(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 758 182**

(51) Int. CI.:

B01J 19/00 (2006.01)
G01N 33/48 (2006.01)
B82Y 30/00 (2011.01)
B82Y 40/00 (2011.01)
B81C 1/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.06.2015 PCT/ES2015/070439**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **10.12.2015 WO15185782**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.06.2015 E 15803414 (0)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.09.2019 EP 3153855**

(54) Título: **Método de obtención de micropartículas planares con multiplexado molecular superficial, las micropartículas y su uso**

(30) Prioridad:

05.06.2014 ES 201430864

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.05.2020

(73) Titular/es:

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC) (100.0%)
Serrano, 117
28006 Madrid, ES

(72) Inventor/es:

ESTEVE TINTÓ, JAUME;
PLAZA PLAZA, JOSÉ ANTONIO;
DUCH LLOBERA, MARTA;
TORRAS ANDRÉS, NÚRIA;
PÉREZ GARCÍA, MARÍA LUISA y
AGUSIL ANTONOFF, JUAN PABLO

(74) Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

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).

0DESCRIPCIÓN

Método de obtención de micropartículas planares con multiplexado molecular superficial, las micropartículas y su uso

Sector y objeto de la invención

La presente invención está dirigida a la aplicación de nuevas técnicas de fabricación de micropartículas en el amplio campo de la ingeniería. Por la propia naturaleza del array obtenido así como de las micropartículas que contiene y que pueden ser individualizadas mediante métodos mecánicos, el área de aplicación de esta invención es muy amplia, englobando tanto los sectores de la química, la biología celular, la medicina y la farmacia.

Estado de la técnica

En el campo de la ingeniería y la ciencia de materiales se entiende como partícula cualquier ente, de escala micro o nanométrica, dotado de masa y que puede ser obtenido de forma natural o artificial a partir de procedimientos físico-químicos. Actualmente, las distintas técnicas existentes para la obtención de micro y nanopartículas pueden clasificarse en dos grandes grupos, en función de si éstas se fabrican directamente de forma individualizada, o bien si son obtenidas en forma de matriz ordenada o *array*.

Todas las técnicas englobadas en el primero de los grupos enumerados (fabricación individualizada de partículas) están basadas en dos tipos de aproximaciones distintas, denominadas "aproximación descendente" (*top-down approach*) y "aproximación ascendente" (*bottom-up approach*). La primera de ellas se basa en la obtención de material particulado a partir de un *bulk* o "bloque" de material o estructuras más grandes, a través de progresivas reducciones de tamaño (Dorian A. Canelas, Kevin P. Herlihy and Joseph M. DeSimone. *Wiley Inter. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* (2009), 1, 4, 391-404). La aproximación ascendente, por otro lado, consiste en la síntesis química supramolecular, que utiliza la información química contenida en los distintos componentes individuales (átomos o moléculas) para conseguir su agrupación espontánea en partículas complejas más grandes, mediante procesos de "auto-ensamblaje" (*self-assembly*; Wei Wang, Baohua Gu, Liyuan Liang and William Hamilton. *J. Phys. Chem. B* (2003), 107, 3400-3404). En los últimos años ha aumentado el interés científico para el desarrollo de nuevos materiales y compuestos basados en polímeros. Mediante el uso de técnicas de síntesis química, se han desarrollado técnicas tan diversas como "*flow-focusing*" o pulverización o la microemulsión que, combinadas con la microfluídica, están siendo empleadas también para la fabricación de partículas, tanto simples como compuestas (K. P. Yuet, D. K. Hwang, R. Haghgooie and P. S. Doyle. *Langmuir* (2010), 26, 6, 4281–4287).

Todas estas técnicas de autoensamblado tienen en común la obtención directa de grandes cantidades de partículas idénticas, de forma individualizada y a un bajo coste. El principal inconveniente que presentan estos métodos de fabricación de partículas es que para su funcionalización deben aplicarse métodos estrictamente químicos, pudiendo obtener así una funcionalización única (idéntica) y total en todas ellas, o bien una combinación de dos o más funcionalizaciones, mediante el uso de sustancias químicas siempre que no se afecten entre sí. Es un proceso difícil y de gran complejidad debido a las múltiples incompatibilidades que ello comporta (ni versatilidad ni discretización). Las partículas obtenidas por los métodos anteriormente descritos suelen emplearse en el campo de la farmacia y la biomedicina como sistemas de transporte de fármacos o "*drug delivery systems*" (Tasciotti E., Liu XW, Bhavane R., Plant K., Leonard A.D., Price B.K., Cheng M.M.C., Decuzzi P., Tour J.M., Robertson F. and Ferrari M. *Nature Nanotechnol.* (2008), 3, 3, 151-157) y como portadores o "*nanocarriers*" (D. Peer, J.M. Karp, S. Hong, O.C. Farokhzad, R. Margalit and R. Langer. *Nat. Nanotechnol.* (2007), 2, 751-760); aunque también son muy empleadas, en el caso de partículas magnéticas, como separadores magnéticos o "*magnetic separation bioprocesses*", mediante procesos de magneto- y electromagnetofóresis, así como para la investigación de nuevos materiales y compuestos.

Por otro lado, está el conjunto de técnicas de fabricación de matrices ordenadas de partículas, basadas en procesos de fabricación de micro- y nanoelectrónica. Estas técnicas, tanto las basadas en los procesos de fotolitografía convencional (M.-H. Wu and G. M. Whitesides. *Appl. Phys. Lett.*, (2001), 78, 16, 2273-2275) como las basadas en procesos conocidos como "*soft-lithography*" o litografía blanda (Y. N. Xia and G. M. Whitesides. *Angew. Chem., Int. Ed.* (1998), 37, 551-557), tales como el micromodelado o *micromolding*, la impresión por microcontacto o *microcontact printing* (MCP), entre otras, permiten también la producción simultánea de miles de unidades (concepto "*batch processing*"), de forma controlada y a bajo coste, pero con una alta adaptabilidad para el uso de materiales tan diversos como metales y polímeros, incluyendo un gran número de biomateriales, y la posibilidad de realizar combinaciones entre ellos. Estos procesos dotan a las partículas diseñadas de una gran versatilidad, tanto de forma como de dimensiones, pudiéndose obtener, de forma simultánea, distintos tipos de partículas. Aunque en algunos casos el proceso de fabricación de este tipo de partículas sea más complejo que los anteriormente mencionados, estas técnicas permiten la obtención de partículas con múltiples superficies, abriendo el abanico a gran variedad de posibles aplicaciones. Gracias a su localización ordenada y controlada en la superficie del sustrato donde se fabrican, estas partículas permiten aplicar distintos tipos de funcionalización en una misma partícula, de forma localizada dentro de la misma. Actualmente, las técnicas existentes para la separación de partículas, obtenidas por procesos litográficos, del sustrato de fabricación, concepto conocido como liberación o individualización de partículas, requieren la utilización de métodos basados en el uso de agentes químicos que puede ser agresivos para

las moléculas multiplexadas en su superficie, como es el caso de la "técnica de *Surface*" (E. Fernández-Rosas, R. Gómez, E. Ibáñez, L. Barrios, M. Duch, J. Esteve, C. Nogués and J. A. Plaza. *Small* (2009), 5, 21, 2433-2439), donde una capa sacrificial, situada entre la partícula y el sustrato, es atacada químicamente.

Los chips multiplexados (entendido como aquellos chips que reúnen en un único sustrato –partícula- varios tipos de canales susceptibles de proporcionar y recibir información diferente, por medio de cada una de las funcionalizaciones impresas en su superficie) compuestos por una matriz ordenada de elementos moleculares y con dimensiones en el orden de los centímetros, como por ejemplo los chips de ADN o "*DNA chips*", han sido ampliamente utilizados en campos como la medicina y la biología para identificación, cuantificación y determinación del funcionamiento de determinadas moléculas S. F. Kingsmore. *Nat. Rev. Drug. Discov* (2006), 5, 310-320). Para los casos en los cuales se requiere del análisis de pequeños volúmenes de muestras la solución tecnológica actual es la producción de suspensiones de partículas en las cuales cada elemento está comprendido por una subpoblación de partículas que se diferencian de los otros grupos por tener diferentes atributos anisótropos (forma, dimensiones, color, etc.). La falta de multiplexado en una misma partícula de las que contienen estas suspensiones, característica que sí ofrecen los chips multiplexados, constituye una limitación importante a la hora de analizar pequeños volúmenes (por ejemplo, el interior de una célula).

B. Ramana Murthy et al, Biosensors and Bioelectronics 24 (2008) 723-728 describen un método para obtener un array de nanopilar oligonucleotídico.

La presente invención recoge una nueva propuesta, basada en la fabricación de una matriz ordenada de micropartículas planares con multiplexado molecular en su superficie, de geometría y dimensiones variables en función de su aplicación final. La funcionalización de su superficie se puede realizar de manera controlada y ordenada con una gran variedad de moléculas simultáneamente, como por ejemplo proteínas y ADN. Las micropartículas se moldean y preparan sobre un sustrato y están sostenidas sobre el mismo gracias a un pie de sujeción que se graba debajo de ellas, pudiendo ser separadas (liberadas) por un método mecánico de ruptura controlada y en ausencia de técnicas químicas de liberación, gracias a la formación de este nuevo elemento estructural llamado "pie" de la micropartícula en el array.

Este pie, que es similar a una columna o pilar, ejerce de elemento de sujeción de dichas micropartículas que componen el array o matriz al sustrato durante los procesos de moldeo y multiplexado molecular en su superficie, y actúa a su vez como elemento concentrador de esfuerzos mecánicos, convirtiéndose así en el punto más débil de todo el conjunto. Esto permite que, en el caso de querer liberar las partículas, sea posible la aplicación de esfuerzos mecánicos direccionados para romper de forma controlada el pie, sin que las micropartículas ni las moléculas multiplexadas en su superficie se dañen porque no se emplean sustancias químicas de liberación que puedan afectar a la estructura o función de dichas moléculas. Es decir, además de poder obtener micropartículas funcionalizadas en superficie, a diferencia de otros métodos conocidos, es posible individualizar las micropartículas del array mediante un método no agresivo químicamente, es decir, que no requiere el empleo de agentes químicos que puedan dañar la integridad de la micropartícula ni que afecten a la funcionalización molecular realizada previamente. Una vez liberadas, dichas micropartículas, al igual que el array, son capaces de actuar como sensores o actuadores de distintas actividades, tanto químicas como biológicas, que se produzcan en el medio en el que se encuentren, como por ejemplo determinadas reacciones químicas o variaciones de parámetros físicos como son la temperatura y pH, entre otras.

Sumario de la invención

La invención que aquí se describe se refiere a un array de micropartículas planares con multiplexado de moléculas en su superficie preparadas a partir de un material originario depositado o crecido sobre un sustrato que hace de soporte, cuya misión es funcionar como detector, sensor y/o actuador molecular en un medio de muestra que puede ser tanto químico como biológico, después se produce la separación del sustrato aplicando cargas de ruptura mecánicas. Concretamente, el array se fabrica con tecnología de microelectrónica, y las micropartículas funcionalizadas que contiene se caracterizan por tener dimensiones que pueden estar comprendidas en el intervalo de 1 µm a 100 µm, según sea requerido en su aplicación final, siendo posible prepararlas sobre el sustrato en grandes cantidades, con formas y dimensiones bien definidas. Debido a su tamaño (micrométrico) y su funcionalización en superficie, el array de micropartículas obtenible a partir de este método presenta una gran versatilidad en lo que a aplicaciones concretas se refiere, pudiendo ser empleadas tanto en medios químicos como biológicos, siempre con objetivos científico-técnicos.

El pie que se graba debajo del material originario de la micropartícula (que corresponde a la parte superior del soporte) ejerce la función de elemento estructural, uniendo individualmente cada micropartícula al sustrato durante los procesos de fabricación y multiplexado molecular y permitiendo la localización de las micropartículas de forma ordenada en el sustrato. Además, gracias a la formación de este nuevo elemento estructural, las micropartículas pueden ser separadas del sustrato e individualizadas de forma controlada mediante la aplicación de esfuerzos mecánicos direccionados, como son los esfuerzos mecánicos transversales, un método no agresivo químicamente y por tanto que respeta la integridad de las moléculas multiplexadas en su superficie. Así, toda funcionalización previa realizada es preservada sin verse alterada, permitiendo la liberación de las micropartículas después de su

funcionalización.

La gran ventaja industrial de este método propuesto reside en la posibilidad de fabricar en serie micropartículas de superficie funcionalizada sobre un sustrato, concretamente sobre un pie que hace de soporte y que permite el uso de métodos de estampación en paralelo para la funcionalización molecular de todas las micropartículas simultáneamente, por ejemplo del mismo modo. El pie formado debajo del material de origen que da lugar a las micropartículas durante el proceso de fabricación permite conseguir su liberación o individualización por separación mecánica del pie mediante rotura del mismo. Debido a su propio diseño y geometría, que es semejante a una columna o pilar que sostiene la micropartícula, este pie se convierte en la zona más frágil de la estructura, actuando como concentrador de esfuerzos mecánicos y asegurando la zona de fractura en caso de que se desee la liberación de las micropartículas para su uso individual.

Idealmente el pie debe tener una sección variable (no constante), es decir, con dos zonas diferentes de tal forma que una de ellas es más estrecha, preferiblemente estando la zona más estrecha de la sección en el centro. De esta forma, el pie ofrece la resistencia necesaria para sostener la micropartícula durante el proceso de funcionalización, y a la vez presenta una zona más estrecha donde se concentran mayormente los esfuerzos mecánicos en el caso de desear su liberación controlada. En un caso particular, el pie puede tener también una sección constante siempre que ésta sea más pequeña que la sección de la propia micropartícula, preferiblemente menor o igual al 50 % del tamaño de la sección de la micropartícula.

Debido a su diseño y geometría, tanto el pie como las micropartículas del array pueden estar formados del mismo material, aunque es preferible que el pie esté fabricado con materiales frágiles y no dúctiles, lo que facilita aún más su ruptura controlada.

Por tanto, el primer objeto de la presente invención lo constituye el propio método de obtención de un array de partículas micrométricas planares funcionalizadas en superficie, método que comprende las siguientes etapas:

a) preparar una capa de un material de origen de las micropartículas (también denominada capa de estructuración) sobre un sustrato que sirve de soporte, típicamente una oblea de silicio, aunque puede ser cualquier otro material igualmente adecuado para este fin; dicha capa de material originario de las micropartículas puede ser de un material típico de la microelectrónica, como por ejemplo silicio policristalino, oxido de silicio, nitruro de silicio, oro, platino, aluminio, etc.;
b) dar forma a las micropartículas en la capa de estructuración previamente preparada sobre el soporte mediante técnicas habituales de la microelectrónica basadas en litografía, por las cuales se define la geometría y las dimensiones laterales, y técnicas de grabado con las que se define el espesor tras preparar la capa;
c) el punto clave del método es la formación de un pie en la parte superior del sustrato que se encuentra debajo de las micropartículas previamente moldeadas, de tal forma que cada pie sustenta una micropartícula. La formación del pie de cada micropartícula se realiza mediante grabado de dicha parte superior del sustrato, pudiendo dicho grabado realizarse mediante técnicas habituales de microelectrónica. De esta manera, se preparan los pies de las micropartículas suficientemente estables desde el punto de vista mecánico para sustentarlas durante la etapa posterior de funcionalización molecular en su superficie, pero suficientemente frágiles también para permitir en el caso deseado su ruptura de forma contralada, al aplicar fuerzas mecánicas direccionadas, que permiten la ruptura del pie y la liberación de la micropartícula del array. Por ello es recomendable que el pie esté fabricado de un material frágil como el silicio;
d) funcionalizar la superficie de las micropartículas que están sostenidas por los pies mediante al menos un componente molecular, preferentemente mediante un método que permita funcionalizar en paralelo un gran número de micropartículas, a modo de ejemplo: técnicas de litografía blanda como la impresión por microcontacto (*microcontact printing, MCP),* la nanolitografía por dip-pen *(dip-pen nanolithography, DPN),* la litografía por polymer-pen *(polymer-pen lithography, PPL*) o la litografía por nanoimpresión *(nano-imprint lithography, NIL)*; y
e) romper los pies que sustentan las micropartículas mediante la aplicación de cargas mecánicas de ruptura, para separar dichas micropartículas del sustrato e individualizarlas.

Básicamente, el sustrato que actúa de soporte para la fabricación de las micropartículas es recubierto de una capa que define el material primigenio de dichas micropartículas que se van a moldear posteriormente, y que puede ser seleccionado dentro del grupo de materiales compuesto por: silicio y sus derivados (óxido o nitruro de silicio, silicio policristalino), oro, platino, aluminio, cobre, níquel, cobalto o cromo; óxidos metálicos; y silicatos o siliciuros de metales compatibles como el de tantalio, hierro, o aluminio. Esta capa es estructurada o moldeada sobre el sustrato para definir la forma deseada de las micropartículas, y posteriormente se estructura o define el pie que está localizado debajo de las mismas.

El pie ejerce una doble función. Por un lado, mantiene unida la micropartícula al sustrato durante todo el proceso de fabricación de las mismas así como durante los subsiguientes pasos de funcionalización, asegurando su posición en todo momento. Por otro lado, al ser la parte más débil y frágil de toda la estructura, actúa como elemento concentrador de esfuerzos permitiendo su ruptura en el caso de que se desee separar o liberar las micropartículas de la matriz.

Tras preparar o moldear el pie de las micropartículas mediante grabado parcial (es decir, solo en parte o no toda la sección de forma constante, porque es preferible una forma de columna o pilar), se funcionaliza la superficie de dichas micropartículas con los diferentes elementos moleculares que se seleccionen (como por ejemplo, compuestos orgánicos, cadenas poliméricas, proteínas, ADN, etc.). Esta acción se realiza en paralelo, aunque dado que el sustrato contiene varias micropartículas en su superficie, la funcionalización en paralelo puede repetirse en serie para dotar a las partículas de más de una funcionalización, o bien es posible repetir la impresión de la misma sustancia varias veces. Así, gracias a la funcionalización se consigue el multiplexado de las micropartículas, de tal forma que en la superficie de cada una de ellas se localizan ordenadamente un único elemento molecular impreso más de una vez o más de un elemento molecular diferente, a diferencia de los chips planares de matrices moleculares, con dimensiones en el orden de los centímetros, que no permiten el análisis de pequeños volúmenes, como puede ser, por ejemplo, una célula de una muestra *ex vivo* y/o *in vitro,* y a diferencia de las suspensiones de subpoblaciones de micro-nanopartículas conocidas donde cada subpoblación presenta un único elemento molecular pero que no permiten el análisis multiplexado en una misma micropartícula. La realización de un array de micropartículas multifuncionalizadas molecularmente en el orden de las micras, como es el caso de la presente invención, permite además el análisis molecular multiplexado en pequeños volúmenes.

El array de micropartículas, tras su funcionalización, puede ser almacenado en seco.

Un segundo objeto de la presente invención se refiere a las propias micropartículas que pueden ser separadas de la matriz mediante un método de ruptura mecánica controlada del pie. De manera preferible, se puede preparar una suspensión de estas micropartículas.

Las micropartículas que son funcionalizadas y liberadas del soporte, y la suspensión que se puede preparar con las micropartículas pueden actuar gracias a sus propiedades como detectores, sensores y/o actuadores moleculares. O dicho de otro modo, la invención cubre también como un tercer objeto el uso de estos productos como sensores, actuadores o detectores de parámetros físicos, químicos y biológicos simultáneamente o por separado en un medio o muestra.

La presente invención se basa en la observación relativa del array de las micropartículas, las cuales son fabricadas sobre el soporte con dimensiones micrométricas (dimensiones físicas laterales comprendidas preferentemente entre 1 µm y 100 µm, y preferiblemente con un espesor de entre los 20 nm y las 5 µm) y debidamente funcionalizadas molecularmente mediante determinados rasgos trazados de forma selectiva y controlada en su superficie.

Descripción de las figuras

Figura 1: Representación de dos posibles configuraciones de micropartículas en el array obtenido mediante el método descrito, una con forma de paralelepípedo de anchura A, longitud L y espesor E, y la otra con forma circular o de disco, de diámetro D y espesor E, de acuerdo con la invención, donde (1) representa el material que hace de pie, (2) la micropartícula y el sustrato (4). 1.A muestra las vistas en perspectiva y 1.B muestra la vista de una sección.

Figura 2: Representación de una posible configuración de micropartícula sobre el soporte en el array, donde su superficie superior ha sido recubierta, de manera localizada, con diferentes elementos moleculares, diseñadas para su funcionalización (3). 2.A muestra una vista de una sección y 2.B muestra una vista en perspectiva.

Figura 3: Esquema de un proceso preferido de fabricación del array de micropartículas basado en tecnología microelectrónica, procesos fotolitográficos y ataques de capas, de acuerdo con el Ejemplo 1, donde tras obtener la matriz de micropartículas éstas son liberadas y preparadas en suspensión. Sección recta que muestra el proceso de fabricación de una micropartícula, con un sustrato principalmente oblea de silicio (4) que actúa de soporte, sobre el cual se tiene una capa (5), típicamente de silicio policristalino, óxido de silicio, nitruro de silicio, oro, platino, aluminio, cromo, que constituyó el material primigenio que dio lugar a las micropartículas (2) (Fig. 3.A). Para definir las micropartículas, se depositó sobre dicha capa de material primigenio de las micropartículas una capa de fotoresina (6) (Fig. 3.B), la cual fue a continuación eliminada parcialmente de determinadas zonas (7) formando una capa de fotoresina estructurada (8) que contenía la geometría y dimensiones laterales de las micropartículas a fabricar (Fig. 3.C). Dichas micropartículas se formaron (estructuraron) mediante un ataque a la capa de material primigenio de las mismas (5) en las zonas descubiertas (7) donde previamente se había eliminado la capa de fotoresina (6), formando así el cuerpo de la/s micropartícula/s (2), (Fig. 3.D). Posteriormente se realizó un grabado del sustrato de silicio (4) inmediatamente por debajo de las micropartículas (2) para formar el pie (1) (Fig. 3.E). La fotoresina remanente (8) fue eliminada de la parte superior de las micropartículas (2). Posteriormente se procedió a la funcionalización molecular de las micropartículas con más de un elemento molecular (3) (Fig. 3.F). Finalmente, las micropartículas (2) funcionalizadas fueron liberadas del sustrato (4) mediante ruptura controlada, y fueron recolectadas en un medio acuoso, en este ejemplo, agua desmineralizada previamente filtrada, obteniéndose la suspensión de las micropartículas (9).

Figura 4: Imagen de microscopía electrónica de barrido en la que se muestra un ejemplo de fabricación del array de micropartículas de óxido de silicio en forma de paralelepípedo (dimensiones de 3 µm x 3 µm x1 µm), de acuerdo con el Ejemplo 1 – Apartado A, en la que se distinguen perfectamente las micropartículas dispuestas en array ancladas en el sustrato mediante un pie. Barra de escala = 5 µm.

Figura 5: Imagen óptica de fluorescencia en la que se muestra un ejemplo de funcionalización de la superficie de las micropartículas mediante la técnica de *polymer-pen lithography*, de acuerdo con el Ejemplo 1 – Apartado B. En este caso, se muestran múltiples impresiones de dos tintas distintas, lectina WGA conjugada con el fluoróforo *Streptavidin Texas Red*® (rojo, tinta nombrada con la letra B en la figura y visualizada mediante sombreados grisáceos más oscuros sobre fondo negro) y la proteína BSA conjugada con el fluoróforo *Neutravidin Oregon Green*® (verde, tinta nombrada con la letra A en la figura y visualizada mediante sombreados grisáceos más claros), antes de ser funcionalizada con el anticuerpo *Goat Anti-Rabbit* IgG conjugado con el marcador AMCA y una tercera tinta (azul, no mostrada en la figura). En este caso, los motivos impresos fueron puntos. Barra de escala = 10 µm.

Figura 6: Imagen de microscopía electrónica de barrido en la que se muestran varias micropartículas después de su liberación mecánica del sustrato, mediante la fractura mecánica controlada de los pies de acuerdo con el Ejemplo 1 – Apartado C. Barra de escala = 5 µm.

Descripción detallada y modo de realización de la invención

Como se ha dicho en el apartado anterior, el pie se fabrica mediante moldeado por grabado de la parte superior del sustrato, que está en contacto directo con la parte inferior de la capa de material originario de las micropartículas. En una realización particular de la invención, el sustrato está formado por un único material, siendo más preferiblemente una oblea de silicio, aunque puede ser otro tipo de sustrato adecuado que dé soporte mecánico para la fabricación de las micropartículas, como por ejemplo el vidrio borosilicatado (comúnmente conocido por el nombre comercial de *Pyrex* o *Duran*) o el vidrio de silicato sodocálcico, más conocido por su término en inglés *soda-lime,* entre otros. No obstante, la invención no se limita únicamente a estos materiales del soporte, ya que cualquier entendido conoce qué tipos de materiales son adecuados y pueden ejercer la función pretendida; básicamente, son todos aquellos que cumplen las siguientes condiciones:

- ser resistentes a los procesos térmicos de depósito, evaporación y crecimiento de capas;
- ser estables a temperatura ambiente;
- ser resistentes a ciertos agentes químicos (compuestos en fase líquida o gas) para permitir la estructuración/grabado/procesado en general de las capas que hay en ellos sin que el propio sustrato se vea afectado (aunque a veces, es necesario protegerlos pues los agentes químicos suelen ser muy agresivos); y
- permitir su propia estructuración/grabado (parcial o total). Este sería el caso en que el pie de las micropartículas se fabrica a partir del mismo sustrato.

En definitiva, el sustrato debe ejercer principalmente la función de soporte, y por tanto debe ser suficientemente rígido para soportar las estructuras y debe mantener su integridad frente al procesado de éstas sin romperse. Y además, en esta realización preferida, debe permitir también la formación del pie en su parte superior, que se encuentra en contacto con el material originario de las micropartículas. En un caso particular de la invención, el soporte o sustrato puede ser del mismo material que se emplee para la capa originaria de las micropartículas. Por ejemplo, pueden fabricarse micropartículas sobre un sustrato que es una oblea de silicio con un pie de silicio (es decir, grabado en el mismo sustrato) donde las partículas han sido moldeadas en una capa de polisilicio; esto permite la posible realización posterior de procesos térmicos de dopado para dotar a las micropartículas de cargas.

En otra realización particular de la invención, alternativa a la anterior, el sustrato está formado por al menos dos materiales, de tal forma que contiene un segundo material en su estructura que se localiza en la parte superior en forma de capa, donde ha sido depositado o crecido. De esta forma, el pie puede moldearse por grabado de este segundo material contenido la parte superior del sustrato. Si el sustrato contiene un segundo material en la parte superior de su estructura, donde se van a grabar los pies, éste puede ser el mismo material que el usado para la fabricación de las propias micropartículas o bien un material distinto, preferiblemente más frágil y menos dúctil que la capa de estructuración para garantizar así su correcto comportamiento frente a los posteriores esfuerzos de ruptura, como es el silicio policristalino. Por ejemplo, es posible usar un sustrato de silicio (oblea) únicamente como soporte de la capa que va a dar origen al pie y a las micropartículas, sin que intervenga para nada en la fabricación de los dispositivos que se definen en él. El silicio es muy aconsejable, aunque no el único, porque es el material por excelencia en la microelectrónica, siendo compatible con la mayoría de procesos y resistente a cambios de temperatura y agentes químicos.

Del mismo modo, la preparación en la etapa a) de la capa de estructuración, o lo que es lo mismo la capa que constituye el material que da lugar a las micropartículas, puede llevarse a cabo mediante deposición o mediante crecimiento sobre el propio sustrato. Los materiales de los que puede estar hecha la capa de estructuración pueden ser seleccionados dentro del grupo compuesto por: silicio y sus derivados (óxido o nitruro de silicio, silicio policristalino), oro, platino, aluminio, cobre, níquel, cobalto, cromo, óxidos metálicos y silicatos o siliciuros de metales compatibles como el de tantalio, hierro o aluminio. Esta capa puede ser depositada o se puede hacer crecer por cualquier método utilizado en microelectrónica: crecimiento térmico, deposito químico en fase de vapor, pulverización catódica (*sputtering*), evaporación u otros métodos comunes actualmente. El método seleccionado para ello vendrá determinado por la elección de los materiales a utilizar.

Para garantizar un buen comportamiento mecánico de toda la estructura (micropartícula más pie), es preferible que

el material elegido para la capa de estructuración y el material del sustrato que se va a grabar en forma de pie, ya sea el sustrato de un material o que contiene un segundo material en su parte superior, tengan una relación entre sus límites de ruptura igual o superior a uno ($L_{rupt_part}/L_{rupt_pie} \geq 1$). De esta manera, se garantiza no solo la sujeción de las partículas durante su funcionalización, sino también que el pie sea más frágil que la micropartícula y por tanto, sea más vulnerable a la ruptura frente a la aplicación de esfuerzos mecánicos en caso de que se desee la liberación controlada de dichas micropartículas del sustrato (facilita su liberación). No obstante, si la aplicación final lo requiere, la capa de estructuración y el segundo material que contiene el sustrato en su parte superior pueden estar fabricados del mismo material, ya que su propio diseño y geometría así lo permiten.

El método de fabricación de las micropartículas basado en tecnología microelectrónica permite la definición de sus dimensiones mediante el uso de técnicas fotolitográficas preferentemente, técnicas de uso común en el campo de la microelectrónica. La utilización de técnicas fotolitográficas permite la formación de micropartículas en formas y dimensiones específicas, elegidas bajo un criterio técnico, preferiblemente idénticas entre sí, aunque esta técnica también permite la fabricación de grupos de micropartículas idénticas entre sí pero distintas a otros grupos del mismo array. Así, las partículas micrométricas del array obtenido mediante el método descrito pueden presentar preferentemente dimensiones comprendidas entre 1 µm a 100 µm, incluidos ambos límite en el plano de la micropartícula. También preferentemente, las micropartículas pueden tener un espesor comprendido entre los 20 nm y las 5 µm, incluidos ambos límites. Las micropartículas pueden tener geometrías variadas, como por ejemplo, forma de paralelepípedo o circular, sin que estas formas sean limitantes de la invención.

La definición de la forma del pie debajo de la micropartícula se puede realizar por cualquier técnica de grabado que permita la eliminación parcial, justo debajo de cada micropartícula, del material que forma dicho pie, ya sea el único material del que consta el sustrato o del segundo material que dicho sustrato puede contener en su parte superior. De este modo, se consigue dotar a dicho elemento de una forma preferida tipo columna o pilar, con una sección que presenta dos partes diferenciadas, una más estrecha que la otra para forzar la concentración de estreses mecánicos, o con una sección uniforme en toda su extensión y a la vez más pequeña que la de la propia micropartícula, preferiblemente inferior o igual al 50 % del tamaño de la sección de ésta. La técnica usada para la formación de los pies debe ser preferiblemente un ataque físico (ataque seco reactivo), o bien un ataque químico (húmedo), que presente un ataque lateral, en función del material o materiales presentes en las estructuras (tanto el que forma la micropartícula como el pie) y que a su vez permitirán obtener un pie de sección constante o variable según convenga por la aplicación requerida.

A su vez, las micropartículas pueden contener una o más clases de moléculas organizadas en monocapas en zonas localizadas, que les permitan tener varias utilidades simultáneamente, y a su vez, realizar determinadas medidas u observaciones de uno o varios parámetros y/o actividades en el interior del medio en que se encuentren. Más concretamente, dicha funcionalización química puede comprender varias moléculas de origen natural o sintético, con actividad química y/o biológica, que incluyan, pero no estén restringidos a, compuestos orgánicos sencillos, polímeros, péptidos, proteínas, nucleótidos y ácidos nucleicos. Las moléculas se pueden depositar sobre la cara superior de las micropartículas preferiblemente por técnicas del campo de la impresión de moléculas a la escala micro y nanométricas como puede ser *microcontact printing (*impresión por microcontacto), *dip-pen nanolithography (nanolitografía por dip-pen) o el polymer-pen lithography (litografía por polymer pen)*.

Tras la etapa d) de funcionalización de la superficie de las micropartículas, el método descrito comprende además:
e) proceder a la ruptura controlada de los pies que soportan las micropartículas mediante la aplicación de cargas mecánicas direccionadas, para separarlas del sustrato (individualizarlas). Estas cargas se pueden aplicar mediante técnicas diversas, como son: raspado del pie; aplicación de una sustancia adhesiva en la superficie ya funcionalizada de las micropartículas y posterior arrancado de las mismas, con disolución posterior del adhesivo en medios que no afecten a la funcionalizaciones moleculares; criofractura, etc.

De esta forma, mediante la aplicación de esfuerzos mecánicos direccionados es posible romper los pies de forma controlada, por ejemplo con un corte limpio, para liberar las micropartículas del sustrato del array sin que éstas se rompan o dañen, preservando intacta la funcionalización aplicada previamente a las mismas por tratarse de un método completamente físico, no agresivo químicamente.

De manera preferida, la ruptura mecánica de los pies para la individualización de las micropartículas que estos sostienen se puede llevar a cabo mediante un corte direccionado, aplicando una fuerza lateral controlada suficiente para romper el pie. Dicho corte puede realizarse con una micro-herramienta diseñada y adecuada para tal fin, que comprende una espátula de punta plana y afilada de dimensiones micrométricas. En otra realización preferida, la ruptura mecánica se puede realizar mediante criofractura, con la congelación de toda la estructura del array (el sustrato con micropartículas funcionalizadas y sus respectivos pies), que comprende: humectar el sustrato con una solución, como puede ser una solución tamponada de fosfato salino (PBS) con un contenido del 0,05 % de solución Tween 20 (PBS-T); sumergir toda la estructura en nitrógeno líquido hasta la congelación de la solución; volver a humectar del mismo modo y volver a congelar con nitrógeno líquido; para finalmente ejercer una fuerza o movimiento de palanca con una pinza o elemento similar hasta la ruptura del pie. La solución congelada que contiene las micropartículas se deja fundir a temperatura ambiente para su liberación. En otra realización preferida, se puede depositar sobre las micropartículas funcionalizadas químicamente una sustancia adhesiva, como puede

ser una capa de una matriz polimérica como es el *Fluoromount*®, en fase líquida para permitir su entrada incluso por debajo de las micropartículas, que tras polimerizarse, se endurece parcialmente. Esta substancia es un medio de montaje biológico de base acuosa muy comúnmente utilizado para la cobertura de tejidos que contienen marcadores fluorescentes, para posterior inspección en microscopios ópticos como confocales y microscopios de fluorescencia, incluso en microscopios electrónicos de transmisión y barrido (*SEM* y *TEM*). En ese momento, dicha capa de la matriz polimérica se puede separar manualmente del sustrato llevándose las micropartículas en su seno y rompiendo los pies al separarlas, tras lo cual esta capa endurecida se puede disolver en algún medio que no afecte a la funcionalización química, por ejemplo en medio acuoso, para eliminarla de la superficie de las micropartículas.

Asimismo, en una versión más preferida de la realización anterior, el método comprende además:
f) recolectar las micropartículas funcionalizadas y separadas (o individualizadas) en un medio de suspensión, pudiendo ser dicho medio cualquiera que no afecte a las funcionalizaciones químicas.

Así, las micropartículas, una vez separadas del sustrato por medios mecánicos, se pueden mantener para su almacenamiento en una suspensión en un medio acuoso que puede ser ácido, neutro o básico indistintamente, según sea requerido por el tipo de funcionalización realizada.

Gracias al método de fabricación, es posible la obtención de un array de micropartículas planares con multiplexado molecular en superficie. Asimismo, en el caso particular del método en que se rompen mecánicamente los pies de la estructura, se consigue la obtención de estas mismas micropartículas funcionalizadas, pero individualizadas. En otro caso más preferido, se consigue una suspensión de estas micropartículas, según lo comentado anteriormente. Cualquiera de estos productos, array, micropartícula/s y suspensión de las micropartículas se puede utilizar para analizar, a modo de ejemplo, “parámetros químicos”, que son todas aquellas magnitudes químicas medibles como por ejemplo el pH o el potencial *redox* (reducción-oxidación). Aún más, puede emplearse para la medida simultánea de varios "parámetros biológicos", refiriéndose así a cualquier magnitud que ponga en evidencia la presencia de determinados compuestos biológicos, o bien su acción dentro del medio en que se encuentren las micropartículas. Dichos parámetros son tales como la concentración de iones en solución, la actividad de una determinada enzima, la presencia de proteínas y/o ligandos, incluso el estudio de ADN, entre otros. Estos parámetros en un medio de muestra se pueden medir a través de la señal emitida por una o más de las micropartículas del array, por una o más micropartículas liberadas e individualizadas o por una o más de las micropartículas individualizadas y en suspensión que se añade al medio de muestra. El medio de muestra en el que se puede utilizar el array, la o las micropartículas individualizadas o la suspensión de ellas como sensor, actuador o similar, puede ser cualquier medio químico o biológico, por ejemplo una muestra *in vitro* de células. De hecho, una única célula puede ser un medio de muestra adecuado en el que medir determinados parámetros gracias a la funcionalización de las micropartículas, por lo que en este caso se puede separar una micropartícula del array para introducirla en la célula.

Es preciso comentar aquí que si el array, las micropartículas individualizadas o la suspensión de micropartículas se utilizasen como actuadores, éstas también pueden servir en el caso más preferido para la vehiculización de sustancias, como por ejemplo fármacos o determinados reactivos. Así, en algunos de los ejemplos de uso del array o de sus micropartículas una vez individualizadas por los métodos anteriormente descritos, cabe destacar que pueden emplearse en el campo de la farmacia y la biomedicina como sistemas de transporte de fármacos o *drug delivery systems*.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Obtención de un array de micropartículas planares, funcionalizadas cada una de las ellas con tres proteínas distintas y liberación de las micropartículas funcionalizadas para fabricar una suspensión obtenidas por el método propuesto en la presente invención.

El objetivo de este ejemplo es demostrar la posibilidad de fabricar un array de micropartículas planares, con dimensiones 3 µm x 3 µm x 1 µm funcionalizadas con tres tipos de moléculas diferentes. En este caso particular el método de colocación de las moléculas sobre la superficie planar se basa en la técnica de litografía por polymer-pen, *polymer-pen lithography.* Mediante esta técnica se han impreso tres proteínas distintas.

A- Fabricación de las micropartículas.

Para fabricar las micropartículas se tomó una oblea de silicio monocristalino con orientación cristalográfica (100) de un diámetro de 100 mm y un espesor de 525 µm. Sobre ella se creció térmicamente a 1100ºC un óxido de silicio térmico. Este material crecido se utilizó para la estructuración o moldeo posterior de las micropartículas. A continuación, y tal cómo se ha expuesto en los párrafos de la Descripción Detallada, se realizó el proceso fotolitográfico, esto es, la definición de las estructuras de las micropartículas. Para ello, se depositó sobre la oblea 1.2 µm de fotorresina positiva (HiPR 6512). Utilizando como máscara un retículo de vidrio sobre el cual estaba definida en cromo la geometría de las micropartículas, la resina se irradió con luz monocromática (longitud de onda 435 nm). Para el caso concreto de este Ejemplo de la Invención, se dispuso de formas geométricas cuadradas en el plano, de 3 µm de lado y separadas 3 µm entre sí. Tras irradiar la fotorresina durante 5 a 8,5 s, ésta se eliminó parcialmente en una disolución de revelador ODP 462 de tal manera que solo quedó resina sobre las zonas de la

capa de óxido de silicio que definieron después las micropartículas. Posteriormente, la resina remanente se recoció a 200ºC durante 30 min para aumentar su resistencia frente al ataque posterior. El proceso siguiente consistió en la realización de un ataque vertical a toda la superficie, con la finalidad de grabar la capa de óxido de silicio en aquellos lugares que no estaban protegidos por la resina. Para ello se utilizó un equipo de grabado mediante iones reactivos (*reactive ion etching*) seco usando una mezcla de C_2H_6 y CHF_3. Este ataque finalizó al alcanzar la oblea de silicio. Después de este paso del proceso, las micropartículas estaban ya bien definidas pero todavía unidas a la oblea de silicio. En la siguiente etapa del proceso de fabricación se realizó un ataque isótropo de la oblea de silicio, usando como máscara las estructuras de óxido de silicio junto con la capa de resina remanente, en un equipo de proceso de grabado profundo mediante iones reactivos DRIE (*Deep Reactive Ion Etching*). Para ello se utilizaron los gases SF_6 y C_4F_8. Este proceso atacó lateralmente 1,3 µm, desde todas las direcciones, el silicio situado debajo de las micropartículas de óxido silicio para la formación de los pies que mantuvieron unidas las micropartículas a la oblea de silicio durante el proceso de funcionalización química. Finalmente, se procedió a eliminar la fotorresina que se utilizó como máscara hasta dejar la superficie de las micropartículas limpia de compuestos orgánicos, quedando las micropartículas listas para su funcionalización molecular y posterior ruptura para recolectarlas y suspenderlas.

B- Funcionalización de la superficie de las micropartículas

Como ejemplo de funcionalización de la superficie de las micropartículas anteriormente descritas, se procedió con la aplicación de la técnica denominada *polymer-pen lithography.* Esta técnica (Fengwei Huo, Zijian Zheng, Gengfeng Zheng, Louise R. Giam, Hua Zhang and Chad A. Mirkin, *Science* (2008), 321, 1658-1660) combina la posibilidad de impresión o ensamblado de monocapas moleculares en una gran superficie, característica de la técnica de *microcontact printing* o impresión por microcontacto, con la precisión de la impresión individualizada mediante la técnica de nanolitografía por *dip-pen* o *Dip-Pen Nanolithography*.

Esta técnica requirió previamente de la fabricación de un molde o sello, llamado *stamp*, de material polimérico blando para transferir las moléculas a la superficie de la muestra. En este ejemplo de realización, se usó polidimetilsiloxano (PDMS), una silicona orgánica de base polimérica en estado líquido, cuyos componentes (un agente curante y el elastómero base) se mezclan en una proporción de 10:1 en peso y se curan a una temperatura entre 60ºC y 100ºC durante un tiempo que puede oscilar entre los 45 min y los 120 min, en función de la dureza deseada. Para la fabricación del molde para el sello de PDMS, se utilizó otra oblea de silicio donde se crece térmicamente a 1100ºC una capa de 1 µm de óxido de silicio. Se realizó un proceso de fotolitografía como el descrito anteriormente pero con una máscara invertida a la utilizada para definir las micropartículas (donde antes quedaba resina ahora no, y viceversa). Al igual que en el caso anterior se procedió al grabado de la capa de óxido de silicio a través de la máscara existente y posteriormente se eliminó la resina remanente. Una vez en este estado, se hizo un ataque anisótropo en KOH, con el cual se definieron unas pirámides invertidas en las zonas donde no había óxido de silicio. Estas pirámides permitieron la obtención posterior de las puntas de polímero. Gracias a la utilización de la misma máscara pero invertida se consiguió fabricar una punta de polímero para cada micropartícula. Por tanto en este ejemplo concreto se definió una matriz de pirámides invertidas de base cuadrada, de 3 µm por 3 µm, separadas 3 µm, de 2,12 µm de profundidad. Una vez obtenido el molde, se hizo un tratamiento superficial con el fluorosilano tricloro-1,1,2,2-tetrahidroperfluorooctilsilano al 97 %, para evitar la adherencia del polímero con el molde. En este estado se depositó PDMS líquido sobre este molde y tras su curado, se retiró el sello de PDMS.

Este sello fue usado para la transferencia de las moléculas adsorbidas a la punta de las pirámides sobre las superficies de las micropartículas. Para poner las moléculas sobre el molde de PDMS se utilizaron las llamadas tintas. Estas tintas son disoluciones que pueden contener cualquier tipo de sustancia que se desee imprimir; desde moléculas orgánicas, como por ejemplo marcadores fluorescentes o fluoróforos, como también biomoléculas como monocadenas de ADN, proteínas, etc., en función de su posterior aplicación. En el caso de este ejemplo de realización, se utilizaron tres tipos de tintas distintas: i) la lectina WGA (*Wheat germ agglutinin)* conjugada con el marcador fluorescente *Streptavidin Texas Red*® (SAV-TR) en rojo; ii) la proteína BSA (*Bovine serum albumin*) conjugada con el marcador fluorescente *Neutravidin OregonGreen*® (NAV-OG) en verde; iii) el anticuerpo *Goat Anti-Rabbit* IgG conjugado con el marcador AMCA (Ácido 7-amino-4-metil-3-cumarinilacético) en azul, respectivamente. Como control de proceso y para la visualización de los resultados obtenidos, se utilizó un microscopio de fluorescencia.

C- Liberación mecánica de las micropartículas previamente funcionalizadas mediante fractura mecánica controlada.

Para liberar las micropartículas impresas de la oblea de silicio se depositó una gota de medio de montaje Fluoromount® sobre la oblea, formando una capa que cubrió homogéneamente las micropartículas de la oblea. Se dejó que el medio polimerizara a temperatura ambiente durante 1 h, creando una capa sólida que envolvía a las micropartículas. Esta capa se separó mecánicamente de la oblea, llevándose consigo las micropartículas que se habían roto por los pies. Este método evitó el deterioro de las moléculas previamente impresas porque el medio era químicamente inerte.

La capa polimerizada y separada de la oblea con las micropartículas separadas pudo almacenarse en este estado, para su uso posterior en suspensión. Para obtener las micropartículas en suspensión, se disolvió la capa separada en un medio acuoso, como por ejemplo, agua desmineralizada o soluciones tamponadas.

Ejemplo 2: Reconocimiento molecular de proteínas: demostración del uso de la suspensión de micropartículas con multiplexado molecular preparada en el Ejemplo 1 como sensor y/o actuador.

Para demostrar que las moléculas funcionalizadas en la superficie de las micropartículas siguen siendo activas (mantienen su integridad y funcionalidad y por tanto, son capaces de reaccionar con distintos elementos del medio) después de ser inmovilizadas y una vez las micropartículas se han liberado del sustrato del array mediante la ruptura controlada de los pies, se procedió a realizar un ensayo de afinidad de anticuerpos (*antibody binding assay*). Para tal ensayo se escogieron como anticuerpo primario el *Goat anti-WGA IgG* y como anticuerpo secundario, el *anti-Goat IgG (H+L),* conjugado con el marcador fluorescente AMCA (Ácido 7-amino-4-metil-3-cumarinilacético) en azul. Estos anticuerpos se incorporaron ordenadamente (en primer lugar el anticuerpo primario y después el secundario) en un medio acuoso, siguiendo los procedimientos estándar de estos ensayos, donde previamente se había incorporado la suspensión de micropartículas, dando lugar al reconocimiento de las proteínas por parte del anticuerpo primario y a la consiguiente unión de ambas moléculas (anticuerpos primario y secundario) a dichas proteínas.

Como resultado, se percibieron las esperadas sumas de emisiones de fluorescencia de las proteínas previamente impresas en las micropartículas debido a la correcta adición de emisiones de los marcadores fluorescentes presentes tanto en las proteínas como en los anticuerpos; cambios perfectamente visibles mediante un microscopio convencional de fluorescencia y que demuestra que los centros de reconocimiento molecular de las proteínas siguen funcionales. Dichos cambios fueron los siguientes:

a) la WGA conjugada con SAV-TR que inicialmente emitía una señal de fluorescencia en rojo, cambió a magenta,
b) la proteína BSA conjugada con NAV-OG que inicialmente emitía una señal de fluorescencia en verde, cambió a cian, y
c) el anticuerpo *Goat Anti-Rabbit* IgG conjugado con AMCA que inicialmente emitía señal de fluorescencia en azul, siguió emitiendo en dicho color.

Como control de la funcionalidad del sistema multiplexado, dicho inmunoensayo se realizó con éxito con el array fabricado, es decir, entre los pasos B y C del Ejemplo 1 de realización (después de la fabricación y funcionalización de las micropartículas y antes de su liberación del sustrato), para demostrar que el proceso de multiplexado de moléculas mediante la técnica de litografía por *polymer-pen* seguida del sistema de liberación mecánica de las micropartículas no afectó a la correcta actividad de las moléculas.

REIVINDICACIONES

1. Un método de obtención de micropartículas planares funcionalizadas en superficie, que comprende dicho método las siguientes etapas:

a) preparar una capa de estructuración de un material originario de las micropartículas sobre un sustrato que hace de soporte;
b) dar forma a las micropartículas en la capa de estructuración mediante una técnica microelectrónica de litografía que da forma a la geometría y las dimensiones laterales, y una técnica de grabado con la que se define el espesor de las micropartículas;
c) formar un pie en la parte superior del sustrato que se encuentra debajo de la capa de estructuración para sustentar cada micropartícula, mediante técnicas de grabado;
d) funcionalizar químicamente la superficie de las micropartículas que están sostenidas sobre el sustrato por los pies, mediante uno o más componentes moleculares; y
e) romper los pies que sustentan las micropartículas mediante la aplicación de cargas mecánicas de ruptura, para separar dichas micropartículas del sustrato e individualizarlas.

2. El método de la reivindicación anterior, donde el sustrato está formado:

- por un único material, siendo dicho material una oblea de silicio; o
- por dos materiales, conteniendo un segundo material en forma de capa que se localiza en la parte superior del sustrato, debajo de la capa de estructuración de las micropartículas.

3. El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la capa de estructuración de la micropartícula es un material seleccionado del grupo que consiste en silicio policristalino, óxido de silicio, nitruro seleccionado del grupo que consiste en silicio, oro, platino, cobre, aluminio, níquel, cobalto, cromo, óxidos metálicos, silicatos de tantalio, hierro y aluminio; y siliciuro seleccionado del grupo que consiste en siliciuro de tantalio, siliciuro de hierro y siliciuro de aluminio; y donde el material originario de la capa de estructuración y la parte superior del sustrato donde son grabados los pies tienen una relación entre sus límites de ruptura igual o superior a 1.

4. El método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la formación del pie de cada micropartícula en la etapa c) se realiza grabando parcialmente la parte superior del sustrato que se encuentra debajo de las micropartículas mediante una técnica microelectrónica, con una sección variable del pie de dos partes diferentes donde una parte es más estrecha que la otra, o con una sección constante del pie que es menor o igual al 50 % de la sección de la micropartícula, a la cual se le dará forma en la etapa b) mediante técnicas fotolitográficas.

5. El método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde se da forma a las micropartículas:

- todas con la misma forma y tamaño; o
- en dos o más grupos de forma y tamaño diferente.

6. El método según una de las reivindicaciones anteriores, donde la funcionalización de la etapa d) se lleva a cabo mediante una técnica de impresión de moléculas seleccionada del grupo que consiste en impresión por microcontacto, nanolitografía por *dip-pen* y técnica de litografía por *polymer-pen*.

7. El método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el componente molecular es una molécula con actividad química y/o biológica, seleccionada del grupo que consiste en compuestos orgánicos, polímeros, péptidos, proteínas, nucleótidos, ácidos nucleicos y cualquier combinación de los mismos.

8. El método según una de las reivindicaciones anteriores, donde la superficie de cada micropartícula es funcionalizada en la etapa d) con más de un elemento molecular diferente, o con un único elemento molecular más de una vez.

9. El método según la reivindicación anterior, donde la carga mecánica de ruptura controlada del pie de cada micropartícula se aplica mediante una técnica seleccionada del grupo que consiste en raspado, corte, criofractura y aplicación de un material adhesivo sobre la superficie ya funcionalizada de las micropartículas y su posterior arrancado, con disolución del adhesivo en medios que no afectan a la funcionalización molecular de la micropartícula.

10. El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además:
f) recolectar las micropartículas individualizadas en un medio de suspensión.

11. Una micropartícula planar con multiplexado molecular en superficie individualizada y liberada mediante el método definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, o una suspensión de micropartículas obtenible mediante el método definido en la reivindicación 10.

12. La micropartícula planar con multiplexado molecular en superficie individualizada según la reivindicación anterior, donde la micropartícula presenta un tamaño de plano comprendido entre 1 µm y 100 µm y un espesor comprendido entre 20 nm y 5 µm.

13. Un dispositivo sensor, detector y/o actuador molecular de parámetros físicos, químicos y/o biológicos en un medio de muestra, **caracterizado por que** comprende una o más micropartículas individualizadas o una suspensión como las definidas en una cualquiera de las reivindicaciones 11 o 12.

14. Un uso de una o más micropartículas individualizadas o una suspensión como las definidas en una cualquiera de las reivindicaciones 11 o 12 para la vehiculización de fármacos o agentes reactivos.

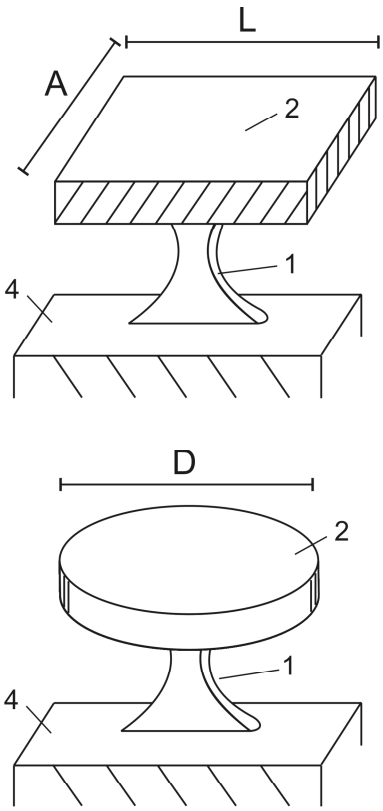


Figura 1.A

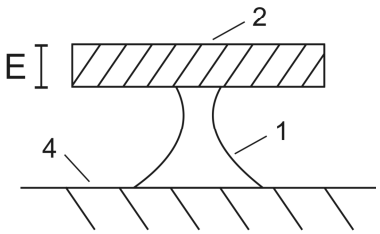


Figura 1.B

FIG. 1

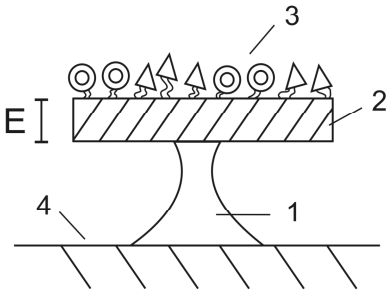


Figura 2.A

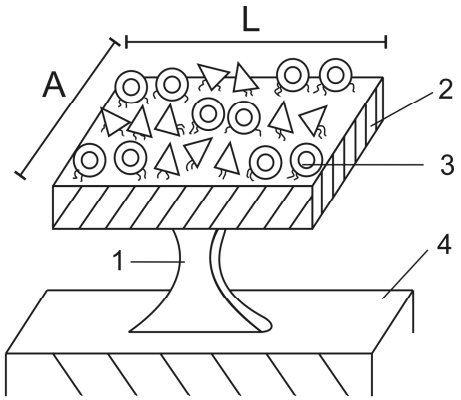


Figura 2.B

FIG. 2

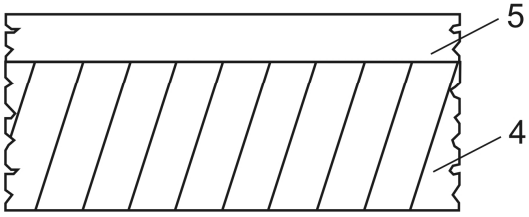


Figura 3.A

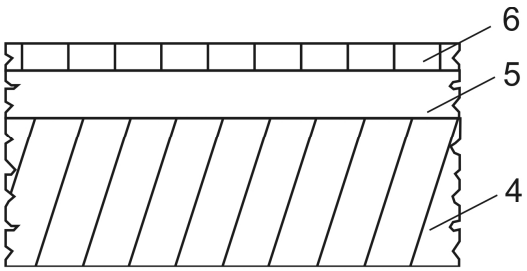


Figura 3.B

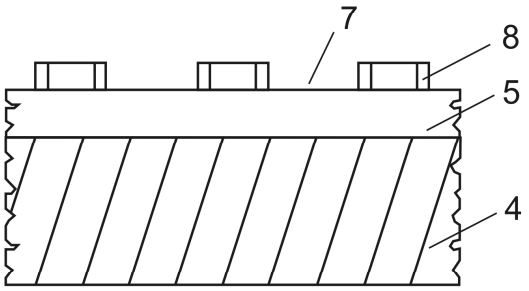


Figura 3.C

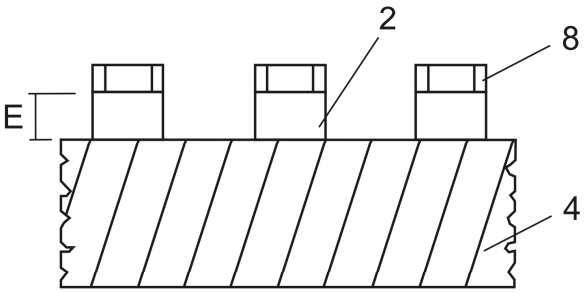


Figura 3.D

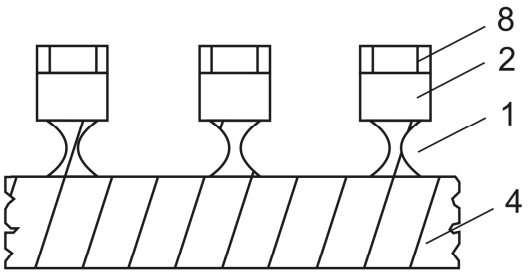


Figura 3.E

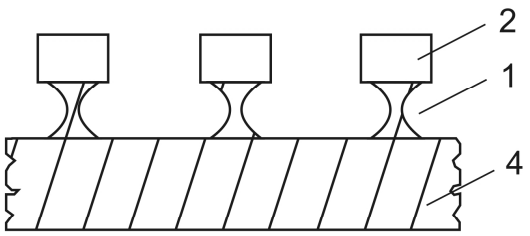


Figura 3.F

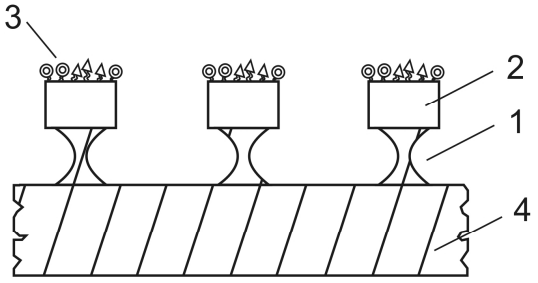


Figura 3.G

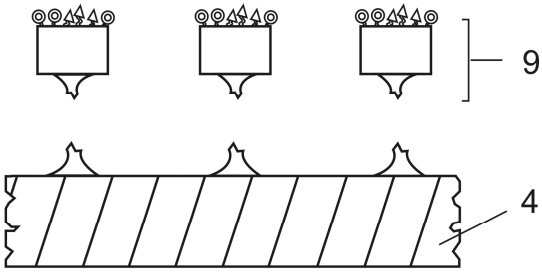


Figura 3.H

FIG. 3

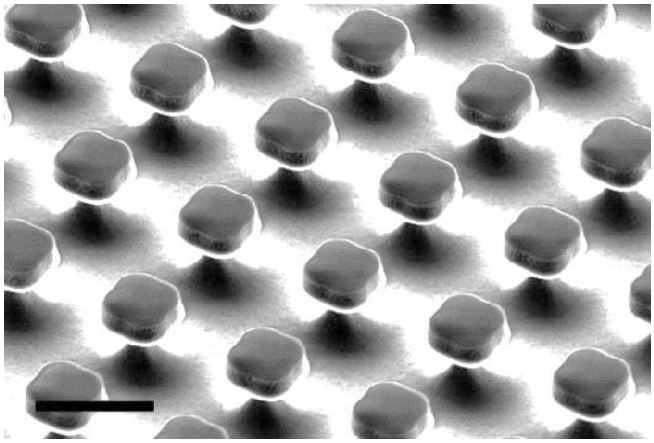


FIG. 4

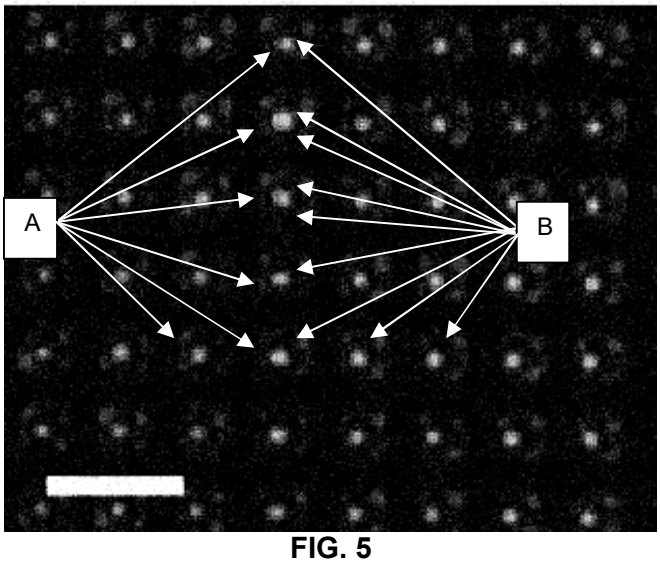


FIG. 5

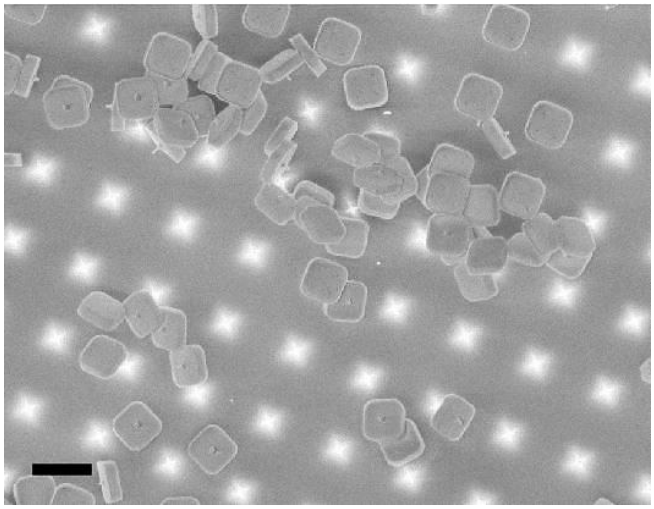


FIG. 6