Seria *„Studii și cercetări”*

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

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

– SHORT DESCRIPTION –

Technology represents the processes, methods and operations used to obtain a particular product. Microelectronics and nanoelectronics are two areas with a significant contribution to technological progress.

The research-development-innovation activities within the two fields, have produced valuable results of reference for the current work: micro-electro-mechanical systems (MEMS).

MEMS are miniaturised systems with small dimensions and weights that can be easily integrated into various commercial applications. These small aids with high technology are increasingly present in our daily lives. Innovative structures allow us to control the environment better and help us increase the energy efficiency of devices. All the applications in the current era, Industry 4.0 (the fourth industrial revolution), integrate sensing devices, data processing and transmission, and actuation devices.

Within the work entitled **"Manufacturing processes of micro-electro-mechanical systems with applications in medicine"**, a "lab-on-a-chip" type device was designed, modelled, simulated and manufactured, with the help of which it can be identified and measured blood T lymphocyte concentrations.

Therefore, the work can be included in the field of bioengineering. In this branch of science, concepts are developed from the molecular level to the systemic level, with the role of developing new biological products, materials and medical devices for the diagnosis, prevention and treatment of diseases, as is the case of the device resulting from this work. The field of medical engineering is closely related to the following subfields: biomechanics, biomaterials, electronics, mechatronics, biophysics, medical imaging, telemedicine, nanotechnology, cellular engineering and genetics; therefore, it is a field with evident multidisciplinary character.

The micro-electro-mechanical devices in the present work were made within the National Institute for Research and Development in Microtechnologies – IMT Bucharest.

Dr. ing. Maria-Roxana MARINESCU

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

Seria *„Studii şi cercetări”*

Editura AGIR
București, 2023

ASOCIATIA GENERALA A INGINERILOR DIN ROMANIA

Copyright © Editura AGIR și autorii, 2023
Editură acreditată de CNCSIS

Toate drepturile asupra acestei ediţii
sunt rezervate Editurii AGIR și autorilor

Editura AGIR
Calea Victoriei, nr. 118, sector 1,
010093 Bucureşti;
Tel.: 4021-3168992, 4021-3168993
Fax: 4021-3168992
e-mail: editura@agir.ro; www.agir.ro

Această carte reprezintă publicarea tezei de doctorat cu titlul „Procese de fabricație a sistemelor micro-electro-mecanice cu aplicații în medicină”, elaborată de Dr. ing. Marinescu Maria-Roxana, sub conducerea prof. univ. dr. habil. ing. Liviu-Daniel Ghiculescu, în cadrul UPB, SD IIR, anul 2021 (OM Nr. 5999/30.12.2021), cu opțiune de publicare sub formă de carte conform art. 35 din Regulamentul UPB.

Descrierea CIP a Bibliotecii Naţionale a României
MARINESCU, MARIA-ROXANA
Procese de fabricație a sistemelor micro-electro-mecanice cu aplicații în medicină / Maria-Roxana Marinescu. - Bucureşti : Editura A.G.I.R., 2023
ISBN 978-973-720-903-0
62

Îngrijire editorială: **Dan BOGDAN**
Coperta: **Mihai GĂZDARU**

Bun de tipar: 10.09.2023
ISBN 978-973-720-903-0

Prefață

Microelectronica și nanoelectronica sunt două ramuri ale electronicii care se ocupă cu proiectarea, fabricarea și utilizarea dispozitivelor electronice de dimensiuni mici (micronice), respectiv foarte mici (nanometrice). Aceste tehnologii joacă un rol esențial în dezvoltarea tehnologiilor emergente, cum ar fi inteligența artificială, robotica, energia regenerabilă și medicina personalizată și ele permit crearea de dispozitive electronice mai puternice, mai eficiente și mai precise, care pot fi utilizate pentru a rezolva o gamă largă de probleme.

Rolul microelectronicii în dezvoltarea dispozitivelor micro-electro-mecanice („Micro-Electro-Mechanical-Systems" – MEMS) a fost esențial. Microelectronica a furnizat tehnologiile și instrumentele necesare pentru a crea dispozitive MEMS, care sunt dispozitive mecanice miniaturizate fabricate folosind procese de microfabricare. Unele dintre cele mai importante contribuții ale microelectronicii la dezvoltarea MEMS includ:

- *Procese de microfabricare: microelectronica a furnizat o serie de procese de microfabricare care pot fi utilizate pentru a crea dispozitive MEMS. Aceste procese includ fotolitografia, gravura și depunerea.*
- *Materiale: microelectronica a dezvoltat o serie de materiale care sunt potrivite pentru fabricarea MEMS. Aceste materiale includ siliciul, siliciul amorf, metalele și ceramica.*
- *Instrumente de măsurare: microelectronica a dezvoltat o serie de instrumente de măsurare care sunt necesare pentru a caracteriza dispozitivele MEMS. Aceste instrumente includ microscoapele și instrumentele de măsurare a forței și a deplasării.*

Fără aceste contribuții ale microelectronicii, MEMS nu ar fi fost posibile. Tehnologia MEMS datează din 1964, odată cu producerea primului dispozitiv de tip MEMS: tranzistorul cu poartă rezonantă proiectat de H.C. Nathanson. MEMS au devenit o tehnologie importantă, cu o gamă largă de aplicații, inclusiv:

- *Senzori: senzori de presiune, senzori de temperatură și senzori de mișcare.*
- *Actuatori: micropompe, micromotoare și microservomotoare.*
- *Dispozitive medicale: implanturi medicale, dispozitive de imagistică medicală și sisteme de terapie.*
- *Aplicații industriale: sisteme de control al proceselor și sisteme de măsurare.*

Aceste sisteme de mici dimensiuni și tehnologie înaltă sunt prezente din ce în ce mai mult în viaţa noastră cotidiană, în absolut tot ceea ce ne înconjoară. 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 dispozitive de „sensing", prelucrare și

transmitere de date, precum și dispozitive de acționare. Toate ramurile economiei au fost atinse de modernizare, aspectul principal fiind atingerea unor performanțe funcționale îmbunătățite, automatizarea diferitelor procese tehnologice, caracteristici de performanță, precum şi gestionarea în timp real a diferitelor operaţii tehnologice sofisticate. A patra revoluție industrială este caracterizată de utilizarea tehnologiilor digitale pentru a conecta obiecte fizice și pentru a crea sisteme inteligente care pot auto-organiza și auto-optimiza. Internet of things (IoT) este o tehnologie esențială pentru această revoluție, deoarece permite conectarea unui număr mare de obiecte fizice la internet. IoT este deja utilizată într-o varietate de aplicații, în domeniile: monitorizarea mediului, sănătate, fabricație, transport.

Având în vedere uriașele avantaje ale noilor dispozitive MEMS cu aplicații în medicină, devenite tot mai complexe sub formă de bioMEMS-uri, care satisfac la un nivel tot mai ridicat cerințele societății, este de înțeles cererea din ce în ce mai crescută pe care o înregistrează.

Necesitatea unor dispozitive bioMEMS cu structuri mai complexe și cu proprietăți noi, cât și tendința de diminuare a dimensiunilor modulelor constituente, a utilizării eficiente a materialelor, precum și a creșterii rentabilității prin reutilizarea lor, care să aducă soluții nevoilor societății în domeniul medical, reprezintă motivația și direcția cercetărilor, finalizate prin prezenta lucrare.

În cadrul lucrării ***„Procese de fabricație a sistemelor micro-electro-mecanice cu aplicații în medicină”*** *a fost proiectat, modelat, simulat și fabricat un dispozitiv de tip „lab-on-a-chip”, cu ajutorul căruia pot fi identificate și măsurate concentrațiile de limfocite T din sânge.*

Din această perspectivă, lucrarea poate fi încadrată în domeniul bioingineriei medicale. Bioingineria explorează organismele vii de la nivel molecular la nivel sistemic, cu scopul de a dezvolta produse biologice noi, materiale și dispozitive medicale pentru diagnostic, prevenire și tratament, cum este și cazul dispozitivului rezultat din această lucrare.

Lucrarea prezintă rodul activității de cercetare realizată de autoare. Dispozitivele micro-electro-mecanice din cadrul lucrării au fost realizate în cadrul Institutului Național de Cercetare - Dezvoltare pentru Microtehnologie – IMT București, unde a găsit în permanență înțelegere și susținere. Mulțumiri deosebite se adresează Conducerii și Colegilor din Institutul Național de Cercetare-Dezvoltare pentru Microtehnologie – IMT București (IMT), fără al căror sprijin nu aș fi putut desfășura cercetările specifice și realiza dispozitivele cuprinse în această lucrare.

Gândurile mele de profundă recunoștință se îndreaptă către domnul dr. fiz. Miron Adrian DINESCU, director general IMT, și doamna dr. fiz. Raluca MULLER, care m-au susținut și încurajat să îmi dezvolt orizontul științific și să realizez mereu mai mult.

Aceleași gânduri de profundă recunoștință se cuvine să adresez domnului dr. fiz. Octavian BUIU, director științific IMT și șeful Laboratorului L7, în cadrul căruia îmi desfășor activitatea, care m-a încurajat și m-a susținut pe calea noilor realizări științifice, finalizate prin brevetare.

Sincere mulțumiri colegilor de laborator (L7): dr. ing. Bogdan-Cătălin ȘERBAN, dr. ing. Octavian Narcis IONESCU, ing. Nicolae DUMBRĂVESCU și celorlalți colegi din IMT, care m-au sprijinit pe parcursul realizării lucrării: dr. fiz. Andrei AVRAM, drd. Corneliu VOIȚINCU, dr. Bianca ȚINCU, dr. Tiberiu Alecu BURINARU, dr. Eugen CHIRIAC, dr. Alina MATEI, dr. Vasilica ȚUCUREANU, dr. Cătălin MĂRCULESCU, dr. Cătălin PÂRVULESCU, fiz. Gabriel CRĂCIUN.

Mulțumesc colegilor care lucrează în departamentele tehnologice, pentru tot sprijinul tehnic și pentru toată răbdarea.

Mulțumesc tuturor celor care prin intervenții directe, sugestii și informații m-au ajutat pe parcursul realizării lucrării.

Și nu în ultimul rând, mulțumesc familiei mele pentru sprijinul moral și profesional acordat în diverse etape ale elaborării lucrării, pentru înțelegerea acordată, mulțumesc părinților mei, care m-au susținut necondiționat, m-au îndrumat și m-au ajutat să înțeleg ce este important în viață.

Un gând pios de recunoștință se îndreaptă către tatăl meu, prof. univ. dr. ing. Niculae-Ion MARINESCU, plecat mult prea devreme dintre noi, dar care mi-a fost mereu alături și m-a îndrumat cu dragoste, profesionalism și maximă competență.

Dr. ing. Maria-Roxana MARINESCU

Cuprins

1. CONCEPTE TEORETICE PRIVIND SISTEMELE MICRO-ELECTRO-MECANICE 13

1.1. Clasificarea componentelor sistemelor micro-electro-mecanice 17
1.1.1. Microsenzori 18
1.1.2. Microactuatori 18
1.1.3. Microsisteme integrate 19
1.2. Sisteme micro-electro-mecanice cu funcții biologice integrate 20
1.3. Efecte ale mediului înconjurător asupra sistemelor micro-electro-mecanice 24

2. MATERIALE FOLOSITE PENTRU FABRICAREA SISTEMELOR MICRO-ELECTRO-MECANICE 25

2.1. Materiale utilizate ca substrat 26
2.2. Materiale utilizate pentru depuneri 29

3. TEHNOLOGII DE FABRICARE A SISTEMELOR MICRO-ELECTRO-MECANICE 31

3.1. Fotolitografia 31
3.1.1. Considerații generale 31
3.1.2. Fenomene specifice și factorii de performanță ai fotolitografiei 32
3.1.3. Aplicații specifice privind tehnica fotolitografiei 34
3.1.4. Instalații și echipamente pentru procesul de fotolitografie 36
3.2. Tehnologii de microprelucrare chimice 39
3.2.1. Considerații generale 39
3.2.2. Fenomene specifice și factorii de performanță ai prelucrării prin corodare chimică 40
3.2.3. Aplicații specifice privind corodarea 42
3.3. Tehnologii de prelucrare cu laser 43
3.3.1. Considerații generale 43
3.3.2. Fenomene specifice ale prelucrării cu laser 44
3.3.3. Aplicații specifice ale laserului 46
3.3.4. Instalații și echipamente laser 47
3.4. Tehnologii de prelucrare cu fascicule de electroni 49
3.4.1. Considerații generale 49

3.4.2. Fenomene specifice 50
3.4.3. Aplicații specifice 51
3.4.4. Instalații și echipamente de prelucrare cu fascicule de electroni 52
3.5. Tehnologii de prelucrare cu fascicule de ioni 53
3.5.1. Considerații generale 53
3.5.2. Fenomene fizico-chimice la prelucrarea cu fascicule de ioni 53
3.5.3. Aplicații ale prelucrării cu fascicule de ioni 54
3.5.4. Echipamente și instalații 55
3.6. Tehnologii de prelucrare cu plasmă 56
3.6.1. Considerații generale 56
3.6.2. Fenomene specifice 57
3.6.3. Aplicații specifice 58
3.6.4. Echipamente și instalații 59

4. MICROFLUIDICA ȘI DISPOZITIVELE „LAB-ON-A-CHIP” 61
4.1. Microfluidica folosită pentru separarea celulelor 61
4.1.1. Clasificarea și numărul celulelor din sânge 62
4.1.2. Importanța limfocitelor din sânge 66
4.2. Construcția dispozitivelor microfluidice 68
4.3. Tipuri de circuite microfluidice 70
4.4. Stadiul actual al dispozitivelor „Lab-On-a-Chip” 71
4.4.1. Dispozitive „Lab-On-a-Chip” pentru determinarea limfocitelor T 76
4.4.2. Dispozitive „Lab-On-a-Chip” pentru determinarea celulelor tumorale circulante 79

5. OBIECTIVELE, DIRECȚIILE DE CERCETARE ȘI METODOLOGIA ABORDATE 83
5.1. Sinteza aspectelor critice privind stadiul actual al sistemelor micro-electro-mecanice cu aplicații în medicină 83
5.2. Obiectivele lucrării 85
5.3. Direcții de cercetare și metodologia de cercetare a lucrării 87

6. CERCETĂRI PRIVIND PROIECTAREA, MODELAREA ȘI SIMULAREA UNUI DISPOZITIV MICRO-ELECTRO-MECANIC DE DETERMINARE A LIMFOCITELOR T, MODEL EXPERIMENTAL ... 89
6.1. Date generale 89
6.2. Stabilirea funcțiilor și structurii funcționale ale produsului 90
6.3. Date tehnologice obținute în laborator 94

6.4. Stabilirea formei traseelor microfluidice 95
6.5. Proiectarea dispozitivului micro-electro-mecanic, model experimental 97
6.4. Modelarea procesului de fabricație a dispozitivului micro-electro-mecanic, model experimental 114
6.5. Modelarea și simularea computerizată a curgerii microfluidice în dispozitivul micro-electro-mecanic, model experimental 124

7. FABRICAREA UNUI DISPOZITIV MICRO-ELECTRO-MECANIC, MODEL EXPERIMENTAL 128

7.1. Scrierea măștilor 128
7.2. Fabricarea propriu-zisă a dispozitivului, model experimental 131
7.2.1. Placheta de siliciu folosită ca substrat 132
7.2.1. Depunerea stratului de oxid de siliciu 133
7.2.3. Fotolitografia pentru prima mască 135
7.2.4. Depunerea stratului de titan-aur 141
7.2.5. Îndepărtarea fotorezistului prin lift-off pentru prima mască 143
7.2.6. Procesul de fotolitografie pentru a doua mască 145
7.2.7. Depunerea stratului de argint 146
7.2.8. Îndepărtarea fotorezistului prin lift-off pentru a doua mască 146
7.2.9. Procesul de fotolitografie pentru a treia mască 154
7.2.10. Depunerea capacului de polidimetilsiloxan 161

8. CLASIFICAREA ALIMENTELOR. CRITERII ŞI TIPOLOGII 165

8.1. Metodologia de testare 165
8.2. Verificarea trecerii curentului electric 168
8.3. Spectroscopia de impedanță electrochimică 169

9. Fabricarea și testarea prototipului îmbunătățit al dispozitivului micro-electro-mecanic 177

9.1. Probleme apărute la fabricarea dispozitivului micro-electro-mecanic, model experimental 177
9.2. Îmbunătățiri ale procesului de fabricație a dispozitivului micro-electro-mecanic 178
9.2.1. Îmbunătățiri ale depunerii argintului 178
9.2.2. Îmbunătățiri necesare pentru creșterea aderenței fotorezistului SU-8 179
9.3. Realizarea prototipului îmbunătățit al dispozitivului micro-electro-mecanic 179
9.3.1. Proiectarea dispozitivului micro-electro-mecanic, prototip îmbunătățit 180

9.3.2. Modelarea procesului de fabricație a dispozitivului micro-electro-mecaanic, prototip îmbunătățit 187
9.3.3. Procesul de fabricație a măștilor 192
9.3.4. Execuția dispozitivului micro-electro-mecanic, prototip îmbunătățit 194
9.4. Testarea prototipului îmbunătățit al dispozitivului micro-electro-mecanic 201
9.4.1. Stabilitatea senzorilor 202
9.4.2. Testarea curgerilor microfluidice 204
9.4.3. Testarea funcționalității senzorilor cu ajutorul spectroscopiei de impedanță electrochimică 205
9.5. Integrarea cipului microfluidic într-un dispozitiv portabil 207
9.6. Teste mecano-climatice de fiabilitate pentru dispozitivul micro-electro-mecanic 209
9.7. Realizarea unui senzor de umiditate pentru monitorizarea condițiilor de păstrare a dispozitivului micro-electro-mecanic 216

10. CONCLUZII 227

BIBLIOGRAFIE 230

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 câţiva micrometri la câţiva 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].

Acronimul pentru sistemele micro-electro-mecanice - **MEMS** („Micro Electro Mechanical Systems") a fost oficial adoptat în anul 1989 de către Dr. Albert P. Pisano în cadrul unei conferințe științifice. Acesta a folosit termenul MEMS pentru prima dată cu scopul de a descrie structurile rezonante fabricate ce puteau fi utilizate în stabilizatoarele de frecvențe. Termenii asociați cu **MEMS** variază foarte mult, de la „atomi MEMS", "tehnologii microsystems" până la "dispozitive de microprelucrare". Tehnologia de realizare a MEMS a devenit omniprezentă și reprezintă acea tehnologie dezvoltată din industria circuitelor integrate (CI) cu scopul de a crea senzori și actuatori miniaturali [S16], [P5], [P10].

Nanotehnologia reprezintă **tehnologia bazată pe posibilitatea de a realiza structuri complexe, până la specificații la nivel atomic prin auto-asamblare sau manipulare, folosind sinteza mecanică**. Ea are scopul de a construi dispozitive extrem de mici - spre exemplu roboți - cu proprietăți îmbunătățite sau diferite de structurile de dimensiuni macroscopice [D1], [*3].

MEMS-urile fac parte din ramura Nanotehnologiei, ele realizându-se folosind elemente de ordinul nano și micro. **„Nanotehnologie"** este un termen generic ce reprezintă dezvoltările tehnologice la o scară foarte mică, nanometrică, ce lucrează cu atomi și molecule, care este denumită nanoscală. În sens restrictiv reprezintă știința materialelor ale căror proprietăți depind de dimensiuni [M6], [*1], [E1]. Nanotehnologiile gestionează materiale cu dimensiuni la scara nanometrilor, între 1 şi 100 nm. Nanoparticulele cuprinse în această scară pot fi observate folosind microscoape cu fascicule de electroni și de ioni, precum și microscoape de forță atomică. În Fig. 1.1 sunt prezentate exemple ce definesc această scară. Proiectarea, caracterizarea, producerea și aplicarea structurilor, dispozitivelor și sistemelor se realizează prin controlul formei și mărimii la scară „nanometrică" [*2], [C3].

Micro-prelucrarea definește, în general, procesele care produc suprafețe ale căror dimensiuni sunt în intervalul de la 1 la 999 μm, conform Colegiul Internațional de Cercetare în Productică - CIRP [M28].

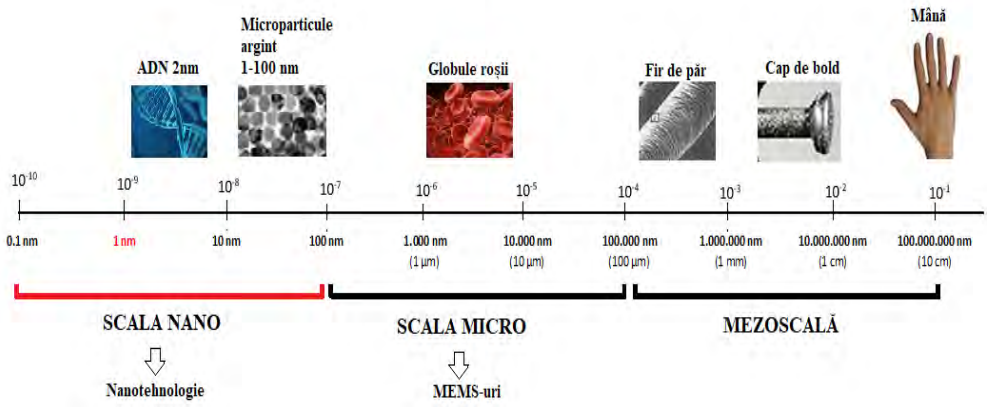


Fig. 1.1. Micro și Nano scală [adaptată după *2]

Nevoia de nano-fabricare este determinată atât de necesitatea unor dispozitive și a unor structuri hibride cu proprietăți noi, cât și de tendința de diminuare a dimensiunilor modulelor constituente, a utilizării eficiente a materialelor, precum și a consumului mic de energie [Z2].

În ceea ce privește metodele de nano-fabricare, au fost cercetate și aplicate anumite tehnologii neconvenționale, pentru realizarea cu succes a prelucrărilor în domeniul micro și nano [C20].

Dintre principalele avantaje ale miniaturizării, se menționează: dimensiunile reduse; îmbunătățirea preciziei și a fiabilității; obținerea de costuri reduse la performanță crescută; consum redus de energie și de materiale; creșterea selectivității și a sensibilității; gestionarea termică îmbunătățită; invazivitate minimă; gamă dinamică largă; exploatarea de noi efecte; dispozitivele odată miniaturizate devin în general portabile [M6], [M21].

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. Câteva dintre aceste exemple cu utilizare din ce în ce mai extinsă sunt [M20]:

- **Electronică/Multimedia:** cuptoare cu microunde, congelatoare, maşini de spălat, camere fotografice/video, televizoare, jocuri multimedia, sisteme de securitate, tablete, sisteme de încălzire autonomă etc.
- **Calculatoare/Birotică:** monitoare, imprimante, dispozitive FAX, tastaturi PC, agende electronice, stick-uri USB, drivere, scanere etc.

- **Telecomunicaţii, reţele:** telefoane mobile, sisteme de comutaţie automate, routere, radare, interfoane, componente ale rețelelor cu fibră-optică etc.
- **Autovehicule/Echipamente transport:** control navigaţie – GPS, geamuri electrice, climatizare, afişaj bord, iluminare, airbag, blocare uşi, reglare viteză, navigaţie marină, submarine etc.
- **Tehnologie spaţială:** sateliţi, rachete teleghidate, explorare spaţială, calculatoare de ghidare pentru rachete etc.
- **Tehnică industrială de măsurare şi control:** osciloscoape digitale cu memorie, analizoare, multimetre, clești ampermetrici, scopmetre etc.
- **Tehnică medicală:** monitorizarea semnalelor fiziologice, prelucrarea datelor, diagnosticarea pacienților, radiaţii, implanturi, ultrasunete etc. [S2], [S3].

Biologia și **medicina** sunt două dintre cele mai importante și extinse domenii de cercetare a științelor vieții. **Biomedicina** reprezintă domeniul interdisciplinar bazat pe transferul principiilor metodologice dintre cele două domenii. Faptul că domeniul biomedical se află în strânsă legătură cu standardul de viață a condus la aprofundarea aplicațiilor acestuia.

Ingineria biomedicală studiază aparatura utilizată în biologie și în medicină pentru investigații, terapie, sau monitorizare. Totodată, sunt studiate principiile și tehnicile care stau la baza exploatării acestei aparaturi [S4].

Ultimii douăzeci de ani au fost marcați de o creștere substanțială a complexității echipamentelor și dispozitivelor utilizate în domeniul medical datorate evoluției tehnologiilor „micro” și „nano”, ce oferă susținere în toate etapele specifice actului medical: diagnostic, investigații clinice, proceduri chirurgicale invazive și non-invazive, monitorizare, tratamente, recuperare fizică și neuromotorie [B15]. Microtehnologia nu cunoaște limite, ea se află într-o continuă creștere, fiind una dintre tehnologiile cheie care susține comportamentul pentru o viață mai sănătoasă [E1].

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 redate în Fig. 1.2 [B14], [Z2].

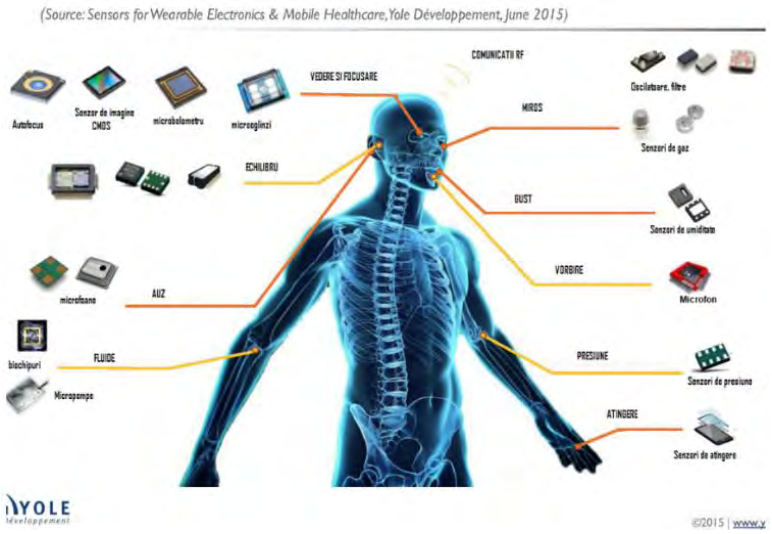


Fig. 1.2. Dispozitive MEMS folosite de om [B14]

MEMS-urile sunt implicate deja în evenimente marcante ale perioadei actuale, precum: rețelele 5G, vehiculele autonome și chiar criza pandemiei de COVID 19. Conform raportului Departamentului de Dezvoltare Yole „MEMS and sensors revenue market in B$", din anul 2015 până în anul 2021 se poate remerca o creștere considerabilă a veniturilor rezultate din piața MEMS-urilor și a senzorilor (Fig. 1.3).

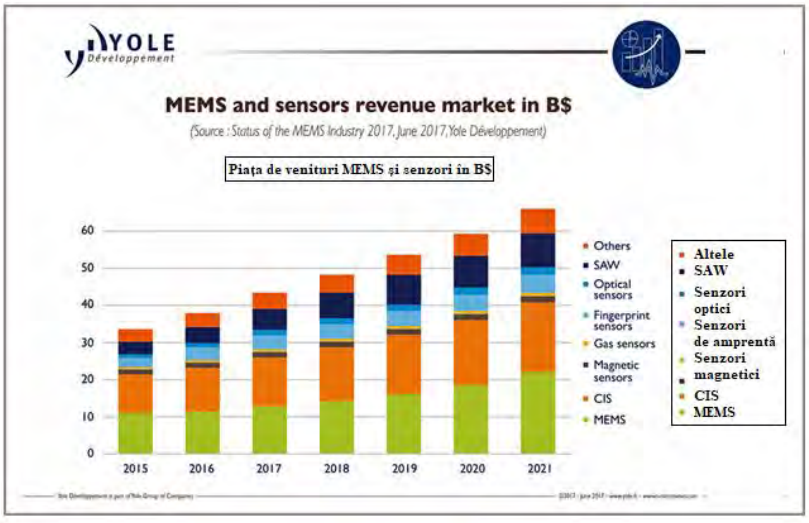


Fig. 1.3. Venituri ale pieței MEMS-urilor și senzorilor [*3]

Acest progres tehnologic are un rol important în dezvoltarea tuturor industriilor. Tehnologiile de mici dimensiuni sunt adoptate de către aproape toate domeniile și disciplinele.

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 proprietăţi speciale (fero-, piezo- etc.) (Fig. 1.4).

Utilizând procesele microtehnologice specifice: joncțiune anodică, joncțiune metalică, joncțiune activă cu plasmă, lipire adezivă, lipire cu diferite materiale de topire etc. se realizează integrarea acestor elemente pe același substrat. De obicei, substratul comun este reprezentat de o plachetă de siliciu. După ce structura MEMS este sigilată, sunt necesare conexiuni electrice pentru interconectarea structurii încapsulate [P10], [M32], [Z7], [M37].

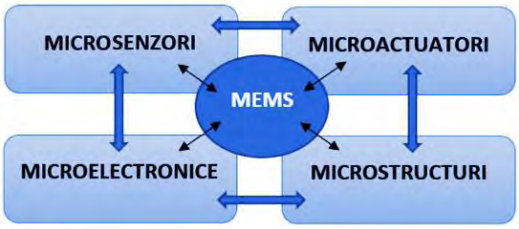


Fig. 1.4. Componentele MEMS

Un **microsistem** combină cel puțin două din următoarele domenii cu parametrii fizici corespunzători [M6], [M21]:

- **Mecanic** - forță, presiune, viteză, accelerație, poziție etc.
- **Termic** - temperatură, căldură, flux de căldură etc.
- **Chimic** - concentrație, compoziție, viteză de reacție etc.
- **Radiații** - intensitate, fază, lungime de undă, polarizare, reflexie, indicele de refracție, frecvențe în domeniile ultraviolet, vizibil, infraroșu etc.
- **Magnetic** - intensitatea câmpului, momentul magnetic, permeabilitate etc.
- **Electric** - tensiune, curent, rezistență, capacitate.

Cu ajutorul tehnologiilor utilizate în realizarea circuitelor integrate se obțin și componentele electronice; utilizând tehnologiile de microfabricație, care constau din

succesiuni de mai multe operații, cum ar fi: corodare, adăugare de straturi, înlăturare de straturi - „straturile de sacrificiu” etc. se obțin componentele micromecanice [C5].

1.1.1. Microsenzori

Microsenzorii sunt dispozitive ce detectează schimbările dintr-un anumit mediu, preiau informaţia și prin măsurare mecanică, termică, magnetică, chimică sau informație electromagnetică generează un semnal proporţional cu mărimea măsurată (semnal electric).

Ei sunt clasificați în diferite variante: după natura semnalului, a materialului selectiv sau după nivelul de semnal. Senzorii sunt folosiți în primul rând pentru a observa efectele temporare ale mediului. Aceștia fac posibilă obținerea informațiilor în timp real cu ajutorul simțurilor, despre acele elemente care se pot palpa, mirosi, vedea sau auzi. Senzorii pot înregistra și elemente nedectabile (nocive sau folositoare) [S12]. Dintre cele mai importante exemple de senzori se menționează: senzori de temperatură, umiditate, care măsoară nivelul apei, fumului şi gazului, pentru tensiune şi intensitatea curentului, mişcare, flux de aer, senzori mecanici care măsoară forța, presiunea, efortul unitar, deplasarea, viteza sau accelerația pe scala atomică, moleculară, subțire sau în vrac [S2], [M37].

1.1.2. Microactuatori

Un microactuator este un servomecanism microscopic care furnizează și transmite o cantitate controlată de energie pentru funcționarea unui alt mecanism sau sistem. Acesta realizează conversia unui semnal de natură diferită, spre exemplu electric sau termic din mediul înconjurător pentru a efectua anumite funcții [S12], [P10]. Microactuatorii au o gamă largă de aplicații: micropompe, microvalve (utilizate în medicină), proteze mecanice, microgrippere (elemente de strângere, folosite pentru micro-manipulare precum micropensetele, care sunt printre cele mai utile inovații folosite **în** microchirurgie MEMS) etc. [K2]. Astfel de exemple semnificative sunt prezentate în Fig. 1.5 - 1.7.

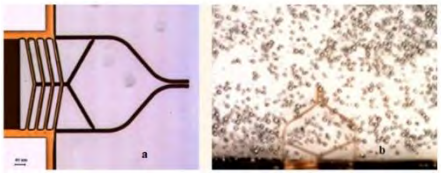


Fig. 1.5. Micropensete a) imagine optică a micropensetei fabricată din SU-8 și aur b) prinderea micro-elementelor [*4]



Fig. 1.6. Micropompă cu angrenaj rotativ [A11]

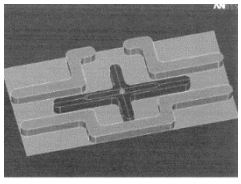


Fig. 1.7. Selector de înaltă presiune [A10]

Noii microactuatori lărgesc gama de aplicații, întrucât au la bază alte principii de funcționare decât actuatorii clasici (microactuatori electrostatici, electro-magnetici, piezoelectrici). Acești noi actuatori se bazează pe acționări directe, fără a mai utiliza transmisia mecanică [S12].

1.1.3. Microsisteme integrate

Circuitul integrat (CI) este acel dispozitiv **electronic** care este utilizat la transformarea și prelucrarea semnalelor. El este realizat printr-un proces tehnologic unic și reprezintă un tot unitar, care cuprinde elementele de circuit. Acesta este încorporat într-o incintă etanșă. Pentru operații în timp real, majoritatea sistemelor electromecanice dinamice sunt interfațate cu circuite electronice necesare, unități și subsisteme. Acestea au încorporat un aparat matematic, circuite logice, registre și unități de memorie, convertor de la sistemul analog la digital și convertor de la sistemul digital la analog, unități de conversie paralel-serie și serie-paralel, amplificator, filtru etc. [C2], [S12]. Circuitele integrate se clasifică în funcţie de:

a) modul de prelucrare a informaţiei:

– *Circuite integrate analogice*: procesează diferite semnale – continue, cu variație continuă în timp, cu variație continuă în frecvență; ele pot amplifica, modula, sau demodula semnalele; pot fi realizate folosind componente discrete, precum diode, condensatori, inductori și tranzistori;

– *Circuite integrate digitale*: procesează semnalele discontinue; pot realiza calcule matematice;

– *Circuite integrate de interfață*: procesează semnale analogice și numerice; ele fac conexiunea dintre echipamentele analogice și digitale [C5].

b) tipul tehnologiei de realizare:

– *Circuite integrate monolitice* sunt acele cristale semiconductor - „cipuri”, care conțin în structura lor toate componentele schemei (diode, rezistoare, tranzistoare etc.).

– *Circuite integrate hibride* - asemănătoare celor monolitice, dar acestea conțin și componente ce sunt dificil de fabricat cu tehnologia monolitică [B6].

Prin urmare, senzorii sunt integrați sistemic. MEMS-urile procesează informația primită de la senzori și transmit un semnal **microactuatorilor** pentru a reacționa și a crea niște schimbări mediului. Aceste valori vor fi calibrate, având scopul de a obține informații relevante. Astfel, senzorii integrați împreună cu electronica de prelucrare a semnalului, formează un sistem [M37], [S12].

1.2. SISTEME MICRO-ELECTRO-MECANICE CU FUNCȚII BIOLOGICE INTEGRATE

De-a lungul anilor, numeroasele aplicații ale sistemelor micro-electro-mecanice au dus la împărțirea MEMS-urilor în diverse categorii. Una din multiplele direcții de dezvoltare a MEMS-urilor este reprezentată de bionanotehnologie și bioMEMS-uri. Termenul "**bioMEMS**" este utilizat pentru a face referire la știința și tehnologia din domeniile biologic și medical. Domeniul medical este cel pe care se va concentra lucrarea în continuare.

Bionanotehnologia reprezintă știința multidisciplinară care utilizează procese din nano/microfabricație și aplică instrumentele specifice acestor procese, cu scopul de a construi dispozitive în vederea studierii biosistemelor, biosenzorilor, a anumitor tipuri de celule, a nanoparticulelor inspirate din biologie, a celulelor de combustie microbiene, ridicarea profilului metabolismului, microbilor sau a tipurilor noi de markeri [S12], [P10].

Tipurile de aplicații biosenzoriale în care o combinație eficientă de MEMS și materiale de interfață pot avea un impact global major, includ dispozitive de diagnostic ce măsoară rapid semnăturile și modelele celulare, genetice și proteomice, în comparație cu analiții singuri [S2].

Prin **biodispozitiv**, se înțelege un ansamblu de elemente active, reprezentate de părți electrice, biologice, mecanice, optice (ex. traductoare, amplificatoare, de caracterizare etc.) și a unor elemente de conectare cu mediul extern (ex. terminale, microcanale, de alimentare cu biolichid). Biodispozitivul poate avea funcții complexe. Acesta poate fi realizat din componente diferite, fiecare îndeplinind o sarcină distinctă. Atunci când este construit doar pentru a detecta o anumită substanță poartă numele de **biosenzor** [A11], [S12].

Biosenzorul este un dispozitiv integrat autonom, sensibil la stimuli fizici sau chimici, ce utilizează un element de recunoaștere biologică (receptor biochimic), capabil să recepționeze substanțe (bioreacția) și să transforme aceste informații în date „tehnice" standardizate. Astfel, se poate face cuantificarea din analog în digital. Elementul de recunoaștere biologică poate fi bazat pe o reacție chimică. Biosenzorii au capacitatea de a fi calibrați în mod repetat. Aceștia se delimitează de un sistem bioanalitic, care necesită etape suplimentare de procesare, cum ar fi adăugarea reactivului [S12], [S17].

Biosenzorii și nanotehnologia s-au impulsionat reciproc în dezvoltare. La ora actuală, cu ajutorul biosenzorilor, se pot realiza diagnosticări moleculare. Se utilizează în mod curent imagistica moleculară și platformele de diagnostic [S12].

Biosenzorii pot fi clasificați în funcție de specificitatea biologică a acestora, după mecanism sau alternativ, după modul de transducție fizico-chimică a semnalului. Biosenzorii mai pot fi clasificați în funcție de analizele sau reacțiile pe care le monitorizează. Clasificarea se poate face prin monitorizarea directă a

concentrației de analit (substanța care se analizează) sau prin reacțiile care produc sau consumă astfel de analit; în mod alternativ, poate fi obținută o monitorizare indirectă a unui inhibitor sau a unui activator al elementului de recunoaștere biologică (receptor biochimic) [S12].

Istoria senzorilor chimici și biologici a început când Dr. Clark a introdus conceptul de biosenzor în 1962 prin invenția sa, numită electrod de glucoză, fiind considerat astfel "părintele biosenzorilor". De atunci, introducerea și dezvoltarea multor tipuri de tehnologii de senzori au fost din ce în ce mai rapide [S2].

Leland C. Clark Jr. (4.12.1918 - 25.11.2005) este biochimistul devenit celebru după inventarea electrodului Clark, un dispozitiv folosit pentru măsurarea oxigenului în sânge, apă și alte lichide. Cercetările sale stau la baza dezvoltării primului dispozitiv de tip senzor utilizat pentru a determina rapid cantitatea de glucoză din sânge. Pentru a calibra senzorul, Clark a adăugat soluției o enzimă glucozoxidază (GOD), după care a continuat dezvoltarea acestuia. Cu ajutorul senzorului, pacienții pot să își monitorizeze singuri nivelul de zahăr din sânge zilnic. Acest lucru permite ca analizele de glucoză să fie cele mai testate. Electrodul Clark este un instrument cheie atât în medicină cât și în monitorizarea mediului. Astăzi, determinarea nivelului de glucoză din sânge s-a transformat într-o testare simplă a glicemiei (Fig. 1.8) [M21], [W3].

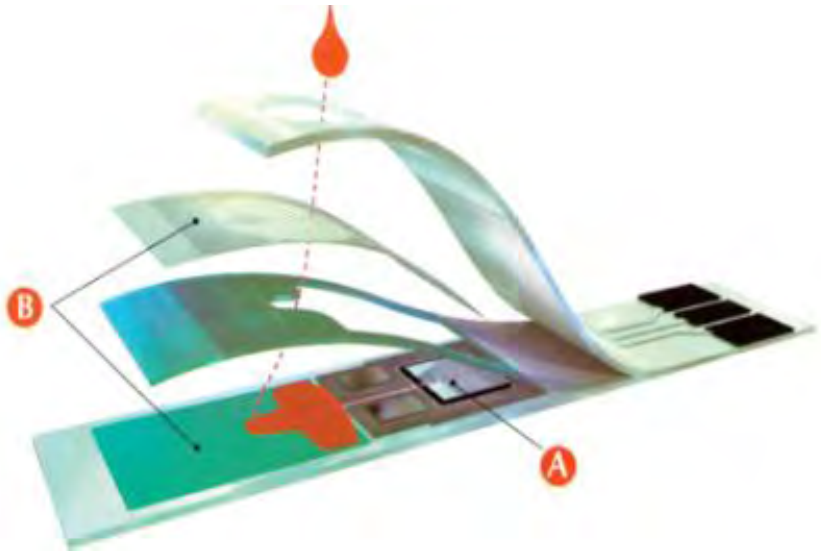


Fig. 1.8. Secțiunea transversală a unei benzi comerciale pentru auto-testare a glucozei din sânge (pe baza biosenzorului de precizie fabricat de Abbott Inc.):
(A) sistem de electrozi; (B) strat hidrofob [W3].

În Tabelul 1.1 sunt prezentate unele dintre cele mai semnificative descoperiri tehnologice din domeniul senzorilor chimici și biologici.

Tabelul 1.1. **Tipuri de senzori [S2]**

Tipuri de senzori	Inventator	Anul
Electrodul pH din sticlă	Hughes	1922
Electrodul de oxigen	Clark	1954
Electrodul de dioxid de carbon	Stow si Randall	1954
Electrodul de glucoză	Clark	1962
Senzorul potențiometric	Guilbault	1969
Imunosenzorul	Janata	1975
Optozii	Lubbers	1975
Senzori de afinitate optici	Schultz	1979
Tehnologii bazate pe cipuri	Fodor	1991

Biosenzorii aparțin categoriei generale a MEMS-urilor, dar sunt cel mai des folosiți și se dezvoltă în domeniul **medical**. Sunt folosiți și la prelucrarea produselor alimentare; detectarea bacteriilor, a virușilor și a toxinelor biologice pentru apărarea biologică [S2]. Dintre aplicațiile curente ale chemosenzorilor și ale biosenzorilor, se menționează:

- **Ingineria auto**: sisteme de monitorizate, de alimentare cu combustibil și pentru emisiile de gaze;
- **Industria de apărare:** aplicații industriale, măsuri de apărare împotriva armelor biologice și armelor chimice;
- **Industria aeronautică:** aplicații pentru monitorizarea calității aerului în aeronave;
- **Industria agricolă:** detecția calității și compoziției solului și plantelor;
- **Industria chimică:** aplicații pentru monitorizarea emisiilor toxice, testarea materialelor;
- **Securitatea civilă:** detecția scurgerilor de gaze;
- **Industria de mediu și protecția mediului:** detecția poluanților din aer, apă și sol, controlul detergenților;
- **Industria medicală:** echipamente folosite pentru diagnosticare, stabilirea concentrației de gaze utilizate în anestezie, terapie intensivă etc.
- **Control vamal:** detecția substanțelor periculoase (droguri, explozivi, radioactive);
- **Industria alimentară:** stabilirea compoziției chimice, a nivelului de alterare, verificarea fermentației etc.

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 (Fig. 1.9). Factorii tehnologici sunt reprezentați de senzori ce colectează informațiile despre parametrii 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 (Fig. 1.10) [M24].

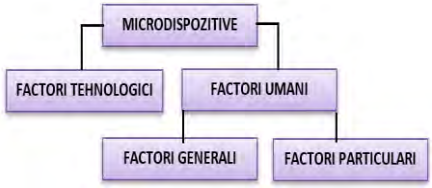


Fig. 1.9. Categoriile de factori la dezvoltarea microdispozitivelor [M24]

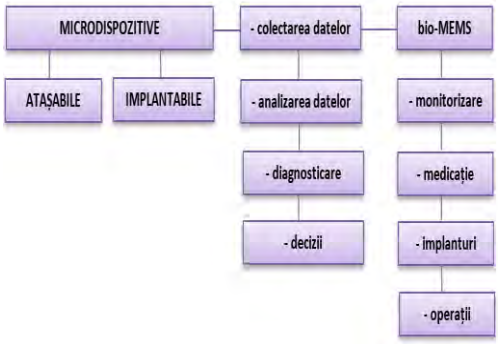


Fig. 1.10. Microdispozitive și bioMEMS [M24]

- ***Dispozitive atașabile***

Acest tip de dispozitive nu sunt implantate chirurgical. Ele sunt aparate simple, portabile, care colectează date relevante pentru sănătatea diverșilor subiecți. Acestea pot colecta date importante în ceea ce privește sănătatea, deoarece pielea oferă o importantă cale pentru diagnostic și opțiuni terapeutice pentru întregul corp [B1]. Dintre cele mai cunoscute bioMEMS-uri atașabile folosite în medicina modernă, se menționează aparatul auditiv, ortoprotezele și chiar dispozitivele pentru detectarea glicemiei [M24].

- ***Dispozitive implantabile***

Nanoroboții sunt cele mai cunoscute dispozitive din categoria dispozitivelor implantabile, având numeroase aplicații în ceea ce privește ingineria biomedicală și sistemele fluidice [W5]. Roboții microscopici pot pătrunde insesizabil în corpul uman și se pot deplasa în interiorul acestuia [S12]. Ei reprezintă componente mici, foarte fiabile, care pot trece prin artere sau vene [B9]. Nanoroboții pot fi injectați în organism cu ajutorul unei seringi standard cu ac hipodermic**.** Odată intrați în sistem, aceștia reacționează la impulsurile exercitate cu ajutorul unui câmp magnetic și al unei telecomenzi [*1], [S11].

Aceste mecanisme sunt folosite în medicină, deoarece pot efectua anumite sarcini medicale imposibil de realizat în alte condiții. Aceste dispozitive pot fi propulsate autonom, sau sub acțiunea unei forțe externe, către ținta specifică. Prin controlarea lor de la distanță sunt capabile să se deplaseze prin corpul omenesc, să diagnosticheze afecțiunile și să le trateze [B3], [Z8]. O invenție asemănătoare constă în aparatul de fotografiat ingerabil – PillCam. Aparatul realizează fotografii ale

tractului gastrointestinal, care permit depistarea leziunilor și polipilor. Astfel, sunt înlocuite investigațiile endoscopice [*5].

Investigațiile, monitorizările sau chiar tratamentele de ultimă oră sunt realizate cu ajutorul unor aparate miniaturizate, înglobate în capsule care pot fi înghițite de pacienți și care pătrund în circulația sangvină a acestora [M21], [Q1], [C7].

1.3. EFECTE ALE MEDIULUI ÎNCONJURĂTOR ASUPRA SISTEMELOR MICRO-ELECTRO-MECANICE

MEMS-urile prezintă atât oportunități unice de piață cât și provocări majore în ceea ce privește procesul de fabricație. Dispozitivele de tip MEMS trebuie adesea să fie expuse mediului, dar totodată au nevoie să fie protejate de factorii de mediu, cum ar fi: șocuri mecanice, vibrații, accelerație ridicată, particule, alți factori de mediu (temperatură, umiditate). La dimensiunile mici ale structurilor MEMS, apar atât efecte fizice interne (ex. frecarea statică, datorită distanței foarte strânse a elementelor micro), cât și efecte externe, precum temperatura, umiditatea și contaminarea cu particule care pot deteriora dispozitivele sau pot afecta fiabilitatea lor pe termen lung. Ca și în cazul dispozitivelor mecanice, coroziunea și uzura pot afecta performanțele dispozitivelor în timp. Îmbătrânirea componentelor utilizate în procesul de fabricație poate provoca în cele din urmă disfuncționalități ale acestor dispozitive complexe [B7], [M21].

Una dintre etapele cele mai dificile din dezvoltarea dispozitivelor de tip MEMS este cea prin care se verifică modul în care solicitările mediului afectează parametrii și de a compensa în continuare aceste efecte. De aceea, este recomandat ca după fabricarea dispozitivului, acesta să fie supus unor teste fie mecanice, termice sau o combinație între acestea [M25]. Un exemplu bine cunoscut este cel al oboselii mecanice. Aceasta reprezintă degradarea progresivă a materialului și apare în structuri supuse unor oscilații sau solicitări ciclice. Pentru a analiza rezistența și durata de viață, se pot efectua teste de ciclare termică sau vibrații [B5].

Ori de câte ori se dezvoltă un produs nou, acesta nu poate fi lansat pe piață fără a fi testat în condiții cât mai apropiate de cele reale. Aceste produse trebuie să ofere atât siguranță, cât și calitate, cu alte cuvinte, respectarea cerințelor clienților.

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].

Materialele utilizate în construcția microdispozitivelor sunt cercetate intens în literatura de specialitate folosind abordări diferite. Se studiază atât corelația dintre materiale și dispozitive, cât și importanța materialelor în tehnologia miniaturizată. 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].

Doar câteva materiale îndeplinesc cele trei cerințe pentru utilizarea MEMS, și anume: proprietăți mecanice și electrice adecvate, adaptabilitate la tehnologia de fabricație a semiconductorilor și proprietăți care limitează dezvoltarea tensiunilor în timpul micro-prelucrării. Dintre aceste materiale fac parte: siliciul (Si) [A9], diamantul, oxidul de siliciu (SiO_2), aluminiul (Al), cuprul (Cu), nichelul (Ni), titanul (Ti), fotorezistul denumit SU-8, poliamida, polimetacrilat de metil ("Polymethyl methacrylate" - PMMA), florură de poliviniliden ("Polyvinylidene fluoride" - PVDF).

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

(a) materiale utilizate ca substrat;

(b) materiale utilizate pentru depunere.

Caracterizarea materialelor se realizează din perspectiva determinării proprietăților structurale și a proprietăților lor funcționale. În condiții normale, majoritatea materialelor se prezintă sub formă solidă (temperaturi și presiuni

obișnuite). După distribuția particulelor atomice, moleculare, sau ionice, se regăsesc trei stări structurale. Acestea sunt: starea cristalină, starea amorfă și starea mezomorfă [P9], [P10].

Procesul de fabricare generic, cu etapele principale, care cuprinde atât materiale utilizate ca substrat cât și materiale folosite pentru depunere este prezentat în Fig. 2.1.

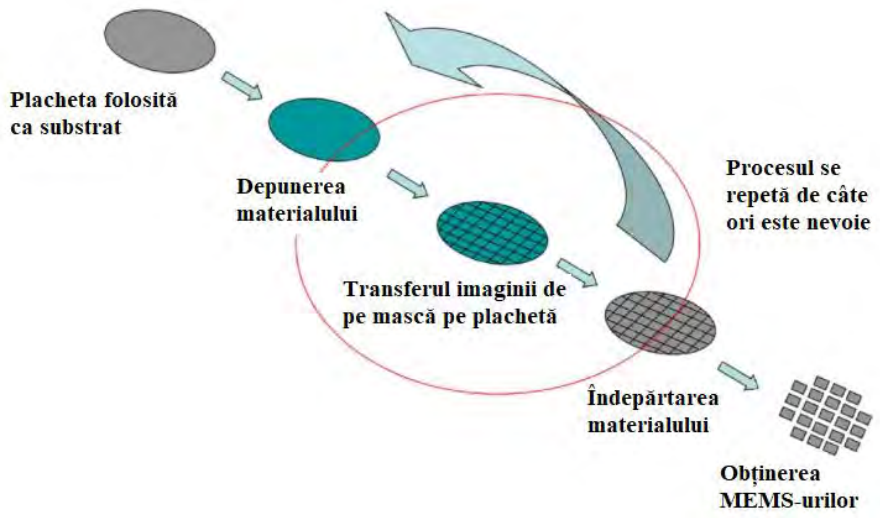


Fig. 2.1. Etape de fabricație pentru MEMS [*2]

Aceasta este o exemplificare simplă de realizare a MEMS-urilor cu un singur material de depunere, dar în realitate, procesele de fabricare sunt mult mai complexe.

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]. Acesta face parte din categoria metaloizilor și a fost prima dată identificat de J. Berzelius în anul 1823, sub forma unui cristal covalent. Siliciul prezintă o structură de tip diamant și are rețea cristalină cubică [A9]. Solidul cristalin prezintă domenii întinse de ordine sau o configurație (structură de rețea) care se repetă în aranjarea atomilor. Particulele din rețeaua cristalină sunt reprezentate în Fig. 2.2 [M6], [R5].

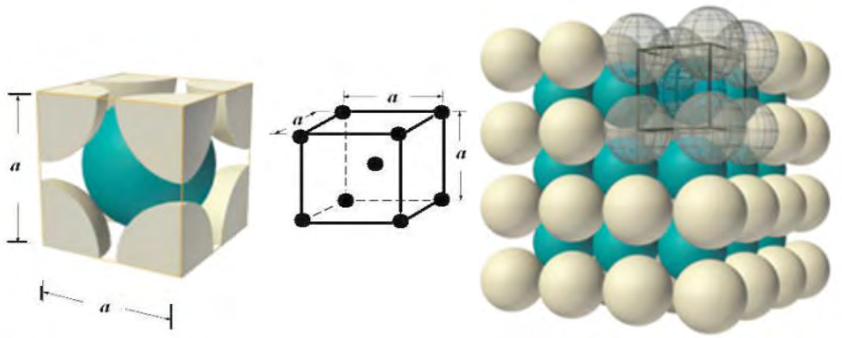


Fig. 2.2. Reprezentarea simbolică a unui cristal [adaptată după A9]

Materialul de bază folosit în tehnologia sistemelor micro-electro-mecanice este siliciul. Acesta este folosit la realizarea microsenzorilor începând cu anul 1950. La acel moment, s-au descoperit proprietățile sale speciale și anume: coeficienți piezorezistivi mai ridicați decât cei ai traductoarelor tensometrice metalice, ceea ce îl face să fie cel mai utilizat material în cadrul tehnologiilor de microsisteme [P10].

Tehnologia de obținere a plachetelor de siliciu este o tehnologie foarte bine pusă la punct, de la cristalizare, formare de lingouri și obținere de plachete. În plus de aceasta, proprietățile sale electrice și electronice îl recomandă ca unul dintre cele mai utilizate substraturi pentru dezvoltarea de dispozitive și circuite electronice. Siliciul are proprietăți electronice, termice și mecanice excelente și poate fi obținut în plachete („wafer") de dimensiuni mari (diametre: 5-20 cm (8 inch)) pentru grosimi cuprinse între 250 - 500 μm. În construcția MEMS-urilor, siliciul este utilizat în trei forme: cristalin; amorf (a-Si) și policristalin. Duritatea unei componente mecanice realizată pe siliciu depinde de orientarea cristalografică, de geometrie, de numărul și de dimensiunea suprafețelor, a marginilor, de defectele de volum, de stresul indus și acumulat în timpul proceselor de creștere și superfinisare. Forma amorfă a siliciului, cu structură neregulată, conține numeroase defecte. El se poate depune în straturi subțiri de maximum 5 μm [I3], [P9].

Acesta este recomandat ca substrat mecanic pentru unele caracteristici importante: este unul dintre cele mai răspândite elemente de pe planetă, după oxigen; are o calitate bună la un preț scăzut; procesarea este bazată pe depunerea de straturi subțiri, ce pot fi utilizate pentru construirea de structuri microprelucrate 3D (membrane, punți, grinzi în console etc.); tehnicile fotolitografice permit realizarea de structuri bine definite cu dimensiuni mici; prelucrarea siliciului se pretează la producții de masă, circuitele integrate și dispozitivele sunt procesate simultan în număr foarte mare (ceea ce determină creșterea marjei de profit prin scăderea costului de fabricație); este larg răspândit în fabricarea circuitelor integrate; are proprietăți electrice ușor de controlat; este obținut în formă cristalină cu costuri scăzute și prezintă bune proprietăți mecanice. Siliciul poate fi utilizat pentru un mare număr de componente. Puritatea foarte mare a siliciului și structura cristalină optimizează

proprietățile mecanice. Este rezistent la acțiunea acizilor, cu excepția acidului fluorhidric (HF). Contrar aparenței, siliciul este un material fragil**.** El poate fi prelucrat ușor pentru realizarea cipurilor, dar este foarte sensibil la solicitări mecanice [P10], [R5].

Oxidul de siliciu este folosit ca izolator, având constanta dielectrică de 9,8. Obținerea unui strat subțire de oxid de siliciu pe siliciu se poate realiza prin diverse metode: creștere din fază de vapori la temperaturi înalte, depunere prin intermediul unor reacții din fază gazoasă, prin oxidare electrochimică sau prin intermediul reacțiilor în plasmă. În practică, cea mai folosită metodă este oxidarea termică [Z2].

Pentru realizarea MEMS-urilor, pe lângă siliciu (Fig. 2.3) se pot utiliza și alte materiale:

- cuarț;
- sticlă;
- polimeri;
- materiale ceramice;
- metale.

Cuarțul este utilizat în primul rând datorită proprietăților sale piezoelectrice. El este un mineral dur și se utilizează în general sub formă de cuarț produs sintetic.\

Sticla și polimerii sunt frecvent utilizați ca materiale de substrat pentru fabricarea dispozitivelor MEMS microfluidice – bioMEMS. Sticla este utilizată ca substrat într-o gamă largă de aplicații MEMS, precum: senzori de presiune, unități de măsurare inerțiale, analize ADN, senzori implantabili etc. Aceasta este preferată ca substrat datorită suprafeței sale de înaltă calitate, în care nu apar deteriorări, iar în cazul în care acestea apar, ele sunt minore, oferind astfel o performanță superioară pentru lipirea anodică (tehnologia folosită pentru lipirea materialelor componente ale dispozitivului) (Fig. 2.4) [*18].

Carbura de siliciu („silicon carbide” – SiC) (Fig. 2.5) este un material ceramic avansat ce conține siliciu și carbon. Acesta este folosit, cu precădere, în realizarea de dispozitive electronice de putere, permițând o funcționare normală la temperaturi mai ridicate, în același timp cu o mai bună disipare a căldurii [Z5], [*23].



Fig. 2.3. Plachete de Si [*23]

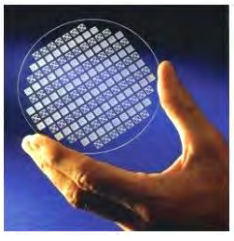


Fig. 2.4. Placheta de sticlă [*18]



Fig. 2.5. Plachete de SiC [*23]



Fig. 2.6. Plachete de GaP [*23]

Galiul (Ga) a fost unul dintre primele metale utilizate pentru construcția plachetelor folosite ca substrat. Alte materiale semiconductoare folosite sunt: arseniură de galiu („gallium arsenide" - GaAs), fosfură de galiu („gallium phosphide" - GaP) (Fig. 2.6), antimoniură de galiu („gallium antenomid" – GaSb) [*23], [P10].

2.2. MATERIALE UTILIZATE PENTRU DEPUNERI

Construcția MEMS-urilor include și depunerea substraturilor de materiale. Aceste straturi subțiri se pot realiza din materiale organice, ceramice, metalice, magnetice și compozite. Caracterizarea acestor materiale se poate face efectuând diferite măsurători. Se efectuează măsurători noncontact prin care se determină constantele optice, grosimea și compoziția chimică [S12].

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-ridicată [B4], [S5], [K5], [M24], [M18], [M19] [Ș2]. Totodată, s-a constatat că se pot realiza combinații de materiale pe bază de carbon. Dintre aceste materiale, se menționează: **grafena** și derivatele sale, **oxid de grafenă** - GO, **oxid de grafenă**

redus - rGO, **puncte cuantice de grafenă –** GQDs, **nanohornurile carbonice** și **nanotuburile carbonice** [M25].

Grafena este considerată blocul de bază al tuturor formelor grafitice. Aceasta are un singur strat de atomi de carbon sub formă de fagure bidimensional [G1]. Este cunoscută ca fiind cel mai subțire material din univers dar și cel mai puternic material măsurat vreodată. Are o bună flexibilitate și ductilitate și totodată prezintă proprietăți optice, mecanice și electrice remarcabile care îl fac versatil pentru diferite aplicații [G2], [M31], [S1], [Ș4]. Grafena este un material sensibil la variația pH-ului, și astfel, interacțiunea sa cu corpul uman este foarte bună, fiind utilizată frecvent în fabricarea dispozitivelor medicale [S16], [Ț1].

Grafena există sub mai multe forme, cum ar fi „graphene nanoribbon", „nanosheets", „nanoplates" și grafena 3D [Ț2]. Aceasta a fost folosită ca strat senzitiv pentru microfabricarea dispozitivelor din domeniul medical. Printre cele mai semnificative dispozitive din ultimii ani, se pot enumera dispozitive ce pot detecta: celulele bacteriene salmonela [S9], norovirusul [C8], cancerul [W8], [A3], [K3], anumite pesticide ce pot afecta sistemul nervos [I5] și multe altele.

Nanohornurile carbonice ("carbon nanohorns" - CNH) aparțin familiei de alotropi de carbon. Acestea au o structură tubulară cu diametrul de 2-5 nm și lungimea de 40-50 nm [P8]. CNH-urile pot fi oxidate în aer [F1] prin tratare cu apă oxigenată [Z3] sau cu acizi [Y2]. Acest tip de materiale sunt de natură hidrofilă și sunt ușor dispersabile în apă și solvenți organici, precum etanolul, alcoolul izopropilic etc. Datorită acestui fapt, funcționalizarea lor chimică este imperativă [M24].

Nanotuburile de carbon ("carbon nanotubes" - CNT) fac parte din familia fulerenelor, ce au forma unor molecule cilindrice care constau în foi laminate de atomi de carbon cu un singur strat (grafen). Printre proprietățile acestora se enumeră: greutate redusă, rezistență înaltă și conductivitate mărită. CNT-urile dețin proprietăți unice în ceea ce privește proprietățile electrice și termice [K1]. Totodată, sunt foarte stabile, netoxice pe cale orală, nonimunogene și relativ inerte [S7], [M24].

Datorită caracteristicilor lor unice, cum ar fi faptul că sunt foarte ușoare, dar foarte puternice (rezistență mecanică), prezintă conductivitate electrică ridicată sau faptul că pot fi ușor modificate chimic, nanostructurile pe bază de carbon pot fi considerate materialele cu un potențial uriaș privind tehnologiile de nouă generație [M13].

Dintre materialele studiate în literatura de specialitate, fac parte oxidul de zinc (ZnO) [C16], [A1], dioxidul de titan (TiO2) [C1], [R1], [I6], [A2] și polimerii [B2], [L2]. S-a constatat faptul că toate aceste materiale au proprietăți remarcabile, iar combinarea lor cu materiale carbonice le face să fie folosite cu succes ca materiale pentru depunere în construcția MEMS-urilor.

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 şablon (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.** Acest proces poartă și denumirea de **fotolitografie**. Fotolitografia este cea mai folosită formă a litografiei. Dacă în trecut, era o tehnică specifică atribuită exclusiv microelectronicii, la ora actuală a devenit o tehnică folosită atât în microprelucrarea sistemelor micro-electro-mecanice (MEMS), cât și a sistemelor microfluidice.

3.1. FOTOLITOGRAFIA

3.1.1. Considerații generale

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 **fotorezişti** („photoresist" sau „resist") și permit erodarea materialului situat în afara zonei de protecție [M2], [M20]. Fotorezиștii se găsesc în stare lichidă sau solidă şi pot fi depuși prin: imersie, pulverizare sau picurare [M5]. Aceștia sunt sensibili la lumina ultravioletă, dar nu și la lumina obișnuită. Este indicat să se evite atât lumina fluorescentă puternică cât și lumina solară.

Fotorezistul are trei componente:

– rășina, care asigură stabilitatea structurală și rezistență la gravare;

– partea fotosenzitivă (numită și partea fotoactivă);

– solventul, care transformă fotorezistul din formă solidă în formă lichidă.

Protejarea zonelor se realizează cu ajutorul măștilor. **Măştile** reprezintă **suporţi fizici** (**șabloane/fotoșabloane**) pe care se obține modelul ce urmează a fi transferat pe substrat. Construcția și materialul din care se realizează șabloanele se aleg în funcţie de proprietățile/caracteristicile radiaţiei care este utilizată pentru transfer. Fotomăştile se realizează din sticlă specială sub forma unei plăci plane, pe care se desenează modelul dorit cu crom sau gelatină. O mască foarte frecvent utilizată este cea de Cr / Au, unde stratul de Cr este utilizat pentru a îmbunătăți aderența aurului la sticlă. Măștile pot fi pozitive sau negative. Pe măștile pozitive, desenele sunt realizate prin zone opace la radiație, pe fond transparent. La măștile negative, reprezentarea formelor se face prin zone transparente pe fond opac [A11], [M5], [M20], [M11].

3.1.2. Fenomene specifice și factorii de performanță ai fotolitografiei

Etapele procesului de fotolitografie sunt prezentate în Fig. 3.1. Pentru aceste trei etape cei mai importanți factori de care trebuie să se țină cont sunt [V1]:

– alegerea numărului de rotații și a vitezei pentru echipamentul de etalare a fotorezistului, denumit „spinner";

– timpul de expunere;

– timpul necesar developării.

În timpul etalării fotorezistului pot apărea diverse probleme:

– dacă se aplică prea puţin fotorezist, pot să rămână zone neacoperite;

– dacă turația mișcării de rotație este prea mare sau timpul este prea lung, atunci filmul poate fi prea subțire;

– dacă turația este prea mică sau timpul selectat este prea scurt, atunci filmul poate poate avea grosime prea mare [M20].



Fig. 3.1. Etapele procesului de fotolitografie

Această substanţă fotosensibilă (fotorezistul), care acoperă suprafeţele ce urmează a fi prelucrate, poate fi pozitivă sau negativă, în funcție de felul în care răspunde radiaţiilor. Scopul unui fotorezist este dat chiar de numele său: el trebuie să fie sensibil la lumină, astfel încât modelele să poată fi formate cu ajutorul lui și trebuie să aibă rezistență bună la gravarea ulterioară (umedă sau uscată) sau la alte etape, iar modelul să poată fi transferat în substratul dorit. De asemenea, acesta trebuie să aibă rezoluție bună, procesare ușoară, puritate ridicată, durată lungă de depozitare, utilizare minimă a solventului și cost redus [M2], [M4].

Fotorezistul expus la lumina potrivită se poate developa mai ușor sau mai greu în funcție de natura lui (pozitiv sau negativ). După ce a fost expus la radiații, acesta devine solubil în developant.

Fotorezиștii pozitivi păstrează configuraţia şablonului, lăsând pe substrat modelul existent pe mască. În schimb, atunci când un fotorezist negativ este expus la radiații, devine mai puțin solubil pentru developant, lăsând astfel un model invers celui de pe mască (Fig. 3.2).

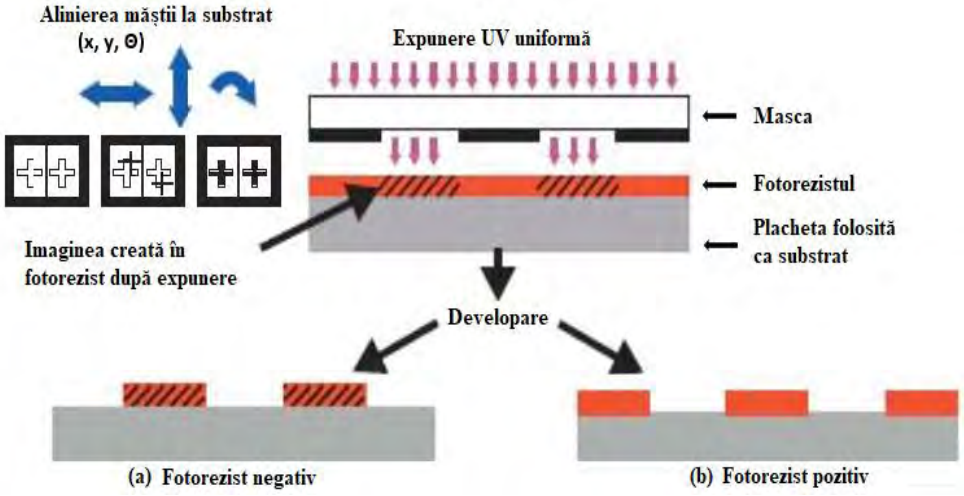


Fig. 3.2. Straturile fotorezistului [adaptată după M5]

Timpul precis de expunere este foarte important. Dacă se expune prea puțin, fotorezistul nu se va developa şi vor rămane urme de fotorezist după developare. Pot exista probleme şi dacă timpul de expunere este prea mare, când difracţia şi „rezoluţia de focalizare" pot face ca zonele protejate să fie expuse. Aceste efecte sunt prezente în general, dar la expunerile scurte, efectul este foarte mic [T3].

Rezoluția, dimensiunea minimă caracteristică ce poate fi transferată, acuratețea alinierii măștilor sau numărul de elemente ce pot fi transferate într-un anumit interval de timp sunt câteva dintre elementele cheie ale fotolitografiei.

- **Tehnologia LIGA**

Tehnologia LIGA presupune construirea structurii în fotorezist după care se galvanizează cu argint sau nichel. Termenul LIGA provine din limba germană de la „Litrographie Galvanoformung und Abformung (Litografie prin galvanizare și mulare)". Procesul folosește litografia cu raze X cu sursa de radiații, sincrotronul [P10]. LIGA este o metodă importantă de litografie și replicare pentru microstructurile cu raport de aspect ridicat (raport dintre adâncime pe dimensiune transversală). În tehnica LIGA, este folosită o sursă cu raze X pentru expunere. Procesul implică un strat gros de rezistență (de la micrometri la centimetri), fiind obținuți pereți cu rezistență ridicată, rigizi și netezi [M5].

Procesul LIGA este reprezentat în Fig. 3.3. Acest proces începe cu depunerea unui strat de polimetil metacrilat (PMMA) (1). Acesta este acoperit cu o fotomască, după care este expus la o sursă de raze X de energie mare (2). Masca permite părților de PMMA să fie expuse la raze X, componentele fiind protejate. PMMA este pus într-un developant pentru a înlătura ariile expuse (3). Apoi, se realizează placarea cu ajutorul PMMA - depunerea metalului (acoperirea) electrochimică în incinta creată prin developare (4). Odată înlăturată matrița de PMMA, rezultă elemente mecanice microscopice foarte precise (5).

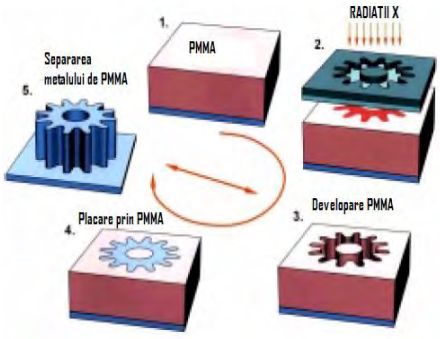


Fig. 3.3. Procesul LIGA [M5], [P10]

Prin aplicarea tehnicilor de galvanizare, se pot crea piese mici, cu o rezoluție bună și se pot crea microstructuri foarte bine definite până la 1000 μm înălțime [P10].

3.1.3. Aplicaţii specifice privind tehnica fotolitografiei

Doar în momentul în care fotorezistul este complet uscat se poate trece la **poziţionarea** fotoșablonului (a măștii)**, alinierea şi expunerea** cu ajutorul razelor ultraviolete. Materialul fotosensibil își modifică rezistența chimică față de soluția de developat după ce acesta este expus unei radiații [J1].

Pentru a se realiza transpunerea cu ajutorul luminii ultraviolete (UV), se folosește un aparat de expunere la ultraviolete în vid, în care se fixează masca. Sub mască se așază placheta care este aliniată (Fig. 3.4) cu ajutorul semnelor de aliniere. Apoi se setează timpul

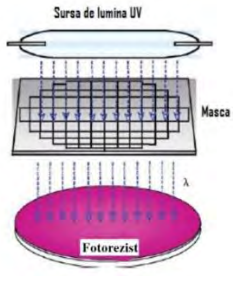


Fig. 3.4. Fixarea măştii [M5]

și modul de expunere (cu masca poziționată la o anumită distanță sau lipită). Expunerea la lumina ultravioletă modifică legăturile chimice ale rășinii în zona în care a fost expusă. Clişeul se transpune pe piesă corect şi precis dacă este utilizată energia optimă de expunere care se determină, în general, pe cale experimentală.

Operaţia de expunere realizează polimerizarea parţială a substanţei fotosensibile, depinzând de compoziţia ei chimică şi se face la o anumită temperatură (de obicei 25 ^{o}C) cu ajutorul lămpilor fluorescente, lămpi cu arc electric, laser etc. Timpul de expunere depinde de grosimea stratului fotosensibil, distanţa sursă-clişeu și energia incidentă optimă. Expunerea se poate face fie prin contact, fie de la distanţă prin proximitate, dar pe baza aceluiași principiu. Cea mai fidelă definire a desenului este realizată cu expunerea prin contact. Însă, acest tip de expunere duce la deteriorarea măștii în timp, după fiecare operaţie, datorită frecării cu placheta. Din cauza acestui aspect, în majoritatea cazurilor se realizează expuneri fără contact [M11], [M13].

După expunere, fotorezistul trebuie developat într-o soluție-developant specifică, iar apoi se realizează un tratament termic plachetei. Operaţia de developare conduce la formarea imaginii de transfer în stratul fotosensibil prin îndepărtarea porţiunilor care au fost expuse. Toate aceste etape ale procesului de fotolitografie sunt prezentate în Fig. 3.5 [M3], [M5], [T3].

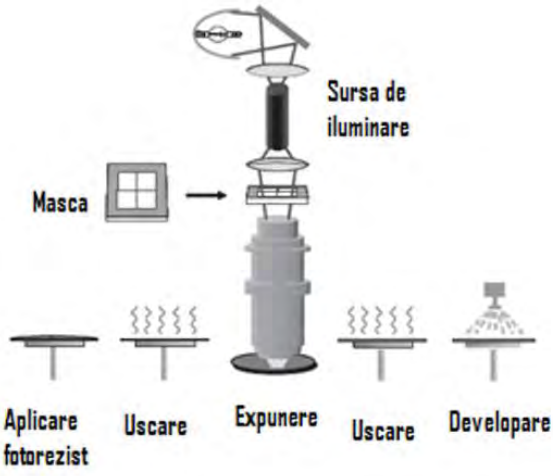


Fig. 3.5. Etapele procesului de fotolitografie [M3]

Developarea reprezintă procesul prin care se înlătură părțile expuse sau neexpuse ale fotorezistului pozitiv, respectiv negativ. Acest lucru se face cu ajutorul unei soluții alcaline potrivită tipului de fotorezist folosit. Timpul de developare este un parametru critic. Se folosesc developanți precum: acetona, tricloroetilena, acetilena, xylina, esteri etc. Aceștia permit ca apa să pătrundă și să favorizeze desprinderea de pe suport a stratului fotosensibil care nu a fost polimerizat. După developare se poate realiza corodarea chimică [M5], [T3].

3.1.4. Instalații și echipamente pentru procesul de fotolitografie

- **Depunerea fotorezistului**

În ceea ce privește depunerea fotorezistului, sunt cunoscute trei metode de depunere a acestuia, fie el pozitiv sau negativ:

A. Depunerea prin centrifugare (spin-coating) reprezintă procedeul cel mai frecvent utilizat, în care grosimea stratului care se dorește a fi obținut este invers proporţională cu viteza unghiulară a centrifugării. Placheta se fixează cu ajutorul unei pompe de vid pe suportul ales în funcţie de dimensiunile plachetei (Fig. 3.6). Este selectat fotorezistul, care este turnat cu ajutorul unui dozator. În funcţie de fotorezist şi de grosimea stratului ce se dorește a fi depus, se alege numărul de rotaţii specific pentru a începe centrifugarea. Combinaţia dintre viteza de centrifugare şi timpul selectat pentru această etapă va defini grosimea finală a filmului [M5]. După ce este aplicat pe substrat, filmul de fotorezist trebuie să aibă o grosime constantă şi să fie chimic izotrop astfel încât reacţia sa la expunere şi la developare să fie uniformă. Uniformizarea stratului se face prin centrifugare la turaţii ridicate (8000 - 12000 rot/min). Pentru evaporarea completă a solventului din răşină, se efectuează un tratament termic al plachetei. După această operație, răşina va rămâne sub formă solidă, dură [M6]. Etalarea fotorezistului prin metoda „spin-coating" este prezentată în Fig. 3.7.

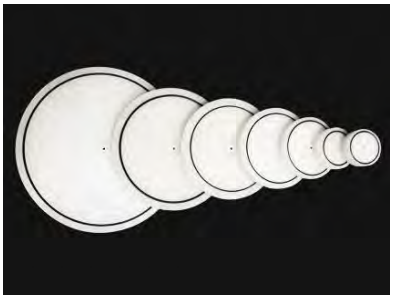


Fig. 3.6. Diferite mărimi ale suportului [*6]

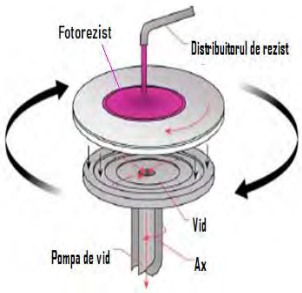


Fig. 3.7. Etalarea fotorezistului [M5]

La momentul actual, pe piață există numeroase echipamente de depunere prin centrifugare. Aceste instalații sunt compacte și prezintă caracteristici avansate. Viteza maximă de rotație, precum şi dimensiunile substraturilor variază la fiecare echipament în parte. Câteva exemple de instalaţii de depunere a fotorezistului prin centrifugare (spin-coating), produse de firma Laurell Technologies Corporation, sunt prezentate în Figurile 3.8 - 3.10.



Fig. 3.8. Echipament Laurell WS-650-15B [*6]



Fig. 3.9. Echipament Laurell WS-650-23NPP [*6]

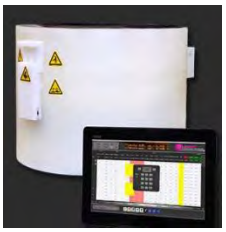


Fig. 3.10. Echipament Laurell H6-15 [*6]

Camera de vid a acestor echipamente este realizată din oțel inoxidabil, rezistent la corodarea în timp. Timpul de accelerație, viteza de rotație și timpul de expunere pot fi controlate și ajustate în mod continuu.

B. Depunerea prin pulverizare (spray coating) este o metodă folosită cel mai des atunci când aplicațiile necesită filme de fotorezist mai groase. Un prim dezavantaj îl reprezintă controlul mai puțin precis asupra grosimii. Un alt dezavantaj al acestui tip de pulverizare apare la acoperirea suprafețelor în dreptul marginilor plachetelor. În cazul metodei de depunere prin pulverizare, substraturile ce se doresc a fi acoperite trec pe sub un spray ce conține fotorezist lichid. În timpul acoperirii prin pulverizare, placheta poate fi rotită încet, în timp ce brațul pivotant al unității de acoperire prin pulverizare este deplasat peste plachetă. Stratul de fotorezist se formează prin reunirea picăturilor ce sunt pulverizate pe suprafața substratului [M5].

Există numeroase instalaţii de depunere a fotorezistului prin pulverizare, toate având același sistem de operare. Sistemul de pulverizare include o duză de pulverizare cu ultrasunete care generează o distribuție a picăturilor în domeniul micrometric. Fotorezistul este împins dintr-un rezervor sub presiune printr-o conductă de alimentare la capul de pulverizare. Capul de pulverizare are o deschidere definită unde se formează ceață de pulverizare. Pentru a evita supraaglomerarea nedorită, pistolul de pulverizare trebuie ținut aproape de substrat (Fig. 3.11) [M5]. Există mai mulți parametri reglabili pentru sistemul de acoperire prin pulverizare, printre care: volumul fotorezistului distribuit; viteza de scanare a atomizorului; viteza de rotire a vasului; distanța de la duza de pulverizare la substrat și presiunea de pulverizare. Cu ajutorul parametrilor corespunzători, se asigură uniformitate și un consum redus de materiale [*6].

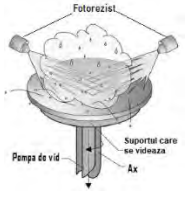


Fig. 3.11. Pulverizarea fotorezistului [M5]



Fig. 3.12. Echipament spinner EVG 101[*7]



Fig. 3.13. Echipament Laurell EDC-650-15B [*6]

Exemple de astfel de instalații pentru depunerea fotorezistului prin pulverizare, comercializate de către firmele DirectIndustry si Laurell, se găsesc în Fig. 3.12 și în Fig. 3.13.

C. Laminarea / Roluirea se poate face fie pe o singură parte, fie pe ambele părţi. Acoperirea prin laminare duce la o aderență excelentă pe majoritatea substraturilor, are o viteză mare de proces, o manipulare simplă, fără formare de granule de margine, energie de expunere scăzută, cost redus și procesare scurtă. Filmul solid uscat de fotorezist (1) este plasat între o foaie de eliberare a polietilenei (2) și o bază de poliester (3), după cum se poate observa în Fig. 3.14. Filmul de fotorezist este aplicat prin îndepărtarea foii de polietilenă înainte de laminarea fotorezistului pe substrat. Foaia de acoperire din partea superioară a poliesterului rămâne pe partea superioară a polimerului fotografic până mai târziu în acest proces. Aceasta protejează împotriva zgârieturilor, contaminanților și împiedică atingerea instrumentului de expunere și, eventual, lipirea acestuia de fotorezist [M5].

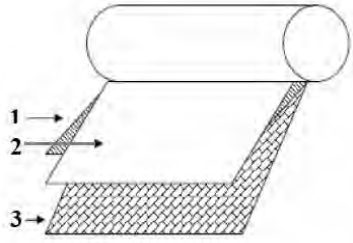


Fig. 3.14. Folia folosită pentru roluire [M5]



Fig. 3.15. Echipament HRL 4200, 5200, 6200 [*7]



Fig. 3.16. Echipament PCB Laminator ZH700 [*7]

Exemple ale unor instalaţii de depunere a fotorezistului prin roluire comercializate de către firma DirectIndustry sunt prezentate în Fig. 3.15 și în Fig. 3.16.

- **Alinierea și expunerea**

Odată încheiat procesul de depunere a fotorezistului pe plachetă, urmează procesul de aliniere și expunere. Folosind același echipament, se aliniază masca și placheta, iar apoi se realizează expunerea. Astfel se va realiza transpunerea imaginii de pe mască pe plachetă. În Figurile 3.17 – 3.18, se prezintă modele de echipamente speciale folosite pentru aliniere și expunere, produse de către firma OAI.

Folosind aceste echipamente, procesul de transpunere a imaginii de pe mască pe plachetă durează doar câteva secunde.

- **Developarea**

Developarea este procesul ce are loc după aliniere și expunere. Prin utilizarea acestui proces, se înlătură componentele acide ale fotorezistului. Acest lucru se face cu ajutorul unei soluții alcaline optimizată compoziționalpentru fotorezistul folosit [M5].



Fig. 3.17. Echipament OAI Model 800E [*8]



Fig. 3.18. Echipament OAI Model 6000 [*8]

3.2. TEHNOLOGII DE MICROPRELUCRARE CHIMICE

3.2.1. Considerații generale

Îndepărtarea chimică a materialului (corodarea) este cel mai folosit procedeu de prelucrare în fabricarea MEMS-urilor. Stabilitatea fotorezistului la agenți chimici depinde atât de compoziția chimică, de grosimea stratului cât și de uniformitatea acestuia [K4]. Prelucrarea prin corodare chimică poate fi definită ca o prelevare controlată a materialelor, în urma interacţiunii acestora cu mediul ambiant [M11].

În cadrul prelucrării dispozitivelor MEMS, atacul chimic are loc prin ferestrele realizate în fotorezist, restul suprafeţelor care nu sunt prelucrate fiind acoperite de fotorezistul ce nu a fost developat. Este important ca fotorezistul polimerizat să fie hidrofob, astfel încât să nu permită soluțiilor de corodare să ajungă la substrat [P10].

Se disting trei tipuri de corodare a metalelor, după mecanismul de desfășurare:

1.) Corodare chimică - guvernează reacţiile chimice eterogene, nu generează curent electric şi se supune legilor cineticii chimice.

2.) Corodare electrochimică - se supune legilor cineticii electrochimice.

3.) Corodare biochimică - cauzată de activitatea unor microorganisme, care folosesc metalul ca mediu de cultură, sau elimină produşi care atacă metalul respectiv [M11], [P10].

Există două tipuri de corodare chimică: **umedă** și **uscată**. Piesele/plachetele se introduc într-o baie în care se află agentul coroziv sau acesta poate fi depus pe suprafaţa piesei prin pulverizare [G3].

Corodarea uscată (în plasmă) permite să poată fi executate îndepărtări de material anizotrope (adânci și abrupte).

Corodarea umedă este cea mai simplă formă de corodare, folosind diverse soluţii, în funcţie de compoziţia chimică şi de temperatura la care trebuie efectuat acest atac chimic, care poate ajunge la o viteză de corodare de circa 30 - 35 μm/min sau poate chiar mai mult [M11], [M3]. În Fig. 3.19, se prezintă o comparație între corodarea izotropă și cea anizotropă:

– corodarea anizotropă: viteza de corodare depinde de orientarea cristalografică a plachetei;

– corodarea izotropă: se asigură o viteză de corodare constantă, indiferent de orientare.

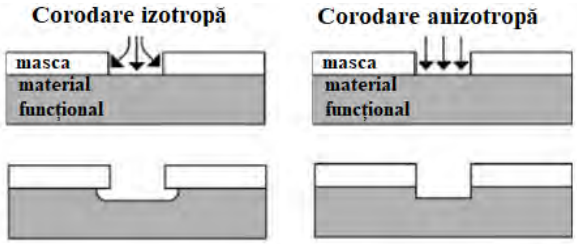


Fig. 3.19. Comparația dintre corodarea izotropă și cea anizotropă [K4]

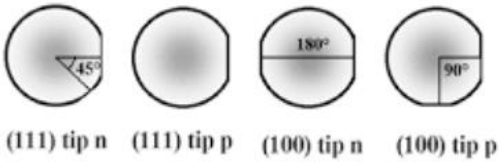


Fig. 3.20. Cele patru tipuri de orientare cristalină a Si [K4]

Corodarea anizotropă este cel mai utilizat proces în definirea structurilor MEMS. Viteza de corodare depinde de direcțiile cristalografice ale monocristalului semiconductor (Fig. 3.20). În principiu, viteza de corodare a Si <100> este mai mare decât cea a Si <111> [M37].

3.2.2. Fenomene specifice și factorii de performanță ai prelucrării prin corodare chimică

Tehnologia de prelucrare prin corodare se poate realiza în două variante:

1. pe întreaga suprafaţă şi pe diferite adâncimi sau

2. prin coroziune selectivă, la care se selectează doar zonele ce vor fi prelucrate, restul suprafeţelor fiind protejate cu diferite substanţe rezistente la atacul chimic.

Procesul de coroziune depinde de pH, de compoziţia soluţiei, de factorii care determină felul produşilor rezultaţi etc. Viteza de corodare se poate exprima prin raportarea pierderii de masă la unitatea de suprafaţă şi la timp sau prin densitatea curentului de coroziune electrochimică. Mediile corozive pot fi: gazele, neelectroliţii, electroliţii şi solul, care atacă pe suprafeţe locale sau pe toate suprafeţele.

Precizia tehnologiei de microprelucrare prin corodare chimică poate fi apreciată după trei criterii:

1. toleranţa dimensiunilor;
2. sub/supracorodarea chimică laterală;
3. rezoluţia şi acurateţea marginilor.

În procesul de prelucrare, parametrii tehnologici conduc la apariţa unor abateri de formă şi dimensiuni. Aceştia sunt legaţi de compoziţia chimică a piesei, condiţiile de păstrare a pieselor între operaţii, impurificarea băii de atac etc.

Operaţia de corodare chimică se produce perpendicular pe suprafaţa care trebuie prelucrată, dar totodată are loc şi o corodare laterală, care influenţează direct precizia de prelucrare, depinzând de timpul de atac.Curba de precizie (Fig. 3.21) evoluează în funcţie de timpul de atac chimic (t_a), de la abaterea superioară (A_s), la cea inferioară (A_i), piesa rămânând în limitele câmpului de toleranţă (T) [M11].

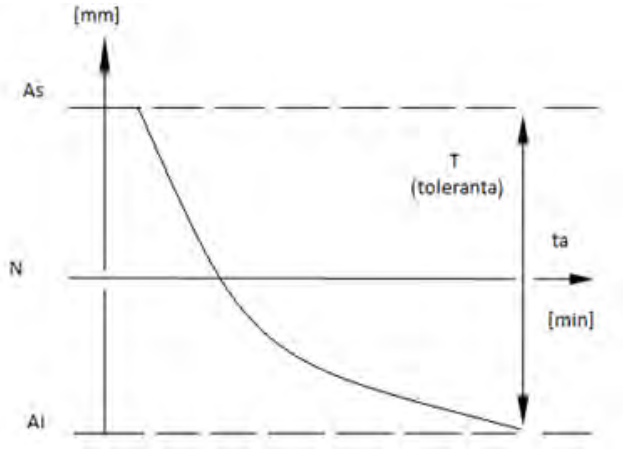


Fig. 3.21. Curba de precizie [M11]

Corodarea poate provoca defecte ascunse, precum distrugerea structurilor sau pierderile de materiale. Din această cauză, procesul de corodare trebuie monitorizat riguros.

3.2.3. Aplicații specifice privind corodarea

Corodarea electrochimică are la bază două reacții parțiale: una de oxidare şi una de reducere. Aceste reacții se desfășoară în paralel și simultan. Soluţiile folosite pentru corodare sunt prezentate în Tabelul 3.1.

Tabelul 3.1. **Soluții de atac chimic [M11]**

		Materialul piesei										
Soluţii de atac	**Siliciu**	**Germaniu**	**Rășini epoxidice**	**Fier și aliaje din fier**	**Cupru și aliaje din cupru**	**Crom**	**Nichel și aliaje din Ni**	**Plumb**	**Zinc**	**Staniu**	**Sticlă**	**Aluminiu și aliaje de aluminiu**
Clorura ferică	-	-	-	X	X	-	X	X	-	X	-	X
Acid sulfuric	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acid clorhidric	-	-	-	-	-	X	X	-	X	X	-	X
Acid azotic	-	-	-	X	-	X	-	-	X	-	-	-
Acid clorhidric + acid azotic	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X
Acid fluorhidric	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-
Acid fluorhidric + acid azotic	X	X	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-
Acid cromic	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-
Acid cromic + sulfuric	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-
Clorura cuprică	-	-	-	-	X	-	-	-	X	-	-	-

În fabricarea microstructurilor sunt folosite diferite tipuri de substanțe anizotrope, precum: hidroxid de potasiu (KOH), hidroxid de tetrametilamoniu (TMAH), apă etilendiamină pirocatechol (EDP sau EPW), hidrazină (N2H4), hidroxid de amoniu (NH4OH), hidroxid de cesiu (CsOH) etc. [P1].

Două astfel de soluții care se utilizează pentru corodarea anizotropă a siliciului sunt prezentate în Tabelul 3.2.

Tabelul 3.2. **Corodanți anizotropi ai siliciului [M37]**

Substrat corodat	Soluție de corodare	Condiții de lucru	Viteza de corodare
Si (100) dopat cu B	17ml etilendiamina -3g pirocatechol -8 ml H_2O	110 °C	0,25 – 0,1 μm/min

Si policristalin	250g KOH -800ml H_2O - 200ml alcool izopropilic, 1HF-50HNO_3 -80CH_3COOH		0,5 μm/min

Produșii de corodare pot fi foarte periculoși. Ei pot ataca incinta echipamentelor. Din acest motiv, pentru fiecare proces nou de corodare se decontaminează echipamentul folosit. Procesul de corodare trebuie controlat pentru prevenirea poluării mediului.

3.3. TEHNOLOGII DE PRELUCRARE CU LASER

3.3.1. Considerații generale

Laserii sunt surse de radiații electromagnetice care emit în domeniile ultraviolet, vizibil și infraroșu ale spectrului electromagnetic.

Procedeul de „Amplificare a luminii prin stimularea emisiei de radiații" (Light Amplification by Stimulation Emition of Radiation (LASER)) are aplicabilitate în foarte multe domenii [G3].

Dintre proprietățile fasciculelor laser se enumeră: *monocromaticitate* - un spectru de lungimi de undă foarte îngust în general; *direcționalitate* - proprietatea de propagare pe distanțe lungi cu divergență infimă, deci, posibilitatea de a se focaliza pe o arie extrem de mică; *intensitate* – putere foarte mare a laserilor care pot realiza tăierea unei game extrem de largi de materiale și *coerență* - fotonii stimulați oscilează în fază cu aceia emiși spontan - emiterea unor radiații cu aceeași frecvență [G4].

În anul 1913 Albert Einstein a emis teoria structurii atomului de hidrogen, iar în 1917 a introdus conceptul privind emisia stimulată a luminii. În 1960, Theodore Maiman a realizat primul laser cu rubin în laboratoarele Bell Telephone. În România, profesorul Ion Agârbiceanu este autorul primului laser românesc cu heliu-neon apărut în anul 1962 (Fig. 3.22). Acesta a realizat un raport din care reiese că în suita țărilor la nivel modial în care s-au realizat laseri, România se situează pe locul patru [M13].

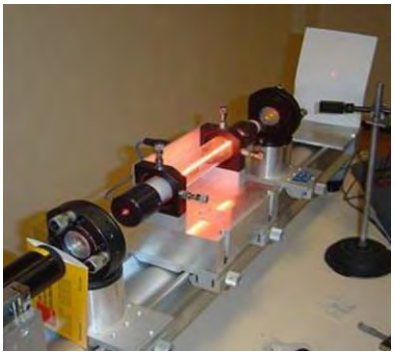


Fig. 3.22. Primul laser cu gaz din România [M13]

Utilizarea fasciculului laser are aplicații și avantaje legate de prelucrarea unei game largi de materiale.

Capacitatea laserului de focalizare este folosită la prelucrarea micro și nano, atât la forme simple cât și la forme complexe [D2]. În microprelucrări, este folosită o mare varietate de tipuri de laseri, datorită capacității acestora de concentrare a energiei fasciculului. La depunerea și

prelucrarea straturilor subțiri, se folosesc diferiți laseri [M26]. Tipul laserului trebuie ales în concordanță cu destinația sa, deoarece nu există nici un tip de laser care să poată fi folosit la realizarea tuturor aplicațiilor [D2], [M12].

Din punct de vedere al construcției instalațiilor laser, acestea se remarcă printr-o foarte mare diversitate tipologică. Laserii pot fi clasificați după natura pompajului, a mediului activ și tipul funcționării (în regim continuu, în regim pulsat) [M13]. Dispozitivul laser folosește un mediu activ împreună cu cavitatea optică rezonantă. După tipul mediului activ, dispozitivele laser se clasifică în: laseri cu mediu activ solid, lichid și gazos.

Este necesară o alegere corespunzătoare a sistemului piesă-dispozitiv de lucru, pentru a evita apariția anumitor dezavantaje: defecte de formă, dimensiuni și suprafețe care vor fi greu remediate. Prelucrarea cu laser a devenit extrem de utilizată datorită costurilor în continuă scădere a echipamentelor. Performanțele tehnologice ale acesteia sunt influențate de optimizarea parametrilor regimului de prelucrare, dar și de alegerea adecvată a materialelor sensibile la un anumit tip de radiație (lungime de undă) dar și de calitatea stratului superficial, care absoarbe energia radiației [A5], [M12].

3.3.2. Fenomene specifice ale prelucrării cu laser

Electronii care aparțin unui atom al orbitei staționare, care înconjoară nucleul și care prezintă nivelul energetic fundamental pot absorbi o cantitate de energie sub forma unei raze de lumină (fotoni) emisă de o sursă de energie exterioară (pompare), care conduce la creșterea nivelului lor energetic. Astfel se determină trecerea de pe orbita staționară pe una exterioară (nestaționară), caracterizată de un nivel energetic mai ridicat, atomul având o stare nouă, de excitare. Această stare este caracterizată de instabilitate, iar electronii se vor înapoia pe o orbită intermediară. Această trecere va ceda nucleului atomic, parțial, energia câștigată. Ulterior, electronii revin de pe orbita intermediară pe orbita de plecare (staționară). Această trecere se face prin emiterea unui foton, a cărui frecvență depinde de diferența de energie dintre cele două niveluri intermediar și staționar - Fig. 3.23 [M12], [M13].

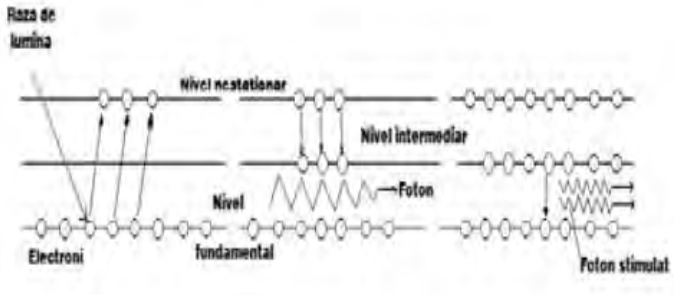


Fig. 3.23. Etapele transferului electronic [M13]

Toți fotonii emiși de electroni au aceeași frecvență (culoare) constituind unul din atributele radiației laser: **monocromaticitatea**. Fotonul emis de un electron la trecerea pe nivelul fundamental, stimulează un alt electron să revină pe orbita fundamentală, care emite la rândul lui un alt foton, stimulat, realizându-se astfel **coerența.** Aceasta constă în emiterea unor fotoni care oscilează în aceeași fază cu fotonii incidenți. O altă proprietate a radiației laser este **direcționalitatea** care constă în calitatea ei de a se propaga rectiliniu și cu o divergență extrem de redusă. Această caracteristică face posibilă echivalarea radiației laser cu o sursă de lumină punctiformă [M26]. Spotul laser creează o densitate foarte mare de energie, cea mai mare dintre toate procedeele de prelucrare cunoscute, aceasta fiind rezultatul proprietății de *intensitate*.

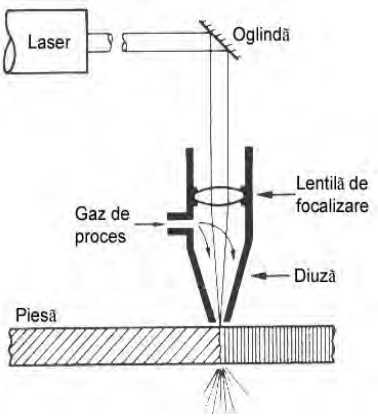


Fig. 3.24. Schema capului de focalizare a fasciculului laser [M13]

Fasciculul laser poate fi focalizat pe spoturi nanometrice. De aceea, prelucrarea cu radiație laser este de bază pentru microtehnologie [M13]. Orientarea fasciculului spre piesă (Fig. 3.24) se realizează printr-un sistem optic de precizie, iar fasciculul este focalizat cu ajutorul lentilei de focalizare.

Parametrul important al acestui proces de prelucrare este dat de distanța dintre lentila de focalizare și piesă. Alt parametru care prezintă importanță pentru procesul de prelucrare, este distanța dintre capul de focalizare și piesa de prelucrat, numită distanță de ajutaj (*stand off distance*).

Diametrul spotului se poate determina cu relația [M10]:

$$d_0 = \frac{\frac{4}{\pi} f \lambda}{D} \quad [\mu m] \tag{3.1.}$$

unde f este distanța focală a lentilei [mm]; D - deschiderea lentilei [mm] și λ - lungimea de undă a radiației emise [μm].

Diametrul minim al spotului laser – d_o depinde de caracteristicile sistemului optic și practic, acesta variază în funcție de relația:

$$d_{omin} = 2\ldots5\ \lambda \tag{3.2.}$$

Prin urmare, lungimea de undă este un parametru de maximă importanță, în ceea ce privește focalizarea fasciculului laser și alegerea tipului de laser adecvat microprelucrărilor. În Tabelul 3.3 sunt prezentate valori ale acestui parametru [M13]:

Având în vedere aspectele prezentate, pentru micro și nanoprelucrări, se utilizează laserii cu lungime ade undă mică, cu aplicabilitate la fabricația MEMS-urilor, după cum va fi prezentat în continuare.

Tabelul 3.3. **Tipuri de laser [M13]**

Tipul laserului	Lungimi de undă (nm)
Argon fluor (UV)	193
Krypton fluor (UV)	248
Azot (UV)	337
Argon (albastru)	488
Argon (verde)	514
Heliu neon (verde)	543
Heliu neon (roșu)	633
Rhondamine 6G	570-650
Rubin ($CrAlO_3$) (roșu)	694
Nd: Yag (NIR)	1064
Dioxid de carbon (FIR)	10600

3.3.3. Aplicații specifice ale laserului

Aplicabilitatea pe scară largă a laserului, se justifică prin aceea că el creează una dintre cele mai mari densități de putere din domeniul tehnologic. Utilizarea laserilor în domeniul MEMS este multiplă. Comparativ cu procedeele clasice de prelucrare, suprafețele obținute prin tehnologii laser au o rezistență mai bună la uzură, la coroziune și la frecare [M10]. Prelucrarea cu laser este avantajoasă atât datorită procesărilor directe și rapide, cât și a faptului că se poate realiza o gamă largă de operații.

Depunerea straturilor subțiri se realizează prin utilizarea evaporării cu laser. Fasciculul laser este incident pe materialul țintă (materialul care trebuie depus pe un anumit substrat). Materialul se evaporă și vaporii se depun pe substrat [M35].

Prelucrările cu rază LASER ale diferitelor materiale metalice sau nemetalice constituie tehnologii termice pentru că folosesc energia termică în mod nemijlocit la prelevarea materialului. Prelucrarea cu fascicul laser (Laser Beam Machining - LBM) este un proces de prelucrare neconvențional, care în general se referă la procesul de îndepărtare a materialului, realizat prin interacțiunea dintre laser și materialul țintă. Procesele pot include: găurirea cu laser, tăierea, canelarea, ablația, sudura, placarea, frezarea etc. (Fig. 3.25).

Tendința este de folosire a laserului la microtexturarea suprafețelor. În ceea ce privește aplicabilitatea laserilor în domeniul MEMS, o metodă rapidă și directă de ablație laser cu CO_2 a fost dezvoltată pentru a crea suprafețe superhidrofile și modele hidrofobe-superhidrofile (HHA) pentru aplicare în bioanalize, descrise în [A2]. Astfel, au fost create dispozitive microfluidice utilizate ca teste biologice. Faptul că agregarea celulară este împiedicată a permis efectuarea de analize microscopice la nivelul celulei individuale [A2].

În Fig. 3.26, sunt prezentate principalele aplicații ale laserului în microprelucrări. Randamentul LBM este influenţat de starea suprafeţei de prelucrat, respectiv de coeficientul de absorbţie ce variază în funcţie de indicele de reflexie a luminii, caracteristic materialului şi rugozităţii suprafeţei [M13].

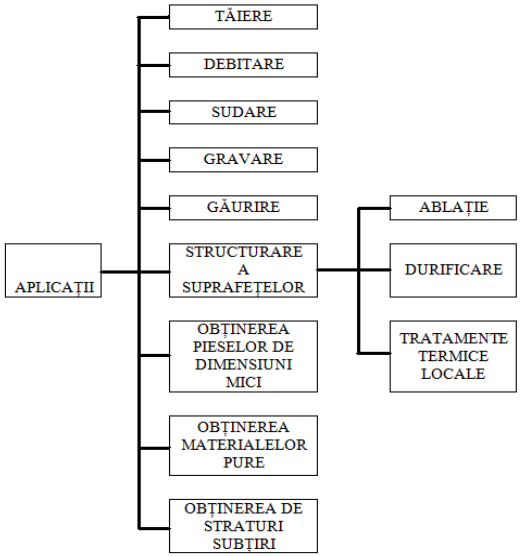


Fig. 3.25. Aplicații ale laserului [adaptată după M13]

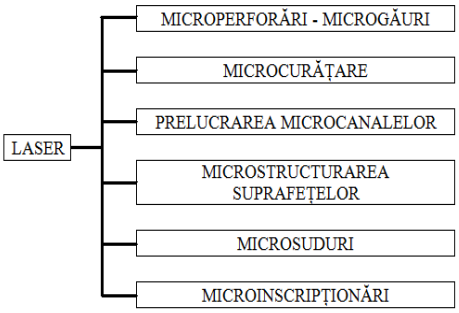


Fig. 3.26. Aplicațiile principale ale laserului în microprelucrări [adaptată după M13]

Cel mai important avantaj al acestei tehnologii cu laser este dat de faptul că se pot face prelucrări pe zone selectate fără a fi nevoie ca zonele ce nu vor fi prelucrate să fie acoperite prin procese fotolitografice [M35].

3.3.4. Instalații și echipamente laser

A. Laseri cu mediu activ gazos

Funcționarea laserilor cu mediu activ gazos se realizează în regimuri de impulsuri și uzuale. În cazul acestor laseri, pompajul se realizează în general, prin descărcare electrică în mediul gazos: CO_2, heliu, amestecuri de gaze, vapori de metal, gaze rare, neon, argon, kripton etc. Caracteristicile principale ale acestui tip de laseri sunt: monocromaticitatea foarte ridicată şi frecvenţa stabilă. Câteva exemple din acest tip de laseri sunt [M13]:

a. Laserul cu gaz atomic - cel mai reprezentativ este cel cu He (85 - 90%) şi Ne (10 - 15%). Excitaţia se face prin atomii de He, iar emisia prin atomii de Ne, pompajul realizându-se prin descărcări electrice în gaze generate de doi electrozi în câmp

electric continuu sau de radiofrecvenţă. Puterea realizată în undă continuă este de 0,1 - 0,5 W şi lungimea de undă λ=6329 Å [M13].

b. Laserul cu gaz ionic foloseşte ca mediu activ, ioni de tip: argon (Ar^+), kripton (Kr^+), mercur (Hg^+) etc. Datorită ionizării realizate prin descărcări electrice, ionii obţinuţi sunt caracterizaţi prin niveluri de energie superioare, revenirea lor pe niveluri fundamentale producând radiaţia laser. Puterea unui laser cu Ar este mică: 0,5 - 3W, λ=4880 Å, iar randamentul este scăzut: 0,02 - 0,1%, datorită eficienţei reduse a pompajului. Domeniile de utilizare sunt aceleaşi ca ale laserilor cu gaz atomic, precum şi microprelucrările care se pot efectua [M13].

c. Laserii cu excimeri - pentru acest tip de laseri se folosesc ca medii active monohalogenurile unor gaze nobile, cum ar fi: ArF, KrF, XeF, KrCl etc., ce conțin molecule cu o stare excitată și o stare fundamentală stabilă. Pompajul se poate realiza prin intermediul fenomenului de descărcare electrică în gaze sau prin bombardare cu fascicule de electroni. Acest tip de laser operează în domeniul ultraviolet (lungime de undă mică). Avantajele laserului sunt date de faptul că nu lasă urme, pete; poate produce structuri de nichel cu adâncimi de până la câteva sute de microni; are rezoluție mare; oferă un control mai precis al adâncimii gravurii [S15].

B. Laserii cu mediu activ solid

Acest tip de laseri se caracterizează prin randament energetic scăzut deoarece cea mai mare parte din energia de pompaj nu este absorbită de ionii activi ai mediului. Datorită încălzirii mediului în timpul pompajului, ei funcționează în general, în regim de impulsuri. Laserii cu mediu activ solid sunt: laseri cu rubin, laseri cu sticlă dopată cu neodim, laseri cu granat de ytriu și aluminiu dopat cu neodim (YAG:Nd), laseri cu semiconductori. Laserele cele mai răspândite au la bază fibre de rubin, de cristal, și de neodim. Laserul cu rubin emite radiații în lungime de undă λ = 6943Å. Acesta folosește oxidul de aluminiu dopat cu ioni trivalenți de crom ca mediu activ [M13].

C. Laseri cu mediu activ lichid

Laserii cu mediu activ lichid utilizează un complex organic de coloranți, precum rodamina. Un astfel de laser cu rodamină dizolvată în soluție de alcool, poate produce o radiație cu putere de circa 50mW, dacă are un pompaj realizat prin intermediul unui laser cu argon ionizat. Aceștia au avantajul realizării concentrației necesare de particule într-un anumit volum și posibilitatea răcirii mai eficiente în comparație cu cei solizi [M13].

Echipamentele cu laser sunt utilizate în inscripționarea măștilor ce sunt folosite pentru fabricarea dispozitivelor MEMS. Un astfel de echipament folosit pentru

scrierea directă a măștilor folosit de către Institutul Național de Cercetare-Dezvoltare pentru Microtehnologie – IMT București este prezentat în Fig. 3.27 - IMT.



Fig. 3.27. Echipament DWL 66 fs [*9]



Fig. 3.28. Echipament LabRAM HR 800 [*17]

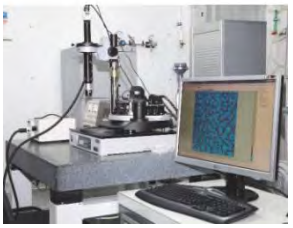


Fig. 3.29. Echipament SPM Ntegra Aura [*17]

În ceea ce privește testarea MEMS cu ajutorul laserilor, se vor menționa Spectroscopia Raman (RAMAN) (Fig. 3.28 - IMT), Microscopia Forței Atomice (Atomic Force Microscop - AFM) (Fig. 3.29 - IMT), sau Microscopia optică în câmp apropiat (Near Field Optical Microscopy - NFOM). Aceste testări sunt esențiale pentru validarea rezultatelor științifice obținute [M35].

3.4. TEHNOLOGII DE PRELUCRARE CU FASCICULE DE ELECTRONI

3.4.1. Considerații generale

Tehnologia de prelucrare cu fascicul de electroni („Electron Beam Machining" - EBM) prezintă performanțe ridicate și este utilizată în domeniul micro și nanotehnologiilor. Cu ajutorul EBM se pot realiza prelucrări de mare precizie, cum ar fi: microgăuriri, frezări, microsuduri cu dimensiuni micrometrice, acoperiri de suprafețe cu straturi subțiri etc.

Tehnologia de prelucrare cu fascicul de electroni este un procedeu de prelucrare termică. Electronii au cel mai ridicat raport dintre sarcină și masă dintre toate particulele cunoscute. Spotul de electroni este văzut ca o sursă de căldură. Având în vedere puterea specifică și precizia, fasciculul de electroni este una dintre cele mai puternice metode de concentrare a energiei [B12].

Se pot realiza prelucrări în zone preselectate de pe piesă cu ajutorul tehnologiei EBM, fără ca piesa să suporte deformări. Acest lucru este posibil deoarece transferul de energie este realizat local, nefiind difuzat în masa integrală a materialului.

Evaporarea materialului cu fascicul de electroni se folosește pentru depuneri sub vid de pelicule subțiri de materiale (Al, Ni, Cr, Au, Pt, etc.), pe plachetele folosite în construcția MEMS-urilor. Dimensiunile straturilor pot varia între 100 - 1000 nm.

Tehnologia de prelucrare în vid protejează împotriva oxidării zonele procesate; prelucrările realizate prin această tehnologie prezintă rezistență, precizie și finețe. De cele mai multe ori nu mai sunt necesare operaţii ulterioare pentru finisarea suprafețelor prelucrate [N1].

3.4.2. Fenomene specifice

Procedeul de bază îl reprezintă emisia termoelectronică, în care un catod este încălzit și emite / generează un fascicul de electroni [B12]. A

Fluxul electronic concentrat (sursa termică), caracterizat de viteză şi energie cinetică mare, bombardează elementele supuse prelucrării [N1]. La impactul electronilor accelerați cu suprafața de prelucrat se transferă energia cinetică de la electroni la atomii de metal supuși bombardamentului electronic. Transferul energetic conduce la creșterea temperaturii materialului supus acțiunii fasciculului de electroni. Fenomenul de încălzire-vaporizare are loc în trei faze:

1. la impactul spotului electronic cu piesa / elementele de prelucrat, se produce un transfer de energie, producând încălzirea locală a elementelor de prelucrat prin conducție [M10], [N1]. Fasciculul intră în substratul superficial la o adâncime (δ) ce poate fi calculată cu relaţia:

$$\Delta = 2{,}6 \cdot 10^{-11} U^2/\rho \text{ [mm]} \qquad (3.3.)$$

în care: U este tensiunea de accelerare [V];
ρ - densitatea materialului [g/cm^3].

2. topirea materialului supus acțiunii, urmată de
3. vaporizarea materialului.

Parametrii procesului, care afectează în mod direct caracteristicile de prelucrare sunt: tensiunea de accelerare; curentul fasciculului; durata impulsului; energia pe puls; puterea pe puls; intensitatea curentului; dimensiunea spotului; densitatea de putere [N1].

Fenomenele secundare care însoțesc bombardamentul cu fascicul de electroni, consumă o parte din puterea fasciculului, al cărui randament este mai mare de 60%. Dintre aceste fenomene fac parte: emisia de raze X; emisia de electroni secundari; atomi și ioni de metal; electroni retrodifuzați. Majoritatea proceselor se realizează în vid, pentru a evita o coliziune a electronilor accelerați cu moleculele de aer în care aceștia își vor pierde energia și pentru a nu exista posibilitatea de contaminare. Atmosfera ar provoca o dispersie a fasciculului [M26], [M14].

3.4.3. Aplicații specifice

EBM are o arie tehnologică vastă prin realizarea de: microsuduri micrometrice, debitări de materiale, microgăuri, frezări, acoperiri de suprafeţe cu straturi subţiri. Principiul condensării controlate în vid a vaporilor de metal topit este cel care stă la baza depunerilor de straturi subțiri [N1], [M14].

În ceea ce privește construcția MEMS, tehnologiile EBM sunt frecvent folosite pentru depunerea straturilor subțiri.

O astfel de instalaţie folosită pentru depuneri are în componenţă următoarele elemente constructive principale: tunuri electronice și deflectoare situate în incinte, pentru protejarea împotriva acţiunii vaporilor generați prin topirea metalului, precum şi a depunerilor metalice pe electrozi; fascicule de electroni care acţionează asupra băii de metal topit, care este răcit continuu cu apă. Vaporii metalici degajaţi condensează pe elementele de depunere și formează un strat metalic subţire [M12]. Proprietăţile stratului depus depind de calitatea suprafeţei suportului, care trebuie să fie perfect curăţată de orice tip de impurităţi, operaţie care se execută în vid, la temperaturi de 500 - 800 ^{o}C.

Prin procedeul cu fascicul de electroni se pot realiza suprafeţe de dimensiuni micrometrice (1 - 20 μm^2), într-un timp extrem de scurt (10^{-5} - 10^{-2} s), iar densitatea de putere a fluxului electronic utilizat este de 10^6 - 10^8 W/cm^2. Cu ajutorul acestui procedeu se pot realiza durificări ale straturilor superficiale, cu grosimi de ordinul micronilor (10 - 50 μm), care produc o creştere importantă a rezistenţei la uzură [M12], [M14].

Folosirea EBM ca metodă de prelucrare a găurilor permite obținerea și prelucrarea microorificiilor cu diametre în domeniul micrometric, cu caracteristici superioare tehnico-economice. Se pot realiza asemenea microorificii cu dimensiuni micrometrice in materiale dure și extradure. Exemple de asemenea materiale sunt: rubinul, corundul sintetic, safirul, sticla, materiale refractare etc. În cazul acestui procedeu, eliminarea materialului topit are la bază fenomenul de sublimare, adică transformarea directă din faza de solid în fază de vapori. Diametrul găurii prelucrate depinde de mărimea timpului de impuls și de adâncimea de pătrundere (δ) a fasciculului electronic, corelaţia dintre cei doi parametrii fiind dependentă şi de materialul prelucrat [M14].

O altă aplicație este dată de **litografia cu fascicul de electroni (EBL)**, care reprezintă o tehnică utilizată pentru fabricarea micro- și nanostructurilor, bazată pe modificarea chimică a rezistenței filmelor polimerice datorată iradierii cu electroni [M14]. Cu ajutorul EBL se pot trasa linii mai mici de 2 μm. Instrumentele EBL moderne utilizează surse de electroni cu luminozitate ridicată pentru o viteză mai mare de transfer și o rezoluție extrem de ridicată [M36].

Litografia cu fascicul de electroni (EBL) este de două tipuri: **litografia scrierii directe** și **litografia optică.**

Litografia scrierii directe se realizează folosind un singur fascicul de electroni care scanează materialul după un model (matrice), pe suprafaţa de prelucrat.

Litografia optică utilizează proiectarea fasciculului pe suprafaţa piesei cu ajutorul unor lentile – obișnuite sau speciale. Această tehnologie realizează o expunere cu precizie şi productivitate ridicate [N1].

3.4.4. Instalații și echipamente de prelucrare cu fascicule de electroni

La nivel mondial există peste 6000 de instalaţii cu flux de electroni și ioni (instalaţii industriale de tăiere, găurire, sudare, topire etc.) [N1].

Instalaţiile de prelucrare EBM au următoarele sisteme funcţionale de bază/subansamble: tun de electroni; focalizare-accelerare; deflexia fasciculului şi masă rotativă sau în coordonate [M12].

Echipamentele realizează şi corelează toate funcţiunile specifice: curentul de emisie a catodului (I_e > 0,1A); tensiunile de accelerare; presiuni joase în incinta tunului electronic (10^{-4} -10^{-6} torr); proces în regim continuu sau în impulsuri; autoreglarea parametrilor de lucru; deplasarea mecanică a tunului electronic sau a piesei (pe cele trei axe de coordonate); curent de intensitate reglabilă (1 - 4 A) de mare stabilitate.

În funcție de tipul emițătorului există două categorii de tunuri de electroni: tunuri cu emisie termică și tunuri cu emisie cu plasmă. Tunurile electronice pot fi clasificate după tensiunile de accelerare: mici (U = 10 - 60kV); medii (U = 20 - 100kV); mari (U = 80 - 175kV) [M10].

Dintre echipamentele de prelucrare cu fascicul de electroni utilizate de către IMT București, fac parte TEMESCAL FC-2000 (Temescal, USA) (Fig. 3.30); echipamentul AUTO 500 (BOC Edwards, UK) (Fig. 3.31) și NEVA - EVD 500A (Neva, Japan). Echipamentul Raith e_Line (Fig. 3.32) este folosit pentru litografia cu fascicul de electroni.



Fig. 3.30. Echipament Temescal FC-2000 [*17]



Fig. 3.31. Echipament DC Auto 500 [*17]



Fig. 3.32. Echipament - Raith e_Line, RAITH GmbH [*17]

Instalaţile de depunere de straturi subţiri sunt folosite pentru diverse depuneri de materiale (Al, W, Ni, Cr, Au, Pt etc.).

3.5. TEHNOLOGII DE PRELUCRARE CU FASCICULE DE IONI

3.5.1. Considerații generale

Prelucrarea cu fascicule de ioni (Ion Beam Machining - IBM) are la bază emisia electronilor de către catod care, ulterior, ionizează moleculele de gaz de tip argon, xenon etc. Ionii obținuți sunt intens accelerați de către un câmp electric.

Prelucrările cu ioni pot fi folosite în realizarea unor operații de genul: frezare, găurire, sudare, prelevări de straturi subțiri, depuneri de acoperire etc. [M26].

Două avantaje importante ale placării ionice sunt date de faptul că nu sunt necesare tratamente complexe ale suprafeței substratului și nu apar restricții privind natura materialelor depuse.

3.5.2. Fenomene fizico-chimice la prelucrarea cu fascicule de ioni

Urmând traiectoria, ionul accelerat atinge suprafața piesei de prelucrat cu viteză ridicată și pătrunde în materialul piesei, unde ciocnește un atom din acesta. În situația în care ionul accelerat are o energie suficient de mare, el proiectează atomul pe care l-a ciocnit în interiorul (profunzimea) materialului. Acest atom deplasat ciocnește alți atomi existenți pe traiectoria pe care o urmează, urmând o succesiune de asemenea ciocniri. Aceste ciocniri se propagă către suprafața materialului supus bombardamentului ionic. În situația în care atomii deplasați posedă în continuare o energie suficient de mare, ei ciocnesc atomii din stratul superficial și îi proiectează în exteriorul piesei, sub formă de atomi ai materialului supus evaporării, producând prelevarea materialului piesei. Pentru analiza succesiunii fenomenelor care ilustrează mecanismul de îndepărtare a materialului se folosește Modelul lui Keywell [M26].

În Fig. 3.33 se descrie parcursul unui ion accelerat după acest model [M26]. În funcție de energia ionilor incidenți, interacțiunile dintre aceștia și piesa prelucrată sunt de trei tipuri: 1.) ioni accelerați cu energii peste 10^6 eV, care anihilează forțele Coulomb de respingere și au ca efect distrugerea avansată a materialului prelucrat; 2.) ioni accelerați cu energii medii (10^4 - 10^5 eV), care, împreună cu electronii atomilor materialului, formează un ecran în jurul nucleului; 3.) ionii accelerați cu energii relativ reduse (10^3 - 10^4 eV), care satisfac cerințele impuse de bombardamentul ionic [C2], [M26].

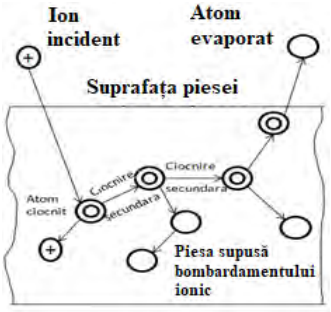


Fig. 3.33. Modelul lui Keywell [M26]

Efectul fizic al bombardamentului ionic se determină prin raportul dintre numărul atomilor ejectați din piesă și numărul ionilor incidenți, cunoscut și sub denumirea de randament de pulverizare, care se determină cu ajutorul relației [M14]:

$$\Pi_p = 26{,}6\ \Delta m/(AIt)\ \text{[nr. atomi / nr. ioni]} \qquad (3.2.)$$

unde: Δm este pierderea de masă din piesa supusă bombardamentului ionic[μg]; I - intensitatea curentului ionic [μA]; A - masa atomică a atomilor materialului, din care este confecționată piesa [μg]; t - timpul în care piesa este supusă bombardamentului ionic [ore].

Randamentul de pulverizare este influențat de trei grupe de parametri care caracterizează instalația (tunul ionic) în ansamblul ei, precum și de materialul elementelor de prelucrat. Aceștia sunt:

1. caracteristicile fasciculului ionic:
   – energia ionilor;
   – densitatea ionilor;
   – tipul de ioni.
2. caracteristicile materialului piesei:
   – structura cristalină;
   – orientarea cristalină;
   – starea suprafeței;
   – temperatura suprafeței.
3. caracteristicile funcționale ale tunului ionic:
   – unghiul de incidență al fasciculului,
   – presiunea din camera de bombardament.

Mărimea randamentului de pulverizare este în funcție de energia ionilor. **Efectele chimice** ale bombardamentului ionic apar în condițiile interacției chimice a materialului din care este confecționată piesa și ionii fasciculului și sunt reprezentate de apariția de oxizi pe suprafața bombardată [M10].

3.5.3. Aplicații ale prelucrării cu fascicule de ioni

Depunerea straturilor subțiri cu ajutorul ionilor reprezintă un proces fizic de depunere prin vaporizare și poartă denumirea de placare ionică. Aceste depuneri de micro şi nanostraturi au loc prin bombardamentul ionic al suprafeței, ce implică două procese: pulverizare și implantare. Suprafața pe care se dorește efectuarea depunerii este supusă bombardamentului cu fascicul de ioni cu energie mare, ţinta depunerii fiind catodul, iar sursa de evaporare - anodul. Catodul se află la tensiune înaltă, iar anodul este legat la pământ. Fasciculul ionic poate fi utilizat în cazul prelevării unor pelicule subţiri sau în cazul curăţării de oxizi sau de alte impurităţi. Aceste tipuri de prelucrări utilizează tensiuni de accelerare care au valori cuprinse între 2 - 30 kV şi presiuni joase de 10^{-5} torri.

Depunerea straturilor subțiri reprezintă un proces fizic de depunere prin vaporizare. Prin pulverizare, se determină un contact direct dintre atomii stratului și atomii filmului depus, ceea ce conduce la o aderare mai bună a filmului pe suprafața de depunere.

Implantarea creează suprafețe cu o compoziţie şi structură gradată, ale unor substanţe care în mod normal nu pot fi amestecate. Totodată, în ceea ce privește natura materialelor, această tehnică poate fi aplicată doar materialelor care se pot evapora fără să se descompună chimic. Un efect specific placării ionice îl reprezintă reîntoarcerea atomilor pulverizaţi pe suprafaţa piesei.

S-a constatat că atomii pulverizați se întorc în proporţie de 90% la o presiune de 10^{-6} torri. Redepunerea atomilor pulverizaţi are loc în funcție de parametrii plasmei. Totodată, depinde şi de debitul gazului aflat în incintă.

Pentru realizarea unor depuneri reproductibile şi cu proprietăţile dorite, este necesară controlarea parametrilor principali ai procesului de placare ionică (presiunea gazelor reziduale (vidul limită), distanţa sursă – substrat, durata de curățire etc.) [M10].

3.5.4. Echipamente și instalații

Utilizarea tunurilor cu fascicul de ioni realizează evaporarea crescută a unor materiale caracterizate de puncte de topire înalte, precum: titan, molibden, cobalt, wolfram etc. Datorită adezivităţii filmelor depuse şi posibilităţii acoperirii unor suprafeţe complexe, placarea ionică este utilă în majoritatea domeniilor de aplicare a proceselor de depunere. Acest procedeu permite obținerea în bune condiții a depunerilor pentru straturi subțiri [M10], [M26].

Sursa de ioni este alcătuită, în principiu, din următoarele elemente componente, prezentate în Fig. 3.34: tub de sticlă Pyrex (1), care înglobează camera de ionizare (2), anodul (3) şi catodul (4), cuplaţi la tensiunea de accelerare şi care formează camera de accelerare (5). Fasciculul ionic (6) trece prin camera de bombardare (7), în care valorile presiunii sunt cuprinse între 10^{-6} - 10^{-7} torri. Presiunea acţionează asupra piesei de prelucrat (8). Existenţa vidului înaintat în camera de bombardare este necesară în vederea anihilării fenomenelor secundare, rezultate din prezenţa ionilor de azot sau a ionilor de oxigen [M10].

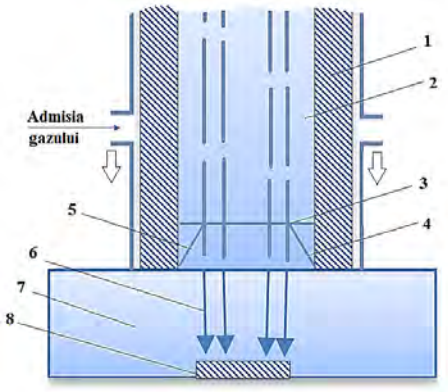


Fig. 3.34. Schema de principiu a instalaţiei de prelucrare cu fascicul de ioni [M26]

Tehnologiile de prelucrare cu ioni sunt înglobate în instalațiile de prelucrare pe bază de plasmă. În principiu, elementele componente ale unei instalații de depunere a plasmei sunt: sursă de ioni, electrod de accelerare, sistem de focalizare, deflector, piesă supusă bombardamentului ionic care este montată pe un suport și fascicul de ioni.

În ceea ce privește corodarea structurilor MEMS, acestea pot fi procesate cu ajutorul a două tipuri de corodări uscate, denumite „Reactive Ion Etching" (RIE) și „Deep Reactive Ion Etching" (DRIE), ce folosesc bombardament ionic. În Fig. 3.35 - 3.36 se prezintă două echipamente cu plasmă din cadrul IMT București.



Fig. 3.35. Echipament DRIE - PlasmaLab System 100 (Oxford Instruments, UK) [*17]



Fig. 3.36. Echipament RIE - Plasma Etcher-Etchlab 200 [*17]

Aceste echipamente sunt folosite pentru corodările uscate „Reactive Ion Etching" (RIE) și „Deep Reactive Ion Etching" (DRIE), ce utilizează fascicule de ioni.

3.6. TEHNOLOGII DE PRELUCRARE CU PLASMĂ

3.6.1. Considerații generale

Plasma poate fi considerată un amestec gazos devenit ionizat printr-o descărcare electrică. **Gradul** de ionizare al unei plasme este dat de proporția de atomi care au pierdut sau au câștigat electroni și este controlat in principal de temperatură. Noțiunea de plasmă a apărut în 1928, fiind dată de Langmuir gazului ionizat și luminos care se răspândea în instalație după interacțiunea dintre electroni și fluidele biologice [M10].

Plasmele sunt clasificate drept **"termice"** sau **"non-termice"** pe baza temperaturii relative a electronilor, a ionilor și a neutronilor. Plasma termică ocupă primul loc în privința incălzirii pieselor.

Materialele recomandate pentru a fi prelucrate cu plasmă sunt în primul rând, aliajele feroase şi neferoase, superaliajele şi mai puţin carburile metalice. Datorită energiei termice degajate, materialul aflat în stare solidă este încălzit, topit, vaporizat, iar ruperea legăturilor interatomice ale materialului se realizează pe cale termică.

Echipamentele cu plasmă sunt des întâlnite în fabricarea MEMS-urilor, acestea fiind folosite pentru depunerea straturilor subțiri cu puritate înaltă. Două dintre cele mai comune tipuri de depuneri efectuate cu ajutorul plasmei sunt depunerile de oxid de siliciu și depunerile de nitrură de siliciu [M10].

3.6.2. Fenomene specifice

Fenomene fizice la prelucrarea cu plasmă

Analiza fenomenului de plasmă termică se poate face prin similitudine cu plasma dintr-un arc electric ajuns în stare cvasistaţionară. Astfel, caracteristica arcului electric şi, corespunzător, cea a plasmei pune în evidenţă trei zone distincte [M10]:

1. Zona catodică (K)

În această zonă, purtătorii de sarcină nu suferă ciocniri. Electronii sunt puternic acceleraţi în câmpul electric al catodului, pătrunzând cu energii mari în coloana arcului, iar ionii acceleraţi vin din coloana arcului cu energii ridicate şi lovesc catodul (E_k). Mărimea tensiunii catodice U_k se defineşte prin relaţia:

$$U_k = E_k \cdot l_k \qquad (3.4.)$$

Datorită lungimii reduse a zonei catodice, l_k intensitatea câmpului electric al catodului E_k va fi foarte mare: $10^5 \ldots 10^6$ V/mm^2. Emisia electronică a catodului nu se produce uniform, ci doar pe o mică zonă a suprafeţei, iar astfel, se formează pe catod aşa-numita „pată catodică". Pata catodică rămâne fixă dacă emisia este termoelectronică şi mobilă dacă emisia este de natură autoelectronică. Această instabilitate a petei catodice este legată de prezenţa impurităţilor pe materialul catodului [M10].

2. Coloana arcului electric (C)

În această zonă au loc procese rapide şi permanente de excitare-dezexcitare, ionizare-recombinare, la temperaturi foarte ridicate, cu valori de circa 6000-50000 K. Mişcarea electronilor este aceea care determină trecerea curentului electric, fenomen exprimat prin relaţia:

$$v^+ = 4{,}25 \text{ x } 10^{-3} \bullet v^{-1} \text{ [m/s]} \qquad (3.5.)$$

unde v^+ este viteza de deplasare a ionilor, iar v^{-1} - viteza de deplasare a electronilor.

Intensitatea curentului electric în coloana arcului se poate determina cu ajutorul relaţiei:

$$I_p = e_0 \bullet N^{-1} \text{ [A]} \quad (3.6.)$$

unde e_0 este sarcina electronului și N^{-1} – numărul electronilor care trec într-o unitate de timp prin coloană [M10].

3. Zona anodică (An)

Această zonă are dimensiuni similare cu zona catodică. Electronii din coloana arcului sunt accelerați de tensiunea anodică, U_{an} (2…3V), și ciocnesc anodul. În urma ciocnirii, electronii cedează anodului toată energia cinetică, care se transformă în căldură, rezultând o creştere substanţială a temperaturii anodului. De regulă, temperatura anodului este mai mare decât cea a catodului, datorită faptului că la anod nu se consumă energie pentru expulzarea de purtători de sarcină.

În ceea ce privește **bilanțul termic**, analiza valorică a căldurii totale care se dezvoltă în arcul de plasmă este direct proportionala cu intensitatea curentului arcului (I_a) și cu tensiunea acestuia (U_a). Rezultă astfel suma cantităților de căldură dezvoltată la catod Q_k, în coloana arcului Q_e și la anod Q_{an} [M10].

$$Q_a = I_a \bullet U_a = Q_k + Q_e + Q_{an} \quad (3.7.)$$

$$Q_k = I_a \bullet U_k \quad (3.8.)$$

$$Q_e = I_a \bullet U_e \quad (3.9.)$$

$$Q_{an} = I_a \bullet U_{an}$$

3.6.3. Aplicații specifice

Depunerea chimică din fază de vapori amplificată de plasmă (Plasma Enhanced Chemical Vapor Deposition - PECVD) reprezintă procesul de depunere chimică în fază de vapori (Chemical Vapor Deposition – CVD) utilizat pe scară largă pentru a depozita filmele subțiri dintr-o stare de gaz (vapori) într-o stare solidă pe un substrat. Cea mai importantă caracteristică a procesului PECVD este utilizarea gazelor în starea lor plasmatică. Astfel, plachetele pot fi păstrate la temperaturi relativ scăzute (~200 °C ÷ 400 °C) în timpul procesului. Datorită temperaturii mici este posibilă depunerea straturilor subţiri chiar peste metale [M5], [I2].

PECVD este cea mai utilizată metodă de depunere. Aceasta folosește plasma gazului pentru a reduce temperatura necesară ce duce la obținerea unei reacții chimice, obținând astfel depunerea filmului. Calitatea filmului depus este evaluată prin determinarea dimensiunii granulelor, a compoziției peliculei, a grosimii, a uniformității, acoperirii treptate, aderenței și rezistenței la coroziune. Această tehnologie de depunere cu plasmă oferă un control excelent al proprietății materialelor (ex. indice de refracție, duritate) filmelor subțiri, printre care: oxid de siliciu (SiO); dioxid de siliciu (SiO_2), oxid nitrură de siliciu (SiON); nitrură de siliciu (SiN); siliciu amorf (a-Si), SiON, poli siliciu (poli-Si) [M29].

Straturile obținute prin PECVD prezintă caracteristici mai bune decât cele obținute prin tehnicile obișnuite de depunere termică, datorită faptului că pot fi ajustați mai mulți parametri de proces: aderența, tensiunea la compresiune și tracțiune, selectivitatea în gravare, stoichiometria (consistența) și gradul de curățare a straturilor depuse. Grosimea maximă a straturilor și uniformitatea lor depind totodată și de parametrii procesului PECVD. Controlul tensiunilor mecanice este important pentru evitarea crăpării filmului și degradării fiabilității metalului [J5], [M5]. PECVD poate fi utilizată pentru a depune filme pe diferite tipuri de piese cu scopul de a le proteja de coroziune, umiditate, zgârieturi și substanțe chimice. Microstructura, tensiunile mecanice, densitatea sunt caracteristici ale filmului depus.

În ceea ce privește structurile MEMS, s-au studiat intens depunerile prin PECVD de filme subțiri de SiC amorf (A-Si) și de grafenă verticală (VG), cu privire la utilizarea ca substraturi de cultură celulară în ceea ce privește aplicațiile BioMEMS [I3]. Cele mai noi cercetări arată faptul ca PECVD este cea mai bună metodă pentru creșterea grafenei verticale [J5].

3.6.4. Echipamente și instalații

Instalaţiile de producere a plasmei termice sunt alcătuite, în general, din următoarele elemente: sursă de alimentare cu energie electrică; panou de comandă; generator de plasmă (plasmatron); instalaţie de răcire a generatorului de plasmă; butelii de gaz plasmagen; sistem de transport; sistem de ventilaţie a noxelor [M10].

Elementul principal al unei instalaţii de producere a plasmei termice este generatorul de radiofrecvență. Schema de principiu a instalației de producere a plasmei este redată în Fig. 3.37. Substraturile pot fi plasate orizontal în cazul tehnicilor anizotrope cu bombardament (Fig. 3.38) sau vertical dacă tehnica este izotropă (Plasma Barrel).

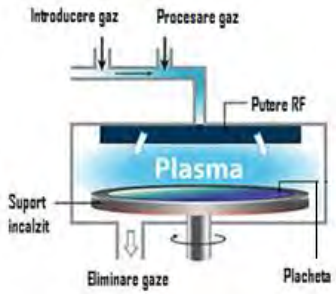


Fig. 3.37. Schema de principiu a instalației de producere a plasmei [M34]

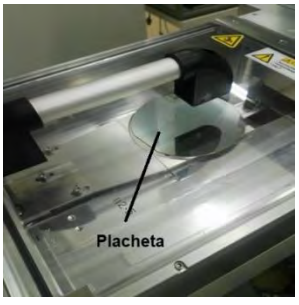


Fig. 3.38. Plasarea unei plachete, folosite ca suport pentru construcția MEMS-urilor, în echipamentul de producere a plasmei

Controlul adecvat al temperaturii substratului asigură uniformitatea. Camera este alcătuită din doi electrozi, dintre care unul este împământat, iar celălalt este alimentat

de o sursă RF. Plachetele sunt plasate pe electrodul împământat și sunt supuse unui bombardament cu particule mai puțin energice decât plachetele plasate pe electrodul alimentat [M34].

Două exemple actuale de astfel de echipamente de depunere cu plasmă, care sunt folosite de către Institutul de Microtehnologie pot fi văzute în Figurile 3.39 - 3.40.



Fig. 3.39. Echipament Plasmalab System 100 (Nanofab 1000) [*17]



Fig. 3.40. Echipament Plasmalab System 400 [*17]

Nanofab 1000 este un echipament de tip PECVD dedicat proceselor de creștere a materialelor carbonice prin regim termic, precum și prin regim asistat de plasmă, pe când Plasma Lab 400 este un echipament de tip RF *magnetron sputtering* pentru depunerea unei game largi de materiale din ținte de puritate înaltă.

4.

MICROFLUIDICA ȘI DISPOZITIVELE „LAB-ON-A-CHIP”

4.1. MICROFLUIDICA FOLOSITĂ PENTRU SEPARAREA CELULELOR

Deși s-a ajuns la un nivel avansat în ceea ce privește dezvoltarea în medicină, un punct de interes major l-a reprezentat întotdeauna și încă îl reprezintă cea mai mică componentă a organismului uman: celula. Astfel, printre progresele în domeniul bioingineriei se enumeră crearea de noi dispozitive biomedicale (bioMEMS-uri) de detecție a celulelor folosind microfluidica.

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”.** Tehnica „lab-on-a-chip” permite efectuarea de procese de laborator standardizate și automatizate utilizând, la scară micrometrică, componente ce permit încărcarea și manipularea mai multor probe. Dintre aceste elemente de acționare, fac parte micropompele și microvalvele, micromixerele, microfiltrele, suprafețele funcționalizate chimic, circuitele de control electric etc. [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].

Microfluidica contribuie semnificativ la biologia celulară, ajutată de faptul că are scala corespunzătoare care se potrivește cu dimensiunea celulelor. Cultura celulară, fuziunea și apoptoza au fost analizate cu succes în microfluidică. Datorită nevoii de a separa eficient celulele, cercetătorii au determinat diverse analize biologico-medicale, dezvoltând tehnici de separare pe baza microfluidicii. Pentru a putea realiza separarea celulelor, este necesar să se țină cont de: principiile de separare, marcatorii de separare, rezoluția, eficiența și capacitatea de producție a acestor tehnici. Dezvoltarea unor metode eficiente de separare a celulelor care să ofere un control mai mare asupra distribuției populației celulare este importantă în

realizarea dispozitivelor tip „Lab-On-a-Chip” (LOC). Orice tip de celulă din sânge poate fi determinată cu ajutorul microfluidicii și a dispozitivelor lab-on-a-chip [W10], [A11].

Biocip-urile, numite și „Lab-On-a-Chip (LOC)”, sunt dispozitive de detecție pe bază de cipuri de siliciu ce integrează un organism viu sau un produs derivat din sisteme vii (de exemplu o enzimă sau un anticorp) și un traductor ce furnizează o indicație, un semnal sau altă formă de recunoaștere a prezenței unei substanțe specifice în mediul înconjurător. LOC-urile reprezintă dispozitive miniaturizate capabile să reducă, să integreze și să automatizeze operațiile convenționale de laborator simple sau multiple într-un sistem care se potrivește pe un cip, denumit și platformă. Cipul poate avea dimensiuni de la câțiva milimetri la câțiva centimetri (mm^2 – cm^2). Aceste platforme permit manipularea unor volume foarte mici de lichide, de obicei pe scara ml sau nl și au o adâncime și o lățime foarte mică a canalelor (mai mică decât 1 mm) [M6], [Ț1].

4.1.1. Clasificarea și numărul celulelor din sânge

Sângele este țesutul de culoare roșie aflat sub formă lichidă, care circulă prin vene și artere, având rolul de a asigura nutriția și oxigenarea organismului. Este compus din două componente principale: **plasmă** și **elemente figurate** (Fig. 4.1). **Plasma sanguină** se regăseşte în sânge în proporție de 40 - 45%. **Elementele figurate** sunt reprezentate de celulele sângelui care plutesc în plasma sanguină. Ele sunt împărțite în trei categorii: eritrocite, leucocite şi trombocite. Prin intermediul acestui țesut lichid se realizează toate schimburile nutritive și de epurare dintre organism și mediul extern. Sângele are anumite proprietăți fizico-chimice: culoare, densitate, temperatură, vâscozitate, pH [N2], [M38], [M33].

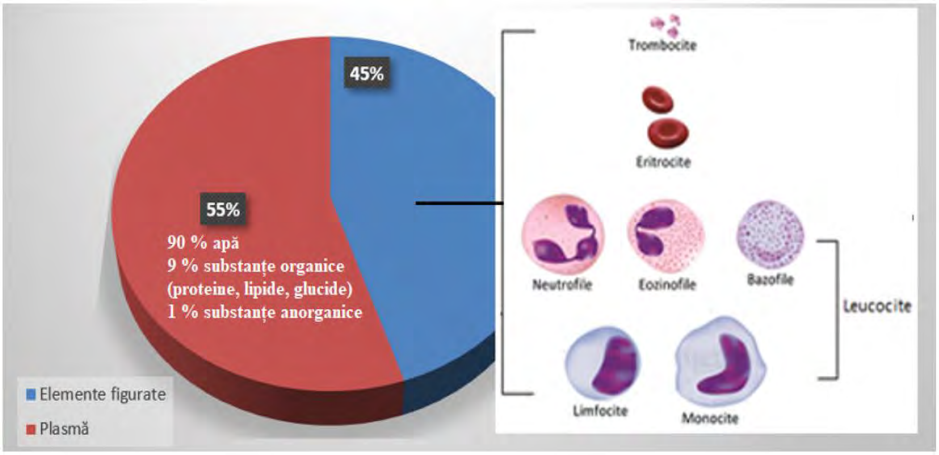


Fig. 4.1. Proporțiile aproximative ale elementelor componente ale sângelui

Sângele, după cum este cunoscut, conține trei grupe principale de celule: **trombocite**, **eritrocite** (globulele roșii) și **leucocite** (globulele albe). Fiecare dintre aceste celule prezintă un anumit număr pe µl (mm^3) de sânge. În funcție de creșterea sau scăderea acestui număr și a categoriei de celule, se pot identifica anumite probleme de sănătate [N2].

A. Trombocite

Trombocitele sunt celule circulante, mobile, care nu au o structură celulară propriu-zisă. Cea mai mare parte dintre aceste celule sangvine au rol în procesul de hemostază (oprirea sângerării). Datorită fragilității lor se distrug repede prin uzură (7 - 10 zile), dar se reînnoiesc permanent. Trombocitele conțin: factori de coagulare; adenozin difosfat (ADP); adenozin-trifosfat (ATP); serotonină; calciu; enzime etc.

Pe lângă hemostază, trombocitele se ocupă de procesul de coagulare a sângelui (transportul unor substanțe plasmatice), de retracția cheagurilor formate, precum și de alte fenomene ale hemostazei, începând să acționeze imediat de la primele momente ale sângerărilor. Ele ajută la menținerea integrității endoteliului vascular (crește fragilitatea vasculară). În mod normal, numărul trombocitelor, este de circa 300.000 / mm^3. În funcție de numărul crescut sau scăzut al acestora, se pot identifica anumite probleme de sănătate [M38].

- **Numărul trombocitelor din sânge**

Un număr **scăzut** al trombocitelor apare în cadrul unor afecțiuni precum: anemie hemolitică, hepatită, leucemie. Poate apărea și în urma transfuziilor, radioterapiei sau chimioterapiei, la expunerea la raze ultraviolete. Dacă numărul scade sub 100.000 / mm^3, atunci crește riscul apariției unor hemoragii (interne sau externe), iar dacă valoarea este sub 50.000 / mm^3, se produc hemoragii spontane. Când numărul trombocitelor **crește** la peste 700.000 / mm^3, poate fi rezultatul: efortului fizic intens, deshidratării, stresului, traumatismelor. Acest număr crescut se poate regăsi și în timpul travaliului, în hemoragii, în timpul sau în urma unor intervenții chirurgicale sau în splenectomie. Această valoare se poate regăsi și datorită unor stări deteriorate ale organismului, precum: anemia feriprivă (lipsa de fier), anumite tipuri de cancer, infecții, reumatism, inflamații, leucemie mieloidă cronică și post hemoragie [T4], [*10], [M38].

B. Eritrocite (hematii / globule roșii)

Eritrocitele sunt denumite și **hematii** sau **„celule roșii”**, datorită pigmentului care dă culoarea roşie sângelui/hemoglobinei. Acestea sunt cele mai numeroase celule din sânge și se formează în măduva osoasă. Atribuția principală o reprezintă transportarea oxigenului şi a dioxidului de carbon de la plămâni la țesuturi.

O singură hematie conține 1 miliard de molecule de oxigen și traversează corpul în 20 de secunde. Într-o picătură de sânge există milioane de hematii, de dimensiuni

mici, cu formă biconcavă și care trăiesc aproximativ 120 de zile (în fiecare secundă se nasc 2 - 3 milioane de hematii).

Eritrocitele sunt formate din: 64 % apă, 34 % reziduu uscat, 2 % proteine, fosfolipide, colesterol și glicoproteine. Cele mai importante proprietăți ale hematiilor sunt:

a. elasticitatea - permite deformarea cu revenire la formă;

b. permeabilitatea selectivă - apă, CO_2, glucoză, ioni mici - impermeabil pentru Na+ - permeabil pentru K+ si H+ - permeabil pentru Cl- și HCO3-;

c. rezistența globulară - capacitatea de a nu se distruge la diverse agresiuni;

d. stabilitatea de suspensie - stă la baza vitezei de sedimentare a hematiilor (VSH) -stabile în suspensie;

e. antigenicitatea - au pe suprafața lor lipopolizaharide [N2].

- **Numărul eritrocitelor din sânge**

Determinarea eritrocitelor din sânge se face în primul rând pentru a determina anemia, dar și pentru a identifica alte afecțiuni medicale. **Creșterea** numărului de eritrocite peste valorile normale (vâscozitate crescută) se poate datora unor afecțiuni precum: insuficiență cardiacă congenitală, cord pulmonar, deshidratare, fibroză pulmonară, policitemia vera. **Scăderea** numărului de eritrocite sub valorile normale (vâscozitatea scăzută) este posibil să se datoreze următoarelor afecțiuni: anemie, deficiențe ale măduvei osoase, hemoragie, malnutriție, deficiențe nutriționale de Fe, Cu, vitamina B6 și B12, lichide în exces în organism etc. [M9].

C. Leucocite (globule albe)

Leucocitele 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 infecţiei.

În cazul în care nu există suficiente celule albe în sânge, atunci sistemul imunitar este slăbit. Organismul unei persoane sănătoase produce zilnic aproximativ 100 de miliarde de celule albe [M33].

Anticorpii produși de către limfocitele B reprezintă elementul de bază al sistemului imunitar - componenta proteică. Ei circulă în sânge, recunosc bacteriile, virușii și alte toxine care duc la îmbolnăvire, sau celulele distruse și le neutralizează. După această expunere la substanțe străine (antigen), anticorpii vor continua să ofere protecție la expuneri viitoare la același antigen [T4].

Toate tipurile de leucocite intervin în apărarea organismul față de diverși agenți patogeni. Leucocitele se împart în două grupe principale, care la rândul lor

se divid în alte subgrupe. Clasificarea leucocitelor este următoarea (Fig. 4.2) [*20]:

C.1. Leucocite cu nucleu unic, numite **mononucleare**, care se împart în:

C1.1. Limfocite - sunt esenţiale pentru producerea anticorpilor care protejează împotriva bacteriilor, virusurilor şi a altor substanţe toxice pentru organism. La rândul lor, limfocitele se împart în alte trei grupe:

- limfocite **B** (contribuie la imunitate, când se sintetizează anticorpi);
- limfocite **T** (au roluri complexe în distrugerea altor celule sau coordonarea întregului sistem imunitar).
- limfocite **N**atural **K**iller - **NK** (recunosc și înlătură celule anormale).

Din totalul limfocitelor circulante aproximativ 90% sunt limfocite T, circa 10% limfocite B, limfocitele recirculante (Natural Killer) fiind în număr foarte mic.

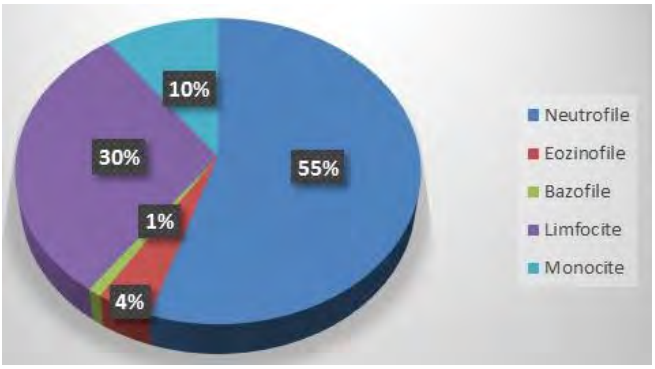


Fig. 4.2. Proporțiile aproximative ale leucocitelor din sânge

C1.2. Monocite - au rolul de a distruge microbii şi bacteriile. Acestea sunt considerate celule de tranzit în sange, părăsesc capilarele și se transformă în macrofage, celule cu roluri importante fiziologice și în apărarea imună. **Un număr crescut al monocitelor se justifică prin** infecţii cronice, boli autoimune sau cancer de sânge [M38], [*20].

C.2. Leucocite cu nucleu fragmentat, numite **polinucleare**

Polinuclearele sunt numite și ***granulocite***, după granulațiile pe care le conțin în citoplasmă. Ele reprezintă aproximativ două treimi din leucocite și cuprind trei subgrupe celulare:

C2.1. Neutrofile - distrug bacteriile şi ciupercile care afectează organismul. Polinuclearele neutrofile se mai numesc polimorfonucleare neutrofile și sunt cele mai numeroase tipuri de leucocite.

Polinuclearele neutrofile au rol de apărare împotriva bacteriilor, pe care le fagocitează. **Dacă numărul neutrofilelor este crescut, acesta poate fi rezultatul unor** infecţii, răni, inflamaţii, unor medicamente sau prezintă o formă de leucemie.

C2.2. Eozinofile - responsabile cu distrugerea paraziților și a celulelor canceroase. Granulațiile lor se colorează bine cu coloranți acizi. **În cazul unui număr de eozinofile crescut pot exista** paraziţi sau alte infecţii, alergii sau astm.

C2.3. Bazofile – au rolul de a „alerta" corpul atunci când apar infecţii, prin secreția de substanţe chimice eliberate în fluxul sanguin. Ele sunt celule importante în procesul de inflamaţie și au granulații cu afinitate pentru coloranții bazici. Un număr de bazofile crescut poate fi rezultatul unei boli tiroidiene [M38].

- **Numărul leucocitelor din sânge**

Numărul leucocitelor din sânge este în medie de 5.000 pe milimetru cub (4.000 - 8.000 / mm^3). Aceste valori pot varia în condiții fiziologice sau patologice.

Bolile infecțioase microbiene produc creșterea numărului de leucocite la valori de 15.000 - 30.000 / mm^3, uneori și mai mult. Unele tipuri de cancer, precum leucemia, prezintă un număr de leucocite de câteva sute de mii pe milimetru cub. În acest caz, sângele devine albicios (sânge alb). Creşterea exagerată a numărului de leucocite (leucocite mărite) poartă denumirea de **leucocitoză.**

Un număr de leucocite scăzut provoacă boala numită **leucopenie** (<4000 / μL). Valorile normale considerate linii de referință sunt între 2500 - 4000 / μL. Sunt considerate valori anormale cele <2500 / μL [G6], [*11].

4.1.2. Importanța limfocitelor din sânge

Limfocitele reprezintă, în mod normal, 30% din totalul de **celule sangvine albe,** ocupând astfel al doilea loc, după neutrofile, Acestea 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. Una din cele mai des întâlnite boli ale secolului cu care limfocitele luptă este cancerul. Acestea se dezvoltă în celule producătoare de anticorpi care neutralizează efectul substanțelor străine în sânge. Forma limfocitelor este sferică; ele prezintă valuri citoplasmatice, ce se pot deplasa în celule și țesuturi. 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) [Z4], [*20]:

1. Limfocite Natural Killer - NK;
2. Limfocite B;
3. Limfocite T.

Principalele organe limfoide responsabile cu producția și selecția clonală precoce a țesuturilor de limfocite sunt Timusul și măduva osoasă. Măduva osoasă produce ambele tipuri de celule T (**CD4**, **CD8**) și este responsabilă de producerea și

maturizarea celulelor B. Dintre acestea, aproximativ 25 % din noile limfocite rămân în măduva osoasă și devin celule B. Celulele B produse se alătură sistemului sangvin și circulă către organele limfoide secundare în căutarea de agenți patogeni.

Celelalte 75 % (celulele T) se deplasează către timus, unde suportă o divizare rapidă și generează un număr mare de timocite imature. Acestea se numesc timocite dublu-negativ (CD4- CD8-). Pe măsura maturizării, timocitele devin dublu-pozitive (CD4+ CD8+), iar la final devin limfocite mature.

În stadiul matur sunt mono-pozitive [CD4+ CD8- (limfocite ajutătoare - „T helper”) sau CD4- CD8 + (limfocite T citotoxice – „cytotoxic”)]. Celulele T mature care pleacă din timus, alături de celulele B sunt în căutarea agenților patogeni, și astfel, limfocitele B și limfocitele T lucrează împreună pentru a lupta împotriva infecțiilor. Populațiile de celule sunt de obicei definite folosind simbolul „+” sau „-” pentru a indica dacă o anumită fracțiune celulară exprimă sau nu o moleculă CD.

CD3 reprezină o moleculă care se exprimă în primele etape ale dezvoltării limfocitelor T. Aceasta este prezentă în ambele categorii de limfocite T: „limfocite T ajutătoare” și „limfocite T citotoxice”. Aceasta nu se regăsește în celulele B sau celulele Natural Killers (NK). Limfocitele de tip T sunt coordonatorul central și executorul multor funcții imune [F2].

Numărul limfocitelor din sânge este între 1.500 – 3.500/µL. Numărul scăzut de limfocite poartă denumirea de **limfocitopenie** și apare atunci când sunt sub 1.500 de limfocite pe mm^3. Poate apărea atunci când corpul nu produce suficiente limfocite, când limfocitele sunt distruse sau sunt prinse în splină sau în ganglionii limfatici. Limfocitopenia poate indica o serie de afecțiuni precum: subnutriție; gripă; stări autoimune (lupusul); unele tipuri de cancer, anemia limfocitară, limfomul și boala Hodgkin; utilizarea steroizilor; terapie cu radiații; administrarea anumitor medicamente, inclusiv cele pentru chimioterapie; unele afecțiuni moștenite, cum ar fi sindromul Wiskott-Aldrich și sindromul DiGeorge etc.

Pe lângă acestea, cea mai cunoscută boală ce poate fi determinată în raport cu numărul de limfocite este dată de infecția cu HIV/SIDA. Infecția cu HIV (Virusul Imunodeficienței Umane) distruge progresiv celulele T din sânge și inhibă producția de noi limfocite. De asemenea, poate duce la izolarea limfocitelor în nodulii limfatici, crescând astfel riscul de infecții pulmonare. Un diagnostic important în managementul bolii HIV este numărul absolut al limfocitelor care exprimă receptorii CD4 și CD8 (receptori ai celulelor T). Numărul de celule T „CD4 si CD8” dintr-o mostră de sânge poate indica starea sistemului imunitar al pacientului, și dacă acesta este infectat cu virusul HIV. Inversarea raportului CD4/CD8 este specific SIDA (Sindromul Imunodeficientei Umane Dobândite), înainte ca virusul HIV să poată fi detectat. Același raport de CD4/CD8 a fost analizat pe pacienți cu vârste cuprinse între 7 - 8 luni și s-a constatat că raportul este mai mic la nou-născuții prematur. Determinarea celulelor CD4 este utilizată pentru stabilirea momentului inițierii terapiei antiretrovirale HIV și pentru monitorizarea eficienței tratamentului [B10].

Limfocitoza (număr mare de limfocite) apare atunci când există peste 4000 de limfocite pe mm^3. Este frecventă atunci când o persoană are o infecție. În general, limfocitele cresc în infecțiile virale. Dacă nivelul limfocitelor persistă să fie crescut, atunci sunt posibile inclusiv rujeolă, oreion și mononucleoză; adenovirus; hepatită; gripă; tuberculoză; toxoplasmoză; citomegalovirus; bruceloză; vasculită; sau anumite forme de leucemie: leucemie limfocitară acută, leucemie limfocitară cronică [*11]. Există și alte cauze mai rare: afecțiuni ale țesutului conjunctiv, afecțiuni ale glandei tiroide, boala Addison etc.

O proporție de peste 40 % de limfocite din totalul leucocitelor, dar cu număr de leucocite normal (sub 4000 celule/mm^3) reprezintă limfocitoza relativă. Un număr de limfocite mai mare decât de obicei poate apărea în perioada de convalescență, după o boală, aceasta fiind o situație temporară. Numărul fiecărei categorii de limfocite poate determina altceva:

– nivelul redus al limfocitelor B presupune scăderea anticorpilor care protejează organismul de infecții;

– nivelul scăzut al limfocitelor T și NK reduce capacitatea organismului de a lupta cu infecții virale, fungice sau cu paraziți [C6], [B10].

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.

O structură de interes des întâlnită în construcția dispozitivelor microfluidice este: sticlă / siliciu / sticlă. Se pot folosi două straturi de sticlă pentru a forma suprafața inferioară și suprafețele laterale ale canalului microfluidic, în timp ce canalele microfluidice sunt definite în siliciu, folosind un proces de corodare (ex. RIE) [I4].

Un alt exemplu de fabricare a canalelor microfluidice în siliciu este prezentat în Fig. 4.3. Microcanalele se corodează într-un substrat de siliciu acoperit cu oxid de siliciu, cu ajutorul unui echipament de corodare adâncă a siliciului cu ioni reactivi (DRIE). Pentru încapsulare este folosit un capac din sticlă, lipit cu ajutorul unui sistem de lipire anodică [*16]. Cel mai mare avantaj al microcanalelor fabricate în

sticlă (Fig. 4.4) îl reprezintă faptul că se poate realiza o curățare minuțioasă a acestora pentru utilizare [O1].

Microfluidica dezvoltată pe hârtie a condus la teste de diagnostic ieftine și de unică folosință. Testele de hârtie sunt destul de frecvente la dimensiuni mari (ex. teste de sarcină) [N3].



Fig. 4.3. Canale microfluidice realizate în Si/SiO_2 [*16]



Fig. 4.4. Canale microfluidice realizate în sticlă [O1]

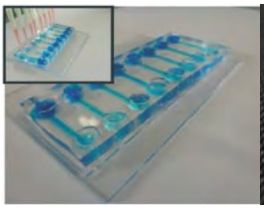


Fig. 4.5. Canale microfluidice realizate în PDMS [C18]

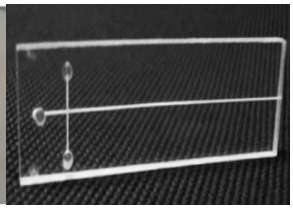


Fig. 4.6. Canale microfluidice realizate în PMMA [C11]

Cel mai utilizat material dintre polimeri în construcția dispozitivelor microfluidice bioMEMS îl reprezintă polidimetilsiloxan (polydimethylsiloxane - PDMS). În baza proprietăților pe care le prezintă acest polimer organic pe bază de siliciu, este extrem de utilizat. Este vâscoelastic, la temperaturi ridicate acționând ca un lichid vâscos, iar la temperaturi scăzute, acționând precum un solid elastic. PDMS este inert, neinflamabil și transparent [W11], [W6]. Acesta poate fi atașat cu ajutorul plasmei diferitelor substraturi (exemplu sticlă, siliciu). Astfel de canale microfluidice realizate în PDMS sunt prezentate în Fig. 4.5 [C18].

PDMS este folosit la dispozitivele microfluidice pentru anumite proceduri biologice, precum: imunoanalizarea, sortarea și manipularea celulelor, separarea ADN-ului sau pentru studiul celulelor din microcanalele parcurse de către fluide [S8], [D4].

Le, T. e*t al.* au prezentat în [L1] un sistem manual de microvalve fabricat din PDMS. Acest dispozitiv se utilizează în aplicații microfluidice. Sistemul de supape a fost fabricat ca un dispozitiv separat și apoi a fost conectat la sistemul microfluidic prin tuburi.

Dzebic, M. *et al.* au prezentat în [D9] fabricarea unui dispozitiv microfluidic folosit pentru separarea soluțiilor biologice. Pentru a realiza acest dispozitiv din PDMS, s-a fabricat inițial cu o matriță din fotorezist SU-8. S-a etalat fotorezistul pe o plachetă de siliciu folosită ca suport, iar cu ajutorul litografiei a fost expusă masca cu modelul dorit. În această matriță, a fost turnat PDMS-ul în interiorul căruia au fost realizate zonele microfluidice (microcanalele și orificiile de intrare și ieșire). Pentru a obține dispozitivul final, după ce PDMS-ul este desprins de matriță, este lipit pe un substrat de sticlă folosind un echipament de lipire cu plasmă de oxigen [D9]. Există mai multe astfel de dispozitive alcătuite din PDMS și sticlă. Aceste două materiale se asamblează folosind plasma de oxigen sau UV-ozon [J4].

Cel mai mare avantaj al folosirii PDMS-ului în fabricarea dispozitivelor microfluidice (Fig. 4.5) este dat de faptul că microstructurile PDMS pot fi fabricate cu precizie și la prețuri reduse [S8].

Un alt material asemănător PDMS-ului, folosit pentru fabricarea canalelor microfluidice îl reprezintă PMMA. Astfel de canale microfluidice fabricate din PMMA pot fi observate în Fig. 4.6 [C11].

De asemenea, s-a demonstrat că fotorezistul SU-8 se poate folosi cu succes în partea de dezvoltare a canalelor microfluidice [A15]. Totodată, au fost folosite tehnologii de fabricare hibridă care folosesc împreună un sistem flexibil polimer (polidimetilsiloxan — PDMS) și un polimer rigid (SU-8) [P4].

4.3. TIPURI DE CIRCUITE MICROFLUIDICE

Un circuit microfluidic poate controla debitele, direcțiile de curgere, amestecarea și reacția substanțelor chimice, separarea particulelor etc. [D8]. Geometria unui sistem microfluidic este determinată de parametrii precum: lățimea canalului central; adâncimea canalului sau unghiul de intersecție dintre canale.

În majoritatea cazurilor de determinare a anumitor tipuri de celule, pe lângă orificiul prin care se introduce sângele, mai există minim o intrare pentru lizarea unui anumit tip de celule, și încă o intrare pentru soluția de stopare a lizării celulelor. De obicei, două dintre soluții se introduc simultan, astfel încât se folosește tipul de bifurcație simetrică.

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^o 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.

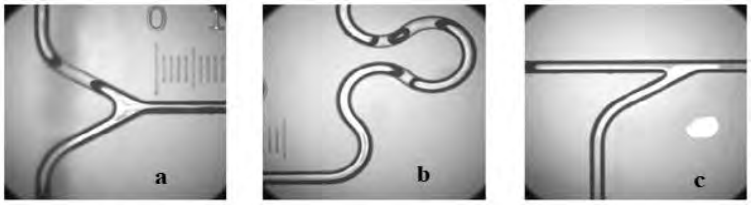


Fig. 4.7. Circuite microfluidice: a.) canale drepte cu bifurcație la 60^o;
b) microcanale șerpuite; c) microcanale drepte cu bifurcație laterală [*33]

Există diverse geometrii propuse pentru circuitele microfluidice în vederea realizării analizelor de sânge. Există dispozitive care pot avea intrările la unghiuri de

60º (Fig. 4.8) sau de 45º (Fig. 4.9) și canalul microfluidic în formă spiralată. Chiu *et. al.* au dezvoltat un dispozitiv microfluidic simplu, în spirală, ce are rolul de a izola limfocitele B și T (Fig. 4.10) [C14].

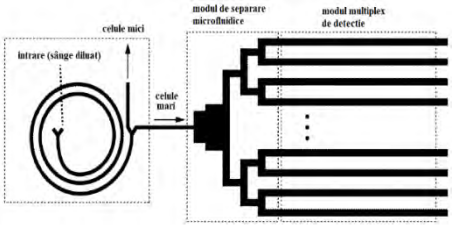


Fig. 4.8. Canal spiralat cu trei intrări la unghiuri de 60º [A7]

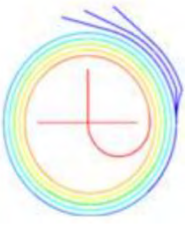


Fig. 4.9. Canal spiralat cu trei intrări la unghiuri de 45º [*21]

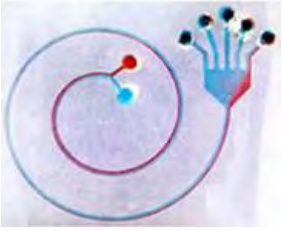


Fig. 4.10. Canal spiralat cu doua intrări la unghiuri de 60º [C14]

Pentru fiecare dispozitiv în parte, s-a stabilit geometria optimă a canalelor microfluidice cu ajutorul simulărilor numerice.

4.4. STADIUL ACTUAL AL DISPOZITIVELOR „LAB-ON-A-CHIP”

Baza procesului de fabricare a dispozitivelor „Lab-On-a-Chip (LOC)” este fotolitografia. În acest sens, LOC-urile sunt uneori denumite dispozitive microfluidice sau cip-uri microfluidice [S2], [Y1]. LOC este în esență o rețea de canale și rezervoare care sunt gravate pe substraturi de materiale pentru a construi laboratoare miniaturale. Forțele de presiune sau electrocinetice deplasează volume mici de lichid într-o manieră riguros controlată prin canale.

Tehnologia bazată pe litografie a apărut pentru prima dată în anul 1966 odată cu dezvoltarea senzorilor de presiune. Imediat după apariția acestor senzori, a început dezvoltarea dispozitivelor de analiză a fluidelor (conexiuni capilare, dispozitive de dozare, mixere, pompe, valve etc).

Primul dispozitiv „Lab-On-a-Chip” a apărut în anul 1979 și era reprezentat de un cromatograf conceput de către S.C. Terry - Stanford University. La sfârșitul anilor 1980 au apărut dispozitive performante în acest domeniu, precum micropompele și senzorii de puls. La mijlocul anilor 1990 interesul în cercetarea și comercializarea acestor dispozitive a crescut, atunci când s-a dovedit că tehnica „Lab-On-a-Chip” oferă instrumente importante în aplicații precum electroforeza capilară. Aceasta permite separarea moleculelor încărcate electric în funcție de mobilitatea proprie într-un tampon cu un pH dat și în funcție de fluxul electroosmotic [P3], [T2]. Electroosmoza reprezintă procesul generat de mișcarea unui fluid față de un perete solid generat de acțiunea câmpului electric [D7].

La nivel internațional, au fost dezvoltate mai multe astfel de dispozitive, dar majoritatea se află în stadiul de cercetare, ele nefiind comercializate. Dintre aceste exemple, se menționează Watkins N. *et al*, care au dezvoltat un biocip microfluidic de numărare a limfocitelor CD4+ și CD8+ din sânge integral, fără a pregăti probele în prealabil. Dispozitivul se bazează pe o numărare electrică diferențială, în care eritrocitele sunt lizate, și celulele țintă CD4 și CD8 sunt legate de anticorpi specifici conjugați cu fluorofori [W9], [H1], [H2].

Multe dintre metodele LOC de numărare a celulelor CD4+ se bazează pe adaptarea microfluidicii la citometria în flux și fac cuantificarea prin analizarea imaginilor celulelor T CD4+ marcate fluorescent [B8] sau pe miniaturizarea platformelor de citometrie în flux [W1].

Murtagh M. împreună cu Agenția Sănătății Globale - Unitaid, au prezentat in 2011 un raport în care au fost prezentate metodele remarcabile în ceea ce privește detecția celulelor CD4+ pentru diagnosticarea HIV [M39].

Dispozitivele portabile și metodele aferente oferă o precizie suficientă pentru monitorizarea progresiei terapiei. Dintre aceste metode, amintim stripurile imunocromatografice pentru celulele CD4+ sau sistemul de sedimentare care cuantifică CD4+ în funcție de înălțimea celulelor CD4+ conjugate cu microparticule într-o fereastră de vizualizare [B13]. Există și alte metode, precum cele ce folosesc microscopia cu scanare în fluorescență și quantum doturi sau anticorpi marcați fluorescent [B11]. În general, în ceea ce privește aceste metode, este necesară prepararea probei în afară cipului și manipularea manuală. Simplitatea și costurile mici fac ca metodele cu detecție electrică să fie în continuare studiate pentru citometrie LOC. S-au făcut progrese în microcitometria impedanței cu curent alternativ pentru detecția diferențelor în celulele modificate chimic [C12], dar nu este suficient de sensibilă pentru a face deosebirea între celulele care au morfologii similare.

Primul analizor fără flux LOC pentru cuantificare de CD3+ și CD4+ a fost fabricat de firma Alere Pima Germania, în anul 2009. Este un citometru cu volum fix, care folosește iluminare LED și detectează celulele CD4+ marcate fluorescent făcând analiza imaginilor statice pentru numărarea CD4+, nu și o determinare procentuala de CD4, ceea ce limitează folosirea pentru monitorizarea HIV la sugari. Cartușul Pima este alimentat cu probă de sânge integral 25 μL și apoi introdus în analizor, unde are loc incubarea cu anticorpii din cartușul Pima, anticorpi anti-CD4 și anti-CD3 marcați fluorescent, iar apoi are loc excitarea fluoroforilor cu LED și detectarea emisiilor fluorescente cu camera CCD [*12].

Firma Mbio Diagnostics Inc. USA a dezvoltat un instrument pentru cuantificare de CD4 cu detecție în fluorescență. Proba de sânge venos sau din înțepătură în deget se introduce direct în cartușul Mbio care conține doi reactivi liofilizați (doi anticorpi marcați fluorescent) iar cititorul efectuează o analiză a imaginii în două culori, furnizând o cuantificare absolută a celulelor CD3+ și CD4+. Deși metoda de detecție este similară cu cea a analizorului Alere Pima, sistemul Mbio prezintă dezavantajul că este un proces în două etape: în prima etapă, proba de sânge este procesată în cartuș în afara cititorului și

în etapa a doua, după procesarea probelor, cartușul este introdus în cititor pentru a genera răspunsul final [M1].

Daktari Diagnostics Inc., USA au dezvoltat un instrument care funcționează fără sisteme optice, lentile sau camere. Detecția se face prin măsurare impedimetrică. Software-ul Daktari poate doar să estimeze numărul de celule CD4+ din volumul original, dar nu poate reda un număr de celule fizice. Această estimare se face pe baza concentrației componentelor celulare eliberate în camera de detecție [M39].

Rodriguez și colaboratorii în 2005 au realizat un microcip de numărare a celulelor CD4. S-a folosit ca probă sânge integral (fără preparare) de care se leagă anticorpi conjugați cu un fluorofor, care au fost capturați pe o membrană într-o celulă de curgere miniaturizată urmată de detecția optică cu ajutorul unui microscop epifluorescent. Un algoritm de calcul asociat transformă imaginile obținute în numărul de CD4 absolute și CD4% în timp real. După aceeași metodă, au fost cuantificate de autorii studiului și CD3% și CD8%. Rezultatele obținute au arătat că este o metodă mai puțin precisă pentru probele de pacienți cu număr mare de CD4 (>500 celule/μL) pentru că imaginile digitale se suprapun și nu se mai pot număra celulele [R3].

Folosirea dispozitivelor microfluidice bazate pe tehnologia MEMS (Micro-Electro-Mechanical-Systems) a îmbunătățit semnificativ performanțele multor aplicații în **biodetecție.** Acestea permit manipularea probelor, amestecarea, diluarea, electroforeza și separarea cromatografică, colorarea și detectarea pe un singur sistem integrat.

O altă categorie de celule determinate de astfel de dispozitive sunt celulele tumorale circulante (CTC). Cancerul apare odată cu apariția „defectelor” (mutațiilor) genelor care determina înmulțirea celulelor. Celulele tumorale circulante (CTC), sunt celule care se găsesc în fluxul sanguin în timpul procesului de metastază (ultima etapă a cancerului). Acestea provin din tumori primare sau secundare la pacienții cu cancer. CTC-urile au markeri de suprafață diferiți față de celulele normale din sânge.

Microfluidica oferă oportunități unice pentru izolarea și detectarea celulelor tumorale rare din sânge, promovând descoperirea biomarkerilor celulelor tumorale și extinzând înțelegerea biologiei metastazelor. Dispozitivele de detectare a CTC-urilor folosesc proprietăți diferite ale celulelor tumorale circulante, markeri specifici suprafețelor celulare, proprietăți biologice [C19] sau proprietăți fizice precum dimensiunea, densitatea și deformabilitatea [B17]. Cercetătorii investighează diferite metode pentru a determina diferite tipuri de cancer: cancer de sân [S6], [B16], [D3], [W2], cancer pulmonar [C13], [C10] cancer colorectal [O2], [M8] etc., prin diferite metode [B18], [M7]. În contextul extinderii permanente a bolilor tumorale, se impune o dezvoltare permanentă a tehnicilor de diagnosticare, tratare și control. **Această dezvoltare implică în permanență utilizarea unor micro și nanotehnologii, pe cât posibil noninvazive, al căror conținut nu se poate delimita de utilizarea unor mini-echipamente specializate din categoria MEMS-urilor cu aplicații în biotehnologie.**

Tehnologiile de biosensibilitate cuprind dispozitive și sisteme portabile utilizate pentru identificarea, monitorizarea și controlul fenomenelor biologice. Cele mai uzuale

dispozitive sunt cele ce folosesc biorezonanţa pentru determinare celulelor. În cazul ființelor umane, există o tehnică de evaluare și tratament numită biorezonanță. Această tehnică detectează și citește oscilațiile electromagnetice ultrafine, produse de moleculele, celulele, diferitele organe și glande ale organismului.

Cu ajutorul unui mini-microscop, celulele canceroase pot fi depistate în timp real. Dispozitivul este prezentat în Fig. 4.11 [*13].



Fig. 4.11. Mini-microscop pentru determinarea celulelor tumorale [*13]

Principalele avantaje ale LOC sunt date de:

- ușurința utilizării;
- viteza de analiză;
- consumul redus de probe și reactivi;
- reproductibilitate ridicată datorată standardizării și automatizării.

În Tabelul 4.1, sunt prezentate articole cu exemple de dispozitive LOC.

Tabelul 4.1. **Exemple de dispozitive LOC**

Nr.	Autor/i	Articol	Subiectul abordat
1	Wang, J.H. et.al. (2011) [W4]	"An integrated microfluidic system for counting of CD4+ /CD8+ T lymphocytes"	Dispozitiv microfluidic ce are în componența sa micromixere și micropompe pentru separarea celulelor CD4+ și CD8+.
2	Watkins N.N. et.al. (2013) [W9]	"Microfluidic CD4+ and CD8+ T Lymphocyte Counters for Point-of-Care HIV Diagnostics Using Whole Blood"	Dispozitiv de detecție a celulelor CD4+ și CD8+, cu circuitele microfluidice realizate în PDMS, din probă nediluată de sânge.
3	Hassan U. et.al. (2014) [H1]	"Flow metering characterization within an electrical cell counting microfluidic device"	Fluxul de măsurare dintr-un dispozitiv microfluidic de detecție a limfocitelor
4	Wang, S. et.al. (2014) [W7]	"Micro-a-fluidics ELISA for Rapid CD4 Cell Count at the Point-of-Care"	Platforma microfluidică de detecție a celulelor CD4+ cu ajutorul benzilor magnetice.

Tabelul 4.1 (continuare)

Nr.	Autor/i	Articol	Subiectul abordat
5	Nwankire C. E.net.al. (2015) [N5]	“Label-free impedance detection of cancer cells from whole blood on an integrated centrifugal microfluidic platform”	Platformă microfluidică de detecție a celulelor producătoare de cancer
6	Hassan U. et.al. (2016) [H2]	“Microfluidic differential immunocapture biochip for specific leukocyte counting”	Dispozitiv microfluidic de detecție a unor leucocite specifice CD4+ și CD8+
7	Chiu T. K. et.al. (2016) [C15]	“Application of optically-induced-dielectrophoresis in microfluidic system for purification of circulating tumour cells for gene expression analysis- Cancer cell line model”	Dispozitiv microfluidic de captare a celulelor tumorale circulante – specifice cancerului metastazic
8	Park E. S. et.al. (2016) [P2]	“Continuous Flow Deformability-Based Separation of Circulating Tumor Cells Using Microfluidic Ratchets”	Dispozitiv microfluidic de separare a celulelor CTC de celelalte celule din sânge
9	Zeinali M. et.al. (2018) [Z1].	“Profiling heterogeneous circulating tumor cells (CTC) populations in pancreatic cancer using a serial microfluidic CTC carpet chip”.	Dispozitiv din PDMS folosit pentru detecția celulelor CTC
10	Liu Y. et.al. (2019) [L3]	“Analysis of leukocyte behaviors on microfluidic chips”	Un review al dispozitivelor de tipul „lab-on-a-chip”folosite în detecția leucocitelor
11	Chen J. et.al. (2020) [C9]	“3D printed microfluidic devices for circulating tumor cells (CTCs) isolation”	Dispozitiv de izolare a celulelor tumorale CTC, realizat cu ajutorul imprimantei 3D.
12	İçöz K. et.al. (2020) [I1]	“Microfluidic Chip based direct triple antibody immunoassay for monitoring patient comparative response to leukemia treatment”	Dispozitiv microfluidic realizat din PMMA pentru monitorizarea leucemiei.
13	Quang L. D. et.al. (2020) [Q2]	“Biological living cell in-flow detection based on microfluidic chip and compact signal processing circuit”	Determinarea celulelor care trec prin microcanale fluidice realizate din PDMS, peste electrozi de aur aflați pe substrat de sticlă.
14	Sivaramakrishnan M. et.al. (2020) [S10]	“Active microfluidic systems for cell sorting and separation”	Review al dispozitivelor microfluidice folosite pentru sortarea și separarea diferitelor celule.
15	Ajanth P. et.al. (2020) [A3]	“Microfluidics technology for label-free isolation of circulating tumor cells”	Review al lucrărilor ce prezintă dispozitive microfluidice de determinare a CTC-urilor.
16	Noor A.M. et.al. (2020) [N4]	“Microfluidic device for rapid investigation of the deformability of leukocytes in whole blood samples”	Dispozitiv microfluidic realizat din PDMS, folosit pentru determinarea leucocitelor din proba de sânge, folosind fluorescența.

4.4.1. Dispozitive „Lab-On-a-Chip” pentru determinarea limfocitelor T

Utilizarea dispozitivelor microfluidice LOC pentru determinarea limfocitelor T este un pas important în ceea ce privește înlăturarea echipamentelor masive și costisitoare. Aceste dispozitive pot să înlocuiască rutina de analize biomedicale și diagnosticare. Astfel, nu mai este necesară deplasarea la centre specializate, iar timpul de așteptare a rezultatelor poate fi diminuat.

Se prezintă trei exemple relevante de biocipuri microfluidice folosite pentru determinarea de limfocite T realizate de unii dintre cei mai importanți cercetători în acest domeniu al microfluidicii.

- **Sistem microfluidic integrat pentru numărarea limfocitelor T CD4+ / CD8+**

Wang *et. al.* au dezvoltat un sistem microfluidic de numărare a „limfocitelor T CD4+/CD8+” existente într-o probă de sânge. Acest sistem este compus dintr-un modul de incubație pentru celulele-țintă cu ajutorul anticorpilor anti-CD4 / CD8 / CD3 și un modul de citometrie în flux [W4].

Modulul de incubație cuprinde o cameră de incubație și un micro-mixer de tip vortex (compus din trei membrane confecționate din PDMS) (Fig. 4.12).

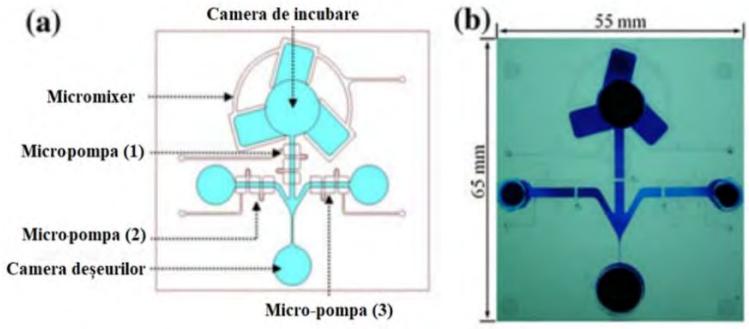


Fig. 4.12. Dispozitiv cu micromixer de tip vortex a) componentele funcționale ale dispozitivului, b) imagine a sistemul microfluidic asamblat, cu lățimea de 55 mm și lungimea de 65 mm [W4]

Acesta este acționat pneumatic, iar probele se amestecă rapid. Acest modul folosește marcarea celulelor cu ajutorul fluorescenței. Sunt utilizate trei micro-pompe pneumatice pentru focalizarea curgerii. După procesul de etichetare, sunt utilizate diferite semnale fluorescente, excitate cu ajutorul laserului, pentru detectarea și numărarea celulelor CD4+ / CD8+. Acest proces are loc pe măsură ce limfocitele trec prin regiunea de detectare a citometrului cu microflux.

Dispozitivul a fost fabricat pornind de la un strat de SU-8. Matrița de SU-8 a fost replicată pentru a fabrica microcanale de PDMS din model invers. Se mai depune

încă un strat de PDMS, după care cele două straturi se lipesc pe un substrat de sticlă cu ajutorul unui echipament cu plasmă.

Autorii au declarat că întreaga procedură de diagnosticare, inclusiv incubarea probei și numărarea celulelor, poate fi efectuată automat în termen de 35 min. Aceste rezultate au fost obținute prin compararea cu rezultatele unor citometrii în flux folosite pe scară largă [W4].

- **Dispozitiv microfluidic de detectare rapidă a celulelor CD4**

Wang *et. al*. au dezvoltat un dispozitiv microfluidic ce măsoară în mod automat celulele CD4 din sânge. Celulele CD4 sunt capturate cu ajutorul unei benzi magnetice [W7]. Această bandă este funcționalizată cu anticorpi specifici, anti-CD4. Caracterizarea a fost efectuată utilizând microscopie electronică de scanare (SEM).

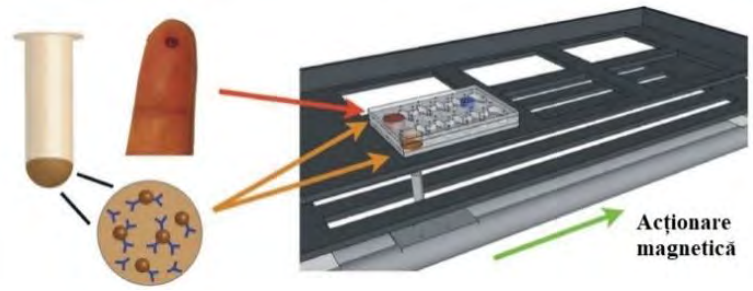


Fig. 4.13. Prezentare generală a platformei m-ELISA [W7]

Dispozitivul (Fig. 4.13) a fost asamblat cu ajutorul unei tehnici non-litografice. Au fost folosiți polimer PMMA și film adeziv, care au fost tăiați cu ajutorul unui echipament cu laser. Au fost folosite trei straturi de PMMA cu grosimea de 1,55 mm, atât pentru partea de sus, cât și pentru partea de jos a dispozitivului.

Cipul proiectat conține cinci camere circulare care conțin soluții apoase și două camere de spălare care conțin soluție salină de tampon fosfat (PBST) și cinci camere eliptice care conțin ulei mineral pentru separarea fizică a lichidelor camerei circulare hidrofile.

Stratul superior de PMMA conține o singură intrare, folosită pentru încărcarea probei/reactivului [W7].

- **Biocip diferențial microfluidic pentru determinarea leucocitelor specifice T CD4+ și CD8 +**

Hassan et.al au fabricat un dispozitiv de dimensiuni mici: 3 cm x 4 cm, folosit pentru capturarea limfocitelor T: CD4, CD8 [H2]. Dispozitivul microfluidic de tip LOC este folosit pentru numărarea celulelor pentru diagnosticarea HIV / SIDA. Deoarece limfocitele T CD4 + nu pot fi diferențiate de limfocitele CD4 doar prin

interogare electrică, acest biosenzor microfluidic a fost dezvoltat fiind bazat pe o tehnologie de numărare a celulelor electrice cu imunocaptură diferențială.

Contorizarea celulelor se face după lizarea manuală a globulelor roșii din sânge, dintr-o probă de sânge de 10 µl nediluat. Această cantitate de sânge este infuzată în cip și amestecată cu reactiv de lizare (0,12 % acid formic și 0,05 % saponin dizolvate în apă deionizată). Soluția rezultată este apoi amestecată pe cip cu o soluție de răcire (5,3 ml de carbonat de sodiu 0,6 % și 3 % volumetrice de clorură de sodiu în DI) pentru a opri procesul de lizare și pentru a păstra leucocitele rămase. Probele de sânge lizate și antilizate au fost injectate în camera de captare la debite cuprinse între 15 și 30 µl / min. Raportul sânge: lizare este de 1:12, iar raportul sânge: stopare lizare este 1: 6.3. Soluția de sânge lizat trece prin canalul de măsurare ce are secțiunea transversală 15 µm înălțime x 15 µm lățime.

Acest canal conține electrozi de dimensiuni micrometrice, pentru a înregistra numărul de celule înainte de a intra în cameră. Contoarele de celule microfluidice se bazează pe principiul de numărare Coulter [M27]: în dispozitiv, celulele curg prin canalul ce are un curent care trece prin el. Celula, care nu poate conduce curentul, îl blochează și astfel provoacă semnalul "spike" (vârf), arătând astfel câte celule au trecut prin canal. Impedanța pe electrozi crește pe măsură ce o celulă trece prin canal și este produs un vârf de tensiune, amplitudinea fiind proporțională cu dimensiunea celulei, iar lățimea este proporțională cu viteza celulei. Modificarea impedanței depinde, de asemenea, de debitul cu care fluidul curge, oferind astfel posibilitatea de a măsura volumul fluidului. Debitul unui electrolit într-un canal microfluidic este dat de un profil parabolic (curgere liniară) [H2]. Debitul variază de la 10 la 60 µL min^{-1}, cu o creștere de 5 µL min^{-1} în 120 s [H1].

Odată cu trecerea leucocitelor prin canalul de numărare, iar apoi prin camera de captură, celulele CD4 + sunt captate și reținute de anticorpi atașati de stâlpii din camera de captură. Celulele rămase trec prin al doilea numărător, astfel încât diferența dintre numărul limfocitelor de intrare și numărul limfocitelor de ieșire determină numărul de celule T capturate CD4 +.

Spațiul dintre electrozi este de 15 µm. Un semnal de intrare de 5V la 3030 kHz și 1,7 MHz este alimentat la electrodul de numărare. Pentru a crea dispozitivul din PDMS, au fost folosite metodele clasice de microfabricare. În Fig. 4.14, este prezentată o imagine de ansamblu a dispozitivului ce conține: (1) intrarea pentru sânge; (2) secțiunea de lizare și cea de stopare a lizării; (3) senzorul de numărare a intrărilor; (4) camera de captură; (5) senzorul de numărare a ieșirilor.

Camera de captură are dimensiunile de 2,5 cm x 1,4 cm, diametrul pilonilor fiind de 40 µm. Pentru celulele T CD4 și CD8, spațiul dintre stâlpi este de 11µm (Fig. 4.15).

Pentru a verifica captarea celulelor T CD4+ sau CD8+, celulele din camera de captare au fost marcate cu anticorpi fluorescenți CD4 și CD14 (CD14, care pot fi utilizați pentru diferențierea monocitelor) sau corpuri anti-CD8 [W9].

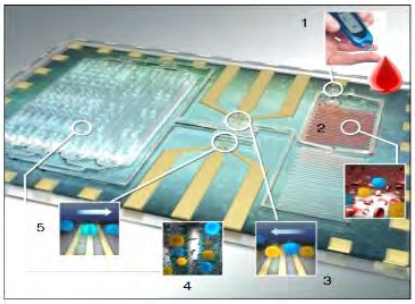


Fig. 4.14. Părțile componente ale dispozitivului prezentat de Watkins [H2]

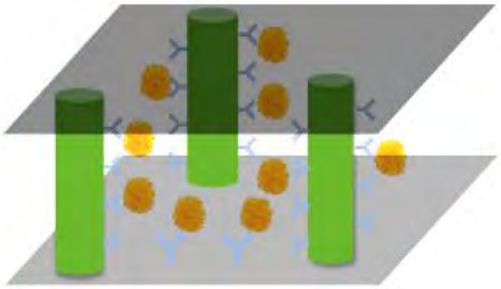


Fig. 4.15. Ilustrație grafică a anticorpilor și a legării celulare pe stâlpi [H2]

4.4.2. Dispozitive „Lab-On-a-Chip” pentru determinarea celulelor tumorale circulante

Dispozitivele de detecție a celulelor tumorale circulante (CTC) s-au dezvoltat semnificativ în ultimii ani. CTC au o semnătură specifică diferită față de cea a celulelor normale. Astfel, dispozitivele LOC folosesc diferite proprietăți ale celulelor tumorale pentru a le cuantifica și pentru a le captura. Celulele pot fi separate prin metode dielectroforetice sau magnetoforetice. Dintre proprietățile celulelor CTC, fac parte markerii specifici de pe suprafața celulelor, mărimea CTC-urilor, și deformabilitatea celulară.

Dispozitivele care folosesc markeri specifici pentru detecția CTC-urilor utilizează diferite suprafețe microstructurate și funcționalizate cu anticorpi sau nanomateriale carbonice, pentru a îmbunătăți sensibilitatea și specificitatea dispozitivelor.

O altă metodă de detecție a CTC-urilor o reprezintă separarea celulară hidrodinamică, care oferă o separare continuă și fără marcare prealabilă [Ț3].

Dintre exemplele de dispozitive folosite pentru detecția CTC-urilor sunt prezentate în continuare următoarele:

- **Platformă microfluidică centrifugală integrată pentru detectarea impedanței fără etichetare a celulelor canceroase din sângele întreg (eLoaD)**

Platforma microfluidică (eLoaD) a fost fabricată pentru a detecta CTC-uri cu ajutorul impedanței electrochimice. Anticorpii sunt atașați de electrozii de aur. Dispozitivul a fost compus din cinci straturi: două straturi de adeziv și trei straturi de PMMA. Cu ajutorul echipamentelor cu laser, s-au prelucrat găuri și rezervoare în dispozitiv.

S-au fabricat valve de sacrificiu cu materiale dizolvabile în apă. Pentru a capta molecula de adeziune a celulelor epiteliale – EpCAM, s-a aplicat un strat de captare

anti-EpCAM, precum și un semnal de curent alternativ de joasă frecvență (177,2 Hz) la potențialul staționar (în circuit deschis). Limita de detecție rezultată a fost mai mică de 21475 celule capturate / mm^2 la o eficiență de captare de 87%.

În Fig. 4.16, se prezintă platforma eLoaD, unde: (1) este discul superior (conține căi de acces), (2) - adeziv superior (conține canale), (3) - disc intermediar (conține camera), (4) - adezivul inferior (conține valve si canale pentru a analiza regiunile) și (5) - discul inferior (cu electrozi).

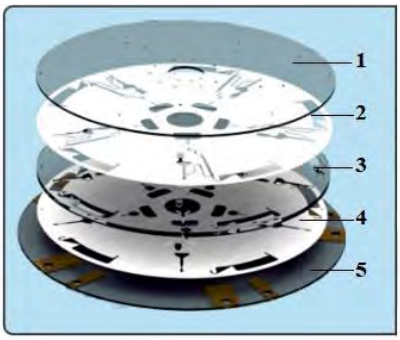


Fig. 4.16. Platformă microfluidică integrată pentru detecția CTC [N5]

Platforma versatilă realizată pentru alte tipuri de bioanalize, de exemplu pentru biomarkeri pe bază de plasmă în sânge, face din eLoaD un candidat promițător pentru stabilirea analizelor rapide, cu mai mulți parametri, cu cantități reduse de sânge exprimate în microlitri, setări clinice comune, chiar la punctul de îngrijire.

Platforma-centrifugă eLoaD detectează numai celulele canceroase, eliminând celulele roșii (RBC-urile). Astfel, numai fracțiunea plasmei care conține celule canceroase ajunge la electrodul de detectare unde sunt capturate. Alte componente precum resturile de celule plasmatice și de trombocite nu aderă la electrozii de aur anti-EpCAM și sunt spălate în camera de deșeuri [N5].

- **Sistem microfluidic pentru purificarea celulelor tumorale circulante pentru analiza expresiei genei prin aplicarea dielectroforezei induse optic**

Chiu *et al.* folosesc dielectroforeza indusă optic pentru separarea CTC-urilor. Autorii folosesc modele optice pentru a crea electrozi virtuali și pentru a manipula CTC-urile într-un canal separat. Sistemul microfluidic propus este simplu, având un microcanal în formă de T și fiind construit din trei straturi prezentate în Fig. 4.17.

O suspensie celulară a fost transportată prin microcanalul principal, în care au fost identificate celulele canceroase și apoi livrate selectiv în microcanalul lateral pentru colectare (Fig. 4.18).

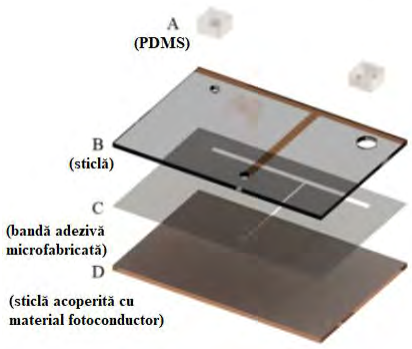


Fig. 4.17. Straturile dispozitivului [C15]

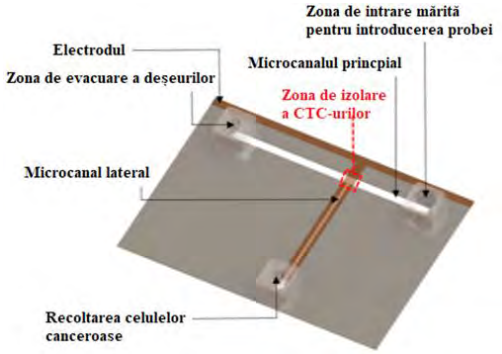


Fig. 4.18. Părțile componente ale dispozitivului [C15]

Rezultatele optime în ceea ce privește testele pentru diverse lățimi ale canalului și pentru viteze de curgere diferite, au fost obținute la o lățime a microcanalului lateral de 400 μm. Distanța de deplasare a unei celule de la microcanalul principal la cel lateral a crescut odată cu creșterea debitului eșantionului în microcanalul principal la valoarea de 2,5 μl min^{-1}. Tensiunea electrică aplicată în sistemul de dielectroforeză indusă optic („optically induced dielectrophoresis” - ODEP) este de 8 V. Acest sistem a generat cea mai mare forță de manipulare ODEP, atât pentru manipularea celulelor PC-3, cât și pentru leucocite fără agregarea celulelor. Pe baza schemei de izolare a CTC-urilor propuse, rezultatele au demonstrat că sistemul poate izola CTC-urile cu puritate celulară până la 100% (rata de recuperare a celulelor: 41,5%), dincolo de nivelurile posibile în prezent folosind tehnicile existente.

Prin urmare, în analiza nivelurilor de expresie genetică a CTC-urilor, se pot exclude interferențele cauzate de leucocite într-un eșantion de celule și se poate obține o sensibilitate analitică mai mare, așa cum s-a demonstrat în acest studiu [C15].

- **Dispozitiv microfluidic cu pâlnii pentru separarea celulelor tumorale circulante bazat pe deformarea fluxului continuu**

Park et al. a realizat un dispozitiv din PDMS care separă CTC-urile dintr-o probă de sânge pe baza deformabilității celulelor. Dispozitivul dezvoltat se bazează pe deformarea celulelor, prin construcții în formă de pâlnie, care au deschiderea mai mică decât diametrul celulei. Fluxul oscilatoriu de o mărime adecvată poate determina celulele cu o dimensiune și o deformabilitate specifică (sau mai precis, stoarcere) să traverseze pâlnia. Cele mai deformabile celule pot trece prin pâlnie, în timp ce acelea mai puțin deformabile sunt blocate de construcția pâlniei și apoi eliberate cu fiecare inversare a fluxului. Acest proces este efectuat continuu, pentru a permite separarea cât mai multor celule. Separarea CTC-urilor din sânge are loc folosind o matrice de construcții conice de tip pâlnie, alcătuită din 32 de rânduri și

2048 coloane. Mărimea porilor construcțiilor este păstrată constantă de-a lungul fiecărui rând și scade, de la 18 la 2 μm, de la partea de jos în partea de sus a matricei. Sângele este introdus prin colțul din stânga jos al matricei și continuă să călătorească pe o cale diagonală în zig-zag, pentru a se îndrepta spre rezervoarele de evacuare până la atingerea unui rând al pâlniei unde se blochează.

Celulele roșii din sânge (RBC) nu sunt constrânse datorită capacității de deformare extremă. RBC-urile foarte deformabile trec prin partea superioară a matricei pâlniei (Fig. 4.19. A, B). Leucocitele (WBC) și CTC-urile ajunse în pâlnia de blocare, sunt constrânse vertical între două rânduri de pâlnie, permițând extragerea acestora folosind un flux constant spre partea dreaptă (Fig. 4.19.C).

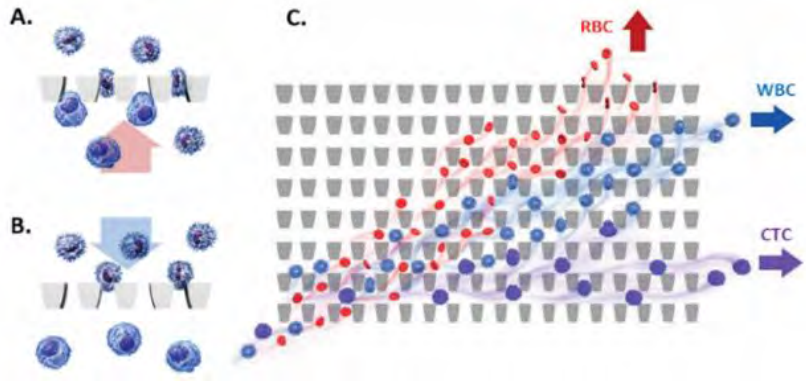


Fig. 4.19. A, B) Transportul celulelor deformabile unidirecțional, în timp ce celulele mai rigide sunt capturate și apoi eliberate. C) Separarea continuă a celulelor bazată pe deformabilitate utilizând fluxul diagonal oscilator printr-o matrice de constricții ale pâlniei [P2]

Acest tip de filtrare este folosit pentru a realiza un proces de separare continuă. Celulele care se deformează sunt colectate la ieșirea leucocitelor, in timp ce celulele care nu reușesc să se deformeze sunt colectate la priza CTC. Celulele tumorale și leucocitele au fost marcate în mod fluorescent pentru a le observa în timpul tranzitului prin regiunea de sortare și pentru a le putea evidenția în magaziile de colectare. Astfel, a putut fi confirmat traseul în diagonală urmat de leucocite și de CTC-uri [P2].

5.

OBIECTIVELE, DIRECȚIILE DE CERCETARE ȘI METODOLOGIA ABORDATE

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 lucrării, 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 lucrării, 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 sistemele 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; majoritatatea 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^o, 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 lucrării.

5.2. OBIECTIVELE LUCRĂRII

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_i)**. Pentru operaționalizarea acestora, aceste obiective au fost formulate după cum se prezintă în continuare:

Op: Obiectivul principal al lucrării 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 prezentei lucrări [*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 capabilităților 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$_1$: Formularea funcției generale și funcțiilor principale și secundare ale dispozitivului microfluidic și a structurii corespunzătoare acestuia;

Os$_2$: Stabilirea formei geometrice și dimensiunilor circuitelor microfluidice;

Os$_3$: Stabilirea formei și dimensiunilor senzorilor și dispunerii acestora în cadrul dispozitivului microfluidic;

Os$_4$: Proiectarea dispozitivului microfluidic – model experimental;

Os$_5$: Proiectarea procesului tehnologic de fabricație a dispozitivului microfluidic – model experimental;

Os$_6$: Modelarea procesului tehnologic de fabricație a dispozitivului microfluidic – model experimental;

Os$_7$: Modelarea și simularea curgerii în circuitele microfluidice ale dispozitivului microfluidic – model experimental;

Os$_8$: Fabricarea dispozitivului microfluidic – model experimental;

Os$_9$: Testarea dispozitivului microfluidic – model experimental;

Os$_{10}$: Identificarea neconformităților și a cauzelor posibile ale acestora la fabricația dispozitivului microfluidic – model experimental;

Os$_{11}$: Proiectarea prototipului îmbunătățit al dispozitivului microfluidic și a procesului tehnologic de fabricație al acestuia;

Os$_{12}$: Modelarea procesului tehnologic de fabricație a prototipului îmbunătățit al dispozitivului microfluidic;

Os$_{13}$: Fabricarea prototipului îmbunătățit al dispozitivului microfluidic;

Os$_{14}$: Testarea prototipului îmbunătățit al dispozitivului microfluidic;

Os$_{15}$: Integrarea dispozitivului microfluidic într-un dispozitiv portabil și efectuarea unor teste specifice de fiabilitate;

Os$_{16}$: 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;

Os$_{17}$: 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 A LUCRĂRII

Direcțiile de cercetare majore (D_i) pe care se va acționa în lucrării 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_1) 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_2) 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_3) 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_4) 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_5) 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 lucrării 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.**

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.

„Limfocitele T ajutătoare, CD4+", sunt în proporție de 60-65% din totalul limfocitelor T aflate în organismul uman. Acest tip de limfocite secretă molecule de limfokine.

„Limfocitele T citotoxice, CD8+", sunt în proporție de 25-35 % din totalul limfocitelor T. Ele realizează distrugerea virușilor și celulelor tumorale.

Determinarea numărului celulelor CD3+, CD4+ și CD8+ prezintă importanță pentru diagnosticul și monitorizarea diferitelor afecțiuni.

S-a determinat numărul de limfocite CD3+, CD4+, CD8+, prin impedanță electrochimică, utilizând pentru fiecare tip de limfocite determinate o structură de canale microfluidice care a fost modelată și simulată numeric încă din faza de proiectare pentru atingerea obiectivului propus.

Fiecare tip de limfocite T se va cuantifica pe un biocip microfluidic distinct, independent. Formarea complexului imun, dintre anticorpii anti CD3+, respectiv anti CD4+ și anti CD8+ are loc în camera de reacție.

S-au folosit soluții testate în laborator, iar rezultatele au reprezentat date de intrare pentru proiectare. Soluția lizant - produs comercial 10X RBC Lysis Buffer (Multi-species) de la ThermoFisher Scientific [*38] - se amestecă cu proba de sânge și determină ruperea selectivă a membranelor eritrocitelor în timp de câteva secunde.

Timpul optim al lizării eritrocitelor este esențial, deoarece trebuie să aibă o durată suficient de mare pentru a rupe toate membranele eritrocitelor, dar

suficient de scurt pentru a păstra leucocitele intacte. Acest interval de timp reprezintă o dată de intrare atât pentru proiectarea dispozitivului microfluidic, cât și pentru modelarea și simularea funcționării sale.

Apoi în dispozitivul microfluidic, s-a introdus o soluție de oprire a lizei (soluția de tampon fosfat salin cu pH 7,1). Leucocitele ajung în camera de reacție. Aici, doar leucocitele țintite, respectiv limfocitele T CD3+, CD4+ și CD8+ se leagă de anticorpii specifici imobilizați de pereții camerei sau de piloni.

Ultima etapă este cea de cuantificare a complexelor imune formate, cu ajutorul senzorului electrochimic. Astfel, din diagrama Nyquist, prin prelucrarea și normalizarea datelor, a rezultat răspunsul senzorilor la diferite concentrații de limfocite CD3+, CD4+ și CD8+ [M16], [M20], [M21], [M22].

6.2. STABILIREA FUNCȚIILOR ȘI STRUCTURII FUNCȚIONALE ALE PRODUSULUI

Pornind de la nevoia exprimată de determinare a limfocitelor T pentru diagnosticarea rapidă a unor boli grave de tip HIV sau leucemie, au fost formulate funcția generală Φ, funcțiile principale Φ_i și funcțiile secundare Φ_{ij},

Funcția generală a produsului se definește ca fiind ansamblul caracteristicilor produsului care răspunde nevoii pentru care acesta se proiectează și ulterior se realizează. Funcțiile principale reflectă caracteristici ale produsului care determină funcția generală, iar funcțiile secundare rezultă din interacțiunea funcțiilor principale între ele [D6].

Funcțiile sunt organizate în arborele funcțional, după cum urmează:

Φ = determinarea numărul limfocitelor T, CD3+, CD4+ sau CD8+;

Φ_1 = alimentarea dispozitivului microfluidic cu proba de sânge;

Φ_{11} = cuplarea orificiului de alimentare cu proba de sânge la micropompă;

Φ_{12} = injectarea probei de sânge în circuitul de lizare;

Φ_2 = alimentarea dispozitivului microfluidic cu soluția de lizare;

Φ_{21} = cuplarea orificiului de alimentare cu soluția de lizare la micropompă;

Φ_{22} = injectarea soluției de lizare în circuitul de lizare;

Φ_3 = alimentarea dispozitivului microfluidic cu soluția de oprire a lizării;

Φ_{31} = cuplarea orificiului de alimentare cu soluția de oprire a lizării la micropompă;

Φ_{32} = injectarea soluției de oprire a lizării în circuitul de antilizare;

Φ_4 = lizarea eritrocitelor;

Φ_{41} = parcurgea circuitului microfluidic de lizare;

Φ_{42} = ruperea selectivă a membranelor eritrocitelor;

Φ_5 = oprirea lizării;

Φ_{51} = parcurgea circuitului microfluidic de oprire a lizării;

Φ_{52} = menținerea constantă a pH-ului neutru al soluțiilor;

Φ_6 = determinarea numărului *total* de limfocite T;
Φ_{61} = trecerea limfocitelor T prin canalul de numărare, înainte de intrarea în camera de captură;
Φ_{62} = determinarea impedanței la trecerea fiecărei limfocite T prin canalul de numărare înainte de intrarea în camera de captură;
Φ_7 = capturarea și selecția unor tipuri de limfocite T;
Φ_{71} = parcurgerea camerei de captură a soluțiilor care conțin limfocite T;
Φ_{72} = legarea limfocitelor T de un anumit tip, CD3+, CD4+ sau CD8+ de anticorpii specifici din camera de captură;
Φ_8 = determinarea numărului de limfocite T, necapturate;
Φ_{81} = trecerea limfocitelor T, nelegate de anticorpii specifici, prin canalul de numărare de la ieșirea din camera de captură;
Φ_{82} = determinarea impedanței la trecerea fiecărei limfocite T prin canalul de numărare, la ieșirea din camera de captură;
Φ_9 = determinarea numărului de limfocite T de un anumit tip, CD3+ , CD4+ sau CD8+ , prin *diferența* dintre numărul total de limfocite T și numărul de limfocite T necapturate;
Φ_{10} = reținerea celulelor necapturate în rezervorul de reținere a celulelor.

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):

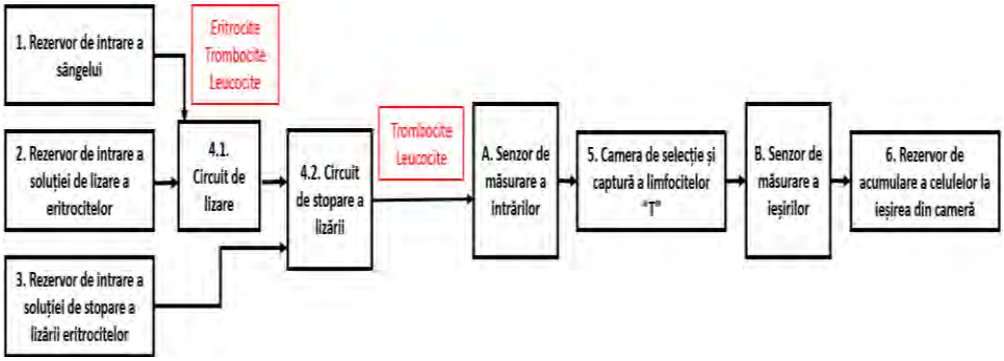


Fig. 6.1. Schema dispozitivului microfluidic pentru determinarea limfocitelor T

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.**

Sângele este alcătuit din cele trei categorii importante de celule: leucocite, eritrocite și trombocite. Prin urmare, dispozitivul microfluidic este conceput astfel încât să elimine tipul de celule care nu sunt de interes pentru determinarea numărului de limfocite T.

Segmentul de îmbogățire a leucocitelor are rolul de a distruge eritrocitele. În acest fel se facilitează numărarea leucocitelor de către senzorii electrochimici și capturarea limfocitelor dorite în camera de selecție și captură. Cealaltă categorie de celule din sânge, a trombocitelor, este nesemnificativă, datorită dimensiunilor extrem de mici ale celulelor.

Modulul de lizare prezintă două rezervoare de intrare, pe unde sunt pompate sângele și soluția de lizare a eritrocitelor, fără a se liza populația leucocitară.

Al doilea modul al segmentului de îmbogățire a leucocitelor are rolul de a stopa procesul de lizare și de a conserva populația leucocitară. **Modulul de stopare a lizării eritrocitelor** reprezintă a treia intrare microfluidică. Prin el se deplasează soluția de stoparea a lizării efectuată asupra eritrocitelor și soluția tampon de lucru, care are rolul de conservare a populației leucocitare. Eritrocitele lizate se dezintegrează total. Astfel, se elimină zgomotul de fundal cauzat de ele în timpul numărării leucocitelor cu senzorul electrochimic.

În multe dispozitive microfluidice, debitul este controlat de o pompă de seringă.

Dimensiunile orificiilor de intrare și a celor de ieșire, depind de dimensiunea seringilor folosite și de tubulatura disponibilă [M16].

Segmentul de microcanale face legătura între cele trei intrări (sânge și soluțiile de lizare și stopare a lizării eritrocitelor), cu camera de selecție și captură a limfocitelor T și cu senzorii electrochimici care numără leucocitele la intrarea și la ieșirea din camera de selecție și captură.

Canalele sistemului microfluidic au o **lățime de 300 µm** și o **înălțime de 50 µm**. Acestea sunt adecvate în raport cu dimensiunile celulelor care sunt numărate.

Camera de selecție si captură a limfocitelor T are rolul de a captura specific subpopulația limfocitară dorită. Camera este funcționalizată cu anticorpi anti-CD4, anticorpi anti-CD8 sau anticorpi anti-CD3 care au rolul de a captura specific limfocitele țintă. Camera de selecție și captură prezintă o suprafață microstructurată cu piloni, destinați imobilizării anticorpilor de care se leagă imunochimic limfocitele T.

Pilonii sunt distanțați la 12 µm, pentru a putea permite celulelor ce trebuie numărate să treacă.

Camera este situată între cei doi senzori electrochimici. În urma intrării populației leucocitare în camera de captură, după ce aceste celule au fost inițial numărate de senzorul de la intrarea în camera de captură, va fi imobilizată specific

doar subpopulația limfocitară dorită, după care toate celulele care au trecut liber prin camera de captură vor fi numărate din nou de senzorul de la ieșirea din cameră.

Pe baza diferenței dintre cele două numărători: numărarea leucocitelor intrate în camera de captură și cele care au ieșit din camera de captură, se determină numărul limfocitelor sau subpopulațiile acestora capturate specific în cameră.

Segmentul de numărare a leucocitelor este format din doi senzori electrochimici - de intrare și de ieșire din camera de captură, care sunt situați pe cele două microcanale.

Porțiunile microcanalelor pe care se realizează senzorii sunt îngustate la **15 µm** pe o lungime de **300 µm**, pentru a forța leucocitele să treacă în șir indian. Leucocitele se deplasează de la senzorul de intrare până la cel de ieșire pe rând, una câte una, evitându-se astfel suprapunerea lor sau formarea de agregate celulare. Supraaglomerările pot duce la apariția erorilor de numărare [M16].

Senzorii electrochimici au fiecare câte trei microelectrozi:

- un electrod de lucru („working electrode" - WE),
- un electrod de referință („reference electrode" - RE),
- și altul auxiliar, de numărare („counting electrode" - CE).

Electrodul de referință și cel de lucru au lățimea de 150 nm, iar electrodul de numărare are lățimea de 300 nm, spațiul dintre ei fiind de 100 nm.

Aceștia realizează numărarea leucocitelor care intră și care ies din camera de captură. Pe baza diferenței numărului leucocitelor înregistrate de cei doi senzori se va determina numărul limfocitelor atașate specific pilonilor din camera de captură.

Cei trei electrozi sunt conectați la un potențiostat, care controlează potențialul electrodului de lucru și măsoară curentul rezultat. Astfel, trecerea celulei va perturba curentul electric din microcanal și va genera o schimbare distinctivă a impedanței, înregistrată printr-un impuls specific. Amplitudinea și lățimea impulsului depind de dimensiunea celulei și de viteza de trecere prin dreptul electrozilor. Acest fenomen va permite atât cuantificarea cât și diferențierea numărului de celule care trec prin microcanal, în funcție de dimensiunea și morfologia acestora și utilizând diferite frecvențe ale curentului electric. Metoda permite indentificarea limfocitelor din populația de leucocite purificate.

Celulele care trec prin canalul microfluidic (considerate particule dielectrice), peste electrozi, perturbă liniile de câmp electric. Impedanța electrodului se modifică dând naștere unor vârfuri (spike) de curent ce au o amplitudine direct proporțională cu dimensiunea celulei care trece peste electrodul auxiliar, înălțimea acestora dând informații despre dimensiunea particulelor, iar lățimea lor despre viteza de deplasare a particulelor.

Cu cât dimensiunea este mai mare, cu atât înălțimea vârfului (spike) este mai mare, iar lățimea lui este invers proporțională cu viteza de deplasare a celulei.

La frecvențe mai mici, de ~3 kHz, membrana celulelor devine nonconductivă și schimbarea impedanței se face numai pe baza dimensiunii celulei.

La frecvențe mai mari de ~1 MHz, membrana celulară devine permeabilă și variația impedanței va depinde de capacitatea membranară.

Cu toate acestea, sistemul nu este suficient de sensibil pentru a putea diferenția limfocitele CD4+ de limfocitele CD8+, care prezintă dimensiune și morfologie aproape identică.

Pentru a depăși acest inconvenient, 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 înainte de intrarea 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

Dispozitivul MEMS denumit „Biocip microfluidic portabil pentru determinarea numărului de limfocite T" rezolvă problema separării eficiente a celulelor. S-a folosit tehnica de separare pe baza microfluidicii. Separarea are loc prin lizarea eritrocitelor.

Pentru a realiza simularea curgerilor microfluidice, în primul rând trebuie cunoscute anumite aspecte tehnologice importante precum [S13]:

- evitarea timpilor prea lungi de reacție dintre proba de sânge și soluția de lizare a eritrocitelor, deoarece astfel s-ar putea degrada și membranele celulare ale limfocitelor T, obținând astfel rezultate fals scăzute; și desigur,
- evitarea timpilor prea scăzuți, în care nu se realizează lizarea eritrocitelor.

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].

Lizarea sângelui integral se realizeză astfel:

(i) Soluția de lizare se diluează 1:10 cu apă deionizată la temperatura camerei și se adaugă 10 ml de soluție de lizare 10X RBC Lysis Buffer (Multi-species) preparată la 1 ml de sânge uman, apoi se pompează în canalul microfluidic prin orificiul corespunzător;

(ii) Se incubează 10-15 minute la temperatura camerei (nu mai mult de 15 minute).

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 µl/min și debitul soluției de liză a fost setat la 60 µl/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 construi geometria dispozitivului folosind elementele prezentate, este necesar să se țină cont atât de datele generale, cât și de datele tehnologice.

Pentru început, este necesară stabilirea formei circuitului microfluidic, pentru a putea fi încadrat în dispozitiv. 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). Acesta s-a bazat pe metoda volumelor finite pentru rezolvarea ecuațiilor cu derivate parțiale, utilizând ca pre-procesor GAMBIT-ul pentru reconstrucția geometriei şi a discretizării domeniului de calcul.

Modelul numeric prezintă un flux laminar izoterm prin utilizarea unor fluide newtoniene (soluția de lizare) și nenewtoniene (sânge) care au variație liniară între tensiunea tangențială și viteza de deformare.

Modelarea prezintă comportamentul curgerii amestecului de sânge cu soluția de lizare (cu raportul debitelor de 1:12) în segmentul microfluidic pentru lizarea eritrocitelor și a leucocitelor.

În ceea ce privește amestecul soluțiilor, pentru evitarea lizării limfocitelor de tip T, **timpul** de parcurgere a circuitului de lizare **trebuie să fie mai mic de 6 secunde**. Debitele volumetrice în acest caz de utilizare a soluțiilor de lizare și antilizare specificate anterior au fost astfel impuse: 5 µl/min pentru sânge și, respectiv, 60 µl/min pentru soluția de lizare.

Circuitul de stopare a lizării trebuie să aibă o lungime suficient de mare încât să permită o parcurgere a segmentului în minim 30 de secunde, pentru o descompunere cât mai eficientă a eritrocitelor și a leucocitelor.

Raportarea rezultatelor se face după o investigație numerică asupra dinamicii curgerii într-o serie de 8 microcanale de tip „șarpe" (pentru lizare) cu dimensiunile secțiunii transversale ale canalului de curgere de 300 x 50 µm, cu două intrări (soluție pentru lizare și sânge), urmată de circuitul de stopare a lizării, la care se mai adaugă o intrare pentru soluția de stopare a lizării și o ieșire pentru fluidul care reprezintă sângele. A fost necesară o aproximație în predicții prin utilizarea modelului Carreau-Yasuda.

Cu ajutorul programului ANSYS® FLUENT s-a rezolvat ecuația Cauchy de mișcare, unde tensorul adițional de efort este formulat ca un model newtonian generalizat:

$$\rho\left[\frac{\partial \mathbf{u}}{\partial t}+(\mathbf{u}\nabla)\mathbf{u}\right]=\rho\boldsymbol{b}-\nabla p+2\nabla\left(\eta(\dot{\gamma})\mathbf{D}\right) \qquad (6.1.)$$

unde ρ este densitatea fluidului; b – forța masică; D – deformarea; t – timpul; u – vectorul viteză; p – presiunea; $\eta(\gamma)$ – funcția de vâscozitate, dependentă de deformația specifică $\boldsymbol{\gamma}$.

Pe lângă ecuația Navier–Stokes, s–a activat și rezolvat și ecuația difuziei pentru a obține soluții cât mai precise:

$$\frac{\partial \rho(\mathbf{r},t)}{\partial t}=\nabla\cdot\left[D(\rho,\mathbf{r})\nabla\rho(\mathbf{r},t)\right] \qquad (6.2.)$$

unde $\rho(r, t)$ este densitatea fluidului care difuzează în locația r și la momentul de timp t, iar $D(\rho, r)$ este coeficientul colectiv de difuzie pentru densitatea ρ în locația r.

Rezultatele obținute din modelare și simulare (Fig. 6.2. A) constau în reprezentări ale distribuțiilor de presiuni (Fig. 6.2. B) și viteze (Fig. 6.2. C), dar și a difuziei celor trei tipuri de substanțe din procesul de analiză (Fig. 6.2. D, E și F).

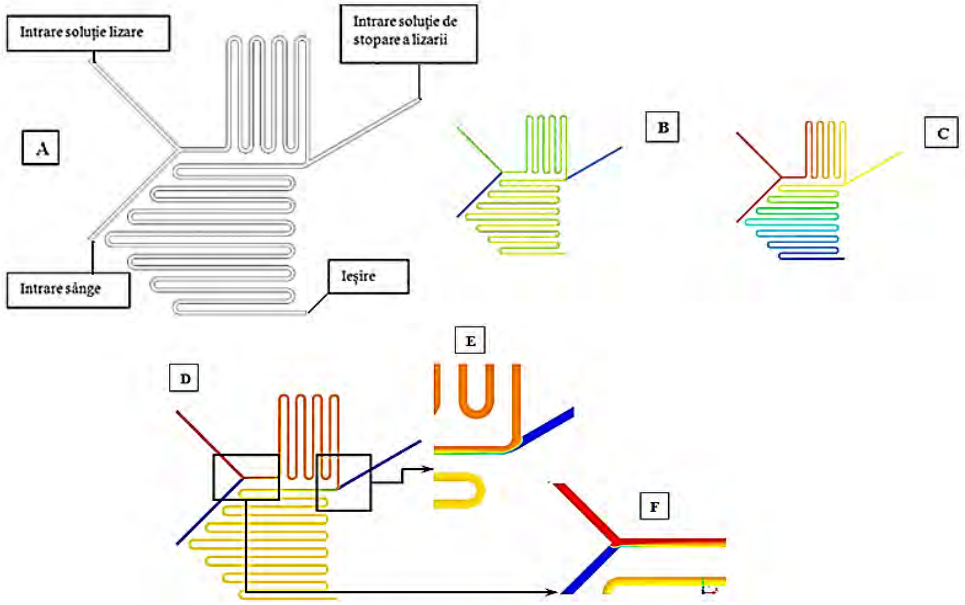


Fig. 6.2. Modelarea şi simularea curgerii în sistemul microfluidic: A) Modulul circuitului de lizare a eritrocitelor cuplat cu circuitul de stopare a lizării; B) Distribuție de presiuni; C) Distribuție de viteze; D) Reprezentarea procesului de difuzie; E), F) Detaliu al procesului de difuzie [M16]

Deoarece este necesar un timp mai mare pentru stoparea lizării, se constată că secțiunea de microcanale aferentă poate fi formată din 14 microcanale tip „șarpe" [M16].

6.5. PROIECTAREA DISPOZITIVULUI MICRO-ELECTRO-MECANIC, MODEL EXPERIMENTAL

Proiectarea dispozitivului micro-electro-mecanic, model experimental, ia în considerare într-o primă etapă, procesul tehnologic de fabricație al acestuia. Etapele necesare realizării (fabricației) dispozitivului micro-electro-mecanic de tip MEMS, care constau în principal, din depuneri de materiale în straturi succesive, urmate de fotolitografie și de îndepărtare a zonelor inactive, după cum se prezintă în Fig. 6.3, sunt:

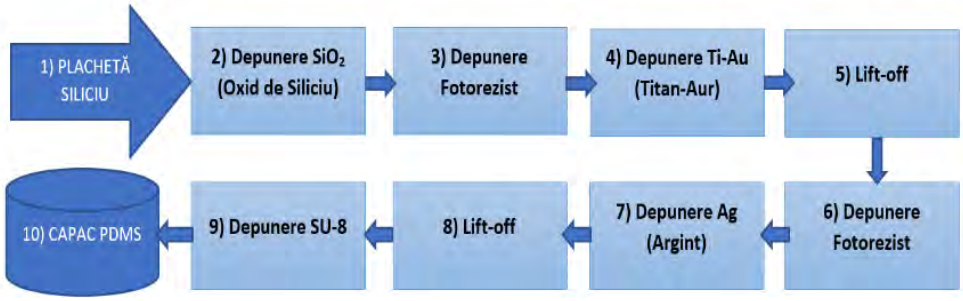


Fig. 6.3. Schema de realizare a dispozitivului

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).

Dispozitivul se realizează prin depunerea succesivă a materialelor pe plachetă. Măștile sunt folosite pentru a imprima imaginea de pe suprafața acestora pe plachete.

Pentru a avea dimensiunile și grosimile dorite, materialul intermediar cu ajutorul căruia se realizează aceste depuneri este fotorezistul. Dat fiind faptul că pentru acest dispozitiv se folosesc mai multe tipuri de material, s-au folosit mai multe măști, în

ordinea depunerii materialelor. De fiecare dată a fost folosit fotorezistul, prezentat anterior în **Capitolul 3**, ca material de sacrificiu pentru a realiza depunerile de materiale.

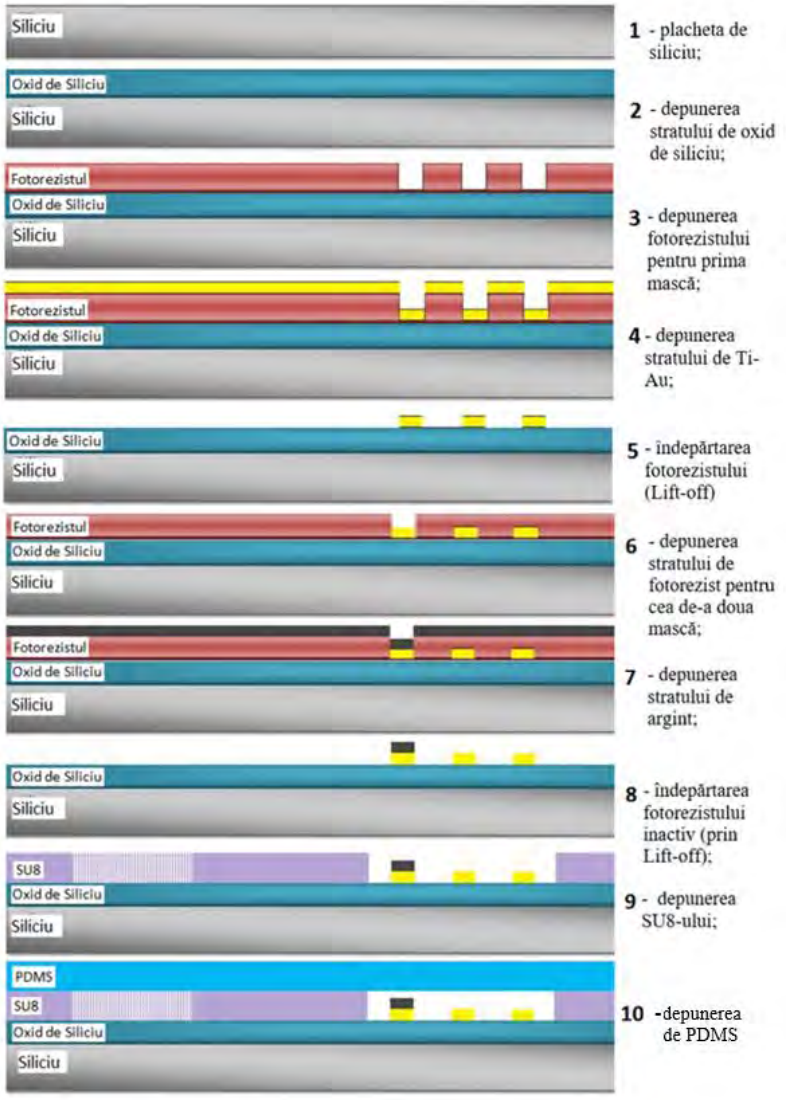


Fig. 6.4. Etapele fluxului tehnologic [M16]

În contextul celor prezentate, luând aceste elemente în considerare, s-a propus următorul model de dispozitiv microfluidic, prezentat în Fig. 6.5, unde pe o plachetă este proiectat dispozitivul de patru ori folosind soft-ul CleWin5.

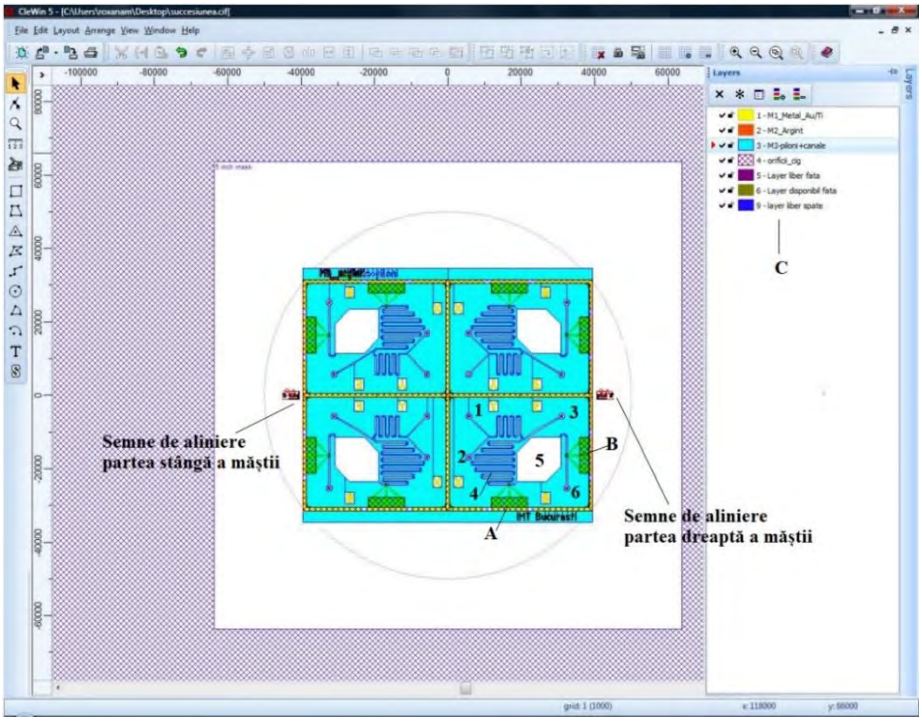


Fig. 6.5. Proiectarea dispozitivului micro-electro-mecanic

Componentele din Fig. 6.5 sunt: 1 - rezervorul de intrare a sângelui; 2 - rezervorul de introducere a soluției de lizare a eritrocitelor; 3 - rezervorul de introducere a soluției de stopare a lizării eritrocitelor; 4 - segmentul de microcanale; 5 - segmentul de selecție și captură a limfocitelor; 6 - rezervorul de colectare a celulelor care ies din camera de selecție și de captură; A - senzor de măsurare a intrărilor și B - senzor de măsurare a ieșirilor;

În Fig. 6.6 - 6.8 se redau imagini la dimensiuni mărite pentru a observa detaliile unui singur dispozitiv (Fig. 6.6), ale senzorilor A/B (Fig. 6.7), ale pilonilor din camera de selecție și captură (Fig. 6.8) precum și ale *layerelor* – detaliul C.

Pentru fiecare mască proiectată, se folosește o culoare distinctă, după cum se poate observa în Fig. 6.9.

Proiectarea dispozitivelor se realizează prin proiectarea măștilor. Un biodispozitiv poate fi realizat folosind una sau mai multe măști.

Pentru realizarea acestui „biodispozitiv de determinare a limfocitelor T” s-au folosit trei măști:

- Prima mască (M1) – folosită pentru realizarea senzorilor din titan-aur;
- A doua mască (M2) – folosită pentru realizarea electrozilor de referință din argint;
- A treia mască (M3) – folosită pentru a realiza partea de microfluidică.

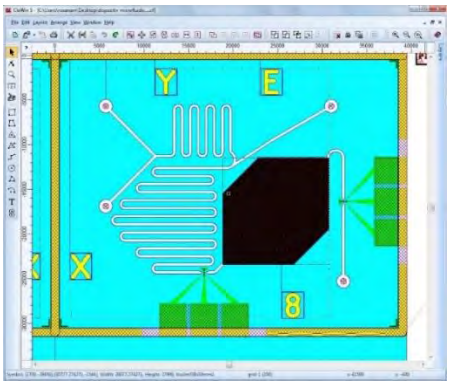


Fig. 6.6. Imagine a proiectării unui singur dispozitiv dispus pe o plachetă

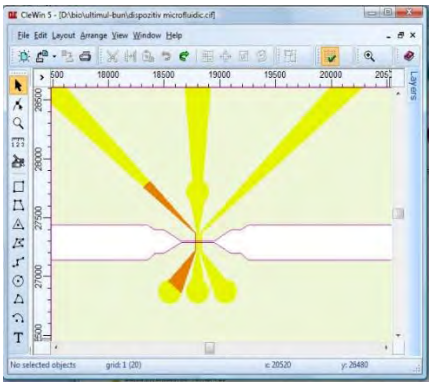


Fig. 6.7. Imagine mărită a proiectării senzorilor (A, B)

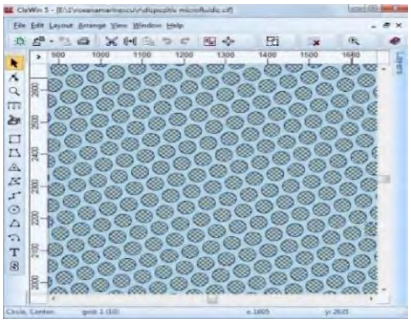


Fig. 6.8. Imagine a detalierii proiectării pilonilor din camera de captură

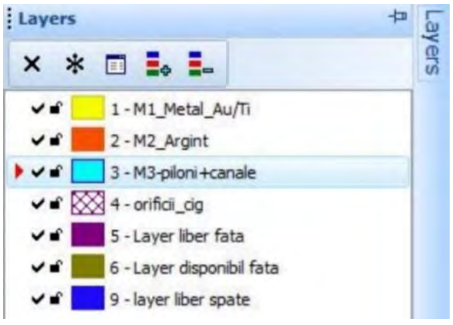


Fig. 6.9. Fereastra de layere folosite pentru proiectarea dispozitivului

Pentru proiectarea măștilor s-a folosit programul CleWin5. Acesta este un editor de layout-uri proiectat, care, în timp, a evoluat de la un simplu editor la un instrument de „design” pentru măștile fotolitografice.

Cele mai importante caracteristici ale programului CleWin includ: vizualizarea ierarhică a arhitecturii, definiția corespunzătoare a fiecărui simbol; îmbunătățirea poligonului și a modului de legare (permite adăugarea și ștergerea nodurilor); rețea avansată, cu posibilitatea de a utiliza o distanțare diferită a grilei în direcția orizontală și verticală; folosirea ca bibliotecă de simboluri a oricărui fișier CIF sau GDS-II; posibilități de scriere în C, MatLab și MaskEngineer; vedere în secțiune transversală; funcție de anulare (“undo”) nelimitată; rezoluție de 1 nanometru [*14].

Cele trei măști proiectate, folosite pentru procesul de fotolitografie în vederea execuției dispozitivului microfluidic, sunt prezentate în Fig. 6.10:

În Fig. 6.11 sunt prezentate, iar apoi descrise detaliat cele trei părți principale ale interfeței programului CleWin folosite în cadrul proiectării celor trei măști (M1, M2 și M3), după cum urmează: I. – Simbolurile principale; II. – Fereastra grafică; III. – Fereastra de *layere*.

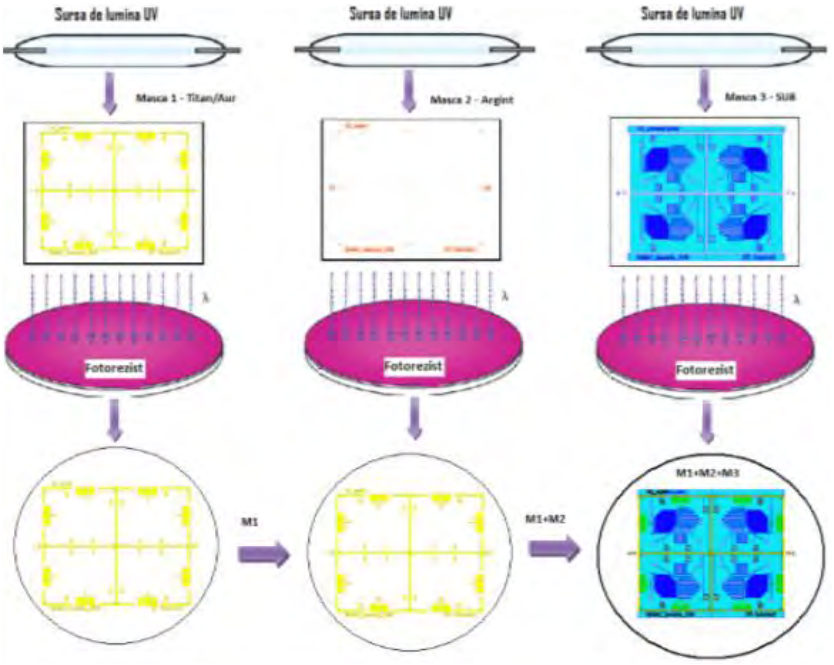


Fig. 6.10. Etapele procesului de fotolitografie folosind cele trei măști proiectate pentru realizarea fizică a dispozitivului micro-electro-mecanic

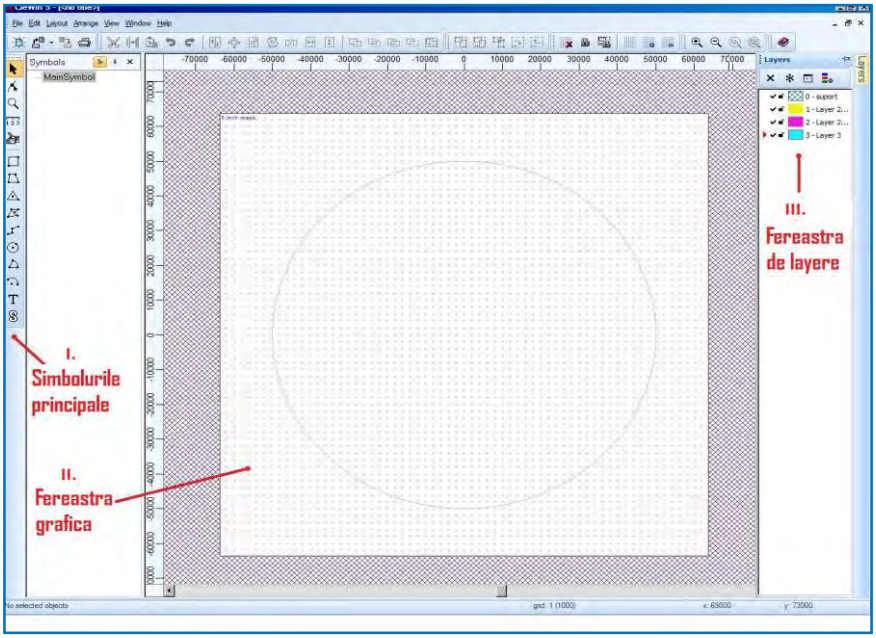


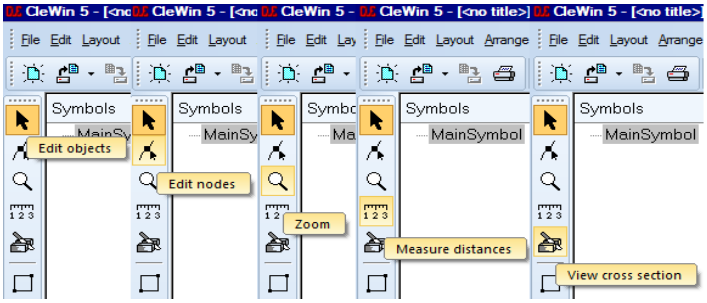
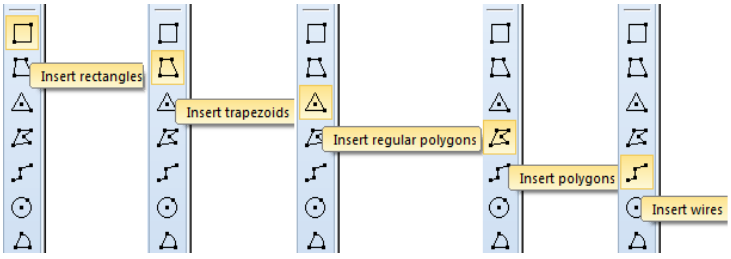
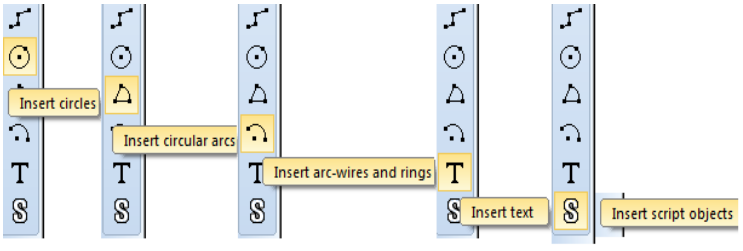
Fig. 6.11. Cele trei ferestre principale ale programului CleWin5

După stabilirea geometriei finale, a dimensiunilor și măștilor necesare, acest proiect structurat în layere va fi urmărit în etapa de proiectare a tehnologiei de fabricație. Această parte a fost realizată cu aparatură specifică, din cadrul IMT București.

I. Unelte principale de proiectare

CleWin este un editor ierarhic de layout-uri, ce constă în simboluri de editare (numite și celule), situate în partea stângă a ecranului. Aceste comenzi rapide ("shortcut commands"), sunt utile pentru simplificarea procesului de proiectare. Programul prezintă o listă ierarhică a tuturor simbolurilor, astfel încât fiecare definiție a simbolului este direct accesibilă pentru editare. Lista ierarhică oferă o imagine de ansamblu clară a structurii fișierelor (Tabelul 6.1).

Tabelul 6.1. **Simbolurile principale ale programului CleWin**

	1) Editare obiecte; 2) Editare noduri; 3) Zoom; 4) Măsurarea distanțelor; 5) Vedere a secțiunii transversale
	6) Inserare dreptunghiuri; 7) Inserare trapezoide; 8) Inserare poligoane regulate; 9) Inserare poligoane; 10) Inserare fire;
	11) Inserare cercuri; 12) Inserare arii circulare; 13) Inserare arcuri și inele; 14) Inserare text; 15) Inserare obiecte de script/ proiectate.

Cele 15 simboluri, în ordinea în care se găsesc în fereastră, sunt: 1) „Edit objects" – editare obiecte; 2) „Edit nodes" – editare noduri; 3) „Zoom"–mărire/micșorare; 4) „Measure distances" – măsurarea distanțelor; 5) „View cross section" – vedere secțiune transversală; 6) „Insert rectangles" – inserare dreptunghiuri;7) „Insert trapezoids"–inserare trapezoide; 8) „Insert regular polygons" – inserare poligoane regulate; 9) „Insert polygons" – inserare poligoane; 10) „Insert wires" – inserare fire; 11) „Insert circles" – inserare cercuri; 12) „Insert circular areas" – inserare arii circulare; 13) „Insert arc-wires and rings" – inserare arcuri și inele; 14) „Insert text" – inserare text; 15) „Insert script objects" – inserare obiecte de script/proiectare [*14].

II. Fereastra grafică

Suportul dispozitivului îl reprezintă o plachetă de monosiliciu cu diametrul de 4 inch (100 mm), fapt pentru care se selectează o mască de 5 inch (Fig. 6.12). S-a urmărit dimensionarea măștii astfel încât aceasta să cuprindă toate elementele constitutive ale dispozitivului micro-electro-mecanic.

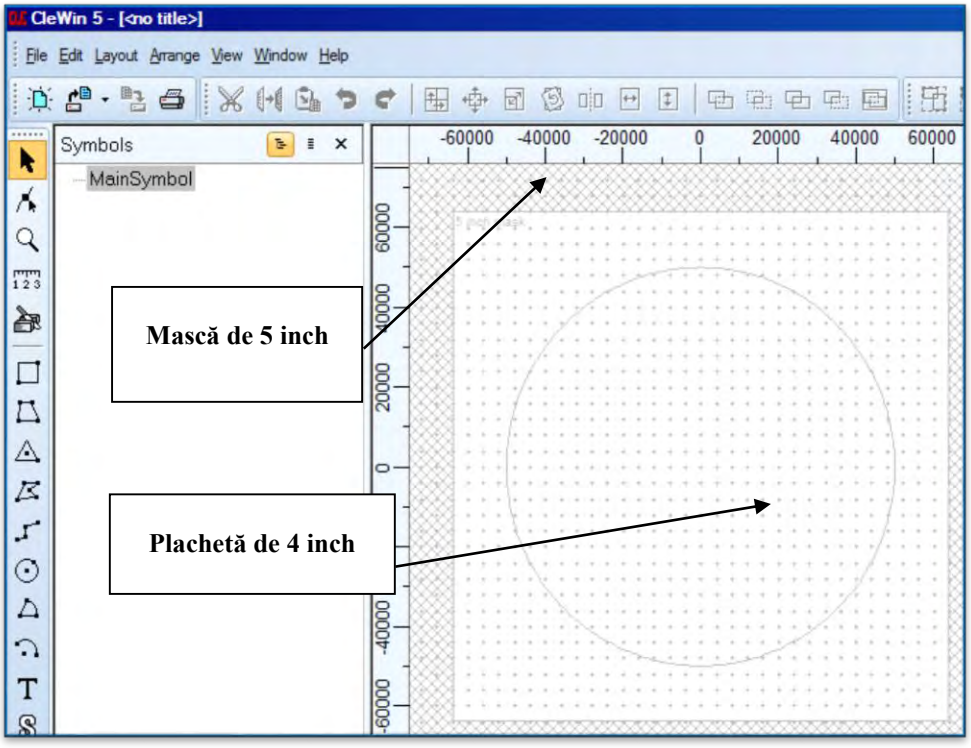


Fig. 6.12. Stabilirea dimensiunilor de gabarit - masca de 5 inch

Masca trebuie să aibă o dimensiune mai mare pentru a asigura cuprinderea tuturor elementelor pe plachetă.

III. Fereastra „Layers”

Pentru proiectarea biodispozitivului microfluidic au fost folosite patru *layere* (straturi), utilizând fereastra „Layers”: un *layer* suport, urmat de cele trei layere alese pentru cele trei măști: cel pentru aur, cel pentru argint și cel pentru fotorezistul SU-8. Acestea pot fi făcute vizibile sau nu în procesul de proiectare (Fig. 6.13). De asemenea, pot fi denumite și se poate selecta câte o culoare specifică pentru fiecare layer, cu ajutorul opțiunii „Layer properties” (Fig. 6.14). Pentru a adăuga un *layer* nou, se selectează opțiunea „Add layers”.

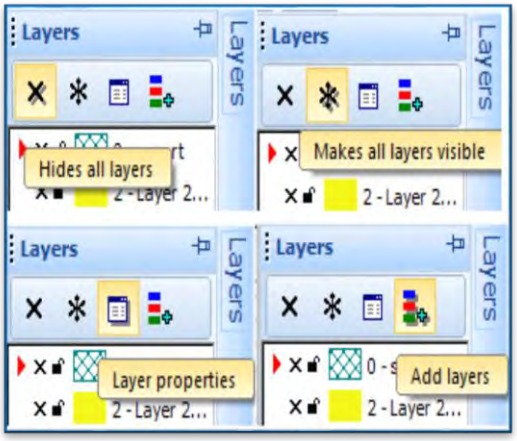


Fig. 6.13. Cele patru opțiuni pentru layere

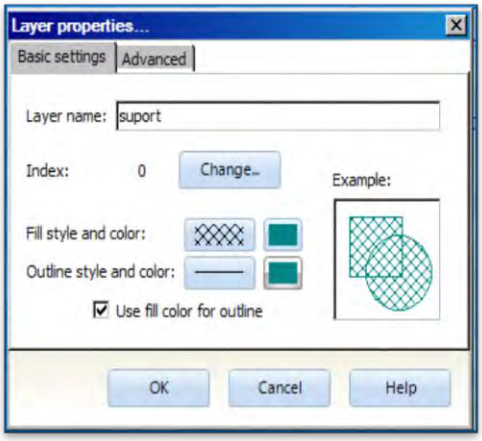


Fig. 6.14. Proprietățile layere-lor

- **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, astfel încât acestea se vor proiecta după ce placheta se împarte în patru părți egale, cu ajutorul punctelor de referință: „0”. Astfel, lățimea este 34350 μm, lungime 36300 μm, iar cele patru margini au dimensiunea de 505 μm (Fig. 6.16).

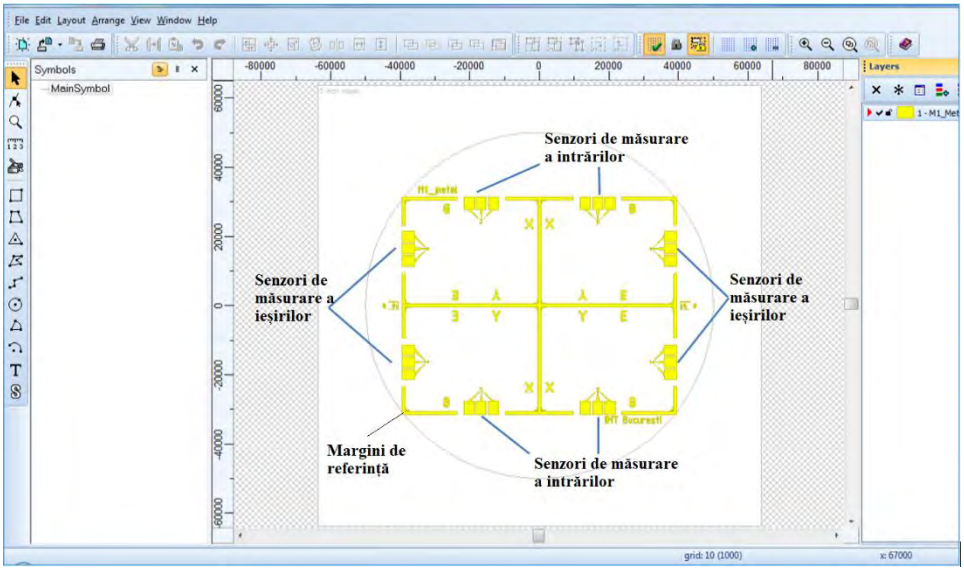


Fig. 6.15. Prima mască specifică dispozitivului

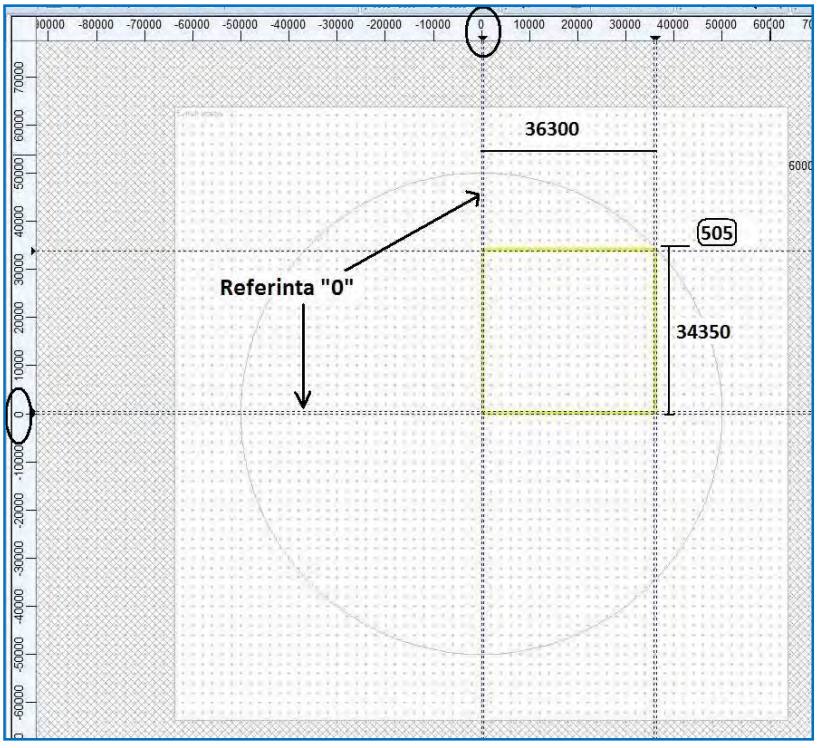


Fig. 6.16. Dimensiunile de gabarit ale unui dispozitiv și dispunerea acestuia pe plachetă

Prima mască conține cei doi senzori de numărare: cel de intrare și cel de ieșire, ambii având aceleași dimensiuni (Fig. 6.17).

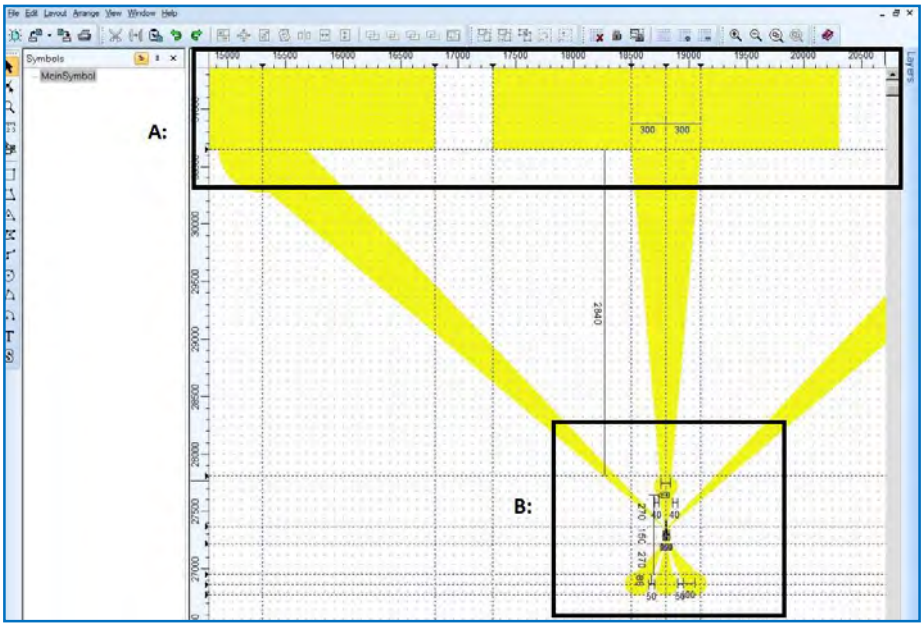


Fig. 6.17. Senzorul proiectat pe prima mască

Într-o prima etapă, se vor dimensiona cele trei dreptunghiuri de care vor fi atașati electrozii. Acestea se numesc „pad-uri" și reprezintă zonele de contact. În Fig. 6.18 se observă detaliul A, unde sunt precizate dimensiunile zonelor de contact (pad-urilor): 3000 x 3700 μm cu distanță egală între ele, de 500 μm. Fiecărui „pad" în parte îi va fi proiectat un braț ce conține unul din cele trei elemente ce împreună formează senzorul, respectiv electrozii de referință, de lucru și de numărare, având dimensiunile prezentate în detaliul B din Fig. 6.19.

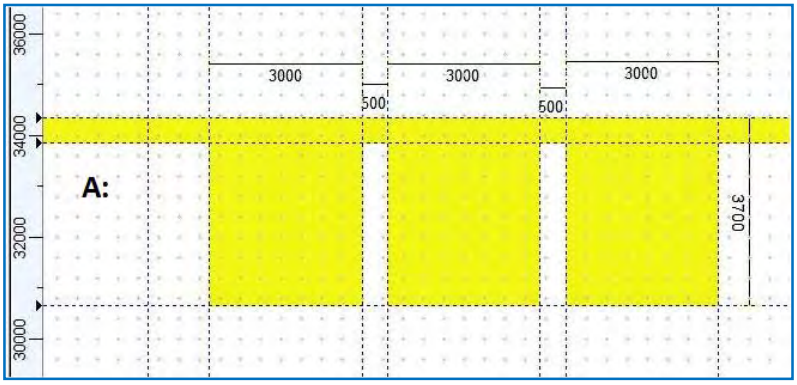


Fig. 6.18. Detaliul A al figurii 6.17

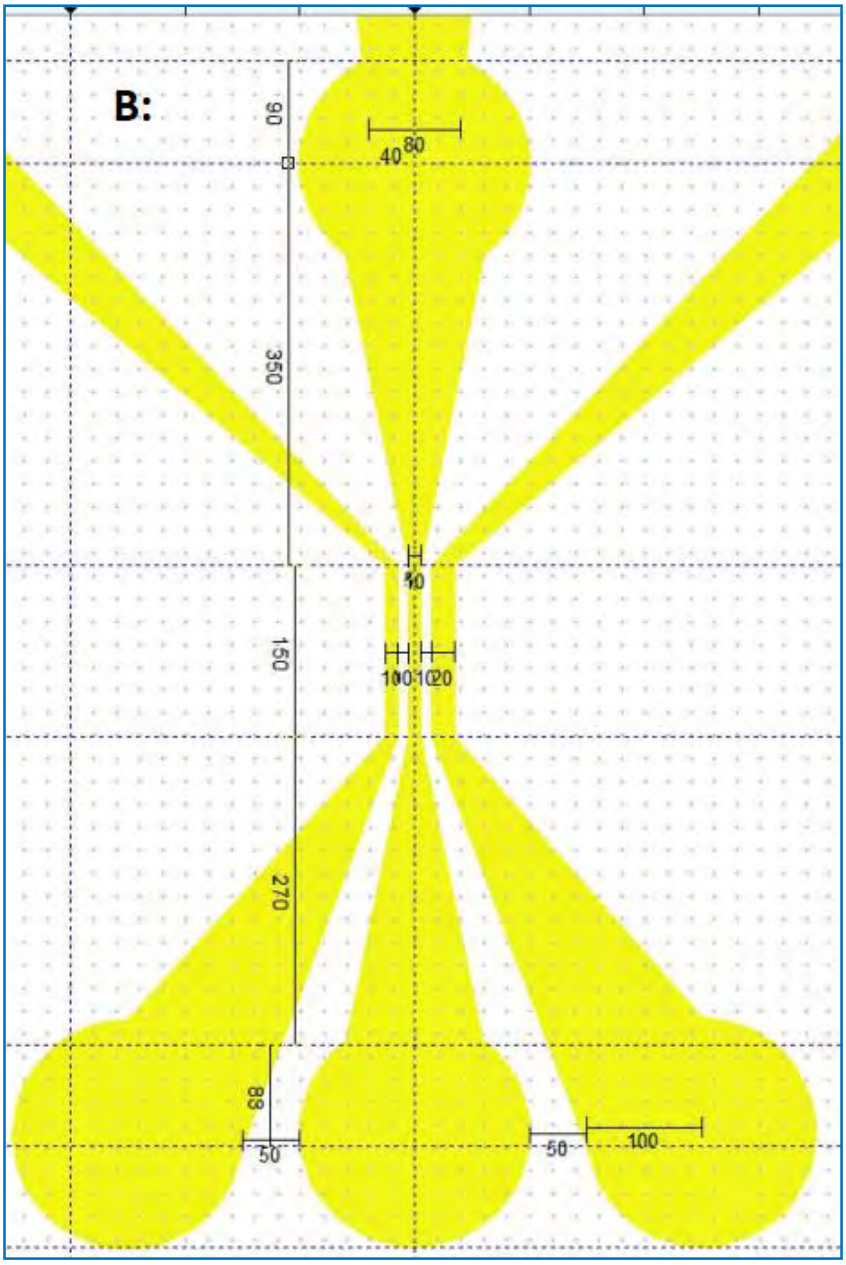


Fig. 6.19. Detaliul B al figurii 6.17

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

Cea de-a doua mască proiectată (M2) (reprezentată cu culoarea roșie 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. Lungimea proiectată pentru realizarea depunerii este de 950 μm. Deoarece depunerea se va face pe niște dimensiuni atât de mici, imaginile de pe mască sunt vizibile doar la dimensiuni mărite.

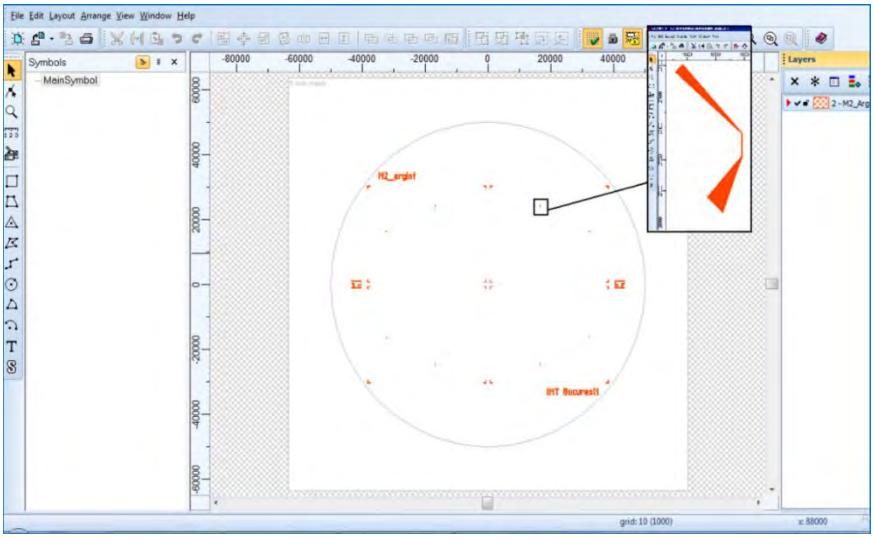


Fig. 6.20. Proiectarea celei de a doua măști

În Fig. 6.21 este prezentat senzorul la dimensiuni mărite. Pe suprafața electrodului de referință are loc depunerea de argint.

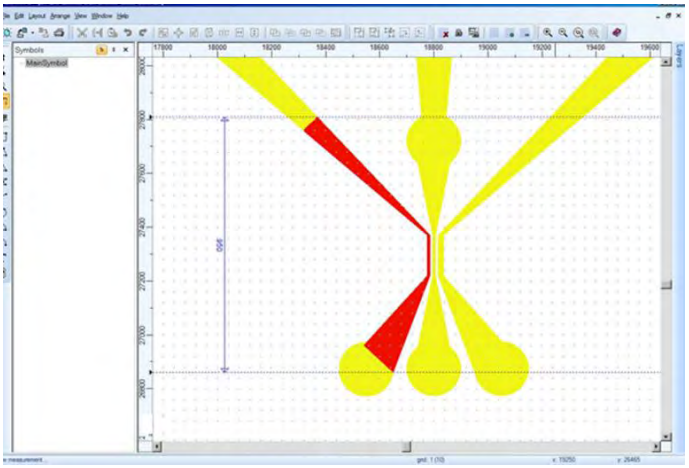


Fig. 6.21. Proiectarea zonei de depunere a argintului pe electrodul de referință al senzorului

- **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. microcanalele; C. camera de selecție și captură.

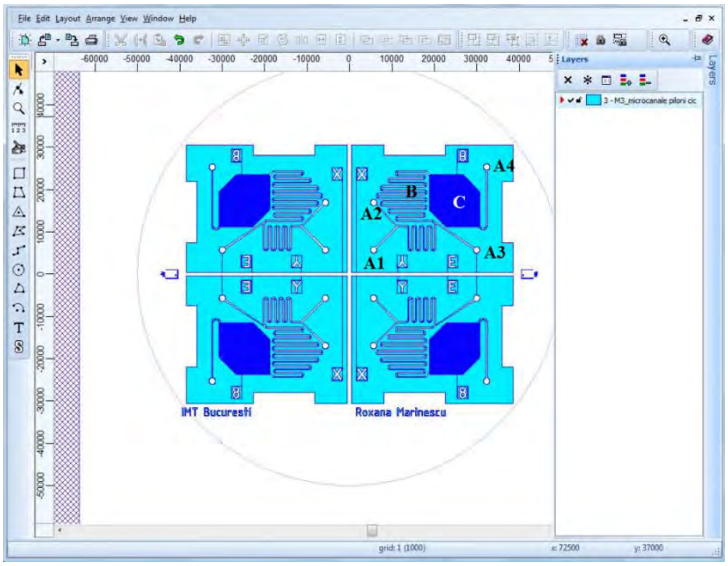


Fig. 6.22. Proiectarea celei de a treia măști

În Fig. 6.23 este redată o imagine mărită a părții microfluidice a unui singur dispozitiv microfluidic din cele patru aflate pe plachetă.

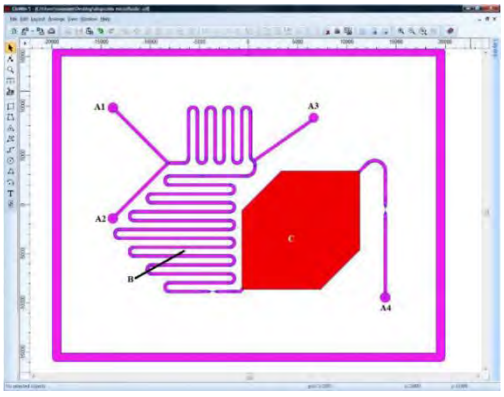


Fig. 6.23. Imaginea mărită a părții microfluidice aflată pe a treia mască

A. Nanoporturile (orificiile prin care se introduc soluțiile)

Cele patru nanoporturi reprezentate A1, A2, A3, A4 în Fig. 6.20 au raza de 750 µm (Fig. 6.24).

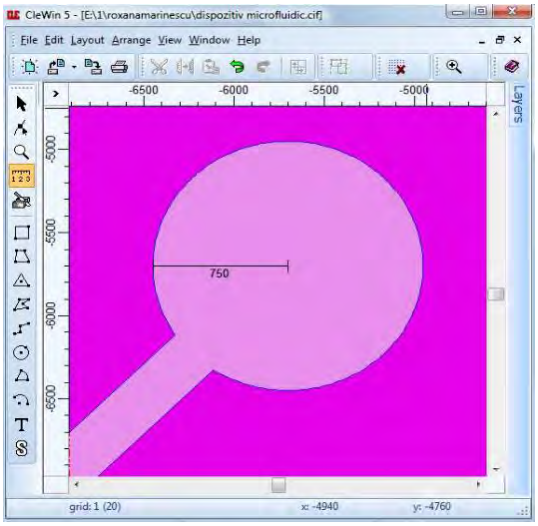


Fig. 6.24. Proiectarea nanoporturilor

B. Microcanalele

Lățimea microcanalelor este de 300 µm. Canalul microfluidic se îngustează la 15 µm în zona senzorilor electrochimici de numărare a intrărilor și a ieșirilor, pe o distanță de 300 µm, 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.

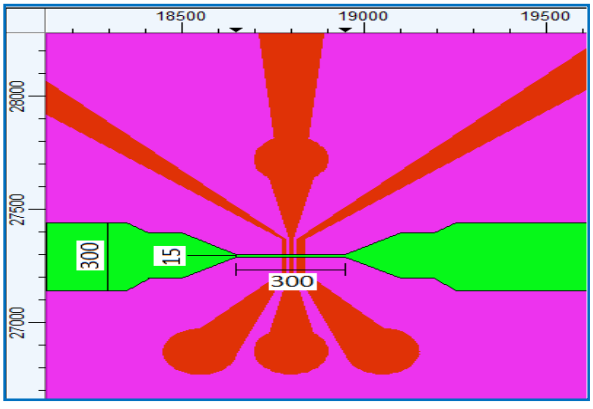


Fig. 6.25. Proiectarea microcanalului de numărare din zona senzorilor

C. Camera de selecție și captură

Camera de selecție și captură are forma hexagonală și este reprezentată cu culoarea albastră în Fig. 6.26.

La utilizarea dispozitivului microfluidic, în momentul în care anticorpii specifici fiecărui tip de celule vor fi atașați pe piloni, atunci când celulele vor ajunge să treacă prin camera de selecție și captură, acestea vor rămâne legate de piloni.

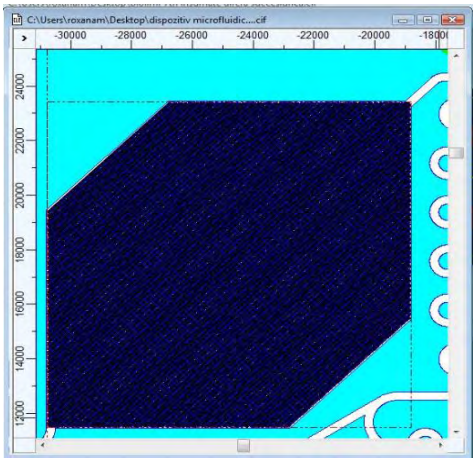


Fig. 6.26. Camera de selecție și captură

Pilonii au diametrul de 40 μm (Fig. 6.27) și distanța de 12 μm între ei care permite trecerea limfocitelor (Fig. 6.28), fiind proiectați 54230 piloni în interiorul camerei de selecție și captură.

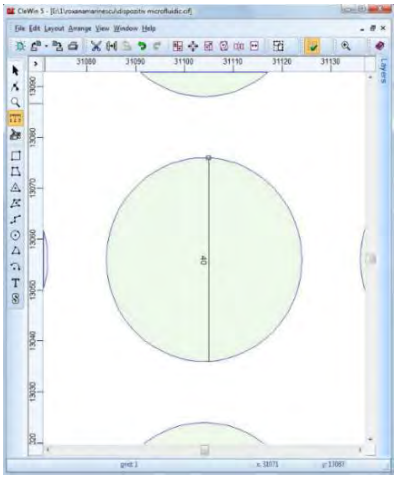


Fig. 6.27. Diametrul pilonilor

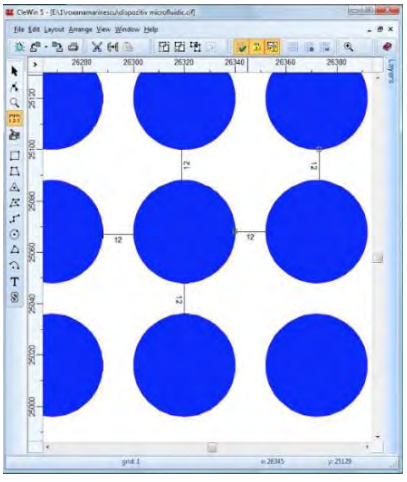


Fig. 6.28. Distanța dintre piloni

- **Măști, aliniere și expunere**

Fabricarea măştilor fotolitografice începe cu proiectarea geometriilor. Măştile conţin geometriile care vor fi transferate în fotorezistul etalat pe plachetă. Fişierul creat în programul specializat CleWin5 este folosit pentru a genera zone transparente sau opace pe mască (Fig. 6.29.a și 6.29.b):

- "câmp opac" - geometria desenată va fi opacă pe mască (culoare neagră);
- "câmp transparent" - geometria desenată va fi transparentă pe mască (culoare albă);

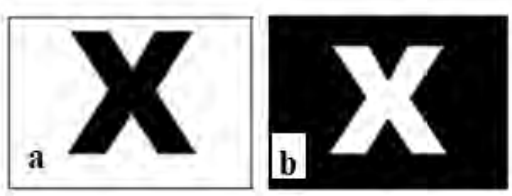


Fig. 6.29. Câmpuri folosite pentru aliniere :
a. opac; b. transparent

Pentru a obţine geometrii complexe pe un substrat, de multe ori sunt necesare mai multe măşti. Alinierea acestora se face cu ajutorul maşinilor de aliniere care permit mişcarea substratului pe trei direcţii: X-Y şi rotaţie în planul X-Y. Pentru obţinerea unei alinieri corecte, este necesară fabricarea unor semne de aliniere care să fie transferate pe substrat. În Fig. 6.30 este prezentat un model clasic de semne de aliniere.

Maşina de aliniere permite vizualizarea semnelor de aliniere de pe mască şi de pe substrat cu ajutorul a două obiective de microscop. Masca este fixă, iar operatorul poate mişca substratul până când se obţine alinierea corectă cu masca. Se prezintă și modul în care acestea se văd atunci când ele sunt suprapuse (1+2) și (1+2+3).

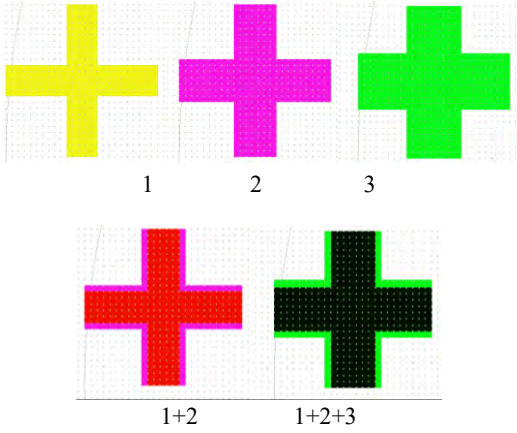


Fig. 6.30. Semnele și alinierea lor

Semnele de aliniere reprezintă mijlocul principal în alinierea exactă a celor trei măști fotolitografice ale dispozitivului micro-electro-mecanic proiectat în cadrul lucrării. Acestea sunt utilizate pentru menţinerea în poziţie corectă a măştilor. În Fig. 6.26 sunt reprezentate semnele de aliniere utilizate pentru poziţionarea corectă a celor trei măşti. Fiecare culoare corespunde fiecărui layer al măştilor, iar cifrele corespund efectiv măştilor la care face referire semnul. Alinierea se face succesiv, în ordinea cronologică a etapelor fluxului tehnologic. Setul de semne de aliniere pentru cele trei măști ale dispozitivului este redat în Fig. 6.31 și Fig. 6.32.

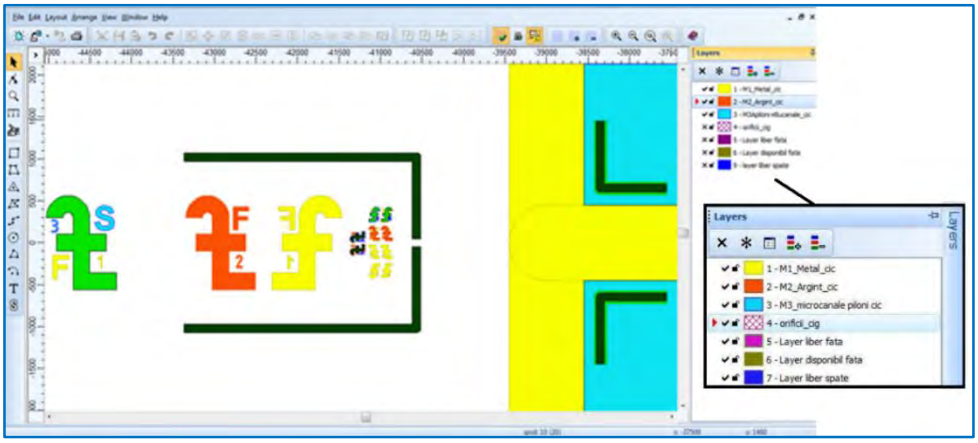


Fig. 6.31. Set semne aliniere la stânga plachetei de 4inch :
masca M2 la masca M1 și masca M3 la masca M1 spate/față

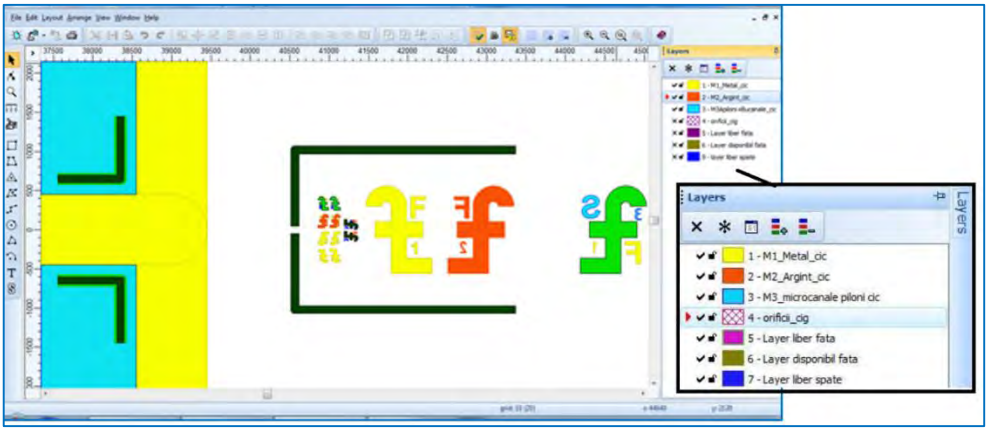


Fig. 6.32. Set semne aliniere la dreapta plachetei de 4inch: M2 la M1 și M3 la M1 spate/față

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.

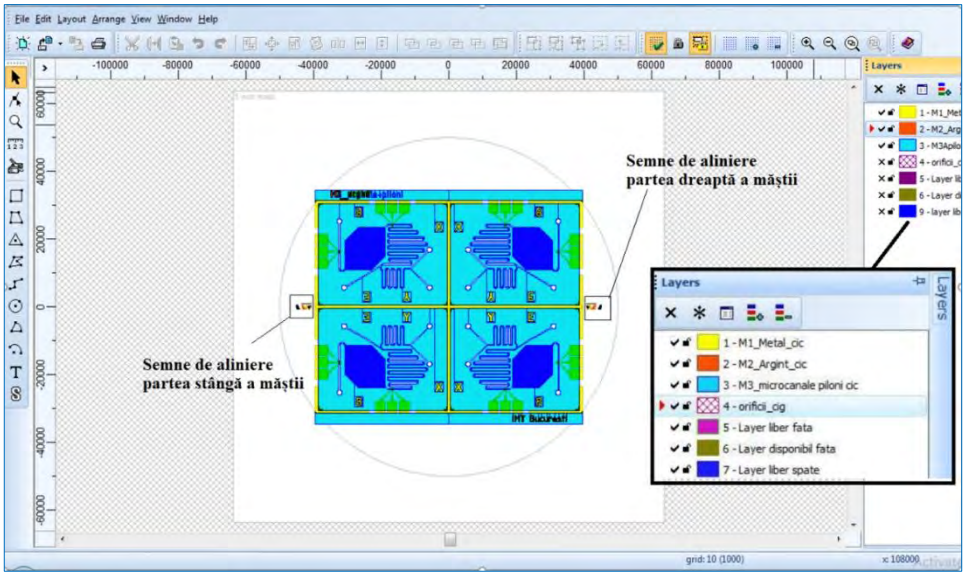


Fig. 6.33. Cele trei măști suprapuse

6.4. MODELAREA PROCESULUI DE FABRICAȚIE A DISPOZITIVULUI MICRO-ELECTRO-MECANIC, MODEL EXPERIMENTAL

La fabricarea biocipului pentru determinarea numărului de limfocite T a fost utilizat programul „SEMulator3D™". Acesta este un modul al fabricării virtuale în micro și nanotehnologie cu ajutorul căruia se obține modelarea pe calculator a proceselor tehnologice indicate a fi utilizate, pe baza evaluării și selectării opțiunilor tehnologice de fabricare.

Pe baza programului „SEMulator3D™" se realizează modelarea proceselor tehnologice, care se bazează pe opțiunile tehnologice de fabricare selectate și evaluate (introduse în programul de modelare).

Folosind programul „SEMulator3D™", au fost generate modelele 3D pentru modulele care alcătuiesc biocipul pentru determinarea limfocitelor T.

Prin utilizarea acestui program, se realizează evaluarea și îmbunătățirea etapelor de proiectare din procesul tehnologic pentru realizarea/fabricarea dispozitivului. În mod evident, toate aceste acțiuni se află în conexiune cu modelarea dispozitivului micro-electro-mecanic.

Trebuie remarcat faptul că, utilizând programul SEMulator3D™, care este un program ce face parte dintr-un modul Coventor, folosind tehnica unică de

modelare fizică 3D, se pot modela etape de proces într-o mare varietate. Pentru a modela etapele de proces, sunt necesari anumiți parametri geometrici și fizici de intrare, care pot fi calibrați fără dificultate. Dintre acești parametri de proces, se menționează cei mai importanți: conformitatea depunerii, anizotropia, selectivitatea corodării.

Parametrii de proces amintiți interacționează cu diverși parametri și cu date de proiectare. Aceste interacțiuni complexe au impact asupra structurii formei finale a dispozitivului [*15].

Programul SEMulator utilizează fișiere cu extensia „.cat", astfel încât fișierele create în CleWin cu extensia „.cif" au fost salvate succesiv, cu extensia „.dxf" și apoi cu extensia „.cat".

Pentru a realiza modelarea, în fișierul „.vproc" (Fig. 6.34) al programului de editare „Process Editor", vor fi introduse toate etapele procesului, precum și parametrii acestora: materialul, grosimea acestuia, denumirea măștii, adâncimea canalului, denumirea substratului (Fig. 6.35).

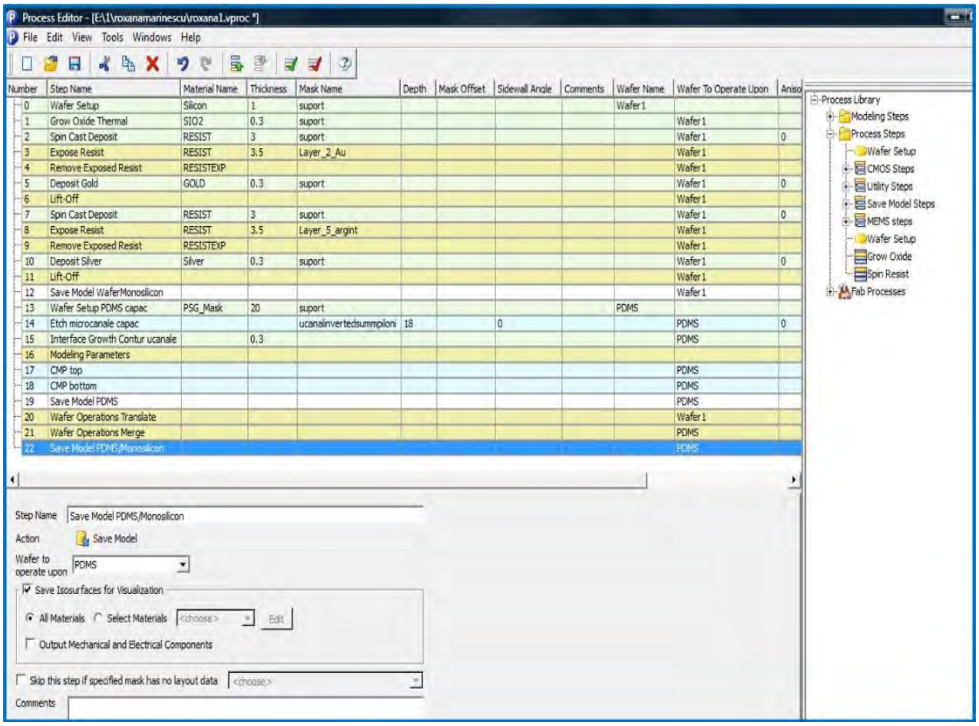
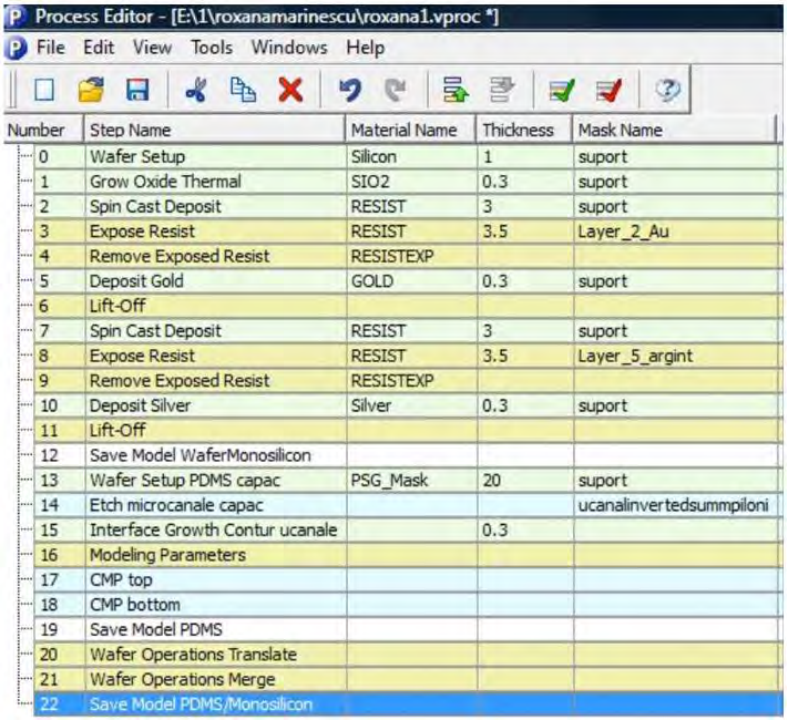


Fig. 6.34. Interfața de lucru a ferestrei „Process Editor"

Cu ajutorul fișierelor „.vproc" și „.cat" realizate, s-a început modelarea în programul SEMulator3D Manager a biodispozitivului (Fig. 6.36).



Number	Step Name	Material Name	Thickness	Mask Name
0	Wafer Setup	Silicon	1	suport
1	Grow Oxide Thermal	SIO2	0.3	suport
2	Spin Cast Deposit	RESIST	3	suport
3	Expose Resist	RESIST	3.5	Layer_2_Au
4	Remove Exposed Resist	RESISTEXP		
5	Deposit Gold	GOLD	0.3	suport
6	Lift-Off			
7	Spin Cast Deposit	RESIST	3	suport
8	Expose Resist	RESIST	3.5	Layer_5_argint
9	Remove Exposed Resist	RESISTEXP		
10	Deposit Silver	Silver	0.3	suport
11	Lift-Off			
12	Save Model WaferMonosilicon			
13	Wafer Setup PDMS capac	PSG_Mask	20	suport
14	Etch microcanale capac			ucanalinvertedsummpiloni
15	Interface Growth Contur ucanale		0.3	
16	Modeling Parameters			
17	CMP top			
18	CMP bottom			
19	Save Model PDMS			
20	Wafer Operations Translate			
21	Wafer Operations Merge			
22	Save Model PDMS/Monosilicon			

Fig. 6.35. Etape de modelare a procesului de fabricație

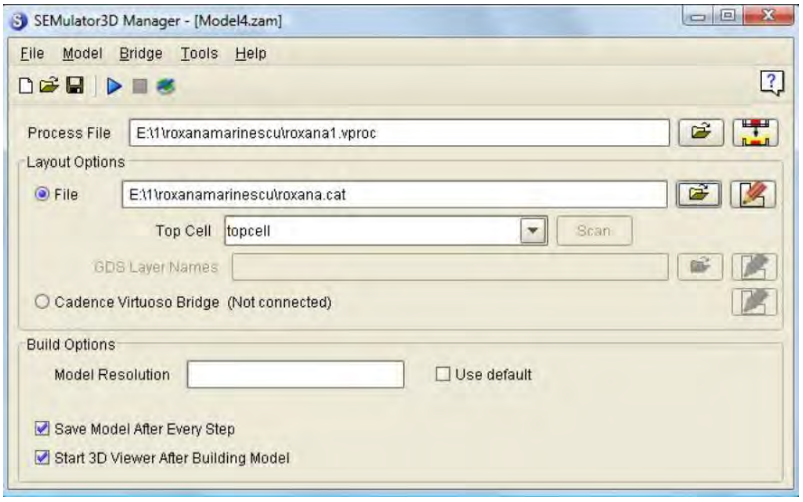


Fig. 6.36. Interfața de lucru a programului SEMulator - conversia modelului

Programul rulează automat modelarea dispozitivului microfluidic. Modelul generat este prezentat în Fig. 6.37.

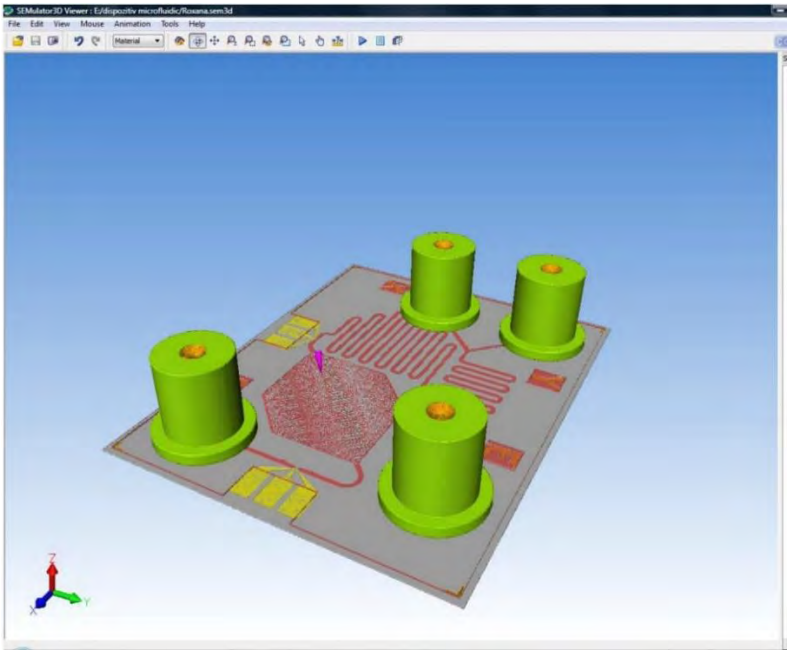


Fig. 6.37. Modelarea rezervoarelor pentru introducerea substanțelor în circuitele microfluidice

Etapele de modelare ale procesului de fabricație a dispozitivului micro-electro-mecanic sunt prezentate în Fig. 6.38 - 6.51. Pentru fiecare etapă au fost redate câte două imagini: planul Z-X (home view) și planul Y-X (top view).

- **Placheta de siliciu –** A fost modelată placheta de siliciu ca substrat pentru fabricarea dispozitivului (Fig. 6.38).

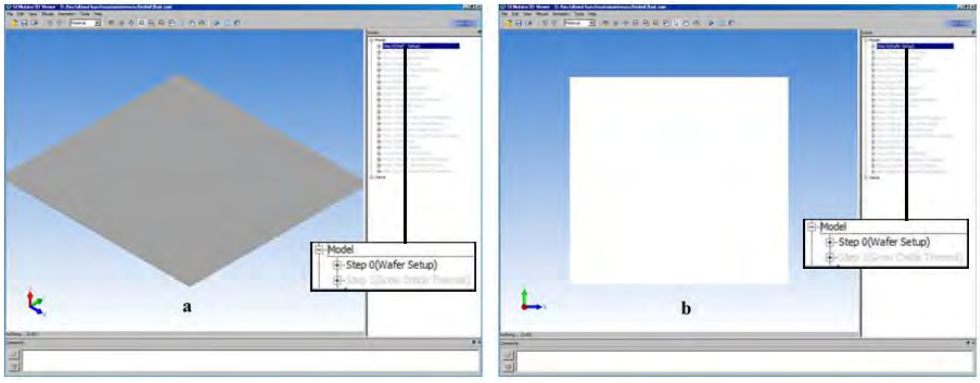


Fig. 6.38. Suportul de plachetă de siliciu pe care se realizează modelarea procesului de fabricație a dispozitivului microfluidic : a) home view și b) top view

În partea dreaptă a fiecărei imagini sunt afișate etapele (pașii) de editare. Acestea au fost stabilite pentru a putea realiza modelarea. Etapele de modelare sunt redate în Tabelul 6.2.

Tabelul 6.2. **Afișarea și explicarea etapelor de modelare**

		**0** Configurarea plachetei **1** Creșterea oxidului **2** Depunere fotorezist **3** Expunere fotorezist **4** Îndepărtarea fotorezisului expus **5** Depunere aur **6** Lift-off **7** Depunere fotorezist **8** Expunere fotorezist **9** Îndepărtare fotorezist expus **10** Depunere argint **11** Lift-off **12** Salvare **13** SU-8 **14** Corodare microcanale **15** Creștere contur canale **16** Parametrii de modelare **17** Rezervoare - sus **18** Rezervoare - jos **19** Salvare model PDMS **20** Operația de transpunere **21** Operația de îmbinare **22** Salvare
Etapele prezentate în modulul Convertor al programului SEMulator	Etapele prezentate în programul Process Editor	Semnificația etapelor

- **Creșterea oxidului:** - a fost modelată creșterea oxidului pe toată suprafața plachetei de siliciu prezentată în Fig. 6.39.

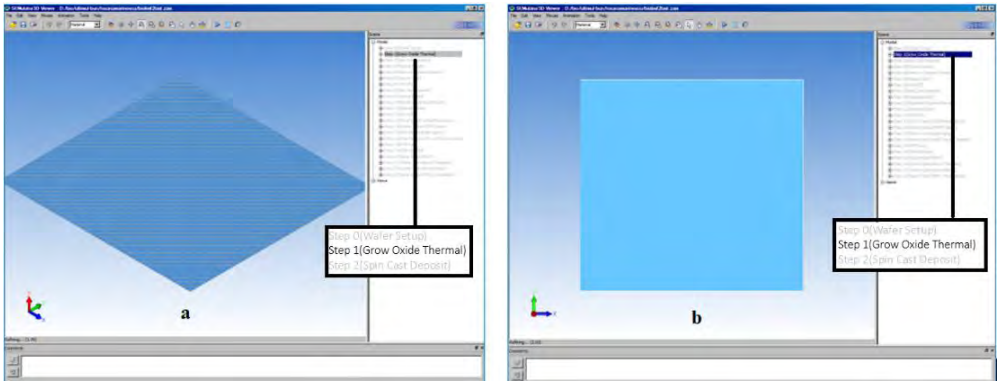


Fig. 6.39. Modelarea procesului creșterii oxidului
a) home view și b) top view

- **Depunerea fotorezistului** a fost modelată pe toată suprafața plachetei de siliciu (Fig. 6.40).

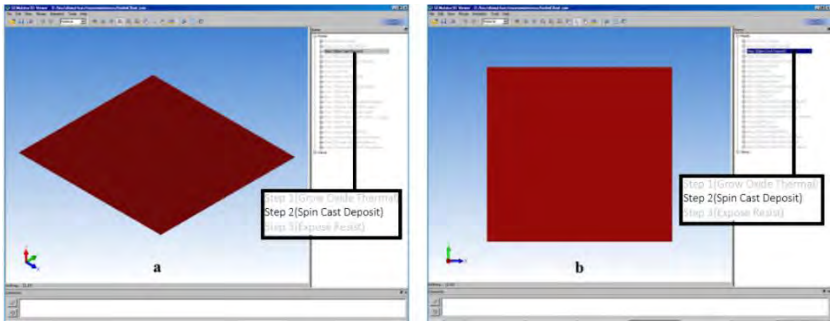


Fig. 6.40. Modelarea procesului depunerii fotorezistului :
a) home view și b) top view

- **Expunerea fotorezistului: -** în momentul expunerii tot fotorezistul de pe plachetă se întărește, cu excepția zonelor ce au fost protejate de prima mască, conform Fig. 6.41.

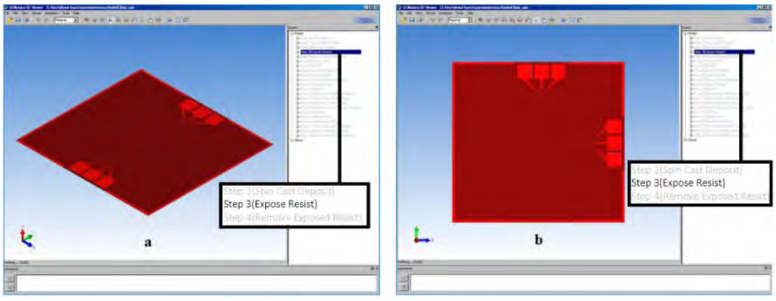


Fig. 6.41. Modelarea procesului de expunere a fotorezistului:
a) home view și b) top view

- **A fost modelată înlăturarea fotorezistului** din zonele care nu au fost expuse, lăsând libere imaginile imprimate cu ajutorul primei măști, conform Fig. 6.42.

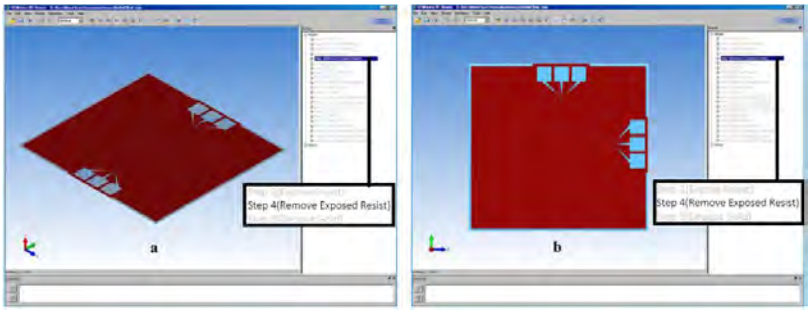


Fig. 6.42. Modelarea procesului de înlăturare a fotorezistului
a) home view și b) top view

- **A fost modelată depunerea unui strat de titan-aur** pe toată suprafața plachetei, conform Fig. 6.43.

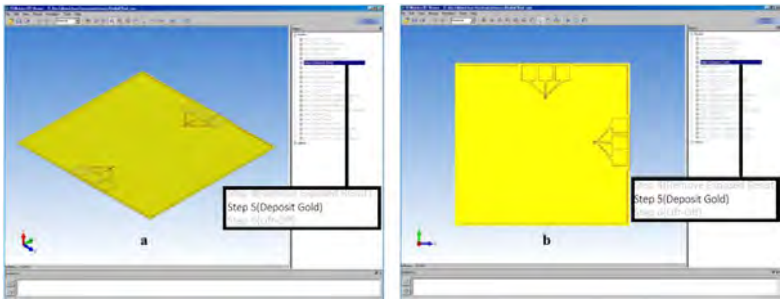


Fig. 6.43. Modelarea procesului de depunere a stratului de titan-aur :
a) home view și b) top view

- **A fost modelată înlăturarea fotorezistului prin lift-off:** acesta se va desprinde de pe plachetă și lasă acoperite doar zonele de pe masca M1 (Fig. 6.44).

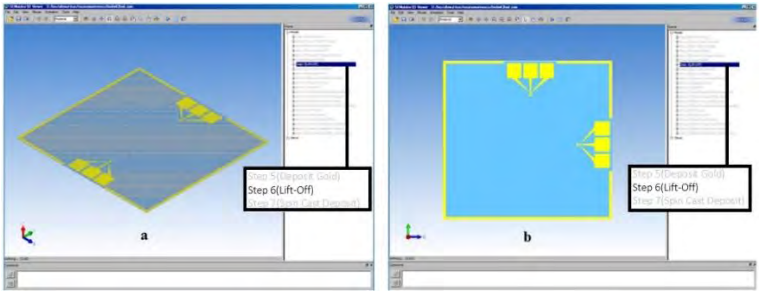


Fig. 6.44. Modelarea procesului de înlăturare a fotorezistului :
a) home view și b) top view

- Aceste etape se referă la modelarea proceselor corespunzătoare **depunerii (**Fig. 6.45), **expunerii și îndepărtării fotorezistului** (Fig. 6.46), similare celor corespunzătoare măștii M1, dar aplicabile pentru procesul de realizare a măștii M2.

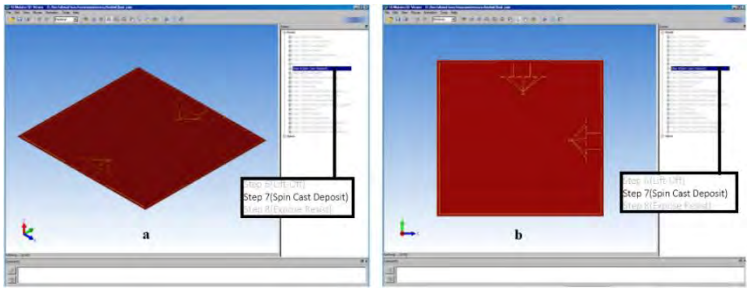


Fig. 6.45. Modelarea procesului de depunere/etalare a fotorezistului :
a) home view și b) top view

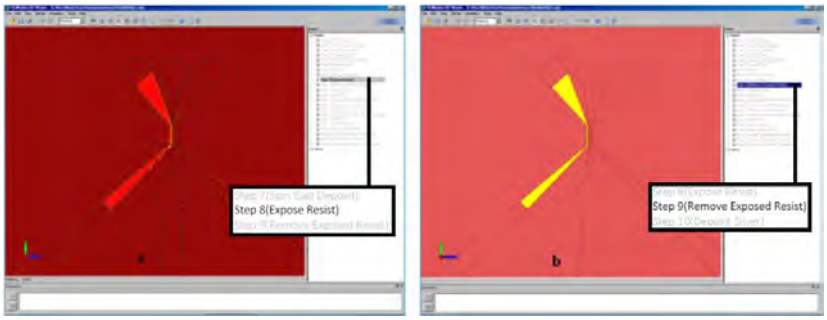


Fig. 6.46. Modelarea procesului de:
(a) expunere și (b) îndepărtare a fotorezistului

- Modelarea procesului de **depunere a Ag** are loc pe întreaga suprafață a plachetei, conform Fig. 6.47.

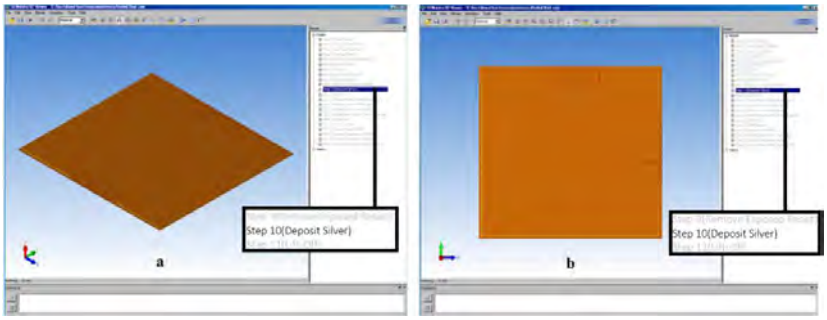


Fig. 6.47. Modelarea procesului de depunere a argintului :
a) home view și b) top view

- **Înlăturarea fotorezistului prin lift-off:** a fost simulat procesul înlăturării fotorezistului cu argintul depus în zonele care nu sunt protejate de mască, astfel încât rămâne imaginea de pe Masca 2, conform Fig. 6.48. Astfel, se obține imaginea electrodului de referință acoperit cu Ag (Fig. 6.49).

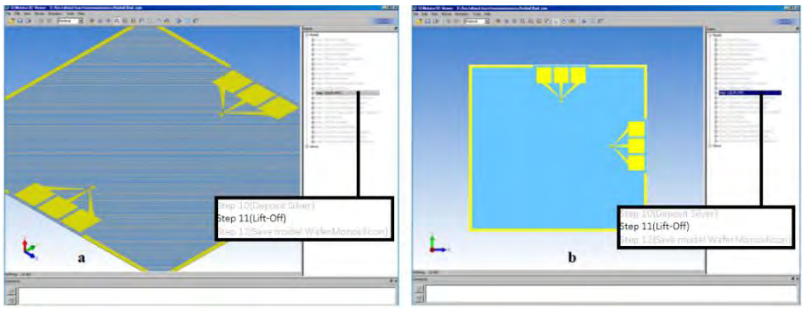


Fig. 6.48. Modelarea procesului de îndepărtare a argintului :
a) home view și b) top view

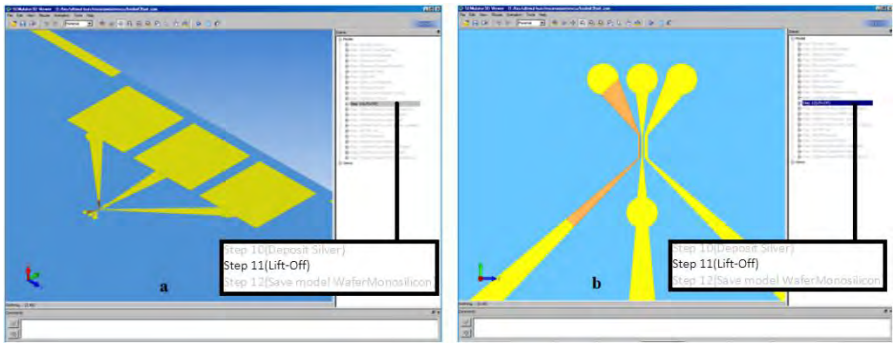


Fig. 6.49. Detaliu al senzorului :
a) home view și b) top view

- **Depunerea fotorezistului SU-8 –** A fost modelat procesul de depunere a fotorezistului SU-8 pentru realizarea părții microfluidice, prezentat în Fig. 6.50, precum și procesul de corodare (Fig. 6.51).



Fig. 6.50. Modelarea procesului de depunere a fotorezistului SU-8

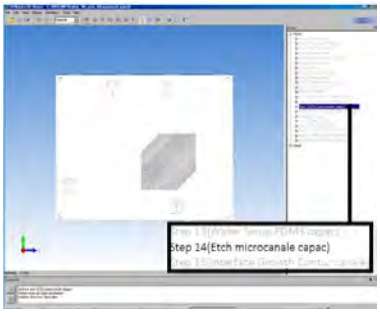


Fig. 6.51. Modelarea procesului de corodare a fotorezistului SU-8

Parcurgând etapele de modelare a procesului de fabricație prezentate anterior, configurația dispozitivelor cu rezervoarele (prin care sunt introduse soluțiile) atașate va arăta conform Fig. 6.52.

De asemenea, s-a mărit imaginea pentru zona senzorilor, conform Fig. 6.53. Pentru a observa pilonii din camera de selecție și captură, s-a obținut Fig. 6.54.

S-a utilizat programul SEMulator3D pentru modelarea dispozitivului micro-electro-mecanic. 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.

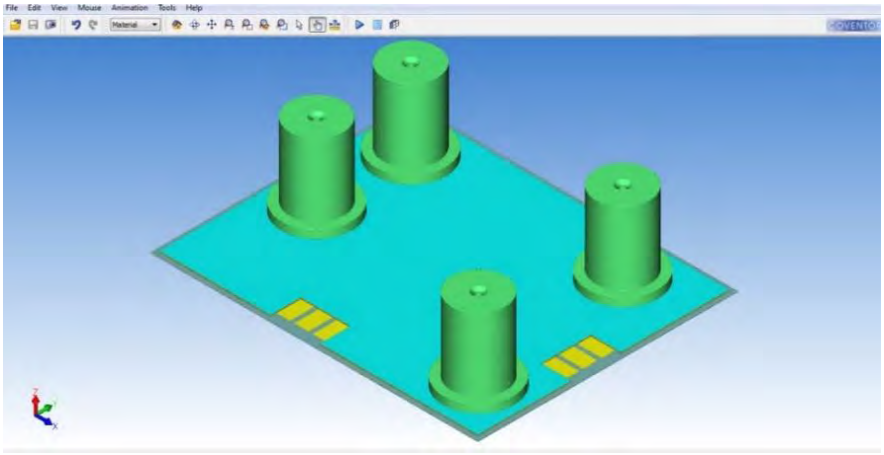


Fig. 6.52. Configurația dispozitivului microfluidic după modelarea etapelor de fabricație

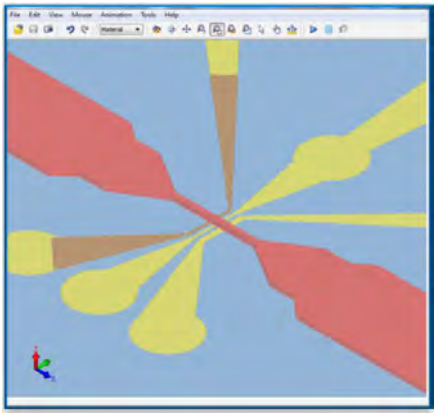


Fig. 6.53. Detaliu al senzorilor și al canalului de numărare îngustat la 15 µm

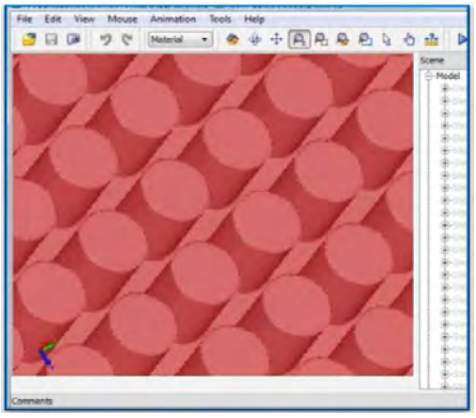


Fig. 6.54. Detalierea modelării pilonilor din camera de selecție și captură

SEMulator3D folosește etape tehnologice standard, nu permite schimbarea parametrilor. Dacă procesul este conform, are loc modelarea, care poate fi văzută și ca o simulare.

În situația unui proces neconform, SEMulator3D semnalează anumite erori, care trebuiesc corectate pentru realizarea unei modelări corespunzătoare, care să confirme valabilitatea proiectării, în baza căreia dispozitivul va fi fabricat.

Simularea computerizată a devenit o parte esențială a științei și ingineriei, este tehnica prin care se verifică corectitudinea/valabilitatea materialelor selectate în construcția unor piese/dispozitive noi, precum și a tehnologiilor de realizare/fabricare.

Se exemplifică această afirmație prin maniera în care a fost utilizat programul SEMulator3D™, la modelarea etapelor de fabricație a biocipului folosit pentru determinarea numărului de limfocite T. Programul a fost folosit în vederea obținerii

modelării pe calculator a proceselor tehnologice indicate a fi utilizate, pe baza evaluării și selectării opțiunilor tehnologice de fabricare.

6.5. MODELAREA ȘI SIMULAREA COMPUTERIZATĂ A CURGERII MICROFLUIDICE ÎN DISPOZITIVUL MICRO-ELECTRO-MECANIC, MODEL EXPERIMENTAL

În practica modernă există posibilitatea accesării unor programe de simulare numerică complexe. Încă din faza de proiectare, a fost necesar să se verifice comportamentul hidraulic al circuitelor microfluidice, determinându-se parametrii de curgere în vederea realizării proceselor de lizare și stopare a lizării, precum și a numărării limfocitelor T - obiectivul principal. Rezultatele obținute din simularea computerizată urmează să fie validate experimental în etapele ulterioare de testare a dispozitivului microfluidic. Astfel, 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 µl/min
Soluție de lizare	1600 µl/min
Soluție de stopare a lizării	265 µl/min

Apa a fost considerată singura fază, deoarece se găsește în proporție mai mare de 99% în amestecul de probă de sânge și soluțiile apoase reactive. A fost adoptată curgerea laminară, pe baza determinării numărului Reynolds.

Pentru calculul său, s-au utilizat următorii parametrii: ρ - densitatea apei [kg / m^3]; u_{av} - viteza medie [m / s] de curgere în circuitele dispozitivului; D - dimensiunea secțiunii de curgere [m], $D = 3 \cdot 10^{-4}$; µ - vâscozitatea dinamică [Pa · s], $\mu = 8{,}9 \cdot 10^{-4}$. Valorile obținute au fost 1,68 pentru circuitul 1 (de lizare) și 0,79 la circuitul 2 (de oprire a lizării), mult mai mici decât 2100. Acesta este pragul dintre curgerea laminară și turbulentă [J2].

Parametrizarea geometriei modelului după optimizarea constructivă și dimensională iterativă este prezentată în Tabelul 6.4 [G5].

Tabelul 6.4. **Parametrii simulării [G5]**

Nume	**Expresie**	**Valoare** [µm]	**Descriere**
l1c	40000	400000.0	lungime cip
l2c	30000	30000.0	lățime cip
a	300	300	lățime canal
l1	7300	7300	lungime canal 1

Tabelul 6.4 (continuare)

Nume	**Expresie**	**Valoare** [μm]	**Descriere**
l2	1800	1800	lungime canal 2
rrac	300	300	rază canal curbă
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 teșitură 1
l11	200	200	lungime canal teșit
c	(a-2*b-d)/2	67.5	lungime teșitură 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
ych	12000-30000	-18000.0	poziția origine cip pe axa y

Cu ajutorul acestor parametri, a fost modelată geometria în Comsol, conform Fig. 6.55.

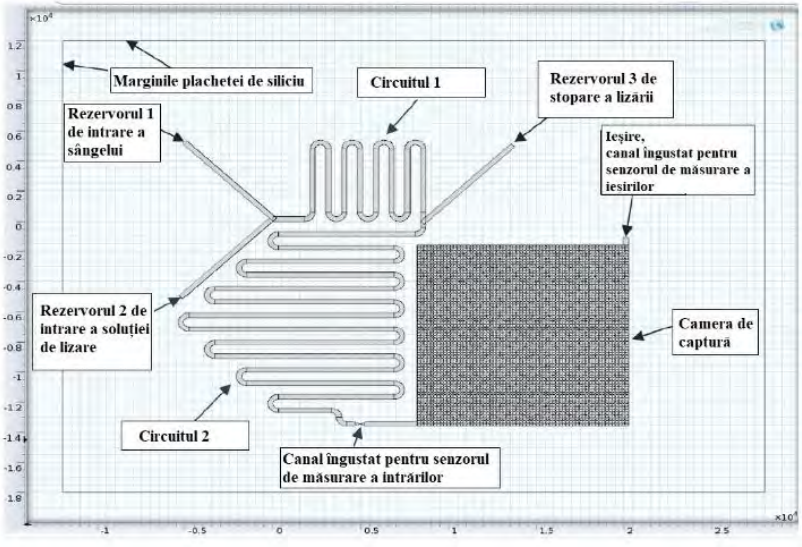


Fig. 6.55. Crearea geometriei dispozitivului microfluidic
cu datele rezultate de la proiectare [G5]

Condițiile la limită se bazează pe modelul matematic, exprimat prin ecuațiile diferențiale (6.3), (6.4), care sunt rezolvate de modulul de calcul adoptat din Comsol Multiphysics.

$$\rho(\mathbf{u}\cdot\nabla)\mathbf{u} = \nabla\cdot\left[-\rho\mathbf{I} + \mu(\nabla\mathbf{u} + (\nabla\mathbf{u})^T) - \frac{2}{3}\mu(\nabla\cdot\mathbf{u})\mathbf{I}\right] \quad (6.3.)$$

$$\nabla\cdot(\rho\mathbf{u}) = 0 \quad (6.4.)$$

unde: u este viteza fluidului [m/s]; ρ – densitatea [kg/m^3]; μ – vâscozitatea dinamică [N·s/m^2]; p – presiunea [Pa]; l – lungimea [m]; T– temperatura [^{o}K]; variabilele μ și ρ din biblioteca Comsol sunt dependente de temperatură.

Condițiile la limită (Fig. 6.56) sunt impuse sub forma celor trei intrări: viteze normale pe suprafața de intrare (sânge, lizare, antilizare) și o ieșire sub formă de presiune atmosferică. Parametrii corespunzători privind viteza [m/s] și presiunea [Pa] sunt prezentați în partea dreaptă a Fig. 6.56.

Discretizarea a fost realizată din elemente triunghiulare libere, cu grad de finețe normal și cu următoarele caracteristici statistice: 315166 elemente triunghiulare libere, cu o calitate medie 0,9384, pe o scală de la 0 la 1.

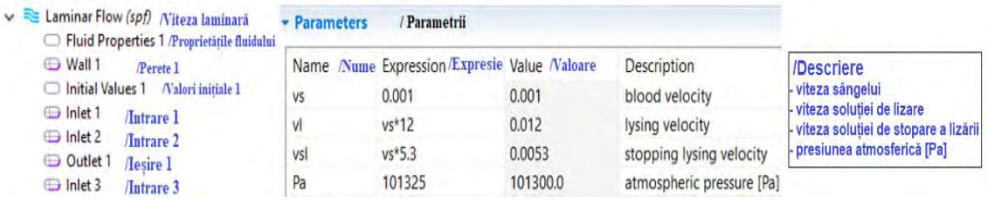


Fig. 6.56. Condiții la limită, viteză [m/s], presiune [Pa] [G5]:
vs – viteza sângelui, *vl* – viteza soluției de lizare, *vsl* - viteza soluției de stopare a lizării și *Pa* - presiunea atmosferică.

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

Au fost colectate vitezele curente în puncte situate pe mediana traseului de curgere, reprezentate cu albastru - Fig. 6.58, având în vedere distribuția parabolică în secțiune a vitezelor la curgerea laminară. S-a constatat că valorile obținute au fost scăzute pe microcanalele drepte și mult mai mari pe acelea curbe și în secțiunile îngustate (Fig. 6.57 și Fig. 6.58)

Obiectivele procesului de analiză a probei de sânge cu substanțele de lizare și de stopare a lizării au fost atinse. Astfel, calculând lungimea fiecărui circuit raportat la valorile corespunzătoare ale vitezei medii, reprezentate cu roșu în Fig. 6.58, timpul de deplasare pentru circuitul 1 a fost 2,48 s mai mic decât valoarea caracteristică de 3 s necesară pentru procesul adecvat de lizare a eritrocitelor.

Pentru circuitul 2, timpul de parcurgere a fost de 30,14 s. Acesta este mai mare decât valoarea de referință pentru oprirea lizării, care este de 30 s.

Rezultatele FEM (metoda elementelor finite) au condus la fabricarea adecvată a dispozitivului „lab-on-a-chip”, validând modelul obținut.

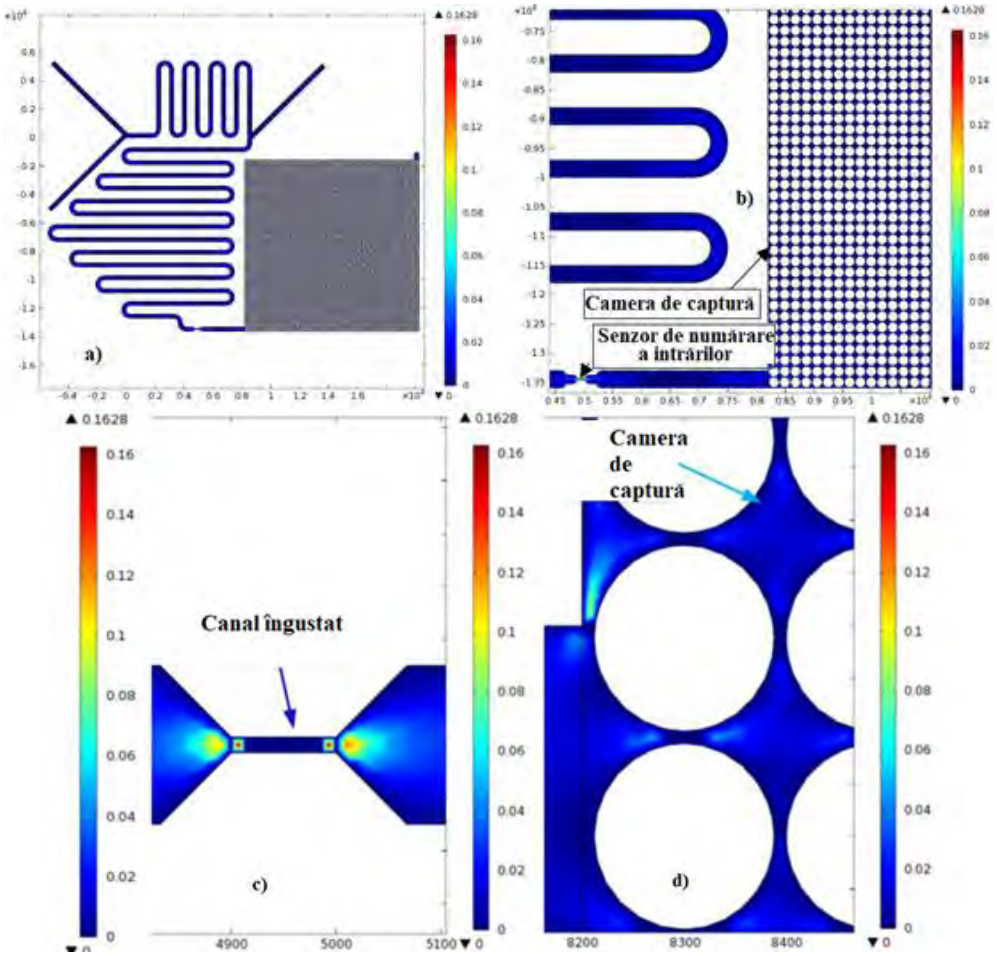


Fig. 6.57. Variația vitezei de curgere [m/s],
a) vedere generală, b) detaliu al circuitelor, c) canalul de numărare,
d) vedere mărită a camerei de selecție și captură [G5]

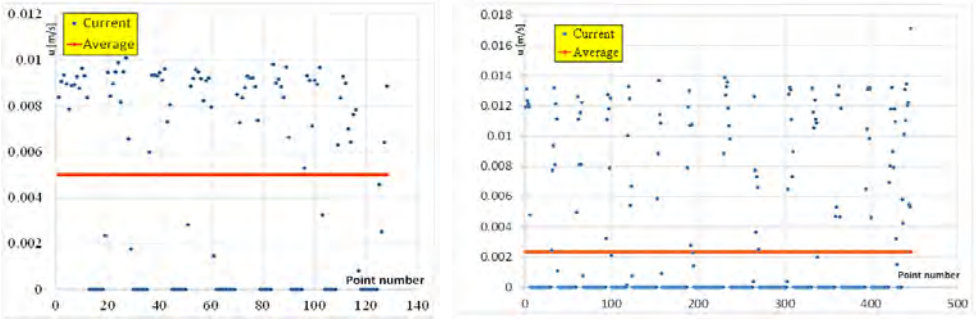


Fig. 6.58. Viteze curente și medii [m / s] în circuitul 1 (stânga) și circuitul 2 (dreapta) [G5]

7.

FABRICAREA UNUI DISPOZITIV MICRO-ELECTRO-MECANIC, MODEL EXPERIMENTAL

Fabricarea dispozitivului micro-electro-mecanic de tip „lab-on-a-chip" reprezintă obiectivul principal al lucrării. Procesul tehnologic de fabricare a fost abordat după parcurgerea etapelor anterioare de proiectare a dispozitivului micro-electro-mecanic, modelare a procesului tehnologic de realizare, modelarea și simularea funcționării sale. Aceste etape de verificare computerizate încă din faza de concepție funcțională și tehnologică, au creat condițiile favorabile de realizare fizică a dispozitivului micro-electro-mecanic.

Toate procesele de fabricație descrise în acest capitol, au fost realizate cu ajutorul infrastructurii din cadrul Institutului Național de Cercetare-Dezvoltare pentru Microtehnologie – IMT București (IMT).

7.1. SCRIEREA MĂȘTILOR

În etapa de modelare a procesului tehnologic, prezentată anterior, s-a stabilit că pentru fabricare se vor utiliza trei măști diferite, ce vor fi folosite succesiv, pentru depunerea materialelor prin suprapunere. Măștile au fost proiectate în programul CleWin, iar documentația obținută a fost utilizată în procesul tehnologic de fabricare.

- **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 fotorezistului 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.

Măştile sunt suporturi fizice cu suprafață plană. Pe suprafața acestora, se inscripționează modelul care va fi transferat pe substratul dorit. Alegerea materialului măștilor, precum și modul lor de construcție se realizează ținând seama de caracteristicile radiației utilizate pentru transfer.

Masca virtuală proiectată în CleWin a fost transpusă pe masca reală, realizată dintr-o placă de sticlă specială: sticlă „Soda Lime", numită și sticlă „Soda-Lime-Silica". Pe ea se desenează modelul dorit folosind crom. Modelul se transpune pe suprafața plachetei cu ajutorul măștii.

Măştile sunt: pozitive şi negative. Măștile **pozitive** au desenele reprezentate prin **regiuni opace** la radiaţia activă **pe un fond transparent**, iar la măștile **negative,** formele sunt realizate din **regiuni transparente pe un fond opac**.

Deoarece suportul dispozitivului îl reprezintă placheta de siliciu monocristalin cu diametrul de 4 inch (cca. 100 mm), masca proiectată a avut dimensiunea de 5 inch (127 mm). Aceasta trebuie să fie mai mare decât placheta, pentru a asigura încadrarea tuturor elementelor.

Scrierea măștilor s-a realizat cu ajutorul echipamentului DWL 66-fs Laser Lithography System (Fig 7.1) din dotarea IMT București [*16], [*17]. Echipamentul este produs de către firma Heidelberg Instruments Mikrotechnik, Germania (2006). Acesta reprezintă un echipament de scriere directă cu fascicul laser de înaltă rezoluție care are următoarele caracteristici:

– este un sistem cu diode laser cu lungime de undă de 405 nm;

– inscripționarea măștii se realizează la o dimensiune minimă de 0,8 μm pe linie, sau, 1 μm pe geometrie, în ambele polarități;

– abaterea dimensională acceptata este de 10 %;

– echipamentul este dotat cu două capete de scriere de 2 μm cu rezoluția maximă de 0,6 μm, respectiv 10 μm cu rezoluția maximă de 3 μm.

În funcție de rezoluția dorită scrierea unei măști poate varia între câteva ore - pentru capul de scriere de 10 μm - și câteva zile pentru cel de 2 μm. Scrierea măștilor cu dimensiuni mai mari de 3 μm se realizează în aproximativ două zile. Scrierea măștilor cu dimensiuni între 1 și 2 μm poate fi realizată în circa patru zile. Realizarea celor trei măști pentru dispozitivul microfluidic care face obiectul lucrării a durat câteva zile.

Imaginea grafică a rezultatului măștilor virtuale proiectate se va transfera din calculator linie cu linie, către dispozitivul de baleiaj al sistemului și astfel se vor realiza măștile fizice. Această procedură are ca rezultat o imagine la scara 1:1 a întregii măști pe placheta de siliciu.

Realizarea acestor măști are loc în câteva etape. Prima dată se va depune un strat de crom. Peste acesta se depune un strat subțire de fotorezist (cu o grosime de 0,6 μm). Primul proces pe care îl suferă masca după inscripționarea cu laser este

developarea. Fotorezistul pozitiv care a fost expus în timpul executării măștii se solubilizează în developant și este astfel îndepărtat.

Corodarea stratului de crom, care are loc în fereastra deschisă în stratul de fotorezist, reprezintă următoarea etapă. Procesul de corodare se face pe cale umedă cu ajutorul unei soluții de acid percloric ($HClO_4$) și a nitratului de amoniu $(NH_4)_2[Ce(NO_3)_2]$ conform reacției [Ș4], [*42]:

$$3Ce(NH_4)_2(NO_3)_6 + Cr \rightarrow 3\ Cr(NO_3)_3 + 3\ Ce(NH_4)_2(NO_3)_5 \qquad (7.1.)$$

După ce a fost făcută corodarea cromului, are loc ultima etapă, reprezentată de îndepărtarea stratului de fotorezist rămas pe mască. În interiorul incintei există o cameră video cu ajutorul căreia s-a realizat inspecția calitativă a măștii după ce au fost efectuate procesele de developare și corodare.

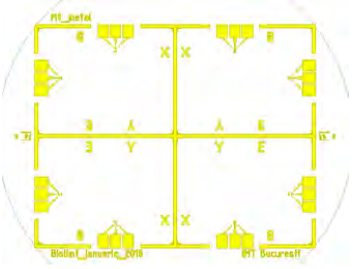
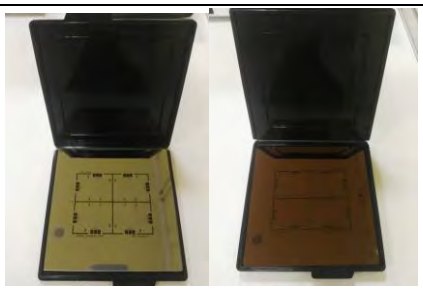
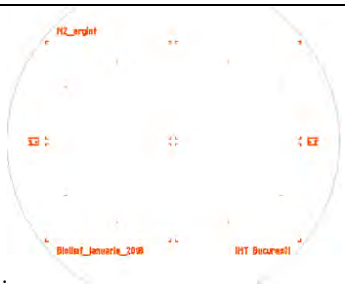
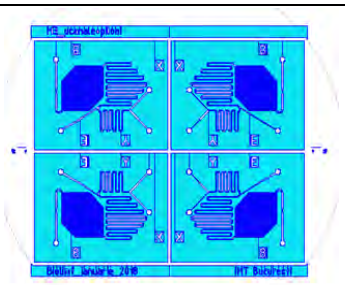
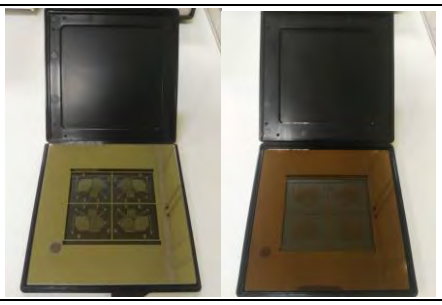
Pentru acest set compus din trei măști s-a efectuat superpoziția, ceea ce înseamnă că semnele de aliniere existente pe măști au fost aduse în aceeași poziție pentru a verifica dacă s-au suprapus perfect.



Fig. 7.1. Capul de scriere al laserului DWL 66-fs [M20]

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.

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

Proiectare	Fabricare
Masca 1 (M1):	
	
Masca 2 (M2):	
	
Masca 3 (M3):	
	

7.2. FABRICAREA PROPRIU-ZISĂ A DISPOZITIVULUI, MODEL EXPERIMENTAL

Înainte de începerea procesului efectiv de fotolitografie (transpunerea de pe mască pe plachetă) au fost pregătite corespunzător componentele pe suprafața cărora s-au realizat depuneri. Acestea trebuie sa fie foarte bine spălate și uscate. Aplicarea fotorezistului trebuie făcută fără oxizi, grăsimi, săruri etc., pentru a realiza o bună aderență a acestuia pe suprafața de depunere.

O suprafață curățată necorespunzător poate produce imperfecțiuni (ex. fisuri) sau exfolieri ale stratului depus, fie după procesul de depunere, fie în timpul exploatării. Se poate face o curăţare a plachetei dacă este cazul, urmată de deshidratarea acesteia pentru ca mai apoi să fie aplicat fotorezistul. Este recomandat ca plachetele să fie spălate de mai multe ori pentru a îndepărta impuritățile în totalitate.

Cea mai folosită soluție pentru spălarea plachetelor este soluția numită „Piranha", ce conține: acid sulfuric (H_2SO_4): apă oxigenată (H_2O_2), în proporție de 3:1.

Alte metode de curățare sunt cele cu solvenţi organici (tricloretilenă, triclorură de carbon etc.) sau spălarea cu acetonă, și/sau alcool, iar în final cu apă deionizată din abundenţă.

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.

Plachetele au fost curățate cu ajutorul soluției Piranha și a apei deionizate.

După curăţare, a avut loc procesul de deshidratare a plachetelor. Acesta se realizează de obicei în etuvă, la o temperatură de aproximativ 100 ^oC şi la un anumit interval de timp. După realizarea acestor etape, s-a început procesul efectiv de fotolitografie.

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

- Alegerea substratului (placheta de siliciu).
- Depunerea stratului de oxid de siliciu pe plachetă (100 nm).
- Fotolitografia pentru prima mască (M1).
- Depunerea stratului de titan-aur (30-300 nm).
- Lift-off (curățirea zonelor inactive).
- Procesul de fotolitografie pentru a doua mască (M2).
- Depunerea stratului de argint (100 nm).
- Lift-off (curățirea zonelor inactive).
- Procesul de fotolitografie pentru a treia mască (M3).
- Depunerea PDMS.

7.2.1. Placheta de siliciu folosită ca substrat

Fabricarea biodispozitivul 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.

Pentru testare s-a folosit un lot de cinci plachete de siliciu, precum cele din Fig. 7.2. Aceste plachete au dimensiunea de 4 inch.

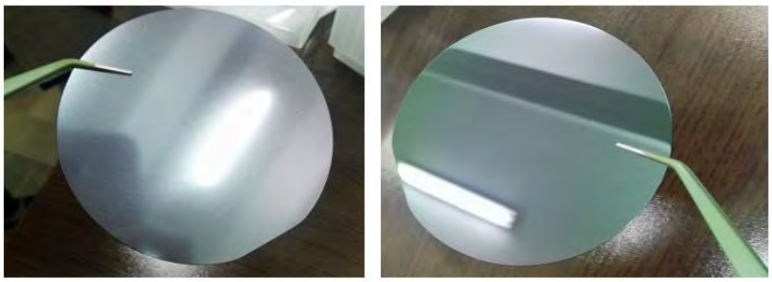


Fig. 7.2. Plachete de siliciu

7.2.1. 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 (Fig. 7.3). Această creștere a stratului de oxid de siliciu pe plachetă constituie caracteristica de bază a tehnologiei planare. Controlul precis al grosimii stratului de oxid precum și cunoașterea cineticii procesului de oxidare sunt două elemente foarte importante în fabricarea dispozitivelor planare.



Fig. 7.3. Schema-bloc a oxidului crescut pe placheta de siliciu

Siliciul și **oxidul de siliciu** stau la baza tehnologiei planare, siliciul fiind materialul cel mai utilizat ca substrat pentru microstructuri. Acesta nu este perfect pentru toate aplicațiile și nici nu poate funcționa de unul singur. Există anumite materiale suplimentare, cum ar fi metalele aluminiu (Al), cupru (Cu), wolfram (W) și izolatoarele oxid de siliciu (SiO_2) și nitrură de siliciu (Si_3N_4). Unul dintre motivele majore pentru popularitatea siliciului este ușurința cu care acesta formează un oxid excelent: SiO_2. Straturile de oxid de siliciu se pot realiza prin diverse metode [M6], [Z2]:

- depunere prin intermediul unor reacții din faza gazoasă,
- formare prin oxidare electrochimică (anodizare) sau
- prin reacții în plasmă.

În practica industrială, straturile de oxid de siliciu sunt realizate cel mai des prin oxidarea termică a siliciului, care are loc prin reacția chimică [Z2], [Ș4]:

$$Si\ (solid) + O_2 \rightarrow SiO_2\ (solid) \qquad (7.2.)$$

Din această ecuație se observă că o parte din siliciu se folosește în creșterea stratului de oxid.

Creșterea oxidului de siliciu s-a realizat în atmosferă uscată de oxigen într-un cuptor termic Lindberg [*9] (Fig. 7.5.). Cuptorul are temperaturi cuprinse între 350±1250 °C, ce pot fi reglate cu ajutorul termocuplelor, iar depunerea se face prin proces de difuzie. Un gaz care conține mediul oxidant (oxigen sau vapori de apă) curge prin reactor și trece peste placheta de siliciu. Dimensiunea maximă a substratului pe care se pot face depuneri la acest cuptor este de 4 inch [*9].



Fig. 7.4. Pregătirea plachetelor pentru depuneri de oxid [*17]

Depunerea de 1 μm (Fig. 7.4) este necesară pentru o bună funcționare a dispozitivului micro-electro-mecanic. Depunerea s-a realizat în atmosferă uscată de oxigen, la 1100 °C, cu o durată de 4 ore și 30 min.

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. Oxidul este și un bun material dielectric care ajută la aderența materialelor ce vor fi depuse ulterior [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]. Echipamentul realizează măsurători precise ale straturilor subțiri de materiale depuse, având o rezoluție de 0,1 nm. Dimensiunile care pot fi măsurate sunt între 10 nm și 100 μm. NanoCalc poate măsura până la zece straturi depuse [*9].

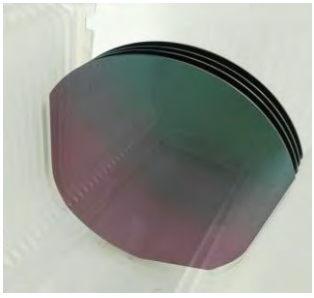


Fig. 7.5. Oxid de siliciu depus pe plachete



Fig. 7.6. Echipament NanoCalc-XR [M20]

S-a constatat faptul că grosimile de oxid depuse au fost conforme, astfel încât a fost posibilă începerea etapei de fotolitografie.

7.2.3. Fotolitografia pentru prima mască

Toate cele trei etape ale procesului de fotolitografie, ce urmează a fi prezentate, au loc într-o zonă unde mediul este controlat, zonă denumită „Camera Albă" (clasa 100) [*17]. Camera albă trebuie să îndeplinească standardele „ISO 14644-1 – ISO Class 5" sau „FED STD 209E – Class 100". Numărul maxim de particule pentru această clasă, pe m^3 este de: 100.000 pentru ≥ 0,1 μm; 23.700 pentru ≥ 0,2 μm; 10.200 pentru ≥ 0,3 μm; 3.520 pentru ≥ 0,5 μm; 832 pentru ≥ 1 μm [*19].

Într-o „cameră albă" aerul este filtrat în permanență pentru a înlătura în totalitate particulele și impuritățile care pot afecta calitatea prescrisă. Temperatura și umiditatea încăperii sunt menținute constante cu scopul protejării echipamentelor deosebit de sensibile la variațiile de mediu. În aceste incinte, presiunea din cameră este diferită: aerul circulă dinspre interior spre exterior.

Mediul de lucru este foarte important, deoarece orice particulă de praf depusă pe dispozitiv poate duce la deteriorarea acestuia. Într-o astfel de „cameră albă", trebuie monitorizată constant umiditatea. O creștere excesivă a umidității poate pune în pericol sănătatea operatorului.

Trebuie să se țină cont de măsurile privind reglementările de mediu și de politicile bazate pe aplicarea științei mediului, precum și a celor mai bune practici [A8]. Sunt impuse anumite cerințe minime de sănătate și securitate în activitățile desfășurate în laboratoare. Substanțele cu care se lucrează de obicei în astfel de laboratoare de fotolitografie sunt substanțe toxice, reactivi inflamabili. Acestea trebuie manevrate cu grijă. Este obligatorie neutralizarea sau captarea substanțelor toxice care rezultă sau care rămân în exces din reacție și care se evacuează. Toate lucrările de laborator se execută cu cantitățile și concentrațiile de substanțe strict necesare. Toate substanțele care au fost folosite sunt colectate în recipiente speciale. Este interzisă deversarea soluțiilor folosite direct în rețeaua de canalizare. Înainte de deversarea în sistemul normal de canalizare, substanțele vor fi obligatoriu neutralizate.

După creșterea stratului de oxid de siliciu, s-a depus fotorezistul pe întreaga suprafață a plachetei. Fotorezistul este elementul intermediar dintre plachetă și depunerea oricărui material. El este folosit pentru a determina forma geometrică a materialului care urmează a fi depus peste siliciu [M23].

Fotolitografia reprezintă procesul de imprimare a unui model geometric aflat pe o mască/șablon pe un strat subțire (~ μm) de material numit fotorezist.

Depunerea fotorezistului trece prin cele trei etape: **etalare → expunere → developare**.

- **Etalarea fotorezistului**

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.

Fotorezиștii pozitivi păstrează configurația măștii/șablonului. În momentul expunerii la radiații își modifică rezistența chimică față de soluția de developant, devin solubili, lăsând pe substrat modelul de pe mască. Dacă s-ar fi ales un fotorezist negativ, în momentul expunerii la radiații, ar fi devenit mai puțin solubil pentru developant și ar fi lăsat un model invers față de cel de pe mască.

Fotorezistul LOR 10B (Fig. 7.7) se găseşte în stare lichidă şi 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].

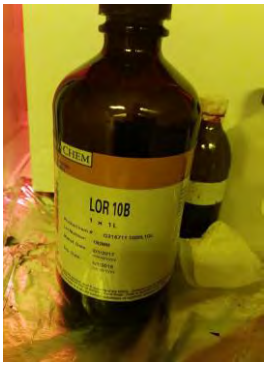


Fig. 7.7. Fotorezist LOR 10B



Fig. 7.8. Fotorezistul LOR 10B depus pe plachetă

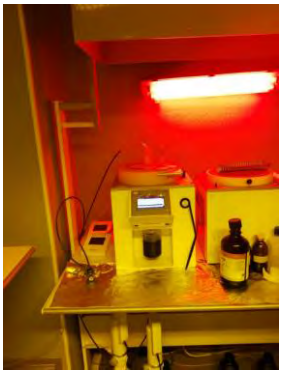


Fig. 7.9. Echipament Spinner Suss MicroTec

Plachetele se fixează pe „spinner" cu ajutorul vidului. După ce este aplicat pe substrat, filmul de fotorezist trebuie să fie chimic izotrop și să aibă o grosime uniformă astfel încât reacția sa la expunere şi la developare să fie uniformă. Filmul de LOR 10B trebuie să fie mai gros decât grosimea depunerii de metal, de obicei între 1,3 și 1,5 ori grosimea filmului metalic pentru a avea o prelucrare bună. Vitezele de centrifugare între 2500 și 4500 rpm generează o uniformitate maximă a stratului de acoperire. Se utilizează viteze mai mari pentru substraturi mai mici și viteze mai mici pentru substraturi mai mari. LOR 10B a fost depus alegând viteza de rotație de 3000 rpm și un timp de 30 - 40 s.

Numărul de rotaţii se alege în funcție de fotorezist şi de grosimea stratului care se dorește a fi depus. Combinația dintre viteza de centrifugare şi timpul selectat pentru această etapă va defini, în general, grosimea finală a filmului. A rezultat un strat cu grosimea de 1 μm.

Pentru solidificarea rășinii, realizată prin evaporarea completă a solventului conținut de aceasta, 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 ^{o}C pe plita Selecta Combiplac (Barcelona) [*28] (Fig. 7.10). Temperatura recomandată este între 140 - 190 ^{o}C. Apoi, fiecare plachetă a fost expusă la lumină ultravioletă (UV) timp de 50 s (Fig. 7.11). Radiațiile UV sunt utilizate pentru a modifica solubilitatea fotorezistului într-un solvent cunoscut. Fotorezиștii pozitivi

devin mai solubili la expunerea la lumină UV, iar cei negativi devin mai puțin solubili datorită unui proces de polimerizare.

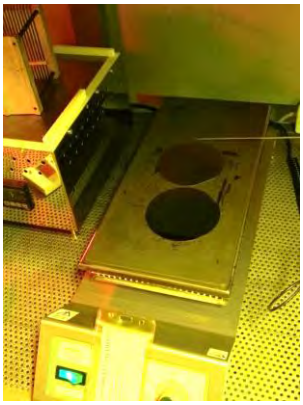


Fig. 7.10. Tratament termic pe plită



Fig. 7.11. Radiații emise de lampă UV

În continuare, s-a depus un al doilea strat de fotorezist pozitiv, numit HPR 504, prezentat în Fig 7.12 prin aceeași modalitate: etalare cu ajutorul spinner-ului Suss MicroTec [*27] la 3000 rpm și un timp de 30 - 40 s. Display-ul pentru setările spinner-ului este prezentat în Fig. 7.13 [M16].



Fig. 7.12. Fotorezistul HPR 504 aflat pe suprafața plachetei



Fig. 7.13. Display-ul pentru selectarea timpului și a vitezei de etalare pe echipamentul Suss MicroTec

După depunerea fotorezistului HPR 504, plachetele au fost așezate pe o plită termică pentru tratament timp de 1 min la 90 ^{o}C. Răşina durificată prin uscare poate rezista atacurilor chimice. Uscarea în cuptor este o altă metodă care poate fi folosită pentru durificarea fotorezistului.

- **Alinierea și expunerea**

Alinierea măştilor s-a realizat succesiv, în ordinea cronologică a etapelor fluxului tehnologic, cu ajutorul maşinii de aliniere care permite mişcarea substratului pe două direcţii: X -Y şi care permite rotaţii în planul X-Y. Maşina de aliniere permite

vizualizarea semnelor de aliniere de pe mască şi de pe substrat cu ajutorul a două obiective de microscop. Masca este fixă, iar operatorul poate mişca substratul până când se obţine alinierea corectă cu masca.

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.

Masca (fotoşablonul) se fixează în echipament în vid (Fig. 7.14. a, b.), iar sub mască se fixează placheta (Fig. 7.15. a, b). Ulterior s-a făcut alinierea [M16]. Echipamentul de aliniere și expunere are următoarele caracteristici:

– intervalul de aliniere: X: ± 10 mm; Y: ± 5 mm Θ: ± 5º;

– dimensiuni plachete: de la dimensiuni mici (4”, 5”) până la plachete cu diametru de 6"/150mm;

– masă de izolare a vibrațiilor (pentru Suss MA6);

– rezoluția mecanică a incrementului: 0,1 μm;

– obiective: 5x, 10x, 20x;

– alinierea laterală (Top side alignment -TSA) – utilizează un microscop optic cu "câmp divizat" de 0,5 μm;

– aliniere - spate plachetă: cu camere LCD de înaltă rezoluție: 0,1 μm;

– stocare imagini: sistem performant („Enhanced Image Storage System - EISS”);

– expunere: prin contact, vacuum, proximitate;

– UV 365 nm, 1000 W (Hg) [*9].

În ceea ce privește expunerea fotorezistului, dacă acesta se expune prea puțin, nu va fi destul de acid, iar după developare vor rămâne unele urme de fotorezist pe plachetă. La fel de bine pot exista probleme şi dacă timpul de expunere este prea mare, când difracţia şi „rezoluţia de focalizare” pot face zonele protejate să fie expuse. Aceste efecte sunt prezente tot timpul, dar la expunerile scurte, efectul este foarte mic.

După ce a fost realizată alinierea plachetei cu masca, a fost expus fotorezistul. Timpul de expunere este de 3,5 secunde. Astfel, a fost realizat transferul figurilor de pe mască pe plachetă (fotolitografia**)**.

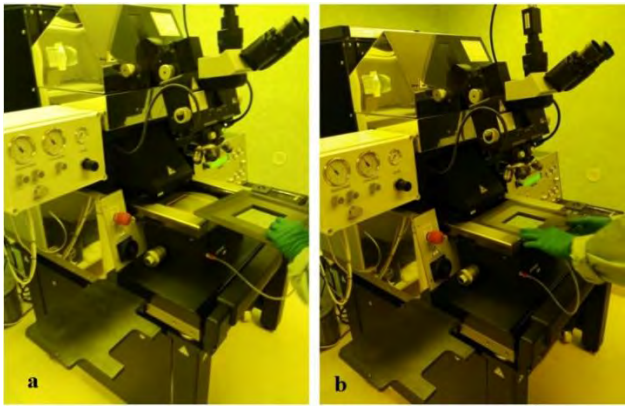


Fig. 7.14. a) orientarea și b) fixarea măștii în echipamentul MA6/BA6

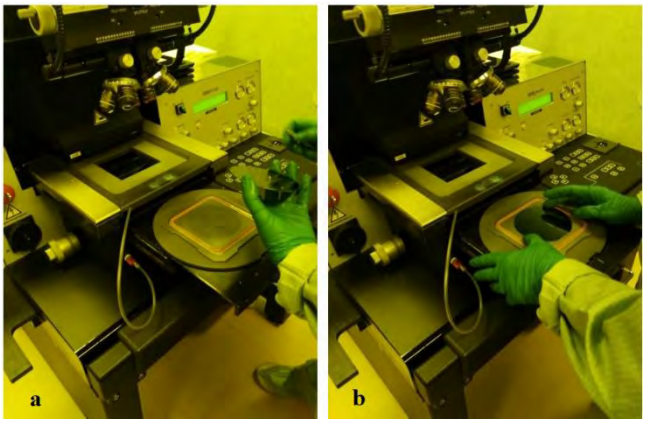


Fig. 7.15. a) orientarea și b) fixarea plachetei în echipamentul MA6/BA6

- **Developarea**

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].

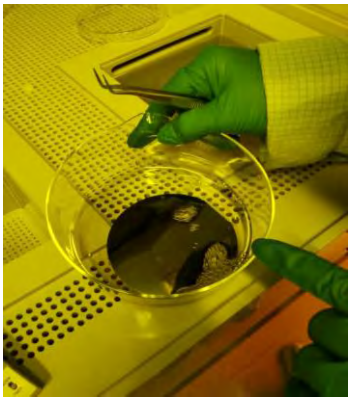


Fig. 7.16. Developarea plachetei în soluție HPRD 402



Fig. 7.17. Spălarea plachetei cu apă deionizată

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 MLW T30 (Fig. 7.18) [*9] pentru a îndepărta orice urmă de soluție sau de apă rămasă pe suprafața plachetei.

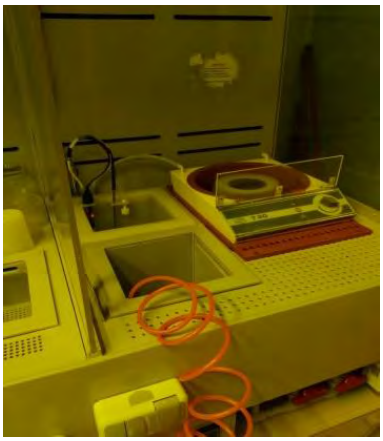


Fig. 7.18. Centrifuga MLW T30 folosită pentru uscarea plachetei

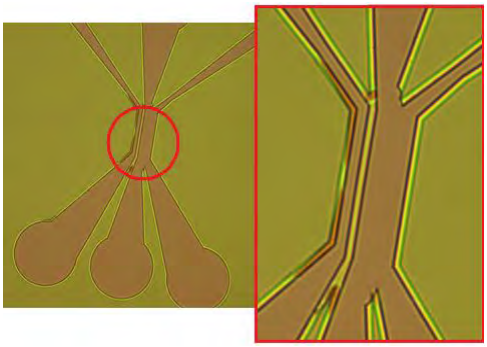
- **Inspecția intermediară**

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. Imaginile redate sunt mărite la scara x50.

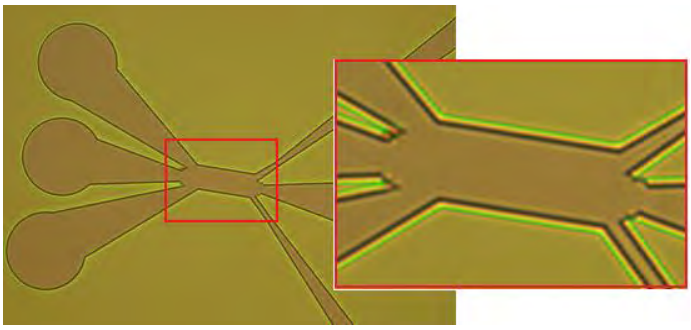
În Tabelul 7.2, se prezintă două exemple de neconformități, unde fotorezistul nu a fost îndepărtat complet din zonele geometrice dorite (spațiile dintre electrozi). Dacă acele zone nu rămân libere, nu se poate realiza metalizarea în etapa următoare a procesului tehnologic de fabricație.

În Tabelul 7.3, se pot vedea două exemple conforme, unde fotorezistul s-a îndepărtat complet, lăsând libere zonele de interes.

Tabelul.7.2. **Developări neconforme ale fotorezistului | observate în cadrul primei inspecții intermediare**

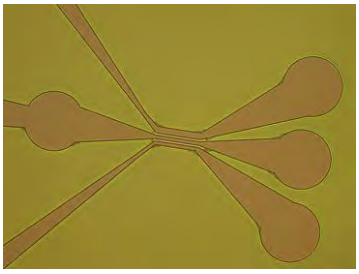
Developări neconforme: spațiile dintre electrozi nu au fost corodate suficient

Exemplul nr. 1 - developare neconformă a fotorezistului

Tabelul.7.2 (continuare)



Exemplul nr.2 – developare neconformă a fotorezistului

Tabelul 7.3. **Developări conforme ale fotorezistului observate în cadrul primei inspecții intermediare**

Developări conforme ale fotorezistului	
	
Exemplul nr. 1 – developare conformă a fotorezistului	Exemplul nr. 2 – developare conformă a fotorezistului

În cazul developărilor necorespunzătoare, unde fotorezistul a fost îndepărtat parțial, plachetele au fost din nou introduse câteva secunde în soluția de developare, pentru a îndepărta fotorezistul rămas pe plachetă. După ce s-a realizat cea de-a doua inspecție intermediară, s-a constat faptul că toate developările 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

Metalele folosite cu precădere datorită aderenței foarte bune la oxidul de siliciu sunt cromul și titanul.

Titanul este un metal dur, lucios, cu densitate mică și care prezintă o bună rezistență la coroziune. Are cel mai mare raport duritate-greutate dintre toate metalele.

În cadrul aplicațiilor medicale, în ceea ce privește implanturile în special, titanul este cel mai utilizat material. Acest lucru se datorează faptului că este un material bioinert, care are o excelentă rezistență la coroziune în organismul uman [C4].

În general, materialele utilizate în construcția electrozilor metalici sunt platina și aurul, folosind tehnica depunerii prin pulverizare catodică. Dat fiind faptul că platina este un material extrem de scump, a fost ales aurul.

Depunerea metalului a fost făcută imediat după ce a avut loc fotolitografia pentru a evita contaminarea. Stratul metalic depus trebuie să țină cont de două cerințe importante: trebuie să prezinte inerție din punct de vedere chimic la reactivii folosiți în condiții experimentale și trebuie să fie compatibil cu procesul de microfabricație. Microelectrozii folosiți pentru segmentul de numărare a celulelor au fost realizați din 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]. Limita cheie pentru grosimea stratului de metal depinde de procesul de lift-off. Depunerea aurului în strat mai gros determină încălzirea plachetei peste temperatura critică și transformă fotorezistul de sub aceasta, făcându-l insolubil în acetonă. Această structură de Ti-Au are o bună rezistență la coroziune [P6].

Echipamentul pe care se face depunerea în vid se numește Neva-EVD 500A (Neva, Japonia) (Fig. 7.19), utilizând fascicul de electroni pentru depuneri [*9]. Acesta este alcătuit din 3 părți: (1) pompa rotativă (se realizează vidul preliminar); (2) pompa de difuzie (realizează vidul înalt – valori mai mari de 10^{-4} Pa) și (3) incinta (camera de depunere, ce conține fasciculul de electroni și cele patru surse/creuzete cu metale). Astfel, se pot realiza patru depuneri succesive.



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

Se aplică un curent pe catodul termoemisiv ce emite un fascicul care bombardează creuzetul cu metal. Metalul se încălzește, se topește și se vaporizează, iar vaporii rezultați se depun pe plachetă. Metalele ce pot fi depuse cu ajutorul acestui echipament sunt: aluminiu (Al), aur (Au), titan (Ti), nichel (Ni), argint (Ag), platină (Pt), molibden (Mo), wolfram (W). Între incintă și camera de difuzie există o valvă plată care are deasupra ei o cameră de captură cu azot lichid pentru a reține impuritățile (ex.: uleiul care poate ajunge pe plachetă). Pentru depunere sunt necesari timpi mici, doar câteva minute. Pentru titan = 2 - 4 Å/s; pentru aur = 12-16 Å/s. Totodată, este necesar și un timp de preîncălzire a filamentului pentru fiecare depunere. Specificațiile echipamentului NEVA EDV 500A, prezentate în manualul de utilizare sunt [*9]:

- domeniul de măsurare a presiunii: cinci intervale de la 10 x 10^{-4} Pa la 1 x 10^{-8} Pa;
- comutarea domeniului de măsurare: automat;
- evacuarea gazului: două moduri, automat (maxim 10 min) și manual;
- curentul de emisie: 50 μA – 3 mA (este posibilă citirea directă a presiunii la 0,9 mA);
- puterea filamentului: 1,5 – 3,5 V; 1,0 – 1,8 A (max. 6.3W);
- potențialul filamentului: +45 V;
- puterea de descărcare: 6V, 7 A (40W);
- potențialul rețelei: + 180 V;
- potențialul de colectare a ionilor: + 5V la 1 x 10^{-3} Pa; 0V la mai puțin de 1 x 10^{-4} Pa;
- precizia indicației curentului ionic: ± 2,5% la scară plină;
- precizia indicației curentului de emisie: ± 2,0% la scară plină;
- protecția filamentului: circuitul filamentului este deschis automat când presiunea atinge maximul de 12 x 10^{-4} Torr;
- intrare: AC 100V, 50/60 Hz;
- dimensiunea exterioară și greutatea manometrului: 199 x 149 x 300 (vert. x lat. x depth), 6,5 kg.

7.2.5. Îndepărtarea fotorezistului prin lift-off pentru prima mască

În cazul fotolitografiei de tip lift-off, fotorezistul se etalează (se expune luminii prin mască fotolitografică și se developează înainte de depunerea materialului de paternare). Materialul care se modelează, se depune pe toată suprafața plachetei, atât în zonele developate, unde se ancorează de substrat, cât și peste fotorezistul nedevelopat. La îndepărtarea fotorezistului, se îndepărtează și materialul de pe regiunile nedevelopate, rămânând pe plachetă numai în zonele în care acesta s-a ancorat la substrat.

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 sa 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].

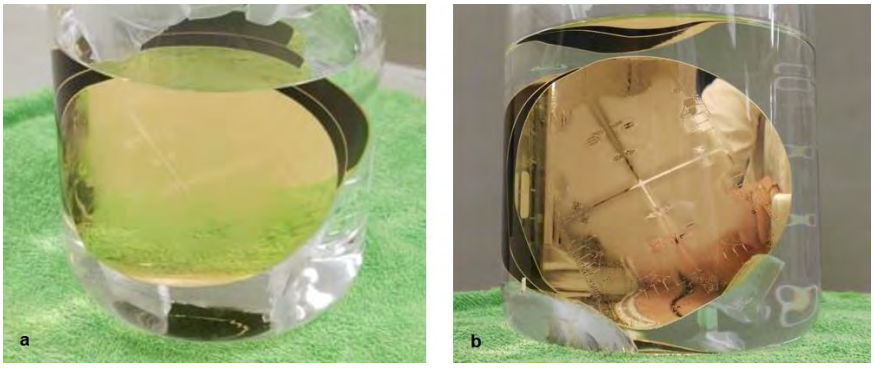


Fig. 7.20. a) Intoducerea plachetelor în soluție de acetonă pentru procesul de lift-off; b) activarea procesului de îndepărtare a stratului de aur

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]

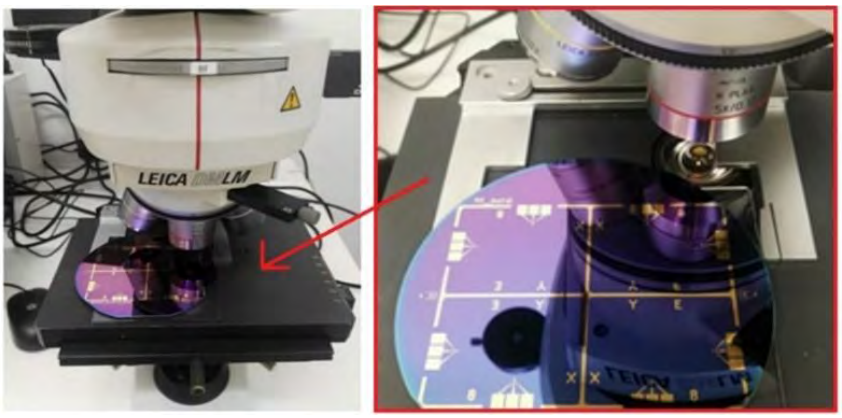


Fig. 7.21. Inspecția la microscop a plachetei după realizarea primei măști

În Fig. 7.22 - 7.23 se pot observa imaginile senzorilor de intrare și a senzorilor de ieșire ai unui dispozitiv.

În urma analizării imaginilor obținute, se constată faptul că toate depunerile stratului de Ti-Au au fost conforme.

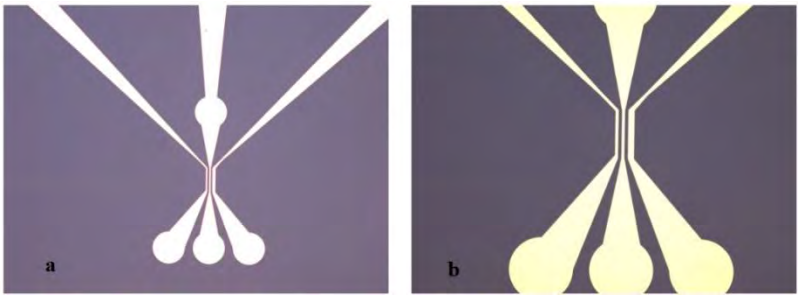


Fig. 7.22. Senzorul de măsurare a intrărilor examinat la microscopul Leica DM LM la dimensiune :
a) x5 și b) x10

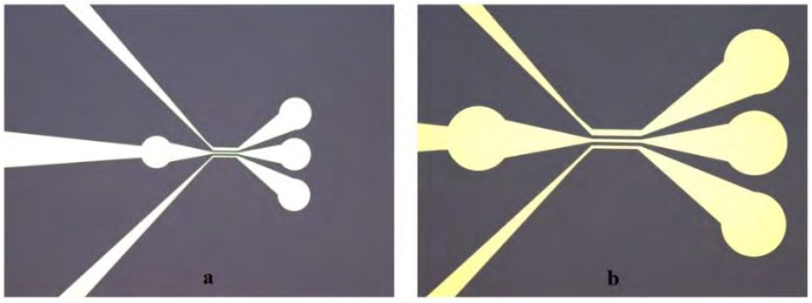


Fig. 7.23. Senzorul de măsurare a ieșirilor examinat l a microscopul Leica DM LM văzut la dimensiune :
a) x5 și b) x10

7.2.6. Procesul de fotolitografie pentru a doua mască

Depunerea fotorezistului pentru a doua mască s-a realizat folosind aceleași două tipuri de fotorezişti 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]. Pașii ce trebuie urmați pentru realizarea acestei etape sunt similari cu cei de la Masca M1. După efectuarea Lift off-ului de Au/Cr a fost etalat imediat fotorezistul pozitiv LOR 10B (3000 rotații/min; timp: 30 - 40 secunde), urmat de un tratament termic pe plită (T = 150 ^{o}C; timp: 3 minute). S-a realizat o expunere la radiații UV (timp: 50 secunde), pentru a putea etala fotorezistul pozitiv HPR 504 (3000 rot/min; timp: 30 - 40 secunde). Odată efectuată această etalare, a urmat încă un tratament termic pe plită (T = 95 ^{o}C; timp: 30 min).

Alinierea și expunerea celei de a doua măști – Masca M2 – au fost efectuate folosind același echipament MA6/BA. Alinierea s-a realizat cu ajutorul semnelor de aliniere inscripționate pe mască, iar expunerea a fost una scurtă, ce a durat numai 3 s.

Developarea de 30 de secunde s-a realizat utilizând aceeași soluție de developare folosită ca și în cazul primei măști: acetona împreună cu substanța HPRD 402. În aceste condiții, placheta a fost pregătită pentru următoarea etapă a procesului tehnologic de fabricație a dispozitivului micro-electro-mecanic, și anume, depunerea stratului de argint.

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].

Pentru construcția electrodului de referință al senzorului electrochimic, selecția s-a realizat din categoria metalelor pure – prețioase, care se folosesc pentru astfel de depuneri: argint, aur, platină. Dintre acestea, a fost ales argintul (Ag). Principalul motiv este dat de faptul că argintul este un foarte bun conducător de electricitate. Mai mult, argintul este cel mai maleabil metal și are cea mai mare conductibilitate electrică și termică.

Datorită faptului că argintul are acțiune antimicrobiană, acesta se poate încorpora în diferite produse și echipamente folosite pentru protecție antibacteriană. Prezenţa argintului este de ajuns pentru a ucide microorganismele care provoacă boli infecţioase, **împiedicând înmulţirea bacteriilor și a virusurilor,** deoarece acesta funcţionează ca un catalizator.

Argintul nu prezintă toxicitate. La contactul dintre argint si celulele ce vor fi numărate, nu are loc nici un efect nedorit, argintul acționând doar în cazul infecțiilor, a celulelor bolnave [Z6].

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 acetonă 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.

Inspecția intermediară a constat în verificarea depunerilor cu ajutorul microscopului optic Leica DM LM.

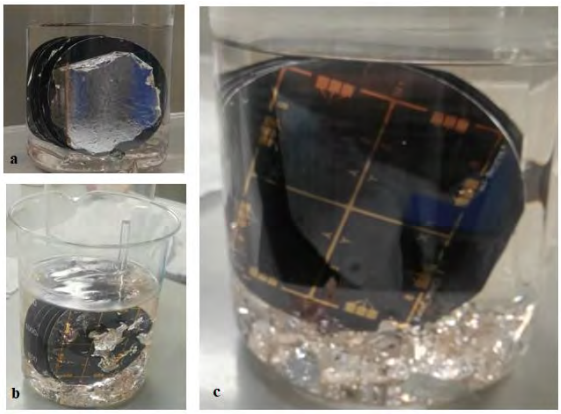


Fig. 7.24. Îndepărtarea prin lift-off a argintului :
a) desprinderea argintului începe din margini; b) desprinderea centrală a argintului;
c) deprinderea totală a argintului

Aceasta s-a făcut individual, pentru fiecare plachetă. Fiecare plachetă cuprinde câte patru dispozitive, după cum se poate observa în Fig. 7.25, unde fiecare dispozitiv a primit un număr de ordine.

Fiecare dispozitiv are la rândul său câte doi senzori care trebuiesc verificați: un senzor de măsurare a intrărilor și un senzor de măsurare a ieșirilor.

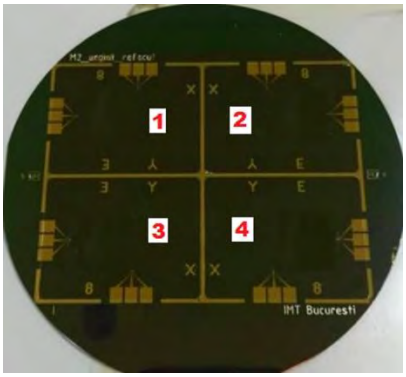
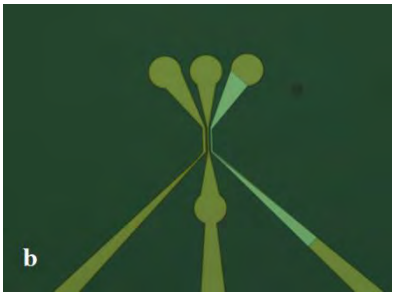
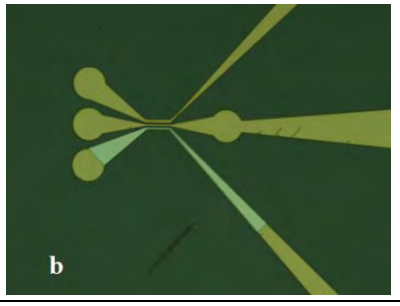
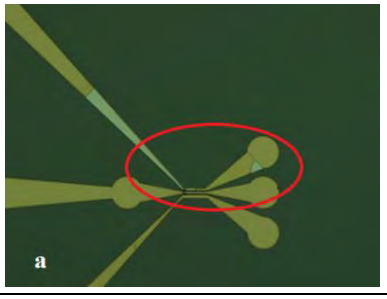
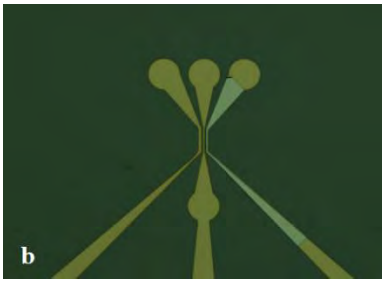
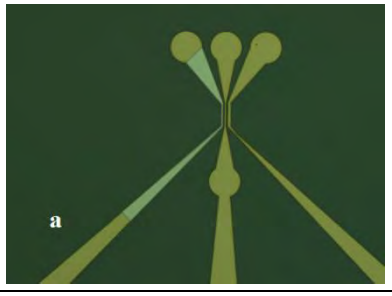
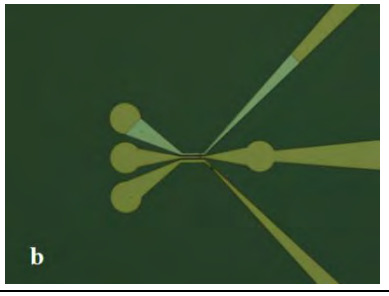


Fig. 7.25. Dispunerea celor patru dispozitive microfluidice
pe o plachetă

În figurile din Tabelele 7.4 - 7.8 sunt redate imagini la dimensiuni mărite (x5) ale depunerilor pentru fiecare dispozitiv în parte.

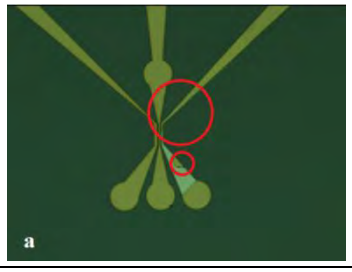
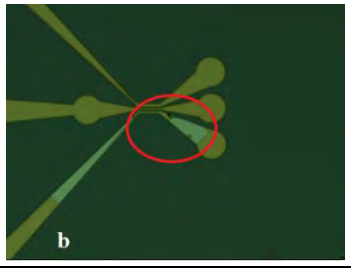
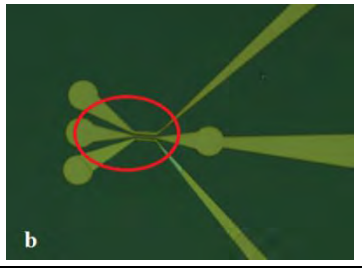
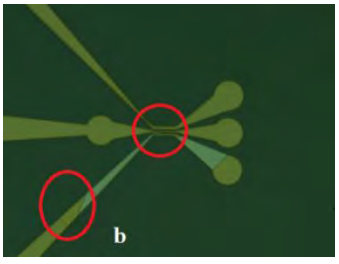
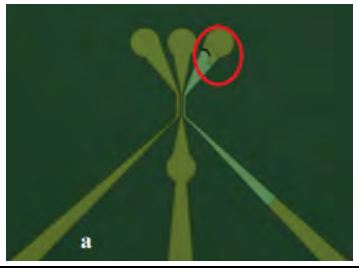
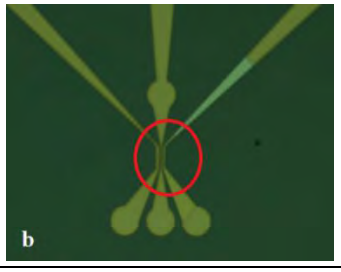
În urma verificărilor la microscop, s-a constatat că: **placheta numărul 1** a avut trei dispozitive funcționale conforme din cele patru: dispozitivul 1, 2 și 4. Imaginile acestora sunt prezentate în Tabelul 7.4.

Tabelul 7.4. **Cei șase senzori ai plachetei 1**

	
Dispozitivul microfluidic 1. a) senzorul de intrare căruia îi lipsește o bucată din argint, dar senzorul poate fi folosit; b) senzorul de ieșire conform	
	
Dispozitivul microfluidic 2. a) senzorul de intrare conform și b) senzorul de ieșire conform	
	
Dispozitivul microfluidic 3. a) senzorul de intrare neconform; b) senzorul de ieșire este conform	
	
Dispozitivul microfluidic 4. a) senzorul de intrare conform; b) senzorul de ieșire conform	

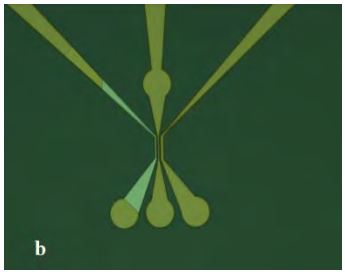
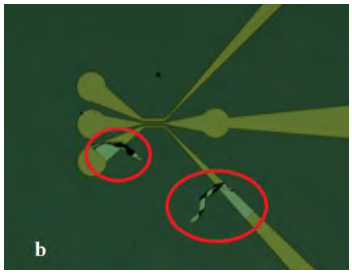
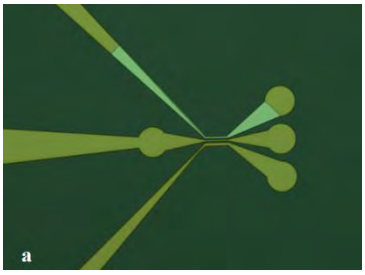
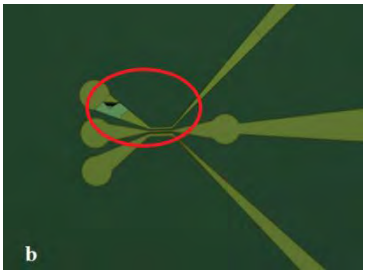
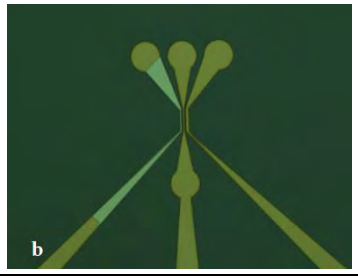
Placheta numărul 2 nu are nici un dispozitiv funcțional, argintul s-a desprins de pe toți electrozii, cu excepția senzorului de intrare al dispozitivului microfluidic 4, care a avut doar o bucată de argint desprinsă. În Tabelul 7.5, se prezintă neconformitățile identificate la placheta numărul 2.

Tabelul 7.5. **Cei șase senzori ai plachetei 2**

	
Dispozitivul microfluidic 1: a) senzorul de intrare neconform; b) senzorul de ieșire neconform	
	
Dispozitivul microfluidic 2: a) senzorul de intrare neconform; b)senzorul de ieșire neconform	
	
Dispozitivul microfluidic 3: a) senzorul de intrare neconform; b) senzorul de ieșire neconform	
	
Dispozitivul microfluidic 4: a) senzorul de intrare conform; b) senzorul de ieșire neconform	

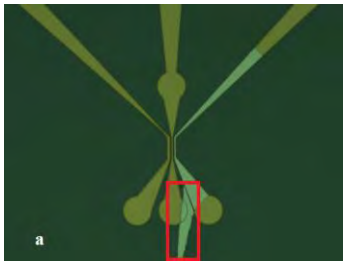
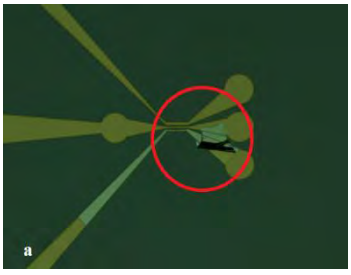
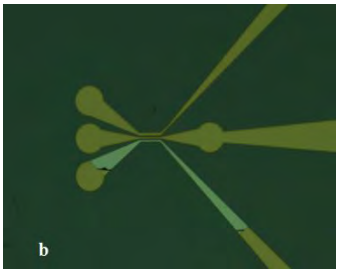
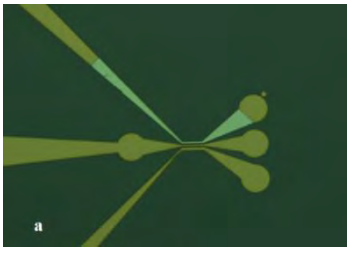
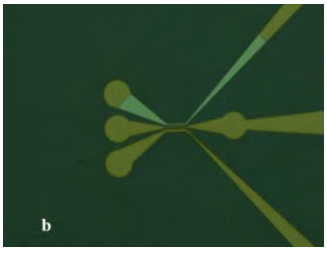
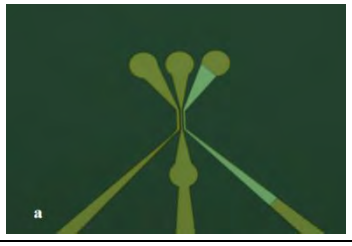
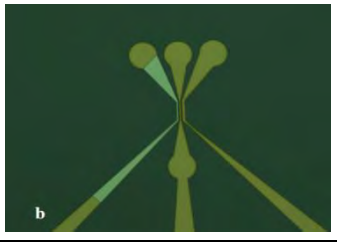
Placheta numărul 3 are două dispozitive funcționale (1 și 4) și două dispozitive în care câte unui senzor i s-a desprins argintul. Senzorii sunt prezentați în figurile din Tabelul 7.6.

Tabelul 7.6. **Cei șase senzori ai plachetei 3**

	
Dispozitivul microfluidic 1: a) senzorul de intrare conform; b) senzorul de ieșire conform	
	
Dispozitivul microfluidic 2: a) senzorul de intrare conform; b) senzorul de ieșire neconform	
	
Dispozitivul microfluidic 3: a) senzorul de intrare conform; b) senzorul de ieșire neconform	
	
Dispozitivul microfluidic 4: a) senzorul de intrare conform; b) senzorul de ieșire conform	

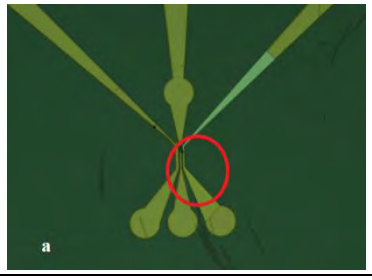
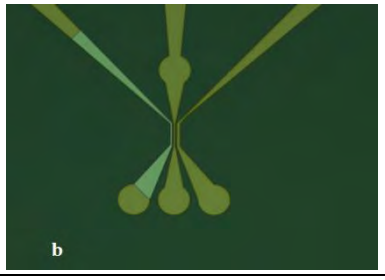
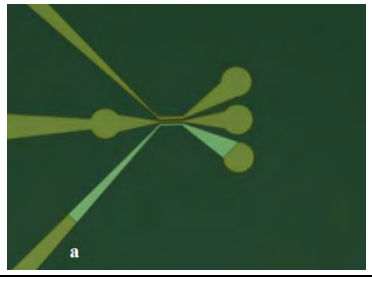
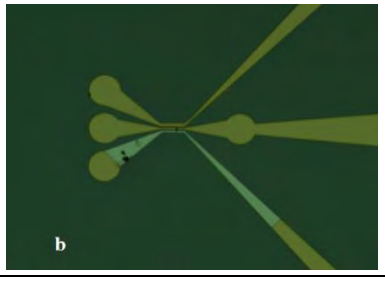
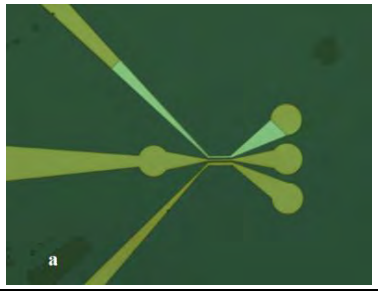
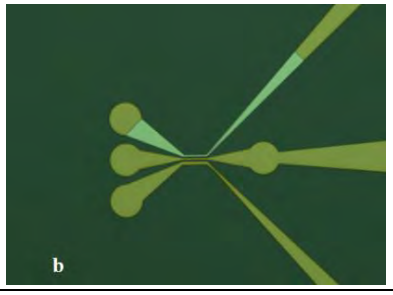
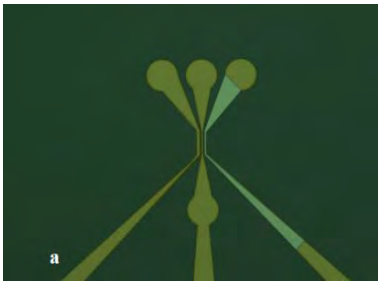
Placheta numărul 4 are trei dispozitive funcționale din cele patru: 1, 3 și 4. Imaginile senzorilor sunt prezentate în Tabelul 7.7. Pe suprafața primului senzor se observă un strat de argint desprins de pe suprafața unui alt electrod. Pentru a folosi acest senzor, s-a îndepărtat acel surplus de argint, înlăturându-se neconformitatea.

Tabelul 7.7. **Cei șase senzori ai plachetei 4**

	
Dispozitivul mirocfluidic 1: a) senzorul de intrare neconform; b) senzorul de ieșire conform	
	
Dispozitivul microfluidic 2: a) senzorul de intrare neconform; b) senzorul de ieșire conform	
	
Dispozitivul microfluidic 3: a) senzorul de intrare conform; b) senzorul de ieșire conform	
	
Dispozitivul microfluidic 4: a) senzorul de intrare conform; b) senzorul de ieșire conform	

Placheta numărul 5 are trei dispozitive funcționale din cele patru: doi, trei și patru, după cum se poate vedea în Tabelul 7.8.

Tabelul 7.8. **Cei șase senzori ai plachetei 5**

	
Dispozitivul microfluidic 1: a) senzorul de intrare neconform; b) senzorul de ieșire conform	
	
Dispozitivul microfluidic 2: a) senzorul de intrare conform; b) senzorul de ieșire conform	
	
Dispozitivul microfluidic 3: a) senzorul de intrare conform; b) senzorul de ieșire conform	
	
Dispozitivul microfluidic 4: a) senzorul de intrare conform; b) senzorul de ieșire conform	

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. **Senzorii 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**
Dispozitive funcționale	**3**		**0**		**2**		**3**		**3**	
Total dispozitive funcționale	**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 schimbate dimensiunile electrozilor de referință și s-au efectuat depunerile la un nivel controlat de umiditate din cameră.

În ceea ce privește placheta numărul 2, argintul aflat pe suprafața acesteia trebuie îndepărtat și apoi reluat întregul proces. În concluzie, pentru parcurgerea etapelor următoare vor fi folosite doar patru plachete.

- **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 $FeCl_3$.

$$Ag + FeCl_3 \rightarrow AgCl + FeCl_2 \quad (7.3.)$$

După galvanizarea Ag, placheta a fost imersată în soluție apoasă 1% de clorură ferică pentru 20 de minute. În timpul procesului de clorurare, culoarea s-a transformat din alb în gri închis.

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]. SU-8 este un fotorezist negativ utilizat frecvent, datorită proprietăților sale, a sensibilității excelente, precum și a aspectului său. Denumirea sa derivă din prezența a opt grupări epoxi. SU-8 este stabil din punct de vedere termic și mecanic. Conținutul ridicat de epoxi dă o adeziune puternică a fotorezistului SU-8 la multe tipuri de substraturi și face ca materialul să fie foarte sensibil la expunerea la radiații UV. Principalele sale aplicații se găsesc în domeniul MEMS și în alte microsisteme, cu deosebire la dispozitivele microfluidice. În ultimii ani, SU-8 a înregistrat o gamă largă de utillizări. Dintre acestea, se menționează: microoptică, microprelucrări, ambalare și alte aplicații analitice microfluidice. A oferit perfomanațe ridicate la fabricarea microcanalelor dispozitivelor microfluidice și a dispozitivelor de tipul „lab-on-a-chip".

Transparența fotorezistului SU-8 la lumină vizibilă îl face compatibil cu detectarea optică și, astfel, ajută la identificarea biomoleculelor. Prezintă o bună biocompatibilitate oferind posibilitatea de a dezvolta teste pe suprafață care permit îndoirea specifică a biomoleculelor pentru aplicații analitice.

SU-8 este utilizat pe scară largă pentru a pregăti matrițele pentru reproducerea canalelor microfluidice în PDMS (polidimetilsiloxan), dar este de asemenea, utilizat direct pentru fabricarea canalelor microfluidice. Din punct de vedere microfluidic, este foarte dorit datorită aderenței puternice la substrat și a inerției chimice. În prezent, SU-8 este disponibil sub diferite forme care permit acoperirea straturilor groase (acoperă grosimi de la 1 la 600 μm) printr-o singură depunere. Fotosensibilitatea acestuia permite modelarea prin fotolitografie cu raze ultraviolete (UV). Fotorezistul SU-8 se depune parcurgând etapele prezentate în Fig. 7.26 [M23], [P7].

După procesul anterior de lift-off al argintului, plachetele s-au deshidratat în etuvă la 100 ^oC 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.

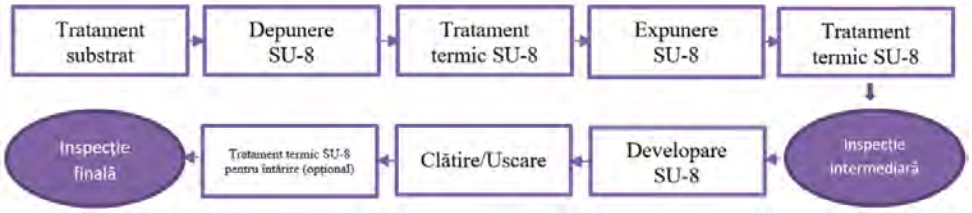


Fig. 7.26. Etapele procesului tehnologic de modelare a circuitelor microfluidice folosind fotorezistul SU-8

După depunerea fotorezistului SU-8, plachetele au fost așezate pe plită pentru tratament termic la temperatura de 65 ºC timp de 3 min și 6 minute la temperatura de 45 ºC [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 ºC / 7 min la 45 ºC). După tratamentul termic, s-a realizat developarea (Fig. 7.27), 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.

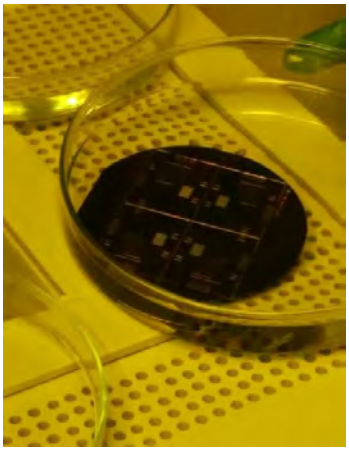


Fig. 7.27. Developarea în acetonă și HPRD 402

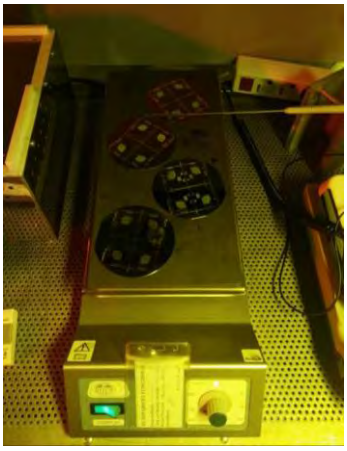


Fig. 7.28. Tratamentul termic final al plachetei pe plită

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 – 7.32 sunt redate imagini ce conțin neconformități.



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

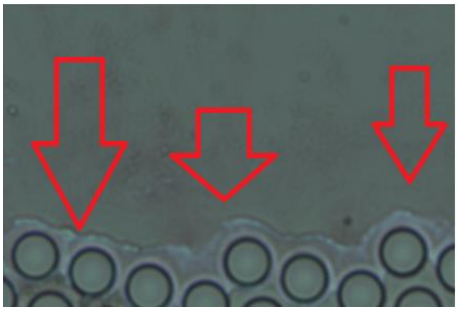


Fig.7.30. Imagine realizată la mărimea x20 a pilonilor unde fotorezistul SU-8 nu a avut aderență

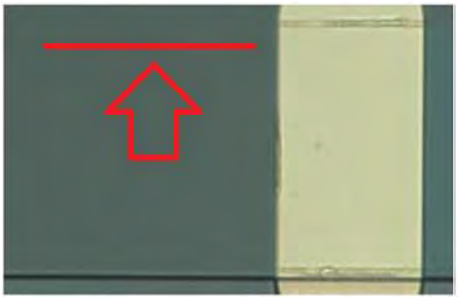


Fig. 7.31. Imagine realizată la mărimea x100 a microcanalului neconform din dreptul senzorilor

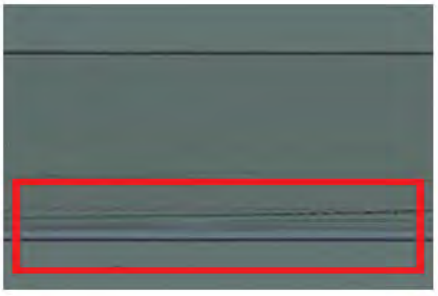


Fig. 7.32. Imagine realizată la mărimea x100 a microcanalului neconform

În urma inspecției, 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.

Pentru a finaliza procesul de fotolitografie a celei de-a treia măști, s-a efectuat un tratament termic final pe plită la 180 ºC timp de 30 de min (Fig. 7.28).

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].

Deoarece aceste componente ale dispozitivului nu pot fi observate cu ochiul liber, după tratamentul termic final, pentru inspecția intermediară, s-a folosit microscopul optic Leica DM LM (Leica Microsystems, Germania) [*9], [*29] (Fig. 7.33).

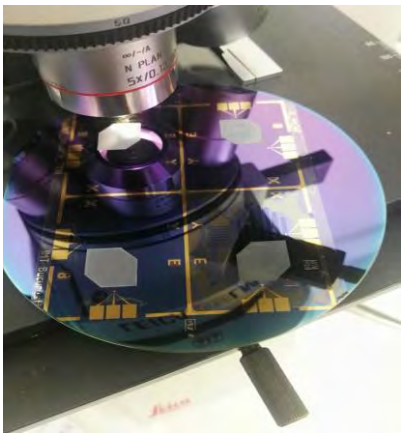
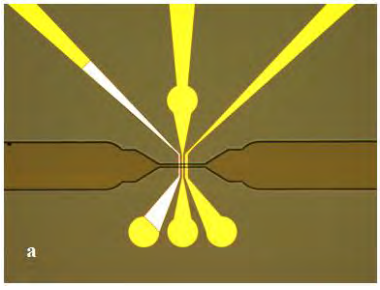
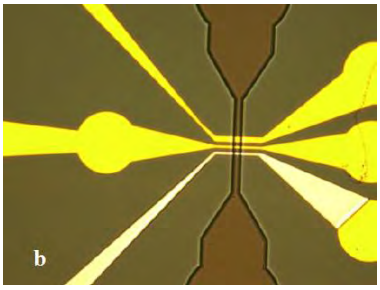
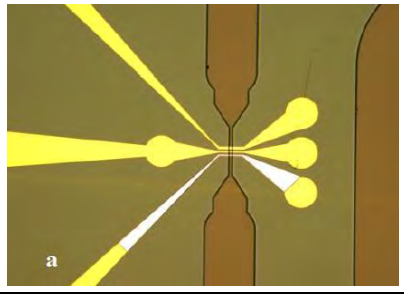
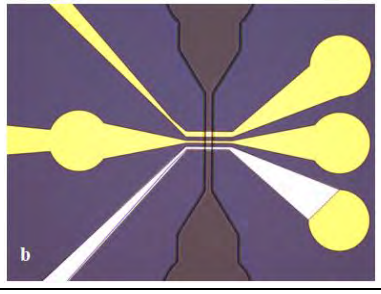


Fig. 7.33. Inspecția finală după realizarea celor trei măști

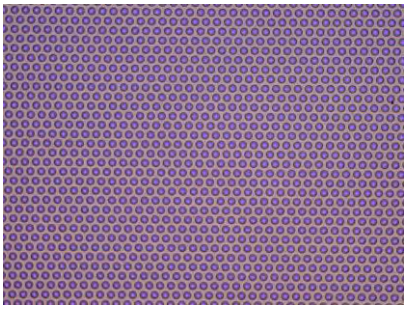
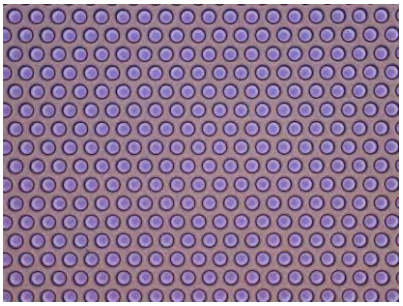
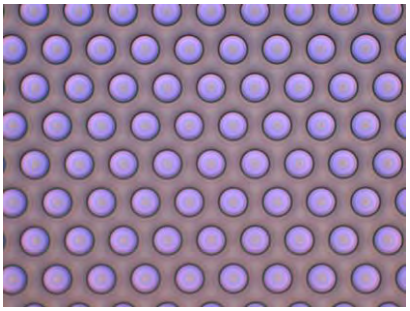
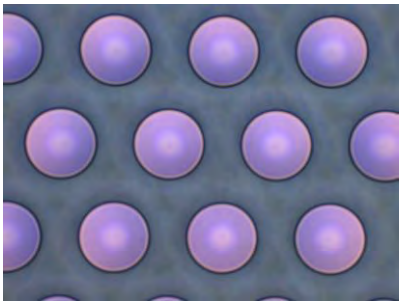
S-a verificat atât microcanalul din dreptul senzorilor, cât și pilonii din camera de selecție și captură. În Tabelul 7.10 sunt prezentate imagini ale microcanalului, realizate cu microscopul optic Leica DM LM (Leica Microsystems, Germania) [*9], [*29], la scări de mărire de x5 și x10.

Tabelul 7.10. **Imagini ale microcanalului realizate la microscopul optic Leica DM LM**

 a	 b
Canalul din dreptul senzorilor de măsurare a intrărilor la scara de mărire : a) 5x și b) 10x	
 a	 b
Canalul din dreptul senzorilor de măsurare a ieșirilor la scara de mărire : a) 5x și b) 10x	

În Tabelul 7.11, sunt redate imagini ale pilonilor aflați în camera de selecție și captură care au fost realizate la diferite măriri.

Tabelul 7.11. **Imagini ale pilonilor din camera de selecție și captură văzuți la diferite măriri**

5x0.12 	10x 
20x 	50x 

În urma inspecției intermediare, s-a constatat faptul că toate cele trei plachete cu care s-a continuat procesul fotolitografic au avut dispozitive conforme.

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].

Dimensiunile maxime ale unei piese ce poate fi prelucrată pe acest echipament sunt de 6 inch. Viteza de tăiere este de 0.1-500 mm/s, unghiul maxim de rotație este de 320^{o}, iar precizia este de 1 μm pe axa Y.

Echipamentul are regimul de lucru atât manual, cât și automat. Acesta realizează tăierea în mode automat, după indicarea și fixarea manuală a punctului din care să înceapă operația de lucru.

Placheta a fost fixată pe un suport cu formă circulară cu ajutorul unei folii adezive transparente (Fig. 7.34).

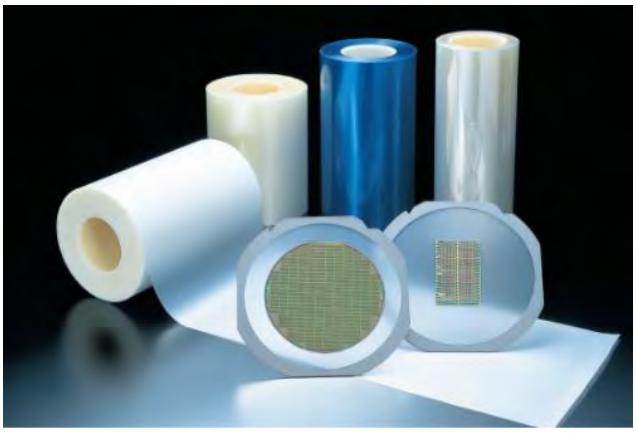


Fig. 7.34. Folie specială Denka [*22]

După ce placheta a fost fixată pe suport (Fig. 7.35.a), acesta a fost introdus în echipamentul DAD 322 (Fig. 7.35.b.).

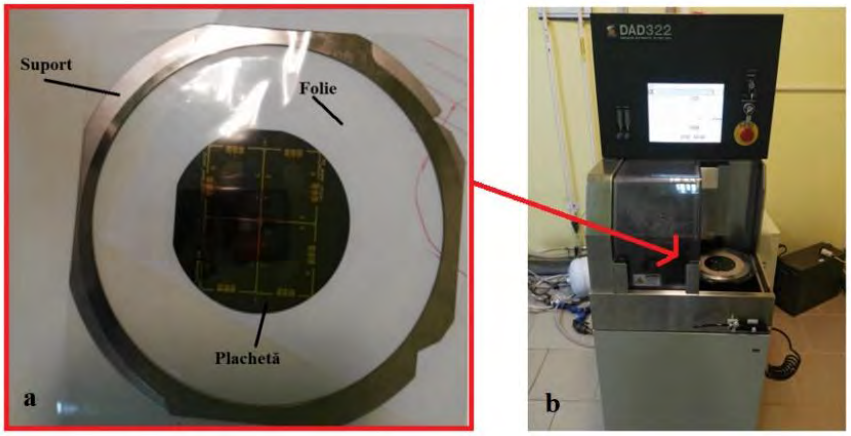


Fig. 7.35. a) fixarea plachetei în suport și b) introducerea suportului în echipamentul DAD 322

După fixarea suportului în echipament, s-au selectat datele necesare (Fig. 7.36) pentru cele șase tăieri care vor fi făcute pentru a obține patru dispozitive microfluidice pe fiecare plachetă. Fig. 7.37 redă o imagine a plachetei înainte de tăiere.

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].



Fig. 7.36. Parametrii de lucru ai echipamentului de tăiere DAD 322

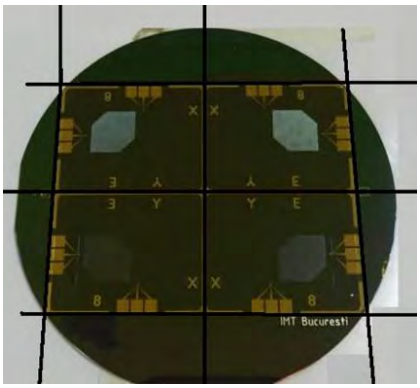


Fig. 7.37. Indicarea schematică pe plachetă a celor șase linii de tăiere

Deoarece în cuptor nu se introduc probe umede, iar la finalul efectuării celor șase tăieri ale plachetei, a rămas apă pe suprafața suportului (Fig. 7.38), aceasta a fost uscată cu azot.

Echipamentul CL-1000 UV (Fig. 7.39) are lungimea de undă de 365 nm. Înainte de utilizare, se așteaptă încălzirea lămpilor aproximativ 2 minute. Fluxul luminii UV are o trecere verticală, de la lampă direct pe suprafața plachetei.

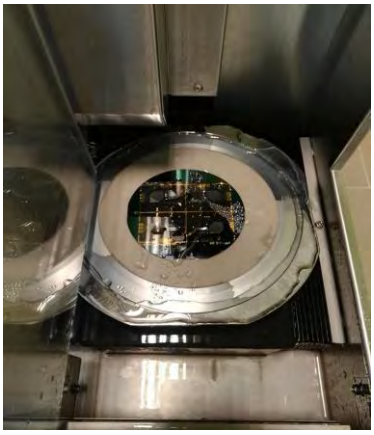


Fig. 7.38. Încheierea procesului de tăiere

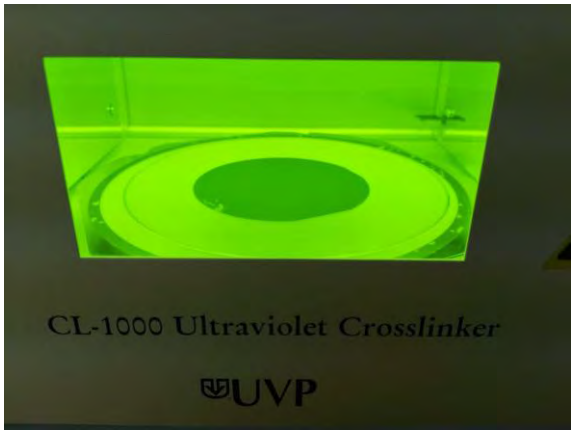


Fig. 7.39. Echipamentul UV- model CL-1000 Ultraviolet Crosslinker

Fig. 7.40 redă o imagine a unei plachete după conturul care delimitează cele patru dispozitive microfluidice.

Din acest moment, dispozitivele au fost folosite individual pentru etapa următoare.

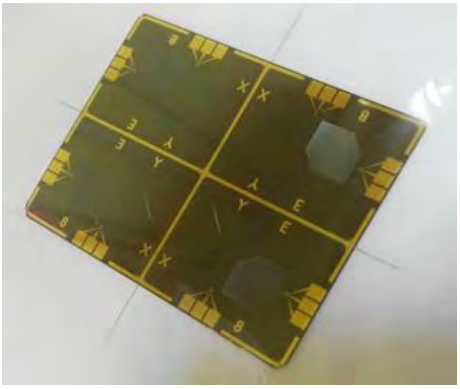


Fig. 7.40. Imaginea unei plachete după tăiere

7.2.10. Depunerea capacului de polidimetilsiloxan

Dispozitivul a fost încapsulat cu un strat de polidimetilsiloxan (PDMS), fără a se acoperi contactele electrice. Polidimetilsiloxan (PDMS) mai este numit și dimeticon. Acesta reprezintă un polimer - elastomer mineral-organic din familia siloxanului.

PDMS este utilizat pe scară largă pentru fabricarea și prototiparea dispozitivelor micro-electro-mecanice. Datorită transparenței și permeabilității sale la oxigen, a devenit un material potrivit pentru cultura celulară. Transparența PDMS-ului este dată de grosimea stratului [M16].

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 (≈ 5mm), s-au amestecat concentrații de 20 ml - 2 ml soluție.

Soluția folosită pentru demulare (demulatorul) este compusă din: chlortrimethylsilas 97% (GC), chlorotrimethylsilane 97% și clorotrimethylsilano 97%. Întreg procesul se numește silanizare.

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).



Fig. 7.41. Procesul de silanizare



Fig. 7.42. Turnarea PDMS-ului în suport



Fig. 7.43. Obținerea stratului uniform de PDMS

După încapsularea dispozitivului microfluidic cu PDMS, s-a realizat un tratament termic la 90 ^{o}C pentru întărirea acestuia. Temperatura de polimerizare este de circa 84 °C.

După tratamentul termic, s-au realizat găurile pentru nanoporturi, prin care a fost introdusă fiecare soluție pentru analiză.

Majoritatea polimerilor folosiți în realizarea dispozitivelor microfluidice (PDMS, PMMA etc.) sunt de natură hidrofobă, dar acest grad de hidrofobicitate poate să nu fie suficient pentru aplicațiile microfluidice. De aceea, suprafața polimerilor se modifică cu ajutorul plasmei [A14]. În cazul de față, 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. 7.44). Plasma este generată de o sursă de radio frecvență cuplată capacitiv și care are o putere maximă de 600 W. Cu ajutorul pompei turbomoleculare, efectuarea proceselor poate avea loc la presiuni cu valori de la 75 mTorr până la 225 mTorr [*17].

Acest echipament a fost folosit pentru a efectua un tratament de funcţionalizare a suprafeţelor în plasmă (20 Pa, 90 ^{o}C), cu scopul de a modifica unghiul de contact al PDMS-ului cu substratul. PDMS-ul a fost introdus în echipamentul de plasmă și a fost supus unui tratament de funcționalizare a suprafeței timp de câteva secunde [A13].

Apoi s-au adus în contact capacul din PDMS și dispozitivul microfluidic (Fig. 7.45) pentru lipire.

S-a efectuat o inspecție a pilonilor din camera de selecție și captură cu ajutorul unui microscop cu scanare electronică, Nova NanoSEM 630, fabricat de FEI Company, SUA, din dotarea IMT București (Fig. 7.46) [*17]. Acesta este un echipament cu emisie în câmp, de înaltă rezoluție. Vizualizarea în vid se realizează la 15 kV pentru 1 nm și 3 kV pentru 1,8 nm. Presiunea de lucru în camera probei este ; 10^{-4} Pa. Înclinarea maximă a mesei este de -10^{o}, +60^{o}.



Fig. 7.44. Echipamentul Etchlab 200 [*17]



Fig. 7.45. Atașarea capacului de PDMS

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 căruia nu i s-a atașat capac de PDMS.



Fig. 7.46. Echipament Nova NanoSEM 630

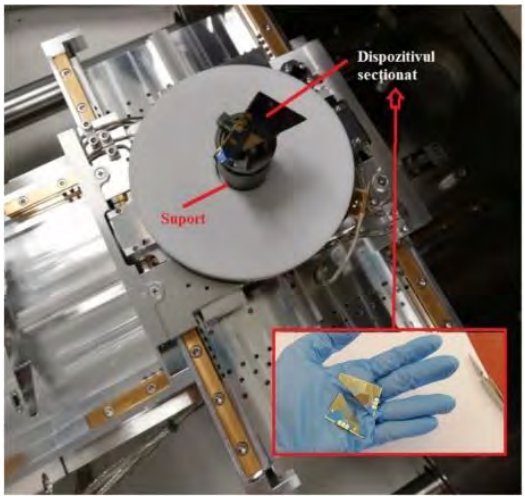


Fig. 7.47. Poziționarea pe suport a probei Y

În Fig. 7.48 - 7.50 sunt redate trei imagini la diferite dimensiuni de referință (500 µm, 200 µm și 50 µm) ale pilonilor din camera de selecție și captură.

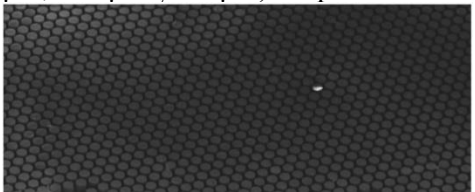


Fig. 7.48. Imagine SEM obținută la dimensiunea de referință 500 µm

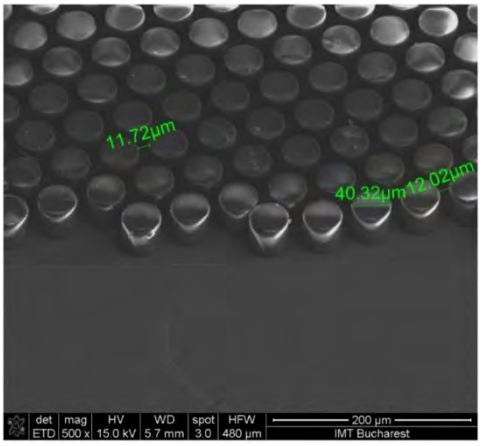


Fig. 7.49. Imagine SEM obținută la dimensiunea de referință 200 µm

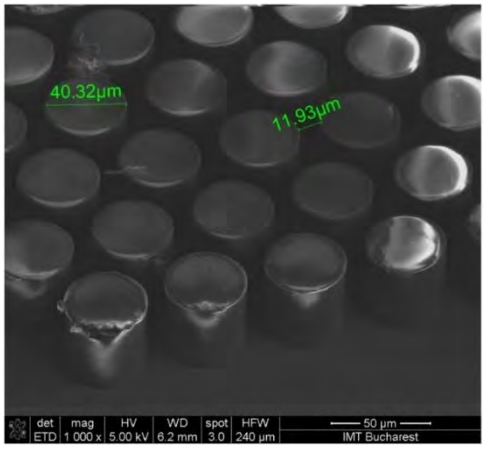


Fig. 7.50. Imagine SEM obținută la dimensiunea de eferință 50 µm

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).

8.

TESTAREA DISPOZITIVULUI, MODEL EXPERIMENTAL

Microfluidica și electrochimia sunt într-o relație sinergică. Microfluidica permite reducerea dimensiunii dispozitivelor, iar sistemul de detecție și transmitere a semnalelor are la bază electrochimia. Microfluidica integrează mai multe etape analitice, precum: sistemul de detecție, sistemul de prelucrare a semnalelor și de transmitere a acestora la distanță.

Sistemele electrochimice sunt mai puțin sensibile comparativ cu citometria în flux, fluorescența sau spectroscopia de masă, care folosesc echipamente analitice convenționale, dar acestea necesită echipamente deosebit de scumpe și personal calificat special pentru manipularea acestor echipamente. Dispozitivele microfluidice cu senzori electrochimici integrați sunt ușor de miniaturizat, fără a pierde performanța analitică.

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.

Pentru realizarea unui dispozitiv microfluidic trebuiesc 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).

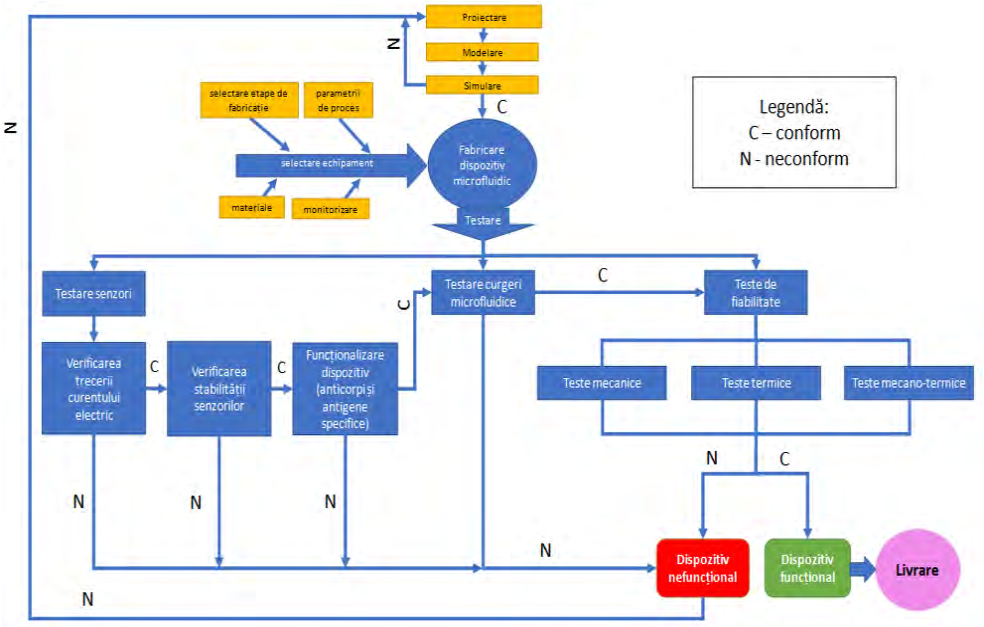


Fig. 8.1. Etapele metodologiei de testare a unui dispozitiv microfluidic

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.

Testarea dispozitivului micro-electro mecanic, s-a realizat cu ajutorul spectroscopiei de impedanță electrochimică (EIS). Aceasta este o tehnică de caracterizare extrem de sensibilă utilizată pentru a determina răspunsul electric, în curent alternativ, al reacțiilor chimice sau biochimice într-o gamă de frecvențe (între 0,1 Hz ÷ 1 MHz în cazul EIS din IMT).

Măsurătorile cantitative realizate cu EIS permit evaluarea mecanismelor chimice la interfața electrodului cu electrolitul și în soluția electrolitică. EIS reprezintă tehnica electrochimică care urmărește schimbările apărute în transferul sarcinilor electrice între electrolit și electrod, al transferului de masă în electrolit, capacitatea stratului dublu electric sau reacția de biorecunoaștere de la suprafața biosenzorului.

Senzorul electrochimic este compus din trei electrozi: electrodul de lucru, electrodul de numărare (counter electrod) și electrodul de referință. Cei trei electrozi se conectează la un potențiostat, care aplică un potențial electrodului de lucru și măsoară variația în frecvență a curentului electric, a impedanței și a diferenței de fază

între curent și tensiune. Impedanța sistemului este determinată prin aplicarea unei tensiuni perturbatoare de amplitudine mică și are ca răspuns variația curentului electric și detecția impedanței.

Celulele care trec prin canalul microfluidic sunt considerate particule dielectrice care se polarizează la aplicarea unui câmp electric, formând dipoli electrici.

La frecvențe mici ale câmpului, dipolii electrici reușesc să urmărească schimbarea polarității curentului electric, iar liniile de câmp vor trece pe lângă celule, dând informații despre structura membranei celulare.

La frecvențe mari, dipolii electrici nu mai reușesc să urmărească schimbarea polarității curentului, iar liniile de câmp electric vor trece prin interiorul celulei, dând informații despre citoplasmă.

Înălțimea vârfurilor (spike-urilor) de curent dau informații despre dimensiunea particulelor, iar lățimea lor despre viteza de deplasare a acestora. Cu cât celula prezintă o dimensiune mai mare, cu atât este mai mare înălțimea spike-ului, iar lățimea este invers proporțională cu viteza de deplasare a celulei. La frecvențe mici ale câmpului electric (~300 kHz), sunt redate informații despre natura/structura membranei celulare. La frecvențe mari (peste ~1 MHz), liniile de câmp electric trec prin interiorul celulei și dau informații despre interiorul acesteia, despre citoplasmă [B17], [B18].

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.

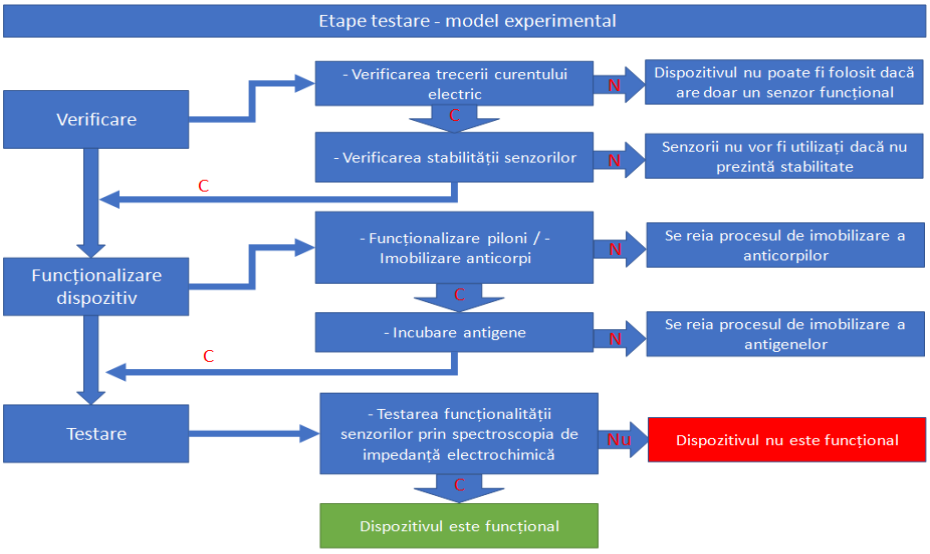


Fig. 8.2. Etape de testare a dispozitivului micro-electro-mecanic, model experimental.
Legendă: C – conform; N – neconform

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.

8.2. VERIFICAREA TRECERII CURENTULUI ELECTRIC

Înainte de a începe testarea dispozitivului, a avut loc o etapă preliminară de selectare a senzorilor electrochimici funcționali. În această etapă, s-a verificat trecerea curentului electric. Acest test s-a realizat cu ajutorul unui echipament Keithley 2700 Multimeter/Data Aquisition System (Keithley, USA) (Fig. 8.3) [*9], [*30]. În această etapă, au fost testate *nouă dispozitive microfluidice, fiecare având un senzor de intrare și unul de ieșire, toate primind calificativul conform*. Cu ajutorul acestora, s-au realizat testările din etapele prezentate în continuare.

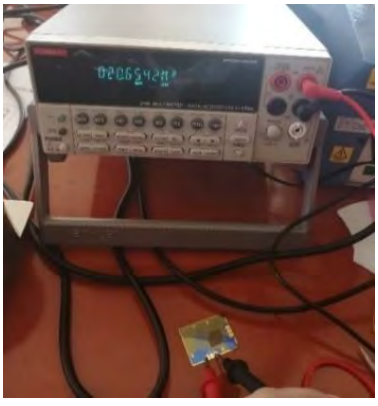


Fig. 8.3. Verificarea trecerii curentului electric

8.3. SPECTROSCOPIA DE IMPEDANȚĂ ELECTROCHIMICĂ

Prima și cea mai importantă etapă este cea de **curățire a electrozilor**, pentru a înlătura orice urmă de praf sau alte particule. Aceasta s-a realizat prin imersie succesivă timp de 10 minute în 2 isopropanol, etanol, acetonă și 1 minut în soluție Piranha (H_2SO_4:H_2O_2, concentrație 70:30). Apoi, senzorii s-au clătit cu apă deionizată și s-au uscat în jet de azot (N_2). După ce au fost curățate, cipurile au fost împărțite astfel: cipuri utilizate pentru determinarea subpopulației CD4+, pentru determinarea subpopulației CD3+, iar altele pentru determinarea subpopulației limfocitare CD8+.

Cu ajutorul unui potențiostat PGSTAT204 (Fig. 8.4) [*40], echipament utilizat pentru tehnicile electrochimice standard – analiza electrochimică a senzorilor, s-a verificat stabilitatea senzorilor. Această stabilitate se realizează prin voltametrie ciclică. Cu ajutorul software-ului potențiostatului la care sunt conectați prin cabluri cei trei electrozi, de lucru, de referință și auxiliar, s-au obținut informații privind variația rezistenței (impedanța reală) și a reactanței capacitive (impedanța imaginară) în funcție de frecvență.

Echipamentul este compus dintr-un amplificator de blocare care va furniza o frecvență de semnal la electrozi, un amplificator diferențial și o placă de achiziție a datelor.

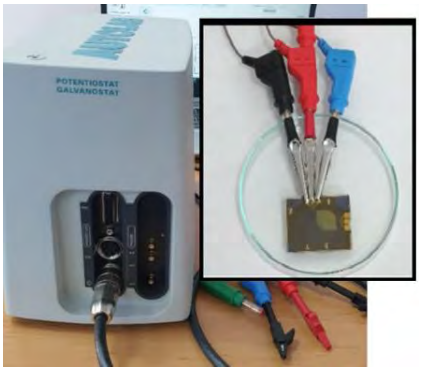


Fig. 8.4. Conectarea padurilor la potențiostatul PGSTAT204

Soluția redox folosită pentru cele trei tipuri de celule a fost aceeași: **5mM $Fe(CN)_6^{4-}$ și 5mM de $Fe(CN)_6^{3-}$** (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.**

În Fig. 8.5. sunt prezentate astfel de curbe de voltametrie ciclică cu potențial de baleiere între -1V și 1V în soluție electrolit PBS 7,1. Viteza de scanare este de 100 mV/s, cu 5mM $Fe(CN)_6^{4-}$ și 5mM de $Fe(CN)_6^{3-}$. Soluțiile

de fericianură (reprezentată prin culoarea verde în diagrama) și ferocianură (reprezentată prin culoarea neagră în diagramă) reprezintă cel mai utilizat mediator redox pentru diferite reacții electrochimice, ceea ce implică un bun transfer de electroni.

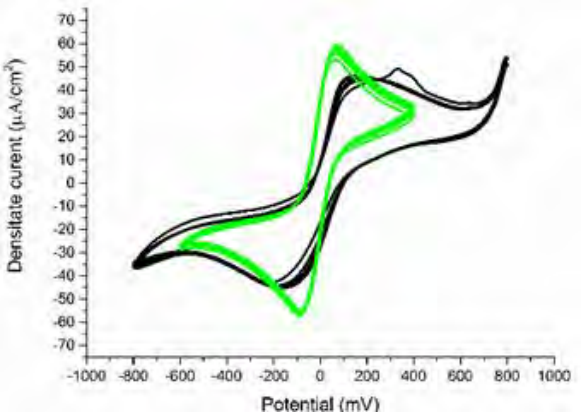


Fig. 8.5. Curbe de voltametrie ciclică

Din curbele suprapuse redate în Fig. 8.5, se constată faptul că senzorul prezintă stabilitate, prin faptul că mai multe cicluri măsurate se suprapun perfect.

Următoarea etapă o reprezintă verificarea metodelor de **funcționalizare** specifică **a pilonilor din camera de captură**. Pentru funcționalizare, se folosește o proteină de blocare - albumină serică bovină, care are rolul de a bloca situsurile rămase nereactive pentru a îndepărta legăturile nespecifice.

Toate soluțiile care conțin albumină serică bovină (BSA) pot inhiba sau interfera (impurități precum protezele, proteine de legare, receptori solubili etc.) cu detecția anumitor analiți. De aceea, s-a utilizat o soluție simplă de tampon fosfat salin (PBS) cu *p*H=7,1.

BSA este o proteină mică, stabilă, moderat non-reactivă, fiind astfel utilizată ca blocant, care are rolul de a imobiliza anticorpii [A6]. Pentru procesul care folosește anticorpi pentru identificarea antigenelor din celule, secțiunile de țesut sunt adesea incubate cu blocante ale BSA pentru a lega situsuri de legare nespecifice. Astfel, anticorpii se vor lega doar de antigenii de interes. De asemenea, această proteină îmbunătățește sensibilitatea prin scăderea zgomotului de fond.

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.

Următoarea etapă a constat în **imobilizarea anticorpilor specifici pentru fiecare subpopulație.**

Anticorpii sunt molecule de natură proteică produse în limfocite. Ei sunt capabili să depisteze antigenii (markeri specifici - particulă străină de organism) și să îi îndepărteze.

Imobilizarea proteinelor și realizarea reacției antigen-anticorp pe suprafețe solide este influențată de factori de mediu precum: umiditate, temperatură, pH-ul soluțiilor tampon dar și de tipul și mărimea suprafeței utilizate. Anticorpii au fost injectați cu ajutorul unei seringi în interiorul camerei de selecție și captură.

Anticorpii folosiți pentru testarea dispozitivului lab-on-a-chip sunt anticorpi **anti-CD4, anti-CD3** și **anti-CD8** meniți să captureze specific limfocitele țintă – limfocitele „T". Grefarea anticorpilor nu a fost realizată covalent, dar afinitatea ridicată a proteinei G pentru anticorpii anti-CD determină imobilizarea orientată a antigenilor.

S-au folosit **40** µL anti-CD4 (anti-CD4, anti-CD8 și anti-CD3) concentrație 5 µg/ml care se incubează 18h la 4 ^{o}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.

Electrozii funcționalizați anterior cu anticorpii specifici au fost incubați cu fiecare concentrație de antigene timp de 30 de minute la temperatura de 37 ^{o}C după care a fost citit răspunsul (rezistența de transfer de sarcină electrică – Rct) pentru fiecare concentrație a antigenelor (CD3+, CD4+ și CD8+) folosind spectroscopia de impedanță electrochimică (EIS).

Scopul analizei datelor prin EIS este determinarea naturii proceselor de electrod și parametrii lor caracteristici. Transferul sarcinii conduce la ambele componente, atât componenta faradaică, cât și cea nefaradaică. Componenta faradaică apare la transferul electronilor în urma unei reacții la interfața electrod – electrolit prin depășirea unei bariere de activare la un potențial standard de electrod, numită rezistență de transfer de sarcină (R_{ct}). Curentul nonfaradaic rezultă prin încărcarea condensatorului format de dublul strat electric (C_{dl}). Rct este egal cu raza fiecărui semicerc din Figurile 8.6 - 8.11. Aceste semicercuri se numesc diagrame Nyquist (-Zi vs Zr), care indică prezența doar a proceselor de schimb de sarcini electrice la interfața electrozilor cu electrolitul, fiind total absente alte fenomene, ca exemplu difuzia, adsorbția, etc. Diagrama Nyquist indică variația reactanței capacitive (Zi) guvernată de procese nefaradaice în funcție de rezistența reală (Zr) guvernată de procese faradaice. Ele sunt reprezentate în Figurile 8.6 - 8.11.

Măsurătorile de impedanță electrochimică sunt senzitive la reactivitatea neuniformă a suprafețelor, care poate fi cauzată de heterogenitatea suprafețelor, transferul de masă neuniform sau curentul indus de geometria electrozilor și distribuțiile de potențial electric. Procesele care implică transferul electronilor între electrod și electrolit au loc la frecvențe mari, iar efectele lor se citesc în partea dreaptă a diagramei Nyquist. Procesele care implică transfer de masă, adsorbții, efectul porozității electrozilor sau structura membranelor celulare se citesc în partea stângă a diagramei Nyquist.

Pentru CD4+ s-au utilizat concentrații între 0 - 800 ng/ml prezentate în diagrama Nyquist (Fig. 8.6).

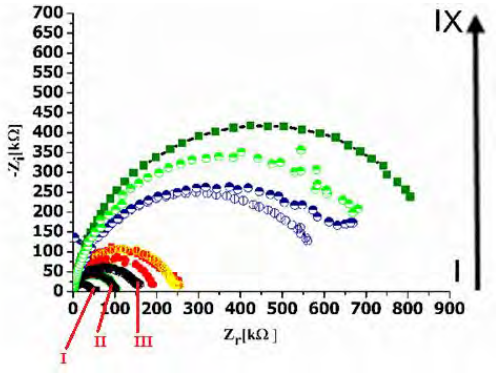


Fig. 8.6. Diagramele Nyquist ($-Z_i$ vs Z_r) după adăugarea de concentrații de CD4+ cunoscute (introduse în soluție tampon fosfat, *p*H=7,1) [M16]

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.

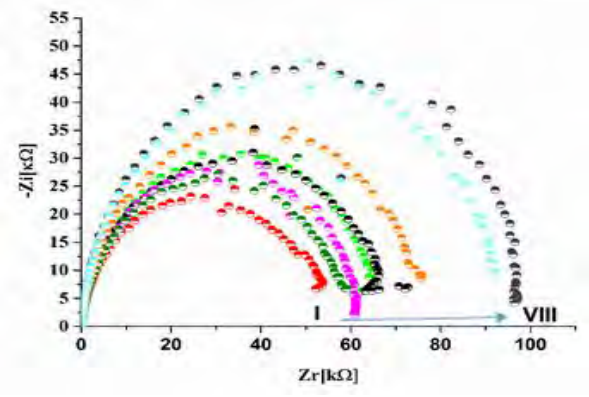


Fig. 8.7. Diagramele Nyquist ($-Z_i$ vs Z_r) după adăugarea de concentrații de CD3+ cunoscute (introduse în soluție tampon fosfat, pH=7,1) [M16]

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.

Toți senzorii s-au comportat similar, valorile medii pentru CD4+ și CD3+ R_{ct} fiind de 50,16 ± 5 kΩ iar valorile R_{ct} înregistrate pentru CD8+ fiind de 10,40 kΩ ± 0,10 kΩ. 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}). Reactanța capacitivă este egală cu:

$$Z_i = (2 \cdot \pi \cdot \nu \cdot C_{dl})^{-1} \qquad (8.1.)$$

unde ν este frecvența (Hz), iar C_{dl} este capacitatea stratului dublu electric format la interfața electrodului de lucru cu electrolitul (F).

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 antigenei, care permite pătrunderea mai ușoară a ionilor redox.

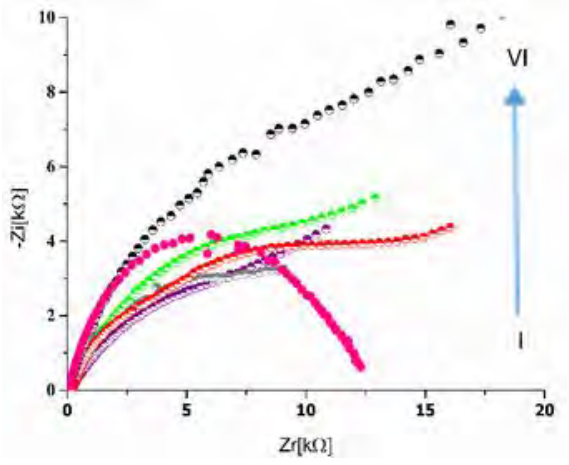


Fig. 8.8. Diagramele Nyquist ($-Z_i$ vs Z_r) după adăugarea de concentrații cunoscute de CD8+ (introduse în soluție tampon fosfat, pH=7,1) [M16]

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.

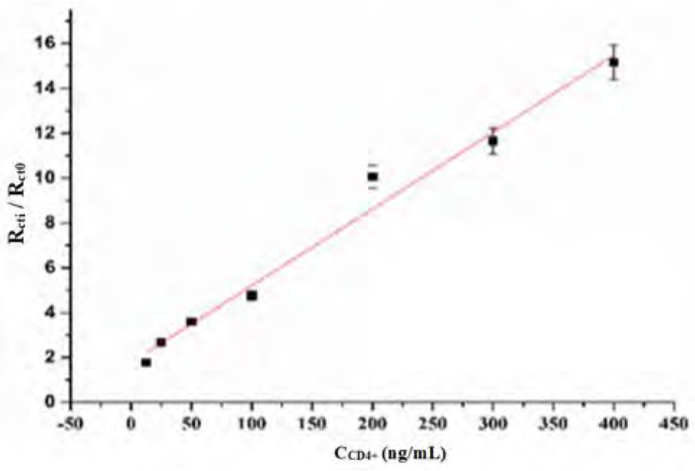


Fig. 8.9. Curba de calibrare rezistivă normalizată (R_{cti} / R_{ct0})
în funcție de concentrația CD4+: Model linear cu concentrațiile adăugate,
intervalul concentrațiilor fiind între 0 ng / mL - 400 ng / mL,
R^2 = 0,979 [M18], [S13]

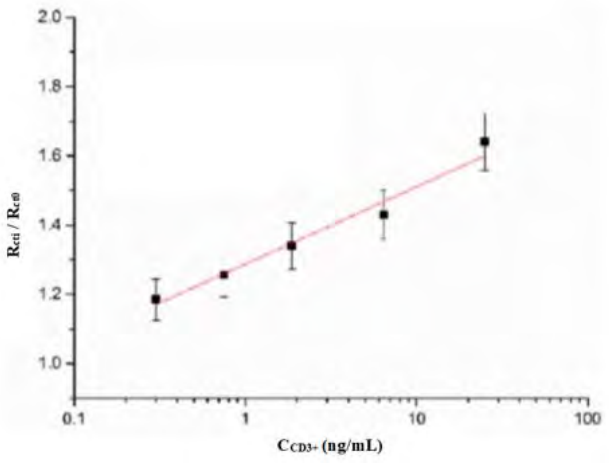


Fig. 8.10. Curba de calibrare rezistivă normalizată (R_{cti} / R_{ct0}) în funcție de concentrația CD3+: Model linear cu concentrațiile adăugate, intervalul concentrațiilor fiind între 0 ng / mL - 25 ng / mL, R^2 = 0,966

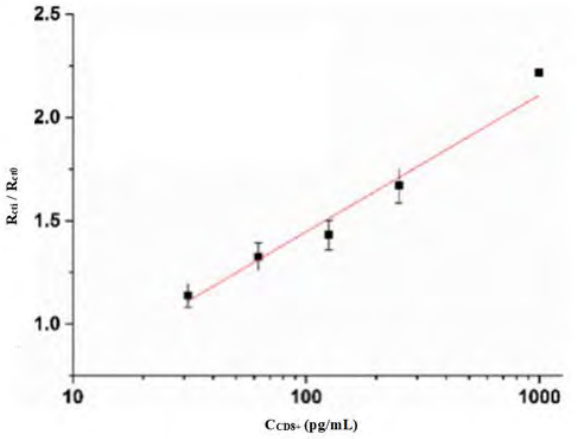


Fig. 8.11. Curba de calibrare rezistivă normalizată (R_{cti} / R_{ct0}) în funcție de concentrația CD8+: Model linear cu concentrațiile adăugate, intervalul concentrațiilor fiind între 0 ng / mL - 1000 pg / mL, R^2 = 0,958

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.

9.

FABRICAREA ȘI TESTAREA PROTOTIPULUI ÎMBUNĂTĂȚIT AL DISPOZITIVULUI MICRO-ELECTRO-MECANIC

9.1. PROBLEME APĂRUTE LA FABRICAREA DISPOZITIVULUI MICRO-ELECTRO-MECANIC, MODEL EXPERIMENTAL

Pentru fabricarea dispozitivului micro-electro-mecanic, model experimental, s-a folosit un lot de cinci plachete de siliciu. Pe fiecare plachetă au fost dispuse patru dispozitive microfluidice, rezultând astfel 20 de bucăți.

Dintre acestea, după depunerea argintului, s-au folosit mai departe, pentru următoarele etape, patru plachete, care au avut în total 11 dispozitive conforme.

În etapa de depunere a fotorezistului SU-8, la una dintre plachete, fotorezistul nu a avut aderență. Astfel, au rămas doar trei plachete, cu un total de nouă dispozitive funcționale.

În urma etapelor de inspecție intemediară 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.

Problemele apărute în prima etapă critică menționată, se pot datora unor cauze diverse. În cazul depunerii argintului, acesta a fost depus doar pe suprafața electrodului de referință al senzorului electrochimic.

Datorită faptului că această suprafață are dimensiuni extrem de reduse (maxim 10 nm), depunerea argintului poate fi realizată cu dificultate. S-a constatat faptul că în unele cazuri argintul nu a avut aderență, suprafața fiind foarte mică, iar în alte zone, acesta s-a exfoliat. În concluzie, dimensiunile extrem de reduse ale suprafeței de depunere au ca rezultat imposibilitatea realizării unei bune adeziuni a argintului, ceea ce reprezintă una din cauzele depistate.

O a doua cauză poate fi reprezentată de nerespectarea parametrilor tehnologici de fabricație (posibile valori diferite) în procesul de depunere a argintului. Acesta ar putea fi cazul plachetei de siliciu care nu a avut nici un dispozitiv funcțional. Pentru

această plachetă, depunerea s-a făcut separat, deoarece pe echipamentul de depunere Neva-EVD 500A [*9], se pot folosi doar patru plachete de 4 inch pentru o depunere.

Cea de-a doua etapă critică precizată a aparținut procesului de fotolitografie pentru fotorezistul SU-8, care nu s-a depus conform. S-a constatat faptul că fotorezistul SU-8 nu a avut aderență la una dintre plachete. Fotorezistul SU-8 a fost folosit la ultima mască pentru a fabrica partea microfluidică: canalele și pilonii pe care se atașează anticorpii specifici limfocitelor de tip „T".

În ciuda faptului că fotorezistul SU-8 are un conținut ridicat de epoxi, care dă o adeziune puternică la multe tipuri de substraturi, pot exista câteva cauze care împiedică SU-8 să adere la plachetă, care ar putea fi:

- grosimea stratului nu a fost aleasă corect;
- etalarea fotorezistului nu a fost efectuată corespunzător;
- au existat anumite imperfecțiuni ale substratului pe care se depune argintul;
- este posibil ca placheta să fi fost contaminată;
- a existat o umiditate prea mare în camera unde s-a efectuat procesul de fotolitografie.

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 îmbunătățit. 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 protipului, 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. Îmbunătăţiri necesare pentru creşterea aderenţei fotorezistului SU-8

În ceea ce priveşte aderenţa fotorezistului SU-8, s-a îmbunătăţit procesul de tratament termic.

Procesul de depunere a fotorezistului a fost îmbunătăţit prin selectarea valorilor specifice pentru acceleraţie, viteză de centrifugare şi timp de rotire. De asemenea, s-au modificat temperaturile tratamentului termic. În Tabelul 9.1 este redată comparaţia între etapele tratamentului termic pentru fotorezistul SU-8 efectuate anterior şi cele îmbunătăţite.

Tabelul 9.1. **Etapele de etalare, expunere şi tratamente termice la depunerea SU-8 şi îmbunătăţirea acestora**

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

9.3. REALIZAREA PROTOTIPULUI ÎMBUNĂTĂŢIT AL DISPOZITIVULUI MICRO-ELECTRO-MECANIC

Procesul de proiectare în inginerie, constă în activităţi asociate, care se pot repeta până la obţinerea unui proiect final. Astfel, poate fi parcurs un întreg ciclu al procesului pentru a selecta o variantă preliminară. Apoi, activităţile se pot repeta, pentru a dezvolta, pe baza variantei preliminare, un proiect detaliat [D5].

Astfel, primul dispozitiv micro-electro-mecanic care a fost realizat, a fost numit model experimental. Pentru îmbunătăţirea dispozitivului micro-electro-mecanic, s-au înlocuit senzorii electrochimici compuşi din electrozi simpli cu senzori electrochimici care conţin electrozi interdigitaţi. Odată cu înlocuirea senzorilor anteriori, s-a modificat şi proiectul dispozitivului. Pentru noul dispozitiv, prototip îmbunătăţit, au fost folosite patru măşti, după cum urmează:

- Prima mască (M1) – realizarea senzorilor din titan-aur;
- A doua mască (M2) – realizarea electrozilor de referinţă 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.

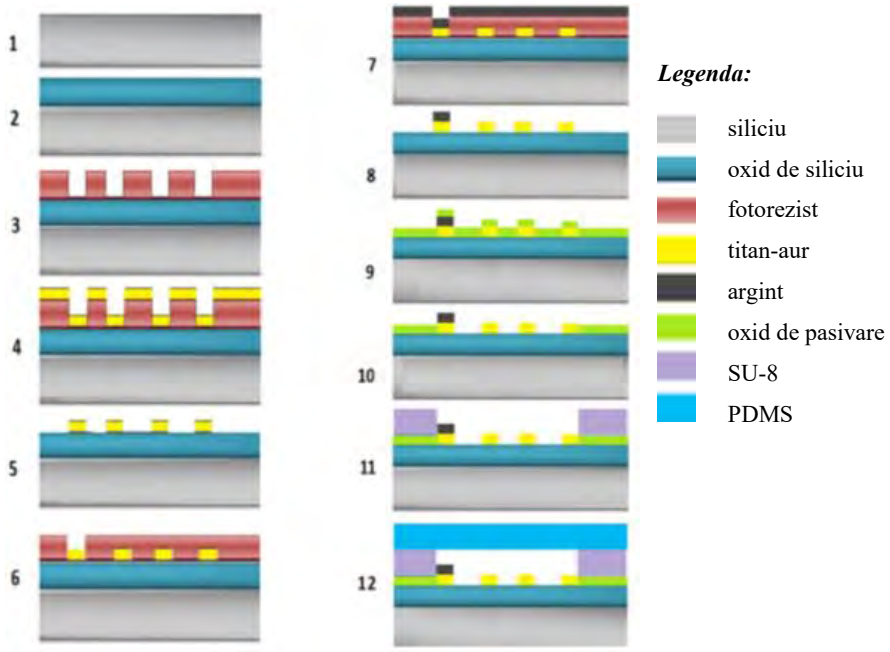


Fig. 9.1. Fluxul tehnologic [M17] :
1 – reprezintă alegerea substratului de siliciu; 2 – etapa de depunere a oxidului de siliciu; 3 – depunerea fotorezistului prin utilizarea primei măști; 4 – depunerea stratului de Ti – Au; 5 – procesul de lift – off; 6 – depunerea fotorezistului prin utilizarea celei 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.

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.

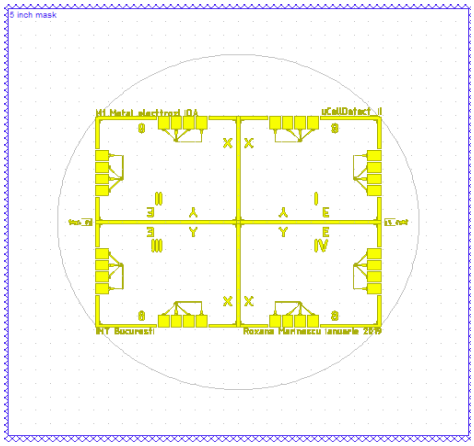


Fig. 9.2. Prima mască (M1) proiectată a dispozitivului micro-electro-mecanic

În Fig. 9.3. se prezintă imaginea mărită aferentă unui singur dispozitiv din cele patru.

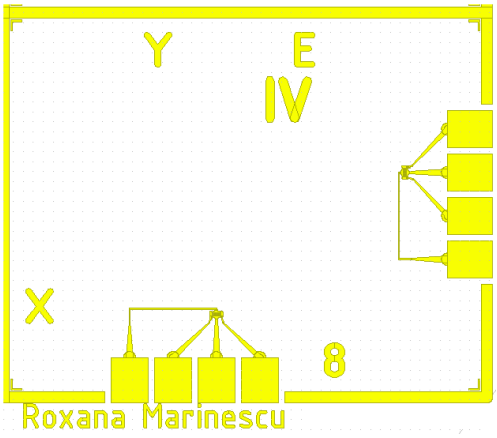


Fig. 9.3. Imaginea mărită proiectată a zonei unui dispozitiv de pe masca M1

Masca pe care au fost proiectați senzorii conține patru dispozitive, cu dimensiunile de 31400 µm × 39500 µm. Fiecare senzor are în componența sa patru pad-uri (suporți), de dimensiuni 3000 µm × 3700 µm, cu distanța egală între ele, de 500 µm. 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 μm, iar cea a electrodului de numărare de 195 μm. Dimensiunile stabilite pentru electrozii de lucru au fost [M17]: a) Dimensiunea unui digit - 20 μm ; b) Lungimea digiților - 285 μm ; c) Distanța dintre digiți - 5 μm ; d) Lățimea unui digit - 10 μm.

Electrozii interdigitați (IDA) sunt utilizați pentru detectarea și analiza reacției compușilor testați. Atât electrozii generatori, cât și colectorii se găsesc pe același plan. Dimensiunile reduse ale microelectrozilor provoacă o perturbare minimă a eșantionului, care poate permite monitorizarea fenomenelor care au avut loc într-o singură celulă.

Când lățimea digitului și distanța electrodului devin mici, eficiența ciclului redox al moleculei între două benzi de electrozi crește, astfel încât curentul de reacție electrochimică este amplificat; construcția specifică a interdigitului a permis această amplificare. Interdigitul poate oferi o amplificare suplimentară a curentului. Electrozii interdigitați au curenți de încărcare mici, cădere mică de tensiune și ating rapid o stare stabilă. În Fig. 9.4, se poate observa imaginea mărită a senzorului electrochimic.

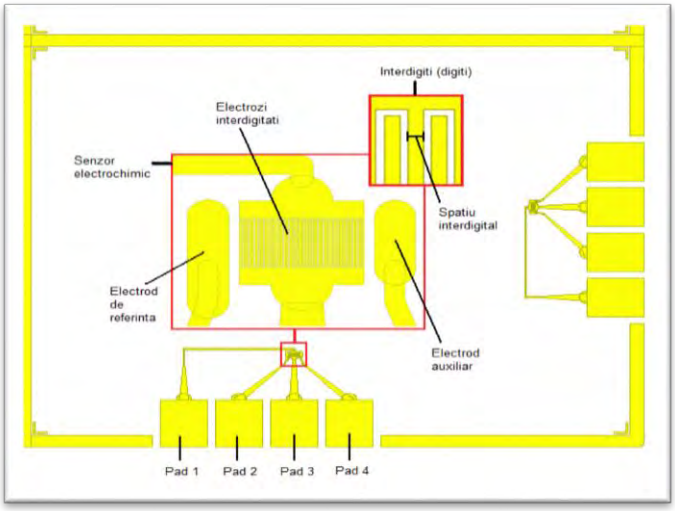


Fig. 9.4. Imaginea mărită proiectată a senzorilor de pe prima mască (M1)

A doua mască proiectată pentru realizarea electrozilor de referință din argint

A fost necesară depunerea de argint pe suprafața unui singur electrod, și anume pe cel de referință. În Fig. 9.5 este prezentată o imagine a cele de-a doua măști, proiectată în CleWin5.

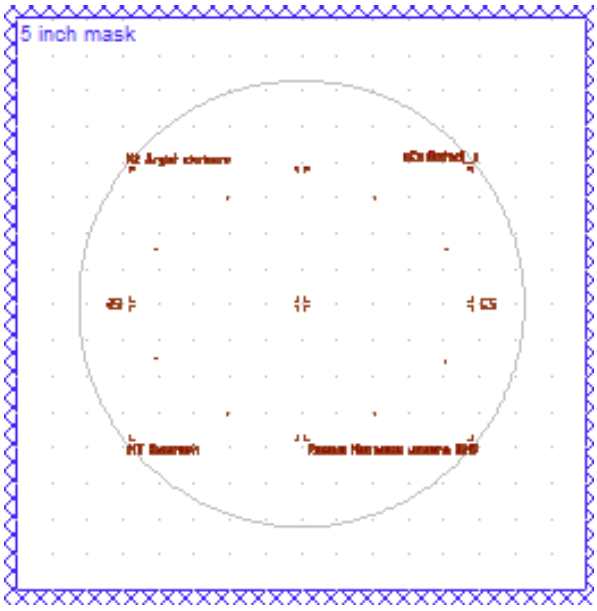


Fig. 9.5. A doua mască (M2) proiectată a dispozitivului micro-electro-mecanic

Dat fiind faptul că la scară normală, electrodul de referinţă nu este vizibil, este redată o imagine mărită a electrodului în Fig. 9.6.

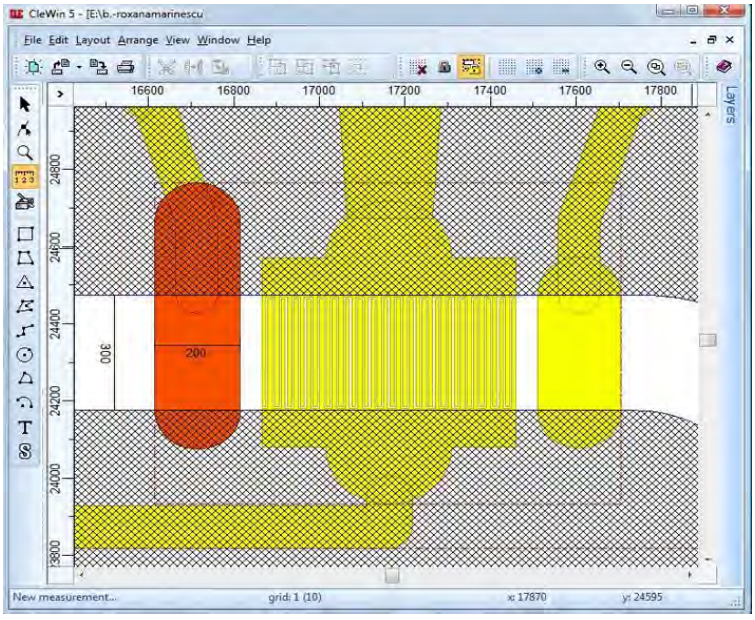


Fig. 9.6. Imaginea mărită proiectată a electrodului de referinţă

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.

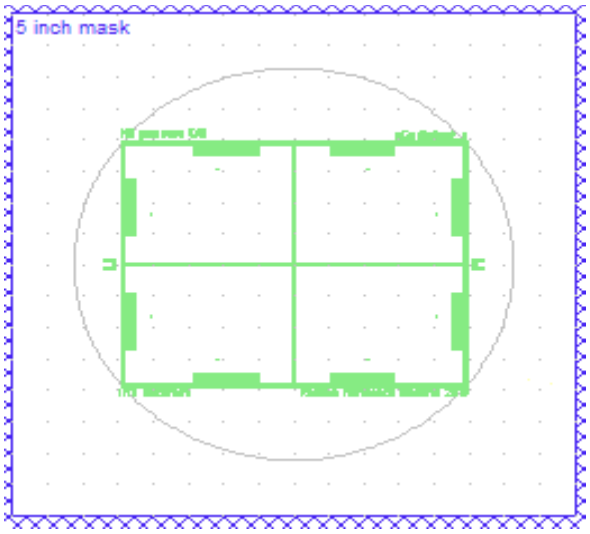


Fig. 9.7. A treia mască (M3) proiectată a dispozitivului micro-electro-mecanic

În Fig. 9.8 se prezintă zona aferentă unui singur dispozitiv micro-electro-mecanic, la scară mărită.

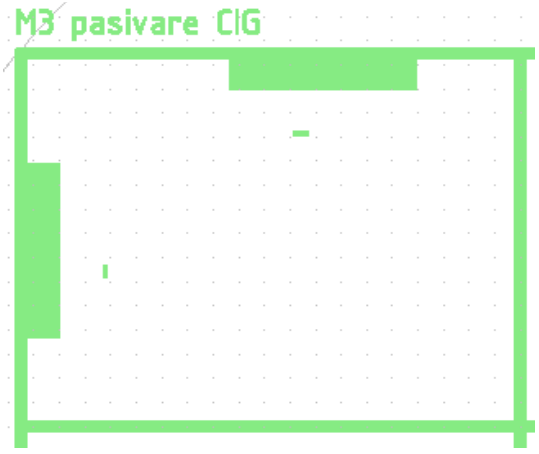


Fig. 9.8. Imaginea mărită proiectată a zonei unui dispozitiv de pe masca M3

Prin suprapunerea celor trei măşti realizate, se pot observa în Fig. 9.9, zonele în care oxidul depus a fost corodat în etapa de fabricare. Acestea sunt reprezentate cu litera „A” pentru zonele de contact şi cu litera „B” pentru zona prin care trece microcanalul peste senzori.

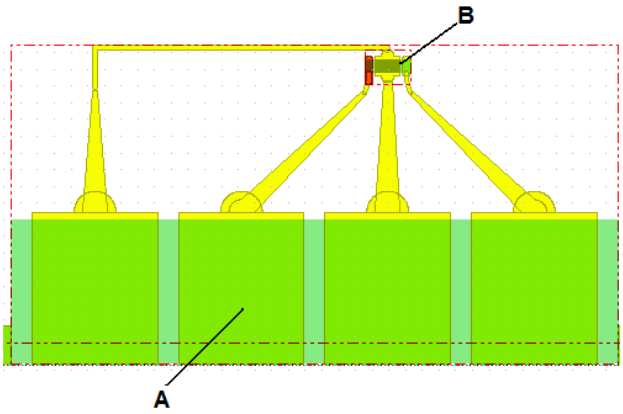
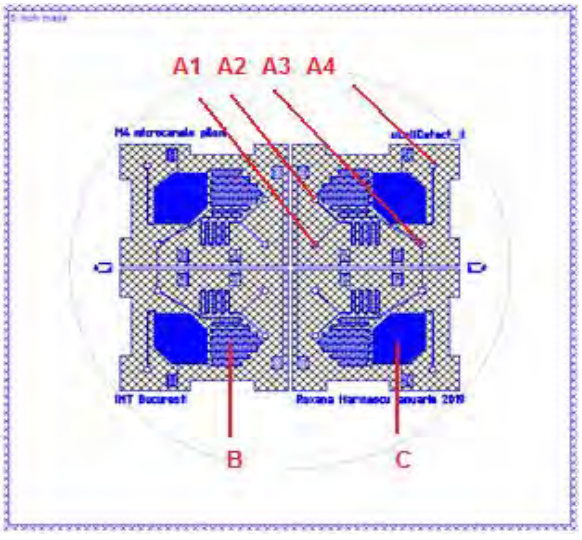


Fig. 9.9. Imaginea mărită proiectată a zonelor rămase libere după etapa de corodare

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

Această mască (M4) a fost proiectată pentru realizarea microcanalelor de curgere, camerei de selecţie şi captură şi a canalelor de numărare (Fig. 9.10).



Masca cuprinde:

A.1. Pentru sânge;
A.2. Pentru soluţia de lizare a eritrocitelor din sânge;
A.3. Pentru soluţia de stopare a lizării;
A.4. Pentru stocarea celulelor rămase
B. Microcanalele;
C. Camera de selecţie şi captură.

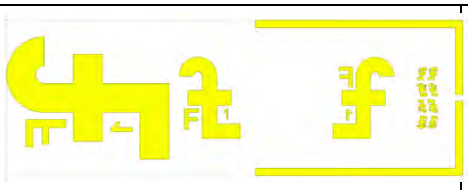
Fig. 9.10. A patra mască proiectată (M4) a dispozitivului micro-electro-mecanic

- **Proiectarea semnelor de aliniere a măștilor**

Semnele de aliniere reprezintă suportul principal în alinierea exactă a celor patru măști fotolitografice ale dispozitivului micro-electro-mecanic. Fiecare mască conține semne de aliniere, utilizate pentru menţinerea în poziţie corectă a măştilor.

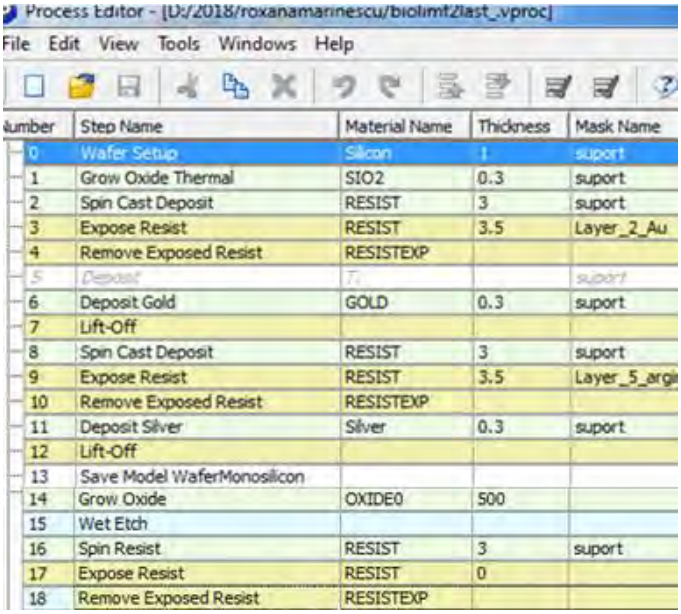
Fiecare culoare corespunde fiecărui layer al măştilor, iar cifrele corespund efectiv măştilor la care face referire semnul: pentru Masca 1: cifra 1 și culoarea galbenă; pentru Masca 2, cifra 2 și culoarea portocalie; pentru Masca 3, cifra 3 și culoarea verde; pentru Masca 4, cifra 4 și culoarea albastră. Semnele de aliniere folosite la cele patru măști sunt redate în Tabelul 9.2.

Tabelul 9.2. **Semnele de aliniere ale celor patru măsti**

 – la stânga plachetei	 – la dreapta plachetei
Grup de semne de aliniere specifice pentru masca M1	
 - la stânga plachetei	 - la dreapta plachetei
Grup de semne de aliniere specifice pentru masca M2	
 - la stânga plachetei	 - la dreapta plachetei
Grup de semne de aliniere specifice pentru masca M3	
 - la stânga plachetei	 - la dreapta plachetei
Grup de semne de aliniere specifice pentru masca M4	

9.3.2. Modelarea procesului de fabricaţie a dispozitivului micro-electro-mecaanic, prototip îmbunătăţit

Modelarea procesului de fabricaţie a prototipului îmbunătăţit s-a realizat cu ajutorul programului SEMulator3D Manager. S-a creat un fişier nou **„.vproc**" (Fig. 9.11) în care au fost introduse toate etapele procesului de fabricaţie îmbunătăţit, împreună cu parametrii specifici acestora în vederea realizării modelării procesului.



Number	Step Name	Material Name	Thickness	Mask Name
0	Wafer Setup	Silicon	1	suport
1	Grow Oxide Thermal	SIO2	0.3	suport
2	Spin Cast Deposit	RESIST	3	suport
3	Expose Resist	RESIST	3.5	Layer_2_Au
4	Remove Exposed Resist	RESISTEXP		
5	Deposit	Ti		suport
6	Deposit Gold	GOLD	0.3	suport
7	Lift-Off			
8	Spin Cast Deposit	RESIST	3	suport
9	Expose Resist	RESIST	3.5	Layer_5_arg
10	Remove Exposed Resist	RESISTEXP		
11	Deposit Silver	Silver	0.3	suport
12	Lift-Off			
13	Save Model WaferMonosilicon			
14	Grow Oxide	OXIDE0	500	
15	Wet Etch			
16	Spin Resist	RESIST	3	suport
17	Expose Resist	RESIST	0	
18	Remove Exposed Resist	RESISTEXP		

Semnificaţia etapelor:
0 - placheta de siliciu;
1 - creşterea termică a oxidului;
2 - etalarea fotorezistului;
3 - expunerea fotorezistului;
4 - îndepărtarea fotorezistului;
5 – depunerea titanului
6 - depunerea aurului;
7 - procesul de lift-off;
8 - etalarea fotorezistului;
9 - expunerea fotorezistului;
10 - îndepărtarea fotorezistului;
11 - depunerea argintului;
12 - procesul de lift-off;
13 - salvare;
14 - depunere oxid;
15 - corodare oxid;
16 - etalare fotorezist;
17 - expunere fotorezist;
18 - îndepărtare fotorezist expus.

Fig. 9.11. Fişierul .vproc cu etapele modelării procesului de fabricaţie a prototipului îmbunătăţit

Modelarea a fost realizată conform etapelor stabilite. Astfel, în Fig. 9.12 se poate observa modelarea dispozitivului micro-electro-mecanic, prototip îmbunătăţit.

În Figurile 9.13 - 9.19, sunt redate imagini ale procesului de modelare. În Fig 9.13 sunt prezentate imagini văzute în planul „home view" (Fig. 9.13.a) şi „top view" (Fig. 9.13.b) ale prototipului îmbunătăţit al dispozitivului micro-electro-mecanic, rezultat în urma procesului de modelare a fabricaţiei. În Fig. 9.13.a. sunt notate toate elementele componente ale dispozitivului micro-electro-mecanic, prototip îmbunătăţit care au fost modelate.

Sunt evidenţiate cu Z1 şi Z2, zonele în care s-ar fi realizat contactul direct dintre braţul electrodului de lucru şi microcanal, dacă nu s-ar fi fabricat masca M3. Acest contact ar fi putut da răspunsuri false ale senzorilor.

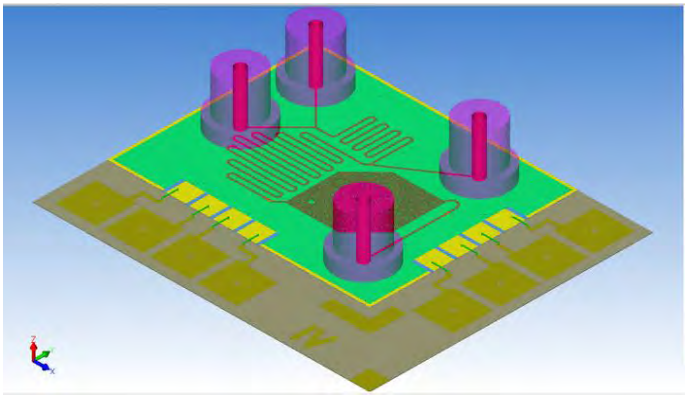
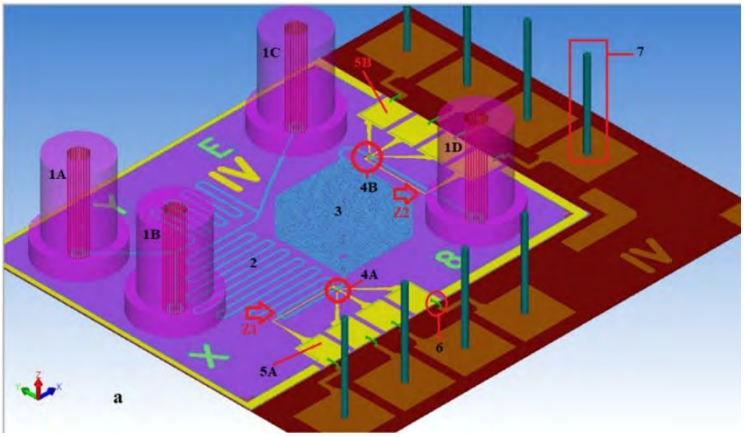


Fig. 9.12. Modelarea procesului de fabricație a dispozitivului micro-electro-mecanic, prototip îmbunătățit



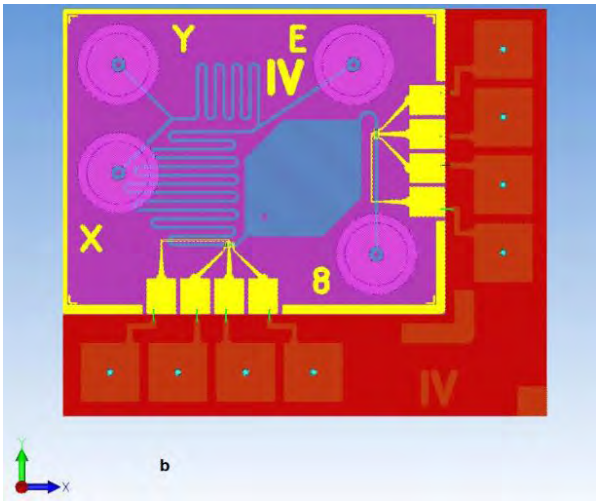


Fig. 9.13. Dispozitivul microfluidic modelat:
a) „home view” și b) „top view”

Semnificațiile notațiilor din figura 9.13 sunt următoarele:
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 – suporți pentru conexiuni electrice.
Z1, Z2 – zonele în care s–ar fi realizat contactul dintre electrod și microcanal, dacă nu se proiecta masca M3.

În Figurile 9.14 - 9.19, sunt redate imagini ale procesului de modelare, pentru fiecare mască. În Fig. 9.14, se prezintă o imagine a primei măști modelate.

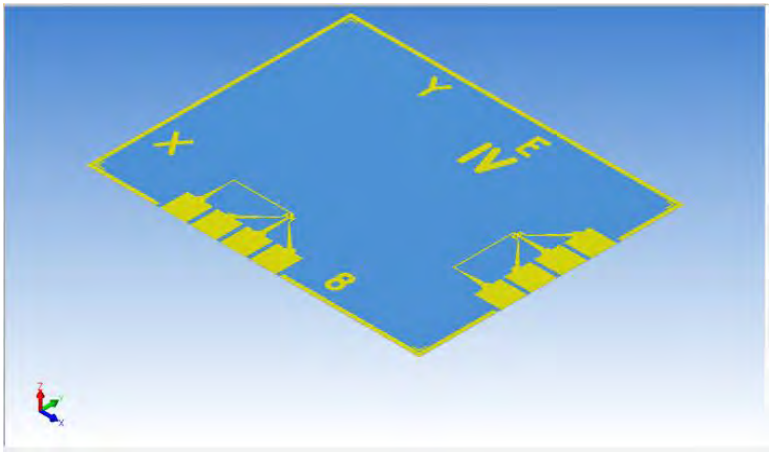


Fig. 9.14. Prima mască (M1) modelată a dispozitivului micro-electro-mecanic, prototip îmbunătățit

În Fig. 9.15 se prezintă o imagine a celei de-a doua măști modelate.
În Fig. 9.16 se prezintă o imagine a celei de-a treia măști modelate, iar în Fig. 9.17 se prezintă o imagine a detaliilor mărite A și B din Fig. 9.16.
În Fig. 9.18, se prezintă o imagine a celei de-a patra măști modelate.

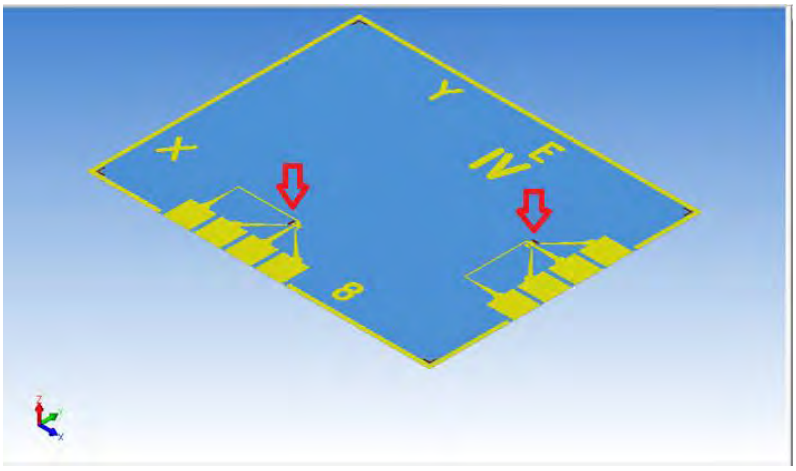


Fig. 9.15. A doua mască (M2) modelată a dispozitivului micro-electro-mecanic, prototip îmbunătățit, cu indicarea zonelor de depunere a argintului

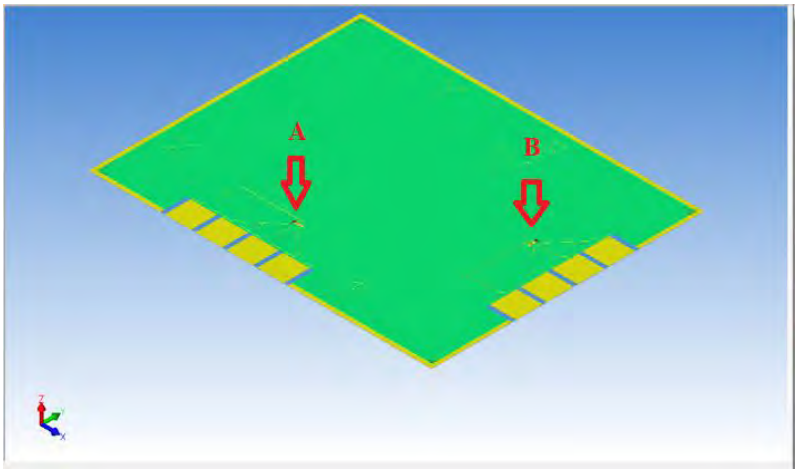


Fig. 9.16. A treia mască (M3) modelată a dispozitivului micro-electro-mecanic, prototip îmbunătățit, cu indicarea zonelor lăsate libere în dreptul senzorilor, marcate A și B

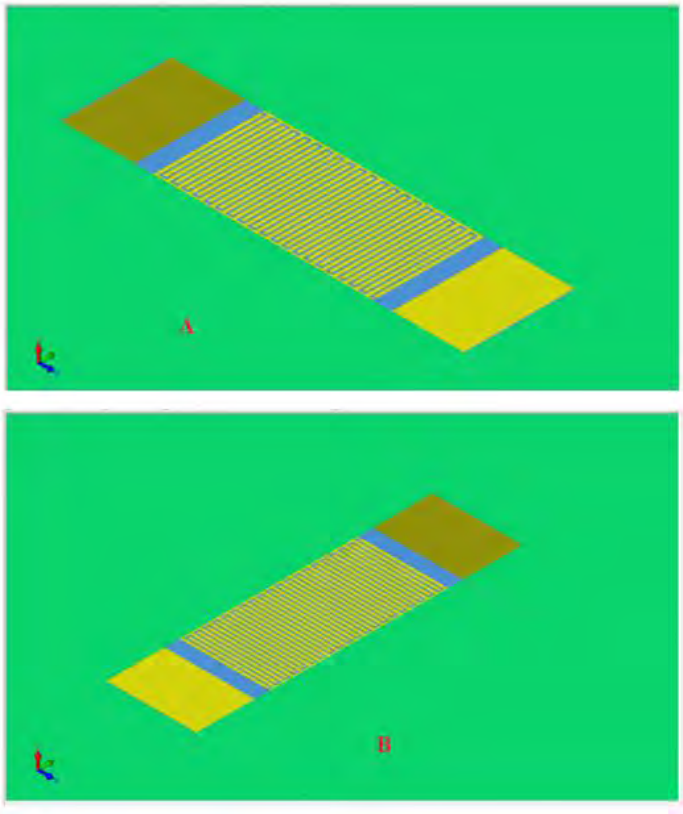


Fig. 9.17. Imagini mărite ale detaliilor A – senzorul de intrare și B – senzorul de ieșire

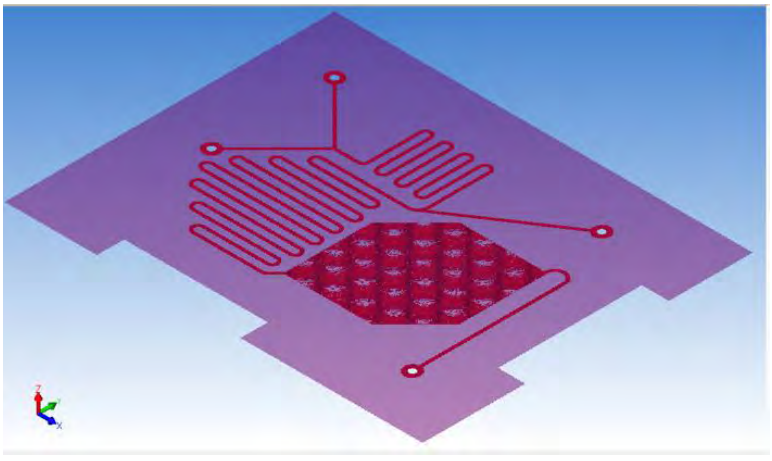


Fig. 9.18. A patra mască (M4) modelată a dispozitivului micro-electro-mecanic, prototip îmbunătățit

În Fig. 9.19 se prezintă o imagine a celor patru măști modelate, suprapuse ale dispozitviului mirco-electro-mecanic, prototip îmbunătățit.

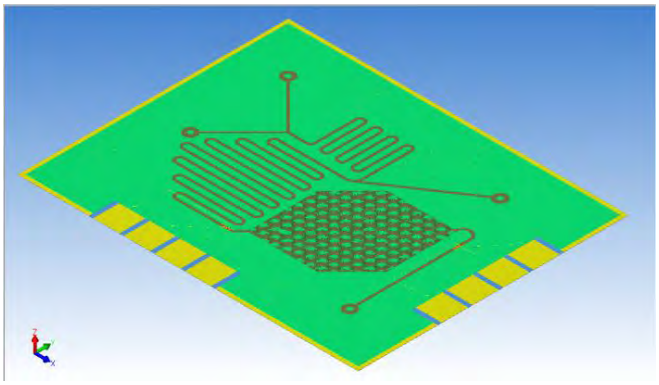


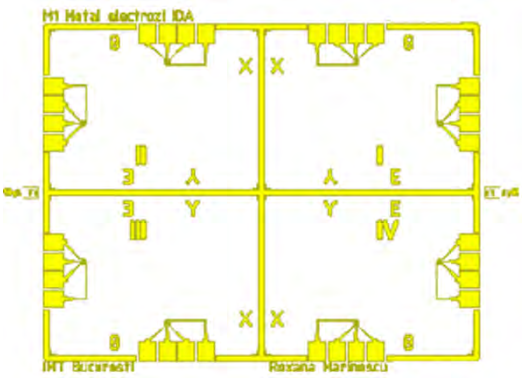
Fig. 9.19. Cele patru măști modelate ale dispozitivului micro-electro-mecanic, prototip îmbunătățit, suprapuse

Programul SEMulator3D a indicat faptul că modelarea procesului de fabricație este conformă, ceea ce a permis trecerea la procesul de fabricație propriu-zis.

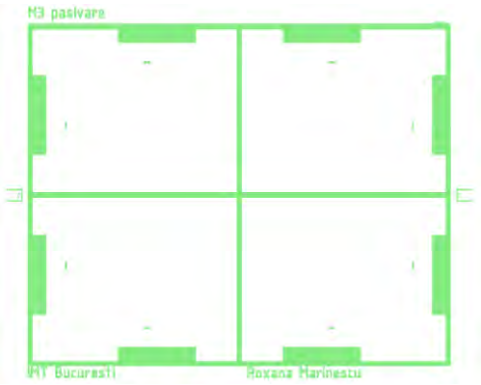
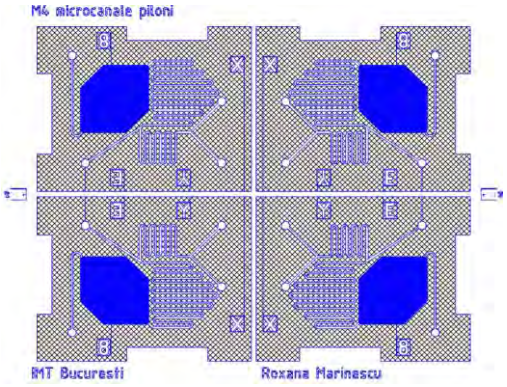
9.3.3. Procesul de fabricație a măștilor

O primă etapă a procesului tehnologic de execuție fizică a dispozitivului micro-electro-mecanic o constituie scrierea prin fotolitografie a măștilor. 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
Masca M1: 	

Tabelul 9.3 (continuare)

Proiectare	Fabricare
Masca M2: 	
Masca M3: 	
Masca M4: 	

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.

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 <111> 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_2 servește ca strat de izolație între siliciu de tip p și straturile metalice. Prima mască a fost utilizată pentru a defini electrozii senzorilor 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 developarea fotorezistului timp de 1 min și 5 s în developantul specific, ma-D 533/S (Fig. 9.25).

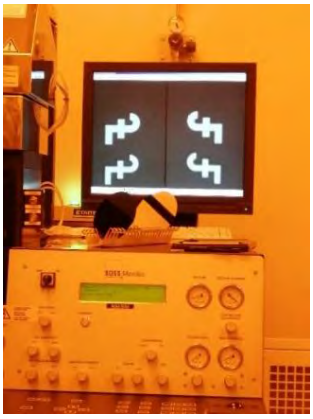


Fig. 9.23. Alinierea efectuată folosind semnele de aliniere

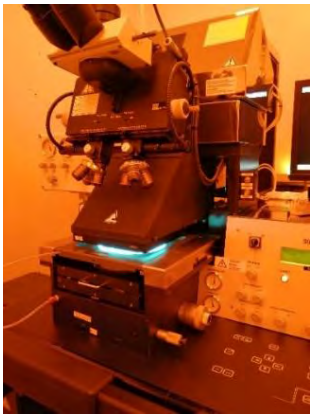


Fig. 9.24. Expunerea măștilor



Fig. 9.25. Developarea 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 acetonă 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]. În Fig. 9.28 este prezentată o imagine a unei plachete după realizarea procesului de lift-off.

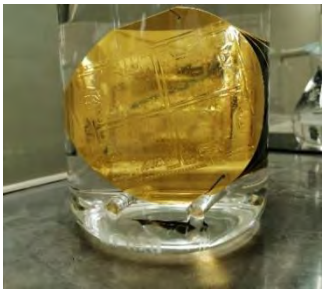


Fig. 9.26. Scufundarea plachetei în soluția pentru lift-off

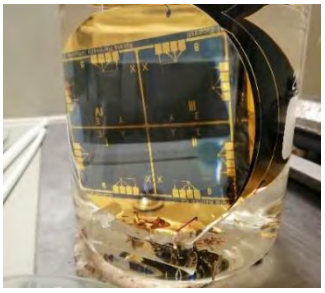


Fig. 9.27. Realizarea procesului de lift-off

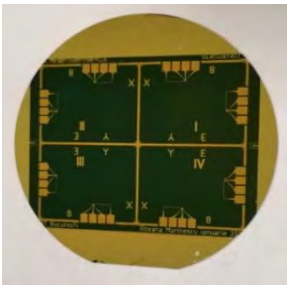


Fig. 9.28. Placheta după procesul de lift-off

După procesul de lift-off, a avut loc inspecția intermediară, realizată cu ajutorul microscopului optic Leica DM LM (Leica Microsystems, Germania) [*9], [*29]. În Fig. 9.29 se pot vedea senzorii la diferite măriri. ***Toate dispozitivele prototip supuse inspecției intermediare s-au dovedit conforme.***

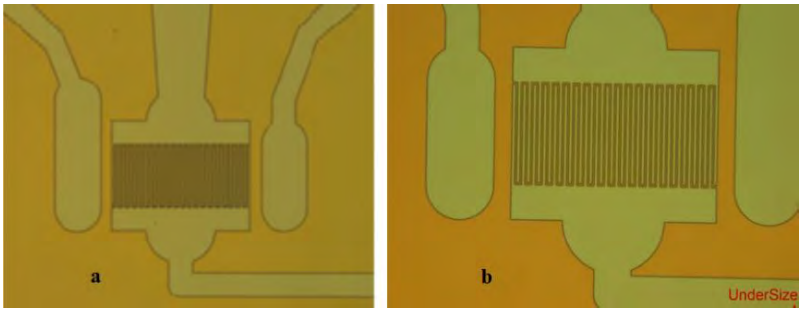


Fig. 9.29. Imagini ale depunerii stratului de Ti-Au la dimensiuni de a) x5 [M17] și b) x10

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) (Fig. 9.30 - 9.32).



Fig. 9.30. Atașarea plachetelor în echipamentul Neva-EVD 500A



Fig. 9.31. Etanșarea echipamentului Neva-EVD 500A



Fig. 9.32. Procesul de depunere realizat cu ajutorul echipamentului Neva-EVD 500A

A urmat un alt proces de lift-off, astfel încât argintul a rămas depus doar pe electrodul de referință (Etapa 8) al senzorilor interdigitați.

Clorurarea Ag, având scopul de a crea electrozi stabili s-a făcut folosind un oxidant puternic, $FeCl_3$. 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.

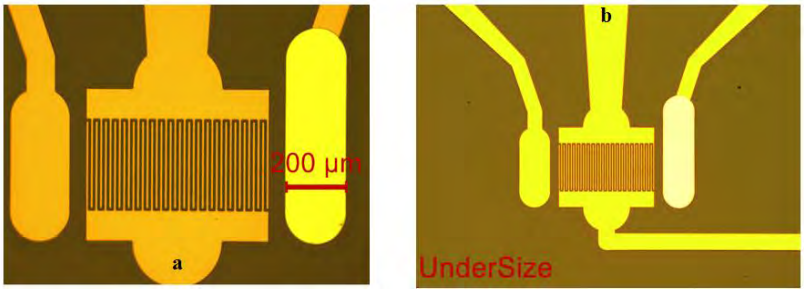


Fig. 9.33. Depunerea de Ag a) imagine la mărire x10 și b) mărire x5

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 ^{o}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 ^{o}C. Apoi, a fost aliniată și expusă a treia mască (4,5 s). Fotorezistul s-a developat în developant HPRD, pe când HSQ s-a înlăturat folosind acid fluorhidric cu clorură de amoniu timp de 15 s (Fig. 9.34). După corodare, a avut loc inspecția intermediară, folosind microscopul optic Leica DM LM (Leica Microsystems, Germania) [*9], [*29]. În Fig. 9.35 sunt redate două imagini la mărire de x5, ale celor doi senzori: senzorul de intrare și cel de ieșire.



Fig. 9.34. Înlăturarea HSQ în acid fluorhidric și clorură de amoniu

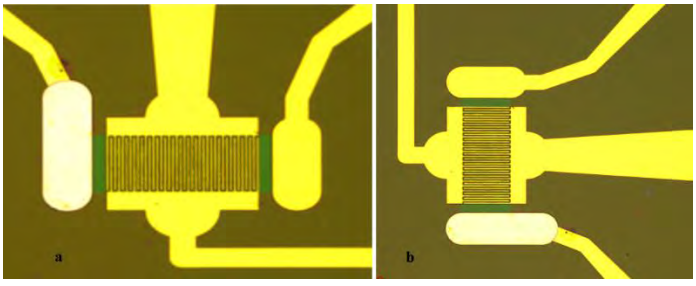


Fig. 9.35. Depunerea oxidului : a) senzorul de intrare [M17], b) senzorul de ieșire

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) (Fig. 9.36). 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 developarea 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 (Fig. 9.37).

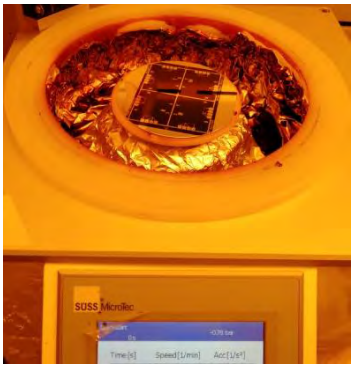


Fig. 9.36. Etalare fotorezist SU-8

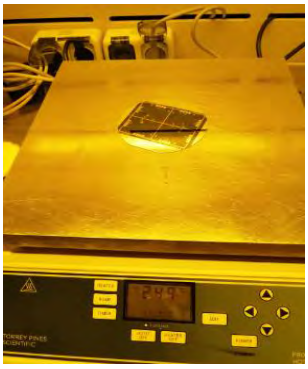


Fig. 9.37. Tratament termic final al plachetei

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] (Figurile 9.38 - 9.40).

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].

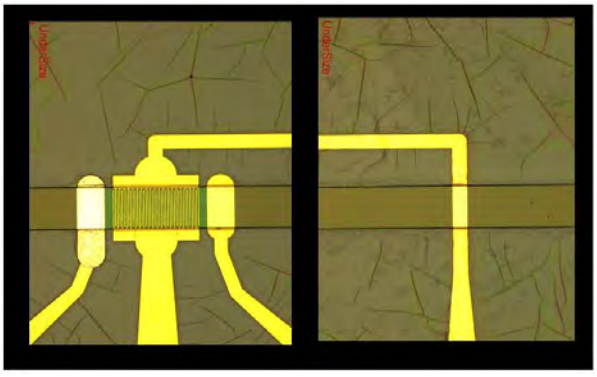


Fig. 9.38. Imagini alăturate ale microcanalului și senzorilor, mărire x5

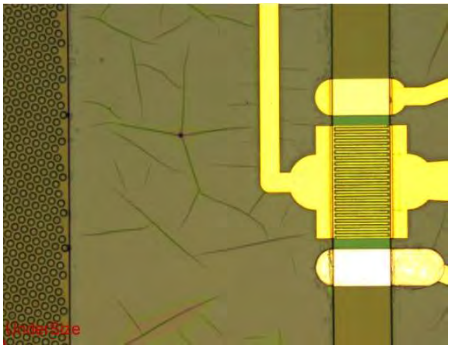


Fig. 9.39. Senzorii şi pilonii din camera de selecţie şi captură, mărire x5

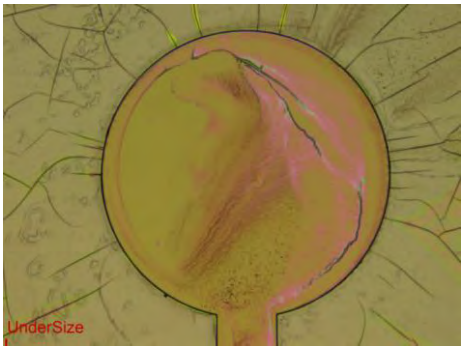


Fig. 9.40. Nanoport, mărire x50

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 subţire, pentru a putea face ulterior o comparaţie în ceea ce priveşte rezistenţa plachetelor la efectele de mediu.

În Fig. 9.41 - 9.42 sunt prezentate două imagini cu PDMS realizat prin metoda descrisă anterior, în **Capitolul 7**. După ce a fost depus PDMS-ul în suportul specific, acesta a urmat un tratament termic de durificare. Odată întărit, s-au poziţionat câte două dispozitive peste acesta (Fig. 9.41), pentru a marca forma care va fi decupată. După ce a fost tăiat şi supus tratamentului

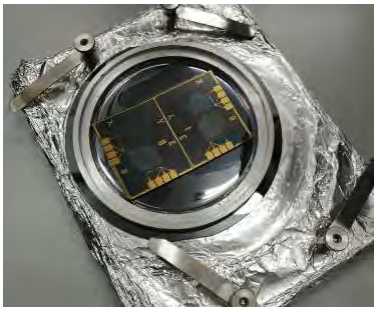


Fig. 9.41. Dispozitive microfluidice poziţionate deasupra stratului de PDMS pentru a stabili dimensiunile care au fost tăiate

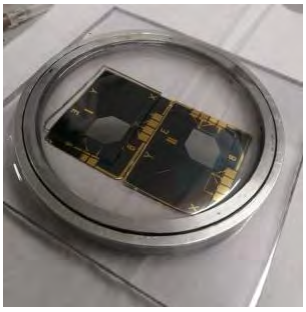


Fig. 9.42. Capacul de PDMS ataşat dispozitivelor microfluidice

Pentru a doua formă de depunere, a fost folosită aceeaşi concentraţie: 2 ml substanţă Silicone Elastomer Curing Agent şi 20 ml Silicone Elastomer – Base. După omogenizarea celor două soluţii componente ale PDMS-ului, acesta a fost plasat într-un exsicator timp de 20 de min (Fig. 9.43). Exsicatorul a fost folosit pentru a elimina toate bulele de aer care s-au format în PDMS. S-a încălzit etuva în prealabil la 90 ^{o}C (aprox. 15 min). Apoi s-a folosit o plachetă de PMMA ca suport pentru a turna

PDMS-ul (Fig. 9.44). După turnarea acestuia în suportul de PMMA, a fost introdus în etuva Heraeus [*31], la temperatura de 90 ^{o}C timp de 60 min (Fig. 9.45).



Fig. 9.43. Exsicatorul folosit pentru eliminarea bulelor de aer din PDMS

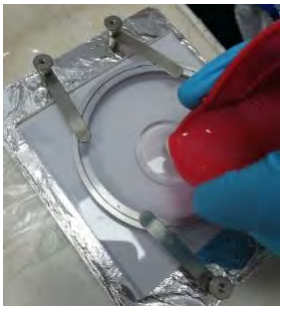


Fig. 9.44. Suportul de PMMA peste care se toarnă soluția de PDMS



Fig. 9.45. Tratament termic al PDMS folosind etuva Heraeus

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.

PDMS-ul a fost tăiat la dimensiunile dorite. Capacul de PDMS a fost supus unui tratament cu plasmă pentru aderență, folosind echipamentul Etchlab 200 (20 Pa, 90 ^{o}C) [*17].

După finalizarea tratamentului, capacul a fost atașat dispozitivului micro-electro-mecanic, prototip îmbunătățit.

Odată ce a fost lipit capacul de PDMS, s-au atașat nanoporturile. Astfel, în Fig. 9.46 se poate observa o imagine a dispozitivului microfluidic înainte de atașarea nanoporturilor.

În Fig. 9.47. este redată o imagine a dispozitivului microfluidic cu nanoporturile atașate.

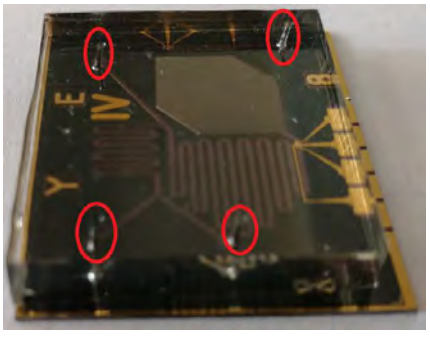


Fig. 9.46. Indicarea orificiilor pentru nanoporturi

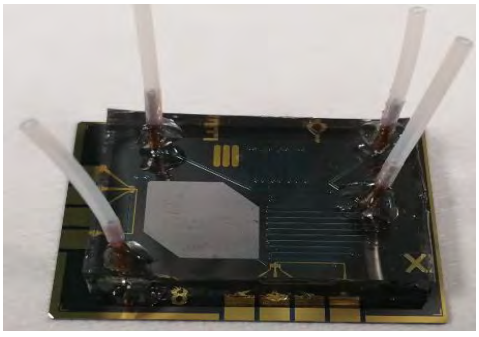


Fig. 9.47. Dispozitivul microfluidic prototip îmbunătățit cu nanoporturi atașate

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.

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.

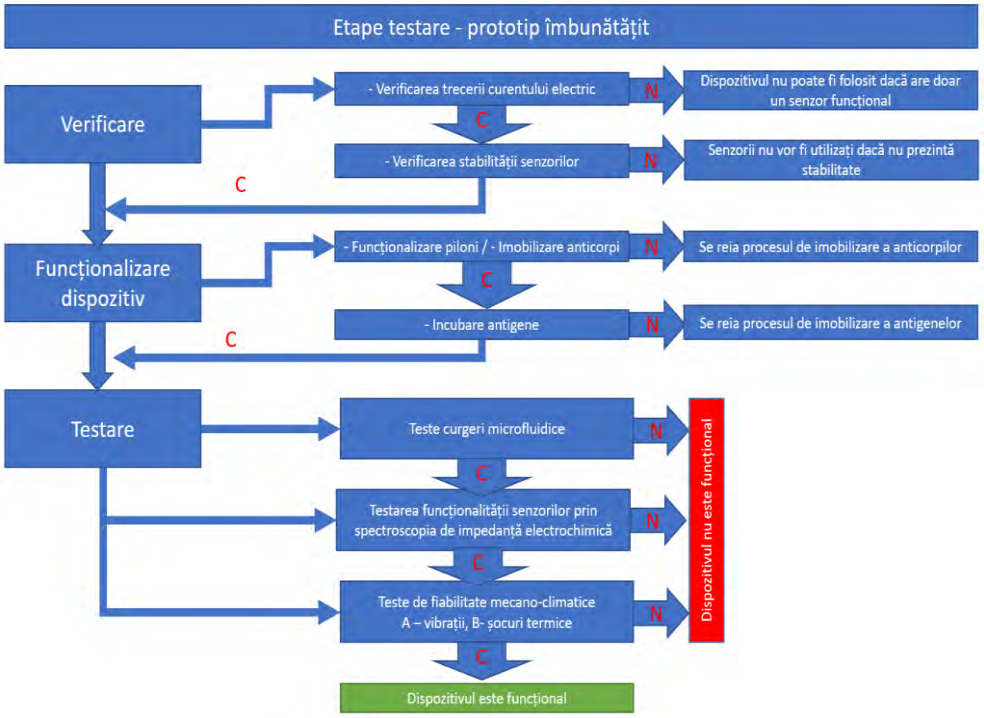


Fig. 9.48. Etape de testare a dispozitivului micro-electro-mecanic, prototip îmbunătățit

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 testelelor 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 potențiostatului 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 senzor cu ajutorul unei pipete (Fig. 9.49.b). Soluția redox folosită a fost aceeași ca la testarea modelului experimental: **5mM Fe $(CN)_6^{4-}$** și **5mM de Fe $(CN)_6^{3-}$** (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.

După ce s-a depus picătura de soluție redox, s-au realizat diagramele de voltametrie ciclică. În Fig. 9.51 și 9.52 sunt redate 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 ÷ 0,2 V**, la o **viteză de scanare** de **0,05 V/s.**

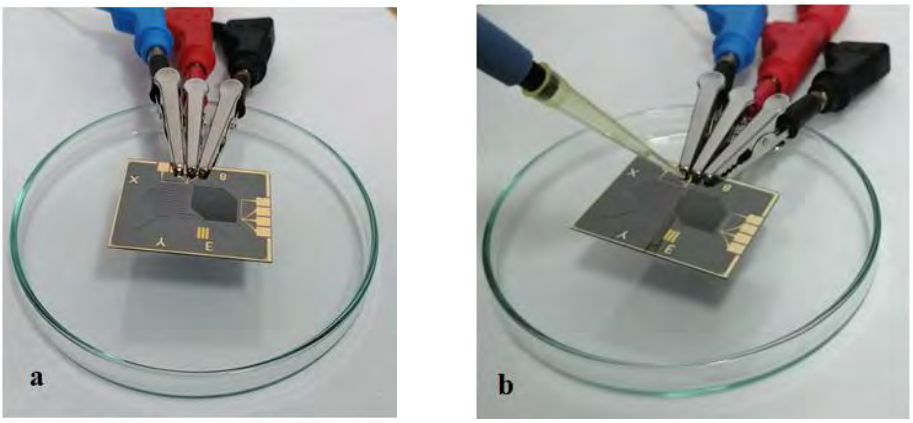


Fig. 9.49. Pregătirea senzorilor pentru testarea cu ajutorul impedanței a) atașarea cleștilor pentru realizarea conexiunilor, b) turnarea picăturii de soluție redox cu ajutorul unei pipete

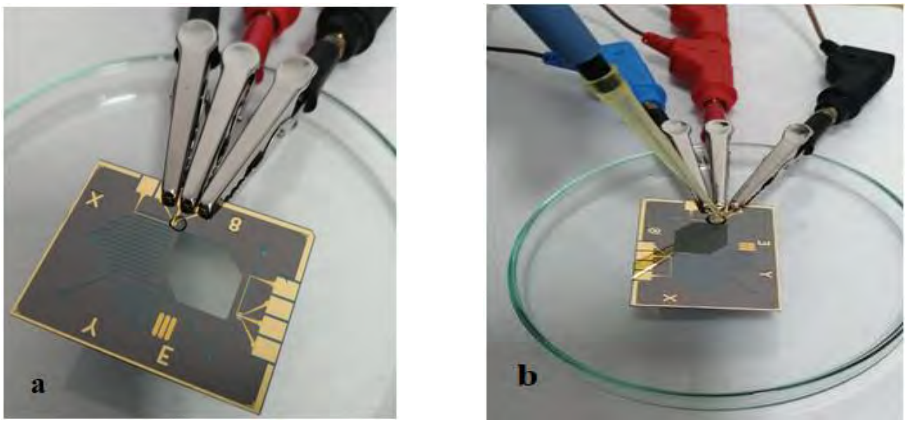


Fig. 9.50. Picătura de soluție redox depusă pe zona de interes a senzorului de măsurare : a) a intrărilor, b) a ieșirilor

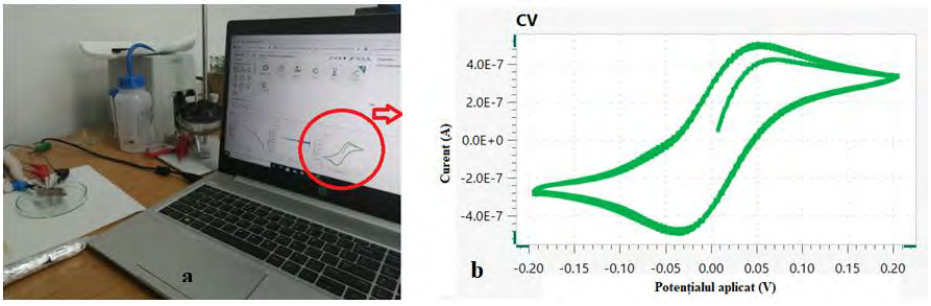


Fig. 9.51. Determinarea curbelor de voltametrie ciclică pentru senzorul de intrare : a) potențiostatul PGSTAT204; b) curbele de voltametrie ciclică.

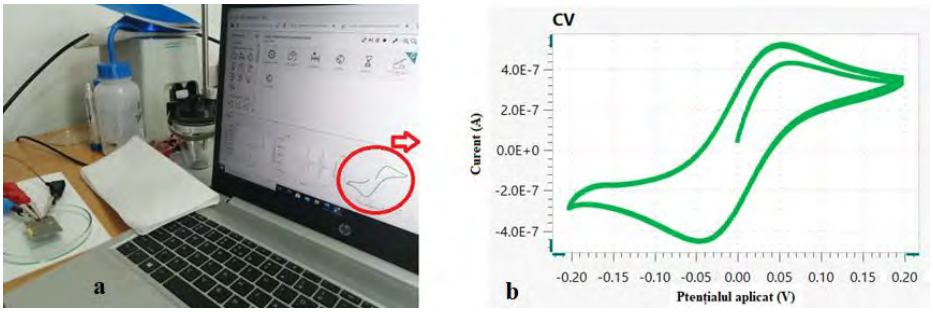


Fig. 9.52. Determinarea curbelor de voltametrie ciclică pentru senzorul de ieșire :
a) potențiostatul PGSTAT204; b) curbele de voltametrie ciclică

În fiecare dintre graficele reprezentate în Fig. 9.51.b și 9.52.b., sunt redate 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 repetabilitea măsurătorilor), 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.

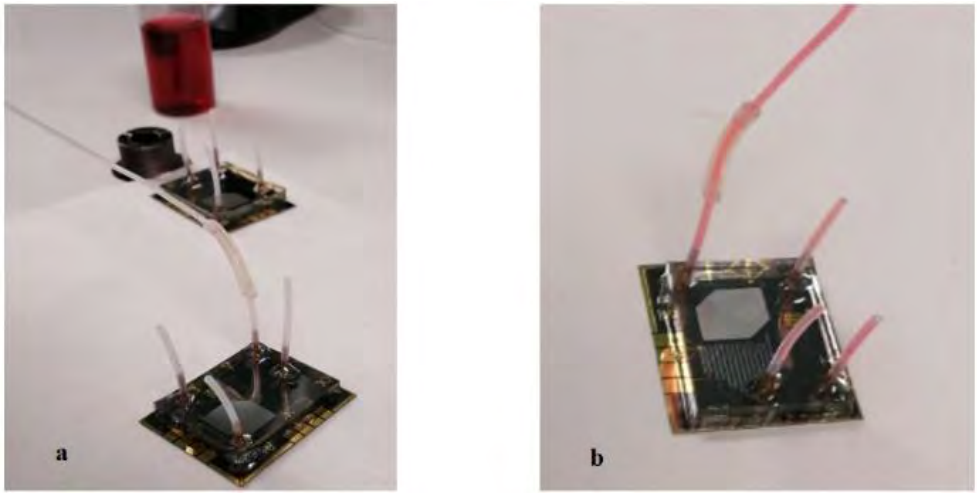


Fig. 9.53. Testarea curgerii fluidice :
a) imagine înainte de introducerea colorantului și b) imagine după introducerea colorantului

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 funcţionalizare a suprafeţelor în plasmă.

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

9.4.3. Testarea funcționalității senzorilor cu ajutorul spectroscopiei de impedanță electrochimică

- **Materiale și metode**

Pentru soluțiile de lizare și de stopare a lizării, au fost folosite aceleași concentrații de substanțe precum în cazul modelului experimental (Tabelul 9.4):

Tabelul 9.4. **Soluțiile folosite**

Soluția de lizare	Soluția de stopare a lizării
10X RBC Lysis Buffer (Multi-species)	Tampon fosfat salin cu *p*H 7,1

Testele au fost realizate individual pentru fiecare tip de celulă, folosind anticorpi specifici fiecărui tip de subpopulație de celule imobilizate.

S-au adăugat 40 µL soluție cu anti CD3, CD4, și CD8 cu concentrație 5 µg/ml și s-au incubat timp de 18 h la 4 ^{o}C. Electrozii funcționalizați, s-au clătit cu PBS. Astfel, au fost pregătite cipurile pentru absorbția antigenelor CD.

Concentrațiile de antigen folosite au fost:

- **CD3+,** concentrație **0,75 ng/mL**;
- **CD4+,** concentrație **3 ng/mL**;
- **CD8+,** concentrație **3 ng/mL**.

Acestea au fost incubate timp de 20 de minute. După incubarea antigenelor, s-au spălat foarte bine cipurile cu PBS.

- **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+, în Fig. 9.55 sunt prezentate cele pentru subpopulația CD4+, iar în Fig. 9.56 sunt prezentate graficele pentru subpopulația CD8+.

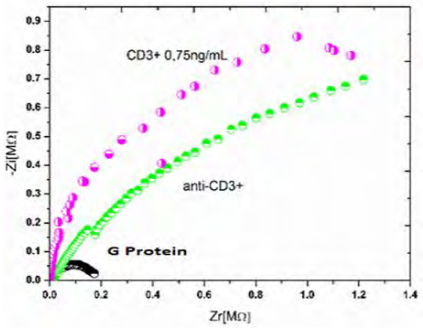


Fig. 9.54. Diagramele Nyquist pentru antigenul CD3+ [M17]

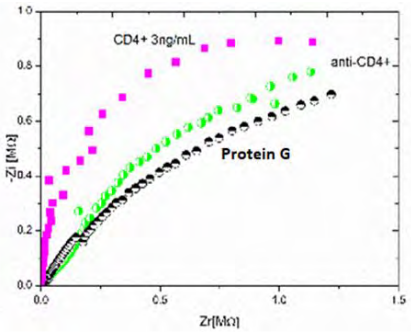


Fig. 9.55. Diagramele Nyquist pentru antigenul CD4+ [M17]

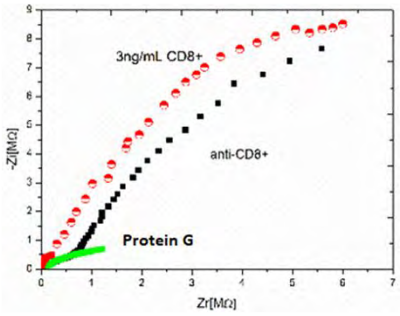


Fig. 9.56. Diagramele Nyquist pentru antigenul CD8+ [M17]

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, Rct / R_{ct0} = 0,85 / 0,07 = 12,14;
– pentru CD4, Rct / R_{ct0} = 0,9 / 0,7 = 1,28;
– pentru CD8, Rct / 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 funcționalizării, 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

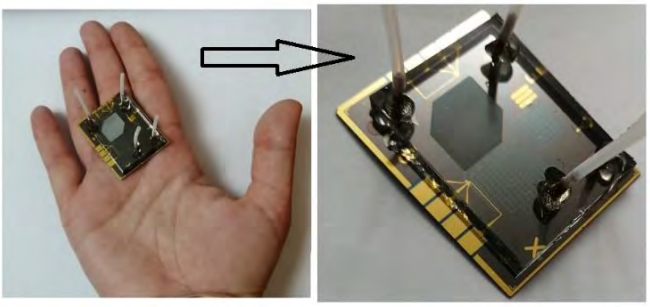


Fig. 9.58. Prototipul îmbunătățit al dispozitivului micro-electro-mecanic realizat fizic

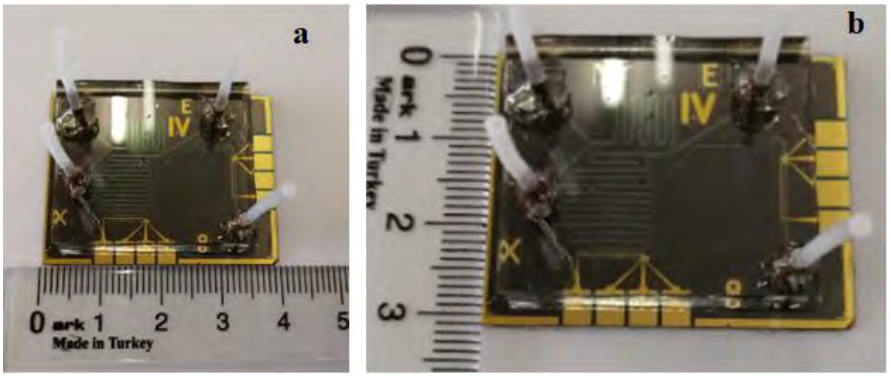


Fig. 9.59. Dimensiunile dispozitivului microfluidic:
a) lungime, b) lățime

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.

KIT-ul de dezvoltare a software-ului furnizat pentru placa de dezvoltare, poate fi instalat pe dispozitive portabile, precum: laptop, tabletă sau telefon inteligent.

Odată ce programul este instalat și parametrii sunt setați, interpretarea rezultatelor se poate face direct, în doar câteva minute.

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 ca și la echipamentul cu ajutorul căruia a fost testat dispozitivul, acesta fiind setat din calculator (Fig. 9.60).

Interpretarea rezultatelor se face folosind curbele de calibrare obținute de către instituții medicale specializate, testând un număr suficient de pacienți – cerință obligatorie pentru o interpretare statistică.

Orice ambulanță sau cabinet medical pot fi dotate cu un astfel de dispozitiv, el fiind re-utilizabil. De asemenea, dacă cineva dorește să aibă un asemenea dispozitiv acasă, poate interpreta personal rezultatele, întrucât nu este nevoie de personal cu pregătire specializată pentru acest lucru [O3].

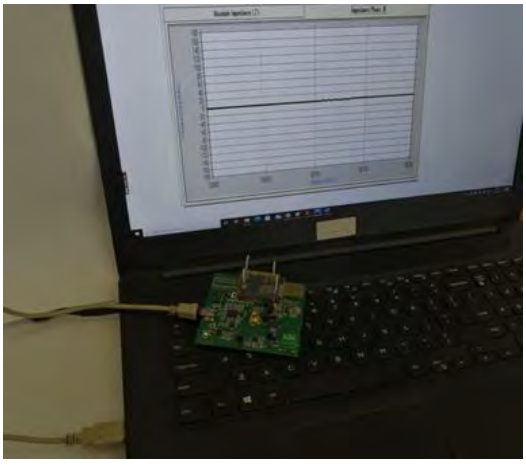


Fig. 9.60. Conectarea la laptop prin cablu USB a plăcii de control

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 capabilitatea 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].

Echipamentul Tira are domeniul de frecvență Dc-3000Hz; accelerație maximă sinusoidal/ aleatoare/șoc: 59/59/119 g, și amplitudine maximă vârf la vârf: 50,8 mm. Masa maximă a unui dispozitiv testat este de 50 kg [*17]. Echipamentul este prezentat în Fig. 9.61.

Pentru efectuarea testelor, a fost necesară fixarea probei pe masa de control. Pentru a realiza acest lucru, s-a folosit un dispozitiv de fixare pe masa de vibrat, care a fost realizat cu ajutorul unei imprimante 3D Printer cu fotopolimerizare (model „SLS Formiga P100, EOS, 2008”) din cadrul IMT [*17], prezentat în Fig. 9.62.

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. 9.61. Echipamentul Shaker Tira TV 55240/LS-180 și amplificator Tira A101 1 010 [*17]



Fig. 9.62. Suportul fabricat cu ajutorul Imprimantei 3D pentru testarea la vibrații

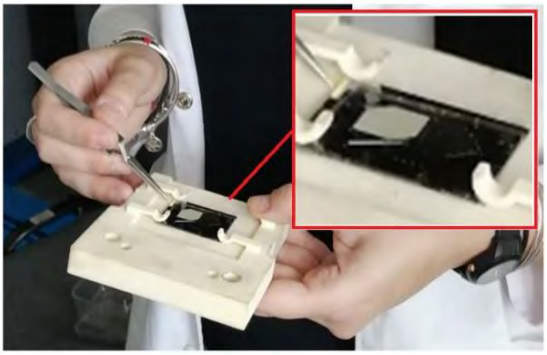


Fig. 9.63. Prinderea dispozitivului în suportul fabricat cu ajutorul tehnologiei 3D printing



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

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 ºC și o umiditate relativă de 37 %. Parametrii stabiliți pentru vibrații au fost:

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

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

a. Vibrații aleatoare pe axa X:

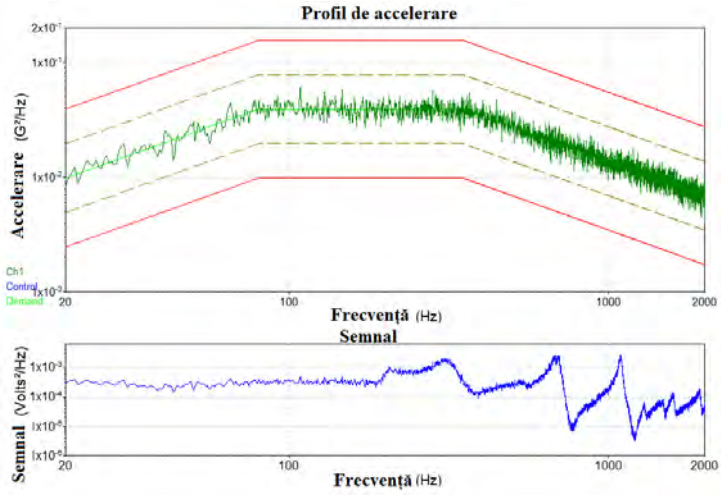


Fig. 9.65. Rezultate vibrații aleatoare pe axa X

b. Vibrații aleatoare pe axa Y:

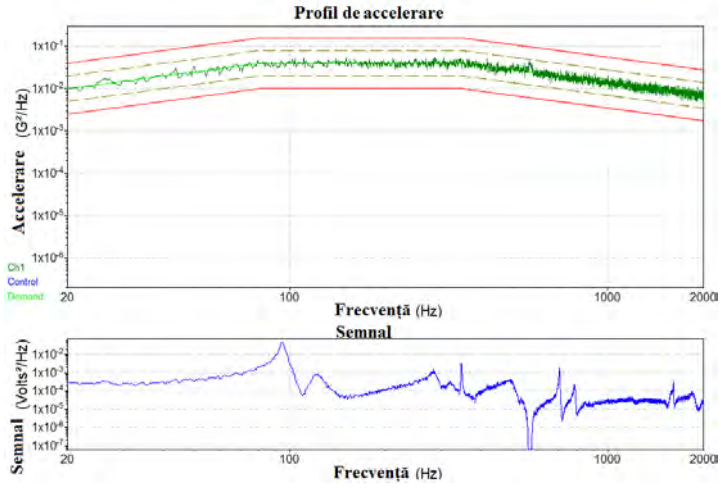


Fig. 9.66. Rezultate vibrații aleatoare pe axa Y

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.

Tabelul 9.5. **Parametrii obținuți la testările la vibrații**

Frecventa	G²/Hz	dB/Octave
20 Hz	0.009829	3

80 Hz	0.03913	**0**
350 Hz	0.03913	-3
2000 Hz	0.006889	
Axa *x*		
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	
Axa *y*		
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	

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

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 apoximativ 1 mm (Fig. 9.67).

Testele de temperatură au constat în realizarea a șase cicluri termice de la -30 ºC la +60 ºC, folosind echipamentul CH 250 Angelantoni (Agilent Technologies, USA) [*17]. Acest echipament, conține o cameră climatică în care temperatura şi umiditatea sunt controlate. În acest tip de cameră, se pot realiza încercări combinate: vibraţii + condiţii de climă. Plaja de temperaturi se situează între -40 ºC și +180 ºC. Domeniul umidităţii relative este de 20 - 95% (între 10 şi 80 ºC), iar viteza maximă de încălzire/răcire este de 2 ºC/min.

Testările pe echipamentul CH 250 Angelantoni (Fig. 9.68.a.) se realizează folosind norme specifice (Fig. 9.68.b).

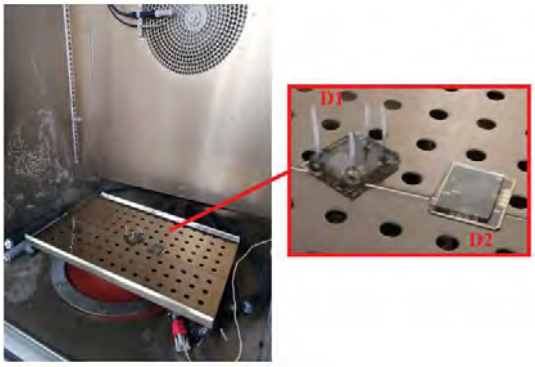


Fig. 9.67. Introducerea celor două probe în camera de testare :
D1 – dispozitiv micro-electro mecanic cu strat gros de PDMS; *D2* – dispozitiv micro-electro mecanic cu strat subțire de PDMS



b

Stabilitatea la acțiunea temperaturii ridicate a mediului	Stabilitatea la acțiunea temperaturii scăzute a mediului
- Produsul trebuie să-şi menţină capacitatea de funcţionare şi să-şi păstreze aspectul exterior în timpul şi după acţiunea temperaturii ridicate. - MIL-STD-810G - Metoda 501.5 - Categoria climatică A2 (Basic Hot) +60 °C, 14 % RH - Durata: 96 ore stocare + 72 ore operațional	- Produsul trebuie să-şi menţină capacitatea de funcţionare şi să-şi păstreze aspectul exterior în timpul şi după acţiunea temperaturii scăzute. - MIL-STD-810G - Metoda 502.5 - Categoria climatică C1 (Basic Cold) - 30 °C, 14 % u.r. - Durata: 96 ore stocare + 72 ore operațional

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

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

Tabelul 9.6. **Parametrii ciclurilor termice efectuate**

Timp [min]	**05**	**10**	**15**	**20**	**25**	**30**	**35**	**40**	**45**	**50**	**55**	**60**
Temperatura [ºC]	-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

Variațiile de temperatură sunt prezentate în Fig. 9.69.

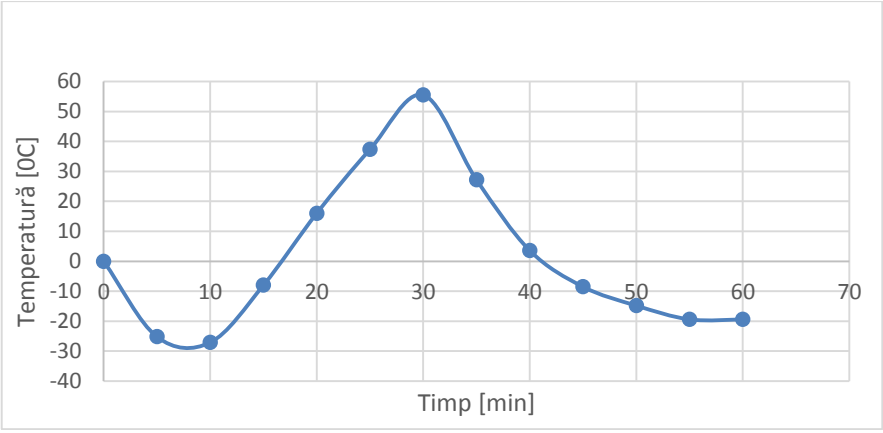


Fig. 9.69. Variațiile de temperatură pentru ciclurile termice

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. 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.

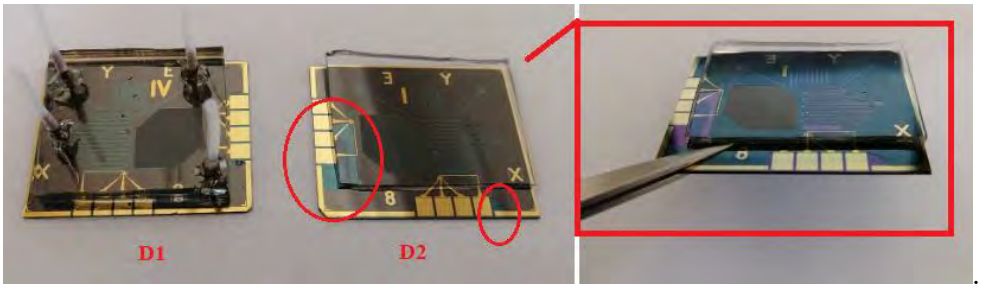


Fig. 9.70. Inspecția celor două dispozitive după realizarea ciclurilor termice

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

În cazul dispozitivelor biomedicale, foarte importante sunt condițiile în care aceste dispozitive sunt depozitate. Un factor important îl reprezintă umiditatea. Aceasta se poate monitoriza cu ajutorul senzorilor de umiditate.

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.

Dintre materialele folosite în construcția MEMS-urilor fac parte materialele pe bază de carbon, prezentate în cadrul lucrării, cât și materiale noi, ce au la bază aceste materiale carbonice.

Aceste combinații de materiale au fost folosite pentru depunerea stratului senzitiv. Grafena, nanohornurile carbonice (CNH) sau nanotuburile carbonice (CNT) au proprietatea de a se adapta micro-dispozitivelor folosite în sănătate.

Dintre combinațiile noi de materiale cercetate în cadrul IMT, care au fost folosite cu succes pentru realizarea unor senzori de umiditate, se menționează compoziția realizată din polivinilpirolidonă (PVP) și nanohornuri de carbon oxidate - oxCNH (1/1, g / g) [Ș1].

Dispersia s-a realizat cu 2 mg de oxCNH în 3 ml alcool izopropilic, care au fost supuse unei etape de ultrasonificare. Domeniul acusticii care cuprinde undele de înaltă frecvență, cu valori peste 20kHz, este reprezentat de ultrasunete [M15].

Etapa de ultrasonificare a fost realizată cu echipamentul Hielscher Ultrasonics UP200 St [*9], folosind o frecvență de lucru de 45 kHz, timp de 30 min. Puterea maximă pe care acest echipament o poate atinge este de 200 W. Ultrasonificarea ajută la obținerea unui strat omogen. Stratul senzitiv de detecție a umidității trebuie să fie omogen și grosimea acestuia trebuie să fie optimizată pentru a obține un răspuns rapid și stabil. Vibrațiile longitudinale ale sonotrodului pe direcția z au amplitudinea în intervalul dimensional de 9 - 240 μm [C16].

S-au adăugat 2 mg PVP în prima dispersie și au fost supuse din nou procesului de ultra-sonificare.

Soluția obținută a fost testată atât pe un senzor comercial cât și pe unul realizat în cadrul IMT, pentru a putea realiza o comparație și a vedea care substrat este optim.

Senzorul cu noul strat senzitiv depus, testat anterior [Ș3], a fost fabricat în cadrul IMT. S-au stabilit dimensiunile pentru senzorul Si/SiO_2 (Fig. 9.71) după care a fost proiectat în programul special de *layere* folosit pentru scrierea măștilor - CleWin5. Dimensiunile senzorului au fost de 20 x 11mm (Fig. 9.72). Senzorul are 100 de perechi de electrozi interdigitați. Pentru acest senzor, a fost necesară fabricarea unei singure măști [M25].

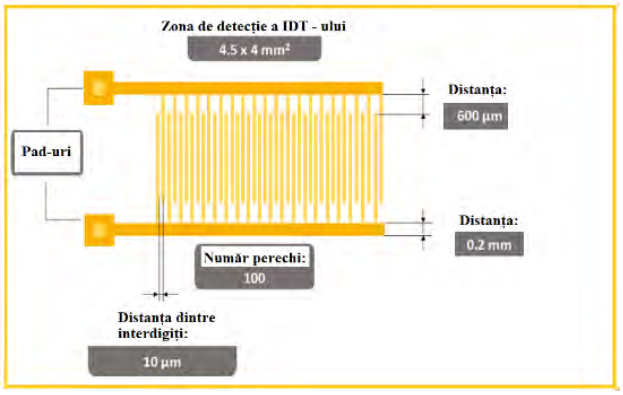


Fig. 9.71. Proiectarea senzorului [M25]

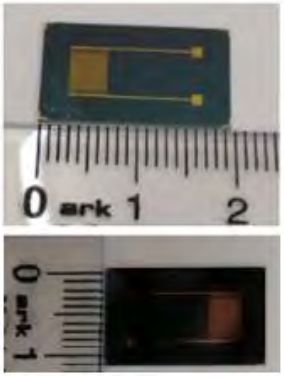


Fig. 9.72. Dimensiunile senzorului [M25]

Fluxul tehnologic cu substratul și dispunerea straturilor de materiale depuse (Fig. 9.73), după care au fost realizați senzorii, este unul care conține un număr redus de etape. S-a ales ca substrat o plachetă de siliciu, peste care s-a depus un strat de oxid de siliciu (SiO_2) de 1 µm. Apoi a urmat etapa de fotolitografie: 1) depunerea fotorezistului; 2) alinierea și expunerea măștii; 3) developarea. S-au depus apoi succesiv 10 nm crom (Cr) și 100 nm aur (Au). S-a realizat un proces de lift-off pentru a înlătura materialul nedorit de pe plachetă precum și fotorezistul rămas. Astfel, au rămas pe plachetă doar zonele de interes [M25].

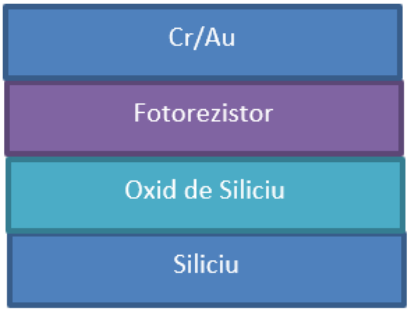
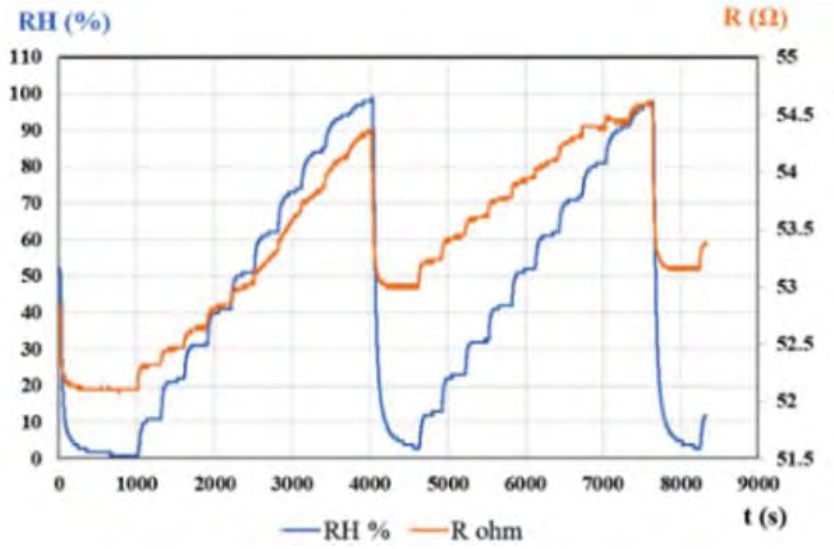


Fig. 9.73. Dispunerea straturilor din cadrul fluxului tehnologic de realizare a senzorului de umiditate

Pentru testare, s-a folosit un echipament de determinare a umidității, marca proprie IMT București [M24]. Echipamentul folosește un senzor comercial Sensirion [*41]. În Fig. 9.74 sunt prezentate rezultatele obținute pentru testarea la umiditate cu un strat senzitiv depus [Ș3].



R - curba pentru PVP/oxSWCNHS 1/1
RH - curba ce corespunde senzorului comercial folosit ca referință

Fig. 9.74. Răspunsul senzorului comercial (albastru) și al senzorului fabricat cu substrat de siliciu cu un strat depus (portocaliu) [Ș3]

Din acest grafic, se poate observa răspunsul liniar dat de senzorul fabricat pe substrat de siliciu în comparație cu senzorul comercial. Se constată faptul că senzorul răspunde la variațiile de umiditate.

Senzorii comerciali sunt senzori flexibili din substrat de plastic care conțin electrozi interdigitați din aur. Dimensiunile senzorilor au fost de 22,8 x 7 x 0,175 mm, cu interdigiți ce au dimensiuni de 50 µm. Acești senzori au fost achiziționați de la firma Dropsens (Metrohm DropSense, Ovideo, Spania) [*28].

Dispersia rezultată a soluției PVP / Ox-SWCNHs a fost depusă în opt straturi succesive prin metoda „turnare prin picurare” pe structurile de detecție interdigitată (interdigital transducer - IDT) ale ambelor tipuri de senzori. S-au depus opt straturi pentru testare.

Pentru senzorul din poliamidă, s-a obținut o rezistență de 6,3 kΩ la opt straturi depuse (Fig. 9.75).

Apoi, senzorul a fost testat la umiditate (Fig. 9.76), folosind drept comparație senzorul de umiditate comercial - Sensirion.

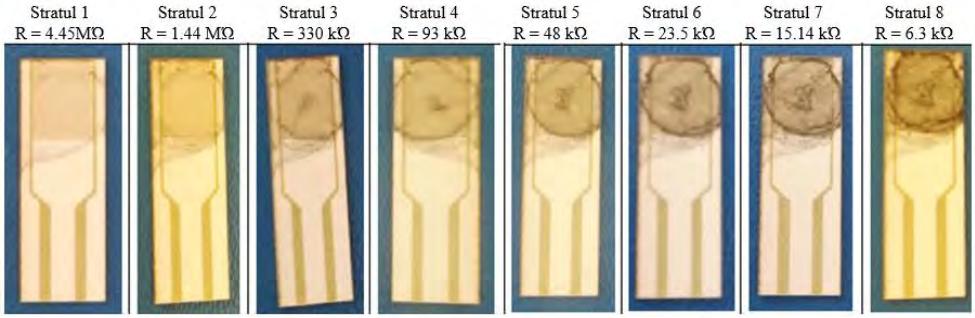


Fig. 9.75. Rezistenţele obţinute pentru cele opt straturi [M24]

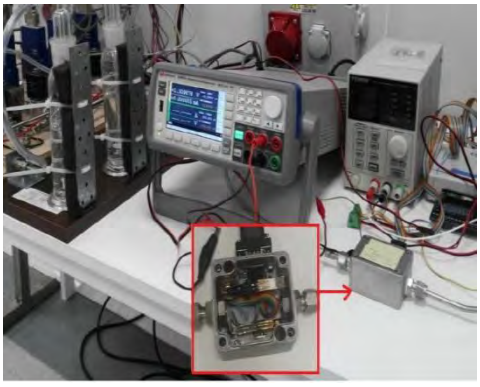
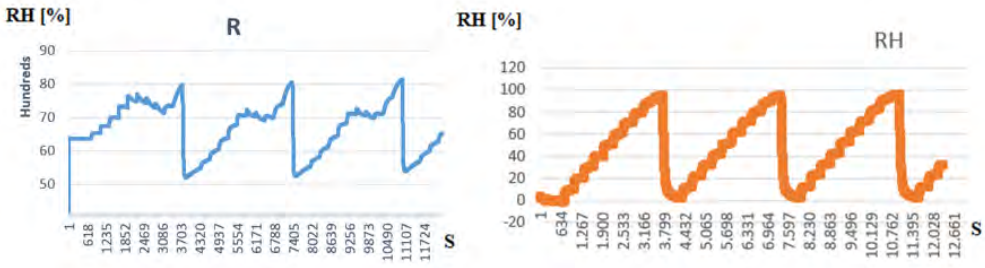


Fig. 9.76. Echipamentul folosit pentru determinarea umidităţii [M24]

În graficul din Fig. 9.77, sunt prezentate răspunsurile senzorului cu substrat de poliamidă peste care s-au depus cele opt straturi (albastru), în comparaţie cu senzorul comercial Sensirion (portocaliu).



R - curba pentru PVP/oxSWCNHS 1/1
RH - curba ce corespunde senzorului comercial folosit ca referinţă

Fig. 9.77. Răspunsul senzorului comercial (albastru) şi al senzorilor fabricaţi cu substrat de siliciu (portocaliu)

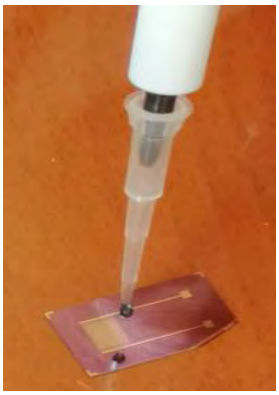


Fig. 9.78. Depunerea stratului senzitiv

Din graficele prezentate, se poate observa un răspuns adecvat la ambii senzori și sensibilitate RH bună a senzorilor comparativ cu senzorul comercial, atunci când RH variază de la 0 % până la 90 % în mediu de aer umed. Diferența dintre cei doi senzori este dată de faptul că senzorul pe substrat de siliciu are avantajul constând într-un răspuns liniar [M24], [M25], [Ș1]. Din această cauză, acest senzor a fost utilizat în testele următoare, testări mecanice.

S-au depus opt straturi de soluție PVP/oxCNH folosită ca strat senzitiv în zona de interes prin metoda de „picurare" (Fig. 9.78) și pentru senzorul Si/SiO_2. Fiecare strat depus conține 2 µL de soluție. După fiecare depunere, s-a măsurat rezistența electrică (Fig. 9.79) cu echipamentul Keithley 2700 Multimeter/Data Aquisition System [*9] (Fig. 9.80).

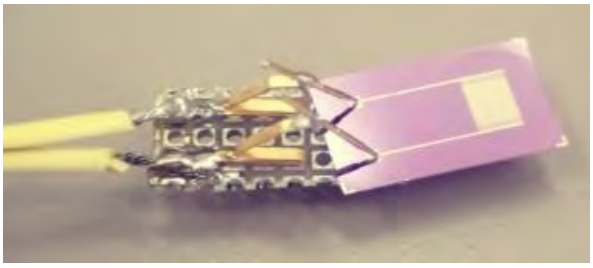


Fig. 9.79. Determinarea rezistențelor [M25]



Fig. 9.80. Echipamentul Keithley 2700

Valorile rezistențelor senzorului fabricat pe siliciu sunt redate în Tabelul 9.7.

Tabelul 9.7. **Rezistențele celor opt straturi [M25]**

	Nr. straturi							
	1S	2S	3S	4S	5S	6S	7S	8S
R [Ω]	838	827	814	798	742	705	640	562

S-a constatat diferența rezistențelor dintre straturile depuse pe siliciu și cele depuse pe poliamidă (Fig. 9.75 și Tabelul 9.7). Aceste diferențe sunt date de dimensiunile interdigiților (50 µm vs. 10 µm). Din această cauză, senzorii cu substrat din plastic au rezistențe mai mari.

Straturile de nanocompozite bazate pe ox-SWCNHs / PVP, care s-au dovedit a fi straturi excelente de detectare a umidității relative (RH), au fost testate mecanic și termic. Scopul testelor este dublu: a) să identifice corelația dintre proprietățile lor

mecanice și electrice, permițând astfel un proiect viitor optimizat al unui senzor RH, pe un substrat rigid; b) verificarea rezistenței la mediu.

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].

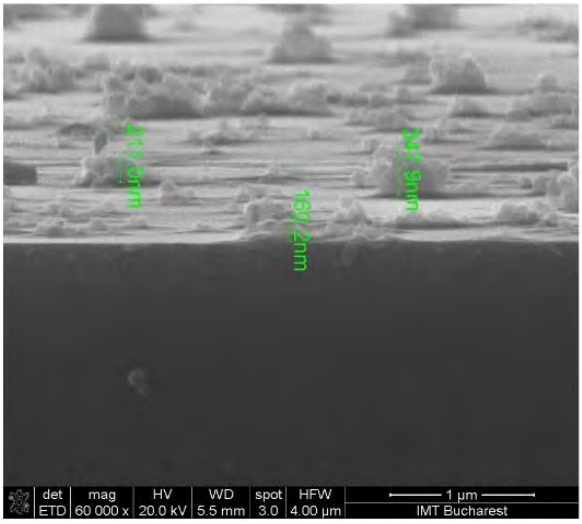


Fig. 9.81. Imagini SEM pentru proba cu un strat [M25]

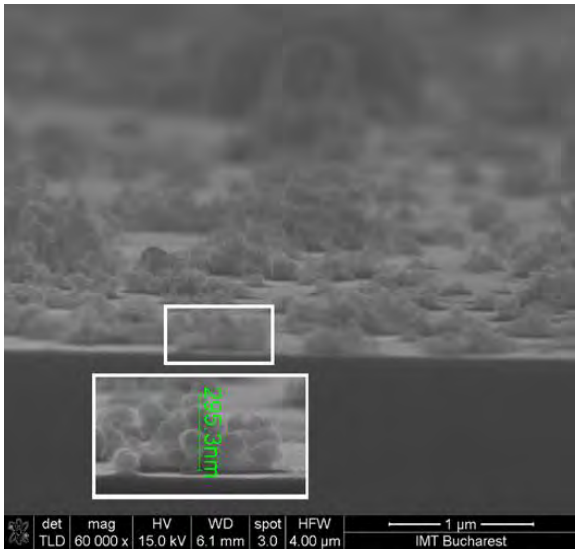


Fig. 9.82. Imagini SEM pentru proba cu patru straturi [M25]

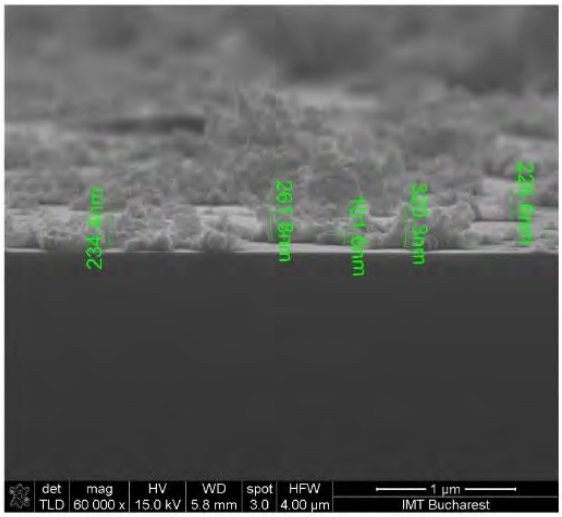


Fig. 9.83. Imagini sem pentru proba cu opt straturi [M25]

Totodată, a fost studiată și reacția senzorilor la testări mecanice și termice. Testarea mecanică a fost utilizată pentru a determina ciclul de viață al materialelor sau componentelor. Testarea a fost efectuată pe structurile Si/SiO_2 cu IDT (20 x 11 mm). Probele au fost diferențiate prin numărul de straturi obținute prin "turnare prin picurare" (de la 1 la 8 straturi).

Fiecare probă a trecut printr-un test de sarcină compresivă, utilizând aparatul Mecmesin Multitest 2.5-i (United Kingdom) [*9], [*25] (Fig. 9.84).



Fig. 9.84. Echipamentul MecmesinMultitest [M25]

Sarcina maximă pentru teste a fost fixată la 20 N. Această valoare a fost stabilită în urma testelor efectuate, în cadrul cărora s-a determinat că valoarea sarcinii maxime de rupere a fost de 23 N (Fig. 9.85) [M25].

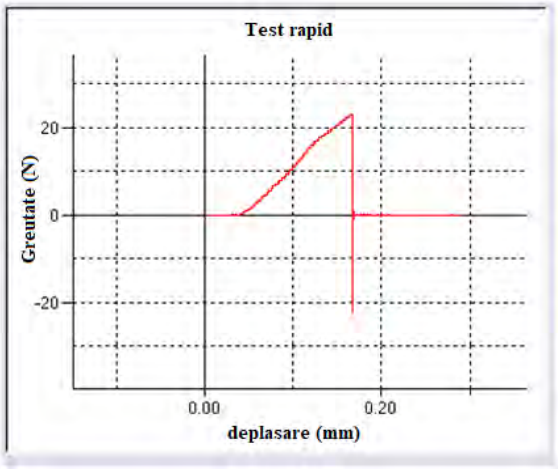


Fig. 9.85. Distrugerea eşantionului la o forţă de 23 N [M25]

Datele din răspunsurile tipice (forţa de încărcare vs. deplasare) din testele mecanice au fost colectate şi analizate în continuare (Fig. 9.86 pentru proba cu un strat (1S) şi Fig. 9.87 pentru proba cu opt straturi – 8S). În primul rând, trebuie remarcat faptul că panta celor două caracteristici se schimbă în timpul măsurătorilor (la aproximativ 10 N pentru proba 1S şi la aproximativ 8 N pentru proba 8S) [M25].

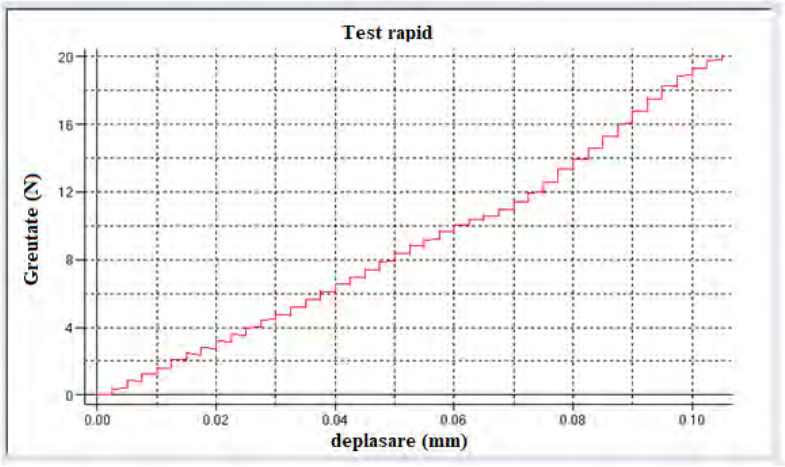


Fig. 9.86. Răspunsul la testele mecanice pentru proba cu un strat [M25]

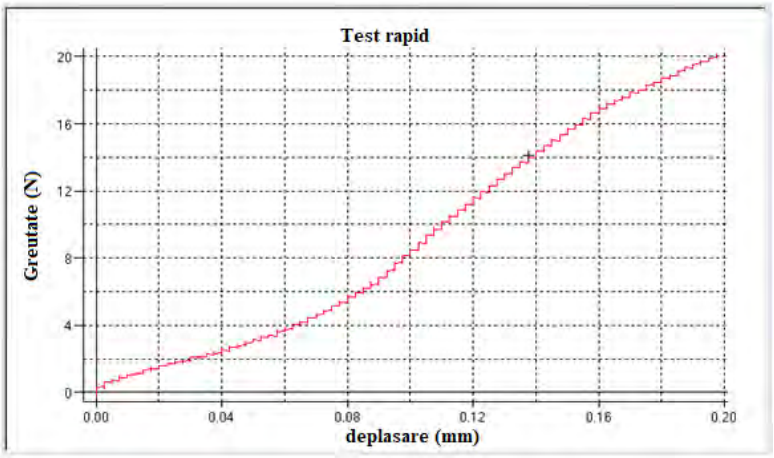


Fig. 9.87. Răspunsul la testele mecanice pentru proba cu opt straturi [M25]

Analizând cele două grafice, se poate observa că valorile deplasărilor deformațiilor sunt destul de diferite între cele două probe: 0,11 mm în cazul 1S și 0, 20 mm pentru proba 8S la forța de încărcare maximă, de 20 N. Modulul de elasticitate al lui Young (E) a fost determinat folosind ecuația:

$$E \equiv \frac{\sigma(\varepsilon)}{\varepsilon} = \frac{F/A}{\Delta L/L_0} \qquad (10.1.)$$

unde: σ este efortul unitar; Ɛ – deformația relativă; F – forța exercitată asupra probei; ΔL – variația dimensiunii probei; L_0 – dimensiunea inițială a obiectului; A – aria probei pe care a fost aplicată F.

Modulul de elasticitate (E) a fost calculat pentru domeniul liniar pentru probele ce conțin unu și opt straturi (Tabelul 9.8).

Tabelul 9.8. **Modulul de elasticitate al lui Young [M25]**

	F (N)	ΔL (mm)	L_0 (mm)	A (mm^2)	E (MPa)
Nr. de straturi					
1	10	0.06	20	484	6.88
8	4	0.06	20	484	2.75

S-au analizat toate cele opt grafice rezultate în urma experimentelor mecanice, iar rezultatele au fost cumulate în graficul prezentat în Fig. 9.88.

Rezultatele experimentelor efectuate au indicat o schimbare a proprietăților mecanice ale straturilor sensibile cu grosimea (adică o scădere a modulului lui Young). Valoarea elasticității senzorului cu stratul sensibil care constă din opt straturi a fost E = 3,99 MPa (redusă de la 8,33 MPa pentru 1S). Acest comportament a fost

însoțit de schimbări ale rezistenței electrice a straturilor, de la 838 Ω la 562 Ω, după cum se poate observa și în graficul din Fig. 9.87 [M25].

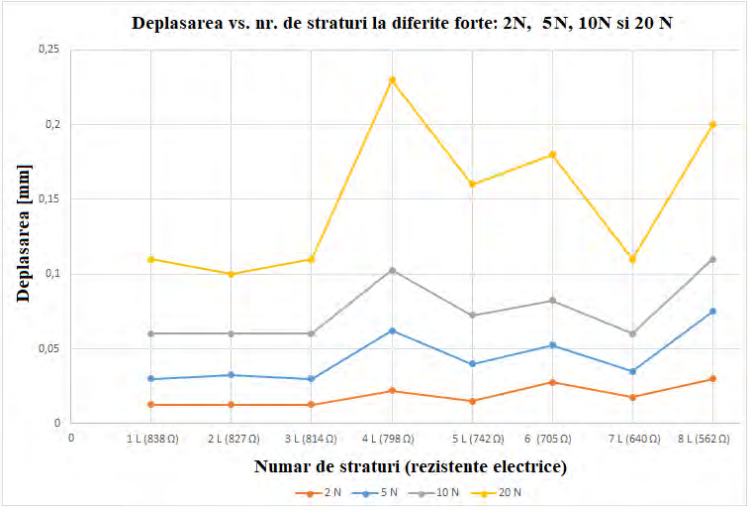


Fig. 9.88. Graficul de deplasare în funcție de sarcină [M25]

Pentru a investiga schimbările potențiale induse de temperatură, a fost utilizat un compresor Cryogenics 8200 (model CCS-450) [*9] pentru testarea la temperaturi sub 50 ºC (Fig. 9.89). S-au folosit două probe (unu și respectiv opt straturi) pentru testare, pentru a evalua reacția stratului sensibil la diferite temperaturi ale mediului. Probele colectate (Fig. 9.90) au fost supuse apoi unui tratament termic de +50 ºC, folosind un cuptor termic Memmert (Memmert, Germania) [*9], [*26] (Fig. 9.91).



Fig. 9.89. Echipamentul Cryogenics 8200



Fig. 9.90. Colectarea probelor



Fig. 9.91. Cuptoare termice Memmert

Imaginile de microscopie optică, realizate cu microscopul Leica DM LM (Leica Microsystems, Germania) [*9], [*29] înainte și după experimentele de temperatură la +50 ºC și -50 ºC sunt prezentate în Fig. 9.92. Nu au fost înregistrate diferențe

semnificative pentru probele expuse la temperaturi extreme, astfel încât nu au fost necesare teste suplimentare.

Proprietățile funcționale ale straturilor au fost complet păstrate după testele termice [M25].

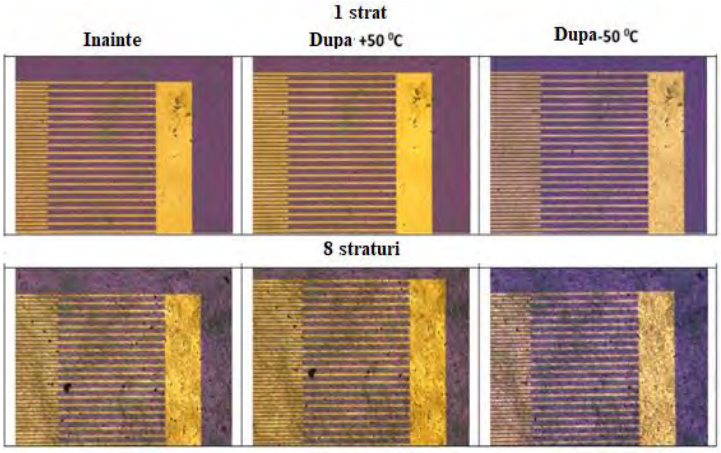


Fig. 9.92. Imagini realizate cu ajutorul microscopului optic după realizarea testelor termice [M25]

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.

10.
CONCLUZII

În urma analizei critice a stadiului actual al domeniului abordat din prima parte a lucrării 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 ajutorulor 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 nouă 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 obiectivul principal al lucrării: 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 (interdigitați) de referinţă 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*, obţinut prin integrarea unor senzori electrochimici interdigitați 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 *prototipul 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 constat 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 lucrării.

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.

BIBLIOGRAFIE

[A1] Abbasi, S., *Adsorption of dye organic pollutant using magnetic ZnO embedded on surface of graphene oxide,* Journal of inorganic and organometallic. Polymers, 2019.

[A2] Agrawal, R., Wang, C., *Laser Beam Machining* in Encyclopedia of Nanotechnology, Bhushan B. (Ed.), Springer Science, second edition, pp. 1739-1752, 2016.

[A3] Ajanth, P., Sudeepthi, A., Sen, A.K., *Microfluidics Technology for Label-Free Isolation of Circulating Tumor Cells,* in J. Inst. Eng. India Ser. C, **vol. 101,** no. 6, pp.1051–1071, 2020.

[A4] Ali, M.A., Mondal, K., Jiao, Y., Oren, S., Xu Z., Sharma, A., Dong L., *Microfluidic immuno-biochip for detection of breast cancer biomarkers using hierarchical composite of porous graphene and titanium dioxide nanofibers*, ACS Applied Materials and Interfaces, **vol. 8**, no. 32, pp. 20570−20582, 2016.

[A5] Alqurashi, T., Alnufaili, M., Hassan, M.U., Aloufi, S., Yetisen, A.K., Butt H., *Laser inscription of microfluidic devices for biological assays*, Applied Materials and Interfaces, **vol. 11**, no. 13, pp. 12253−12260, 2019.

[A6] Aramwit, P., *Introduction to biomaterials for wound healing,* Wound Healing Biomaterials, **vol. 2,** Functional Biomaterials, pp. 3–38*,* 2016.

[A7] Arbabian, M.A., Chien, J.C., *Massive microfluidics for multiplexed counting*, Patent No. US 0039060, 2019.

[A8] Armeanu, A., David, E., **Marinescu, R.,** Badescu, V., *Hydrogen production by non-conventional biomass pyrolysis process and environmental impact*, Nonconventional Technologies Review, **vol. 23**, no. 4, pp. 28-34, 2019.

[A9] Averill, B., Eldredge, P., *General Chemistry: Principles, Patterns, and Applications*, Ed. Saylor Foundation, 2011.

[A10] Avram, A., Avram. M., *Design and fabrication of new microfluidic valves*, 2007 International Semiconductor Conference, IEEE Xplore, pp. 559-562, 2007.

[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., *Microbionsesors for electrical impedance spectroscopic study of melanoma cells*, Proceedings of International Semiconductor Conference (CAS), pp. 165-168, 2012.

[A13] Avram, M., Avram, A.M., Bragaru, A., Ghiu, A., Iliescu, C., *Plasma Surface Modification for Selective Hydrophobic Control*, Romanian Journal of Information Science and Technology, **vol. 11**, no. 4, pp. 409-422, 2008.

[A14] Avram, M., Avram, A., Iliescu, C., *Biodynamical analysis microfluidic system,* Microelectronic Engineering, **vol. 83**, no. 4-9, pp. 1688–1691, 2006.

[A15] Avram, M., Rădoi, A.M., Avram, M.A., Bălan, C.M., Mărculescu, C.V., *Procedeu de realizare a dispozitivului dielectroforetic pentru caracterizarea dielectrică a lipozomilor autoasamblați în canale microfluidice*, BOPI nr.9/2015, IMT București, Nr. Cerere de brevet: A 2014 00025.

[B1] Bai, W., Kuang, T., Chitrakar, C., Yang, R., Li, S., Zhu, D., Chang, L., *Patchable micro/nanodevices interacting with skin,* Biosensors and Bioelectronics, **vol. 122**, pp. 189-204, 2018.

[B2] Banu, A., Marcu, M., Pirvu, C., *New uses of nanocomposite materials with polymeric matrix for environmental monitorization*, Nonconventional technologies review, no.1, 2007.

[B3] Barbot, A., Decanini, D., Hwang, G., *On-chip microfluidic multimodal swimmer toward 3D navigation*, Scientific Reports, **vol. 6**, no. 1, pp. 1-8, 2016.

[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.

[B5] Băjenescu T.M., *Micro-comutatoare RF MEMS: fiabilitate, moduri si mecanisme de defectare*, Meridian Ingineresc, **vol. 5**, no. 3, pp. 11-17, 2013.

[B6] Băjenescu, T. M., Bâzu, M., *Mecanisme de defectare ale componentelor electronice*, Ed. Matrix Rom, București, 2012.

[B7] Bâzu, M., Băjenescu, T., *Failure analysis: a practical guide for manufacurers of electronic eomponents and systems*, Ed. Wiley, 2011.

[B8] Beck M., Brockhuis S., van der Velde N., Breukers C., Greve J., Terstappen L. W. M. M., *On chip sample preparation by controlled release of antibodies for simple CD4 counting,* Lab Chip, **vol. 12**, no. 1, pp. 167-173, 2012.

[B9] Bellouard, Y. J., *Microrobotics, microdevices based on shape memory alloys*, In M. Schwartz (Ed.), Encyclopedia of Smart Materials London: Wiley-Interscience, 2002.

[B10] Berrington, J. E., Barge, D., Fenton, A.C., Cant A.J., Spickett G.P., *Lymphocyte subsets in term and significantly preterm UK infants in the first year of life analysed by single platform flow cytometer*, Clin Exp Immunol, **vol. 140**, no. 2, pp. 289-292, 2005.

[B11] Bocsi, J., Mittag, A., Sack, U., Gerstner, A.O.H., Barten, M.J., Tarnok A., *Automated four color CD4/CD8 analysis of leukocytes by scanning fluorescence microscopy using quantum dots*, Cytometry Part A, **vol. 69A**, no. 3, pp. 131-134, 2006.

[B12] Bolundut, I.L., *Materiale și tehnologii neconvenționale*, Ed. Tehnico-Info Chișinău, 2012.

[B13] Boyle, D.S., Hawkins, K.R., Steele, M.S., Singhal, M., Cheng, X., *Emerging technologies for point-of-care CD4 T-lymphocyte counting*, Trends Biotechnol. **vol. 30**, no. 1, pp. 45-54, 2012.

[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.

[B16] Bulfoni, M., Gerratana, L., Ben, F.D., Marzinotto, S., Sorrentino, M., Turetta, M., Scoles G., Toffoletto, B., Isola, M., Beltrami, C.A., Di Loreto, C., Beltrami, A.P., Puglisi, F., Cesselli, D., *In patients with metastatic breast cancer the identification of circulating tumor cells in epithelial-to-mesenchymal transition is associated with a poor prognosis*, Breast Cancer Res. **vol. 18**, no. 1, 2016.

[B17] Burinaru T. A., Avram M., Avram A., **Marinescu R.,** Mărculescu C., Ţîncu B., Ţucureanu V., Matei A., Voiţincu C., Militaru M., *Microfluidic device for circulating tumor cell quantification and capture*, AIP Conference Proceedings 2071, pp. 040006-1-040006-9, 2019.

[B18] Burinaru, T.A., Volmer, M., Avram, M., Țucureanu, V., Avram, A., Țîncu, B., Mărculescu, C., Matei, A., **Marinescu, R.**, Militaru, M., *Antibody functionalized magnetic nanoparticles for circulating tumor cells detection and capture using magnetophoresis*, IOP Conference Series: Materials Science and Engineering, **vol. 485**, no. 1, 2019.

[C1] Calderon-Moreno, J.M., Preda, S., Predoana, L., Zaharescu, M., Anastasescu, M., Nicolescu, M., Stoica, M., Stroescu, H., Gartner, M., Buiu, O., Serban, B., *Effect of polyethylene glycol on porous transparent TiO2 films prepared by sol–gel method,* Ceramics International, **vol. 40**, no. 1, pp. 2209–2220, 2014.

[C2] Campbell, S.A., *The science and engineering of microelectronic fabrication*, Oxford University Press, 2001.

[C3] Castillo, R.C., *Functional Nanostructures fabricated by focused electron/ion beam induced deposition*, Ed. Springer, 2014.

[C4] Cavalu, S., Antoniac, I. V., Mohan, A., Bodog, F., Doicin, C., Mates, I., Ulmeanu, M., Murzac, R., Semenescu, A., *Nanoparticles and Nanostructured Surface Fabrication for Innovative Cranial and Maxillofacial Surgery,* Materials, **vol. 13**, no. 23, pp. 5391, 2020.

[C5] Căldăraru, M., Căldăraru, F., *Introducere în Microelectronică - curs universitar*, Ed. Cavallioti, 2009.

[C6] Celada, F., Perni, B., *T Lymphocytes Structure, Functions, Choices,* Ed. Plenum Press, New York, 1992.

[C7] Chalupniak, A., Morales-Narvaez, E., Merkoci, A., *Micro and nanomotors in diagnostics*, Advanced drug delivery reviews, **vol. 95**, pp. 104-116, 2015.

[C8] Chand, R., Neethirajan, S., *Microfluidic platform integrated with graphene-gold nano-composite aptasensor for one-step detection of norovirus,* Biosensors and Bioelectronics, **vol. 98**, pp. 47–53, 2017.

[C9] Chen, J., Liu, C.Y., Wang, X., Sweet, E., Liu, N., Gong, X., Lin, L., *3D printed microfluidic devices for circulating tumor cells (CTCs) isolation",* Biosensors and Bioelectronics, **vol. 150**, 111900, 2020.

[C10] Chen, Q., Ge, F., Cui, W., Wang, F., Yang, Z., Guo, Y., Li, L., Bremner, R.M., Lin, P.P., *Lung cancer circulating tumor cells isolated by the EpCAM-independent enrichment strategy correlate with Cytokeratin 19-derived CYFRA21-1 and pathological staging*, Chimica Acta**, vol. 419**, 18, pp 57-61, 2013.

[C11] Chen, Y., Zhang, L., Chen, G., *Fabrication, modification, and application of poly(methyl methacrylate) microfluidic chips,* Electrophoresis, **vol. 29**, no. 9, pp. 1801–1814, 2008.

[C12] Cheung, K., Gawad, S., Renaud, P., *Impedance spectroscopy flow cytometry: On-chip label-free cell differentiation,* Cytometry A, **vol. 65A**, no. 2, pp. 124-132, 2005.

[C13] Chinniah. C., Aguarin. L., Cheng. P., Decesaris. C., Cutillo. A., Berman. A.T., Frick, M., Doucette, A., Cengel, K.A., Levin, W., Hahn, S., Dorsey, J.F., Simone, C.B., Kao, G.D., *Early detection of recurrence in patients with locally advanced non–small-cell lung cancer via circulating tumor cell analysis*, Clinical Lung Cancer, **vol. 20**, no. 5, pp. 384-390, 2019.

[C14] Chiu, P.L., Chang, C.H., Lin, Y.L., Tsou, P.H., Li, B.R., *Rapid and Safe Isolation of Human Peripheral Blood B and T Lymphocytes through Spiral Microfluidic Channels,* Scientific Reports, **vol. 9,** no. 1, 2019.

[C15] Chiu, T.K., Chou, W-P., Huang, S.B, Wang, H.M., Lin, Y.C., Hsieh, C.H., et al. *Application of optically-induced-dielectrophoresis in microfluidic system for purification of circulating tumor cells for gene expression analysis-cancer cell line model, S*cientific Reports, vol. **6,** 32851, 2016.

[C16] Cobianu, C., Dumbravescu, N., Serban, B.C., Buiu, O., Romanitan, C., Comanescu, F., Danila, M., **Marinescu, R.**, Avramescu, V., Ionescu, O., *Sonochemically synthetized ZnO-Graphene nanohybrids and its characterization*, Reviews on Advanced Materials Science, **vol. 59**, pp. 176-187, 2020.

[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.

[C18] Cosson, S., Aeberli, L.G., Brandenberg, N., Lutolf, M.P., *Ultra-rapid prototyping of flexible, multi-layered microfluidic devices via razor writing,* Lab on a Chip, vol. 15, no. 1, 2014.

[C19] Cote, R., Datar, R., *Circulating Tumor Cells, Advances in Basic Science and Clinical Applications*, Ed. Springer, 2016.

[C20] Coteaţă, M., Floca, A., Dodun, O., Ionescu, N., Nagîţ, G., Slătineanu, L., *Pulse Generator for Obtaining Surfaces of Small Dimensions by Electrical Discharge Machining,* Procedia CIRP, **vol. 42**, pp. 715–720, 2016.

[D1] Dascălu, D., *Școala românească de micro- și nanoelectronică*, Editura Academia Romana Bucuresti, 2018.

[D2] Darwish, S., Ahmed, N., Alahmari, A. M., *Laser beam machining, laser beam hybrid machining, and micro-channels applications and fabrication techniques,* Machining, Joining and Modifications of Advanced Materials, **vol. 61**, chapter 17, Ed. Springer, pp 171-269, 2016.

[D3] Dawson, S. J., Tsui, D. W., Murtaza, M., Biggs, H., Rueda, O. M., Chin, S. F., Dunning, M. J., Gale, D., Forshew, T., Mahler-Araujo, B., Rajan, S., Humphray, S., Becq, J., Halsall, D., Wallis, M., Bentley, D., Caldas, C., Rosenfeld, N., *Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer*, N. Engl. J. Med., **vol. 368**, no. 13, pp. 1199–1209, 2013.

[D4] Do, L.Q., Bui, T.T., Hoang, B.A., Nhu, C.N., Thuy, H.T.T., Jen, C.P., Duc, T.C., *Biological living cell in-flow, detection based on microfluidic chip and compact signal processing circuit*, IEEE Transactions on Biomedical Circuits and Systems, **vol.14**, no. 6, pp. 1371 – 1380, 2020.

[D5] Doicin, C., *Analiză economică în inginerie*, Ed. Bren, București, 2009.

[D6] Doicin C., Ulmeanu M., *Product design and development: project guide and applications*, Ed. Bren, București, ISBN 978-606-610-220-9, 2018.

[D7] Drioli, E., Giorno, L. (Eds.), *Encyclopedia of Membranes,* Ed. Springer, 2016.

[D8] Dutta, P., Horiuchi, K., & Jubery, T. Z., *Microfluidic Circuits. Encyclopedia of Microfluidics and Nanofluidics,* **vol. 1–12**,doi:10.1007/978-3-642-27758-0_930-2, 2014.

[D9] Dzebic, M., Kurikov, O., Dobroliubov, O., Nava, O.C.A., *Design and fabrication of a PDMS microfluidic device for titration of biological solutions*, CMBEBIH 2017, Proceedings of the International Conference on Medical and Biological Engineering (IFMBE Proceedings), **vol. 62**, no. 217, pp 147-152, 2017.

[E1] Emerich, D.F., Thanos, C.G., *Nanotechnology and medicine,* Expert Opinion on Biological Therapy, **vol. 3**, no. 4, pp. 655–663*,* 2003.

[F1] Fan, J., Yudasaka, M., Miyawaki, J., Ajima, K., Murata, K., Iijima, S., *Control of Hole Opening in Single-Wall Carbon Nanotubes and Single-Wall Carbon Nanohorns Using Oxygen*, J. Phys. Chem. B, **vol. 110**, no. 4, pp. 1587 – 1591, 2006.

[F2] Freitas, R.A.. *Nanomedicine, Volume I: basic capabilities*, Ed. Landes Bioscience, 2000.

[G1] Geim, A.K., Novoselov, K.S., *The rise of graphene*, Nature Materials, **vol. 6**, no. 3, pp. 183-91, 2007.

[G2] Geim, A.K., *Graphene: Status and Prospects*, *Science,* **vol. 324,** no. 5934, pp.1530-1534, 2009.

[G3] Ghiculescu, D., *Prelucrări Neconvenționale*, Ed. Printech, București, 2004.

[G4] Ghiculescu, D., *Curs de Tehnologii Neconvenționale*, Universitatea Politehnica din București, platforma Moodle, 2021.

[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.

[G6] Gomez-Tourino, I., Arif, S., Eichmann, M., Peakman, M., *T cells in type 1 diabets: instructors, regulators and effectors: a comprehensive review*, Journal of Autoimmunity, **vol. 66**, pp. 7-16, 2016.

[H1] Hassan, U., Watkins, N.N., Edwards, C., Bashir, R., *Flow metering characterization within an electrical cell counting microfluidic device*, Lab on a Chip, **vol. 14**, no. 8, pp. 1469-1476, 2014.

[H2] Hassan, U., Watkins, N.N., Reddy, Jr B., Damhorst, G., Bashir, R., *Microfluidic differential immunocapture biochip for specific leukocyte counting*, Nat. Protoc., **vol. 11**, no. 4, pp. 714-726, 2016.

[I1] İçöz, K., Akar, U., Ünal, E., *Microfluidic Chip based direct triple antibody immunoassay for monitoring patient comparative response to leukemia treatment*, Biomedical Microdevices, **vol. 22**, no. 3, pp. 48, 2020.

[I2] Iliescu, C., Avram, A., Capitolul 15: *Metallization over nanoplanar surfaces,* Chemical Mineralogy, Smelting and Metallization, Nova Science Publishers, Editors: Eugene D. McLaughlin and Levan A. Breaux, pp. 289-314, 2009.

[I3] Iliescu, C., Chen, B.T., Poenar, D.P., Lee ,Y.Y., *PECVD amorphous silicon carbide membranes for cell culturing*, Sensors and Actuators B, vol. 129, no. 1, pp. 404-411, 2008.

[I4] Iliescu, C., Taylor, H., Avram, M., Miao, J., Franssila, S., *A practical guide for the fabrication of microfluidic devices using glass and silicon,* Biomicrofluidics, vol. 6, no. 1, 016505. doi:10.1063/1.3689939, 2012.

[I5] Islam, S., Shukl, S., Bajpai, V.K., Han, Y.K., Huh, Y.S., Ghosh, A., Gandhi, S., *Microfuidic-based graphene field efect transistor for femtomolar detection of chlorpyrifos*, Scientific Reports, **vol. 9,** no. 1, 2019.

[I6] Istrate, A.I., Năstase, F., Mihalache, I., Comănescu, F., Gavrilă, R., Tutunaru, O., Romanițan, C., Șchiopu, V., Nedelcu, M., Muller, R., *Synthesis and characterization of Ca doped ZnO thin films by sol–gel method, Journal of Sol-Gel Science and Technology*, **vol. 92**, no. 3, pp. 585-597, 2019.

[J1] Jackson, M.J., *Microfabrication and Nanomanufacturing*, Ed. Taylor & Francis Group, 2006.

[J2] Janna, W.S., *Introduction to Fluid Mechanics*, CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 2020.

[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.

[J4] Jha, S. K., Soni, A., Raj, R., Bala, S., Sharma, K., Panwar, S., Singh, H., *Functionalization, immobilization and stabilization of biomolecules in microfluidic devices*, Immobilization Strategies, Ed. Springer, Singapore, pp. 509-533, 2021.

[J5] **Junhong,** C., **Bo,** Z., **Ganhua,** L., *Vertically-Oriented Graphene – PECVD Synthesis and Applications*, Ed. Springer International Publishing, 2015.

[K1] Karandikar, S., Mirani, A., Waybhase, V., Patravale, V.B., Patankar, S., *Nanovaccines for oral delivery- formulation strategies and challenges*, Nanostructures for Oral Medicine / Micro and Nano Technologies, Ed. Elsevier, pp. 263-293, 2017.

[K2] Kim, K., Nilsen, E., Huang,T., Kim, A., Ellis, M., Skidmore, G., Lee, J.B., *Metallic microgripper with SU-8 adaptor as end-effectors for heterogeneous micro/nano assembly applications,* Microsystem Technologies, vol. 10, no. 10, pp. 689–693, 2004.

[K3] Kim, T.H., Yoon, H.J., Fouladdel, S., Wang, Y., Kozminsky, M., Burness, M.L., Paoletti, C., Zhao, L., Azizi, Eb., Wicha, M.S., Nagrath, S., *Characterizing Circulating Tumor Cells Isolated from Metastatic Breast Cancer Patients Using Graphene Oxide Based Microfluidic Assay*, Advanced Biosystems, **vol. 3**, no. 2, pp. 1800278 (1-10), 2018.

[K4] Kohlar, J.M., *Isotropic etching*, in Li D. (eds): *Encyclopedia of Microfluidics and Nanofluidics,* Springer, Boston, MA., pp. 877-884, 2008.

[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.

[L1] Le, T.N., Nguyen, V.A., Bach, G.L., Tran, L.D., Cao, H.H., *Design and Fabrication of a PDMS-Based Manual Micro-Valve System for Microfluidic Applications,* Advances in Polymer Technology, pp. 1–7, 2020.

[L2] Liu, C., *Recent developments in polymer MEMS*, Advanced materials, **vol. 19**, no. 22, pp. 3783-3790, 2007.

[L3] Liu, Y., Yang, Q., Cao, L., Xu, F., *Analysis of Leukocyte Behaviors on Microfluidic Chips*, Advanced Healthcare Materials, **vol. 8**, no. 4, pp. 1801406 (1-17), 2019.

[M1] Macdara, T.G., Kinahan, D.J., Ducree, J., *CD4 counting technologies for HIV therapy monitoring in resource-poor settings – state-of-the-art and emerging microtechnologies*, Lab on a Chip, **vol. 13**, no. 14, pp. 2731-2748, 2013.

[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.

[M6] Madou, M.J., *Fundamentals of Microfabrication and Nanotechnology - From MEMS to Bio-MEMS and Bio-NEMS,* third edition, **vol. 3**, CRC Press, 2011.

[M7] Mansilla, C, Soria, E, Ramírez, N, *The identification and isolation of CTCs: A biological Rubik's cube*, Critical Reviews in Oncology / Hematology, **vol. 126**, pp.129-134, 2018.

[M8] Marcuello, M., Vymetalkova, V., Neves, R.P.L., Duran-Sanchon, S., Vedeld, H.M., Tham, E., van Dalum, G., Flügen, G., Garcia-Barberan, V., Fijneman, R.J.A., Castells, A., Vodicka, P., Lind, G.E., Stoecklein, N.H., Heitzer, E., Gironella, M., *Circulating biomarkers for early detection and clinical management of colorectal cancer*, Molecular Aspects of Medicine, **vol. 69**, pp. 107-122, 2019.

[M9] Marieb, E.N., Hoehn, K., *Human anatomy and physiology*, 9th edition, 2013.

[M10] Marinescu, N.I., Lăcătuș, E., Marinescu, R.D., Nanu, D., Popa, L., Savastru, R., *Procese de prelucrare cu fascicule și jeturi*, Institutul National de Optoelectronica, Bucuresti INOE 2000, 2000.

[M11] Marinescu, N.I., Gavrilaș, I., Vișan, A., Marinescu, R.D., *Prelucrări neconvenționale în construcția de mașini*, **vol. 2**, Ed. Tehnică, Bucureşti, 1993.

[M12] Marinescu, N.I., Ghiculescu, D., Popa, L., Lăcătuș, E., Banu, A., Nanu, S., *Tehnologii cu energii concentrate pentru micro și nanostraturi*, Ed. Printech, București, 2008.

[M13] Marinescu, N.I., Ghiculescu, L.D., Popa, L., Pîrnău, C., **Marinescu, M.R.,** Grumezescu, M., *Procese tehnologice cu fascicule, oscilații și jeturi,* **vol. 1**, Tehnologie cu fascicul laser, Ed. Printech București, 2017.

[M14] Marinescu, N.I., Ghiculescu, L.D., Popa, L., Pîrnău, C., **Marinescu, M.R.,** Grumezescu, M., *Procese tehnologice cu fascicule, oscilații și jeturi*, **vol. 2,** Tehnologii cu fascicule de electroni, ioni și microunde, Ed. Printech București, 2018.

[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 34th 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 – 8th 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., Voițincu, 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.

[M26] Marinescu, R.D., Marinescu, N.I., Purcărea, A.A., Dănălache, F., Ghiculescu, D., *Management în micro și nanotehnologii*, Ed. Printech Bucuresti, 2005.

[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.

[M28] Masuzawa, T., Tonshoff, H.K., *Threedimensional micromachining by machine tools,* Annals of the CIRP, **vol. 46**, no. 2, pp. 621-628, 1997.

[M29] Matsumura, H., Umemoto, H., Masuda, A., *Cat-CVD (hot-wire CVD): how different from PECVD in preparing amorphous silicon.* Journal of Non-Crystalline Solids, **vol. 338-340,** no. 1, pp. 19–26, 2004.

[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.

[M31] Mărculescu, C., **Marinescu, R**., Burinaru, T., Matei, A., Țîncu, B., Țucureanu, V., Preda, P., Chiriac, E., Voițincu, C., Avram, M., *Biomedical applications of microfluidic and nanotechnology - review,* Nonconventional Technologies Review, **vol. 23**, no. 4, pp. 22-27, 2019.

[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.

[M34] MKS, *MKS Instruments handbook, Semniconductors and Process Technology by the Office of the CTO*, Ed. By MKS, 2017.

[M35] Moagăr-Poladian, G., Illyefalvi-Vitez, Z., Balogh, B., Ulieru, D., Coraci, A., *Laser applications in the field of MEMS,* INDLAS 2007: Industrial Laser Applications, ed.by Mircea Udrea, Proc. of SPIE **vol. 7007**, 70070K, 2008.

[M36] Mohammad, A.M., Muhammad, M., Dew, S.K., Stepanova, M., *Fundamentals of Electron Beam Exposure and Development*, Nanofabrication, Ed. Springer-Verlag/Wien, pp. 11- 41, 2012.

[M37] Moldovan, C., *Microsenzori integrați pe siliciu și tehnologii de microprelucrare*, Ed. Electronica 2000, 2004.

[M38] Murdok, H., *Fundamentals of human biology & health*, Fouth edition, Ed. Cognella Academic Publishing, 2016.

[M39] Murtagh, M.M., *HIV/AIDS diagnostic landscape,* Unitaid technical report, 2nd Edition, 2011.

[N1] Neagu, D., *Tratamente termice superficiale cu fascicul de electroni*, Nonconventional Technologies Review, No. 1, pp. 69-74, 2007.

[N2] Nguyen, J., *Development of a fully monolithic microfluidic device for complete blood count,* PhD Thesis, University of Toronto, 2014.

[N3] Nikoleli, G.P., Siontorou, C.G., Nikolelis, D.P., Bratakou, S., Karapetis, S., Tzamtzis, N. *Biosensors Based on Microfluidic Devices Lab-on-a-Chip and Microfluidic Technology,* Nanotechnology and Biosensors, pp. 375–394, 2018.

[N4] Noor, A.M., Masuda, T., Arai, F., Noor, M., *Microfluidic device for rapid investigation of the deformability of leukocytes in whole blood samples*, Robomech Journal, **vol. 7**, no. 5, 2020.

[N5] Nwankire, C.E., Venkatanarayanan, A., Glennon, T., Keyes, T.E., Forester, R. J., Ducree, J., *Label-free impedance detection of cancer cells from whole blood on an integrated centrifugal microfluidic platform,* Biosens Bioelectron, **vol. 68**, pp.382-389, 2015.

[O1] Ofner, A., Moore, D.G., Puhs, P.A., Schwendimann, P., Eggersdorfer, M., Amstad, E., weitz, D.A., Studart, A.R., *High-throughput step emulsification for the production of functional materials using a glass microflidic device*, Macromolecular Chemistry and Physics, vol. 218, no. 2, 1600472. doi:10.1002/macp.201600472, 2016.

[O2] Oh, B.Y., Kim, J., Lee, W.Y., Kim, H.C., *A New Size-based Platform for Circulating Tumor Cell Detection in Colorectal Cancer Patients*, Clinical Colorectal Cancer, **vol.16**, no. 3, pp. 214-219, 2017.

[O3] Olson, S., *The role of human factors in home health care*, The National Academies Press, 2010.

[P1] Pal, P., Swarnalatha, V., Rao, A.V.N. et al., *High speed silicon wet anisotropic etching for applications in bulk micromachining: a review*, Micro and Nano Syst Lett, **vol. 9,** no. 4, 2021.

[P2] Park, E.S., Jin, C., Guo, Q., Ang, R.R., Duffy, S.P., Matthews, K., Azad, A., Abdi, H., Todernhofer, T., Bazov, J., Chi, K.N., Black, P.C., Ma, H., *Continous flow deformability-based separation of circulating tumor cells using microfluidic ratchets*, Small Journl, **vol. 12**, no. 14, pp. 1909-19, 2016.

[P3] Parker, A.R., *Biomimetics of Optical Nanostructures, in: Encyclopedia of Nanotechnology, Bhushan B,* Ed. Springer Science, second edition, pp. 359-371, 2016.

[P4] Patel, J.N., Gray, B.L., Kaminska, B., Wu, N.C., Gates, B.D., *SU-8 and PDMS-based hybrid fabrication technology for combination of permanently bonded flexible and rigid features on a single device,* J. Micromech. Microeng. **vol. 23**, 065029 (10pp), 2013.

[P5] Pelesko, J.A., Bernstein, D.H., *Modeling mems and nems*, Ed. Chapman & Hall/CRC, 2002.

[P6] Perks, C., Mudd, G., *Titanium, zirconium resources and production: A state of the art literature review*, Elsevier journal, **vol. 107**, 2018.

[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.

[P8] Pippa, N., Stangel, C., Kastanas, I., Triantafyllopoulou, E., Naziris, N., Stellas, D., Zhang, M., Yudasaka, M., Demetzos, C., Tagmatarchis, N., *Carbon nanohorn/liposome systems: Preformulation, design and in vitro toxicity studies,* Materials Science & Engineering C, **vol. 105**, 110114, 2019.

[P9] Pratap, R., Arunkumar, A., *Material selection for MEMS devices*, Indian Journal of Pure and Applied Physics, **vol. 45**, pp. 358-367, 2007.

[P10] Prime Faraday Partnership, *An Introduction to MEMS,* Ed. Prime Faraday Partnership, 2003.

[Q1] Qiu, F., Bradley, J.N., *Magnetic Helical Micro- and Nanorobots: Toward Their Biomedical Applications*, Engineering, **vol. 1**, no. 1, pp.21–26, 2015.

[Q2] Quang, L.D., Bui, T.T., Hoang, B.A., Nhu, C.N., Thuy, H.T.T., Jen, C.P., Duc, T.C., *Biological living cell in-flow, detection based on microfluidic chip and compact signal processing circuit*, IEEE Transactions on Biomedical Circuits and Systems, **vol. 14**, no. 6, pp.1371 – 1380, 2020.

[R1] Rathee, D., Kumar, M., Arya, S. K., *Deposition of nanocrystalline thin TiO_2 films for MOS capacitors using Sol–Gel spin method with Pt and Al top electrodes,* Solid-State Electronics, **vol. 76**, pp. 71–76, 2012.

[R2] Rebello, K.J., *Applications of MEMS in surgery*, Proceedings of the IEEE, **vol. 92**, no. 1, pp. 43-55, 2004.

[R3] Rodriguez, W., Christodoulides,, N., Floriano P., Graham, S., Mohanty, S., Dixon, M., Hsiang, M., Peter, T., Zavahir, S., Thior, I., Romanovicz, D., Bernard, B., Goodey, A.,

Walker, B., McDevitt, J., *A microchip CD4 counting method for HIV monitoring in resource-poor settings*, PLoS Medicine, **vol. 2**, no. 7, pp. 0663–0672, 2005.

[R4] Ruiz, G.P., Kristin, De Meyer, Witvrouw, A., *Poly-SiGe for MEMS - above - CMOS sensors,* Ed. Springer, pp. 1-23. 2014.

[R5] Runyan, W.R., *Silicon,* Kirk-Othmer *Encyclopedia of Chemical Technology*, Ed. Wiley, pp. 1–22, 2013.

[S1] Salvo, P., Melai, B., Calisi, N., Paoletti, C., Bellagambi,, F., Kirchhain A., Trivella, M.G., Fuoco, R., Di Francesco, F., *Graphene-based devices for measuring pH,* Sensors and Actuators B: Chemical, **vol. 256**, pp. 976-991, 2017.

[S2] Schultz, J., Mrksich, M., Bhatia, S., Brady, D., Ricoo, A., Walt, D., Wilkins, C., *Biosensing International Research and Development*, Springer, 2006.

[S3] Secrieru, V., Teza de doctorat în științe tehnice *Dispozitive electronice încorporate pentru industrie, medicină și sfera socială*, Universitatea Tehnică a Moldovei, Chișinău, Moldova, 2016.

[S4] Selishchev, S. V., *Integration of Basic and Applied Biomedical Engineering Research at the Department of Biomedical Systems of Moscow State Institute of Electronic Engineering,* Biomedical Engineering, **vol. 38**, no. 3, pp. 109–111, 2004.

[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.

[S6] Shaw, J.A., Guttery, D.S., Hills, A., Fernandez-Garcia, D., Page, K., Rosales, B.M., Goddard, K. S., Hastings, R.K., Luo, J., Ogle, O., Woodley, L., Ali, S., Stebbing, J., Coombes, R.C., *Mutation analysis of cell free DNA and single circulating tumor cells in metastatic breast cancer patients with high circulating tumor cell counts*, Clinical Cancer Research, **vol. 23**, no. 1, pp. 88–96, 2017.

[S7] Shen, H., Liu, T., Qin, D., Bo, X., Wang, L., Wang, F., Yuan, Q., Wagberg, T., Hu, G., Zhou, M., *Wearable Carbon Nanotube Devices for Sensing,* Industrial Applications of Carbon Nanotubes, pp. 179-199, 2015.

[S8] Sia, S.K., Whitesides, G.M., *Microfluidic devices fabricated in poly(dimethylsiloxane) for biological studies*, Electrophoresis, **vol. 24**, pp. 3563–3576, 2003.

[S9] Singh, C., Ali, Md, A., Reddy, V., Singh, D., Kim, C.G., Sumana, G., Malhotra, B.D., *Biofunctionalized graphene oxide wrapped carbon nanotubes enabled microfluidic immunochip for bacterial cells detection,* Sensors and Actuators: B, **vol. 255,** pp. 2495-2503, 2018.

[S10] Sivaramakrishnan, M., Kothandan, R., Govindarajan, D.K., Meganathan, Y., Kandaswamy, K., *Active microfluidic systems for cell sorting and separation*, Current Opinion in Biomedical Engineering, **vol. 13**, pp. 60–68, 2020.

[S11] Slavuteanul, A. C., *Nanotehnologia în medicină (Nanomedicina)*, Antropologie medicală, 2014, disponibil la: http://www.e-antropolog.ro/2014/08/nanotehnologia-in-medicina-nanomedicina/ accesat la data de 11.10.2018.

[S12] Stamatin, I., *Nanomateriale aplicații în biosenzori, surse de energie, medicină, biologie – Elemente de nanotehnologie*, Editura Universităţii din Bucureşti, 2008.

[S13] Stan Dana, Mihăilescu Carmen Marinela, Rădulescu Clara Hortensia, *Procedeu de functionalizare electrochimica a unor electrozi interdigitate pentru detectia*

antigenului receptor de suprafata CD4+ al subpopulatiilor 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.

[S15] Stefan, N., Teza de doctorat, *Studii asupra straturilor subțiri obținute și modificate prin tehnici laser pentru aplicații medicale și metalurgice*, Universitatea din București, 2009.

[S16] Stihi, V., *Microtehnologii utilizate în sistemele de supraveghere*, Rev. Intelligence, 2009, accesat la: ***http://intelligence.sri.ro/microtehnologii-utilizate-sistemele-de-supraveghere/, accesat la data de 14.09.2017.

[S17] Sun, T., Xie, X., Wang, Z., *Wireless power transfer for medical microsystems*, Springer New York Heidelberg Dordrecht London, pp. 1-15, 2013.

[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.

[Ș3] Șerban, B.C., Buiu, O., Dumbrăvescu, N., Cobianu, C., Avramescu, V., Brezeanu, M., Bumbac, M., Nicolescu, C., M., *Oxidized carbon nanohorns as novel sensing layer for resistive humidity sensor*, Acta Chimica Slovencia, vol. 67, no. 2., 2020.

[Ș4] Șerban, B.C., Bumbac, M., Schiketanz, I., Popescu, M.V., Nicolescu, C., Buiu, O., *Chimie organică – întrebări și răspunsuri,* **vol. 1**, Ed. Printech, 2017.

[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.

[T2] Tian, W.C., Finehout, E., *Microfluidics for biological applications*, Ed. Springer, 2008.

[T3] Torstensson, M., *Photolithography,* disponibil la: http://fy.chalmers.se/~yurgens/FKA196/lab%20exercises/photolithography.pdf, accesat la data de 12.01.2017;

[T4] Tortora, G., Derrikson, B., *Principles of anatomy and physiology*, 12th edition, Ed. Wiley, 2009.

[Ț1] Țincu, B., Avram, M., Pachiu, C., Chiriac, E., Voitincu, C., Costache, A.C., **Marinescu, M.R**., *Microfluidic device based on graphene*, *Proceedings of International Semiconductor Conference (CAS),* pp. 97-100, 2020.

[Ț2] Țincu, B., Demetrescu, I., Avram, A., Țucureanu, V., Matei, A., Tutunaru, O., Burinaru, T., Comănescu, F., Voițincu, C., Avram, M., *Performance of single layer graphene obtain by chemical vapor deposition on gold electrodes*, Diamond & Related Materials, **vol. 98,** pp. 107510, 2019.

[Ț3] Țucureanu, V., Matei, A., Țincu, B.C., Avram, M.A., Mărculescu, C.V., Burinaru, T.A., Avram, M., *Procedeu chimic de transfer a grafenei de pe un substrat pe altul*, IMT, CBI, A00486, 2017.

[V1] Vijay, K. Varadan, K. J. Vinoy, S. Gopalakrishnan, *Smart Material Systems and MEMS: Design and Development Methodologies*, Ed. John Wiley & Sons Ltd, 2006.

[W1] Wang, B., Weldon, A.L., Kumnorkaew, P., Xu, B., Gilchrist, J.F., Cheng, X., *Effect of Surface Nanotopography on Immunoaffinity Cell Capture in Microfluidic Devices,* Langmuir, **vol. 27**, no. 17, pp. 11229-11237, 2011.

[W2] Wang, G., Benasutti, H., Jones, F.J., Shi, G., Benchimol, M., Pingle, S., Kesari, S., Yeh, Y., Li-EnHsieh, Liu, Y.T., Elias, A., Simberg, D., *Isolation of Breast cancer CTCs with multitargeted buoyant immunomicrobubbles*, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, **vol. 161**, pp. 200-209, 2018.

[W3] Wang, J., *Electrochemical Glucose Biosensors*, *Chemical Reviews*, **vol. 108**, no. 2, pp. 814–825, 2008.

[W4] Wang, J.H, Wang, C.H., Lin, C.C., Lei, H.Y, Lee, G.B., *An integrated microfluidic system for counting of CD4+ /CD8+ T lymphocytes*, Microfluid Nanofluid, 10:531–541, 2011.

[W5] Wang, L,, Xu, H., Zhai, W., Huang, B., Rong, W., *Design and characterization of magnetically actuated helical swimmers at submillimeter-scale,* Journal of Bionic Engineering, vol. 14, pp. 26–33, 2017.

[W6] Wang, S. , Yu, S., Lu, M. , Zuo, L., *Microfabrication of plastic-PDMS microfluidic devices using polyimide release layer and selective adhesive bonding*, Journal of Micromechanics and Microengineering, **vol. 27**, no. 5, 055015, 2017.

[W7] Wang, S., Tasoglu, S., Chen, P.Z., Chen, M., Akbas, R., Wach, S., Ozdemir, A.I, Gurkan, U.A., Giguel, F.F., Kuritzkes, D.R., Demirci, U., *Micro-a-fluidics ELISA for Rapid CD4 Cell Count at the Point-of-Care,* Scientific Reports, vol. 4, 2014.

[W8] Wanga, X., Liua, A., Xinga, Y., Duanc, H., Xua, W., Zhoua, Q., Wud, H., Chenf, C., Chen, B., *Three-dimensional graphene biointerface with extremely high sensitivity to single cancer cell monitorin*, Biosensors and Bioelectronics, **vol. 105**, pp 22-28, 2018.

[W9] Watkins, N.N., Hassan, U., Damhorst, G., Ni, H., Vaid, A., Rodriguez, W., Bashir, R., *Microfluidic CD4$^+$ and CD8$^+$ T Lymphocyte Counters for Point-of-Care HIV Diagnostics Using Whole Blood,* Science Translational Medical, **vol. 5**, no. 214, pp. 214ra170, 2013.

[W10] Watkins, N.N., Sridhar, S., Cheng, X., Chen, G.D., Toner, M., Rodriguez, W., Bashir, R., *A microfabricated electrical differential counter for the selective enumeration of CD4+ T lymphocytes*, Lab on a Chip, **vol. 11**, no. 8, pp. 1437-1447, 2011.

[W11] Wolf, M.P., Salieb-Beugelaar, G.B., Hunziker, P., *PDMS with designer functionalities-Properties, modifications strategies, and applications*, Progress in Polymer Science, **vol. 83**, pp. 97-134, 2018.

[Y1] Yoon, J.Y., *Introduction to Biosensors From Electric Circuits to Immunosensors*, Ed. Springer, 2016.

[Y2] Yuge, R., Ichihashi, T., Shimakawa, Y., Kubo, Y., Yudasaka, M., Iijima, S., *Preferential Deposition of Pt Nanoparticles Inside Single-Walled Carbon Nanohorns,* Advanced Materials, **vol. 16**, no. 16, pp. 1420-1423, 2004.

[Z1] Zeinali, M., Murlidhar, V., Fouladdel, S., Shao, S., Zhao, L., Cameron, H., Bankhead, A., Shi, J., Cuneo, K.C., Sahai, V., Azizi, E., Wicha M.S., Hafner, M., Simeone, D.M., Nagrath, S., *Profiling Heterogeneous Circulating Tumor cells (CTC) populations in*

pancreatic cancer using a serial microfluidic CTC carpet chip, Advanced Biosystems, **vol. 2**, no. 12, pp. 1800228 (1-13), 2018.

[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.

[Z3] Zhang, M., Yudasaka, M., Ajima, K., Miyawaki, J., Iijima, S., *Light – Assisted Oxidation of Single-Wall Carbon Nanohorns for Abundant Creation of Oxygenated Groups That Enable Chemical Modifications with Proteins to Enhance Biocompatibility,* ACS Nano, **vol. 1,** no. 4, pp. 265-272, 2007.

[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.

[Z5] Zhang, W., Chen, X., Yamashita, S., Kubota, M., Kita, H., *B_4C-SiC Ceramics with interfacial nanorelief morphologies and low underwater friction and wear*, ACS Applied Nano Materials, vol. 4, pp. 3159-3166, 2021.

[Z6] Zhao, M., Gong, H., Ma, M., Dong, L., Huang, M., Wan, R., Gu, H., Kang, Y., Li, D., *A comparative antibacterial activity and cytocompatibility for different top layers of TiN, Ag or TiN-Ag on nanoscale TiN/Ag multilayers,* Applied Surface Science, **vol. 473**, pp. 334-342, 2019.

[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.

[Z8] Zoaby, N., Shainsky-Roitman, J., Badarneh, S., Abumanhal, H., Leshansky, A., Yaron, S., Schroeder, A., *Autonomous bacterial nanoswimmers target cancer,* Journal of Controlled Release, vol. 257, pp. 68–75, 2017.

[*1] *** Descopera.ro, *Nanotehnologia: inginerii microscopici ai viitorului*, publicat la data de 12.28.2009, disponibil la: https://www.descopera.ro/stiinta/5189803-nanotehnologia-ingerii-microscopici-ai-viitorului, accesat la data de: 27.09.2018.

[*2] *** Engineeringproductdesign.com, *An introduction to MEMS*, publicat la data de 19.01.2019, disponibil la: https://engineeringproductdesign.com/mems-micro-electro-mechanical-system/, accesat la data de 07.12.2019.

[*3] ***IEEE Spectrum, *Time-domain simulation of electromechanical sensors and systems,* disponibil la: https://spectrum.ieee.org/computing/it/timedomain-simulation-of-electromechanical-sensors-and-systems, accesat la data de: 01.02.2021.

[*4] *** IMT Bucuresti, *Proiect: Robogrip*, disponibil la: https://www.imt.ro/robogrip/results.php, accesat la data de 03.05.2020.

[*5] ***Ehealth.ro, *Nanotehnologia schimba medicina*, publicat la data de 21.07.2016, disponibil la: https://ehealthromania.com/nanotehnologia-schimba-medicina/, accesat la data de 01.08.2017.

[*6] ***Laurell Technologies Corporation, *Echipamente de centrifugare si de pulverizare a fotorezistului ale firmei Laurell*, disponibile la: www.laurell.com, accesat la data de: 02.01.2017.

[*7] ***Direct Industry by Virtualexpo Group, *Echipamente de centrifugare, pulverizare și roluire comercializate de către firma DirectIndustry,* disponibile la: http://www.directindustry.com, accesat la data de: 03.04.2017.

[*8] ***OAI, *Echipamente de ainiere si expunere comercializate de catre firma OAI*, disponibile la: http://oainet.com/, accesat la data de: 25.02.2021.

[*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, accesat la data de 09.08.2017.

[*10] ***Medicotest SRL, *Ce sunt trombocitele si care este rolul lor in organism*, publicat la data de: 03.08.205, disponibil la: https://www.medicotest.ro/ce-sunt-trombocitele-si-care-este-rolul-lor-in-organism/, accesat la data de: 05.05.2018.

[*11] ***MyMed.ro, *Limfocite crescute. Limfocitoza,* disponibil la: http://www.mymed.ro/limfocite-crescute-limfocitoza.html, accesat la data de: 10.04.2018.

[*12] ***WHO Prequalification of diagnostics Programme –Public report – Product: Pima CD4 Test, PQDx 0099-032-00, disponibil la: https://www.who.int/diagnostics_laboratory/evaluations/pq-list/cd4/201012_amended_pqpr_pqdx_0099_032_00_pima_cd4_test.pdf, accesat la data de: 03.04.2021.

[*13] ***Ehealth.ro, *Celule canceroase depistate in timp real*, publicat la data de 03.02.2016, disponibil la: https://ehealthromania.com/celule-canceroase-depistate-in-timp-real/, accesat la data de 10.05.2018.

[*14] ***Software.informer, *CleWin 5.4*, disponibil la: https://clewin.software.informer.com/, accesat la data de: 09.07.2017.

[*15]***Software.informer, *SEMulator 3D*, disponibil la: https://semulator3d.software.informer.com/, accesat la data de:09.07.2017.

[*16] ***IMT București, proiect *Cellimmunochip*, disponibil la: 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, 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: airbone 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/, 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, accesat la data de: 10.05.2021.

[*21] ****Elaborarea tehnologiilor de fabricație a platformelor microfluidice***, disponibil la: https://www.imt.ro/MICRONANOFAB/rez7.php, accesat la data de 04.06.2020.

[*22] Denka, *Elegrip tape (dicing tape)*, produs disponibil la: https://www.denka.co.jp/eng/product/detail_00020/, accesat la data de 01.03.2021.

[*23] ***Semiconductor Wafer Inc (SWI) Taiwan, produse disponibile la: http://www.semiwafer.com/, accesat la data de 20.05.2020.

[*24] ***Dropsens, produs disponibil la: https://www.dropsens.com/en/interdigitated_electrodes.html, accesat la data de 12.11.2020.

[*25] *** Mecmesin, echipamente disponibile la: https://www.mecmesin.com/software-controlled-force-systems/single-column-force-tester, accesat la data de 23.03.2019.

[*26] *** Memmert, echipamente disponibile la: https://www.memmert.com/home/, accesat la data de 23.03.2019.

[*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.

[*30] ***Keithley, USA, echipamente disponibile la: https://www.tek.com/keithley, 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, 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/PNCDI%20III/P2_Cresterea%20competitivitatii%20economiei%20romanesti/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/@@images/file, 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, accesat la data de: 25.06.2021.

[*40] ***Metrohm Autolab - *Autolab PGSTAT204 - Compact and modular potentiostat/galvanostat*, Disponibil la:https://www.metrohm-autolab.com/Products/Echem/CompactNonModular/PGSTAT204.html, accesat la data de: 26.06.2021.

[*41] ***Sensirion, Disponibil la: https://www.sensirion.com/en/, accesat la data de: 25.06.2021.

[*42] ***Chromium etching, Disponibil la: http://www.ostec-materials.ru/upload/iblock/6b7/6b7f10c362e4f93a6a67d62dbc1159cc.pdf accesat la data de 05.06.2020.