



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 321 228**

51 Int. Cl.:
G01N 21/55 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06724509 .2**

96 Fecha de presentación : **21.04.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1875208**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.01.2008**

54 Título: **Chip sensor con partículas no metálicas conectadas que comprenden un revestimiento metálico.**

30 Prioridad: **22.04.2005 EP 05008931**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
03.06.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
03.06.2009

73 Titular/es: **Fujirebio Inc.**
62-5 Nihonbashi-Hamacho 2-chome
Chuo-ku, Tokyo 103-0007, JP

72 Inventor/es: **Dahint, Reiner;**
Bücker, Petra;
Trileva, Elka;
Schilp, Sören;
Himmelhaus, Michael y
Acunman, Hatice

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 321 228 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Chip sensor con partículas no metálicas conectadas que comprenden un revestimiento metálico.

5 Campo técnico

La presente invención versa acerca de un chip constituido por una capa de partículas no metálicas con un revestimiento metálico, un procedimiento para preparar dicho chip, un dispositivo óptico constituido por dicho chip y un procedimiento analítico que utiliza dicho chip.

10

Técnica antecedente

La mayoría de los procedimientos bioanalíticos actuales, como los inmunoensayos o los ensayos de hibridación, requieren el uso de marcas, tales como marcas fluorescentes, para la detección del analito. Sin embargo, el uso de dichas marcas no es deseable por un número de razones: la necesidad de lavar la muestra antes de la medición lleva mucho tiempo y puede también evitar la observación de interacciones transitorias, eventos de aglomeración de baja afinidad y cinética de aglomeración. Además, la introducción de marcas es cara y puede alterar el sistema biológico que se está estudiando de una forma no deseable y a veces impredecible. Finalmente, un conocimiento insuficiente de la eficacia del marcado puede resultar en resultados falsos en el análisis biomédico.

20

Una técnica que permite la detección sin marcas de un analito implica la resonancia de plasmón superficial (SPR). El plasmón superficial es una onda de propagación de electrones libres que oscilan de manera colectiva en una interfaz entre una película metálica delgada y un material dieléctrico. Dado que la propagación de la onda está influenciada por la constante dieléctrica en la interfaz, se pueden detectar mediante sensor los procesos de adsorción en la interfaz. Los sensores de la SPR están disponibles comercialmente, por ejemplo, bajo el nombre comercial de BIAcore de Pharmacia Biosensor, Piscataway, Nueva Jersey, EE. UU.

25

Una limitación importante de estos sensores de la SPR es el hecho de que el plasmón superficial en, por ejemplo, capas de oro se propaga por distancias comparativamente mayores, prohibiendo su uso para la detección de una plétora de distintos analitos que es necesaria en ensayos biológicos miniaturizados en paralelo, tal como los conjuntos de proteínas o los conjuntos de ADN.

30

Se han propuesto el uso de nanopartículas de oro para explotar el fenómeno de la SPR localizada o coloidal. El documento WO03/050291 describe un sensor obtenido mediante la deposición de nanopartículas de oro o plata en sustratos ópticamente transparentes tal como el vidrio. El documento US 2003/0174384 A1 describe el uso de los, así llamados, nanoenvolturas de oro encima de una superficie de oro.

35

El documento EP 0 965 835 A2 y Sensors y Actuators B 2000, 63 pp. 24-30 describen la formación de una monocapa de partículas de poliestireno sobre la que se forma subsiguientemente un revestimiento de oro mediante evaporación térmica, formando de ese modo nanopartículas de oro con forma de cápsula. Se informa de que estos chips sensores muestran una buena sensibilidad.

40

45 Resumen de la invención

A la luz de esta técnica anterior, el objeto de la presente invención es proporcionar un dispositivo óptico y un chip sensor que muestren una apropiabilidad mejorada para detectar analitos.

50

Es un objeto adicional de la presente invención proporcionar un procedimiento analítico que permite no marcar y realizar la detección en paralelo de distintos analitos.

Para conseguir estos objetos, la presente invención proporciona un chip constituido por un sustrato con al menos una superficie, opcionalmente dieléctrica, y, encima de dicha al menos una superficie, una capa de partículas que tienen un núcleo no metálico y un revestimiento fabricado a partir de un metal de transición o de una aleación de metales de transición, caracterizado porque cada núcleo no metálico, de media, forma un punto de contacto rodeado por metal, una así llamada abertura, con al menos otro núcleo no metálico y/o con la superficie del sustrato.

55

La invención también proporciona un procedimiento para preparar un chip, que comprende los pasos de

60

adsorber partículas no metálicas sobre dicha superficie del sustrato, y, subsiguientemente,

adsorber coloides de un metal de transición o de una aleación de metales de transición sobre dichas partículas no metálicas,

65

o, de manera alternativa, depositando de manera catódica agrupaciones de metales de transición o agrupaciones de aleaciones de metales de transición sobre dichas partículas no metálicas,

para proporcionar el revestimiento fabricado a partir de un metal de transición o de una aleación de metales de transición,

y que se obtiene un chip mediante dicho procedimiento.

Sorprendentemente, los inventores han encontrado que los chips de la presente invención proporcionan un aumento significativo de la sensibilidad en comparación con las superficies que comprenden nanopartículas de oro con forma de cápsula conocidas en el documento EP 0 965 935 A2, y en comparación con los sistemas según se describen en el documento US 2003/0174384 A1, en el que las partículas comprenden una envoltura cerrada.

La presente invención también proporciona un dispositivo óptico para la detección de un analito, que está constituido por el chip de la presente invención, un sistema óptico para irradiar dicho chip, y un sistema de detección para detectar la luz reflejada, transmitida, dispersa o difractada por dicha superficie del chip.

Finalmente, la presente invención proporciona un procedimiento para determinar la concentración de un analito, que comprende los pasos de proporcionar un chip conforme a la presente invención, poniendo una disolución que contiene potencialmente uno o más analitos en contacto con dicho chip, y detectar la luz reflejada, transmitida, dispersa o difractada por dicho chip durante o después de la exposición a la disolución.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 ilustra un procedimiento preferido para preparar los chips de la presente invención. (a) Funcionalización superficial del sustrato de poliestireno (PS) revestido con oro mediante estampado por microcontacto de un tiol hidrófobo (octadecanotiol, ODT); (b) Rellenar los huecos entre las regiones de ODT estampado por medio de tioglicolato (TG); (c) Adsorción de perlas de PS de una disolución acuosa por la química del clorhidrato de 1-etil 3-(3-(dimetilamino)propil)carbodiimida (EDC) en regiones revestidas con TG; (d) decoración de las perlas de PS con partículas de oro coloidal y revestimiento por reacción química subsiguiente para formar un revestimiento de oro alrededor de las partículas de PS (para más detalle, cf. ejemplos 1 y 2).

La Fig. 2 muestra una micrografía SEM de una superficie de un chip preparada conforme a la rutina dada en el ejemplo 1 antes de la metalización.

La Fig. 3 muestra micrografías SEM de superficies con un patrón de chips preparados conforme al ejemplo 1 antes de la metalización.

Las Figuras 4a a 4f muestran micrografías SEM de capas de partículas no metálicas revestidas con metal preparadas mediante distintos procedimientos de metalización.

Las Figuras 5a - d visualizan la formación de puntos de contacto no metálicos entre partículas colindantes y/o la superficie, que están rodeados por el revestimiento metálico. Las Figuras 5a-c muestran cortes transversales a través del centro del punto de contacto de dos partículas en contacto. La Fig. 5a muestra la metalización de las partículas mediante evaporación conforme al documento EP 0 965 835 A2 y Sensor and Actuators B 2000, 63, pp. 24-30 (cf. ejemplo comparativo 1); las Figuras 5b y c muestran la metalización conforme a la presente invención, por ejemplo, mediante deposición catódica (cf. ejemplo 3) o la deposición de capa a capa de partículas coloidales metálicas (cf. ejemplo 2); la Fig. 5d muestra la metalización de una partícula que no está en contacto con otras partículas. El revestimiento metálico cubre tanto, la partícula como el sustrato, formando de ese modo una abertura en la interfaz de partícula/sustrato; la Fig. 5e muestra un punto de contacto, que está rodeado mediante un revestimiento metálico hasta una extensión de $\theta = 180^\circ$, según se consigue con la metalización mediante evaporación (cf. Fig. 5a); la Fig. 5f muestra un punto de contacto, que está rodeado por un revestimiento metálico hasta una extensión de $\theta = 360^\circ$, según se puede conseguir mediante la metalización conforme a la presente invención (cf. Figuras 5b y c); las Figuras 5g y h muestran ejemplos de puntos de contacto de las partículas no metálicas, que están rodeadas por el revestimiento metálico hasta una extensión de $\theta > 220^\circ$.

Las Figuras 6a - k muestran un procedimiento para la verificación de las aberturas entre las partículas y/o el sustrato utilizando SEM. Las Figuras 6a y b muestran una superficie del chip, donde se ha eliminado parte de las partículas adsorbidas con anterioridad mediante el uso de una cinta adhesiva; las Figuras 6c y d muestran puntos de contacto entre partículas aún presentes en la superficie y partículas eliminadas que fueron adyacentes anteriormente. Se puede juzgar la presencia anterior de las partículas eliminadas a partir de las aberturas en el revestimiento metálico del sustrato; las Figuras 6e y f muestran vistas de planta de áreas similares como se muestra en las Figuras 6c y d. Los residuos metálicos en las partículas dirigidos hacia la anterior posición de las partículas eliminadas indican que el revestimiento metálico conecta las partículas colindantes; también se pueden observar las conexiones mediante la inspección de los contactos de las partículas; la Fig. 6g muestra residuos en la superficie del sustrato que indican que las partículas presentes anteriormente estuvieron conectadas al revestimiento metálico del sustrato; la Fig. 6h muestra partículas eliminadas del sustrato por medio de una cinta de doble cara. Entonces, se montó la cinta boca abajo en el soporte SEM de muestras para la inspección de la superficie de las partículas en contacto anteriormente con el sustrato. Evidentemente, se puede identificar la formación de aberturas con el sustrato; las Figuras 6i-k muestran la formación de aberturas entre partículas de las capas primera y segunda de partículas. Solo se había eliminado una

única partícula, en contacto anteriormente con tres partículas adyacentes debajo. Los bordes metálicos que rodean los puntos de contacto no metálicos son claramente discernibles.

5 Las Figuras 7 a y b muestran partículas (a) núcleo-envoltura y superficies de un chip formado mediante partículas núcleo-envoltura preparadas conforme al ejemplo comparativo 2.

10 Las Figuras 8a y b ilustran configuración óptica para la adquisición de los espectros de extinción que utiliza una sonda de fibra óptica para detectar la luz reflejada, dispersa y/o difractada por la superficie, o transmitida por la misma. Para la detección del esparcimiento, se puede utilizar adicionalmente una esfera integradora. La Fig. 8c da un ejemplo para una configuración alternativa de representación para tomar mediciones. De manera alternativa, también se pueden llevar a cabo las mediciones simultáneas resueltas lateralmente en la transmisión a través del sustrato.

15 La Fig. 9a muestra una ilustración gráfica de la superficie del chip preparada conforme al documento EP 0 965 835 A2 y un espectro de extinción antes y después de un experimento de adsorción de tiol en este chip (cf. ejemplo 5); la Fig. 9b muestra una ilustración gráfica de la superficie del chip preparada conforme a la presente invención mediante deposición catódica, y un espectro de extinción antes y después de un experimento de adsorción de tiol en este chip; la Fig. 9c muestra una ilustración gráfica de la superficie del chip preparada conforme a la presente invención mediante adsorción de coloides y revestimiento por reacción química subsiguiente, y un espectro de extinción antes y después de un experimento de adsorción de tiol.

20

Descripción detallada de la invención

El sustrato

25 El chip comprende un sustrato con al menos una superficie. La forma del sustrato no está limitada y puede ser plana o curvada. Por ejemplo, el sustrato puede tener un corte transversal circular. Sin embargo, en una realización preferida el sustrato es plano. El sustrato puede estar constituido por cualquier material adecuado conocido por los expertos en la técnica. Ejemplos ilustrativos de materiales adecuados para su uso como el sustrato incluyen, pero no están limitados a, los siguientes: vidrio; cuarzo; sustratos orgánicos, tal como policarbonatos, poliolefinas (por ejemplo, poliestireno) y resinas acrílicas y metacrílicas (por ejemplo, polimetil metacrilato, PMMA); materiales inorgánicos, tal como germanio, arsenuro de galio, sílice, materiales derivados de la sílice (por ejemplo, silicio fundido, geles de silicón y polisiloxanos) y materiales derivados del estaño (por ejemplo, óxido de estaño y óxido de estaño dopado con indio) y similares. En particular, los materiales preferidos son el vidrio, la sílice y los sustratos orgánicos como el poliestireno o los sustratos de PMMA.

35

40 En otra realización preferida, el sustrato está constituido por un material de guía de ondas o comprende elementos de guía de ondas que permiten la transducción de señales de luz a través del sustrato. Por ejemplo, un material de guía de ondas está constituido por un sustrato polimérico con un índice de refracción n_1 , en el que otro material, por ejemplo un segundo polímero, con un índice de refracción $n_2 > n_1$ está integrado de tal forma, que se puede guiar la luz dentro del segundo material mediante reflexión interna total. De manera alternativa, el segundo material con $n_2 > n_1$ puede estar generado a partir del material de integración mediante la modificación físico-química de este, por ejemplo, mediante tratamiento por UV de este en regiones seleccionadas. Conforme a la presente invención, los núcleos no metálicos contactan, preferiblemente, con la superficie del material con el mayor índice de refracción. La forma del material de guía de ondas no está limitada y puede ser plana o curvada. En una realización preferida, es un sustrato plano o una fibra.

45

50 La superficie del sustrato puede estar compuesta del mismo material que el material base del sustrato o puede estar compuesta de una capa metálica o no metálica aparte revestida sobre el sustrato. Esta capa metálica o no metálica puede consistir en un único o múltiples materiales y/o subcapas. Cada una de las subcapas puede ser homogénea o tener un patrón. Las subcapas con patrón compuestas de áreas metálicas y no metálicas puede proporcionar una mejora resonante de las señales ópticas y/o transporte de las señales eléctricas. Las subcapas con patrón también pueden ser utilizadas para la adsorción dirigida de partículas no metálicas sobre áreas seleccionadas del sustrato. La capa del único o múltiples materiales y/o subcapas puede ser el material de guía de ondas descrito anteriormente. Además, la capa del único o múltiples materiales y/o subcapas puede contener tintes fluorescentes y/u otros materiales activos ópticamente.

55

60 En una realización preferida, la capa revestida sobre el sustrato está compuesta de un metal o de una aleación metálica, preferiblemente un metal de transición o una aleación de metales de transición. Los metales que son particularmente adecuados para ser utilizados en dichas capas incluyen, pero no están limitados al aluminio, oro, plata, cobre, platino, paladio, plomo, hierro o similares. Se prefieren el oro, la plata, el paladio y/o el platino. También se pueden utilizar las aleaciones o las mezclas no homogéneas de dichos metales. El grosor de la capa compuesta de un metal o de una aleación metálica (preferiblemente un metal de transición o una aleación de metales de transición) es preferiblemente de entre 2 y 500 nm, más preferiblemente entre 5 y 100 nm, y aún más preferiblemente entre 10 y 50 nm.

65

A su vez, la capa metálica puede estar revestida con una capa no metálica, preferiblemente dieléctrica. Preferiblemente, la capa no metálica tiene un grosor menor de 100 nm, más preferiblemente de 1 a 50 nm, y puede, por ejemplo, consistir en polielectrolitos, polímeros revestidos por rotación, vidrio revestido, semiconductores de SiO_2 como sílice,

ES 2 321 228 T3

germanio o arsenuro de galio, u óxido de estaño dopado con indio. En una realización preferida, la capa dieléctrica está constituida por una monocapa de moléculas orgánicas, por ejemplo, de un alcanotiol o de un silano que puede o no ser modificada y que puede o no formar un SAM.

5 En una realización preferida, la subcapa superior puede tener un patrón con regiones que tienen propiedades físico-químicas diferenciadas, tal como las regiones con distinta hidrofiliidad o grupos funcionales químicos.

10 En una realización preferida, el patrón proporciona estructuras químicas (por ejemplo, cuadrados) de 400 nm² hasta 10000 μm², más preferiblemente de 1 μm² hasta 1000 μm², que están separadas por huecos de 20 nm hasta 100 μm, más preferiblemente de 1 μm hasta 30 μm. En otra realización preferida, el patrón consiste en círculos embebidos en un material de matriz de distinta funcionalidad química. El diámetro preferido de los círculos varía desde 100 nm hasta 100 μm, más preferiblemente desde 1 μm hasta 30 μm.

15 Por ejemplo, el patrón puede proporcionarse mediante estampado por microcontacto, fotolitografía, o litografía por haz de electrones.

Las superficies de oro dotadas de un patrón por medios químicos (por ejemplo, capas de oro de 10 a 50 nm evaporadas directamente sobre un sustrato orgánico tal como el poliestireno) se pueden preparar utilizando el estampado por microcontacto proporcionando un contraste químico diferenciado entre las distintas áreas superficiales (Kumar *et al.*, Science 1994, 263, pp. 60-62). Por ejemplo, se entinta una prensa elastomérica microestructurada de estampar con una disolución de un primer tiol (por ejemplo, una disolución etanólica de 1 octadecanotiol de 1 milimol (mM)) proporcionando una superficie hidrófoba en comparación. Después del secado, se aprieta suavemente la prensa de estampar contra el sustrato (por ejemplo, durante 10 segundos hasta 1 minuto). Después de la separación de la prensa de estampar, se llena el espacio intermedio mediante la inmersión del sustrato en una disolución de un tiol funcionalizado hidrofílicamente (tal como el ácido 16-mercaptohexano decanoico). De esta manera, se obtiene una superficie con patrones de tiolatos terminados con COOH- y CH₃. La geometría y el tamaño de los patrones dependen de la microestructura de la prensa elastomérica de estampar. Las dimensiones laterales preferidas varían desde 0,5 hasta 50 μm. En Adv. Materials 2003, 15, n° 13, pp. 1113 a 1118 de Kaltenpoth *et al.*, se describe un proceso adecuado para la creación de patrones.

30 De manera alternativa, el patrón de las propiedades superficiales se puede conseguir mediante reacciones fotoquímicas. Con la irradiación a través de una máscara, las moléculas con grupos fotoestables como las mitades de benzofenona, diacirina o azida están ligadas a matrices orgánicas en estructuras bien definidas. Las áreas superficiales no derivatizadas pueden reaccionar con otros tipos de moléculas en pasos sucesivos. Los problemas en la derivatización superficial se dan como resultado de reacciones químicas paralelas no deseadas y posibles procesos de fragmentación durante la iluminación. Este dilema se puede superar mediante el enmascarado temporal de las funcionalidades químicas con grupos protectores no fotoestables, que son eliminados cuantitativamente después del proceso de inmovilización. Las dimensiones de las estructuras químicas generadas varían desde 500 nm hasta 1 mm (tesis doctoral, Jürgen Pipper, Universidad de Heidelberg, 1999).

40 Se puede conseguir el patrón químico en la escala nanométrica mediante litografía por haz de electrones. Por ejemplo, SAM de silano terminados con amino depositados en sustratos de Si pueden recibir un patrón con una resolución de aproximadamente 80 nm mediante la disociación inducida por electrones del grupo amino. Las estructuras superficiales químicas pueden actuar como plantillas para la adsorción dirigida de partículas no metálicas en las áreas no expuestas al haz (Harnett *et al.*, Appl. Phys. Lett. 2000, 76 n° 17, 2466-2468). De manera alternativa, los grupos terminales NO₂ de SAM de 4'-nitro-1,1'-pifenil-4-tiolato en oro pueden ser convertidos a grupos NH₂ mediante irradiación por haz de electrones, mientras que la película aromática subyacente está reticulada ("chemical nanolithography"; Götzhäuser *et al.*, Adv. Mater. 2001, 13 n° 11, pp. 806-809). Las estructuras más pequeñas factibles en la actualidad son líneas de un grosor de 20 nm. La nanoestructura generada terminada con NH₂ puede servir como una plantilla en reacciones de acoplamiento subsiguientes, formando, de esta manera, la base para una variedad de modificaciones superficiales químicas.

Los núcleos no metálicos de las partículas

55 Los materiales adecuados para el núcleo no metálico incluyen, pero no están limitados a, materiales inorgánicos como dióxido de sílice, sulfuro de oro, dióxido de titanio, germanio, arsenuro de galio, sílice, materiales derivados de la sílice (por ejemplo, silicio fundido, geles de silicona y polisiloxanos) y materiales derivados del estaño, polimetil metacrilato (PMMA), poliestireno, otras macromoléculas como dendrímeros, polielectrolitos, hidrogeles, micelas y vesículas. Las partículas pueden contener tintes fluorescentes, materiales activos ópticamente (o sea, materiales que absorben la luz en un primer rango de longitud de onda y que luego emiten luz en un segundo rango de longitud de onda que es distinto del primer rango de longitud de onda) y/o ser funcionalizadas con grupos químicos que son adecuados para reticular las partículas como los grupos amina o los grupos carboxilato. Los materiales no metálicos preferidos son materiales dieléctricos. Un material de núcleo dieléctrico preferido es el dióxido de sílice o el poliestireno (conteniendo preferiblemente grupos sulfato). Preferiblemente, la media del diámetro promedio de los núcleos no metálicos de las partículas se encuentra en el rango de 10 a 1000 nm, más preferiblemente de 50 a 700 nm, y aún más preferiblemente de 80 a 500 nm. Para algunas aplicaciones, es particularmente ventajosa una media del diámetro promedio de 10 a 150 nm. En el caso de un sustrato constituido por un material de guía de ondas, el diámetro medio se encuentra, preferiblemente, en el rango de 3 a 30 μm. La forma de las partículas puede ser esférica o no esférica tal como una

ES 2 321 228 T3

forma de aguja, una forma de cubo, de pirámides, etc. Se prefieren los núcleos esféricos. En una realización preferida, se utilizan materiales de núcleo no metálico monodisperso que tienen una desviación estándar del diámetro medio del núcleo del 15% o menos, más preferiblemente del 10% o menos, aún más preferiblemente del 5% o menos. La media del diámetro promedio de las partículas se determina mediante mediciones por dispersión de luz láser (dispersión de Rayleigh).

Adsorción de los núcleos no metálicos en el sustrato

En contraste a los chips descritos, por ejemplo, en el documento US 2003/0174384 A1, en el que se adsorben los nanoenvolturas de oro encima de una superficie de oro, el chip de la presente invención está producido al adsorber primero las partículas no metálicas del núcleo en el sustrato. Para conseguir esto, las partículas no metálicas del núcleo están suspendidas en una disolución adecuada y luego son adsorbidas en la superficie del sustrato.

Para mediar en la adsorción de las partículas en el sustrato, se pueden utilizar cualquiera de los procedimientos conocidos comúnmente (Himmelhaus y Takei, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2002, 4, pp. 496 - 506). Por ejemplo, se pueden aplicar los procedimientos físicos basados en la tensión superficial (Lenzmann *et al.*, *Chem. Mater.* 1994, 6, pp. 156; Deckman *et al.*, *J. Vac. Sci. Technol. B* 1989, 7, pp. 1832) y en las fuerzas capilares (Rakers *et al.*, *Langmuir* 1997, 13, pp. 7121; Denkov *et al.*, *Langmuir* 1992, 8, pp. 3183). Se puede lograr un control adicional al utilizar campos de corriente hidrodinámicos en una geometría restringida o enfriando la suspensión para minimizar el movimiento browniano (Burmeister *et al.*, *Chem. Eng. Technol.* 1998, 21, pp. 761). Además, por medio de las macromoléculas añadidas a la suspensión, se pueden generar fuerzas antrópicas, que inducen fuerzas de atracción entre las partículas no metálicas y el sustrato (Rudhardt *et al.*, *Phys. Rev. Lett.* 1998, 81, pp. 1330). Además de los medios físicos, también se pueden aplicar procedimientos químicos para controlar la adsorción superficial de las partículas. Por ejemplo, mediante la adición de sales o productos químicos que alteran las propiedades superficiales, como los surfactantes, a la suspensión, se puede cambiar la carga superficial de las partículas no metálicas, alterando de esta manera la interacción entre las partículas al igual que entre las partículas y el sustrato (Chen *et al.*, *Langmuir* 2000, 16, pp. 7825; Himmelhaus y Takei, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2002, 4, pp. 496). En general, se puede utilizar cualquier procedimiento que altere la estabilización de la suspensión coloidal, o sea, reduzca la repulsión efectiva entre las partículas al igual que entre las partículas y la superficie, para la formación de una capa de adsorbato de partículas no metálicas en la superficie.

En un modelo de preparación preferido, se utilizan esferas de poliestireno monodisperso preferiblemente sulfatado con un diámetro de 10 a 800 nm con un procesamiento adicional como sigue: la suspensión de esferas (que contiene, preferiblemente, esferas de 1 a 4% en volumen) se mezcla con agua desionizada y un tampón de fosfato a un pH de 7,6, preferiblemente en una relación de volumen de (1 a 3):(1 a 3):(1 a 3). Antes de mezclar, se añade EDC al tampón de fosfato. Entonces, la suspensión activada se coloca sobre un sustrato en menos de 5 minutos. En el caso de la adsorción de las partículas en oro nativo, un valor de 1 a 10 mg de EDC por ml de disolución de tampón rinde los mejores resultados, con respecto a la uniformidad de la adsorción de las partículas en la superficie. Se permiten que las suspensiones reposen sobre la superficie (por ejemplo, durante una hora), y luego se enjuaga con una cantidad abundante de agua desionizada. Finalmente, la capa obtenida de esta manera de partículas de poliestireno se seca al aire libre.

Los núcleos no metálicos pueden ser adsorbidos como una monocapa o como múltiples capas. Se prefiere en particular la formación de las monocapas. Dependiendo del procedimiento aplicado para la formación de la monocapa, las partículas pueden conseguir un empaquetamiento regular o aleatorio. Se prefiere el empaquetamiento aleatorio por la ausencia de problemas relacionados con la difracción y la facilidad de producción de áreas mayores. Con el proceso de revestimiento de la presente invención, se pueden conseguir densidades muy elevadas de empaquetamiento aleatorio superiores al 35%, preferiblemente superiores al 45% y aún más preferiblemente superiores al 50%. Obsérvese que la máxima densidad de empaquetamiento para un empaquetado compacto aleatorio es del 54,7% de la cobertura total que es el límite de interferencia del modelo de adsorción secuencial aleatorio para esferas (Hinrichsen *et al.*, *J. Stat. Phys.* 1986, 44 pp. 793).

También se puede preferir utilizar partículas de al menos dos medias distintas de diámetros promedio. En una realización particularmente preferida, se utiliza un núcleo no metálico con una media de diámetro promedio en el rango de 200 a 800 nm en combinación con un núcleo no metálico con una media de diámetro promedio en el rango de 10 a 100 nm. En la superficie, las partículas más pequeñas pueden rellenar los huecos entre las partículas más grandes y de esta manera aumentar la densidad total de la partícula en la superficie.

Si se proporciona el sustrato con una capa con un patrón que proporciona regiones de distintas propiedades físicas o químicas tal como topologías adaptadas, distintas hidrofílicidades o grupos funcionales químicos, se puede llevar a cabo la adsorción de las partículas no metálicas del núcleo de tal forma que las partículas se adsorben en únicamente una de estas regiones, por ejemplo, en el caso de superficies cargadas, la región con una carga opuesta a la de las partículas (Chen *et al.*, *Langmuir* 2000, 16, pp. 7825), en el caso de patrones hidrófilos/hidrófobos, las regiones más hidrófilas (Aizenberg *et al.*, *Phys. Rev. Lett.* 2000, 84, pp. 2997), y en el caso de regiones alternas de funcionalidades carboxílicas y de metilo, en los grupos carboxílicos activos químicamente. En este caso, se puede mediar la adsorción mediante la adición de EDC (Himmelhaus y Takei, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2002, 4, pp. 496 - 506), que es un procedimiento preferido conforme a la presente invención. La Fig. 3 muestra una monocapa de partículas con patrón, que fue fabricada mediante el estampado por microcontacto de un patrón químico en una superficie de oro y la adición

de EDC a la suspensión de partículas antes de la exposición al patrón químico (para más detalles, cf. Fig. 1 y ejemplo 1).

En el caso de un sustrato que comprende elementos de guía de ondas, se puede utilizar la capa con patrón para proporcionar un acoplamiento óptico entre las partículas no metálicas y los elementos de guía de ondas.

Metalización de los núcleos no metálicos

Conforme a la presente invención, se adsorben los coloides de un metal de transición o de una aleación de metales de transición en la superficie constituida por las partículas no metálicas y/o el sustrato.

Los coloides pueden tener una forma esférica o no esférica, tal como similar a una aguja o triangular. Los coloides pueden ser adsorbidos en un patrón si están embebidos en una envoltura orgánica (Spatz *et al.*, *Macromol.* 1996, 29, pp. 3220).

El procedimiento de adsorción depende de la naturaleza del núcleo no metálico. Por ejemplo, para las partículas de dióxido de sílice, la superficie se puede activar con (aminopropil)trimetoxisilano, en el que se adsorben subsiguientemente los coloides, similar al proceso descrito por Halas y colaboradores en *Langmuir* 1998, 14, pp. 5396, para partículas en una disolución. Para partículas de poliestireno, el procedimiento descrito por Lirtsman *et al.*, en *Adv. Mater.* 2001, 13, p. 1253, se puede adaptar para partículas en suspensiones, como se describe en mayor detalle en los ejemplo.

Subsiguientemente a la adsorción de los coloides, el material puede ser sometido a un paso de revestimiento por reacción química (por ejemplo, utilizando sales de metales de transición y un agente reductor) para aumentar la cobertura del metal (de transición) o de la aleación de los metales (de transición) y/o para mejorar los contactos eléctricos entre los coloides. El procedimiento de deposición de coloides y/o revestimiento por reacción química se puede repetir una o varias veces para conseguir un revestimiento altamente conductor como se describe en Kaltenpoth *et al.*, (*Adv. Mater.* 2003, 15, pp. 1113).

De manera alternativa, el revestimiento se puede obtener mediante deposición catódica con un metal de transición o con una aleación de metales de transición, como conocen los expertos en la técnica.

En una realización preferida, el revestimiento de los núcleos no metálicos consisten en distintas subcapas metálicas, separadas entre sí mediante capas intermedias no metálicas, que pueden contener tintes fluorescentes u otros materiales activos ópticamente. Dichas capas intermedias no metálicas pueden prepararse, por ejemplo, mediante evaporación o deposición catódica de un material no metálico. De manera alternativa, se puede utilizar la técnica de capa a capa, en particular para incorporar tintes u otros materiales activos ópticamente en las capas intermedias (Campbell *et al.*, *Chem. Mater.* 2005, 17, pp. 186 - 190; Decher y Schlendoff (eds.), *Multilayer Thin Films*, Wiley-VCH 2003).

Conforme a una realización preferida de la presente invención, el revestimiento de los núcleos no metálicos cubre esencialmente la superficie libre de los núcleos no metálicos de manera uniforme. Es decir, el revestimiento está formado en la superficie completa que está disponible para la adsorción, siendo esta superficie la superficie de las partículas con la excepción de las áreas que no son accesibles debido a su contacto con otra partícula o a la superficie del sustrato. El revestimiento puede consistir en coloides aislados, una capa colindante de coloides, o una capa continua de un metal de transición o de una aleación de metales de transición. La colindancia del revestimiento puede estar adaptado, por ejemplo, mediante una deposición de coloides y pasos sucesivos de revestimiento por reacción química, como se ha descrito anteriormente.

Caracterización de la superficie del chip

En contraste con el procedimiento descrito por Himmelhaus y Takei (*Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2002, 4, 496 - 506; *Sensors and Actuators B* 63 (2000) 24 - 30), en el que se evaporó térmicamente oro en una superficie revestida con partículas de poliestireno, proporcionando de ese modo una superficie con nanopartículas de oro con forma de cápsula, el chip de la presente invención está constituido por partículas revestidas con metal con núcleos no metálicos en el que cada núcleo no metálico, de media, forma un punto de contacto rodeado de metal, una así llamada abertura, con al menos otro núcleo no metálico y/o con la superficie del sustrato.

Preferiblemente, los puntos de contacto entre los núcleos de las partículas están caracterizados de forma que, de media, están rodeados por el revestimiento de metal de transición o de la aleación de metales de transición hasta una extensión de $\theta > 220$ grados (cf. Fig. 5g y h). En una realización preferida, el revestimiento de metal de transición o de aleación de metales de transición conecta de manera colindante las partículas con un punto de contacto común (Fig. 8b y c).

En el caso de partículas esféricas, el revestimiento también está presente en la semiesfera de las partículas dirigida hacia la superficie del sustrato.

En el caso de una monocapa de partículas, cada núcleo no metálico, de media, contacta preferiblemente tanto con al menos otro, preferiblemente al menos 1,5 otro(s) núcleo(s) central(es) no metálico(s), como con la superficie del

sustrato. En el caso de multicapas de partículas, cada núcleo no metálico, de media, contacta preferiblemente con al menos 2 otros núcleos no metálicos.

En el caso de que de media se forme menos de un punto de contacto entre los núcleos de las partículas, el metal o la aleación metálica cubre los núcleos de las partículas y el sustrato de una forma colindante (Fig. 5d).

Preferiblemente, el revestimiento metálico cubre de manera uniforme la superficie libre de los núcleos no metálicos, es decir, la superficie que no está en contacto con otro núcleo o con la superficie del sustrato.

Se puede utilizar la microscopía electrónica con barrido (SEM) para probar la existencia de puntos de contacto, y para caracterizar el revestimiento que los rodean de metal de transición o de aleación de metales de transición al igual que la formación de una conexión colindante entre las partículas y/o el sustrato. Para esto, se puede retirar parte de la capa de partículas del sustrato por medio de una cinta adhesiva de doble cara (Fig. 6) y se analiza el borde entre las partículas estables y las adsorbidas anteriormente. En las Figuras 6a-k se dan ejemplos de un análisis de SEM después de este procedimiento.

En el caso de partículas no esféricas, se puede aplicar el mismo procedimiento analítico para la verificación de los puntos de contacto como se ha descrito anteriormente para las partículas esféricas. Sin embargo, la forma de las aberturas, es decir, los agujeros en el revestimiento metálico, dependerá de la simetría del área de contacto.

El dispositivo óptico para la detección de un analito

Los chips de la presente invención muestran propiedades ópticas únicas que los hacen particularmente útiles para su uso en sensores y formaciones bioquímicos. Se ha demostrado que las estructuras en capas constituidas por películas metálicas delgadas, materiales dieléctricos, y nanopartículas de oro exhiben características de extinción óptica diferenciadas en el régimen de IR a UV. De esta manera, la invención también proporciona un dispositivo óptico para la detección de un analito constituido por el chip de la presente invención, un sistema óptico para irradiar dicho chip, y un sistema de detección para detectar la luz reflejada, transmitida, dispersa o difractada, preferiblemente reflejada, por dicha superficie del chip. También se observó que el espectro de extinción óptico medido es afectado de manera sensitiva por la adsorción de moléculas orgánicas en la superficie del chip. Como hallaron sorprendentemente los presentes inventores, el chip conforme a la presente invención es significativamente más sensible que los chips de la técnica anterior.

La irradiación o la luz de excitación excita las oscilaciones colectivas de los electrones de conducción (resonancia de plasmón) dentro del revestimiento metálico de los núcleos no metálicos y/o del sustrato. La excitación de estas oscilaciones colectivas provoca una pérdida en la luz reflejada, dispersa o difractada por la superficie o transmitida a través de la misma, que puede ser analizada de forma espectral, por ejemplo, por medio de un espectrómetro de fibra óptica, para determinar las características de la excitación del plasmón superficial (por ejemplo, la longitud de onda de la resonancia y la absorbancia pico). La longitud de onda de la resonancia se encuentra normalmente en la región ultravioleta, visible o infrarroja del espectro. Se puede obtener información resuelta lateralmente, por ejemplo, mediante visualización óptica de la luz reflejada, dispersa o difractada por la superficie o transmitida por la misma en la superficie activa de un sensor CCD. De manera alternativa, la luz reflejada, transmitida, dispersa o difractada se puede separar de la luz de irradiación (luz de excitación) utilizando microscopía de campo oscuro, microscopía de reflexión, microscopía de reflexión interna total o microscopía óptica de barrido de campo cercano. Entonces, se puede analizar la firma espectral de la luz reflejada, transmitida, dispersa o difractada y ser grabado por una cámara CCD, uno o más fotodiodos, fotomultiplicadores y/o disposiciones de fotodiodos en combinación con un espectrómetro, un monocromatizador y/o un espejo dicróico.

Un dispositivo óptico sencillo que se puede utilizar con los chips consiste en una fuente de luz blanca conectada a una fibra óptica para la iluminación de una muestra, una segunda fibra para detectar la luz reflejada, dispersa o difractada por el chip o transmitida por el mismo, y un espectrómetro de fibra óptica conectado a un dispositivo electrónico para el almacenamiento de datos y su evaluación (Fig. 8a y b). Si se desea información resuelta lateralmente, se pueden barrer lateralmente la fibra de detección y el chip entre sí. De manera alternativa, la fibra óptica utilizada para la detección puede ser reemplazada por un sistema óptico, que visualiza ópticamente la superficie completa del chip en el área activa de un chip CCD o de una disposición de diodos o de un dispositivo afín de detección óptica resuelta lateralmente (Fig. 8c). La fuente de luz blanca puede ser sustituida por una o más fuentes monocromáticas, por ejemplo, de 3 a 5 LED o diodos láser que funcionan a distintas longitudes de onda, o puede estar conectada a un sistema de filtraje espectral antes de la iluminación de la superficie del chip para facilitar la adquisición de información resuelta espectral y lateralmente.

Si se utilizan un número pequeño de fuentes de luz monocromáticas o de banda estrecha, tal como LED o diodos láser, se pueden utilizar los cambios de las intensidades de la luz reflejadas, transmitidas, dispersas o difractadas en las longitudes respectivas de ondas debidos a los cambios en las propiedades ópticas en proximidad cercana a la superficie para determinar los cambios de los espectros por completo, por ejemplo, mediante interpolación o el acomodo de los espectros a funciones modelo.

En un enfoque alternativo, se excitan los modos de cúpula susurrante dentro de las partículas dieléctricas adsorbidas por la superficie, por ejemplo, mediante acoplamiento óptico entre las partículas no metálicas y un material de guía

de ondas o elementos de guía de ondas, tal como un guíaondas plano o una fibra óptica. En este caso, es ventajoso el uso de partículas no metálicas con un diámetro > 5 μm para la excitación por luz en la región visible y/o NIR del espectro electromagnético (Oraevsky, Quantum Electronics 2002, 32, pp. 377). También, en este caso, las partículas están depositadas preferiblemente en la superficie de guía de ondas de tal forma, que tienen un número controlado de puntos de contacto con partículas colindantes, por ejemplo, ningún contacto en absoluto. Esto se puede conseguir, por ejemplo, mediante la aplicación del estampado por microcontacto (cf. ejemplo 1) al estampar patrones cuadrados con un tamaño menor que el diámetro de la partícula. Otro ejemplo de controlar los puntos de contacto entre las partículas es la disposición de un número controlado de partículas en líneas. De nuevo, esto se puede conseguir mediante estampado por microcontacto (Kaltenpoth *et al.*, Adv. Mater. 2003, 13, pp. 1113).

Inmovilización de los agentes aglomerantes

Para hacer el chip selectivo para analitos específicos, se prefiere revestir la superficie del chip con agentes aglomerantes que son capaces de aglomerar (preferiblemente de manera reversible) un analito, tal como proteínas, péptidos y ácidos nucleicos. Se conocen procedimientos para conjugar los agentes aglomerantes a superficies metálicas y son igualmente adecuadas para derivatizar la superficie del chip de la presente invención. Por ejemplo, el chip de la presente invención puede ser modificado químicamente utilizando las químicas de los metales de transición (por ejemplo, oro)-tiol. Por ejemplo, se puede sumergir la superficie con los núcleos no metálicos revestidos con metal en una disolución de moléculas de tiol que tienen un grupo amino como el aminoetanetiol de forma que se modifique la superficie del chip con un grupo amino. A continuación, se puede activar por EDC una biotina modificada con N-hidroxisuccinimida suspendida en una disolución tampón de pH 7 - 9, y ser añadida a la superficie del chip modificado con anterioridad con un grupo amino. Como resultado, se forma un enlace amida de forma que se modifican los núcleos no metálicos revestidos con metal con biotina. A continuación, se puede ligar avidina o estreptavidina que comprenden cuatro emplazamientos de aglomeración a la biotina. A continuación, se puede ligar cualquier molécula biológica derivatizada de la biotina como proteína, péptido, ADN o cualquier otro ligando a la superficie de los núcleos no metálicos revestidos con metal modificados con avidina.

De manera alternativa, las superficies terminadas con amino pueden reaccionar con una disolución acuosa de glucardialdehído. Después de enjuagar el sustrato con agua, es expuesto a una disolución acuosa de proteínas o péptidos, facilitando un acoplamiento covalente de las biomoléculas mediante sus grupos amino (R. Dahint *et al.*, Anal. Chem., 1994, 66, 2888-2892). Si el chip está terminado primero con carboxi, por ejemplo, mediante la exposición a una disolución etanólica de ácido mercapto undecanoico, se pueden activar los grupos funcionales terminales con una disolución acuosa de EDC y N-hidroxisuccinimida). Finalmente, las proteínas o los péptidos están enlazados de manera covalente a la superficie activada mediante sus grupos amino a la solución acuosa (Herrwerth *et al.*, Langmuir 2003, 19, 1880-1887).

Un problema general para controlar e identificar las interacciones bioespecíficas en las superficies es la adsorción no específica. Las técnicas habituales para superar este obstáculo están basadas en la exposición de los sustratos funcionalizados a otras biomoléculas que se adhieren fuertemente para así bloquear los emplazamientos de adsorción no específicos. Sin embargo, la eficacia de este procedimiento depende del sistema biológico que se está estudiando y los procesos de intercambio se pueden dar entre especies disueltas y unidas superficialmente. Además, la eliminación de las biomoléculas adsorbidas de manera no específica puede requerir abundantes pasos de lavado, de esta manera, evitando la identificación de los eventos de aglomeración específicos con una afinidad reducida.

Una solución a este problema es la integración de los agentes aglomerantes en los materiales inertes, tal como películas de poli(PEG) y oligo(etilenglicol) (OEG). La técnica más habitual para integrar elementos de aceptación bioespecíficos en SAM terminados con OEG está basada en la coadsorción de disoluciones binarias, compuestas por moléculas de EG resistentes a la proteína y una segunda especie molecular funcionalizada adecuada para el acoplamiento del agente aglomerante (o que contiene el propio agente aglomerante). De manera alternativa, también se ha informado del acoplamiento directo del agente aglomerante a moléculas de PEG de extremos funcionalizados de injerto superficial.

Recientemente, se ha sintetizado un alcanotiol poli(etilenglicol) COOH-funcionalizado, que forma SAM densamente empaquetados en superficies de oro. Después del acoplamiento covalente de los receptores bioespecíficos, las películas eliminan de manera efectiva las interacciones no específicas mientras que exhiben una elevada aceptación específica (Herrwerth *et al.*, Langmuir 2003, 19, pp. 1880-1887).

Las entidades aglomerantes inmovilizados en la superficie pueden ser proteínas como anticuerpos, péptidos, oligonucleótidos, o ADN (que se hibridan con un oligonucleótido o ADN específico objetivo, por ejemplo, un rango de secuencia específico de un gen, que puede contener un polimorfismo de nucleótido simple (SNP), o carbohidratos). Para reducir las interacciones no específicas, las entidades aglomerantes estarán integradas preferiblemente en materiales inertes de matriz.

De esta manera, la invención también proporciona un procedimiento para determinar la concentración de un analito, constituido por los pasos de aglomerar una disolución que contiene potencialmente uno o más analitos en contacto con un chip de la presente invención mientras se irradia la superficie del chip, y detectar la luz reflejada, dispersa o difractada por dicha superficie del chip o transmitida por la misma. De manera alternativa, la luz reflejada, transmitida, dispersa o difractada también puede ser detectada después de la eliminación de la disolución. Al comparar las

propiedades ópticas de la superficie antes y después de la adsorción del analito, son posibles tanto mediciones cualitativas como cuantitativas. Más preferiblemente, se registra de manera continua la intensidad de la señal. Esto permite interpretaciones adicionales acerca de la cinética de la adsorción y aumenta la utilidad del dispositivo reivindicado.

5 *Microconjuntos*

En una realización preferida, se inmoviliza una pluralidad de agentes aglomerantes en la superficie de tal forma que se pueden asignar distintas ubicaciones en la superficie del chip a distintos agentes aglomerantes. En otras palabras, la invención también proporciona microconjuntos de agentes aglomerantes tal como conjuntos de ácido nucleico o conjuntos de péptidos. Un microconjunto es un conjunto miniaturizado ordenado definido espacialmente de una multitud de reactivos inmovilizados. Por ejemplo, los agentes aglomerantes pueden estar asignados a distintas ubicaciones al utilizar dispositivos de micropunto como robots o microestampadoras (véase *Angew. Chem. Int. Ed.* 2002, 41, pp. 1276-1289).

En vez de inmovilizar las moléculas completas del agente aglomerante, el agente aglomerante como los péptidos o los ácidos nucleicos también pueden estar formados en la superficie *in situ*. Se puede llevar a cabo una síntesis combinatoria de péptidos con una impresora láser de color modificada (A. Poustka *et al.*, solicitud de patente WO 00/35940, 2000) que permite la transferencia de “partículas monoméricas de tóner” sobre un soporte. Las partículas consisten en aminoácidos o nucleótidos protegidos y un “disolvente sólido”. Después de formar un patrón bidimensional de partículas de tóner que contienen distintos aminoácidos en la superficie, se eleva la temperatura por encima de la temperatura de fusión de las partículas. Entonces, el disolvente sólido se licua y los, hasta el momento, monómeros atrapados se acoplan al soporte. Al repetir estos pasos de una forma combinatoria, se pueden generar muchos agentes aglomerantes distintos en la superficie. De manera alternativa, también se puede utilizar la tecnología descrita en el documento EP-A-619 321. Si se lleva a cabo la síntesis combinatoria en una capa estructurada o no estructurada de partículas, se facilita la exploración de alto rendimiento sin marcas de eventos de aglomeración haciendo un ensayo local de cambios en las propiedades ópticas del chip.

Como un chip para la inmovilización de un conjunto de agente aglomerante, se prefiere emplear, en particular, chips en los que las partículas están presentes con un patrón, como se ha descrito anteriormente. En particular, se prefiere aplicar el agente aglomerante de manera selectiva sobre las áreas revestidas con partículas. Por ejemplo, cuando la superficie está constituida por patrones cuadrados de áreas revestidas con partículas, se prefiere colocar el agente aglomerante sobre estas zonas. Esto se puede conseguir utilizando volúmenes de agente aglomerante o partículas de agente aglomerante (por ejemplo, partículas de tóner) que cubren aproximadamente el tamaño de estas zonas o una zona ligeramente menor. Este procedimiento reduce la interferencia entre las áreas individuales.

35 *Otras aplicaciones*

El chip y el dispositivo óptico que utiliza dicho chip descrito en la presente invención mide básicamente cambios en las propiedades en la proximidad inmediata de la superficie del chip. Por lo tanto, se puede aplicar la invención a cualquier aplicación que puede utilizar cambios en las propiedades dieléctricas, es decir, el índice de refracción, en proximidad a la superficie del chip como una medida, es decir, un mecanismo transductor, para la conversión de una señal física o (bio)química en una señal óptica y/o eléctrica. Por ejemplo, el chip y el dispositivo se pueden utilizar para seguir cambios de temperatura en un fluido en contacto con la superficie del chip. De la misma forma, se puede medir la concentración de sustancias disueltas en disoluciones mezcladas, la heterogeneidad en los perfiles de flujo, por ejemplo debidos a la turbulencia, la concentración al mezclar dos fluidos distintos, los cambios en la densidad de materiales viscoelásticos o elásticos en contacto con la superficie del chip. Se podrían monitorizar las proyecciones de las turbulencias en líquidos en la superficie del chip mediante el uso de mecanismos de detección resuelta lateralmente como se ha descrito para la lectura de los microconjuntos.

Si la superficie del chip está revestida con un material que es capaz de cambiar su densidad y, de esta manera, su índice de refracción debido a efectos físicos o químicos (por ejemplo, fuerzas o reacciones químicas), este chip y el dispositivo óptico pueden ser utilizados para monitorizar estos cambios. Por ejemplo, se puede inmovilizar un hidrogel en la superficie del chip, permitiendo de esta manera, seguir los cambios en el pH o la concentración de sal, la humedad de un gas, etc.

55 **Ejemplos**

Ejemplo 1

60 *Preparación de la superficie de un chip mediante adsorción mediada por EDC*

Para obtener una superficie de un chip revestida con una capa empaquetada densamente de nanopérlas de poliestireno (PS), se procedió como sigue:

65 El lado interno de la parte superior de una placa (FALCON, cat.# 3002 de BD Co.) de cultivo de células de poliestireno, que está dividido en 96 pocitos de - 9 mm de diámetro y una altura de borde de ~ 1 mm, se revistió con una película de oro (99,99%) de un grosor de 20 nm mediante evaporación. El evaporador estaba equipado con un filamento de tungsteno y hecho funcionar con una presión base de $5 \cdot 10^{-5}$ Pa. Des-

ES 2 321 228 T3

pués de la evaporación, se expuso la película de oro depositada en los pocitos del sustrato a una disolución acuosa de un alcanotiol terminado con carboxilo (TG, 97%; disolución de 10 mM en agua desionizada) durante 60 min para hacer la superficie hidrófila. Después de 60 min, se enjuaga la disolución con agua desionizada. Entonces, se expuso la superficie a una suspensión acuosa de perlas de poliestireno monodisperso con un diámetro medio de 350 nm, preparada de la siguiente forma: se mezclaron perlas de PS de 350 nm (desviación estándar < 5%; Polysciences, Warrington, Pensilvania, EE. UU.) suspendidos en agua con agua desionizada y un tampón de fosfato (pH 7,6) con una relación de volumen de 2:1:3. Antes de mezclar la suspensión, se añadió una pequeña cantidad de EDC {99%; Sigma-Aldrich} al tampón de fosfato para producir una solución tampón de EDC de ~ 3 mM, que se utilizó luego para preparar la suspensión. Los pocitos circulares del sustrato se rellenaron con la suspensión y se dejó reposar durante una hora. Subsiguientemente, fue enjuagado con una cantidad abundante de agua desionizada y fue secado al aire libre. Después de este procedimiento, se obtuvieron las capas de partículas según se muestran en la Fig. 2.

Para obtener capas de perlas de PS con patrón, se modificó el procedimiento descrito anteriormente de la siguiente forma (Fig. 1):

Antes de la exposición de la superficie de oro a la disolución acuosa de TG, se formó un patrón de octadecanotiol (ODT) en la superficie de oro mediante estampado por microcontacto (Kumar *et al.*, Science 1994, 263, pp. 60-62). De ese modo, se entintó una prensa elastomérica de estampar en relieve {poli(dimetilsiloxano)} con una disolución etanólica de ODT de 1 mM. Después de la evaporación del disolvente, se apretó levemente la prensa de estampar sobre la superficie de oro, transfiriendo de ese modo el ODT a la superficie de oro únicamente de las regiones salientes del relieve. Entonces, se aplicó el mismo procedimiento que en el caso de las superficies sin patrón, es decir, la exposición de la superficie a una disolución acuosa de tioglicolato, y una exposición subsiguientemente a una suspensión de perlas de PS activada por EDC. Sin embargo, en contraste con el procedimiento descrito anteriormente, se tuvo que reducir la cantidad de EDC para producir una concentración total de EDC en la suspensión de aproximadamente un 2,5% de la concentración utilizada anteriormente. Después de enjuagar y secar, se había formado una superficie de perlas de PS con patrón, como se muestra en la Fig. 3.

Ejemplo 2

Metalización de los núcleos no metálicos mediante adsorción capa a capa (LbL)

Se cubrieron las superficies del chip preparadas como se ha esbozado en el anterior ejemplo con un revestimiento metálico de la siguiente forma:

Se prepararon las partículas de oro con un diámetro medio de 2-3 nm al mezclar 1 ml de 1% $\text{HAuCl}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ (aq) con 100 ml de H_2O con una enérgica agitación durante un minuto, seguido por la adición de 1 ml de una disolución acuosa 1% de citrato Na_3 . Después de un minuto, se añadió a la disolución 1 ml de 0,075% NaBH_4 en 1% citrato Na_3 acuoso, que fue agitado adicionalmente durante 5 min. este procedimiento lleva a la formación de citrato estabilizado, es decir, partículas coloidales de oro cargadas negativamente, con un diámetro medio de 2-3 nm.

Para adsorber las partículas coloidales de oro sobre la superficie cubierta con perlas de PS, primero se revistió la superficie con polielectrolitos para proporcionar una carga superficial positiva. En primer lugar, se expuso la superficie a 90 μl (aquí, y a continuación: 90 μl por pocito) de ácido de poli(estireno) sulfónico (PSS) {1 mg de PSS por ml de 0,5 molar $\text{NaCl}_{(\text{aq})}$ } durante 20 min. Entonces, se enjuagó la superficie con agua desionizada. En un segundo paso, se expuso la superficie a 90 μl de poli(etilenimina) (PEI) {2 mg de PEI por ml de 0,5 molar $\text{NaCl}_{(\text{aq})}$ } durante otros 20 min, y luego fue enjuagado con agua desionizada. Este procedimiento dio como resultado una superficie cargada positivamente, que permitió la inmovilización de coloides de oro cargados negativamente. En consecuencia, la superficie fue expuesta subsiguientemente a 90 μl del oro coloidal preparado con anterioridad durante cinco horas. Después de enjuagar con agua desionizada, la superficie mostró vestigios de color morado debido a la adsorción del oro coloidal. Para garantizar la densidad óptima de las partículas coloidales de oro en la superficie, se repitió una vez el último paso. Entonces, se cultivan las partículas de oro adsorbidas mediante un paso de revestimiento por reacción química. De ese modo, se expuso la superficie a una mezcla (90 μl por pocito) de 3,5 ml de 0,1% $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (aq) y 1,5 ml de 0,04 M NH_2OH (aq) durante 3 min. Entonces, se enjuagó la superficie con agua desionizada y se secó en un chorro de nitrógeno. En esta etapa de la preparación, la superficie mostró un color morado oscuro en la reflexión cuando fue irradiada con luz blanca.

La Fig. 4a muestra micrografías electrónicas de reflejo del haz de la superficie resultante.

Ejemplo 3

Metalización de los núcleos no metálicos mediante deposición catódica

De manera alternativa, se metalizaron las perlas de PS adsorbidas por la superficie con una película delgada de oro mediante deposición catódica. Por medio de un sistema de revestimiento por deposición catódica (BAL-TEC,

ES 2 321 228 T3

Med020) operado a una presión base de $5 \cdot 10^{-5}$ Pa y una presión Ar de 5,1 Pa, se deposita catódicamente 20 nm de oro sobre la superficie de la muestra. Se montaron las muestras a una distancia de 50 mm del objetivo de oro y se deposita catódicamente a 30 mA durante 67 s. La Fig. 4c muestra una micrografía SEM de la superficie resultante.

5 Ejemplo comparativo 1

Metalización de los núcleos no metálicos mediante evaporación

Para una comparación directa con estudios anteriores (Himmelhaus y Takei, Sens. Actuators B 2000, 63, pp. 24-30, Takei *et al.*, Opt. Lett. 2002, 27, pp. 342), se revistieron las perlas de PS inmovilizadas por la superficie mediante evaporación de 20 nm de oro de la misma forma como se ha descrito anteriormente para el revestimiento de oro del sustrato. De ese modo, las envolturas de oro con forma de cápsula se forman en la mitad superior de las perlas de PS, según se puede ver en las micrografías SEM en la Fig. 4b.

15 Ejemplo comparativo 2

Fabricación del chip utilizando partículas núcleo-envoltura

Se llevó a cabo una comparación adicional con partículas núcleo-envoltura que consistían de un núcleo dieléctrico y una envoltura metálica, como han publicado anteriormente un número de autores (Oldenburg *et al.*, Chem. Phys. Lett. 1998, 288, pp. 243; Lirtsman *et al.*, Adv. Mater. 2001, 13, pp. 1253, Cassagneau y Caruso, Adv. Mater. 2002, 14, pp. 732; Kaltenpoth *et al.*, Adv. Mater. 2003, 15, pp. 1113).

Para obtener un revestimiento metálico para las perlas de PS de 350 nm utilizados en nuestro estudio, se aplicó el proceso de adsorción capa a capa descrito por Caruso *et al.* ("Nano-engineering of inorganic and hydrate hollow spheres by colloidal templating", Science 282: 1111 - 1114, 1998) para partículas dieléctricas en suspensión. En pocas palabras, se mezclaron 120 ml de una suspensión acuosa de perlas de PS de 350 nm con 1 ml de disolución de PEI {2 mg de PEI por ml de 0,5 molar $\text{NaCl}_{(\text{aq})}$ } y 500 μL de tampón de fosfato (pH 7,4) durante 20 - 30 min. Entonces, se centrifugó la mezcla a 8000 rpm durante diez minutos varias veces para separar las partículas de la fase fluida. Después de cada paso de centrifugado, se eliminó la porción clara del fluido mediante pipetado, seguido del añadido de una cantidad apropiada de agua desionizada para compensar la pérdida. En el primer ciclo de centrifugado, el agua desionizada añadida a la suspensión contenía NaCl con una concentración de 0,5 M. Se llevaron a cabo tres ciclos subsiguientes de centrifugado utilizando agua desionizada pura. De ese modo, se obtuvo una suspensión acuosa que contenía perlas de PS cargadas positivamente revestidas con PEI.

Para la adsorción de las partículas coloidales de oro (cf. ejemplo 2) en las perlas de PS revestidas con PEI, se diluyeron 200 μL de la suspensión de perlas de PS con 300 μL de agua desionizada. Entonces, se añadieron 1,5 ml de suspensión de oro coloidal. Si el color morado de la mezcla había desaparecido después de 12 horas, se repetía la adición de la suspensión de oro coloidal. Después de otras 12 horas, se eliminó el oro coloidal superfluo en tres ciclos de centrifugado.

Para formar envolturas metálicas cerradas alrededor de las perlas de PS, se añadieron 350 μL de 0,1% $\text{HAuCl}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ (aq) y 150 μl de 0,04 M NH_2OH (aq) a la suspensión obtenida después de la decoración de las perlas de PS con las partículas coloidales de oro. Se agitó la mezcla durante 2-3 minutos, luego se separó inmediatamente mediante centrifugado y pipetado. Las partículas núcleo-envoltura resultantes se muestran en la Fig. 7a.

Para formar una capa empaquetada densamente de partículas núcleo-envoltura en los pocitos de una placa de PS FALCON revestido con oro (cf. ejemplo 1) para una comparación directa con los resultados del ejemplo 2, se expuso la superficie de oro a una disolución acuosa de cisteamina durante 1 hora y se enjuagó subsiguientemente con agua desionizada. Se revistieron las partículas núcleo-envoltura preparadas como se ha descrito anteriormente con una capa adicional de PSS al mezclar 200 μl de suspensión de partículas núcleo-envoltura con 1 ml de solución de PSS (cf. ejemplo 2) durante 30 min. Después de 30 min, se ultracentrifugó y se separó la mezcla mediante pipetado, como se ha descrito anteriormente. Se añadió el agua desionizada para compensar la pérdida de volumen. Este procedimiento fue repetido tres veces. Entonces, se colocó la suspensión de partículas núcleo-envoltura sobre las superficies de oro funcionalizadas con cisteamina durante 2 horas. Finalmente, se enjuagó la suspensión y se secaron las superficies al aire libre. En la Fig. 7b se muestra una capa resultante de partículas.

Ejemplo 4

Micrografías SEM de las capas de partículas revestidas con oro mediante los distintos procedimientos de metalización

Las Figuras 4a y 4b muestra una superficie del chip preparada conforme al documento EP 0 965 835 A2; las Figuras 4c y 4d muestran una superficie del chip conforme a la presente invención mediante deposición catódica; las Figuras 4e y 4f muestran una superficie del chip preparada conforme a la presente invención mediante la adsorción de coloides y el revestimiento por reacción química subsiguiente. Las Figuras 4b, d y f muestran las capas de partículas después de la eliminación de algunas de las partículas colindantes con cinta adhesiva (cf. Fig. 6), de forma que se vuelven visibles las aberturas que se habían formado entre las partículas. El punto oscuro en la superficie del sustrato en la Fig. 4d indica dónde había estado ubicada una de las partículas eliminadas. De manera similar, en las Figuras

4a y b se pueden ver las posiciones anteriores de las partículas eliminadas, dado que no se depositó el oro en las regiones oscurecidas por las partículas anteriormente adsorbidas. En la Fig. 4b dos partículas muestran puntos de contacto, que están rodeadas por el revestimiento metálico depositado mediante evaporación hasta una extensión de aproximadamente $\theta = 180^\circ$. El revestimiento metálico no se encuentra presente en esa mitad de las esferas dirigidas hacia la superficie del sustrato, dado que mediante la evaporación solo se pueden revestir las áreas de la superficie que están en visión directa de la fuente de evaporación.

Ejemplo 5

10 *Caracterización óptica de las superficies preparadas de distinta forma*

Para determinar las propiedades ópticas de las superficies de perlas de PS metalizadas mediante los distintos procedimientos descritos anteriormente, se midió la extinción dependiente de la longitud de onda de la luz reflejada por las superficies con una configuración de fibra óptica como se esboza en la Fig. 8a. Se colocó la sonda de fibra de reflexión utilizado para la iluminación y muestreo de la luz reflejada a una distancia de ~ 10 mm sobre la superficie y se orientó de forma perpendicular a la superficie. En primer lugar, se registró un espectro de referencia a partir de una zona superficial no tratada del sustrato de PS revestido con oro, es decir, el área interna de un pocito revestido solo con 20 nm de oro evaporado. Entonces, se analizaron los pocitos revestidos con perlas de PS y metalizadas conforme a los distintos procedimientos descritos anteriormente en distintas ubicaciones (centro del pocito y 2-3 puntos descentrados). Subsiguientemente, se calculó la extinción de estas capas con respecto a la referencia de oro.

Como una medida para la sensibilidad de las distintas superficies con respecto a la adsorción de las moléculas orgánicas, se expusieron subsiguientemente las superficies a una disolución etanólica de alcanotioles (1 mM de octadecanotiol (ODT), 95%; Sigma-Aldrich) durante ocho horas, luego enjuagadas con etanol puro (grado p.a.; Sigma-Aldrich) y secadas en un chorro de nitrógeno. Subsiguientemente, se registraron los espectros de extinción con respecto al espectro de referencia. Por medio de una etapa traductora 2D controlada mecánicamente, se pudieron analizar los mismos puntos investigados en la primera medición con una precisión de $< 0,1$ mm para un diámetro total del área de detección de > 3 mm.

En la Fig. 9 se muestran los espectros adquiridos exceptuando la capa de partículas núcleo-envoltura preparada conforme al ejemplo comparativo 2, dado que en este caso no fue observable ningún pico pronunciado en el rango visible completo y los cambios en los espectros de extinción debidos a la adsorción de tiol fueron insignificantes. Como es obvio, los picos de extinción alrededor de 560 nm en el caso de (a) y (b) y de 630 nm en el caso de (c) exhiben un desplazamiento claro en respuesta a la adsorción de los tioles. Las posiciones pico y la magnitud correspondiente de extinción están listadas en la Tabla 1. Además, se da el desplazamiento medio en la posición pico debida a la adsorción de tiol como una media de 5 muestras. Mientras que los cambios en la extinción son muy pequeños, se puede observar un desplazamiento claro en la posición pico en particular para las superficies del chip con una metalización preparada mediante la adsorción LbL de las partículas coloidales metálicas como se ha descrito en el ejemplo 2.

40

(Tabla pasa a página siguiente)

45

50

55

60

65

ES 2 321 228 T3

TABLA 1

5 *Posiciones pico y extinciones pico de espectros UV-vis de superficies del chip antes y después de la adsorción de octadecanotiol. Se prepararon las superficies mediante evaporación, deposición catódica y deposición LbL de partículas coloidales metálicas, conforme al ejemplo comparativo 1, al ejemplo 3 y al ejemplo 2, respectivamente. Las partículas núcleo-envoltura a las que se hace referencia en las últimas dos columnas fueron metalizadas en disolución antes de la adsorción superficial conforme al ejemplo comparativo 2*

10	Tratamiento	Evaporado		Deposición catódica		Deposición LbL		Partículas núcleo- envoltura	
		Posición pico (nm)	Extinción pico (ABU)	Posición pico (nm)	Extinción pico (ABU)	Posición pico (nm)	Extinción pico (ABU)	Posición pico (nm)	Extinción pico (ABU)
15	Antes de la adsorción de C18	556,5	1,68	553,0	1,55	617,7	1,92	837,20	1,04
20	Después de la adsorción de C18	559,2	1,79	558,4	1,45	627,9	1,68	837,20	1,05
25	Antes - Después	2,7	0,11	5,4	-0,1	10,2	-0,24	0,0	0,01
30	Desplazamiento medio (media de 5 muestras)	2,70 nm ± 0,86 nm		6,13 nm ± 1,51 nm		10,61 nm ± 6,47 nm		0,0 (media de 2 muestras)	0,01 (media de 2 muestras)

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un chip que comprende un sustrato con al menos una superficie, opcionalmente dieléctrica, y, encima de dicha al menos una superficie, una capa de partículas que tienen un núcleo no metálico y un revestimiento fabricado a partir de un metal de transición o de una aleación de metales de transición, **caracterizado** porque cada núcleo no metálico, de media, forma un punto de contacto rodeado por metal con al menos otro núcleo no metálico y/o la superficie del sustrato.
2. Un chip que comprende un sustrato con al menos una superficie y, encima de dicha al menos una superficie, una capa de partículas que tienen un núcleo no metálico y un revestimiento fabricado a partir de un metal de transición o de una aleación de metales de transición, obtenido mediante
- la adsorción de partículas no metálicas sobre dicha superficie del sustrato, y, subsiguientemente,
- la adsorción de coloides de un metal de transición o de una aleación de metales de transición sobre dichas partículas no metálicas,
- o, de manera alternativa, la deposición catódica de agrupaciones de metales de transición o agrupaciones de aleaciones de metales de transición sobre dichas partículas no metálicas, para proporcionar el revestimiento fabricado a partir de un metal de transición o de una aleación de metales de transición.
3. El chip conforme a la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el revestimiento metálico cubre de manera uniforme la superficie libre de los núcleos no metálicos, es decir, la superficie que no está en contacto ni con otro núcleo ni con la superficie del sustrato.
4. El chip conforme a una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el núcleo no metálico tiene una forma esférica y el revestimiento metálico también se encuentra presente en la semiesfera de las partículas dirigidas hacia la superficie del sustrato.
5. El chip conforme a una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que se proporciona una capa compuesta de un metal o de una aleación metálica entre el sustrato y dicha capa de partículas que tienen un núcleo no metálico y un revestimiento fabricado a partir de un metal de transición o de una aleación de metales de transición, y en el que cada núcleo no metálico, de media, forma un punto de contacto rodeado por metal con al menos otro núcleo no metálico.
6. El chip conforme a la reivindicación 5, en el que la capa compuesta de un metal o de una aleación metálica está compuesta de un metal de transición, de una aleación de metales de transición o de aluminio.
7. El chip conforme a la reivindicación 5 o 6, en el que se proporciona una capa no metálica entre dicha capa compuesta de un metal de transición o de una aleación de metales de transición y dicha capa de partículas.
8. El chip conforme a una de las reivindicaciones precedentes, en el que el sustrato consiste en un material de guía de ondas o comprende elementos de guía de ondas.
9. El chip conforme a una de las reivindicaciones precedentes, en el que la capa de las partículas es una monocapa con una densidad de empaquetamiento de al menos un 35%.
10. El chip conforme a una de las reivindicaciones precedentes, en el que las partículas están presentes siguiendo un patrón sobre la superficie.
11. El chip conforme a una de las reivindicaciones precedentes, en el que los agentes aglomerantes capaces de aglomerar un analito están inmovilizados sobre la superficie del chip.
12. El chip conforme a la reivindicación 11, en el que se inmoviliza una pluralidad de agentes aglomerantes sobre la superficie, de tal forma que se pueden asignar distintas ubicaciones en la superficie del chip a distintos agentes aglomerantes.
13. Un procedimiento para preparar el chip conforme a una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende los pasos de
- adsorber partículas no metálicas sobre dicha superficie del sustrato, y, subsiguientemente,
- adsorber coloides de un metal de transición o de una aleación de metales de transición sobre dichas partículas no metálicas,
- o, de manera alternativa, la deposición catódica de agrupaciones de un metal de transición o agrupaciones de una aleación de metales de transición sobre dichas partículas no metálicas, para proporcionar el revestimiento fabricado a partir de un metal de transición o de una aleación de metales de transición.

ES 2 321 228 T3

14. Un dispositivo óptico para la detección de un analito, que comprende el chip conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, un sistema óptico para irradiar dicho chip, y un sistema de detección para detectar la luz reflejada, transmitida, dispersa o difractada desde dicha superficie del chip.

5 15. Un procedimiento para determinar la concentración de un analito, constituido por los pasos de

proporcionar un chip conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12,

10 poner en contacto una disolución que contiene potencialmente uno o más analitos con dicho chip, y

detectar la luz reflejada, transmitida, dispersa o difractada desde dicha superficie del chip durante su exposición a la disolución o después de la misma.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

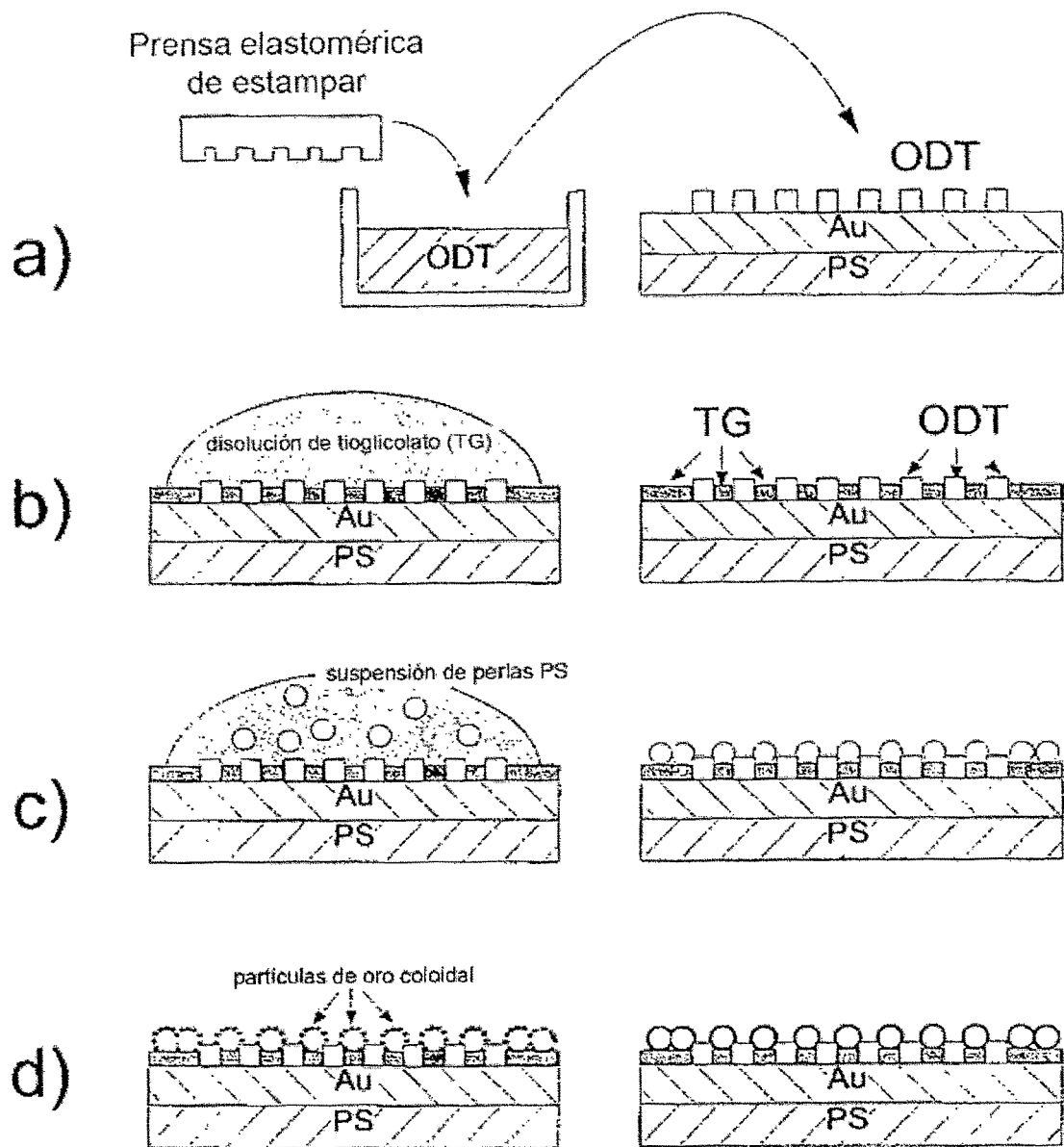


Figura 1

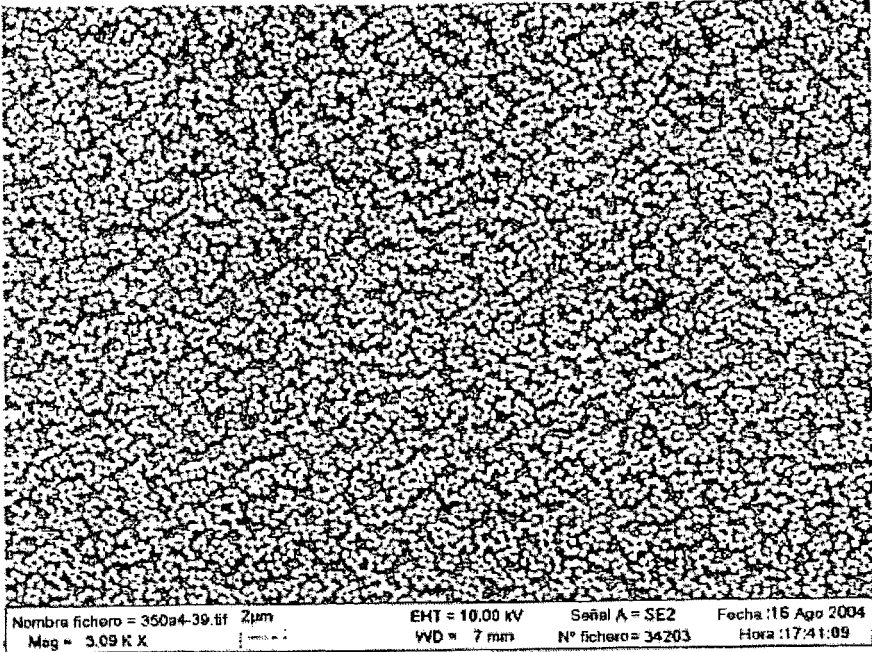


Figura 2

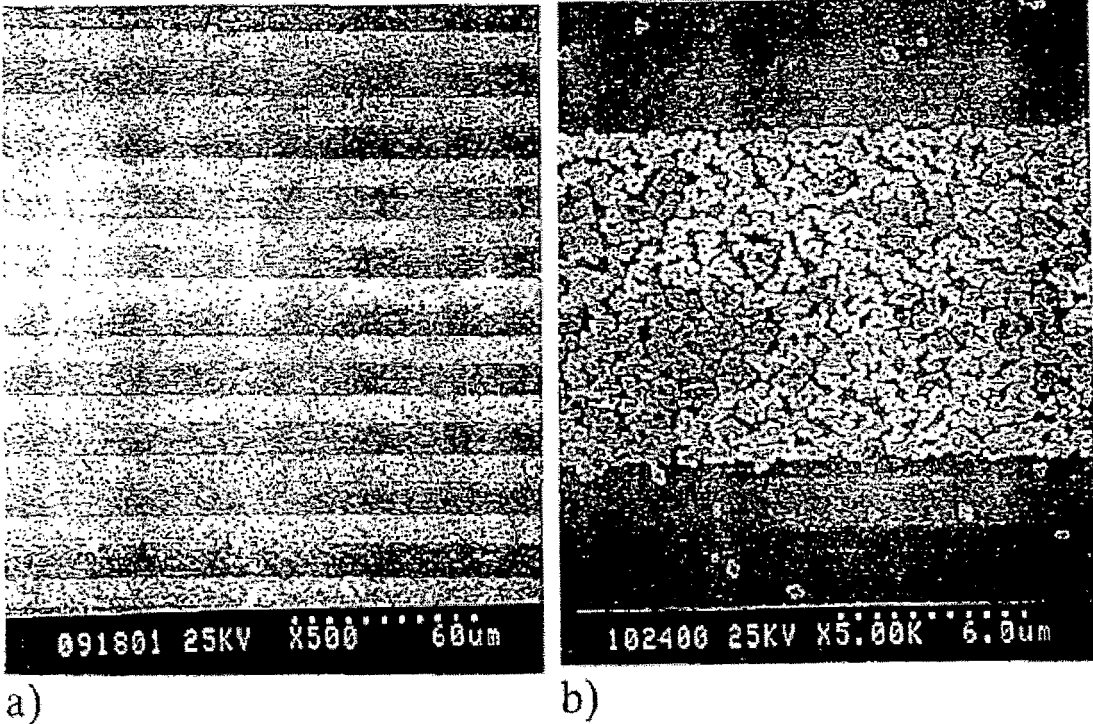
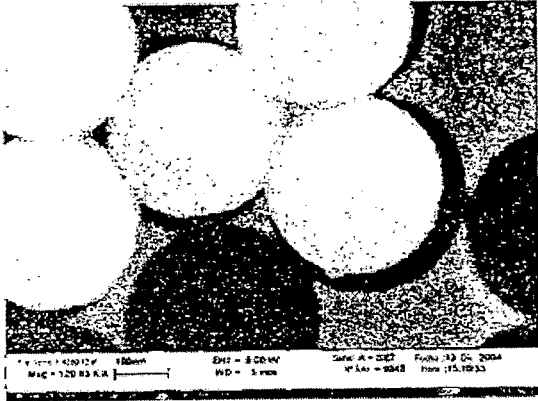
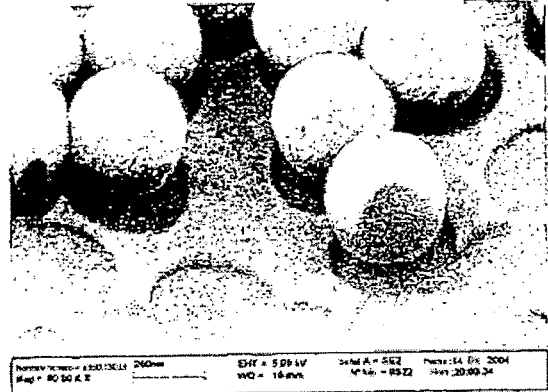


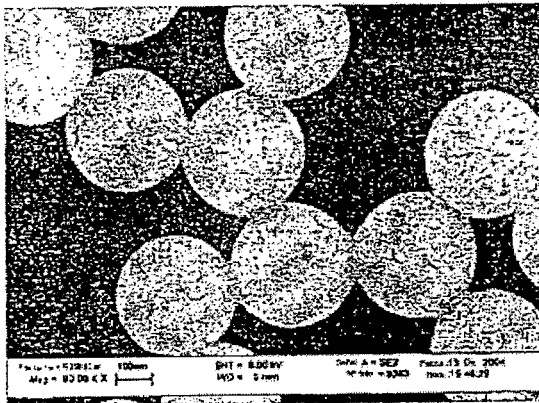
Figura 2



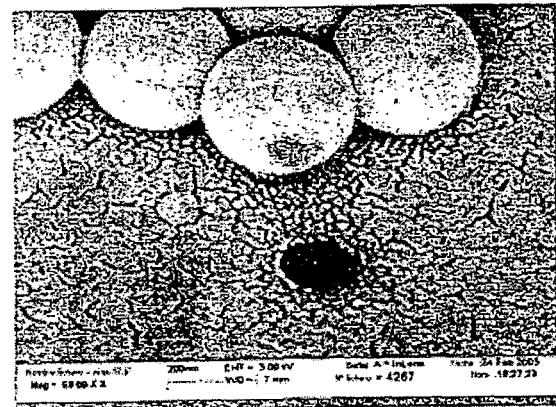
a)



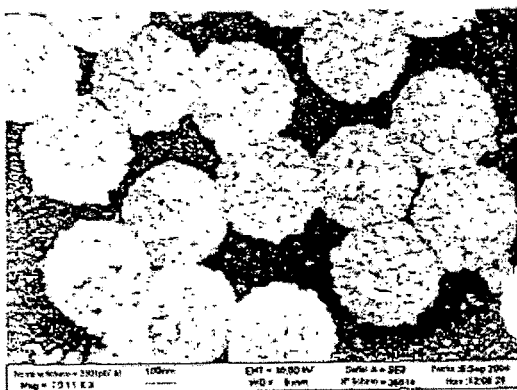
b)



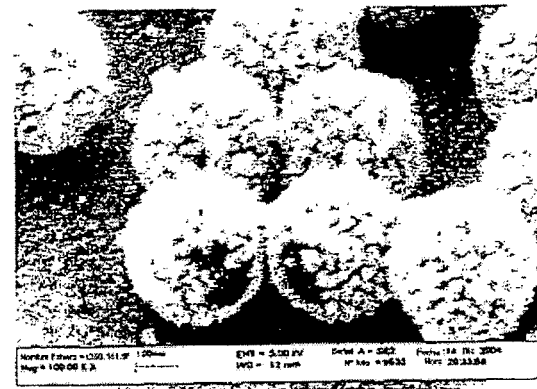
c)



d)



e)



f)

Figura 4

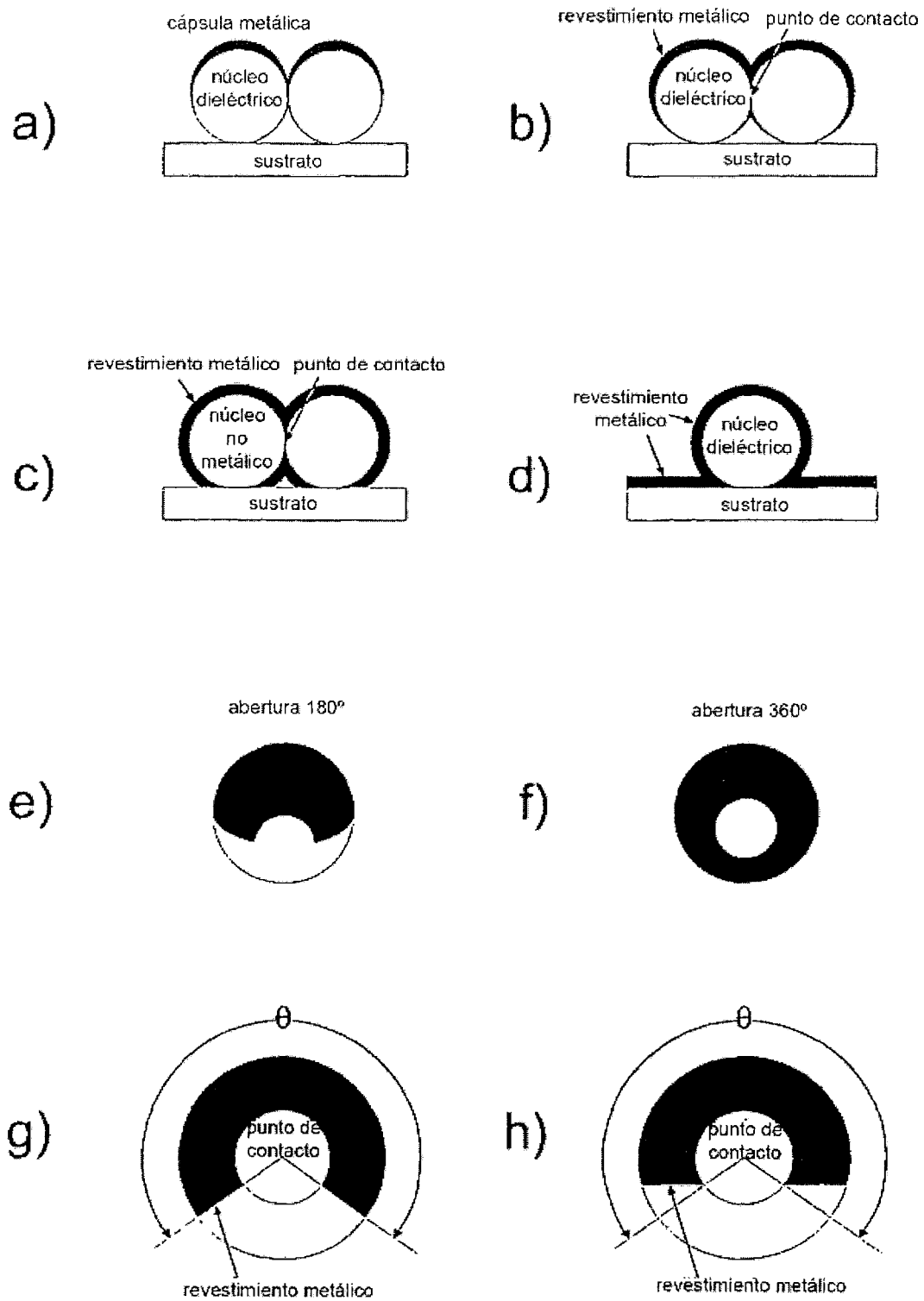
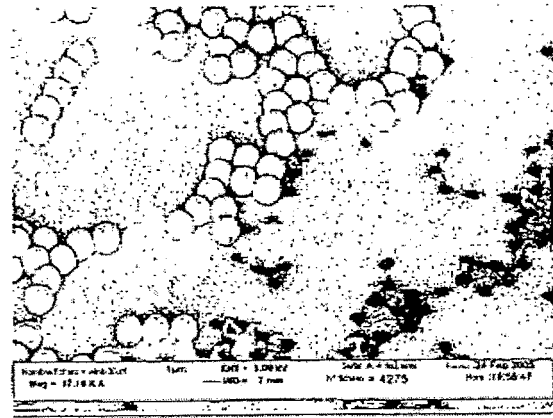
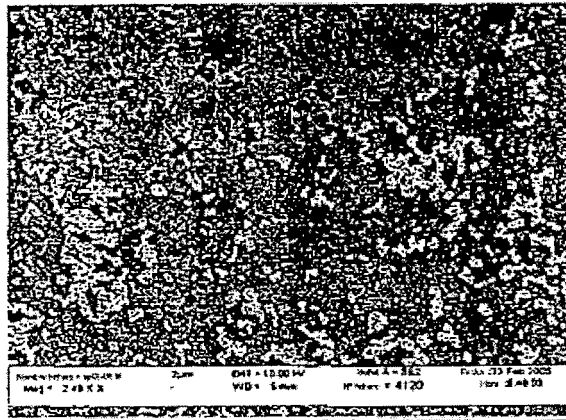
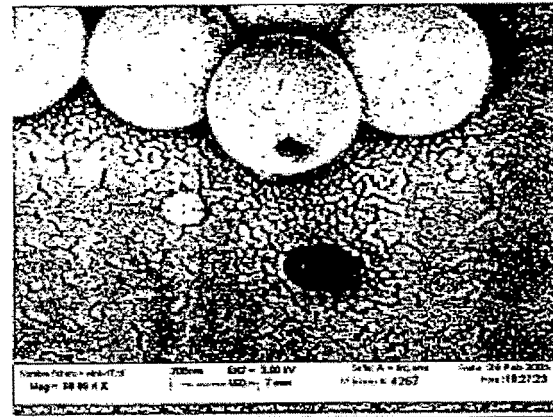
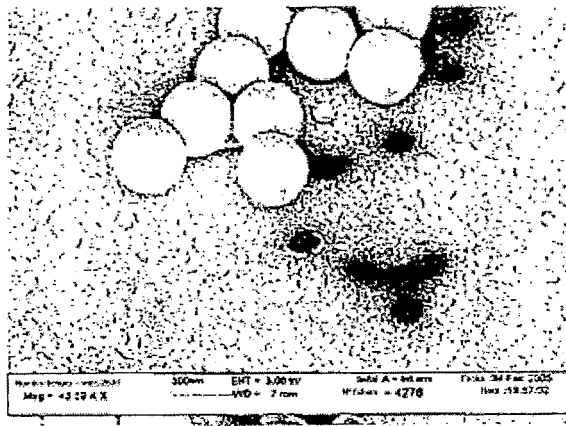


Figura 5



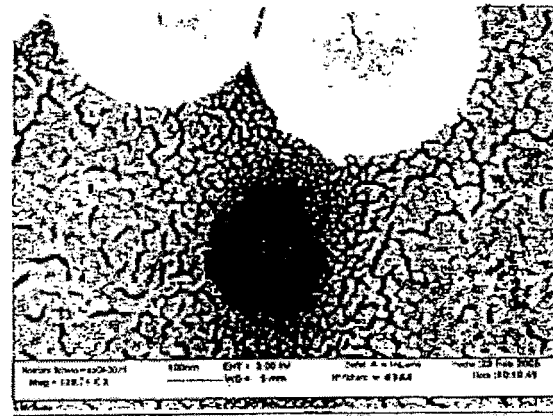
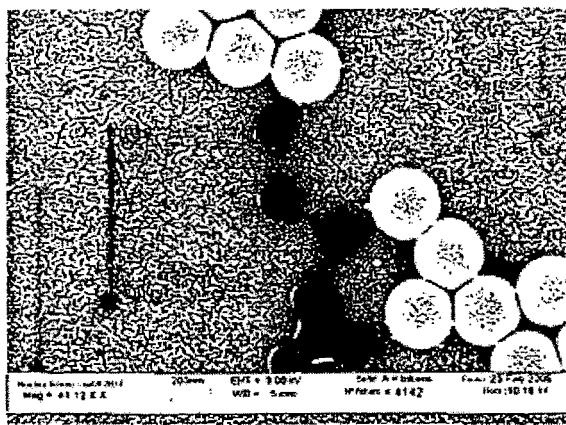
a)

b)



c)

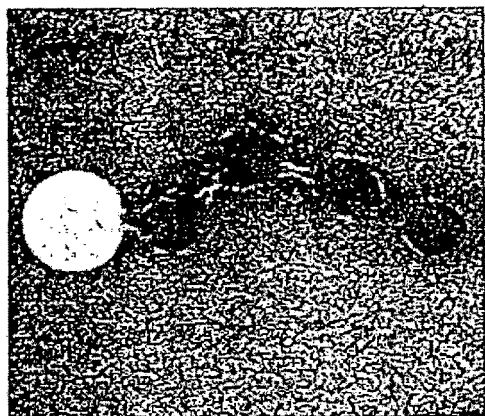
d)



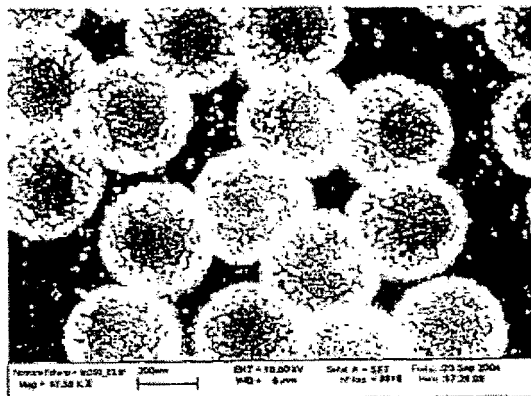
e)

f)

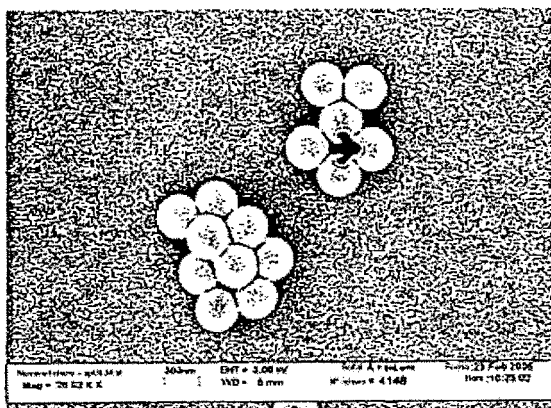
Figuras 6 a - f



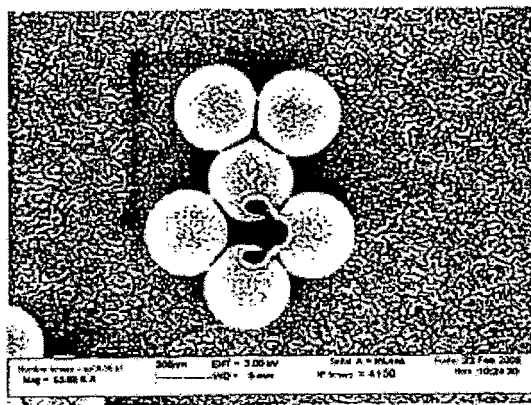
g)



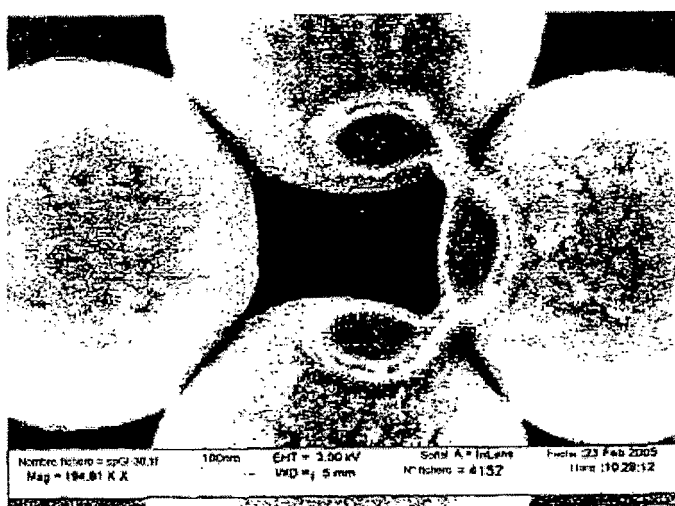
h)



i)



j)

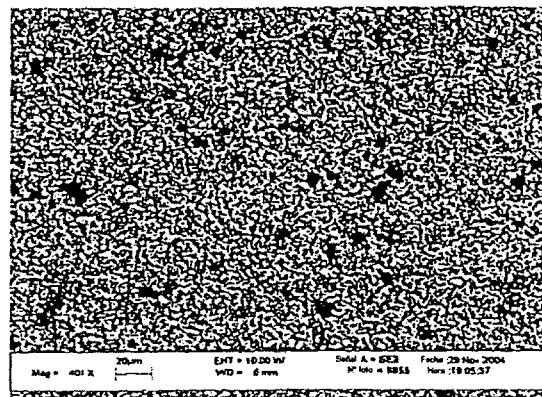


k)

Figuras 6 g - k



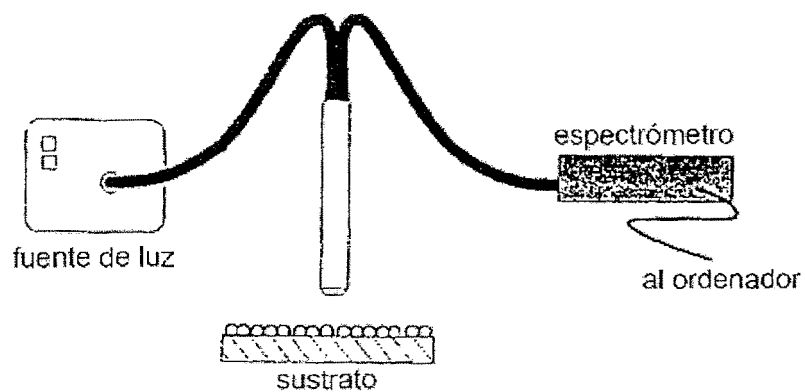
a)



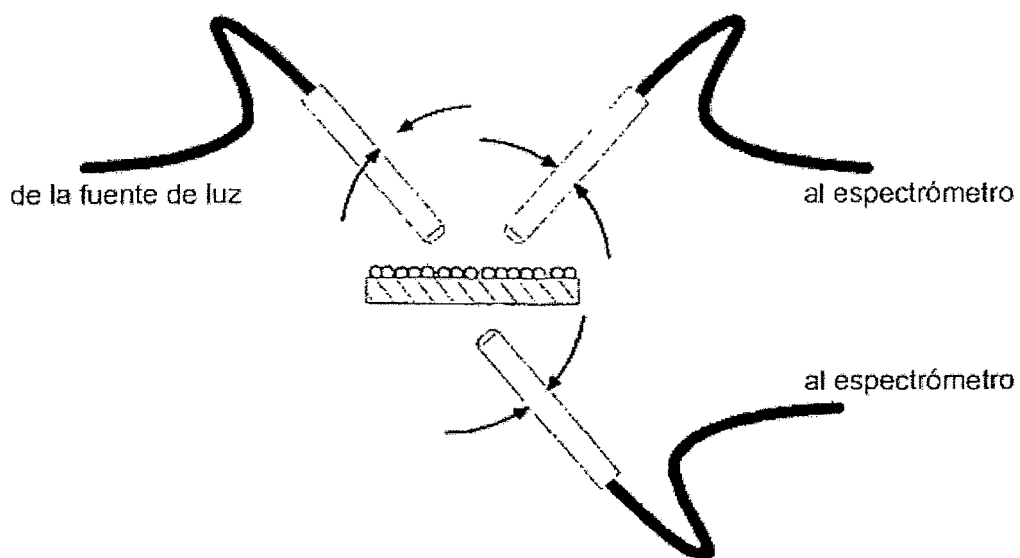
b)

Figura 7

a)



b)



c)

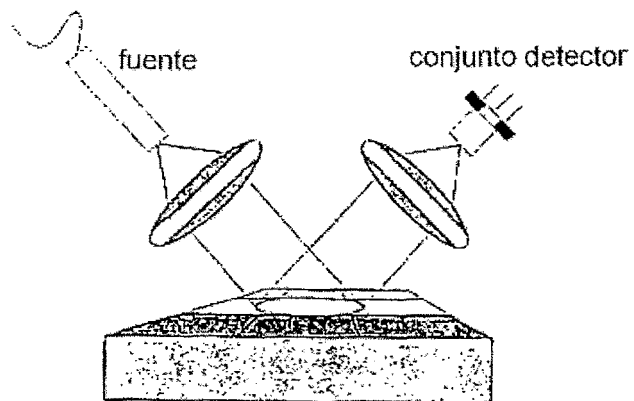


Figura 8

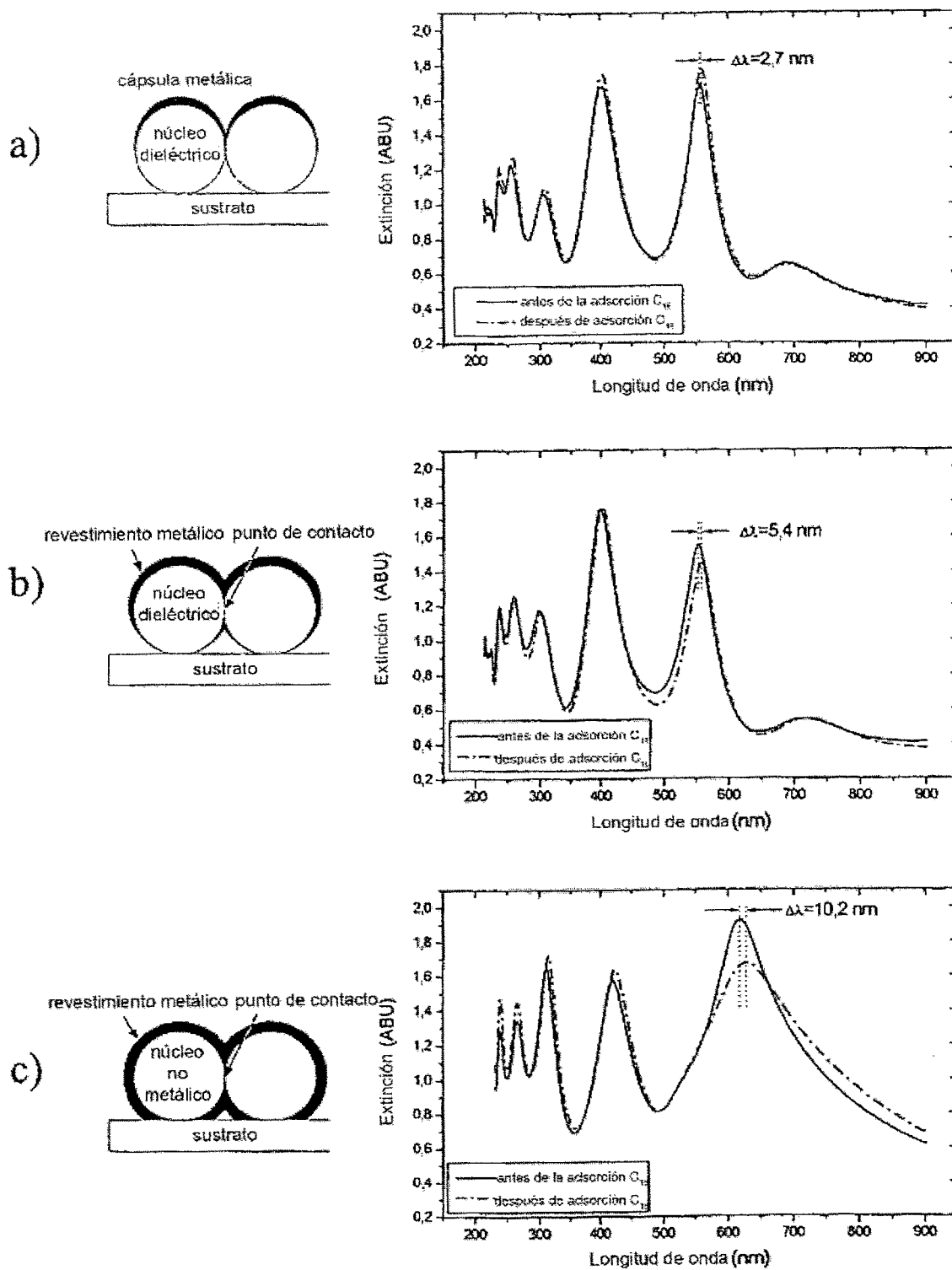


Figura 9