit pătrunderea mai ușoară a ionilor redox.

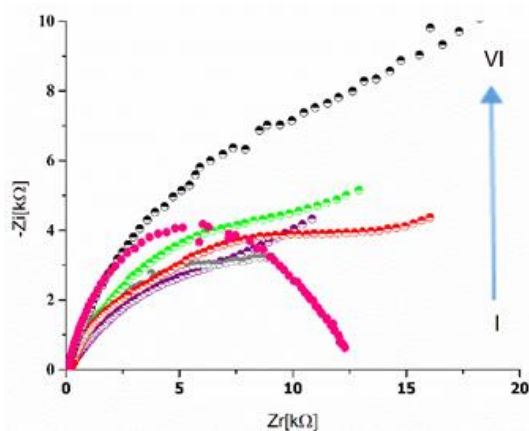


Fig. 8.8. Diagrame Nyquist (-Zi vs Zr) după adăugarea de concentrații cunoscute de CD8+ (introduse în soluție tampon fosfat, pH=7,1) [M16]

unde concentrațiile de antigene adăugate sunt:

- I. mov - 0 ng/ml;
- II. gri - 31,25 pg/ml;
- III. roșu - 62,5 pg/ml;
- IV. vernil - 125 pg/ml;
- V. roz - 250 pg/ml;
- VI. gri - 1000 pg/ml.

Se observă din Figura 8.6 că la concentrații mai mari (1 ng/mL) apar și alte efecte la interfața cu electrodul, și anume difuzii ale speciilor ionice, dar senzorul răspunde la concentrații mici de antigene adăugate (de ordinul pg/mL). Din Figurile 8.6 - 8.8 se observă creșterea rezistenței de transfer de sarcină și scăderea capacității stratului dublu electric cu concentrația antigenelor. Curbele de calibrare (Fig. 8.9 - 8.11) au fost construite pe baza semnalului electrochimic normalizat obținut din diagramele Nyquist și răspunsurile date de  $R_{ct}$  - rezistența de transfer electronic la interfață date de software-ul potențiostatului. În curbele de calibrare s-a notat cu  $R_{ct0}$  rezistența transferului de sarcină pentru electrolit, iar cu  $R_{cti}$  rezistența transferului de sarcină corespunzătoare fiecărei concentrații. Pe axa orizontală a graficelor au fost puse concentrațiile antigenelor, iar pe axa verticală raportul  $R_{cti}/R_{ct0}$ . Rezistența transferului de sarcină se mărește proporțional cu creșterea numărului celulelor (concentrația). În funcție de mărimea rezistenței la transferul de sarcină la o anumită concentrație a unui tip de celule, se determină numărul acestora.

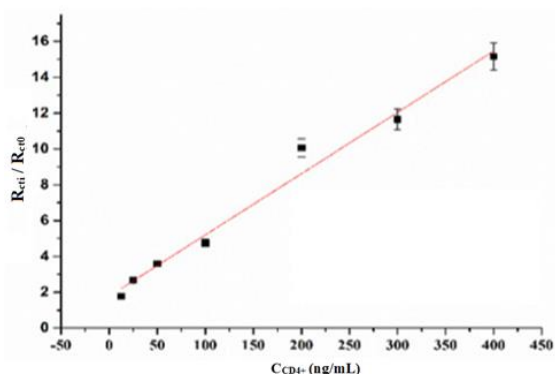


Fig. 8.9. Curba de calibrare rezistivă normalizată ( $R_{cti}/R_{ct0}$ ) în funcție de concentrația CD4+: Model linear cu concentrațiile adăugate, intervalul concentrațiilor fiind între 0 ng / mL - 400 ng / mL,  $R^2 = 0,979$  [M18], [S13]

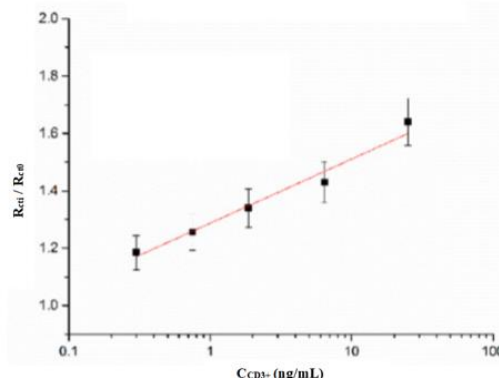


Fig. 8.10. Curba de calibrare rezistivă normalizată ( $R_{cti}/R_{ct0}$ ) în funcție de concentrația CD3+: Model linear cu concentrațiile adăugate, intervalul concentrațiilor fiind între 0 ng / mL - 25 ng / mL,  $R^2 = 0,966$



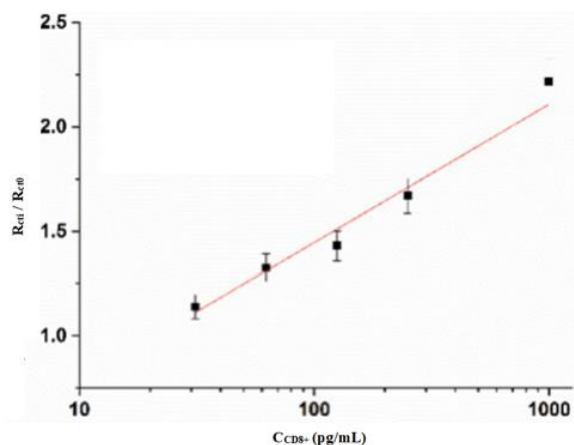


Fig. 8.11. Curba de calibrare rezistivă normalizată ( $R_{cti} / R_{ct0}$ ) în funcție de concentrația CD8+: Model linear cu concentrațiile adăugate, intervalul concentrațiilor fiind între 0 ng / mL - 1000 pg / mL,  $R^2 = 0,958$

Rezistența la transfer electronic este direct proporțională cu logaritmul concentrației adăugate. Răspunsul dat de electrod cu soluția tampon fără introducerea antigenelor a fost considerat zgomotul ( $R_{ct0}$ ) în timp ce răspunsul dat de standarde ( $R_{cti}$ ) este semnalul înregistrat pentru fiecare concentrație.

Raportul  $R_{cti} / R_{ct0}$  a fost calculat și reprezentat prin logaritmul fiecărei concentrații de antigen. Cu alte cuvinte, fiecărui raport  $R_{cti} / R_{ct0}$  îi corespunde o anumită concentrație, iar fiecărei concentrații îi corespunde un anumit număr de celule, deci prin extrapolare, fiecărui raport  $R_{cti}/R_{ct0}$  îi corespunde un anumit număr de celule.

În condiții optime, prin această metodă, s-a obținut o curbă de regresie liniară (Fig. 8.9) cu un coeficient de corelație ( $R^2$ ) de 0,979 când intervalul de concentrație este cuprins între 0 și 800 ng/mL pentru CD4+.

S-a obținut o regresie liniară cu logaritmul fiecărei concentrații CD3+ adăugat, cu un coeficient de corelație de 0,966 (Fig. 8.10).

În cazul detecției de CD8+, concentrațiile de anticorpi au fost exprimate în pg/mL, deci diferența de la o concentrație la alta este foarte mică în comparație cu celelalte două antigene unde domeniile de concentrații au fost de ordinul nanogramelor.

## CAPITOLUL 9. FABRICAREA ȘI TESTAREA PROTOTIPULUI ÎMBUNĂTĂȚIT AL DISPOZITIVULUI MICRO-ELECTRO-MECANIC

### 9.1. Probleme apărute la fabricarea dispozitivului micro-electro-mecanic, model experimental

În urma etapelor de inspecție intermediară și finală a procesului tehnologic de fabricație a dispozitivului micro-electro-mecanic, model experimental, s-au identificat acele etape critice (deficitare) ale procesului tehnologic. Astfel, s-a constatat că:

- nu s-a realizat o adeziune bună a argintului la substratul de aur;
- nu s-a realizat o adeziune bună a fotorezistului SU-8 la substratul de siliciu.

Pentru eliminarea etapelor critice constatate, ceea ce reprezintă un grad ridicat de importanță, s-a îmbunătățit procesul tehnologic în etapa următoare a procesului de cercetare-dezvoltare.

### 9.2. Îmbunătățiri ale procesului de fabricație a dispozitivului micro-electro-mecanic

În urma testelor și verificărilor efectuate au fost stabilite etapele de îmbunătățire a procesului de fabricație a dispozitivului micro-electro-mecanic-prototip. Astfel, s-au realizat optimizări ale etapei tehnologice de depunere a argintului și de depunere a fotorezistului SU-8.

### 9.2.1. Îmbunătățiri ale depunerii argintului

Pentru a elimina problemele întâmpinate în cadrul execuției dispozitivului, s-au înlocuit senzorii electrochimici cu senzori care conțin electrozi de lucru interdigitați.

S-a modificat suprafața de depunere, înlocuind suprafața cu dimensiune de 10 nm cu o suprafață mai mare, de 200 nm, ceea ce a permis remedierea problemei aderenței argintului. La inspecțiile intermediare ulterioare din procesul de fabricație a prototipului, s-a constatat că argintul nu s-a mai desprins de pe suprafața electrodului de referință. A fost ales acest tip de senzori, pentru că prezintă avantajul unei sensibilități mărite.

### 9.2.2. Îmbunătățiri necesare pentru creșterea aderenței fotorezistului SU-8

În ceea ce privește aderența fotorezistului SU-8, s-a îmbunătățit procesul de tratament termic. În Tabelul 9.1 este redată comparația între etapele tratamentului termic pentru fotorezistul SU-8 efectuate anterior și cele îmbunătățite.

Tabelul 9.1. Etapele de etalare, expunere și tratamente termice la depunerea SU-8 și îmbunătățirea acestora

	Tratament realizat	Tratament îmbunătățit
<b>Étalare:</b>	4000 rot/min	3000 rot/min
<b>Tratament termic realizat după etapa de etalare:</b>	3 min - 65 °C 6 min - 45 °C	3 min - 65 °C 6 min - 95 °C
<b>Aliniere / Expunere (12 s)</b>		
<b>Tratament termic realizat după etapa de expunere:</b>	2 min - 65 °C 7 min - 45 °C	2 min - 65 °C 7 min - 95 °C
<b>Developare:</b>	1 min 30 s ± 10 s	3 min
<b>Tratament termic final:</b>	30 min - 180 °C	30 min - 250 °C

### 9.3. Realizarea prototipului îmbunătățit al dispozitivului micro-electro-mecanic

Pentru noul dispozitiv, prototip îmbunătățit, au fost folosite patru măști, după cum urmează:

- Prima mască (M1) – realizarea senzorilor din titan-aur;
- A doua mască (M2) – realizarea electrozilor de referință din argint;
- A treia mască (M3) – depunerea unui strat de oxid de pasivare;

Această mască nou introdusă în raport cu procesul tehnologic anterior, aferent modelului experimental, a avut scopul de a folosi stratul de oxid ca strat intermediar între brațele electrozilor de lucru realizați din aur și canalul microfluidic, deoarece a existat o zonă în care acestea s-au suprapus. Pentru a nu exista contact direct între cele două zone, s-a depus acest strat.

- A patra mască (M4) – realizarea părții microfluidice cu ajutorul fotorezistului SU-8.

În Fig. 9.1 sunt prezentate etapele fluxului tehnologic pentru noul dispozitiv, unde: 1 reprezintă alegerea substratului de siliciu; 2 - etapa de depunere a oxidului de siliciu; 3 - depunerea fotorezistului prin utilizarea primei măști; 4 - depunerea stratului de Ti-Au; 5 - procesul de lift-off; 6 - depunerea fotorezistului prin utilizarea celei de a doua măști; 7 - depunerea stratului de Ag; 8 - procesul de lift-off; 9 - depunerea stratului de oxid prin utilizarea celei de a treia măști; 10 - corodarea oxidului; 11 - depunerea fotorezistului SU-8 prin utilizarea celei de a patra măști; 12 - depunerea capacului de PDMS.

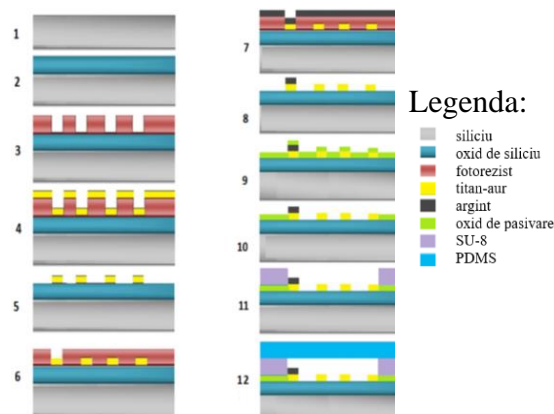


Fig. 9.1. Fluxul tehnologic [M17]

### 9.3.1. Proiectarea dispozitivului micro-electro-mecanic, prototip îmbunătățit

Proiectarea prototipului îmbunătățit s-a realizat în programul CleWin5. În comparație cu modelul experimental, pentru care au fost proiectate trei măști, pentru acest nou dispozitiv s-au proiectat patru măști.

#### Prima mască – realizarea senzorilor din Titan-Aur

Masca 1 (M1) acoperă cele patru dispozitive micro-electro-mecanice identice (Fig. 9.2). Această mască conține senzorii electrochimici: senzorii de măsurare a intrărilor și senzorii de măsurare a ieșirilor, materialul folosit pentru acești senzori fiind titan-aur. În Fig. 9.3. se prezintă imaginea mărită aferentă unui singur dispozitiv din cele patru

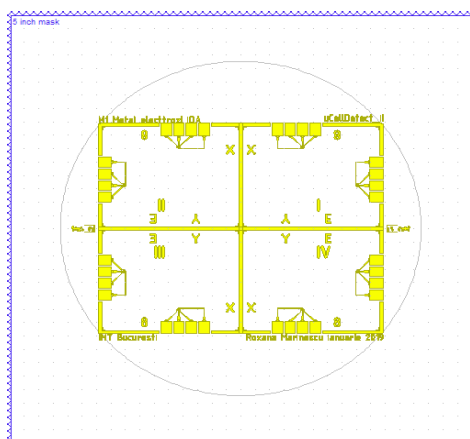


Fig. 9.2. Prima mască (M1) proiectată a dispozitivului micro-electro-mecanic

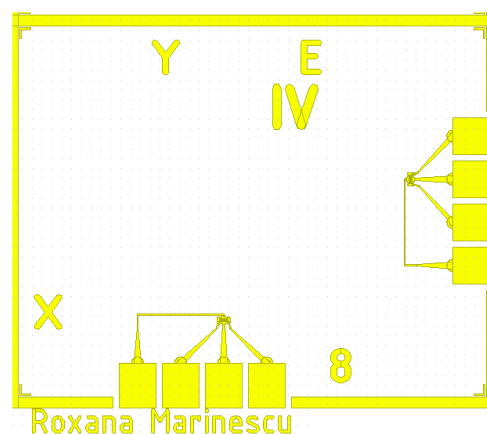


Fig. 9.3. Imaginea mărită proiectată a zonei unui dispozitiv de pe mască M1

Masca pe care au fost proiectați senzorii conține patru dispozitive, cu dimensiunile de  $31400 \mu\text{m} \times 39500 \mu\text{m}$ . Fiecare sensor are în componența sa patru pad-uri (suport), de dimensiuni  $3000 \mu\text{m} \times 3700 \mu\text{m}$ , cu distanța egală între ele, de  $500 \mu\text{m}$ . Cu ajutorul acestor pad-uri se realizează conexiunea electrică.

Senzorii electrochimici se realizează folosind trei tipuri de electrozi, precum în cazul precedent, al modelului experimental. Aceștia sunt: electrodul de lucru (“working electrode”- WE), electrodul de referință (“reference electrode”- RE) și electrodul de numărare “counting electrode” - CE).

Electrodul de lucru a fost realizat din două perechi de electrozi metalici în formă de pieptene. Lățimea electrodului de referință a fost de  $200 \mu\text{m}$ , iar cea a electrodului de numărare de  $195 \mu\text{m}$ . Dimensiunile stabilite pentru electrozii de lucru au fost [M17]: Dimensiunea unui digit -  $20 \mu\text{m}$ ; Lungimea digiților -  $285 \mu\text{m}$ ; Distanța dintre digiți -  $5 \mu\text{m}$ ; Lățimea unui digit -  $10 \mu\text{m}$ . În Fig. 9.4, se poate observa imaginea mărită a senzorului electrochimic.

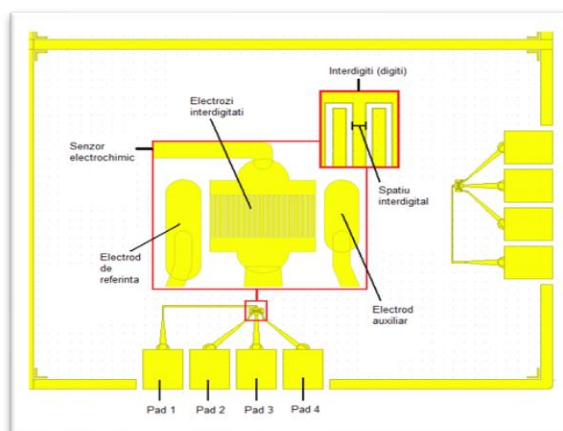


Fig. 9.4. Imaginea mărită proiectată a senzorilor de pe prima mască (M1)

### A doua mască proiectată pentru realizarea electrozilor de referință din argint

În Fig. 9.5 este prezentată o imagine a celei de-a doua măști, proiectată în CleWin5. Dat fiind faptul că la scară normală, electrodul de referință nu este vizibil, este redată o imagine mărită a electrozului în Fig. 9.6.

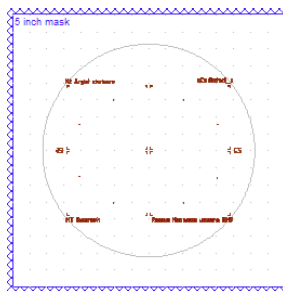


Fig. 9.5. A doua mască (M2) proiectată a dispozitivului micro-electro-mecanic

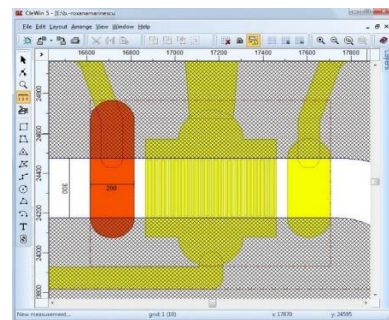


Fig. 9.6. Imaginea mărită proiectată a electrozului de referință

### A treia mască proiectată pentru depunerea unui strat de hidrogen silsesquioxane (hydrogen silsesquioxane -HSQ)

Această operație a constat în depunerea unui oxid pe toată suprafața plachetei, lăsând libere doar zonele de contact și porțiunea pe unde trece microcanalul peste senzor și electrozi.

În Fig. 9.7 se redă o imagine a celei de-a treia măști proiectate, unde se observă dispunerea celor patru dispozitive. În Fig. 9.8 se prezintă zona aferentă unui singur dispozitiv micro-electro-mecanic, la scară mărită.

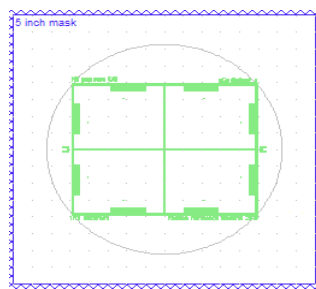


Fig. 9.7. A treia mască (M3) proiectată a dispozitivului micro-electro-mecanic

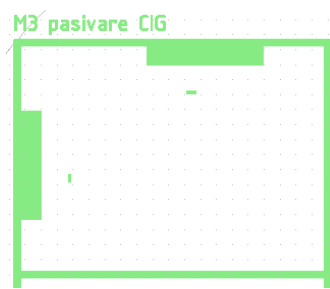


Fig. 9.8. Imaginea mărită proiectată a zonei unui dispozitiv de pe masca M3

### A patra mască proiectată pentru realizarea părții microfluidice cu ajutorul fotorezistului SU - 8

Masca (M4) a fost proiectată pentru realizarea microcanalelor de curgere, camerei de selecție și captură și a canalelor de numărare (Fig. 9.10).

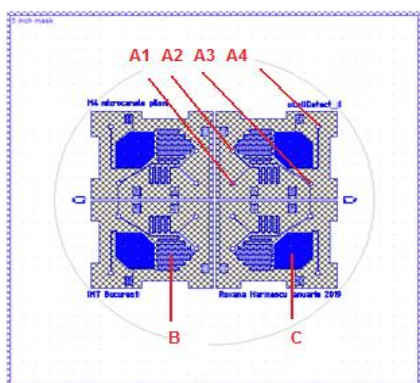


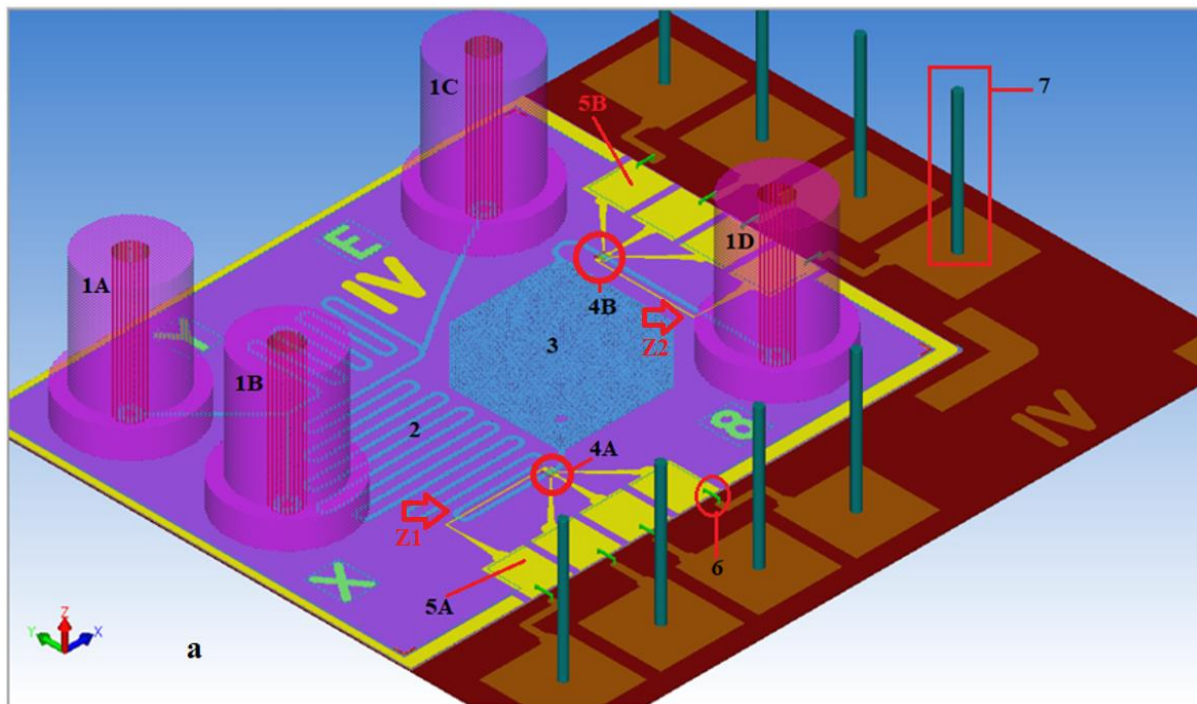
Fig. 9.10. A patra mască proiectată (M4) a dispozitivului micro-electro-mecanic

Masca cuprinde:

- A. Patru nanoporturi:
  - A.1. Pentru sânge;
  - A.2. Pentru soluția de lizare a eritrocitelor din sânge;
  - A.3. Pentru soluția de stopare a lizării;
  - A.4. Pentru stocarea celulelor rămase
- B. Microcanalele;
- C. Camera de selecție și captură.

### 9.3.2. Modelarea procesului de fabricație a dispozitivului micro-electro-mecanic, prototip îmbunătățit

Modelarea procesului de fabricație a prototipului îmbunătățit s-a realizat cu ajutorul programului SEMulator3D Manager.



unde:

1A reprezintă nanoportul pentru introducerea sângelui;

1B - nanoportul pentru introducerea soluției de lizare;

1C - nanoportul pentru introducerea soluției de stopare a lizării;

1D - nanoportul pentru colectarea resturilor celulelor/soluțiilor;

2 – microcanal;

3 - camera de selecție și captură;

4A - senzor de numărare a intrărilor;

4B - senzor de numărare a ieșirilor;

5(A, B) - paduri pentru conectarea electrică;

6 - fire de aur;

7 - suporturi pentru conexiuni electrice.

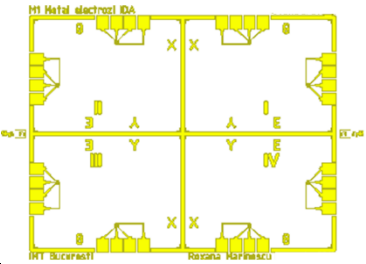

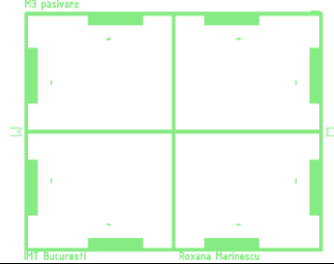



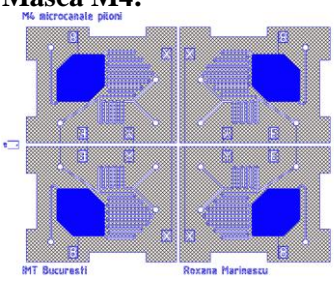

Z1, Z2 – zonele în care s-ar fi realizat contactul dintre electrod și microcanal, dacă nu se proiecta masca M3.

### 9.3.3. Procesul de fabricație a măștilor

Măștile au fost realizate cu ajutorul echipamentului DWL-66fs [\*9], [\*17]. Urmărind etapele fluxului tehnologic stabilit anterior, după obținerea măștilor, s-a abordat fabricarea efectivă a dispozitivului.

În Tabelul 9.3, sunt prezentate cele patru măști fotolitografice de 5 inch folosite în realizarea dispozitivului

Tabelul 9.3. Cele patru măști ale dispozitivului microfluidic, prototip îmbunătățit

Proiectare	Fabricare	Proiectare	Fabricare
<b>Masca M1:</b> 		<b>Masca M3:</b> 	
<b>Masca M2:</b> 		<b>Masca M4:</b> 	

### 9.3.4. Execuția dispozitivului micro-electro-mecanic, prototip îmbunătățit

Pentru fabricarea dispozitivului micro-electro-mecanic, prototip îmbunătățit, s-a folosit un lot de patru plachete realizate din siliciu cu orientare  $\langle 111 \rangle$  și cu dimensiunea de 4 inch, diametru de 100 mm și o rezistivitate de 1 ~ 10 ohm cm, ca substrat pentru fabricare (Etapa 1).

A urmat depunerea unui strat de dioxid de siliciu crescut termic (100 nm) într-un mediu uscat la 1000 °C în cuptorul Centrotherm E1200 HT (Germania) [\*17] (Etapa 2). Stratul de SiO<sub>2</sub> servește ca strat de izolație între siliciu de tip p și straturile metalice. Prima mască a fost utilizată pentru a defini electrozii senzilor pe fotorezistul negativ ma-N 1420 (Etapa 3). Acesta a fost depus cu ajutorul spinner-ului Suss MicroTec [\*17] (Fig. 9.20) la 3000 rpm. După depunerea fotorezistului, a avut loc un tratament termic de 2 minute în etuva Heraeus [\*9], [\*31] încălzită la 100 °C (Fig. 9.21). Tratamentele la temperaturi înalte îmbunătățesc aderența fotorezistului.

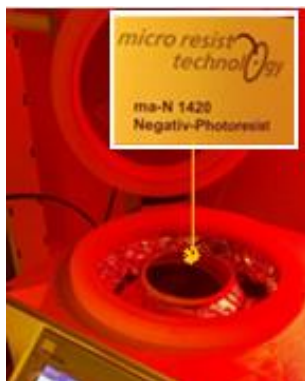


Fig. 9.20. Etalarea fotorezistului negativ ma-N 1420



Fig. 9.21. Tratament termic în etuvă Heraeus

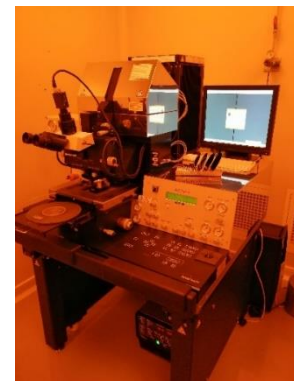


Fig. 9.22. Echipamentul de aliniere și expunere MA6 /BA6

Pentru toate procesele de fotolitografie, s-a utilizat același echipament de aliniere și expunere ca și în cazul precedent, și anume, echipamentul MA6/BA6 SUSS MicroTec [\*9], [\*17] (Fig. 9.22). Alinierea a fost făcută folosind semnele inscripționate pe măști (Fig. 9.23).

Expunerea a durat câteva secunde (Fig. 9.24). Ultima etapă a procesului de fotolitografie, a fost dată de dezvoltarea fotorezistului timp de 1 min și 5 s în dezvoltantul specific, ma-D 533/S (Fig. 9.25).



Fig. 9.23. Alinierea efectuată folosind semnele de aliniere



Fig. 9.24. Expunerea măștilor



Fig. 9.25. Dezvoltarea cu soluție ma-D

Fotorezistul care nu a fost acoperit de mască a fost expus la UV și apoi s-a îndepărtat, lăsând libere zonele unde a fost depus următorul material. După procesul de fotolitografie, a fost depus un strat subțire de Ti-Au (30 nm - 300 nm) pe toată suprafața plachetei. Depunerea metalică a fost făcută prin pulverizare, folosind echipamentul Neva-EVD 500A (Etapa 4) [\*9].

Materialul nedorit a fost îndepărtat prin procesul de lift-off (Etapa 5). În cazul acestui proces, plachetele au fost scufundate într-un recipient umplut cu acetone și cu substanță folosită pentru eliminare ("negative remover") (Fig. 9.26). Fotorezistul folosit ca material de sacrificiu a fost detașat și îndepărtat împreună cu materialul depus pe el (Fig. 9.27). Grosimea depunerii stratului metalic depinde întotdeauna de procesul ulterior de lift-off [M17].

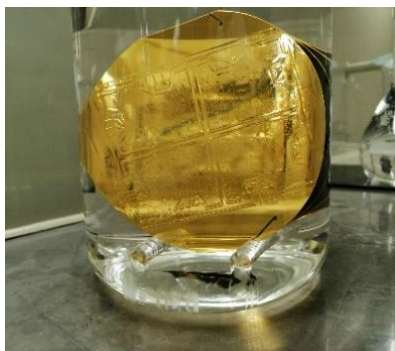


Fig. 9.26. Scufundarea plachetei în soluția pentru lift-off

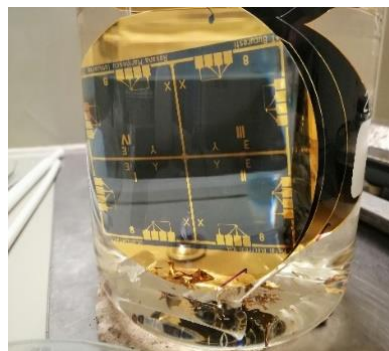


Fig. 9.27. Realizarea procesului de lift-off

După procesul de lift-off, a avut loc inspecția intermediară, realizată cu ajutorul microscopului optic Leica DM LM (Leica Microsystems, Germania) [\*9], [\*29]. **Toate dispozitivele prototip supuse inspecției intermediare s-au dovedit conforme.**

După ce s-a realizat depunerea stratului de Ti-Au, s-a depus un al doilea strat de fotorezist negativ (Etapa 6), pentru a imprima imaginea de pe cea de-a doua mască. Depunerea de 100 nm de argint s-a realizat prin evaporare cu fascicul de electroni, echipamentul folosit fiind Neva-EVD 500A [\*9] (Etapa 7). A urmat un alt proces de lift-off, astfel încât argintul a rămas depus doar pe electrodul de referință (Etapa 8) al senzorilor interdigitati.

Clorurarea Ag, având scopul stabiliza electrozii, s-a făcut folosind un oxidant puternic,  $\text{FeCl}_3$ . După depunerea Ag, fiecare plachetă a fost înmuiată în soluție apoasă 1% de clorură ferică timp de 20 minute.

După etapa de depunere, s-a realizat inspecția intermediară cu ajutorul microscopului optic Leica DM LM (Leica Microsystems, Germania) [\*9], [\*29]. În Fig. 9.33 sunt prezentate imagini ale inspecției intermediare, captate la mărire de x10 și x5.

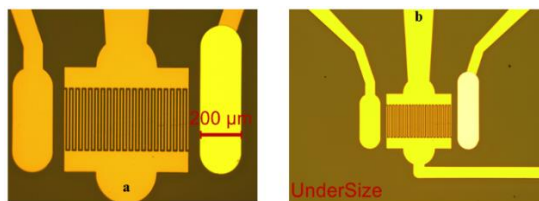


Fig. 9.33. Depunerea de Ag a) imagine la mărire x10 și b) mărire x5

A treia mască a fost utilizată pentru a acoperi întreaga suprafață cu un oxid de pasivare, denumit „hydrogen silsesquioxane” (HSQ) (Etapa 9), lăsând libere zonele din dreptul senzorilor și zona pad-urilor (pentru a putea realiza conexiunile viitoare) după ce are loc procesul de corodare (Etapa 10).

Pentru această mască, s-au depus 100 nm HSQ la 1000 rpm. S-a făcut un tratament termic de 2 min la 250 °C, după care s-a depus un strat de fotorezist pozitiv HPR 504 la 3000 rpm. În continuare, a fost făcut un alt tratament termic de 1 min la 100 °C. Apoi, a fost aliniată și expusă a treia mască (4,5 s). Fotorezistul s-a dezvoltat în dezvoltant HPRD, pe când HSQ s-a înlăturat folosind acid fluorhidric cu clorură de amoniu timp de 15 s.

După corodare, a avut loc inspecția intermediară, folosind microscopul optic Leica DM LM (Leica Microsystems, Germania) [\*9], [\*29]. În Fig. 9.35 sunt redată două imagini la mărire de x5, ale celor doi senzori: senzorul de intrare și cel de ieșire.

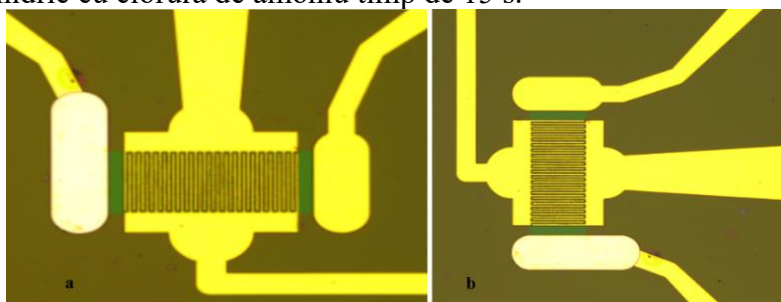


Fig. 9.35. Depunerea oxidului a) senzorul de intrare [M17], b) senzorul de ieșire

Cea de-a patra mască a fost folosită pentru a fabrica partea de microfluidică: canalele microfluidice și pilonii din camera de selecție și captură. Pentru această etapă, s-a depus un strat de 50 nm de fotorezist negativ SU-8 2050 la 3000 rpm (Etapa 11). S-a realizat un tratament termic de 3 minute, la 65 °C, mărind apoi temperatura la 95 °C pentru alte 6 minute. Apoi a fost expusă a patra mască (10 s), urmată de un alt tratament termic (2 min - 65 °C și 7 min - 95 °C).

După dezvoltarea în care a fost îndepărtat fotorezistul (1 min, 30 s), s-a realizat tratamentul termic final, la 250 °C, timp de 30 min, folosind echipamentul Torrey Pines Echo Term HS60-2 [\*9], [\*35] pentru a întări fotorezistul SU-8. După ce au fost realizate aceste etape, au fost observate microscopic depunerile realizate. A avut loc inspecția intermediară a microcanalului, a nanoporturilor și a pilonilor din camera de captură, folosind microscopul optic Leica DM LM (Leica Microsystems, Germania) [\*9], [\*29] (Fig. 9.38).

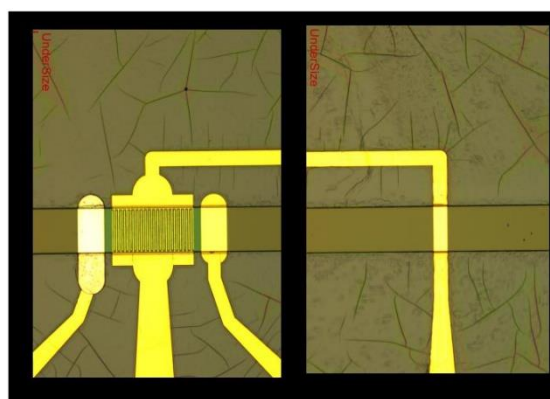


Fig. 9.38. Imagini alăturate ale microcanalului și senzorilor, mărime x5

Ultima etapă (Etapa 12) a fost cea de realizare a capacului de PDMS, care s-a poziționat deasupra dispozitivului. Acesta nu trebuie să acopere contactele electrice (“pad”-urile).



S-a optat pentru un capac de PDMS mai gros, pentru a asigura stabilitatea nanoporturilor. Capacul se atașează fiecărui dispozitiv individual, după ce dispozitivele au fost separate cu ajutorul echipamentului de tăiere DAD 322 [\*17].

A fost folosită o plachetă în scop experimental. Pe aceasta, s-a depus capacul de PDMS prin metoda folosită anterior, pentru realizarea dispozitivului micro-electro-mecanic, model experimental. S-a depus un strat mai subțire, pentru a putea face ulterior o comparație în ceea ce privește rezistența plachetelor la efectele de mediu.

După ce a fost depus PDMS-ul în suportul specific, acesta a urmat un tratament termic de durificare. Odată întărit, s-au poziționat câte două dispozitive peste acesta, pentru a marca forma care va fi decupată. După ce a fost tăiat și supus tratamentului în plasmă, PDMS-ul a fost atașat dispozitivelor micro-electro-mecanice, prototip îmbunătățit. După întărirea PDMS-ului, s-au trasat orificiile pentru nanoporturi, cu ajutorul unei seringi speciale folosită pentru găuri microfluidice. Apoi, au fost lipite nanoporturile cu ajutorul unei rășini.



Fig. 9.47. Dispozitivul microfluidic prototip îmbunătățit cu nanoporturi atașate

Cu această etapă, s-a încheiat procesul tehnologic de fabricație a prototipului îmbunătățit al dispozitivului microfluidic pentru determinarea limfocitelor T, după care protipurile realizate au fost supuse testelor de funcționare specifice. În Fig. 9.47. este redată o imagine a dispozitivului microfluidic cu nanoporturile atașate.

#### 9.4. Testarea prototipului îmbunătățit al dispozitivului micro-electro-mecanic

Testarea dispozitivului micro-electro-mecanic, prototip îmbunătățit, s-a realizat conform etapelor metodologice, stabilite în Fig. 9.48. Aceste etape sunt similare cu cele ale modelului experimental, la care se adaugă cele referitoare la curgerile în circuitele microfluidice și testele mecano-climatice de fiabilitate.

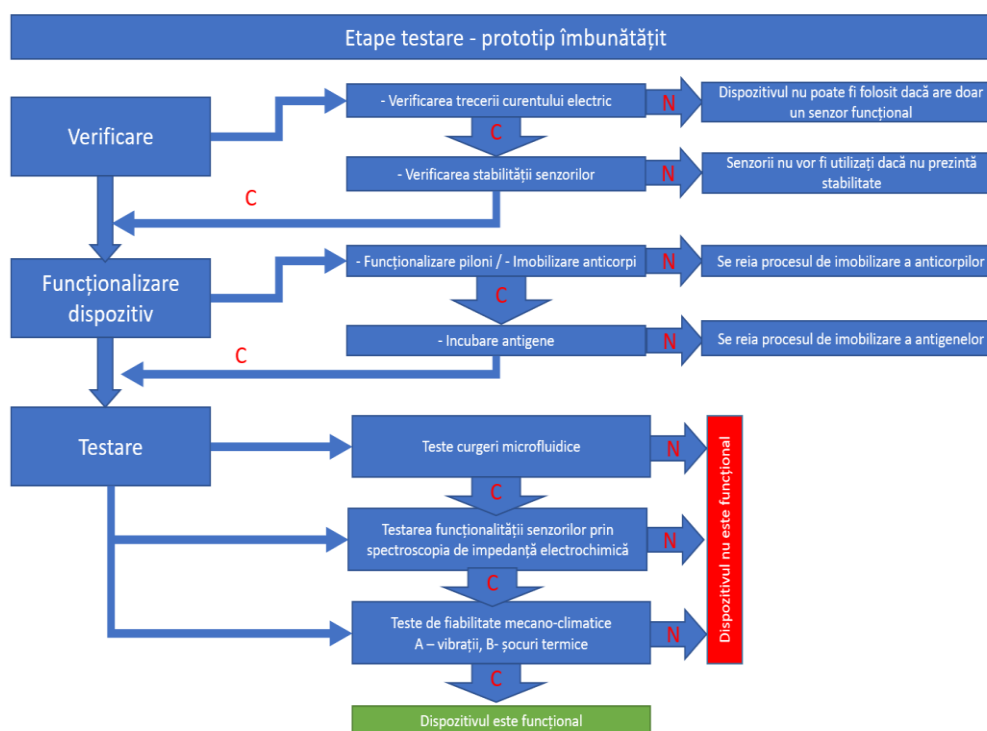


Fig. 9.48. Etape de testare a dispozitivului micro-electro-mecanic, prototip îmbunătățit

În cadrul etapei de „Verificare” sunt selectate dispozitivele cu senzori funcționali care au permis trecerea curentului, urmată de verificarea stabilității acestora. Dacă senzorii sunt instabili, ei nu vor fi utilizați deoarece vor da rezultate diferite pentru fiecare testare. Pentru senzorii instabili, răspunsul va fi notat cu „N” (neconform). Acești senzori nu vor fi utilizați mai departe.

La testarea prototipului îmbunătățit, testele efectuate au fost efectuate pe același echipament, ca la modelul experimental, echipament Keithley 2700 Multimeter/Data Acquisition System (Keithley, USA). Toți senzorii, au primit calificativul conform.

Pentru senzorii funcționali, răspunsul a fost notat „C” (conform) și s-a trecut la etapa următoare, de funcționalizare a dispozitivului. În cadrul acestei etape, s-au atașat anticorpii, iar ulterior, s-au incubat diferite concentrații de antigene CD3+, CD4+, CD8+. După ce au fost lăsați la incubat, senzorii au fost verificați. Dacă imobilizarea și incubarea au avut loc, se trece la etapa următoare. În caz contrar, se realizează din nou cele două operații de imobilizare/incubare.

Testele de curgere a fluidelor sunt premergătoare testelor de funcționalizare și au ca obiect verificarea parcurgerii în întregime a circuitelor microfluidice cu zone critice în care sunt poziționați senzorii la intrarea și la ieșirea din camera de selecție și captură, precum și camera în sine.

A fost testată funcționalitatea senzorilor conformi cu ajutorul metodei de spectroscopie de impedanță electrochimică. Dacă răspunsurile date de diagramele Nyquist sunt favorabile, se va trece la etapa de testare mecano-climatică a dispozitivului.,

Dacă dispozitivul răspunde la toate procedeele de testare, atunci este un dispozitiv funcțional. În cazul în care se înregistrează răspunsuri nefavorabile la una dintre testări, dispozitivul nu este funcțional.

#### 9.4.1. Stabilitatea senzorilor

Testarea stabilității senzorilor s-a realizat cu ajutorul potențostatului din dotarea IMT [\*9]. Cei trei electrozi - electrodul de referință, electrodul de numărare și unul dintre electrozii de lucru au fost conectați la echipament cu ajutorul cleștilor (Fig. 9.49.a).

Pentru testare, s-a pus câte o picătură de soluție specifică peste zona de interes a fiecărui sensor cu ajutorul unei pipete (Fig. 9.49.b). Soluția redox folosită a fost aceeași ca la testarea modelului experimental:  $5\text{mM Fe}(\text{CN})_6^{4-}$  și  $5\text{mM de Fe}(\text{CN})_6^{3-}$  (ferocianură și fericianură).

În Fig. 9.50.a și Fig. 9.50.b. sunt prezentate imagini ale soluției redox depusă pe zonele de interes ale senzorilor de intrare și de ieșire.

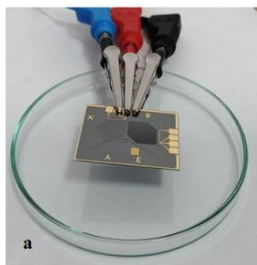


Fig. 9.49. Pregătirea senzorilor pentru testarea cu ajutorul impedanței a) atașarea cleștilor pentru realizarea conexiunilor, b) turnarea picăturii de soluție redox cu ajutorul unei pipete

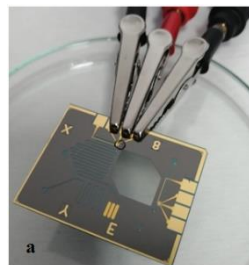
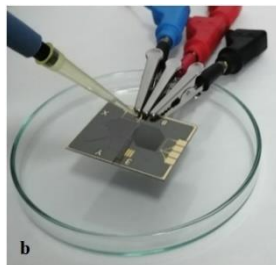
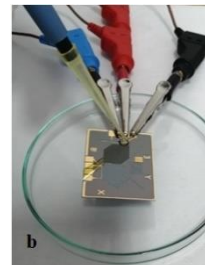


Fig. 9.50. Picătura de soluție redox depusă pe zona de interes a senzorului de măsurare a) a intrărilor, b) a ieșirilor



După ce s-a depus picătura de soluție redox, s-au realizat diagramele de voltametrie ciclică. În Fig. 9.51 și 9.52 sunt redade curbele de voltametrie ciclică pentru cei doi senzori, care

au fost obținute la același domeniu de frecvențe: 1 mHz – 0,1 KHz. Potențialul aplicat a fost de:  $-0,2 \div 0,2$  V, la o viteză de scanare de 0,05 V/s.

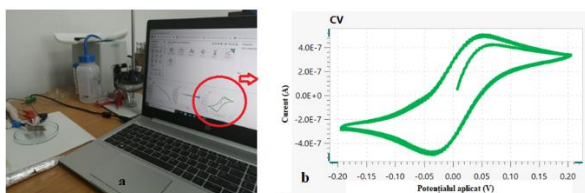


Fig. 9.51. Determinarea curbelor de voltametrie ciclică pentru senzorul de intrare  
a) potențiostatul PGSTAT204; b) curbele de voltametrie ciclică.

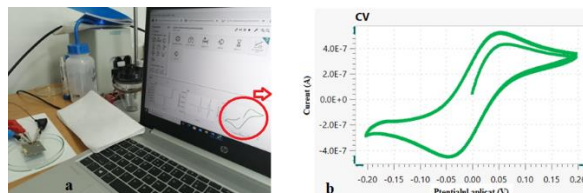


Fig. 9.52. Determinarea curbelor de voltametrie ciclică pentru senzorul de ieșire.  
a) potențiostatul PGSTAT204; b) curbele de voltametrie ciclică

În fiecare dintre graficele reprezentate în Fig. 9.51.b și 9.52.b., sunt redată mai multe curbe realizate la viteza de scanare de 0,05 V/s. Suprapunerea perfectă a curbelor de voltametrie ciclică indică stabilitatea senzorilor. Dacă senzorii nu sunt stabili (nu prezintă repetabilitatea măsurărilor), ei nu pot fi folosiți.

#### 9.4.2. Testarea curgerilor microfluidice

Testarea curgerii fluidelor se realizează după funcționalizarea suprafeței capacului de PDMS și după ce acesta a fost atașat dispozitivului. Pentru a verifica sistemul de curgere în microcanale, s-a folosit un colorant (Fig. 9.53). Colorantul a fost introdus prin fiecare nanoport individual.

În cazul în care curgerea fluidelor nu ar fi avut loc prin microcanale, ar fi dus la concluzia că nu există o închidere etanșă a capacului.

În această situație, ar fi fost necesar să se reia tratamentul de funcționalizare a suprafețelor în plasmă.

Prin această testare, s-a validat modelarea și simularea cu elemente finite a curgerii în circuitele microfluidice prezentată anterior.

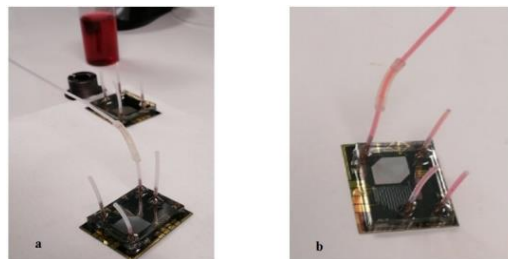


Fig. 9.53. Testarea curgerii fluidice a) imagine înainte de introducerea colorantului și b) imagine după introducerea colorantului

#### 9.4.3. Testarea funcționalității senzorilor cu ajutorul spectroscopiei de impedanță electrochimică

- Măsurătorile de impedanță

Pentru a verifica imobilizarea anticorpilor și cuantificarea antigenelor, s-a folosit spectroscopia de impedanță prin înregistrarea diagramelor Nyquist. Măsurătorile EIS au avut loc la potențial de echilibru (potențial generat între electrozii scufundați în electrolit), la un domeniu de frecvențe cuprinse între 100 mHz – 100 kHz.

În Figurile 9.54 - 9.56 sunt prezentate graficele Nyquist după imobilizarea Proteinei G, imobilizarea anticorpilor și după reacția cu concentrația specifică a antigenelor. În cadrul acestor experimente electrozii au fost funcționalizați cu proteina G, care este poroasă, motiv pentru care rezistența de transfer de sarcină apare numai la frecvențe mari (zeci de kHz), iar la frecvențe mai mici apar fenomene de difuzie a ionilor. Aceste efecte sunt reflectate de diagramele Nyquist din Figurile 9.54 - 9.56 în care apar semicercuri de raze foarte mici în zona frecvențelor mari urmate de curbe cu raze de curbură mari la frecvențe mai mici. În Fig. 9.54

sunt prezentate graficele pentru subpopulația CD3+, iar în Fig. 9.55 sunt prezentate graficele pentru subpopulația CD4+.

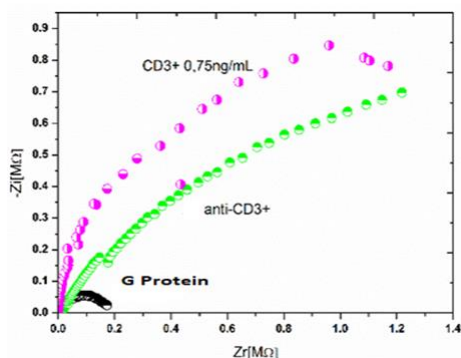


Fig. 9.54. Diagramele Nyquist pentru antigenul CD3+ [M17]

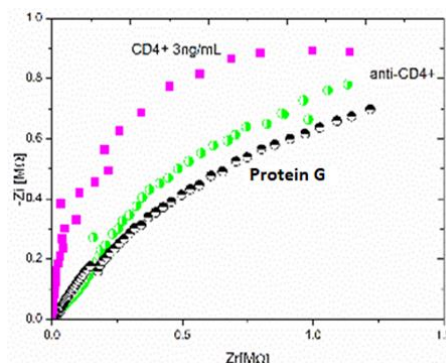


Fig. 9.55. Diagramele Nyquist pentru antigenul CD4+ [M17]

În Fig. 9.56 sunt prezentate graficele pentru subpopulația CD8+.

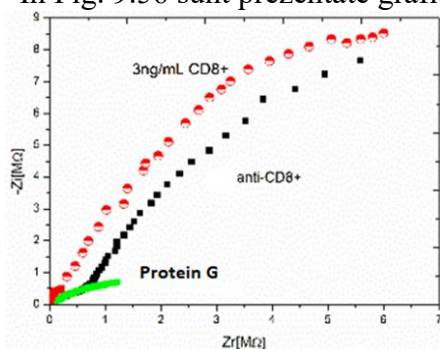


Fig. 9.56. Diagramele Nyquist pentru antigenul CD8+ [M17]

S-a notat cu  $R_{ct0}$  rezistența transferului de sarcină pentru proteina G, iar cu  $R_{ct}$  rezistența transferului de sarcină corespunzătoare fiecărei antigene (CD3+, CD4+, CD8+). unde

Pentru CD3,  $R_{ct} / R_{ct0} = 0,85 / 0,07 = 12,14$ ;

Pentru CD4,  $R_{ct} / R_{ct0} = 0,9 / 0,7 = 1,28$ ;

pentru CD8,  $R_{ct} / R_{ct0} = 8,5 / 0,6 = 14,16$ .

Din spectrele de impedanță electrochimice, s-a constatat că dispozitivul micro-electro-mecanic, prototip îmbunătățit, are o sensibilitate mare pentru detecția numărului limfocitelor T.

În cazul funcționării, pentru a detecta subpopulațiile CD3+, CD4+, CD8+, a fost posibilă detecția unei diferențe între rezistențe chiar și atunci când diferențele între concentrații au fost foarte mici, de ordinul ng/ml.

### 9.5. Integrarea cipului microfluidic într-un dispozitiv portabil

Masa și dimensiunile reduse (Fig. 9.57 - 9.59), fac ca dispozitivul micro-electro-mecanic, prototip îmbunătățit, fabricat să permită integrarea sa într-un dispozitiv portabil.



Fig. 9.57. Determinarea masei dispozitivului micro-electro-mecanic, prototip îmbunătățit

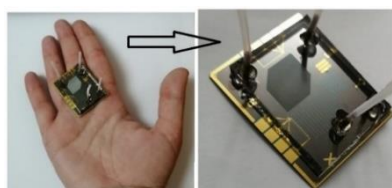


Fig. 9.58. Prototipul îmbunătățit al dispozitivului micro-electro-mecanic realizat fizic

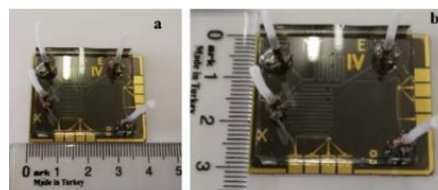


Fig. 9.59. Dimensiunile dispozitivului microfluidic a) lungime, b) lățime

Faptul că acest dispozitiv folosit pentru detecție celulară este portabil, reprezintă un avantaj major. Pentru ca testarea cu ajutorul dispozitivului micro-electro-mecanic să nu aibă loc numai în centrele/instituțiile specializate ce dețin echipamente speciale pentru determinarea impedanței, s-a căutat o rezolvare a acestei probleme.

Dispozitivul poate fi conectat la o placă de achiziție de date, echipată cu un microcontroler specializat în spectroscopie de impedanță. Această placă poate converti și analiza datele obținute cu ajutorul impedanței. Dispozitivul micro-electro-mecanic a fost conectat la placă prin legarea cu fire de aur. La rândul ei, placa este conectată la un calculator prin cablu USB. Apoi, se instalează software-ul și se rulează programul. Se folosește același domeniu de frecvență folosit la echipamentului cu ajutorul căruia a fost testat dispozitivul, acesta fiind setat din calculator (Fig. 9.60).

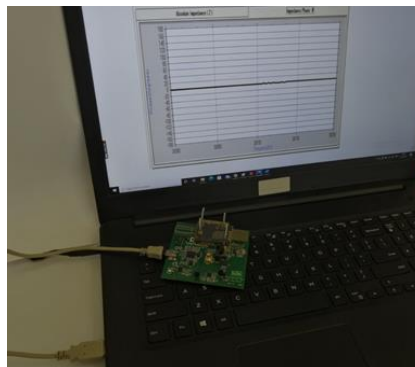


Fig. 9.60. Conectarea la laptop prin cablu USB a plăcii de control

Interpretarea rezultatelor se face folosind curbele de calibrare obținute de către instituții medicale specializate, testând mai mulți pacienți – cerință obligatorie pentru o interpretare statistică [O3].

## 9.6. Teste mecano-climatice de fiabilitate pentru dispozitivul micro-electro-mecanic

Testele de fiabilitate prezintă o importanță majoră în cadrul dezvoltării unui dispozitiv MEMS portabil [B7].

Unul dintre atributele cerute pentru dispozitivele portabile este dat de gradul de fiabilitate mărit. Pentru a demonstra capacitatea și eficacitatea dispozitivului microfluidic de a fi utilizat ca un dispozitiv portabil, s-au efectuat teste în condiții de solicitare similare sau apropiate de cele întâlnite într-un mediu de funcționare real [T1].

### A. Teste de vibrații

Un test de vibrații este foarte important în cazul unui dispozitiv portabil, care poate fi transportat cu diverse mijloace, a căror motoare de acționare pot induce vibrații. Dispozitivul micro-electro-mecanic prin natura sa are un anumit grad de fragilitate, care poate genera rezultate false. Echipamentul utilizat pentru testarea la vibrații a fost “Shaker Tira TV 55240/LS-180” și „amplificator Tira A101 1 010” (Tira, Germania) [\*17].

După ce dispozitivul microfluidic a fost așezat în suportul realizat prin fabricație aditivă (Fig. 9.63), suportul a fost fixat în echipamentul Tira. Prinderea suportului cu ajutorul unor șuruburi, în echipamentul de testare a vibrațiilor, este prezentată în Fig. 9.64.

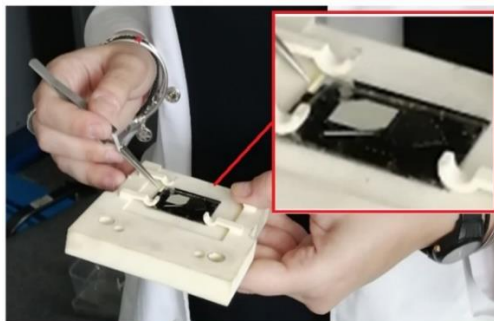


Fig. 9.63. Prinderea dispozitivului în suportul fabricat cu ajutorul tehnologiei 3D printing



Fig. 9.64. Testarea dispozitivului micro-electro-mecanic la vibrații

Încercările s-au efectuat având ca bază normativele 6AA-TE 100535 și PM –LEM-10 Ed 8 Rev 3 [\*19], la o temperatură ambiantă de 25 °C și o umiditate relativă de 37 %. Parametrii stabiliți pentru vibrații au fost:

- de la 20Hz la 80 Hz +3dB/octava, 0,04 G<sup>2</sup>/Hz;
- de la 80Hz la 350 Hz; 0,04 G<sup>2</sup>/Hz;
- de la 350Hz la 2kHz -3dB/octava.

Graficele rezultate în urma testărilor, sunt prezentate în Fig. 9.65 și în Fig. 9.66.

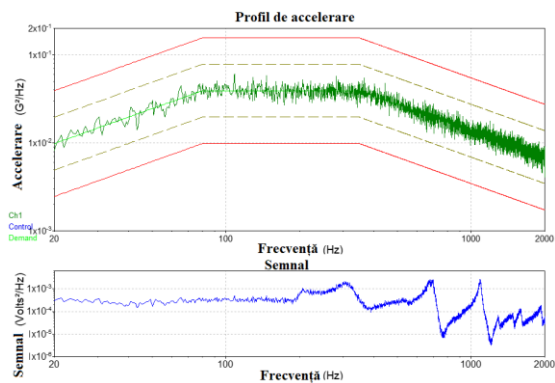


Fig. 9.65. Rezultate vibrații aleatoare pe axa X

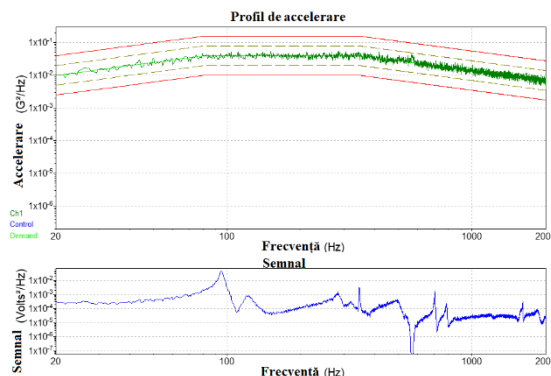


Fig. 9.66. Rezultate vibrații aleatoare pe axa Y

Valorile obținute pentru testarea care a durat 1:10:38, funcționând la nivel maxim de 100 % timp de 10 minute sunt prezentate în Tabelul 9.5, la fel și frecvențele canalelor.

În urma rezultatelor obținute, s-a constatat prin examinare vizuală și la microscop faptul că dispozitivul nu a suferit deteriorări.

Tabelul 9.5. Parametrii obținuți la testările la vibrații

Frecvența	G <sup>2</sup> /Hz	dB/Octave
20 Hz	0.009829	3
80 Hz	0.03913	0
350 Hz	0.03913	-3
2000 Hz	0.006889	
<b>Axa x</b>		
Ch2	0.002628 G RMS	0.001016 G RMS
Ch3	0.004935 G RMS	0.001976 G RMS
Ch2	20 mV/G	
Ch3	11 mV/G	
<b>Axa y</b>		
Ch2	0.003346 G RMS	0.000997 G RMS
Ch3	0.005038 G RMS	0.001913 G RMS
Ch2	20 mV/G	
Ch3	11 mV/G	

## B. Teste de șocuri termice

Testele de temperatură și umiditatea sunt considerate factori cheie ai testărilor similare cu acelea din mediul real [B7]. Aceste teste la șocuri termice, conform normelor MIL-STD-810, s-au realizat pentru a vedea dacă capacul de PDMS s-a desprins sau nu de pe dispozitivele micro-electro mecanice, prototip îmbunătățit [\*19]. Pentru aceste teste, s-au folosit două dispozitive, cu capac PDMS de diferite grosimi unul cu strat de aprox. 5 mm și altul cu strat subțire cu grosime de aproximativ 1 mm (Fig. 9.67). Testele de temperatură au constat în realizarea a șase cicluri termice de la -30 °C la +60 °C, folosind echipamentul CH 250

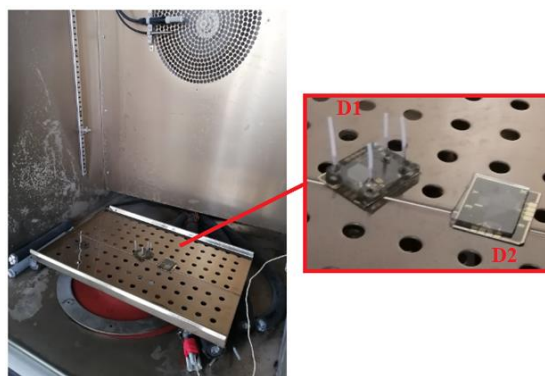


Fig. 9.67. Introducerea celor două probe în camera de testare, unde D1 - dispozitiv micro-electro mecanic cu strat gros de PDMS, iar D2 - dispozitiv micro-electro mecanic cu strat subțire de PDMS.

Angelantoni (Agilent Technologies, USA) [\*17].

Acest echipament, conține o cameră climatică în care temperatura și umiditatea sunt controlate. În acest tip de cameră, se pot realiza încercări combinate: vibrații + condiții de climă. Plaja de temperaturi se situează între  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$  și  $+180\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Domeniul umidității relative este de 20 - 95% (între  $10$  și  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), iar viteza maximă de încălzire/răcire este de  $2\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . Testările pe echipamentul CH 250 Angelantoni (Fig. 9.68.a.) se realizează folosind norme specifice (Fig. 9.68.b).

În Tabelul 9.6, sunt prezentate datele obținute din realizarea ciclurilor termice.

După ce s-au încheiat cele șase cicluri termice, au fost scoase cele două dispozitive micro-electro-mecanice (D1, D2) din incinta camerei de testare și s-a realizat inspecția acestora.

În Tabelul 9.6, sunt prezentate datele obținute din realizarea ciclurilor termice.

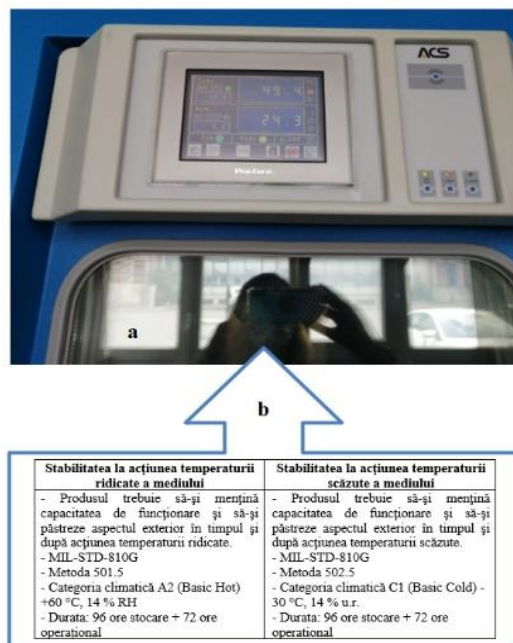


Fig. 9.68. Testarea termică a) interfața echipamentului CH 250 Angelantoni, b) cerințele normelor MIL-STD-810G.

Tabelul 9.6. Parametrii ciclurilor termice efectuate

Timp [min]	05	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60
Temperatura [°C]	-25,2	-27,1	-8	16	37,3	55,5	27,2	3,6	-8,5	-14,8	-19,4	-22,8
Umiditate [%]	31,4	33,7	95	67	33,3	21	10,7	14,4	18,3	21,2	24,7	28,4

S-a constatat faptul că dispozitivul D1 - cu capac PDMS gros nu a suferit nici o modificare, pe când D2 - cu strat subțire de PDMS, a avut locuri în care stratul de PDMS s-a desprins, după cum se poate observa în Fig. 9.70.

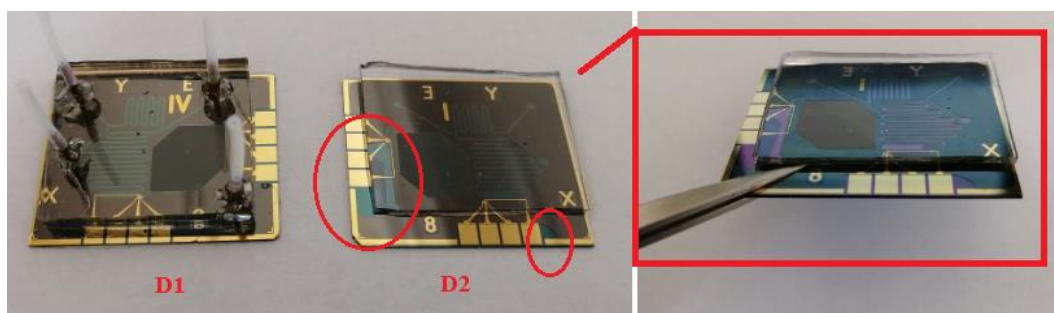


Fig. 9.70. Inspecția celor două dispozitive după realizarea ciclurilor termice

Astfel, în urma inspecției intermediare, s-a decis folosirea capacului de PDMS cu strat de grosime 5 mm, care a rezistat la variații mari de temperatură, depășind cu mult condițiile de utilizare uzuale, de laborator.

Dispozitivul micro-electro-mecanic realizat a trecut de la etapa de dezvoltare (TRL2) la etapa de fabricație, care a fost validată în laborator (TRL4). Prin testele de fiabilitate efectuate în condiții similare sau apropiate de acelea din mediul de funcționare real, s-au creat condiții de trecere la niveluri de maturitate superioare, TRL 5 și TRL 6 [\*32], [\*36].

## 9.7. Realizarea unui senzor de umiditate pentru monitorizarea condițiilor de păstrare a dispozitivului micro-electro-mecanic

Datorită faptului că problemele întâmpinate în cadrul fabricării dispozitivului micro-electro-mecanic pot avea drept cauză umiditatea, s-a decis realizarea unui senzor de umiditate cu strat senzitiv nou. Senzorul se dorește a fi mult îmbunătățit față de senzorii existenți pe piață. Acesta poate fi folosit ca dispozitiv independent, pentru monitorizarea umidității în camerele în care au loc procesele tehnologice. Stratul nou senzitiv a fost realizat din polivinilpirolidonă (PVP) și nanohornuri de carbon oxidate – oxCNH (1/1, g / g) [Ș1]. Senzorul a fost testat la umiditate, folosind drept comparație un senzor de umiditate comercial - Sensirion. Sensibilitate RH bună a senzorilor comparativ cu senzorul comercial, atunci când RH variază de la 0 % până la 90 % în mediu de aer umed [M15].

Grosimea stratului depus a fost măsurată cu echipamentul Nova NanoSEM 630 (FE-SEM, FEI Company, SUA) [\*17]. Aceasta a fost de circa 200 nm. Nanohornurile se așază unul lângă altul, ocupând spațiile libere pe măsură ce numărul straturilor crește, formând astfel un strat continuu (Fig. 9.81 - 9.83) [M25].

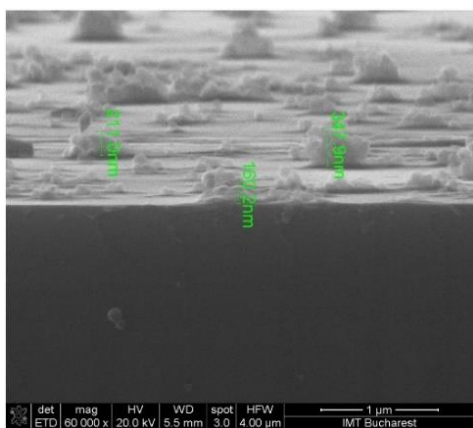


Fig. 9.81. Imagini SEM pentru proba cu un strat [M25]

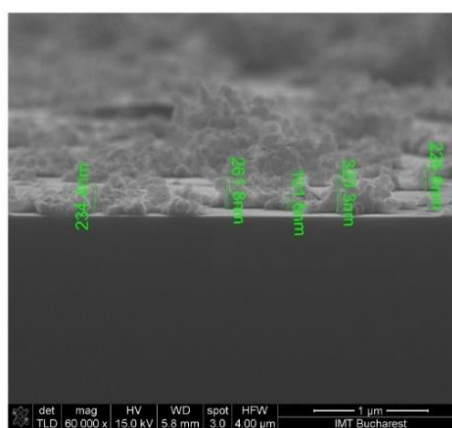


Fig. 9.83. Imagini SEM pentru proba cu opt straturi [M25]

Folosirea filmului de strat senzitiv nou îi conferă senzorului câteva avantaje semnificative, printre care: proprietăți mecanice superioare; răspuns rapid la variații ale umidității relative; sensibilitate crescută; stabilitate; dimensiuni reduse; costuri de producție rezonabile. Pentru a demonstra fiabilitatea acestuia în condiții de funcționare extreme, s-au efectuat teste relevante mecano-climatice. Dispozitivul a fost testat la vibrații și la șocuri termice de la - 30°C la + 60°C. În urma testelor efectuate, nu au fost identificate neconformități.

Astfel, s-a realizat un senzor nou funcțional de determinare a umidității, cu strat senzitiv compus din nanohornuri carbonice oxidate și PVP, care poate fi folosit pentru monitorizarea etapelor de fabricare a dispozitivelor micro-electro-mecanice sau poate fi integrat în carcasa de protecție / depozitare a dispozitivelor micro-electro-mecanice.

## CAPITOLUL 10. CONCLUZII FINALE, CONTRIBUȚII ORIGINALE ȘI DIRECȚII VIITOARE DE CERCETARE

### 10.1. Concluzii finale

În urma analizei critice a stadiului actual al domeniului abordat din prima parte a tezei și a desfășurării activităților de cercetare din partea a doua cu privire la realizarea modelului experimental și a prototipului îmbunătățit al dispozitivului microfluidic pentru determinarea limfocitelor T, s-au desprins următoarele concluzii finale:



1. BioMEMS-urile sunt aplicabile la determinarea limfocitelor T având mai multe avantaje principale față de aparatura convențională, care constau în: reducerea volumului probelor; consum energetic și costuri reduse; portabilitatea și reutilizarea dispozitivelor; procesarea rapidă a probelor și implicit timpul de reacție scurt pentru diagnosticare și acordarea tratamentelor.

2. Materialele folosite în construcția bioMEMS-urilor sunt clasificate în materiale de substrat și de depunere. Siliciul este folosit pe scară largă sub formă de substrat și metalele, compușii metalici, materialele ceramice și polimerice, ca materiale de depunere. Noua tendință de dezvoltare a bioMEMS-urilor este legată de materialele carbonice, reprezentate de grafenă și derivatele acesteia, nanohornuri și nanotuburi carbonice etc.

3. Microtehnologiile folosite la fabricația bioMEMS-urilor, în diverse etape, unele chiar în cazul realizării dispozitivului microfluidic pentru determinarea leucocitelor T sunt:

- prelucrările fotochimice realizează precizie ridicată, având la bază procesul de fotolitografie pentru selectarea suprafețelor de prelucrat cu ajutorul măștilor, utilizându-se substanțe de tip fotorezist; prezintă avantajul productivității ridicate ca urmare a prelevării simultane a materialului pe întreaga suprafață expusă procesului de corodare chimică selectivă;
- prelucrarea cu radiație laser (LBM) este utilizată pentru scrierea directă a măștilor, prin utilizarea laserilor cu lungime de undă redusă, în domeniul UV, asigurând un diametru redus al spotului și implicit o densitate mare de energie pe suprafața prelucrată;
- prelucrarea cu fascicul de electroni (EBM) este folosită la litografie prin scriere directă (scanare matricială a suprafeței) și proiectarea fasciculului prin deflexie electromagnetică, dar și la depunerea materialelor din componența bioMEMS-urilor în straturi subțiri;
- prelucrarea cu fascicul de ioni (IBM) este utilizată la depunerea materialelor din structura bio-MEMS-urilor în straturi subțiri sau îndepărtare de material sub forma corodărilor uscate, prin “Reactive Ion Etching” (RIE) și “Deep Reactive Ion Etching” (DRIE);
- prelucrarea cu plasmă (“Plasma Enhanced Chemical Vapor Deposition” - PECVD) este folosită pentru depunerea materialelor sub forma filmelor subțiri, spre exemplu, SiC amorf (A-Si) și grafenă verticală (VG), utilizate ca substraturi de cultură celulară la aplicațiile bioMEMS.

4. Biodispozitivul pentru numărarea limfocitelor de tip T din sânge proiectat și modelat este structurat în următoarele părți componente: (1) nanoporturile pentru introducerea probei de sânge, soluției de lizare a eritrocitelor, soluției pentru oprirea lizării; (2) circuitele microfluidice pentru lizarea eritrocitelor și pentru oprirea lizării; (3) camera de selecție și captură a leucocitelor de tip CD3+, CD4+ sau CD 8+; (4) senzorii de impedanță electrochimică pentru numărarea intrărilor și ieșirilor celulelor în și din camera de selecție și captură; (5) rezervor de acumulare a celulelor la ieșirea din camera de selecție și captură.

5. Pentru modelul experimental al dispozitivului microfluidic s-au proiectat trei măști în programul CleWin5: (1) pentru depunerea titan-aur; (2) pentru depunerea argintului; (3) pentru depunerea fotorezistului SU-8; a fost modelat procesul de fabricație al modelului experimental cu ajutorul programului SEMulator3D.

6. A fost realizată în Comsol Multiphysics, modelarea și simularea numerică a curgerii celor trei tipuri de fluide în circuitele de lizare și oprire a lizării, în canalele de numărare corespunzătoare senzorilor electrochimici și în camera de selecție și captură; rezultatele simulării au arătat că geometria proiectată îndeplinește condițiile de timp de parcurgere a circuitelor microfluidice pentru realizarea procesului de lizare a eritrocitelor și stopare a lizării; rezultatele obținute au fost validate în urma testelor funcționale ulterioare, post-fabricație.

7. A fost fabricat *modelul experimental* al dispozitivului microfluidic utilizând un lot de cinci plachete de siliciu, pe care au fost dispuse câte patru dispozitive (20 bucăți), pe baza succesiunii etapelor modelate anterior cu ajutorul SEMulator3D. După fiecare etapă de fabricație, s-au efectuat inspecții intermediare, eliminându-se produsele neconforme. La finalul

procesului de fabricație, au rămas doar două dispozitive microfluidice – model experimental conforme.

8. A fost testat *modelul experimental* al dispozitivului microfluidic pe baza metodologiei de testare elaborate, parcurgând mai multe etape; verificarea conductivității electrice a senzorilor; verificarea stabilității în funcționare a senzorilor și în final, a funcționalității acestora. A fost demonstrată funcționalitatea dispozitivelor lab-on-a-chip pentru detecția electrochimică a celor trei subpopulații limfocitare: CD4+, CD3+ și CD8+, ceea ce constituie atingerea obiectivului principal al tezei de doctorat: fabricarea unui dispozitiv bioMEMS funcțional care să determine numărul limfocitelor T din sânge.

9. În urma inspecției calității etapelor de execuție ale dispozitivului micro-electro-mecanic, *model experimental*, s-au identificat două probleme majore care au condus la neconformități critice: (1) lipsa de aderență a argintului la placheta de siliciu; (2) lipsa de aderență a fotorezistului SU-8 la plachetă.

10. Aceste probleme au fost rezolvate la realizarea *prototipului îmbunătățit* al dispozitivului microfluidic pentru determinarea limfocitelor prin: creșterea dimensiunii suprafeței electrozilor (interdigați) de referință pe care a fost depus argintul; îmbunătățirea tratamentului termic al plachetei pe care a fost depus fotorezistul SU-8.

11. Pentru creșterea sensibilității procesului de detecție a limfocitelor de tip T, s-a generat în programul CleWin5, un model nou de dispozitiv în faza de *prototip îmbunătățit*, obținut prin integrarea unor senzori electrochimici interdigați pe platforma microfluidică. Procesul de fabricație a fost modelat din nou în programul SEMulator3D, rezultatele obținute fiind validate la testările post-fabricație ale prototipului.

12. Pentru *prototipul îmbunătățit* al dispozitivului microfluidic, s-au fabricat patru măști: (1) pentru depunerea stratului de titan-aur folosit la construcția senzorilor; (2) pentru depunerea stratului de argint pentru electrodul de referință; (3) pentru depunerea unui strat de oxid care a blocat contactul dintre aur și microcanal în zonele nedorite; (4) pentru depunerea fotorezistului SU-8 cu ajutorul căruia s-au realizat circuitele microfluidice.

13. Aplicând metodologia elaborată de testare a *prototipului îmbunătățit*, s-au parcurs etape similare celor aferente modelului experimental, la care s-au adăugat testarea curgerii microfluidice și testarea funcționalității senzorilor prin spectroscopia de impedanță electrochimică. În urma analizării diagramelor Nyquist obținute, s-a constatat faptul că dispozitivul micro-electro-mecanic, poate detecta cu *sensibilitate ridicată* cele trei subpopulații limfocitare: CD4+, CD3+ și CD8+, ceea ce constituie confirmarea îndeplinirii obiectivului principal al tezei de doctorat.

14. Dispozitivul microfluidic pentru determinarea limfocitelor T a fost integrat într-un dispozitiv portabil și supus unor teste de fiabilitate specifice, de vibrații și șocuri termice. Rezultatele obținute, apropiate de cele întâlnite într-un mediu de operare real, au prezentat conformitatea cerută unor asemenea echipamente.

15. Au fost parcurse etape de cercetare care au făcut trecerea de la nivelul de maturitate tehnologică, TRL2, faza de concept a dispozitivului microfluidic de determinare a limfocitelor T la nivelul de maturitate tehnologică, TRL 4, faza de validare a operării și tehnologiei de fabricație a dispozitivului microfluidic la nivel de laborator și au fost create premise pentru trecerea la nivelurile de maturitate tehnologică TRL 5 și TRL 6, prin validarea operării dispozitivului în condiții similare, respectiv apropiate de cele întâlnite în mediul de funcționare real.

## 10.2. Contribuții originale

Analizând rezultatele cercetărilor desfășurate în cadrul tezei de doctorat intitulată “Procese de fabricație a sistemelor micro-electro-mecanice cu aplicații în medicină” se evidențiază

următoarele contribuții originale, dezvoltate pe cele două categorii principale, *teoretice* și *aplicative*, după cum urmează:

#### A. Din punct de vedere teoretic:

- caracterizarea tendinței majore din domeniul tehnologic de miniaturizare și ultraminiaturizare și anume, micro și nanotehnologiile și selectarea celor mai adecvate asemenea tehnologii aplicabile în procesul de fabricație a biodispozitivelor micro-electro-mecanice;
- clasificarea și caracterizarea MEMS-urilor, cu concentrarea pe acelea folosite în domeniul medical – bioMEMS;
- clasificarea și caracterizarea componentelor Sistemelor Micro-Electro-Mecanice și selectarea acelor componente adecvate construcției dispozitivelor *lab-on-a-chip*, respectiv biosenzori, circuite microfluidice, nanoporturi și micropompe pentru introducerea probelor analizate și a reactanților;
- în caracterizarea sistemelor micro-electro-mecanice sunt evidențiate conexiunile cu factorul uman, care face obiectul analizei, folosind dispozitive atașabile sau implementabile, cum sunt nanoroboții sau aparatele ingerabile sau care utilizează bioMEMS-urile și interpretează rezultatele obținute;
- identificarea testelor post fabricație, necesare pentru utilizarea curentă a biodispozitivelor micro-electro-mecanice, în condiții cât mai apropiate de cele întâlnite în realitate și îndeplinirea cerințelor de fiabilitate;
- analiza proprietăților materialelor utilizabile pentru MEMS-uri prin prisma condițiilor critice necesare construcției și fabricației bioMEMS-urilor: caracteristici mecanice și electrice adecvate, adaptabilitate la tehnologia de fabricație a semiconductorilor și proprietăți care limitează dezvoltarea tensiunilor interne în timpul micro-prelucrărilor, necesare la generarea suprafețelor pentru circuitele microfluidice;
- caracterizarea materialelor aplicabile pentru bioMEMS-uri, precum și gruparea acestora în funcție de proprietățile lor, în materiale de *substrat* și de *depunere*; identificarea avantajelor și dezavantajelor acestora relativ la specificitatea bioMEMS-urilor și a compatibilității dintre acestea;
- în vederea creșterii performanțelor biodispozitivelor, a fost identificată *tendința actuală* de utilizare pentru tehnologiile de nouă generație, a materialelor carbonice cu proprietăți excepționale termice, optice, mecanice și electrice, asociate cu masă extrem de redusă - materiale reprezentate de grafenă și derivatele sale, nanohornuri și nanotuburi carbonice etc.;
- selectarea acelor tehnologii neconvenționale avansate, denumite și tehnologii cu energii concentrate, care prin capacitatea lor de a crea densități mari de energie pe suprafața prelucrată sunt cele mai adecvate Industriei 4.0; în acest context, ele sunt aplicabile și la fabricația bioMEMS-urilor ultra-miniaturizate;
- au fost clasificate, caracterizate fenomenologic și evidențiate acele tehnologii cu energii concentrate, materialele cele mai adecvate fiecărei etape tehnologice și parametrii lor critici pentru obținerea MEMS-urilor conform cerințelor, precum și tipurile de echipamente utilizate, evidențiind avantajele și dezavantajele acestora, în procesele de fabricație – fluxul tehnologic;
- a fost identificată o nouă tendință în domeniul microtehnologiei, aplicabilă bioMEMS-urilor, în diverse etape ale procesului tehnologic de fabricație, prin utilizarea mai largă a prelucrărilor cu radiație laser în condițiile scăderii continue a costurilor echipamentelor, capacității tehnologiei de a crea cea mai mare densitate de energie din domeniul industrial și de prelucrare a unor tipuri de materiale și microgeometrii extrem de diverse;

- caracterizarea microfluidicii și evidențierea capacității sale de utilizare la dispozitivele micro-electro-mecanice aplicate în domeniul medical; selectarea și caracterizarea materialelor celor mai adecvate a fi utilizate pentru dispozitive microfluidice, precum și evidențierea diversității morfologiei circuitelor microfluidice;
- a fost caracterizat stadiul actual al dispozitivelor lab-on-a-chip, au fost evidențiate soluțiile relevante raportate în urma activităților de cercetare-dezvoltare-inovare la nivel mondial și în acest context, situarea dispozitivului microfluidic de determinare a limfocitelor T, realizat în cadrul tezei pentru prima dată în România, în ierarhia dispozitivelor similare;
- a fost elaborată o metodologie de cercetare pentru un dispozitiv micro-electro-mecanic pentru determinarea limfocitelor T, care a condus la trecerea de la nivelul de maturitate tehnologică, TRL2, faza de concept la nivelul de maturitate tehnologică, TRL 4, faza de validare a operării dispozitivului și tehnologiei de fabricație la nivel de laborator, cu crearea premiselor pentru trecerea la nivelurile de maturitate tehnologică TRL 5 și TRL 6, prin validarea operării în condiții similare, respectiv apropiate de cele întâlnite în mediul de operare real;
- a fost elaborată o metodologie de testare a unui dispozitiv microfluidic, încadrată în procesul holistic de fabricație a acestuia – proiectare, modelare, simulare, execuție, testare, livrare. Metodologia cuprinde etapele generale referitoare la testarea senzorilor prin verificarea conductivității electrice, stabilității în funcționare, testarea curgerii fluidelor în circuitele microfluidice, testarea funcționalității prin capturarea celulelor care fac obiectul analizei lab-on-a-chip și testarea mecano-climatică de fiabilitate.

## B. Din punct de vedere practic

În urma cercetărilor experimentale desfășurate au fost aduse următoarele contribuții la tema de doctorat, grupate în două etape majore de dezvoltare a dispozitivului microfluidic de determinare a limfocitelor T, model experimental și prototip îmbunătățit, după cum urmează:

### Model experimental

- A fost realizată proiectarea conceptuală a biodispozitivului micro-electro-mecanic, aplicabil la determinarea numărului de limfocite de tip T din probele de sânge, formulând funcția generală, funcțiile principale și secundare, elaborând schema logică a acestuia cu principalele părți componente: intrări ale probei de sânge și soluțiilor de lizare și stopare a lizării, microcircuite ale modulelor proceselor de lizare a eritrocitelor și oprire a procesului de lizare, canale de numărare asociate cu senzori electrochimici, poziționate ante și post cameră de captură, cameră de selecție și captură a limfocitelor T, rezervor de acumulare a celulelor reziduale din proba de sânge;
- Proiectarea unui model experimental al biodispozitivului micro-electro-mecanic pentru determinarea numărului de limfocite de tip T din probele de sânge; aceasta a presupus modelarea computerizată pentru determinarea formei și dimensiunilor critice ale unor elemente esențiale ale părții de microfluidică cum sunt: circuitele de lizare și soluția de stopare a lizării, canalele de numărare, camera de captură cu dimensionarea pilonilor și distanței dintre aceștia;
- Proiectarea și modelarea computerizată a celor trei măști necesare în etapa de fotolitografie din cadrul procesului tehnologic de fabricație a modelului experimental și anume: masca 1 utilizată la depunerea stratului de Ti-Au; masca 2 pentru depunerea Ag; masca 3 folosită pentru realizarea părții de microfluidică cu ajutorul SU-8, un fotorezist negativ;
- Modelarea numerică a curgerii, urmărind variația vitezei de curgere și a presiunii fluidelor în modulele specifice de lizare și antilizare a circuitele microfluidice, în canalele de numărare și în interiorul camerei de selecție și captură a limfocitelor T, care a demonstrat

- funcționarea biodispozitivului micro-electro-mecanic în faza de concepție și validarea ulterioară a rezultatelor computerizate cu datele reale obținute în urma testelor efectuate;
- Modelarea computerizată a procesului de fabricație a modelului experimental al biodispozitivului MEMS și validarea rezultatelor obținute în urma procesului de fabricație efectivă și testarea modelului fizic, prin verificarea parametrilor funcționali prescriși;
  - A fost executat un lot de 20 de bucăți în faza de *model experimental* al biodispozitivului MEMS, identificându-se acele dispozitive neconforme pe baza inspecțiilor intermediare, precum și etapele tehnologice critice ale procesului de fabricație cu scopul îmbunătățirii în faza ulterioară de *prototip*;
  - A fost elaborată și aplicată o metodologie de testare a dispozitivului microfluidic, *model experimental*, care a cuprins următoarele etape succesive: testarea senzorilor privind trecerea curentului electric și stabilității în funcționare, testarea prin spectroscopie de impedanță electrochimică după funcționalizarea privind atașarea anticorpilor și incubarea diferitelor concentrații de antigene.

### Prototip îmbunătățit

- Îmbunătățirea biodispozitivului MEMS pentru determinarea limfocitelor T prin următoarele măsuri de ordin funcțional și tehnologic:
  - schimbarea senzorilor anteriori cu aceia compuși din electrozi interdigitați;
  - creșterea suprafeței de depunere a Ag, corespunzător senzorilor realizați din acest material;
  - introducerea celei de a treia măști, în etapa tehnologică intermediară corespunzătoare depunerii unui strat de oxid de pasivare, ce are scopul de a bloca contactul dintre brațele noilor senzori și microcanale în zone nedorite, pentru a evita apariția unor răspunsuri false date de senzori;
  - modificarea parametrilor de etalare, dezvoltare și tratament termic pentru creșterea aderenței fotorezistului negativ, SU-8;
- Modelarea computerizată a noului proces tehnologic de fabricație a prototipului îmbunătățit al biodispozitivului MEMS cu validarea ulterioară a rezultatelor obținute prin datele experimentale de la testarea finală;
- Elaborarea și aplicarea unei metodologii de testare a *prototipului îmbunătățit*, care include și testarea curgerii fluidelor în circuitele microfluidice, funcționalității senzorilor, precum și teste de fiabilitate mecano-climatice;
- Integrarea bioMEMS-ului pentru determinarea limfocitelor T într-un dispozitiv portabil și testarea produsului final, în condiții de laborator, la solicitări mecanice și termice, în condițiile apropiate de utilizare reală;
- A fost proiectat, modelat, realizat și testat un senzor de umiditate cu sensibilitate mărită în raport cu produsele similare de pe piață, utilizat la monitorizarea condițiilor de păstrare și utilizare a dispozitivului micro-electro-mecanic pentru determinarea limfocitelor T;
- S-a realizat un dispozitiv micro-electro-mecanic, pentru determinarea limfocitelor T, trecând prin etapele de dezvoltare tehnologică, etapa de concept - Technology Readiness Level- TRL 2, la faza de tehnologie de fabricație, validată în laborator- TRL 4;
- Prin testele de fiabilitate la care a fost supus dispozitivul micro-electro-mecanic de determinare a limfocitelor T, în condiții de operare similare, respectiv apropiate de cele întâlnite în realitate, s-au creat premisele de trecere la nivelurile de maturitate TRL 5 și TRL 6;
- S-a obținut un salt important, spre etapa esențială de realizare a unui produs, gata de lansare pe piață, de la cercetare *precompetitivă*, spre cercetare *competitivă*. Aceasta din urmă, creează condițiile pentru realizarea avantajului competitiv al unei organizații inovative;

- A fost fabricat un dispozitiv micro-electro-mecanic cu o serie de avantaje cum sunt: ultra-miniaturizare, energie consumată foarte redusă, funcționalitate complexă, portabil și reutilizabil și implicit, costuri de fabricație și funcționare reduse;
- Contribuțiile originale rezultate din activitățile de proiectare, modelare, simulare fabricație și experimentare denotă faptul că dispozitivul denumit “Biocip microfluidic portabil pentru determinarea numărului de limfocite T” cu caracteristicile și avantajele prezentate, obținute în cadrul tezei de doctorat, a fost realizat pentru prima dată în țara noastră.

Se menționează că aceste contribuții aplicative nu ar fi fost posibile fără utilizarea bazei tehnico-materiale disponibile, a echipamentelor puse la dispoziție de către Institutul Național de Cercetare - Dezvoltare pentru Microtehnologie - IMT București (IMT) și expertizei acumulate în acest domeniu avansat, în cadrul IMT.

### 10.3. Direcții viitoare de cercetare

Microtehnologia este un domeniu de vârf, într-o continuă evoluție, generatoare de noi produse, care ne îmbunătățesc calitatea vieții. Datorită evoluției tehnologiilor „micro” și „nano”, s-a înregistrat o creștere substanțială a complexității echipamentelor și dispozitivelor utilizate în diferite domenii, cu precădere în domeniul medicinei, în toate etapele specifice actului medical.

O atenție deosebită este necesar să fie acordată *bioMEMS-urilor*, aceste dispozitive cu funcții biologice integrate, folosite pentru aplicații medicale. În perioada actuală se înregistrează o cerere uimitoare pentru microdispozitivele autonome din domeniul medical, cu nevoia implicită de surse de energie miniaturizate. Spre exemplu, ca urmare a impactului pandemiei de COVID 19, *bioMEMS-urile* au avut o creștere a cotei de piață de circa 90%, în anii 2019 - 2020 [\*39].

**În acest context, sistemele micro-electro-mecanice cu aplicații în medicină reprezintă o direcție de cercetare majoră care se va dezvolta accelerat în continuare.** Datorită faptului că utilizarea noului dispozitiv realizat, *Biocip microfluidic portabil pentru determinarea numărului de limfocite T* produce efecte și rezultate semnificative, următoarele direcții de cercetare viitoare pot fi extinse, în conexiune cu tema abordată în cadrul tezei:

- Realizarea unor noi dispozitive medicale, pentru alte utilizări, cum ar fi spre exemplu determinarea celulelor tumorale circulante (CTC), cu direcționări spre:
- Folosirea în componența lor de materiale carbonice, folosite în fabricarea MEMS-urilor, precum grafena și derivatele sale;
- Studiarea modului de obținere a grafenei și derivatelor sale, ceea ce presupune:
  - a. Efectuarea de diverse experimente pentru a alege metoda adecvată;
  - b. Testarea acesteia încorporată în dispozitive;
- Proiectarea și modelarea altor forme de circuite microfluidice, simularea numerică privind comportamentul hidraulic al acestora, urmărindu-se minimizarea pierderilor de presiune;
- Utilizarea altor micro și nanotehnologii cu energii concentrate pentru fabricația *bioMEMS-urilor*, care să conducă la creșterea productivității, preciziei și calității suprafețelor generate, precum și la reducerea în continuare, a dimensiunilor acestora, conform tendinței de ultraminiaturizare, care asigură minimizarea volumului probelor, consumului energetic și reducerea costurilor și implicit, creșterea cotei de piață a unor asemenea produse de înalt nivel tehnic.

### 10.4. Valorificarea rezultatelor cercetării

În urma cercetărilor bibliografice efectuate, respectiv în urma dezvoltărilor și contribuțiilor în cadrul tezei de doctorat, autoarea a desfășurat în domeniul cercetat, numeroase studii teoretice și aplicative care s-au materializat în lucrări științifice și cereri de brevet de invenție, participări la conferințe, la saloane internaționale de invenții, așa cum rezultă din Anexele 5-12.

## BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

- [A11] Avram, A.M., Avram, M., Iliescu, C., Volmer, M., *BioMEMS for the Determination of Rheological Properties of Biological Fluids*, Proceedings of SPIE, **vol. 6415**, 2007.
- [A12] Avram, A., Mărculescu, C., Bălan, C.M., Pirvulescu, C., Volmer, M., Popescu, A., Mihăilescu, M., Avram, M., *Microbionensors for electrical impedance spectroscopic study of melanoma cells*, Proceedings of International Semiconductor Conference (CAS), pp. 165-168, 2012.
- [A14] Avram, M., Avram, A., Iliescu, C., *Biodynamical analysis microfluidic system*, Microelectronic Engineering, **vol. 83**, no. 4-9, pp. 1688–1691, 2006.
- [B4] Baughman, R.H., Zakhidov, A.A., de Heer, W.A., *Carbon nanotubes--the route toward applications*, Science **vol. 297**, no. 5582, pp. 787-792, 2002.
- [B7] Băzu, M., Băjenescu, T., *Failure analysis: a practical guide for manufacturers of electronic components and systems*, Ed. Wiley, 2011.
- [B14] Bowers, N., *Mems technology for your senses*, Yole Developpement, Electronic specifier, publicat la data de 22 Sept 2015: <https://www.electronicspecifier.com/news/analysis/mems-technology-for-your-senses>, accesat la data de: 25.09.2017.
- [B15] Buiu, O., Șerban, B.C., Ionescu, O., *Internet of things and the human body*, Journal of Nanomedicine Research, **vol. 5**, no. 2, 00113, 2017.
- [C17] Comsol, *Introduction to COMSOL Multiphysics, version 5.5*, disponibil la: <https://cdn.comsol.com/doc/5.5/IntroductionToCOMSOLMultiphysics.pdf>, accesat la: 10.06.2020.
- [D1] Dascălu, D., *Școala românească de micro- și nanoelectronică*, Editura Academia Romana Bucuresti, 2018.
- [G5] Ghiculescu, D., **Marinescu, R.**, Avram, M., *Finite Element Modeling of Lab-on-Chip for T Lymphocyte Analysis*, Macromolecular Symposia, **vol. 395**, no. 1, 2021.
- [J3] Jammes, F. C., Maerkl, S. J., *How single-cell immunology is benefiting from microfluidic technologies. Microsystems & Nanoengineering*, **vol. 6**, no. 1, doi:10.1038/s41378-020-0140-8, 2020.
- [K5] Kukhta, A.V., Maksimenko, S.A., Taoubi, M.I., Harb, M., Cataldo, A., Bellucci, S., Nuzhdin, V.I., Valeev, V.F., Stepanov, A.L., *Effect of silver doping by ion implantation on graphene nanoplatelets properties*, Optoelectron. Adv. Mat., **vol. 13**, no. 5-6, pp. 354-358, 2019.
- [M2] Mack, C.A., *Positive Photoresists– Exposure*, The Lithography Tutor (Lithography Expert), Tutor 5, 1994, pp. 21-23.
- [M3] Mack, C., *Fundamental Principles of Optical Lithography: The Science of Microfabrication*, Ed. Wiley, 2007.
- [M4] Madou, M.J., *Fundamentals of microfabrication and nanotechnology – solid-state physics, fluidics, and analytical techniques in micro- and nanotechnology*, third edition, **vol. 1**, CRC Press, 2011.
- [M5] Madou, M.J., *Fundamentals of microfabrication and nanotechnology – manufacturing techniques for microfabrication and nanotechnology*, third edition, **vol. 2**, CRC Press, 2011.
- [M15] Marinescu, N.I., Ghiculescu, L.D., Popa, L., Pîrnău, C., **Marinescu, M.R.**, Ene, G.M., *Procese tehnologice cu fascicule, oscilații și jeturi*, **vol. 3**, Tehnologii cu oscilații ultrasonice, Ed. Printech București, 2019.
- [M16] **Marinescu, M.R.**, Avram, M., Voitincu, C., Savin, M., Mihailescu, C., Ghiculescu, D., *Development of a new Biomedical MEMS for T Lymphocytes Determination*, Vision 2025: Education excellence and management of innovations through sustainable economic competitive advantage, Proceedings of 34<sup>th</sup> International-Business-Information-Management-Association (IBIMA), pp. 3209-3220, 2019.
- [M17] **Marinescu, M.R.**, Avram, M., Voitincu, C., Savin, M., Mihailescu, C., Ghiculescu, L.D., *Electrochemical sensors with interdigitated electrodes for counting T-cells*, Romanian Journal of Information Science and Technology, **vol. 23**, no. 4, pp. 368-378, 2020.
- [M18] **Marinescu, M. R.**, David, E., *Obtaining carbon structures from organic compounds derived of biomass for their use in chemical sensors manufacturing*, Journal of Optoelectronics and Advanced Materials, **vol. 22**, no. 3-4, pp. 194-199, 2020.
- [M19] **Marinescu, M. R.**, David, E., Ghiculescu, L.D., *Obtaining of high density carbon materials by coke sintering resulting from heat treatment of tar for applications in sensors manufacture*, proceedings of ICAMS 2020 – 8<sup>th</sup> International Conference on Advanced Materials and Systems, 2020.

- [M20] **Marinescu, M.R.**, Ghiculescu, D., *Technological aspects regarding the use of photolithography in obtaining micro-electro-mechanical systems (MEMS)*, Nonconventional Technologies Review, **vol. 21**, no. 1, pp. 24-29, 2017.
- [M21] **Marinescu, M.R.**, Ghiculescu D., *Micro-electro-mechanical systems (MEMS) and applications in medicine*, Nonconventional Technologies Review, **vol. 21**, no. 4, pp. 10-17, 2017.
- [M22] **Marinescu M. R.**, Ghiculescu, L.D., *Detection of modified cells using "lab-on-a-chip (LOC)" microfluidic devices*, Nonconventional Technologies Review, vol. **22**, no. 2, pp. 25-30, 2018.
- [M23] **Marinescu, M.R.**, Avram, M., Pîrvulescu, C., Voișincu, C., Țucureanu, V., Matei, A. *Considerations regarding the use of SU-8 photoresist in MEMS technique*, Nonconventional Technologies Review, vol. **22**, no. 3, pp. 10-14, 2018.
- [M24] **Marinescu, M.R.**, Șerban B., Dumbrăvescu, N., Avramescu, V., Cobianu, C., Buiu, O., *Carbon-based materials for healthcare micro-devices*, Nonconventional Technologies Review, **vol. 23**, no. 4, pp. 72-77, 2019.
- [M25] **Marinescu, M.R.**, Șerban, B.C., Cobianu, C., Dumbrăvescu, N., Ionescu, O., Buiu, O., Ghiculescu, L.D., *"Mechanical properties of carbon-based nanocomposites for sensors used in biomedical applications"* – UPB Sci. Bull., Series B, **vol. 83**, Iss. 1, pp. 31-42, 2021.
- [M27] Marshall D., *The Coulter Principle: Foundation of an Industry*, JALA: Journal of the Association for Laboratory Automation, **vol. 8**, no. 6, pp. 72-81, 2003.
- [M30] Mărculescu, C., Bala, C.M., Avram, A., Avram, M., *Analyzing microfluidic devices using numerical modeling*, U.P.B. Sci. Bull., Series D, **vol. 76**, no. 2, 2014.
- [M32] McLaughlin, E., Breaux, L., *Chemical Mineralogy - Smelting and Metallization*, Ed. Nova Science Publishers, Inc., 2009.
- [M33] McMillan, B., *Marele atlas ilustrat al corpului uman*, Ed. Litera, 2017.
- [M37] Moldovan, C., *Microsenzori integrați pe siliciu și tehnologii de microprelucrare*, Ed. Electronica 2000, 2004.
- [O3] Olson, S., *The role of human factors in home health care*, The National Academies Press, 2010.
- [P7] Pinto, V.C., Sousa, P.J., Cardoso, V.F., Minas, G., *Optimized SU-8 processing for Low-Cost Microstructures Fabrication without Cleanroom Facilities*, Micromachines, **vol. 5**, no. 3, pp. 738-755, 2014.
- [P10] Prime Faraday Partnership, *An Introduction to MEMS*, Ed. Prime Faraday Partnership, 2003.
- [R2] Rebello, K.J., *Applications of MEMS in surgery*, Proceedings of the IEEE, **vol. 92**, no. 1, pp. 43-55, 2004.
- [R4] Ruiz, G.P., Kristin, De Meyer, Witvrouw, A., *Poly-SiGe for MEMS - above - CMOS sensors*, Ed. Springer, pp. 1-23. 2014.
- [S5] Shah, K.A., Tali, B.A., *Synthesis of carbon nanotubes by catalytic chemical vapour deposition: A review on carbon sources, catalysts and substrates*, Materials Science in Semiconductor Processing, **vol. 41**, pp. 67-82, 2016.
- [S12] Stamatin, I., *Nanomateriale aplicații în biosenzori, surse de energie, medicină, biologie – Elemente de nanotehnologie*, Editura Universității din București, 2008.
- [S13] Stan Dana, Mihăilescu Carmen Marinela, Rădulescu Clara Hortensia, *Procedeu de funcționalizare electrochimică a unor electrozi interdigitate pentru detectia antigenului receptor de suprafața CD4+ al subpopulațiilor de limfocite T-CD4+*, DDS Diagnostic SRL, Nr. Cerere brevet A 2018 00572.
- [S14] Stanimirovic, Z., Stanimirovic, I., *Mechanical properties of MEMS materials*, Micro Electronic and Mechanical Systems (Rijeka: Intech), capitolul 11, pp. 165-176, 2009.
- [Ș1] Șerban, B.C., Buiu, O., Avramescu, V., Ionescu, O.N., Cobianu, C., **Marinescu, R.**, Pachiu, C., *Senzor chemirezistiv de umiditate pe bază de nanohornuri carbonice oxidate*, IMT București, CBI: A/00443/22.07.2019.
- [Ș2]. Șerban, B. C., Buiu, O., Cobianu, C., Avramescu, V., Dumbrăvescu, N., Brezeanu, M., Bumbac, M., Nicolescu, C.M., **Marinescu, R.**, *Ternary Carbon-Based Nanocomposite as Sensing Layer for Resistive Humidity Sensor*, in Multidisciplinary Digital Publishing Institute Proceedings, **vol. 29**, no. 1, pp. 114, 2019.
- [T1] Tănăsescu, F.T., Stefanescu, Ghe., Ilie, C., Popa, M., Dumitru, S., *Încercări de performanță pentru caracterizarea unui dispozitiv MEMS*, Buletinul AGIR, **vol. 4**, pp. 97-102, 2015.



- [Z2] Zhang, J.X.J., Hoshino, K., in *Molecular Sensors and Nanodevices: Fundamentals of nano/microfabrication and scale effect*. *Molecular Sensors and Nanodevices*, pp. 43–111, Academic Press, 2019.
- [Z4] Zhang, X., Mariano, C.F., Ando, Y., Shen, K., *Bioengineering tools for probing intracellular events in T lymphocytes*, Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine (WIREs), pp. e1510 (1-28), 2020.
- [Z7] Zhou, W., Bridges, D., Li, R., Bai, S., Ma, Y., Hou, T., Hu, A., *Recent progress of laser micro- and nano manufacturing*, Science Letter Journal, vol. 5, no. 228, 2016.
- [\*9] \*\*\* Institutul National de Cercetare – Dezvoltare in Microtehnologie – IMT Bucuresti: www.imt.ro, Echipamente ale Institutului, disponibile la: [https://www.imt.ro/echipamente/characterization\\_tools.htm](https://www.imt.ro/echipamente/characterization_tools.htm), accesat la data de 09.08.2017.
- [\*16] \*\*\*IMT București, proiect *Cellimmunochip*, disponibil la: [https://www.imt.ro/cellimmunochip/rezultate\\_etapaIII.html](https://www.imt.ro/cellimmunochip/rezultate_etapaIII.html), accesat la data de 03.02.2021.
- [\*17] \*\*\*TGE-PLAT/IMT Bucureti, *Ofertă de expertiză, servicii și echipamente pentru domeniile: microsenzori, componente fotonice, dispozitive și sisteme pentru unde milimetrice*, Ed. INCD pentru Microtehnologie – IMT București, publicat la data de Iunie 2018, disponibil la: [https://www.imt.ro/TGE-PLAT/doc/Brosura\\_TGE-PLAT\\_iunie2018.pdf](https://www.imt.ro/TGE-PLAT/doc/Brosura_TGE-PLAT_iunie2018.pdf), accesat la data de 09.12.2020
- [\*18] \*\*\*Azo materials, *Glass substrates and wafers for MEMS applications*, publicat la data de 05.10.2010, disponibil la: <https://www.azom.com/article.aspx?ArticleID=5433>, accesat la data de 03.04.2018.
- [\*19] \*\*\*FED-STD-209E, *Federal standard: airborne particulate cleanliness classes in cleanrooms and clean zones* (11 Sep. 1992) / [S/S BY ISO14644-1 and ISO14644-2], disponibil la: [http://everyspec.com/FED-STD/FED-STD-209E\\_21739/](http://everyspec.com/FED-STD/FED-STD-209E_21739/), accesat la data de 10.05.2021
- [\*20] \*\*\**Sângele - compoziție, rol, analize medicale de laborator*, disponibil la: <https://bioclinica.ro/pentru-pacienti/hematologie-1/sangele-compozitie-rol-analize-medicale-de-laborator>.
- [\*23] \*\*\*Semiconductor Wafer Inc (SWI) Taiwan, produse disponibile la: <http://www.semiwafer.com/>, accesat la data de 20.05.2020.
- [\*27] \*\*\*Suss MicroTec, echipamente disponibile la: <https://www.suss.com/en>, accesat la data de 23.03.2019.
- [\*28] \*\*\*J.P. Selecta S.A., echipamente disponibile la: <https://grupo-selecta.com/fr/>, accesat la data de 23.03.2019.
- [\*29] \*\*\*Leica Microsystems, echipamente disponibile la: <https://www.leica-microsystems.com/products/>, accesat la data de 23.03.2019.
- [\*31] \*\*\*Heraeus, echipamente disponibile la: <https://www.heraeus.com/en/group/home/home.html>, accesat la data de 23.03.2019.
- [\*32] \*\*\*Technology readiness levels (TRL), disponibil la: [https://ec.europa.eu/research/participants/data/ref/h2020/wp/2014\\_2015/annexes/h2020-wp1415-annex-g-trl\\_en.pdf](https://ec.europa.eu/research/participants/data/ref/h2020/wp/2014_2015/annexes/h2020-wp1415-annex-g-trl_en.pdf), accesat la data de 05.05.2021.
- [\*33] \*\*\*IMT București, proiect Cancellab, disponibil la: <https://www.imt.ro/cancellab/rezultate.php#2016>, accesat la data de 11.12.2017.
- [\*34] \*\*\*Ocean Insight, echipamente disponibile la: <https://www.oceaninsight.com/support/software-downloads/>, accesat la data de 04.05.2021.
- [\*35] \*\*\*Torrey Piness Scientific, echipamente disponibile la: <https://www.torreypinesscientific.com/>, accesat la data de 03.02.2021.
- [\*36] \*\*\* Definiții TRL, disponibil la: [https://uefiscdi.gov.ro/userfiles/file/PNCIDI%20III/P2\\_Cresterea%20competitivitatii%20economiei%20rom%20anesti/TRL.pdf](https://uefiscdi.gov.ro/userfiles/file/PNCIDI%20III/P2_Cresterea%20competitivitatii%20economiei%20rom%20anesti/TRL.pdf), accesat la: 28.06.2021
- [\*37] \*\*\* U.S. Department of Energy, *Technology Readiness Assessment Guide*, Disponibil la: <https://www.directives.doe.gov/directives-documents/400-series/0413.3-EGuide-04a>, accesat la data de: 28.06.2021.
- [\*38] \*\*\*ThermoFisher - eBioscience™ 1X RBC Lysis Buffer, Disponibil la: <https://www.thermofisher.com/ro/en/home.html>, accesat la data de: 20.01.2019.
- [\*39] \*\*\*Yole Developpement, *COVID-19: Yole's analysts point out the impacts on the bioMEMS industry*, Disponibil la: [http://www.yole.fr/BIOMEMS\\_MarketUpdate.aspx](http://www.yole.fr/BIOMEMS_MarketUpdate.aspx), accesat la data de: 25.06.2021.

## ANEXA 1. LISTĂ ABREVIERI

### • Generale

ADN - acid deoxiribonucleic  
ADP - adenzin difosfat  
ATP - adenzin trifosfat  
anti-CD3+, CD4+, CD8+ - anticorpi specifici CD3+, CD4+, CD8+  
anti-EpCAM - anticorpi anti-EpCAM  
bioMEMS - MEMS cu funcții biologice integrate  
CE - "Counting Electrode" - electrod de numărare  
CI - "Integrated Circuits" - circuite integrate  
*CIRP - Comitetului Internațional pentru Cercetare în Productică*  
Citometrie POC - citometrie "Point Of Care" – citometrie în punct de îngrijire  
CNHs - "Carbon Nanohorns" - nanohornuri carbonice  
CNTs - "Carbon Nanotubes" - nanotuburi carbonice  
CTC - "Circulating Tumor Cells" - celulele tumorale circulante  
DI - "Deionized Water" - apă deionizată  
DRIE - "Deep Reactive Ion Etching" – corodare adâncă cu fascicule de ioni  
EBM - "Electron Beam Machining" - tehnologii de prelucrare specifice cu fascicul de electroni  
EIS - "Electrochemical Impedance Spectroscopy" - spectroscopie de impedanță electrochimică  
EpCAM - "Epithelial Cell Adhesion Molecule" - molecula de adeziune a celulelor epiteliale  
FEM - "Finite Element Method" – metoda elementelor finite  
GaP - "Gallium Phosphide" - fosfură de galiu  
GaAs - "Gallium Arsenide" - arseniură de galiu  
GaSb - "Gallium Antimonid" - antimoniură de galiu  
GID - "Gold Interdigitated Electrodes" - electrozi de aur interdigitați  
GOD - glucozoxidază  
GO - "Graphene Oxide" - oxid de grafenă  
GQDs - "Graphene Quantum Dots" - puncte cuantice de grafenă  
HIV - virusul imunodeficienței umane  
HPR 504 - fotorezist pozitiv denumit HPR 504  
HPRD - soluție pentru dezvoltare  
HSQ - hidrogen silsesquioxan  
IDA/IDE - electrozi interdigitați  
IBM - "Ion Beam Machining" - tehnologii de prelucrare specifice ionilor  
IDT - structuri interdigitate  
*IMT - Institutul Național de Cercetare-Dezvoltare pentru Microtehnologie – IMT București*  
LOC - dispozitive Lab-On-a-Chip  
LBM - "Laser Beam Machining" - tehnologii de prelucrare specifice laserului  
LCVD - "Laser Chemical Vapor Deposition" - laser cu depunere chimică din fază de vapori  
LED - "light-emitting diode" - diodă electro luminescentă  
MEMS - Sisteme-Micro-Electro-Mecanice  
NEMS - Sisteme-Nano-Electro-Mecanice  
NK - limfocite Natural Killer  
ODEP - dielectroforeză indusă optic  
oxCNH – nanohornuri de carbon oxidate  
PBS - "Phosphate Buffered Saline" - tampon fosfat salin  
PDMS - Polidimetilsiloxan/dimeticon  
PDGF - "Platelet Derived Growth Factor" - factorul de creștere derivat din trombocite  
PG - biomolecule proteice  
PM - Plasma Machining - tehnologii de prelucrare specifice plasmei  
PMMA - "Polymethyl methacrylate" – polimetacrilat de metil  
PVDF - "Polyvinylidene fluoride" - fluorură de poliviniliden  
rGO - oxid de grafenă redus  
RBC - "Red Blood Cells" Celulele roșii din sânge

RE - "Reference Electrode" - Electrode de referință  
RIE - "Reactive Ion Etching" – Corodare ionica reactiva  
SU-8 - fotorezist negativ denumit SU-8  
USM - "Ultra Sound Machining" - tehnologii de prelucrare specifice ultrasunetelor  
UV - lumină ultraviolet  
WBC - "White Blood Cells" - celulele albe din sânge  
WE - "Working Electrode" - electrod de lucru

• **Parametrii**

A - masa atomică  
 $A_s$  - abaterea superioară  
 $A_i$  - abaterea inferioară  
 $C_{dl}$  - capacitatea stratului dublu electric  
d - distanța dintre sarcini  
E - intensitatea câmpului electric  
f - frecvența  
G - gravitația  
I - intensitatea curentului  
K - factorul Clausius- Mossotti  
RMS - „Root Mean Square” - rădăcină medie pătrată  
 $R_{ct}$  - rezistența de transfer electronic la interfață  
 $R_{ct0}$  - rezistența transferului de sarcină pentru electrolit  
 $R_{cti}$  - rezistența transferului de sarcină corespunzătoare fiecărei concentrații  
S - suprafața interfeței  
t - timpul  
 $t_a$  - timpul de atac chimic  
U - tensiunea de accelerare  
u - viteza fluidului  
V - potențial electric  
Z - impedanța  
 $Z_{re}$  - impedanța reală  
 $Z_{im}$  - impedanța imaginară  
 $\epsilon$  - permitivitatea electrică a mediului  
 $\sigma$  - conductivitatea electrică  
 $\eta$  - indicele de refracție  
 $\phi$  - defazajul  
 $\delta$  - adâncimea de pătrundere  
 $\mu$  - vâscozitatea dinamică

• **Soluții**

CD - *Cluster de diferențiere (se referă la un fenotip celular)*  
CD 3+ - grup de diferențiere 3  
CD 4+ - grup de diferențiere 4  
CD 8+ - grup de diferențiere 8  
anti -CD3 - anticorpi ai clusterului de diferențiere CD3  
anti -CD4 - anticorpi ai clusterului de diferențiere CD4  
anti -CD8 - anticorpi ai clusterului de diferențiere CD8  
BSA - albumină serică bovină  
HPRD 402 - dezvoltant pentru fotorezist pozitiv  
LOR 10B – fotorezist denumit LOR 10B  
PG - proteina G  
PVP - polivinilpirolidonă  
SAMs - soluții mixte