



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 298 858**

51 Int. Cl.:
B01L 3/00 (2006.01)
B01J 19/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **04805770 .7**
86 Fecha de presentación : **21.10.2004**
87 Número de publicación de la solicitud: **1677914**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **12.07.2006**

54 Título: **Procedimiento de distribución de gotas de un líquido de interés sobre una superficie.**

30 Prioridad: **31.10.2003 FR 03 50763**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.05.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.05.2008

73 Titular/es:
COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE
25, rue Leblanc - Immeuble "Le Ponant D"
75015 Paris, FR
BIOMERIEUX S.A.

72 Inventor/es: **Delattre, Cyril;**
Marchand, Gilles;
Pouteau, Patrick y
Ginot, Frédéric

74 Agente: **Justo Vázquez, Jorge Miguel de**

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

Procedimiento de distribución de gotas de un líquido de interés sobre una superficie.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un procedimiento de distribución localizada de gotas de un líquido de interés sobre una superficie activa, a la utilización de este procedimiento en un laboratorio en un chip o en un microsistema para química o biología. La presente invención se refiere también a procedimientos de detección eléctrica, electroquímica, química y óptica de al menos un compuesto que puede estar presente en una gota de un líquido de interés y a un procedimiento de electropolimerización de moléculas presentes en un líquido de interés.

La presente invención permite obtener una matriz de gotas localizadas, de alta densidad, en una superficie a partir de un líquido de interés. Esta invención permite asegurar fácilmente la transición de una cámara de fluidos, denominada caja y llena de un líquido de interés a una matriz de gotas o microvolúmenes, perfectamente localizados sobre una superficie situada en dicha cámara de fluidos, cuando el líquido de interés se extrae de dicha cámara de fluidos.

Por matriz de gotas, se entiende una disposición determinada de dichas gotas, sin que sea necesaria una forma geométrica particular de dicha disposición. La matriz de gotas puede ser redonda, cuadrada, poligonal o incluso aleatoria, siendo lo esencial que las gotas formadas se dispongan de forma localizada y determinada sobre la superficie de acuerdo con el objetivo conseguido por la presente invención. Por localizada, se entiende circunscrita, individualizada y distinta de las otras gotas capturadas voluntariamente sobre dicha superficie gracias al procedimiento de la invención.

Cada una de las gotas puede someterse a una o varias operaciones para analizar cualitativa y/o cuantitativamente uno o varios analitos presentes o que pueden estar presentes en el líquido de interés, por ejemplo una molécula, un oligonucleótido, una proteína, etc. El análisis de los analitos en la gota puede realizarse mediante cualquier técnica conocida por el especialista en la técnica para realizar los análisis, en particular en un volumen de líquido tan reducido como una gota. Puede tratarse de técnicas de análisis utilizadas en chips biológicos. El análisis puede hacer o no intervenir a la superficie del dispositivo de la invención recubierta por la gota, de acuerdo con la realización de la invención.

Cada una de las gotas forma un volumen en el que pueden realizarse las reacciones químicas o biológicas. Cualquier reacción química o biológica conocida por el especialista en la técnica puede realizarse en este volumen. Estas reacciones pueden o no hacer intervenir a la superficie del dispositivo de la invención recubierta por la gota, de acuerdo con la realización de la presente invención. Cuando estas reacciones hacen intervenir a la superficie del dispositivo de la invención recubierta por la gota, pueden hacerlo con una única gota o con varias gotas depositadas sucesivamente sobre esta superficie, estando estas gotas sucesivas constituidas por un único o por varios líquidos de interés diferentes de acuerdo con la realización de la presente invención. Un ejemplo de reacciones químicas que por ejemplo hacen intervenir dos líquidos de interés diferentes sobre un dispositivo de la invención es el siguiente: por medio de una gota de un primer líquido de interés, el depósito localizado de una película polimérica orgánica sobre la superficie cubierta por esta gota, y después por medio de una gota de un segundo líquido de interés, funcionalización de la película polimérica orgánica depositada sobre esta superficie.

De acuerdo con la presente invención, pueden realizarse análisis y reacción(es) química(s)/biológica(s) de forma exclusiva sobre un dispositivo de acuerdo con la presente invención (análisis o reacción), o de forma complementaria. En este último caso, esto puede ser simultáneo (reacción y análisis) o sucesivo (reacción y después análisis o análisis y después reacción). Además, pueden sucederse varios análisis y/o varias reacciones. Por ejemplo, el dispositivo de la presente invención puede intervenir ventajosamente, por un lado en la fabricación de una tarjeta o un laboratorio en un chip (por ejemplo mediante reacciones químicas que permiten depositar un polímero y después funcionarizarlo) ("lab-on-chip"), en la que todas las etapas necesarias para los análisis cualitativos y cuantitativos de un líquido de interés están integradas: manipulación de fluido, reacciones químicas y/o biológicas, chip de detección óptica, eléctrica y/o química, etc.; y por otro lado en la utilización de esta tarjeta o laboratorio en un chip, para efectuar análisis cualitativos y/o cuantitativos en gotas de un líquido de interés a analizar (reacción(es) química(s)/bioquímica(s) y análisis).

En la presente descripción, las referencias entre corchetes [] se refieren a la lista de referencias adjunta.

Técnica anterior

De acuerdo con las aplicaciones previstas, esta invención se basa en el campo general de la formación de gotas, del trabajo con microvolumen o microvolúmenes, y de las matrices con alta densidad de gotas.

La formación de zonas localizadas para aislar una fase líquida se describe en el campo de los chips biológicos y particularmente de los chips de ADN. Para estas aplicaciones, el volumen de reacción a menudo es muy reducido para economizar los productos biológicos y los reactivos.

Para la formación de gotas localizadas y de matrices con alta densidad de gotas, las compañías Protogene Laboratories Inc. [1] y Affymetrix Inc. [2] utilizan una técnica que utiliza un sistema de dispensado automático. Estos sistemas conducen a la formación de gotas y matrices con alta densidad de puntos o gotas en una superficie.

Sin embargo, además del sistema de dispensado de gotas, estas técnicas requieren la utilización de un dispositivo de desplazamiento y de alineamiento exacto de este sistema, así como de un dispositivo para el suministro de líquido. El coste de este equipo es elevado. Además, la densidad máxima de las matrices de gotas que pueden formarse está limitada por una combinación entre el tamaño de las gotas dispensadas y el paso mínimo entre puntos del sistema de dispensado.

Para la formación de matrices con alta densidad de micro-cubetas, pueden mencionarse dos familias de procedimientos significativos: la familia de los procedimientos que utilizan la formación de una red de cubetas microfabricadas mediante grabado en una placa de silicio para realizar amplificaciones de ADN mediante PCR en microvolúmenes de varios picolitros y la familia de los procedimientos que utilizan la formación de pocillos o de canales mediante fotolitografía sobre resinas fotosensibles depositadas sobre un sustrato de plástico [3]. Con estas técnicas, la cantidad de pocillos varía entre 100 y 9.600 pocillos, con diámetros de 60 a 500 μm y profundidades de 5 a 300 μm .

Sin embargo, los bordes de estas cubetas, no permiten la separación física entre la fase líquida dentro de la cubeta y la del exterior de ésta, permitiendo por lo tanto conexiones entre las cubetas y por lo tanto contaminaciones entre ellas. Además, estos dispositivos requieren para su utilización sistemas de dispensado de gotas, un dispositivo de desplazamiento y de alineamiento preciso de este sistema, así como un dispositivo para el suministro de líquido. Por lo tanto, se encuentran los mismos inconvenientes y problemas mencionados anteriormente.

Para la detección eléctrica o electroquímica en ensayos biológicos, un gran número de sistemas de detección eléctrica o electroquímica descritos en la bibliografía no permiten descender a niveles nanomolares en términos de límite de detección, limitación debida generalmente a la reducida cantidad de electrones generada por cada híbrido.

Las técnicas que hacen intervenir una acumulación enzimática permiten rebajar este límite de detección hasta las proximidades del picomol debido a la amplificación elevada de la cantidad de especies redox a detectar presentes en el medio de reacción [4]. Sin embargo, este método de amplificación genera un problema para los sistemas multipuntos conocidos actualmente ya que el compuesto redox se difunde y puede contaminar de este modo los puntos cercanos.

Con este fin, la mayor parte de las veces se recomienda en la bibliografía la utilización de estructuras tridimensionales (utilización de compartimentos). Por ejemplo, Infineon [6] propone muros de polímeros y un sistema de migración de las moléculas mediante fuerzas eléctricas, de forma que se confinen en un volumen definido y se evite de este modo la contaminación entre puntos. Desafortunadamente, pueden aparecer problemas de rellenado con fluidos con este tipo de enfoque cuando se desea por ejemplo, trabajar con vetas líquidas muy finas. En este caso también es indispensable un dispensador de gotas.

Existe por lo tanto una necesidad real de un procedimiento que permita obtener fácilmente una matriz de gotas de alta densidad, a partir de un líquido de interés, utilizable sin ningún equipo de dispensado de gotas, fácil de utilizar, que permita evitar eficazmente las contaminaciones entre gotas y que pueda utilizarse de forma muy flexible con todos los procedimientos conocidos actualmente por el especialista en la técnica para analizar de forma colectiva o individual micro-volúmenes, por ejemplo en un laboratorio en un chip, que se trate de un procedimiento químico, eléctrico u óptico o de una combinación de estos procedimientos.

Exposición de la invención

La presente invención responde exactamente a esta necesidad e incluso a otras, que se describen a continuación, proporcionando un procedimiento de distribución localizada de gotas de un líquido de interés o una superficie activa de un sustrato, comprendiendo dicho procedimiento las siguientes etapas:

- una introducción del líquido de interés en una caja mediante medios de introducción, conteniendo dicha caja dicha superficie activa, y

- una extracción del líquido de interés de dicha caja mediante medios de extracción;

siendo dicha superficie activa, así como las demás superficies en el interior de la caja, prácticamente no tensioactivas frente al líquido de interés con excepción de varias zonas de captura localizadas, formadas de manera determinada sobre dicha superficie activa, que son cada una apropiadas para capturar una gota del líquido de interés, estando dichos medios de introducción y de extracción del líquido de interés en la caja dispuestos de tal manera que cuando el líquido de interés se introduce en la caja, cubre dichas zonas de captura, y cuando el líquido de interés se extrae de la caja, una gota de dicho líquido de interés queda capturada de forma distribuida y localizada sobre cada zona de captura.

En el contexto de la presente invención, un líquido se denomina “de interés” cuando este líquido se destina a ser capturado por las zonas de captura en un procedimiento de acuerdo con la presente invención, para formar una matriz de gotas de este líquido.

Por “líquido de interés” se entiende cualquier líquido que puede necesitar una disposición en matriz de gotas sobre un soporte, por ejemplo con un fin analítico y/o químico y/o bioquímico. Por “fin químico y/o bioquímico” se entiende cualquier reacción química y/o bioquímica que puede realizarse en un líquido. Por “fin analítico” se entiende cualquier análisis cualitativo y/o cuantitativo que pueda realizarse en un líquido.

El líquido de interés puede ser orgánico o acuoso. Puede tratarse de cualquiera de los líquidos manipulados actualmente en laboratorios o en la industria, por ejemplo en laboratorios en un chip. Puede tratarse por ejemplo de un líquido seleccionado entre una solución, un disolvente, un reactivo, una muestra, un extracto celular, un muestreo procedente de un organismo animal o vegetal, un muestreo realizado en la naturaleza o en la industria, etc. Puede tratarse de un líquido biológico o químico, por ejemplo de una solución en la que deba realizarse y/o detectarse un reconocimiento biológico (por ejemplo proteína/proteína; hibridación de ácido nucleicos; antígeno/anticuerpo, etc.). Este líquido de interés puede ser un líquido diluido, si fuera necesario, para su utilización con el dispositivo de la presente invención, como puede hacerse en los laboratorios en un chip. Un producto sólido puede disolverse para constituir un líquido de interés de la presente invención. Este producto sólido puede seleccionarse por ejemplo entre un producto químico o bioquímico, un reactivo, un material a analizar, un muestreo procedente de un organismo animal o vegetal, un muestreo realizado en la naturaleza o en la industria, etc. El especialista en la técnica conoce la manipulación de estos productos y líquidos de interés.

De forma general, el procedimiento de la invención puede utilizarse en un laboratorio en chip, en un microsistema químico o biológico, tal como otro sistema de análisis o en un chip biológico (biochip), por ejemplo seleccionado entre el grupo constituido por chip de ADN (ácido desoxirribonucleico), de ARN (ácido ribonucleico), chips de proteínas, chips de anticuerpos, chips de antígenos, chips de células, etc.

El procedimiento de la invención utiliza una caja. Esta caja puede ser abierta o cerrada. Esta caja puede utilizarse solamente para obtener una distribución localizada de gotas de líquido de interés sobre la superficie activa de acuerdo con el procedimiento de la invención. Esta caja puede utilizarse también para encerrar a las gotas distribuidas localmente sobre la superficie activa y/o realizar reacciones químicas o bioquímicas y/o análisis cualitativos y/o cuantitativos sobre o en estas gotas. La caja puede constituir por lo tanto un auténtico laboratorio en miniatura (laboratorio en un chip).

Las dimensiones de esta caja dependen particularmente de las dimensiones del sustrato que comprende la superficie activa seleccionada para la realización del procedimiento de la invención, pero también llegado el caso, de la presencia de dispositivos de análisis y de microsistemas adicionales que pueden unirse a dicha caja, por ejemplo otros laboratorios en un chip, para la realización del procedimiento de la invención. Estas dimensiones pueden disminuir hasta menos de un cm para el lado más grande de la caja.

La caja puede estar constituida por ejemplo por un material seleccionado entre el grupo constituido por un polímero orgánico, un material plástico elastómero, vidrio, metal, silicio, una resina fotosensible o por cualquier material conocido por el especialista en la técnica y que permita la realización de la presente invención. Por ejemplo puede tratarse de un polímero seleccionado entre el grupo que comprende policarbonatos, polidimetilsiloxanos, polimetilmetacrilatos, policlorobifenilos y copolímeros de cicloolefinas.

El material de la caja se selecciona generalmente en función del tipo de líquido de interés a distribuir en gotas, de la utilización de la caja (simplemente inmersión o inmersión y análisis) y en función de las especificaciones de coste del fabricante.

Las cajas utilizables son preferiblemente lo suficientemente herméticas para evitar por ejemplo fugas durante la inmersión de estas en la superficie activa, contaminaciones que pueden proceder del exterior de la caja, por ejemplo bacteriana, química, etc., y la evaporación de la o las gotas capturadas por la o las zonas de captura después de la extracción del líquido de interés de la caja.

Las cajas utilizables pueden comprender una tapadera para su montaje, pero también, en ciertas aplicaciones, para su apertura o su cierre, particularmente para poder retirar de ellas el sustrato con superficie activa después de haberlo puesto en contacto con el líquido de interés y/o después de los análisis o reacciones en las gotas. La caja puede comprender también medios de fijación amovibles del sustrato. Si la caja comprende una tapa, será preferiblemente lo suficientemente estanca como para que no perturbe la inmersión de la superficie activa.

La tapa puede estar constituida por un material tal como los mencionados anteriormente para la caja. Puede estar fabricada por ejemplo por moldeado, mediante embutido, mediante grabación o mediante erosión mecánica etc. A continuación puede fijarse de forma definitiva sobre la caja para cerrarla, por ejemplo mediante unión con un adhesivo, compresión, unión de placas o mediante cualquier otro medio conocido por el especialista en la técnica que asegure la fijación y la estanqueidad requerida para la utilización de esta última. También puede fijarse sobre la caja de forma amovible, siempre que asegure la fijación y la estanqueidad requeridas para la utilización de esta última, para que la propia caja constituida de este modo pueda servir para la inmersión sucesiva de diferentes sustratos con diferentes superficies activas, para formar varias matrices de gotas.

Preferiblemente, el material de la caja y, llegado el caso, de su tapa, es en el interior de esta última prácticamente no tensioactivo frente al líquido de interés. En efecto, esto permite evitar que las gotas se adhieran a las superficies internas de la caja, después de la extracción del líquido de interés y caigan sobre la superficie activa y generen los análisis y reacciones sobre las gotas distribuidas localmente sobre la superficie activa. Pueden ser necesarios tratamientos de superficie para obtener este resultado, por ejemplo tales como los que se describen a continuación para la superficie activa.

Las cajas cerradas utilizables comprenden medios de introducción y de extracción del líquido de interés de dicha caja. No existe limitación en cuanto a la posición, forma y función de estos medios aparte de estas: estos medios deben permitir la introducción y después la extracción del líquido de interés en la caja; y deben disponerse de tal manera que cuando el líquido de interés se introduce en la caja, cubra la o las zonas de captura y cuando el líquido de interés se extrae de la caja, una gota del líquido de interés quede capturada en la zona de captura. Estos medios pueden comprender aberturas formadas en la caja. Estas aberturas pueden estar dispuestas por encima de o a los lados de la tapa o de la caja o también a través del sustrato. El líquido de interés puede entrar y después salir de la caja por dos aberturas diferentes, una abertura para la introducción del líquido de interés en la caja y una abertura para la extracción del líquido de interés de la caja. El líquido de interés también puede entrar y después salir la caja por una única de las dos aberturas, sirviendo una segunda abertura para permitir la extracción del líquido de interés, o para dejar pasar aire introducido por la extracción, o para inyectar mediante esta segunda abertura, un fluido gaseoso que permita expulsar el líquido de interés fuera de la caja. Estas aberturas pueden disponerse en la tapa o en las paredes de la caja, por ejemplo mediante grabación, embutido, moldeado, exposición a la luz para una resina fotosensible, perforación mecánica, etc.

Los medios para introducir el líquido de interés en la caja pueden comprender además cualquier medio adecuado conocido por el especialista en la técnica para inyectar un líquido en una caja, particularmente los utilizados en el campo de los laboratorios en un chip y de los microsistemas. Puede tratarse, por ejemplo, de una jeringa, una pipeta, una micro-pipeta o una bomba de inyección, etc.

Los medios de extracción del líquido de interés de la caja pueden ser cualquier medio adecuado conocido por el especialista en la técnica para extraer un líquido de una caja. Lo esencial es que la o las gotas capturadas por la zona de captura no sean arrastradas durante la extracción del líquido de interés. Por ejemplo, los medios de extracción pueden comprender una bomba de aspiración del líquido de interés fuera de la caja: la etapa de extracción consiste entonces en aspirar el líquido de interés de dicha caja. También, por ejemplo, los medios de extracción pueden comprender una bomba de inyección de un fluido gaseoso en la caja: la etapa de extracción consiste entonces en inyectar el fluido gaseoso en la caja de forma que expulse el líquido de interés de dicha caja. Ventajosamente, el fluido gaseoso inyectado puede estar saturado en vapor del líquido de interés mediante cualquier técnica conocida por el especialista en la técnica. Además, generalmente, la aberturas o conexiones de la caja con el exterior pueden unirse ventajosamente a reservas de gas saturado en vapor de la fase líquida de interés, lo que tiene como ventaja evitar que se evaporen las gotas una vez formadas, en particular cuando las dimensiones de la caja y del sustrato utilizados sean muy pequeñas. El gas o fluido gaseoso puede ser aire o un gas neutro si fuera necesario.

El sustrato puede estar constituido por cualquier material apropiado para realizar la presente invención. Puede tratarse por ejemplo de uno de los materiales de base utilizados para fabricar los laboratorios en un chip, chips biológicos, microsistemas etc. Puede tratarse por ejemplo de un material seleccionado entre el grupo constituido por silicio, óxido de silicio, nitruro de silicio, vidrio, un polímero orgánico, y un metal o una aleación de metal. Los polímeros orgánicos pueden seleccionarse por ejemplo entre el grupo que comprende policarbonatos, polidimetilsiloxanos, polimetilmelacrilatos, policlorobifenilos y copolímeros de cicloolefinas. El metal puede seleccionarse por ejemplo entre el grupo constituido por Au, Ti, Pt, Al, Ni y la aleación de metal puede ser acero inoxidable.

El sustrato puede constituir una de las paredes de la caja. Las paredes que constituyen la caja pueden montarse después a partir del sustrato, por ejemplo, mediante unión con adhesivo o compresión, siempre que la superficie activa esté dentro de la caja.

La superficie activa puede estar constituida por cualquier material prácticamente no tensioactivo frente al líquido de interés y apropiado para realizar la presente invención. En efecto, el funcionamiento del procedimiento de la presente invención se basa en parte en el hecho de que la superficie activa no retiene o retiene muy poco el líquido de interés, lo que permite un des-humedecimiento total, fácil, sin retención de líquido en el interior de la superficie, y esto sin secado. De este modo, las gotas de líquido de interés se capturan de forma selectiva y exclusiva por la o las zonas de captura y se están limitadas a estas zonas, lo que evita cualquier problema de contaminación entre las gotas capturadas.

El material de la superficie activa se selecciona por lo tanto particularmente en función del líquido de interés a partir del que debe formarse una matriz de gotas, pero también en función del sustrato, de las zonas de captura y llegado el caso, en función de zonas de trabajo dispuestas con estas zonas de captura (las zonas de trabajo se definen a continuación). Puede disponerse sobre el sustrato mediante modificación química o mediante depósito. Puede tratarse también del propio sustrato, si éste está constituido por un material prácticamente no tensioactivo frente al líquido de interés.

Por ejemplo, cuando el líquido de interés es acuoso, el material que forma la superficie activa es ventajosamente hidrófobo. Por ejemplo, en los ejemplos de materiales mencionados anteriormente que constituyen el sustrato, la superficie del sustrato puede hacerse no tensioactiva, aquí hidrófoba, mediante modificación química, por ejemplo mediante silanización con un silano que tiene funciones hidrófobas, por ejemplo 1H, 1H, 2H, 2H-perfluorodecil-triclorosilano. Puede tratarse por ejemplo también de un depósito de teflón líquido sobre una placa giratoria; de una silanización en fase gaseosa de silano hidrófobo; de la utilización de silano hidrocarbonado, por ejemplo de tipo octadeciltriclorosilano. Los materiales y procedimientos utilizables para la realización de dichas modificaciones químicas los conoce el especialista en la técnica. A continuación se proporciona un ejemplo de realización.

El tratamiento que permite hacer a la superficie del sustrato no tensioactiva frente al líquido de interés puede realizarse, antes o después de la formación de la o las zonas de captura y/o de la o las zonas de trabajo correspondientes. Estas últimas estarán protegidas opcionalmente en el caso en el que el tratamiento se realice a partir de éstas.

La forma y el tamaño de esta superficie activa y por lo tanto también del sustrato sobre el que se forma, no tiene importancia para el funcionamiento del procedimiento de la invención. Estas se determinan generalmente en función del número de zonas de gotas del líquido de interés a formar sobre esta superficie y de las especificaciones de coste. Sin embargo, para evitar retenciones no previstas de líquido de interés sobre la superficie, ésta preferiblemente se selecciona de forma plana. Por ejemplo, la superficie activa puede tener una forma y un tamaño comparables a las placas utilizadas para la fabricación de laboratorios en un chip y a microsistemas de análisis y de detección conocidos por el especialista en la técnica.

La superficie del sustrato utilizada en el procedimiento de la invención (superficie activa) se modifica (estructuración) para crear zonas localizadas tensioactivas frente al líquido de interés, es decir de gran afinidad por el líquido de interés, o a nivel de las cuales el líquido puede estar retenido por fuerzas capilares. Estas zonas se denominan “zonas de captura”. El término “localizado” se ha definido anteriormente. Al hacer pasar un poco de líquido de interés sobre la superficie activa, las zonas de captura capturan o retienen una gota del líquido de interés, mientras que la superficie activa, prácticamente no tensioactiva frente al líquido de interés, no retiene o retiene muy poco del líquido de interés. Al dejar de pasar el líquido, únicamente las gotas de interés retenidas localmente por la zona de captura quedan sobre la superficie activa.

Pueden disponerse múltiples soluciones para formar estas zonas de captura sobre la superficie activa del sustrato: tratamiento químico superficial para aumentar de forma local la afinidad por el líquido, por ejemplo, mediante injerto de moléculas con grupos específicos, electro-humedecimiento localizado gracias a microelectrodos, microcubetas formadas por coronas de relieve en la superficie, microcubetas grabadas en profundidad, etc. En efecto, la al menos una zona de captura puede ser una zona de captura química, eléctrica o física de una gota de líquido de interés. Puede tratarse de cualquier tipo de zona, localizada, que permita capturar una gota de líquido de interés mediante simple contacto de esta zona con el líquido de interés.

Como ejemplo, puede tratarse de una zona de captura por humedecimiento. En efecto, la zona de captura puede estar constituida por un material de soporte que se dispone de forma determinada sobre dicha superficie activa o sobre el sustrato y que, si fuera necesario, puede modificarse químicamente para hacerlo tensioactivo frente al líquido de interés, por ejemplo mediante injertos sobre este último de una función química tensioactiva frente a dicho líquido de interés.

Por ejemplo, este material de soporte puede estar constituido por un material seleccionado entre el grupo constituido por silicio, óxido de silicio (SiO_2); vidrio; nitrato de silicio (Si_3N_4); polímeros, por ejemplo, polímeros orgánicos tales como los seleccionados entre el grupo que comprende policarbonatos, polidimetilsiloxanos, polimetilmetacrilatos, policlorobifenilos y copolímeros de cicloolefinas; y por un metal o por un metal o por una aleación metálica, por ejemplo seleccionada entre Al, Au, o acero inoxidable.

Por ejemplo, la función química tensioactiva frente al líquido de interés acuoso puede seleccionarse entre el grupo constituido por una función alcohol, alcoholato, ácido carboxílico, carboxilato, ácido sulfónico, sulfonato, oxiamina, hidracina, amina y amonio.

Por ejemplo, el procedimiento descrito en el documento [9] o [10] puede utilizarse para fabricar este tipo de zona de captura.

También como ejemplo, en particular cuando el procedimiento de la invención es para distribuir gotas del líquido de interés acuoso, y cuando la superficie activa o el sustrato es a base de silicio, la zona de captura puede estar constituida por silicio negro hidrófilo, que puede formarse muy fácilmente sobre dicha superficie mediante grabado. La zona grabada se vuelve particularmente tensioactiva frente a un líquido de interés acuoso. La zona grabada no necesita ninguna modificación química más para ser tensioactiva frente a las soluciones acuosas. Este ejemplo de realización es por lo tanto muy económico. Por ejemplo el documento [11] presenta un protocolo de laboratorio que puede utilizarse para fabricar este tipo de zonas de captura.

También como ejemplo, la zona de captura puede ser un electrodo de captura mediante humedecimiento. Según este ejemplo, la zona de captura, en este caso un electrodo, puede estar constituida por ejemplo por un material seleccionado entre el grupo constituido por metales nobles, por ejemplo Au, Pt, Pd, Ti, Al, etc., o una aleación de metales nobles; de carbono; de grafito; y de óxido de indio y de estaño (ITO); haciéndose dicho material tensioactivo mediante electrodeposición sobre éste de un polímero conductor de la electricidad sobre el que se fija una función química tensioactiva frente al líquido de interés. El polímero conductor de la electricidad puede ser uno de los polímeros utilizados en la fabricación de los laboratorios en un chip. Puede seleccionarse por ejemplo, entre el grupo constituido por polipirrol, polianilina, poliazuleno, politiofeno, poliindol, polifurano y polifluoreno. La función química tensioactiva puede ser por ejemplo una de las funciones químicas tensioactivas citadas anteriormente. Su fijación sobre el monómero antes de la polimerización o sobre el polímero una vez que éste se ha formado, puede realizarse mediante técnicas convencionales químicas. Un ejemplo de procedimiento de fabricación de este tipo de zona de captura utilizable para realizar el procedimiento de la presente invención puede encontrarse en el documento [4].

También como ejemplo, la zona de captura puede ser una zona de captura de una gota de líquido de interés mediante fuerzas capilares. Puede tratarse por ejemplo de un grabado de o de un saliente sobre la superficie activa que permite capturar la gota mediante fuerzas capilares. Estos grabados o salientes pueden realizarse por ejemplo mediante grabado directo del sustrato; mediante depósito de un material sobre la superficie de un sustrato plano, por ejemplo mediante revestimiento, evaporación, pulverización o depósito electroquímico y después grabado junto con un procedimiento convencional de fotolitografía, por ejemplo mediante revestimiento de resina, aislamiento y definición de motivos o grabado; mediante definición directa de motivos por fotolitografía en polímeros fotosensibles, por ejemplo en el caso de resinas fotosensibles; moldeado o embutido de materiales plásticos. Estos procedimientos los conoce el especialista en la técnica. Lo esencial es que estos grabados o salientes que forman estas zonas de captura permitan capturar, de forma localizada, por capilaridad, una gota del líquido de interés.

Como ejemplo adicional, las zonas de captura pueden estar en cubetas sobre el sustrato, o en salientes, construidas de forma que formen rebordes sobre dicha superficie activa. Preferiblemente los rebordes no se tocan entre sí, no tienen borde común, y forman cada uno una cubeta sobre la superficie del sustrato destinada a capturar una gota del líquido de interés. La figura 11 adjunta es una representación esquemática en corte de dos tipos de cubetas utilizables en el procedimiento de la invención: a la izquierda de las cubetas (c_s) “enfundadas” en un sustrato (S_a) y a la derecha cubetas (c) formadas gracias a su reborde (b) sobre un sustrato (S). A la derecha, queda disponible un espacio libre entre las cubetas (c) para el vertido del líquido de interés. La fabricación de los rebordes o cubetas puede realizarse por ejemplo mediante grabado directo del sustrato; depósito de una material en la superficie de un sustrato plano, por ejemplo mediante revestimiento, evaporación, pulverización o depósito electroquímico y después grabado junto con un procedimiento convencional de fotolitografía, por ejemplo mediante revestimiento de resina, exposición al sol y definición de motivos o grabado; definición directa de motivos mediante fotolitografía en polímeros fotosensibles, por ejemplo en el caso de resinas fotosensibles; moldeado o embutido, por ejemplo de materiales plásticos o del sustrato que forma la superficie activa. Estos procedimientos los conoce el especialista en la técnica. Las zonas pueden formarse particularmente durante la última etapa de un apilamiento tecnológico de varias capas sobre el sustrato. Las capas inferiores podrán contener accionadores o detectores mecánicos, ópticos o electrónicos, por ejemplo de tipo MEMS o MEMS óptico (“Micro Electro Mechanical Systems”) o también moléculas injertadas de interés químico o biológico para formar una zona de trabajo.

Cuando el líquido de interés es acuoso, la zona de captura es preferiblemente una zona hidrófila y la superficie activa prácticamente no tensioactiva es preferiblemente hidrófoba. De este modo, la zona de captura puede capturar la gota del líquido de interés mediante interacciones de tipo hidrófilo/hidrófobo con el líquido de interés. De forma general, la zona de captura captura localmente la gota de líquido de interés debido a una tensioactividad (química o capilar) de la zona de captura por el líquido de interés más importante que la de la superficie activa.

De acuerdo con la invención, las zonas de captura localizadas, distribuidas de forma determinada sobre dicha superficie activa, pueden formar una matriz. Por matriz de gotas, se entiende una disposición determinada de dichas gotas, sin que se requiera una forma geométrica particular de dicha disposición. La matriz de gotas puede ser redonda, cuadrada, poligonal o incluso aleatoria, siendo lo esencial que las gotas formadas se dispongan de forma localizada y determinada sobre la superficie de acuerdo con el objetivo conseguido por la presente invención. Por localizada, se entiende circunscrita, individualizada y distinta de las otras gotas capturadas voluntariamente sobre la superficie activa gracias al procedimiento de la invención.

De acuerdo con la invención, la zona de captura puede tener cualquier forma, siempre que capture una gota del líquido de interés. Esta zona puede seleccionarse, como ejemplo, entre una forma anular, de estrella, de rectángulo, de cuadrado, de triángulo, de elipse, o poligonal que tenga de cuatro a veinte lados, o cualquier otra forma adecuada para la realización de la presente invención. En general, tiene forma de banda.

Además, cada zona de captura puede disponerse con al menos una zona de trabajo (definida a continuación) formada sobre dicha superficie activa de tal manera que esta zona de trabajo esté en contacto con la gota de líquido de interés cuando ésta es capturada por dicha zona de captura. Preferiblemente, al menos una zona de captura tiene una forma anular, abierta o cerrada, que rodea la al menos una, zona de trabajo dispuesta con ella. Por otro lado, una zona de captura de una gota de líquido de interés puede rodear a varias zonas de trabajo, por ejemplo de 2 a 4 o más, siempre que cuando una gota del líquido de interés es capturada por la zona de captura, esta gota recubra, al menos parcialmente, todas las zonas de trabajo que están rodeadas por esta zona de captura.

Por zona de trabajo, se entiende una zona a nivel de la cual pueden realizarse operaciones físicas y/o químicas y/o ópticas en la gota capturada por la zona de captura con la que se dispone. De este modo, de acuerdo con la invención la al menos una zona de trabajo puede ser una zona de interacción seleccionada entre una zona de interacción eléctrica, química, mecánica u óptica con dicha gota de líquido de interés capturada o una zona a nivel de la cual se utilizan varias de estas interacciones simultánea o sucesivamente.

Como ejemplo, la zona de trabajo puede ser una zona de interacción química con la gota de líquido de interés capturada, con o sin microcélula electroquímica. La zona de trabajo puede comprender por ejemplo funciones o reactivos químicos o biológicos preparados para reaccionar con una diana de estas funciones o de estos reactivos, presente en el líquido de interés. Esta zona de trabajo puede seleccionarse entre las conocidas por el especialista en la técnica en el campo de los chips biológicos (chips comercializados por AGILENT, CIPHERGEN, EUROGENTEC). La diferencia del dispositivo de la presente invención con estos chips de la técnica anterior reside sobre todo en la presencia de la

zona de captura de una gota de líquido de interés dispuesta con dicha zona de trabajo. Esta zona de trabajo puede estar fabricada por ejemplo mediante silanización y después inmovilización de la sonda biológica como se ha descrito por ejemplo en el documento [12].

5 Esta zona de trabajo puede ser por ejemplo una zona funcionalizada mediante una molécula química (“sonda”) destinada a interactuar con una diana que puede estar presente en un líquido de interés. La molécula química (“sonda”) puede seleccionarse por ejemplo entre el grupo constituido por moléculas portadoras de función silanol, complejos organometálicos (por ejemplo de rodio unido a fosfinas quirales tales como BINAP (marca comercial), DUPHOS (marca comercial) que intervienen en reacciones de hidrogenación, o bien complejos de rutenio que intervienen por ejemplo en la síntesis de cetonas insaturadas) y los catalizadores a base de metales (por ejemplo paladio sobre sílice, cloruro de aluminio). La “diana” correspondiente a cada una de estas funciones químicas (“sondas”) puede seleccionarse por ejemplo entre el grupo constituido por silanos (por ejemplo tri-, di-, mono-etoxisilano o tri-, di-, mono-clorosilano), compuestos alquénicos (por ejemplo deshidroaminoácidos), derivados de alcoholes arílicos (por ejemplo 3-buten-2-ol), compuestos aromáticos clorados (por ejemplo mono-, di-, tri-clorofenol), mezclas de compuestos aromáticos y de reactivos halógenos (por ejemplo de benceno y bromo o benceno y cloruro de acetilo).

La zona de trabajo puede comprender por ejemplo un polímero funcionalizado mediante una sonda biológica tales como los mencionados anteriormente, con el fin de fijar una diana correspondiente que puede estar presente en un líquido de interés para detectarla, por ejemplo ópticamente. Por ejemplo, sobre un sustrato tal como los mencionados anteriormente, esta zona de trabajo puede obtenerse de acuerdo con los métodos descritos en el documento [13].

También como ejemplo, de acuerdo con la invención, la zona de trabajo puede ser una zona de interacción eléctrica, por ejemplo una microcélula electroquímica. Una microcélula electroquímica es un dispositivo que posee al menos dos electrodos, preferiblemente coplanarios, que forman un electrodo de trabajo y un contra-electrodo. También puede poseer un electrodo de referencia. Estos elementos los conoce el especialista en la técnica y los procedimientos de fabricación conocidos por el especialista en la técnica pueden utilizarse para fabricar esta zona de trabajo, por ejemplo el procedimiento descrito en el documento de referencia [8]. La zona de trabajo constituye entonces un auténtico microrreactor electroquímico que utiliza las gotas de líquido de interés capturadas por los rebordes como medios de reacción y más exactamente como medios electroquímicos. Cada reactor electroquímico (reborde + zona de trabajo en forma de microcélula electroquímica + gota de líquido de interés capturada) de acuerdo con esta primera realización de la presente invención, puede utilizarse para realizar cualquier reacción y/o análisis electroquímico conocido por el especialista en la técnica.

El procedimiento de la invención que utiliza estos reactores electroquímicos puede servir por ejemplo para realizar reacciones de electropolimerización localizada de uno o de varios monómeros presentes en la gota (polimerización o copolimerización) y/o de electroinjerto localizado en una o varias moléculas químicas presentes en la gota de líquido de interés en uno de los electrodos de la microcélula. En este ejemplo, el líquido de interés puede ser un líquido que contiene los reactivos necesarios para la electropolimerización o electroinjerto deseado. La polimerización y el injerto se localizan ventajosamente a nivel de cada gota de líquido de interés capturada por cada zona de captura. Dichas reacciones de electropolimerización o injerto localizadas pueden utilizarse por ejemplo para la fabricación de chips biológicos o sistemas de análisis.

En un ejemplo particular de realización del procedimiento de la invención, la microcélula electroquímica puede utilizarse en primer lugar para “fabricar” las zonas de trabajo y a continuación por ejemplo para utilizar estas zonas de trabajo para el análisis de las gotas de un líquido de interés a analizar. Por ejemplo, si las zonas de trabajo deben comprender un polímero orgánico funcionalizado por una sonda, por ejemplo una sonda biológica, pueden estar fabricadas por electropolimerización de un polímero conductor funcionalizado por una sonda, por ejemplo de acuerdo con el procedimiento descrito en el documento de referencia [5]. La particularidad vinculada a la utilización del procedimiento de la invención es que se utilizan las zonas de captura para capturar de forma localizada sobre cada zona de trabajo una primera gota de un primer líquido de interés que contiene los reactivos necesarios para la electropolimerización (monómero orgánico). La funcionalización por la sonda, puede realizarse simultáneamente a la electropolimerización, el primer líquido de interés contiene entonces también la sonda (monómero funcionalizado por la sonda). La funcionalización también puede realizarse posteriormente a la electropolimerización por medio de una segunda gota de un segundo líquido de interés (que contiene la sonda) capturada por las mismas zonas de captura y, debido a esto, localizada en las mismas zonas de trabajo. Además, las zonas de trabajo fabricadas de este modo pueden secarse a continuación y pueden servir, siempre gracias a la zona de captura que las rodea, para capturar una gota de un tercer líquido de interés a analizar, que contiene una diana que interactúa con la sonda (por ejemplo oligonucleótidos complementarios). Un cuarto líquido de interés puede utilizarse también para analizar (detección y/o dosificación) la interacción sonda/diana sobre dichas zonas de trabajo y así seguidamente.

El microrreactor electroquímico que puede utilizarse en el procedimiento de la invención puede servir por ejemplo también para realizar análisis electroquímicos cualitativos y/o cuantitativos, de analitos presentes en las gotas capturadas por las zonas de captura. Puede servir por ejemplo también para realizar análisis electroquímicos, cualitativos y/o cuantitativos, de una interacción molecular sonda/diana, estando la sonda fijada sobre la zona de trabajo y encontrándose la diana en las gotas del líquido de interés capturadas.

En un ejemplo particular, en el que la microcélula electroquímica se utiliza para detectar una diana presente en una muestra líquida, por ejemplo poniendo en juego una interacción de la diana a detectar con una sonda específica fijada

sobre la zona de trabajo, es posible detectar electroquímicamente dicha interacción por ejemplo con la amplificación de la señal mediante acumulación enzimática en una gota de un líquido de interés, que contiene un sustrato enzimático capturado por la zona de captura que rodea a cada zona de trabajo. El documento [4] describe un protocolo operatorio utilizable para este tipo de detección, con el procedimiento de la presente invención.

La detección de una interacción sonda/diana sobre una zona de trabajo puede hacer intervenir un medio diferente de la célula electroquímica conocido por el especialista en la técnica, por ejemplo uno de los descritos en la presente descripción, por ejemplo un procedimiento óptico. La microcélula electroquímica puede servir por lo tanto en este caso únicamente para “fabricar” las zonas de trabajo, realizándose a continuación la detección de una interacción sonda/diana mediante otro medio, o también para analizar una interacción sonda/diana, realizándose la fabricación de estas zonas de trabajo mediante otro procedimiento, por ejemplo uno de los conocidos por el especialista en la técnica en el campo de los chips biológicos.

De forma general, de acuerdo con la invención, cuando se utiliza una sonda sobre las zonas de trabajo, ésta puede seleccionarse por ejemplo entre el grupo constituido por una enzima, un sustrato enzimático, un oligonucleótido, un oligonucleósido, una proteína, un receptor de membrana de una célula eucariota o procariota, un anticuerpo, un antígeno, una hormona, un metabolito de un organismo vivo, una toxina de un organismo vivo, polinucleótido, polinucleósido, ADN complementario o una mezcla de estos últimos. Por supuesto, la sonda se selecciona en función de la diana con la que deberá interactuar.

También como ejemplo, la zona de trabajo puede poseer dispositivos activos o de medición, tales como sensores o accionadores. Estos dispositivos pueden añadirse a las zonas de trabajo mencionadas anteriormente o ser exclusivos según el objetivo previsto en la realización de la presente invención. Los dispositivos activos o de medición se sitúan ventajosamente en el centro de las zonas de captura. Cuando la zona de trabajo comprende un sensor, éste puede seleccionarse por ejemplo entre el grupo constituido por sensores eléctricos, magnéticos, electrostáticos, mecánicos (por ejemplo sensor de presión), térmicos (por ejemplo sensores de temperatura), ópticos (por ejemplo dispositivo de detección óptica) y químicos. Cuando la zona de trabajo comprende un accionador, éste puede seleccionarse entre el grupo constituido por accionadores ópticos (fuente de luz), eléctricos, magnéticos, electrostáticos, mecánicos (desplazamiento mecánico), térmicos (resistencia al calor) y químicos. Dichos sensores y accionadores, utilizables para la realización de la presente invención, así como su procedimiento de fabricación los conoce el especialista en la técnica, particularmente en el campo de los laboratorios en un chip.

Para la realización del procedimiento de la invención, la al menos una zona de trabajo puede ser una zona prácticamente no tensioactiva o tensioactiva frente al líquido de interés. Los inventores han observado en efecto durante sus experimentos que la tensioactividad de la zona de trabajo no es determinante para el funcionamiento del procedimiento de la presente invención. Han observado en efecto, de forma totalmente inesperada, que el procedimiento de la presente invención permite también funcionar cuando la zona de trabajo no es tensioactiva frente al líquido de interés, siempre que la gota capturada recubra al menos parcialmente dicha zona de trabajo.

Las dimensiones de una zona de captura pueden variar enormemente en función de la utilización a la que está destinada y de su naturaleza (tipo de zona de captura, una o varias zonas de trabajo por zonas de captura, una o varias zonas de trabajo sobre la superficie activa, etc.). Por ejemplo, para un laboratorio en un chip o un microsistema, la zona de captura puede tener un diámetro que varía entre $5\ \mu\text{m}$ y $5\ \text{mm}$. Cuando la zona de captura tiene forma de banda, esta banda puede tener una longitud de 1 a $500\ \mu\text{m}$ y un grosor con respecto a la superficie activa de 0 a $500\ \mu\text{m}$. La zona de trabajo, cuya dimensión depende particularmente de la zona de captura (debiendo recubrir la gota capturada al menos parcialmente esta zona de trabajo) puede tener por ejemplo, con las dimensiones mencionadas anteriormente de la zona de captura, un diámetro tal que toque la zona de captura que la rodea o no. Por ejemplo, la zona de trabajo puede tener un diámetro de $5\ \mu\text{m}$ a $5\ \text{mm}$.

De acuerdo con la invención, la superficie activa puede definirse también de la siguiente manera cuando la zona de captura tiene forma de un reborde (véase la figura 11 a título indicativo para las referencias):

D: diámetro interno de las gotas con, por ejemplo, $15\ \mu\text{m} \leq D \leq 5\ \text{mm}$;

L: separación entre gotas;

e: sección del murete mayor, con por ejemplo $20\ \mu\text{m} \leq e \leq 100\ \mu\text{m}$; y

h: altura del murete con, por ejemplo, $5\ \mu\text{m} \leq h \leq 20\ \mu\text{m}$;

con $h/D < 0,15$; $e/D < 0,33$; y $h/L < 0,3$.

De este modo, como ejemplo, los rebordes que se presentan ventajosamente en forma de anillo, opcionalmente con una de las formas geométricas mencionadas anteriormente, cuya altura (h) a partir de su superficie activa es de 5 a $20\ \mu\text{m}$; cuya sección (e) del anillo a nivel de la superficie activa es de 20 a $100\ \mu\text{m}$; y cuyo diámetro (D) en el interior del reborde, que delimita la zona de trabajo, es de $15\ \mu\text{m}$ a $5\ \text{mm}$.

En el campo de los laboratorios en un chip y de las microtecnologías, en el que la dimensión característica de las zonas de captura está próxima a 100 μm , la orientación de la caja no tiene importancia ya que las fuerzas de gravedad se vuelven despreciables frente a las fuerzas de captura de la gota por las zonas de captura que resultan de las interacciones a corta distancia. Por el contrario, para aplicaciones que prevén mayores escalas de tamaño para la realización de la presente invención, la caja utilizada se coloca preferiblemente por supuesto de forma horizontal con una estructuración de la superficie activa para formar zonas de captura y de trabajo hacia arriba.

El procedimiento de la presente invención puede esquematizarse en dos etapas de la siguiente manera:

- rellenado total o parcial de la caja, o cámara de fluido, mediante el líquido de interés de forma que cubra la o las zonas de captura, y después

- extracción del líquido de la caja.

Solamente la o las zonas de captura retienen, cada una, una gota del líquido de interés, siendo la superficie activa no tensioactiva.

La realización del procedimiento de la presente invención en sus diferentes aplicaciones puede por lo tanto hacer intervenir sucesivamente una operación que se desarrolla colectivamente y después operaciones individuales a nivel de cada una de las gotas formadas. De este modo, en una primera operación, llamada colectiva, el procedimiento de la invención permite el paso de una veta de fluido del líquido de interés, por ejemplo inyectada en dicha caja, a una matriz de gotas o microvolúmenes independientes unos de otros. A continuación, el procedimiento de detección y/o de reacciones químicas o bioquímicas conocidas por el especialista en la técnica puede realizarse individualmente (operación individual), en paralelo o sucesivamente, en cada una de las gotas capturadas por las zonas de captura para detectar y analizar dianas presentes en el líquido de interés.

De este modo, la presente invención se refiere también a la utilización del procedimiento de la invención en laboratorios en un chip y microsistemas para la química o la biología, por ejemplo para el análisis y/o la detección de analitos diana presentes en un líquido de interés a analizar. Los propios laboratorios en un chip y microsistemas pueden obtenerse empleando el procedimiento de la invención, como es evidente para el especialista en la técnica con la lectura de la presente descripción.

La presente invención se refiere también a un procedimiento de detección de al menos una molécula que puede estar presente en un líquido de interés, comprendiendo dicho procedimiento las siguientes etapas:

- distribución localizada de gotas de líquido de interés sobre una superficie activa en una caja de acuerdo con el procedimiento de la presente invención, y

- detección electroquímica en dichas gotas de la al menos una molécula que puede estar presente.

La caja utilizada en este procedimiento comprende un sustrato, una superficie activa, zonas de captura dispuestas con zonas de trabajo que son microcélulas electroquímicas. El sustrato, la estructuración para formar la zona de trabajo, el tratamiento de la superficie del sustrato para hacerla prácticamente no tensioactiva y la estructuración de la superficie para formar la zona de captura de una gota de líquido de interés se han definido anteriormente.

La presente invención se refiere también a un procedimiento de detección óptica de al menos una molécula que puede estar presente en un líquido de interés, comprendiendo dicho procedimiento las siguientes etapas:

- una distribución localizada de gotas de líquido de interés sobre una superficie activa en una caja de acuerdo con el procedimiento de la presente invención, y

- detección en dicha caja, en al menos una de dichas gotas, de la al menos una molécula que puede estar presente, por medio de un detector óptico.

La caja utilizada en este procedimiento comprende un sustrato, una superficie activa, zonas de captura dispuestas con zonas de trabajo, siendo estas últimas detectores ópticos. El sustrato, la estructuración para formar la zona de trabajo, el detector óptico, el tratamiento de la superficie del sustrato para hacerlo prácticamente no tensioactivo, y la saturación de la superficie para formar la zona de captura de una gota de líquido de interés se han definido anteriormente.

La detección óptica puede realizarse después de una realización de una reacción electroquímica en las gotas capturadas (en el caso en el que las zonas de trabajo comprenden, además del detector óptico, una célula electroquímica) o química o bioquímica en la gota capturada (por ejemplo una reacción enzimática que demuestra una interacción sonda/diana sobre la zona de trabajo recubierta por la gota del líquido de interés).

De acuerdo con la invención, las detecciones de diferentes moléculas que pueden estar presentes en el líquido de interés pueden realizarse en paralelo, simultánea o sucesivamente, en diferentes gotas de líquido de interés capturadas sobre dicha superficie activa en la caja.

De acuerdo con la invención, el al menos un analito a detectar puede seleccionarse por ejemplo entre moléculas biológicas o químicas. Las moléculas biológicas pueden seleccionarse por ejemplo entre el grupo constituido por una enzima, un sustrato enzimático, un oligonucleótido, un oligonucleósido, una proteína, un receptor de la membrana de una célula eucariota o procariota, un virus, un anticuerpo, un antígeno, una hormona, un metabolito de un organismo vivo, una toxina de un organismo vivo, un nucleótido, un nucleósido, un ADN complementario. La molécula química puede ser cualquier molécula que deba analizarse cualitativa y/o cuantitativamente.

De acuerdo con la invención, las detecciones de los diferentes analitos que pueden estar presentes en el líquido de interés pueden realizarse en paralelo, simultánea o sucesivamente, en diferentes gotas de líquido de interés capturadas sobre dicha superficie activa en la caja.

La presente invención se refiere también a un procedimiento de electropolimerización de moléculas presentes en un líquido de interés, comprendiendo dicho procedimiento las siguientes etapas:

- distribución localizada de gotas de líquido de interés sobre una superficie activa en una caja de acuerdo con el procedimiento de la invención, y

- electropolimerización en dicha caja, en las gotas de dicho líquido de interés, de las moléculas a polimerizar.

La caja utilizada en este procedimiento comprende un sustrato, una superficie activa, zonas de captura dispuestas con zonas de trabajo, siendo estas últimas microcélulas electroquímicas. El sustrato, la estructuración para formar esta zona de trabajo, el tratamiento de la superficie del sustrato para hacerla prácticamente no tensioactiva y la estructuración de la superficie destinada a formar la zona de captura de una gota de líquido de interés se han definido anteriormente. El polímero puede ser por ejemplo uno cualquiera de los polímeros utilizados para la fabricación de chips biológicos, por ejemplo polipirrol, polianilina, poliazuleno, politiofeno, poliindol, polifurano o polifluoreno.

La invención se refiere por lo tanto principalmente a un procedimiento que permite la formación de una matriz con alta densidad de gotas de un líquido de interés sobre la superficie, en una cámara de fluidos (caja), preferiblemente cerrada, con únicamente conexiones de fluido. Por lo tanto no es necesario recurrir a un sistema externo (equipo de distribución de gotas) de dispensado de gotas. El procedimiento de la invención permite realizar muy fácil y muy rápidamente dicha matriz de gotas y tiene un coste muy reducido (al no haber equipo de distribución de gotas). Todas las aplicaciones posibles del procedimiento de la invención se benefician de estas ventajas.

La aplicación más básica del procedimiento de la invención es la fabricación de laboratorios en un chip o microsistemas de análisis. En efecto, el líquido de interés puede comprender todos los elementos químicos necesarios para la fabricación de laboratorios y microsistemas, por ejemplo un monómero para su polimerización localizada en el punto de cada gota sobre la superficie activa, dicho monómero funcionalizado por una sonda, una sonda para fijar sobre un polímero de forma localizada en el punto de cada gota de líquido de interés, reactivos químicos y/o bioquímicos para depositar de forma localizada sobre la superficie, marcadores, etc.

En los procedimientos químicos o bioquímicos y/o en los procedimientos de análisis, de varias etapas que utilizan el procedimiento de la invención, no es necesario que todas las etapas conduzcan a la formación de gotas. En efecto, nada impide que algunas etapas se realicen cubriendo todas las zonas de captura con un líquido y después sacando de la caja este líquido de tal manera que no queden gotas capturadas por la zona de captura (por ejemplo mediante inyección en una caja de un gas a presión o mediante agitación vigorosa, etc.).

Por otro lado es posible capturar sucesivamente diferentes gotas de uno o varios líquidos de interés sobre una misma zona de trabajo gracias a la zona de captura que la rodea. Cada líquido de interés puede contener uno o varios reactivos necesarios, por ejemplo, para realizar una de las etapas de un procedimiento químico o bioquímico, por ejemplo para fabricar zonas de trabajo y/o para realizar los análisis. La sucesión de las diferentes gotas sobre una misma zona de trabajo permite por ejemplo realizar diferentes etapas sucesivas de un procedimiento realizado gracias al procedimiento de la invención sobre las zonas de trabajo rodeadas por su zona de captura. El conjunto de estas etapas del procedimiento se localiza por lo tanto ventajosamente en las zonas de trabajo.

Esta invención puede aplicarse en campos muy variados. De este modo, los microsistemas para química y biología, convencionalmente denominados laboratorios en un chip (LOC) o MicroSistema de Análisis Total (μ TAS) pueden beneficiarse de esta invención para todos los casos en los que sea necesario trabajar con altas densidades de sitios sobre una superficie y realizar en dos tiempos una etapa colectiva, y después una etapa individual. Por ejemplo, los chips de ADN o de proteínas son abarcados por esta invención. Además, esta invención puede aplicarse en cualquier momento en el que sea necesario formar matrices controladas de gotas o de productos: secado localizado de productos farmacéuticos, formación de manchas ("spots") teñidas, injerto localizado de moléculas a analizar cualitativa y/o cuantitativamente. Por otro lado, este nuevo procedimiento permite trabajar en un volumen muy reducido y por lo tanto realizar aplicaciones en las que es preciso economizar los reactivos: por ejemplo catálisis homogénea, moléculas de alto valor añadido de química farmacéutica.

Otras características y ventajas de la invención se presentarán también para el especialista en la técnica con la lectura de los ejemplos a continuación que se proporcionan a título ilustrativo y no limitante, en referencia a las figuras adjuntas.

Breve descripción de las figuras

- La figura 1 es un esquema que representa en corte transversal un ejemplo de realización del procedimiento de la presente invención para la creación de una matriz de gotas.

- La figura 2 es una representación esquemática de diferentes realizaciones posibles del procedimiento de la invención utilizando diferentes cajas cerradas, que difieren particularmente por la posición de las aberturas de entrada y de salida del líquido de interés.

- La figura 3 es un esquema que representa en corte transversal un dispositivo utilizable para la realización del procedimiento de la invención en el que los medios de introducción del líquido de interés en la caja cerrada y de extracción del líquido de interés de la caja utilizan una misma abertura de esta caja.

- La figura 4 es un esquema en vista superior, realizado a partir de fotografías experimentales, de una superficie activa (S) sobre la cual se forma una matriz de gotas utilizando el procedimiento de la presente invención: a la izquierda la superficie sin gotas antes de la realización de este procedimiento y a la derecha la superficie con la matriz de gotas (g) retenidas por las zonas de captura (Zc) cuando el líquido de interés se ha extraído de la caja, en la última etapa del procedimiento de la invención.

- Las figuras 5, 6 y 7a) a 7c) representan esquemáticamente diferentes formas de zonas de captura utilizables para la realización del procedimiento de la presente invención, particularmente cuando estas zonas rodean a una zona de trabajo.

- La figura 8 representa esquemáticamente un dispositivo utilizable para la realización del procedimiento de la invención, en el que la zona de trabajo es un microsistema electroquímico.

- Las figuras 9a) y 9b) son dos fotografías que ilustran la realización del procedimiento de la invención sobre un dispositivo en el que la zona de trabajo es una microcélula electroquímica: la figura 9a) antes de la captura de una gota del líquido de interés y la figura 9b) después de la captura de una gota del líquido de interés.

- La figura 10 es un gráfico que muestra la detección, a nivel de una zona de trabajo, de un producto de una reacción enzimática en una gota capturada mediante la realización de la presente invención.

- La figura 11 es una representación esquemática en corte de dos tipos de cubetas: a la izquierda las cubetas de la técnica anterior y a la derecha las cubetas de acuerdo con la presente invención.

Ejemplos

En estos ejemplos, la estructuración del sustrato para formar las zonas de captura de gotas del líquido de interés es generalmente anular, para disponer una zona de trabajo en el centro de cada zona de captura.

Ejemplo 1

Ejemplo de fabricación de una superficie activa no tensioactiva frente a un líquido de interés acuoso

Un sustrato de silicio (Si) con una capa superior de óxido de silicio (SiO_2) de 300 nm se trata con silano hidrófobo (1H, 1H, 2H, 2H perfluorodecil-triclorosilano) para hacer hidrófoba a la superficie.

El protocolo es el siguiente: después del tratamiento en una mezcla de sosa/agua/etanol a 3,5 M durante 2 horas a temperatura ambiente para generar los sitios de silanol, el sustrato se coloca durante 10 minutos a temperatura ambiente en una mezcla de tolueno anhidro/silano hidrófobo a 9 mM de concentración de silano. A continuación se lava con tolueno y después con acetona y después con etanol y finalmente se limpia con ultrasonidos durante 5 minutos en etanol. El sustrato se coloca a continuación en una estufa durante 1 hora a 110°C. El ángulo de contacto medido con el agua es de 110°C.

Ejemplo 2

Fabricación de una zona de captura constituida por un material de soporte dispuesto sobre la superficie activa utilizable para la realización del procedimiento de la invención

Sobre el sustrato de Si con una capa de SiO_2 de 300 nm, realización de etapas convencionales para un especialista en la técnica de microelectrónica:

- depósito de 300 nm de platino (Pt) por pulverización;

- fotolitografía en una resina fotosensible con apertura de un motivo circular unido a una banda de llegada de corrientes;

ES 2 298 858 T3

- en un reactor de plasma, grabado iónico completo del Pt en zonas sin resina;
- retirada de la resina en un baño de ácido nítrico;
- en un reactor de plasma, depósito químico en fase de vapor de 500 nm de SiO₂;
- fotolitografía en una resina fotosensible con apertura de un motivo circular;
- en un reactor de plasma, grabado iónico completo de 500 nm de SiO₂ en zona sin resina; y
- retirada de la resina en un baño de ácido nítrico.

La figura 7a es una representación esquemática de una zona de captura circular constituida por un material de soporte y que rodea a una zona de trabajo obtenida.

Ejemplo 3

Fabricación de una zona de captura constituida por silicio negro utilizable para realización del procedimiento de la invención

Sobre un sustrato de Si (todas estas etapas las conocen muy bien el especialista en la técnica de microelectrónica):

- fotolitografía en una resina fotosensible con apertura de un motivo en corona;
- en un reactor de plasma, grabado del reactivo iónico de aproximadamente 3 µm de silicio de acuerdo con el protocolo descrito en el documento [11] para formar silicio negro;
- limpieza de la superficie al finalizar el grabado mediante el paso en un reactor de plasma Plassys MDS 150 (compañía Plassys, Francia) con las siguientes condiciones: potencia 500 W, tiempo de reacción 4 minutos, presión 21,33 Pa (160 mTorr), caudal de oxígeno 25 cm³/minuto, temperatura ambiente; y
- retirada de la resina en un baño de ácido nítrico.

El silicio negro formado sobre estas zonas determinadas es fuertemente hidrófilo, mientras que el silicio es prácticamente no tensioactivo frente a líquidos de interés acuosos (muestras).

Las figuras 5 y 6 muestran esquemáticamente diferentes zonas de captura formadas alrededor de su(s) zona(s) de trabajo. La estructuración fina se ha realizado para crear una banda de silicio negro, abierta o cerrada, que constituye la zona de captura (Zc) alrededor de una zona prevista para formar la zona de trabajo (Zt). En la figura 6, se dispone una zona de captura alrededor de dos (a la derecha) o cuatro (a la izquierda) zonas de trabajo.

La zona grabada no necesita ninguna modificación química. Este dispositivo de la invención es para utilizarlo con líquidos de interés acuosos.

Ejemplo 4

Fabricación de una zona de captura en forma de electrodo de captura mediante humedecimiento utilizable para la realización del procedimiento de la invención

4.1 Zona de captura en forma de electrodo de captura

En un sustrato de Si con una capa de SiO₂ de 300 nm, se realizan las etapas siguientes:

α) Se realizan las mismas etapas que en el ejemplo 2 para disponer un electrodo (material de soporte) sobre la superficie activa.

β) Realización de la superficie activa no tensioactiva frente al líquido de interés sobre el conjunto del sustrato para hacerlo hidrófobo como en el ejemplo 1. A continuación se limpia el electrodo químicamente con una solución de sosa/agua/etanol. Para conseguir esto, se deposita una gota de una mezcla de sosa/agua/etanol a 3,5 M sobre los electrodos durante dos horas a temperatura ambiente. Los electrodos se lavan a continuación con agua y después se secan.

γ) En los experimentos suplementarios, se realiza una barrera hidrófila sobre el electrodo mediante electropolimerización en condiciones potencioestáticas de un pirrol portador de funciones alcohol (funciones tensioactivas frente a un líquido de interés acuoso) en posición 3. Este polipirrol se genera a partir de una solución de pirrol-3-etanol 100 mM y de perclorato de litio (LiCl₄) 0,5 M. Se aplica un potencial de 1 V frente a Ag/AgCl/Cl⁻ durante 5 segundos. El ángulo de contacto medido con el agua en el electrodo es de 53°.

ES 2 298 858 T3

La figura 7a es una representación esquemática de un dispositivo de acuerdo con la invención obtenido utilizando el protocolo de este ejemplo. En esta figura, la zona de captura (Zc) que rodea a la zona de trabajo (Zt) se forma mediante un electrodo recubierto por un polipirrol portador de funciones tensioactivas (funciones alcohol).

4.2 Zona de captura en forma de banda tensioactiva

En un sustrato de Si con una capa de SiO₂ de 300 nm, se han realizado las siguientes etapas:

α) Realización de la superficie activa no tensioactiva frente al líquido de interés en el conjunto del sustrato para hacerlo hidrófobo como en el ejemplo 1.

β) Fotolitografía en una resina fotosensible de tipo negativo (referencia NFR-015 del proveedor Shipley) con una apertura de un motivo en corona, para formar la zona de captura (o banda tensioactiva);

γ) Destrucción del silano hidrófobo en los motivos abiertos de la resina fotosensible mediante el paso por un reactor de plasma Plassys MDS 150 (compañía Plassys, Francia) con las siguientes condiciones: potencia 500 W, tiempo de reacción 4 minutos, presión 21,33 Pa (160 mTorr), caudal de oxígeno 25 cm³/minuto, temperatura ambiente; y

δ) Realización de la zona de captura mediante silanización con un silano portador de funciones amina (funciones tensioactivas para el líquido de interés acuoso). El sustrato se coloca en una solución de γ-aminopropil trietoxisilano al 10% en volumen en etanol. Después de una noche a temperatura ambiente, el sustrato se lava con etanol y finalmente se deja durante tres horas en una estufa a 110°C.

Ejemplo 5

Fabricación de zonas de captura constituidas por rebordes utilizables para la realización del procedimiento de la invención

En una nueva placa de silicio se realiza una etapa de fotolitografía con una resina espesa fotosensible Clariant AZ4562 (marca comercial) de la siguiente manera:

- depósito de un promotor de adherencia, que en este caso es hexametildisilazano, en un horno a 120°C,

- revestimiento de resina en un torno a 1000 vueltas/minuto durante 30 segundos con una aceleración de 200 vueltas/minuto/s,

- recocido en una placa de calor a 115°C durante 2 minutos,

- exposición al sol en una máquina de exposición al sol Kart Süß MA750 (marca comercial) durante 50 s en modo discontinuo (50 x 10 segundos con 5 segundos de pausa) a través de una máscara,

- desarrollo en una solución Shipley MF319 (marca comercial) diluida en proporción 1:3 con agua desionizada,

- aclarado con agua desionizada y secado en un flujo de nitrógeno,

- recocido en una placa de calor a 115°C durante 3 minutos y después a 150°C durante 1 minuto,

- medición de grosor: 13 μm.

En la máscara utilizada para la exposición al sol, todos los motivos representan anillos cuyos muretes tienen una longitud de 35 μm con combinaciones variadas entre su diámetro (de 100 a 1000 μm) y la distancia entre los centros de dos rebordes (coronas) (de 50 a 1000 μm).

Pueden obtenerse fácilmente 3025 cubetas (c) en una superficie de 1 centímetro cuadrado.

La figura 11, a la derecha, representa esquemáticamente las zonas de captura (Zc) obtenidas, en forma de rebordes. Estas zonas de captura forman cubetas (c) capaces de capturar una gota (g) de un líquido de interés.

Ejemplo 6

Fabricación de zonas de trabajo funcionalizadas mediante una sonda utilizables en el procedimiento de la invención

En este ejemplo, se utiliza una zona de trabajo que comprende cuatro electrodos. En un sustrato de Si con una capa de SiO₂ de 300 nm, realización de etapas convencionales para un especialista en la técnica de microelectrónica:

- depósito de 300 nm de platino (Pt) mediante pulverización;

ES 2 298 858 T3

- fotolitografía en una resina fotosensible con abertura de motivos de la micro-célula, del electrodo de captura y de las bandas de llegada de corrientes;

- en un reactor de plasma, grabado iónico completo del Pt en zonas sin resina;

- retirada de la resina en un baño de ácido nítrico;

- en un reactor de plasma, depósito químico en fase de vapor de 500 nm de SiO_2 ;

- fotolitografía en una resina fotosensible con abertura de los motivos de los electrodos de la micro-célula y del electrodo de captura;

- en un reactor de plasma, grabado iónico completo de 500 nm de SiO_2 en las zonas sin resina; y

- retirada de la resina en un baño de ácido nítrico.

El electrodo de trabajo (We) (véase la figura 8), el contra-electrodo (CE) y el electrodo adjunto utilizado para formar la zona de captura (Zc) son de platino (depósito de aproximadamente 5000 Å). También está presente un electrodo de referencia $\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{Cl}^-$ (Rf) (véase la figura 8).

También está presente un electrodo de referencia $\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{Cl}^-$ (Rf). Este electrodo se obtiene mediante el depósito de plata sobre el platino con el siguiente protocolo:

- preparación de 10 ml de solución que contiene AgNO_3 0,2 M, KI 2 M, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,5 mM;

- un potencial de -0,65 V frente al ECS (electrodo de calomelano saturado) se suministra durante 90 segundos (seguido de cronoamperometría) en el electrodo de referencia. Se obtiene un depósito gris/blanco. A continuación la zona de trabajo se aclara con agua; y

- la zona de trabajo con el electrodo modificado anteriormente se sumerge en una solución de HCl 0,1 M y se suministra un potencial de 0,5 V frente a ECS durante 30 segundos para clorar el depósito de plata. A continuación el sustrato se aclara con agua.

El conjunto de cada zona de trabajo se silaniza con silano hidrófobo de acuerdo con el protocolo descrito en el ejemplo 1.

La barrera hidrófila se realiza sobre el electrodo de captura de acuerdo con el protocolo descrito en el ejemplo 4.1-δ.

A continuación el contra-electrodo (CE) se funcionaliza con un copolímero conductor de pirrol/pirrol funcionalizado en posición 1 mediante la función biológica (en este caso un oligonucleótido sonda) [5]. La electropolimerización se localiza sobre el contra-electrodo de la zona de trabajo.

Para ensayar esta zona de trabajo, el oligonucleótido sonda se hibrida con un oligonucleótido diana (100 pM) portador de un marcador enzimático (HRP "Horse Radish Peroxidase" (Peroxidasa de Rábano Rusticano)) en un tampón (NaCl 1 M/Tris 10 mM/EDTA 1 mM/Triton X 100 al 0,05%). Después de los lavados en el mismo tampón pero sin Triton, la solución de revelado ($\text{OPD} + \text{H}_2\text{O}_2$ + tampón fosfato-citrato 50 mM) se introduce en el dispositivo de la presente invención y después se aspira. Se deja una fracción de líquidos de forma localizada sobre la zona de trabajo como se muestran en las fotografías de la figura 9:

- a la izquierda, antes de que el dispositivo este recubierto por la solución de revelado, se distingue el dispositivo de la presente invención sin la gota; y

- a la derecha, después de que se haya aspirado la solución de revelado, se distingue el dispositivo de la presente invención que ha capturado gracias a su zona de captura (banda hidrófila) una gota de la solución de revelado.

Después de 5 minutos de revelado, el producto enzimático se detecta mediante voltamperometría diferencial de impulsos sobre un electrodo de medida (WE). Los resultados de esta detección se representan mediante el gráfico de la figura 10 adjunta.

La figura 8 es una representación esquemática de una micro-célula electroquímica de un dispositivo de acuerdo con la invención obtenida utilizando el protocolo de este ejemplo. En esta figura, la zona de trabajo está constituida por el electrodo de medición o el electrodo de trabajo (WE), por el polímero conductor portador del oligonucleótido (Po) depositado sobre el contra-electrodo (CE) y por la zona de captura (Zc) formada por el electrodo más externo sobre el que se ha depositado el polímero portador de las funciones alcoholes (Pm). El conjunto se realiza en la superficie activa (Sa) no tensioactiva.

Ejemplo 7

Fabricación de una caja adecuada para la realización del procedimiento de la invención

5 Se fabrica una tapa hueca de polidimetilsiloxano (PDMS) mediante moldeo en un molde de vidrio con un motivo cuadrado de grosor de 1 mm.

10 En un dispositivo de la presente invención plano, como los obtenidos en los ejemplos anteriores, se fija esta tapa hueca de forma hermética mediante pegado con el adhesivo reticulante y mediante exposición a radiación ultravioleta (VI-TRALIT 6181). Las conexiones para las entradas y salidas de fluido se realizan mediante perforación de la tapa con agujas de diámetro reducido. La aguja de entrada se une a tubos de transporte de fluido y a una jeringa llena del líquido de interés. El conjunto final se ensaya para detectar posibles fugas, asegurando que el líquido debe pasar únicamente por las conexiones previstas a tal efecto.

15 La figura 3 es una representación esquemática de la caja obtenida en este ejemplo.

20 Pueden realizarse fácilmente otras disposiciones de las conexiones de entrada y de salida, y la figura 2 proporciona representaciones esquemáticas de diferentes cajas. En esta figura B1, B2 y B3 representan tres tipos de cajas de acuerdo con la invención con aberturas de entrada (o) y de salida (s) colocadas de forma diferente. Sb, Sa, Zc, Zt tienen el mismo significado que en las figuras mencionadas anteriormente. Los diferentes elementos que constituyen la caja de la invención se representan de la misma manera en los tres esquemas.

25 La figura 4 es una representación esquemática vista desde arriba de una superficie activa que se utiliza para fabricar una caja de acuerdo con la invención. Esta superficie activa comprende 12 zonas de captura y 12 zonas de trabajo correspondientes. La superficie activa es no tensioactiva frente al sustrato. Se han fabricado diferentes formas de zonas de captura utilizables para la realización del procedimiento de la invención, en particular de anillo o de disco. Éstas se representan en las figuras 5 y 6.

Ejemplo 8

30 *Realización del procedimiento de la invención para la distribución localizada de gotas, y resultados*

La realización del procedimiento de la invención se ha ensayado en cajas fabricadas de acuerdo con el ejemplo 7 anterior, con las diferentes zonas de captura fabricadas de acuerdo con los ejemplos 2 a 6 anteriores.

35 La figura 1 representa el funcionamiento de una caja cerrada con una primera abertura (o) de introducción del líquido de interés en la caja y una segunda abertura (s) de extracción del líquido de interés de la caja: el líquido de interés E se inyecta en la caja (esquema superior) mediante la primera abertura (o) hasta el llenado (esquema central) y después se extrae por la segunda abertura (s) (esquema inferior). El medio de inyección utilizado es una jeringa y el medio de extracción utilizado es una jeringa. Se obtiene una matriz de gotas (g) sobre la superficie activa como se representa en la figura 4 adjunta, gracias a las zonas de captura (Zc).

45 La figura 3 representa el funcionamiento de una caja cerrada con una primera abertura (o) de introducción del líquido de interés en la caja y de extracción del líquido de interés de la caja y una segunda abertura (s) que deja que el aire contenido en la caja salga durante la introducción del líquido de interés en ésta y entre en la caja durante la extracción de líquido de interés. El líquido de interés E se inyecta y después se extrae de la caja mediante una única abertura. Se obtiene una matriz de gotas (g) como se representa en la figura 4 adjunta.

50 Este ejemplo muestra que se obtiene una matriz de gotas (g) bien localizadas en diferentes zonas de captura gracias al procedimiento de la presente invención. El llenado de la caja no es obligatorio, siempre que las diferentes zonas de captura estén cubiertas por el líquido de interés.

55 Los experimentos realizados con diferentes formas de zonas de captura, como las formas representadas en las figuras 5 y 7 demuestran que estas zonas de captura dispuestas con zona de trabajo también son funcionales para la realización del procedimiento de la invención.

Ejemplo 9

Procedimiento de detección electroquímica

60 Se fabrica una caja de acuerdo con el protocolo del ejemplo 7, con zonas de captura y zonas de trabajo fabricadas de acuerdo con el ejemplo 6.

65 El líquido de interés está constituido por una solución de revelado que comprende el sustrato de la enzima HRP: agua oxigenada (H₂O₂) y cromógeno OPD (Ortofenilendiamina). Esta solución se introduce en la caja cerrada para recubrir las zonas de captura y después se aspira fuera de esta caja.

ES 2 298 858 T3

Las gotas de líquido de interés son capturadas por las zonas de captura y cubren las zonas de trabajo como se muestran en las fotografías de la figura 9 adjunta.

- a la izquierda, antes de que la superficie activa se recubra con el líquido de interés: se distingue la zona de trabajo sin la gota; y

- a la derecha, después de que el líquido de interés se haya aspirado: se distingue la zona de captura que ha capturado una gota del líquido de interés.

Después de 5 minutos de reposo que sirven para el revelado de la reacción química, el producto enzimático se detecta mediante voltamperometría diferencial de impulsos. Los resultados de esta detección se presentan en el gráfico de la figura 10 adjunta.

La zona de captura que rodea a la zona de trabajo es por lo tanto muy funcional y el procedimiento de la invención permite detectar bien un analito en cada gota capturada.

Ejemplo 10

Procedimiento de electropolimerización

Se fabrica una caja de trabajo de acuerdo con el protocolo del ejemplo 7, con zonas de captura y zonas de trabajo fabricadas de acuerdo con el ejemplo 6.

Como en el ejemplo 6 anterior, se ha obtenido una polimerización de pirrol funcionalizado o no de forma localizada en las gotas capturadas por las zonas de captura.

Lista de referencias

[1] WO 02/16023: Protogene Laboratories Inc.

[2] US 6.040.193: Affymetrix Inc.

[3] WO 99/03684: Eapen Saji y col.

[4] **Azek et al.**, *Analytical Biochemistry*, 2000, 284, 107-113.

[5] WO 00/36145: Comisario de la Energía Atómica.

[6] WO 02/090573: Infineon

[7] Junghoon **Lee et al.**, "Electrowetting and Electrowetting-on-dielectric for microscale liquid handling", *Sensor and Actuators A* 95 (2002), 259-268.

[8] J. **Cooper et al.**, "Micromachining Sensor for Electrochemical Measurement in Subnanoliter Volumes", *Anal. Chem.* 1997, 69, 253-258.

[9] Mengsu **Yang et al.**, "Covalent Immobilisation of Oligonucleotides on Modified Glass/Silicon Surfaces for Solid-Phase DNA Hybridization and Amplification", *Chemistry Letters* 1998, 257-258.

[10] Mila **Boncheva et al.**, "Design of Oligonucleotide Arrays at Interfaces", *Langmuir* 1999, 15, 4317-4320.

[11] H. **Jansen et al.**, "The black silicon method: a universal method for determining the parameter setting of a fluorine-based reactive ion etcher in deep silicon trench etching with profile control", *J. Micromech. Microeng.* 5 (1995), 115-120.

[12] FR-A-2 818 662.

[13] EP-B-561 722.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de distribución localizada de gotas de un líquido de interés en una superficie activa de un sustrato, comprendiendo dicho procedimiento las siguientes etapas:
 - una introducción del líquido de interés en una caja mediante medios de introducción, conteniendo dicha caja a dicha superficie activa, y
 - una extracción del líquido de interés de dicha caja mediante medios de extracción;siendo dicha superficie activa así como las otras superficies en el interior de la caja prácticamente no tensioactivas frente al líquido de interés a excepción de varias zonas de captura localizadas, formadas de forma determinada sobre dicha superficie activa, que son cada una apropiadas para capturar una gota del líquido de interés;estando dichos medios de introducción y de extracción del líquido de interés en la caja dispuestos de tal manera que cuando el líquido de interés se introduce en la caja, cubre dichas zonas de captura y cuando el líquido de interés se extrae de la caja, la gota de dicho líquido de interés queda capturada de forma distribuida y localizada en cada zona de captura.
2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que cada zona de captura se dispone con al menos una zona de trabajo formada sobre dicha superficie activa de tal manera que esta zona de trabajo esté en contacto con la gota de líquido de interés capturada.
3. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, en el que al menos una zona de trabajo es una zona no tensioactiva frente al líquido de interés.
4. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2 ó 3, en el que al menos una zona de captura tiene forma anular, abierta o cerrada que rodea a la al menos una zona de trabajo dispuesta con ella.
5. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la zona de captura de la gota del líquido de interés rodea a varias zonas de trabajo.
6. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la zona de trabajo es una zona de detección de una especie química que puede estar presente en el líquido de interés.
7. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, en el que la zona de trabajo es una zona funcionalizada mediante una sonda biológica.
8. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7, en el que la sonda se selecciona entre el grupo constituido por una enzima, un sustrato enzimático, un oligonucleótido, un oligonucleósido, una proteína, una receptor de membrana de una célula eucariota o procariota, un anticuerpo, un antígeno, una hormona, un metabolito de un organismo vivo, una toxina de un organismo vivo, un polinucleótido, un polinucleósido y un ADN complementario.
9. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, en el que la zona de trabajo es una zona funcionalizada mediante una molécula química.
10. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 9, en el que la zona de trabajo es una zona de interacción eléctrica y/o química con dicha gota capturada.
11. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10, en el que la zona de trabajo es una microcélula electroquímica.
12. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 9, en el que la zona de trabajo comprende un sensor seleccionado entre el grupo constituido por sensores ópticos, eléctricos, magnéticos, electroestáticos, mecánicos, térmicos y químicos.
13. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 9, en el que la zona de trabajo comprende un accionador seleccionado entre el grupo constituido por accionadores ópticos, eléctricos, magnéticos, electroestáticos, mecánicos, térmicos y químicos.
14. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que al menos una de las zonas de captura de una gota de un líquido de interés es una zona de captura eléctrica o física.
15. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 14, en el que la zona de captura captura a la gota de líquido de interés mediante fuerzas capilares.

ES 2 298 858 T3

16. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 14, en el que la zona de captura captura localmente a la gota de líquido de interés mediante humedecimiento.

17. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 16, en el que la zona de captura captura localmente a la gota del líquido de interés debido a una mayor tensioactividad de la zona de captura por el líquido de interés que la de la superficie activa.

18. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 16, en el que la zona de captura captura localmente a la gota de líquido de interés mediante electro-humedecimiento.

19. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 14, en el que la zona de captura captura a la gota de líquido de interés mediante interacciones de tipo hidrófilo/hidrófobo con el líquido de interés.

20. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la menos una de las zonas de captura es hueca o sobresale con respecto a la superficie activa sobre la que se forma.

21. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las zonas de captura localizadas distribuidas de forma determinada sobre dicha superficie activa, forman una matriz.

22. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que siendo los medios de extracción del líquido de interés medios de aspiración de éste fuera de la caja, la etapa de extracción consiste en aspirar el líquido de interés de dicha caja.

23. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que siendo los medios de extracción del líquido de interés medios de inyección de un fluido gaseoso en la caja, la etapa de extracción consiste en inyectar un fluido gaseoso en la caja de forma que expulse el líquido de interés de dicha caja.

24. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 23, en el que el fluido gaseoso inyectado está saturado en vapor del líquido de interés.

25. Utilización de un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en un laboratorio en un chip o en un microsistema para química o biología.

26. Utilización de un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25 en un chip biológico seleccionado entre el grupo constituido por chips de ADN, chips de ARN, chips de proteínas, chips de anticuerpos, chips de antígenos o chips de células.

27. Procedimiento de determinación de al menos una molécula que puede estar presente en un líquido de interés, comprendiendo dicho procedimiento las siguientes etapas:

- distribución localizada de gotas de líquido de interés en una superficie activa en una caja de acuerdo con el procedimiento de la reivindicación 1, y

- detección electroquímica en dichas gotas de la al menos una molécula que puede estar presente en el líquido de interés.

28. Procedimiento de detección óptica de al menos una molécula que puede estar presente en un líquido de interés, comprendiendo dicho procedimiento las siguientes etapas:

- una distribución localizada de gotas de líquido de interés en una superficie activa en una caja de acuerdo con el procedimiento de la reivindicación 1, y

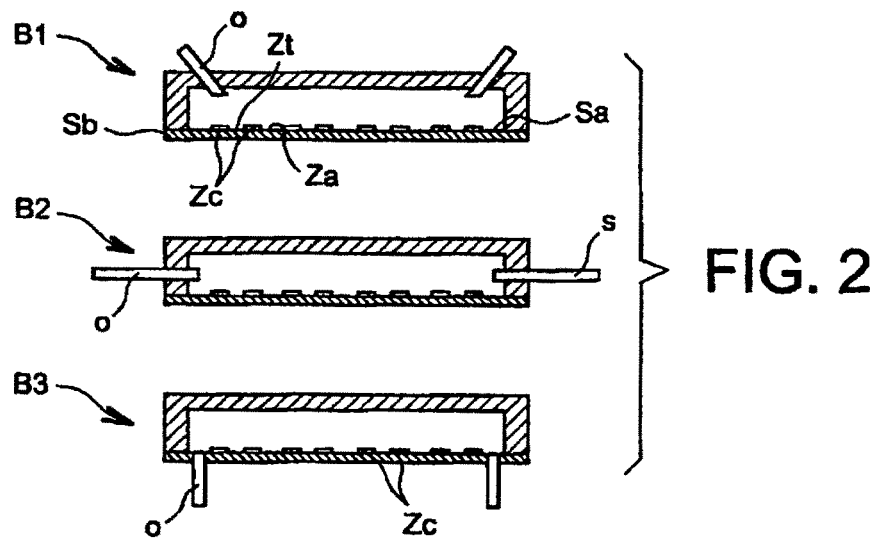
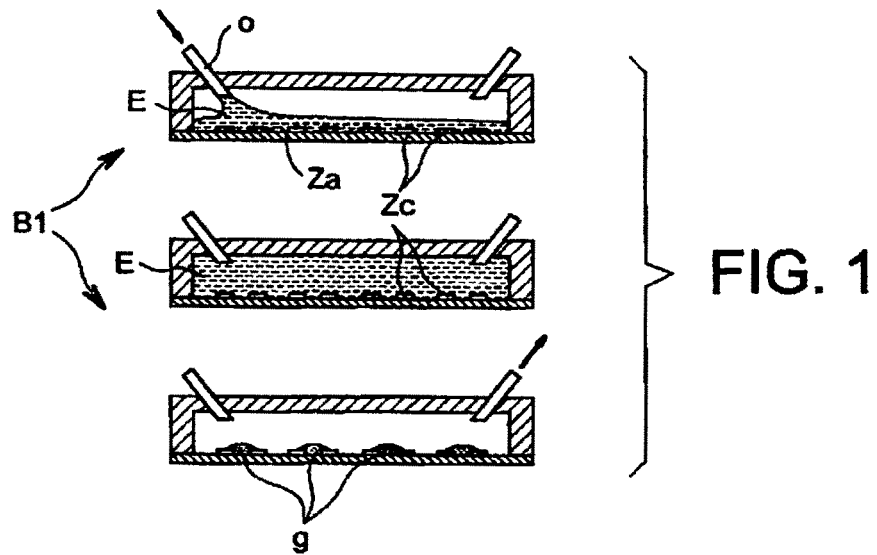
- detección óptica en dichas gotas, de la al menos una molécula que puede estar presente en dicho líquido de interés.

29. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 27 ó 28, en el que las detecciones de moléculas diferentes que pueden estar presentes en el líquido de interés se realizan en paralelo en diferentes gotas de líquido de interés capturadas sobre dicha superficie activa en la caja.

30. Procedimiento de electropolimerización de moléculas presentes en un líquido de interés, comprendiendo dicho procedimiento las siguientes etapas:

- distribución localizada de gotas de líquido de interés en una superficie activa en una caja de acuerdo con el procedimiento de la reivindicación 1, y

- electropolimerización en dicha caja, en las gotas de dicho líquido de interés, de las moléculas a polimerizar.



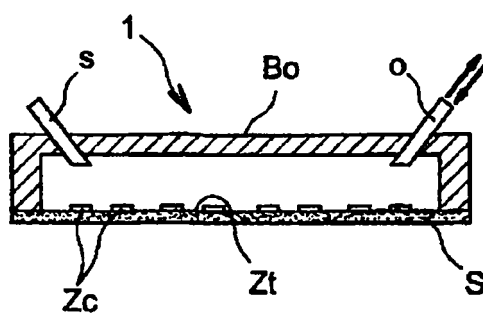


FIG. 3

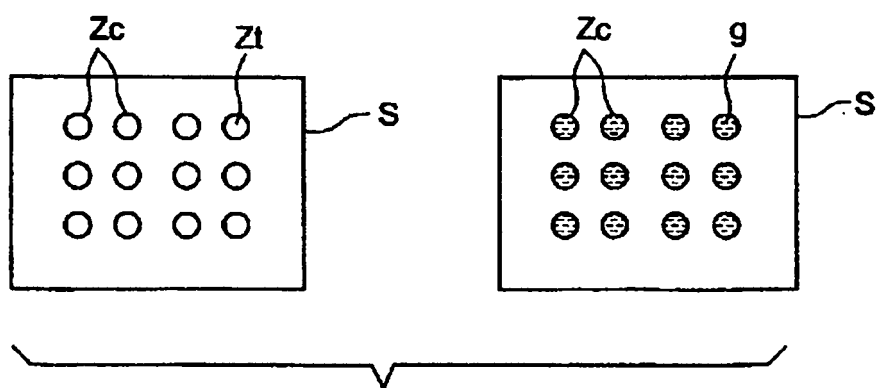


FIG. 4

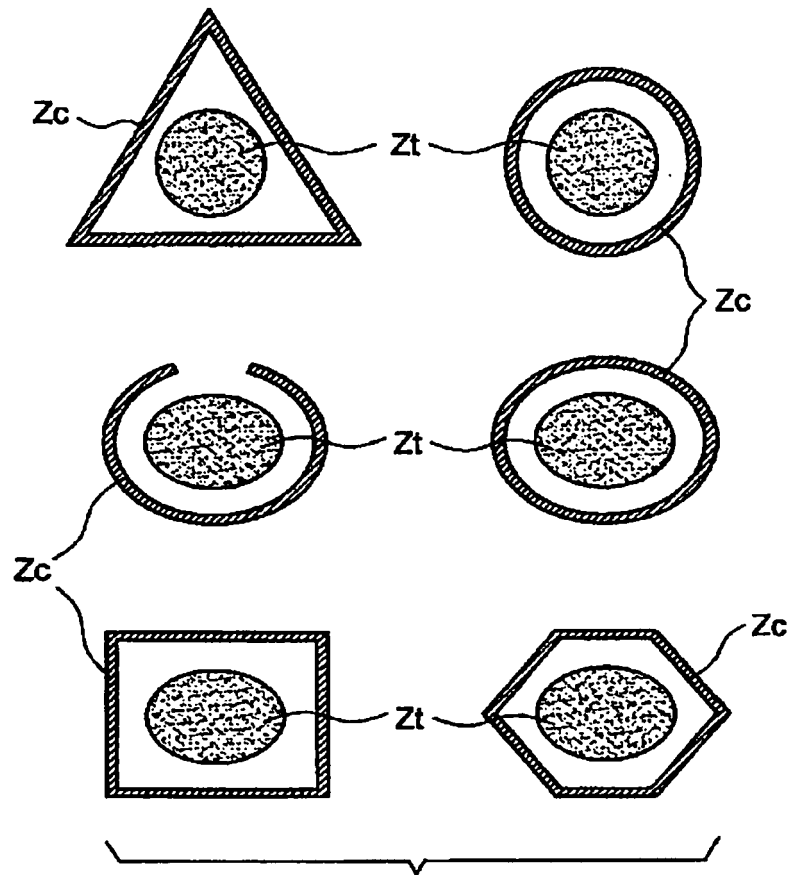


FIG. 5

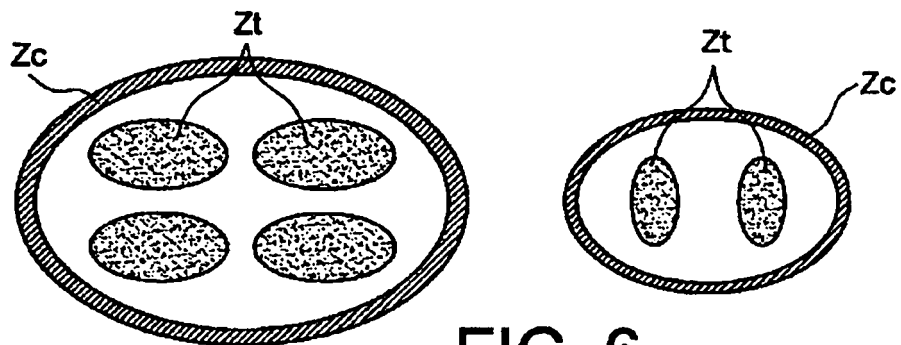


FIG. 6

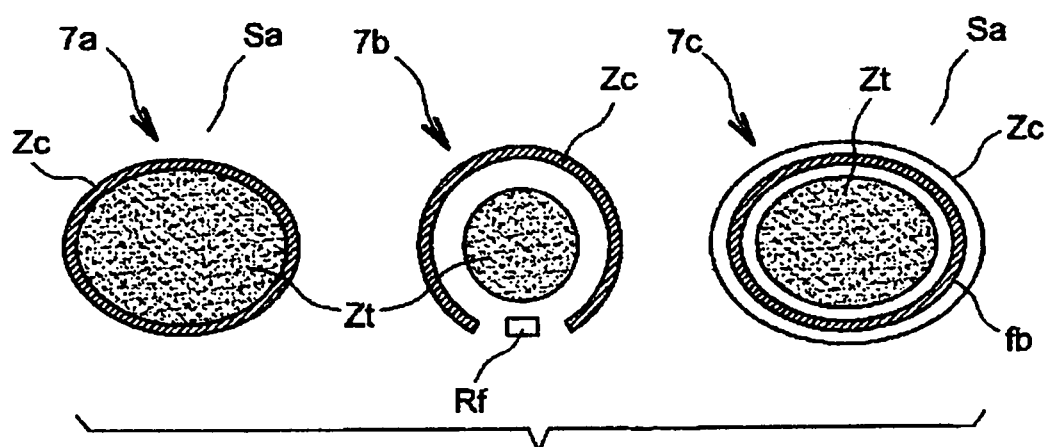


FIG. 7

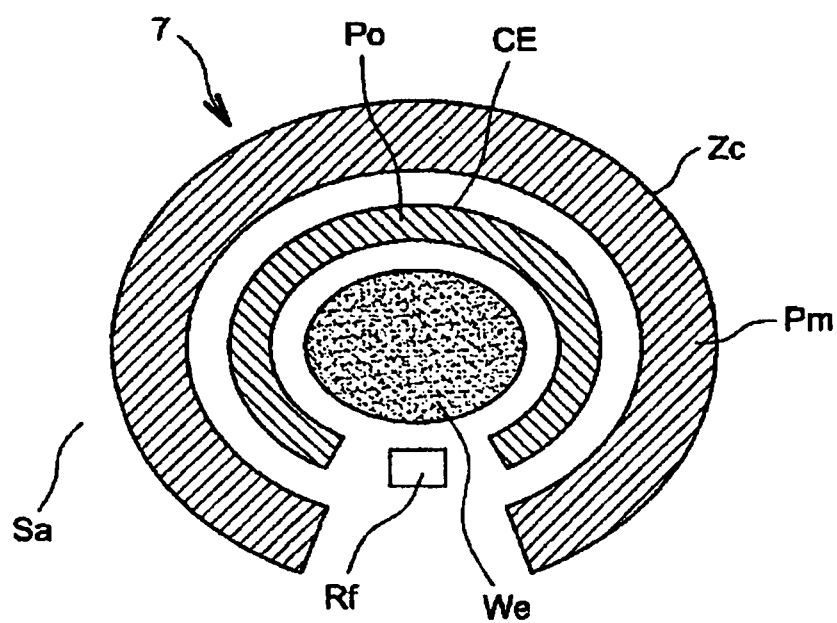
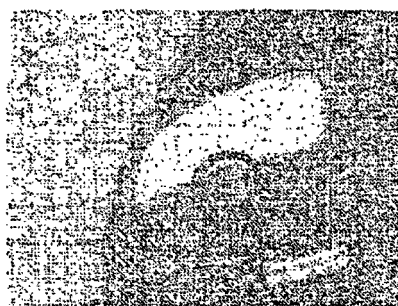
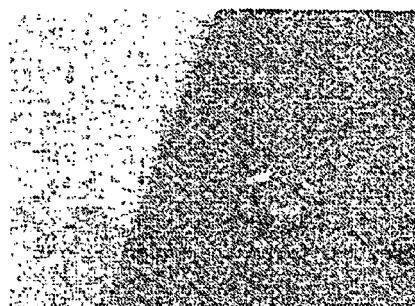


FIG. 8



(a)



(b)

FIG. 9

