



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 269 776**

(51) Int. Cl.:
B01L 11/00 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **02780170 .3**

(86) Fecha de presentación : **15.11.2002**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1448301**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **25.08.2004**

(54) Título: **Método de llenado de un pocillo en un sustrato.**

(30) Prioridad: **16.11.2001 NL 1019378**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.04.2007

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.04.2007

(73) Titular/es: **Technische Universiteit Delft**
Julianalaan 134
2628 BL Delft, NL

(72) Inventor/es: **Moerman, Robert**

(74) Agente: **Urizar Anasagasti, Jesús María**

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

Método de llenado de un pocillo en un sustrato.

La presente invención se refiere a un método de llenado de un pocillo con un líquido, en el que el líquido se aplica en un sustrato que comprende un pocillo en una posición que no coincide con el pocillo, y el pocillo tras el llenado se sella con un medio de cubierta.

Se conoce generalmente un método de este tipo para llenar micromatrices que se usan para diversos ensayos, tales como ensayos enzimáticos y de ADN. Debido a la pequeña cantidad de líquido en un pocillo, el efecto de evaporación es relativamente grande. Con el fin de evitar la evaporación, puede colocarse un medio de cubierta tal como un cubreobjetos sobre los pocillos.

Un problema consiste en que antes de tomar una medición han de llevarse a cabo varias operaciones, por ejemplo, llenar un pocillo con una cantidad medida de líquido, cubrir el pocillo llenado con el líquido (todo esto preferiblemente sin desarrollarse burbujas de aire) y comenzar la medición. Esto último a menudo requiere operaciones que conllevan mucho tiempo, dado que para diversas técnicas de medición tales como las técnicas de medición ópticas sólo hay un pequeño espacio alrededor de un sustrato y, por este motivo, a menudo es imposible llenar el sustrato mientras está montado. Además, para muchos ensayos, la reacción comenzará tan pronto como se llene el pocillo con líquido.

Es el objeto de la invención proporcionar un método del tipo mencionado en el preámbulo mediante el cual es posible comenzar a medir más rápidamente.

Para este fin, el método según la invención se caracteriza porque

- para llenar el pocillo, se aplica líquido a un primer sitio situado entre un segundo sitio en el que está situado un lado frontal del medio de cubierta aplicado sobre el sustrato y el pocillo no cubierto por el medio de cubierta,
- se mueve el lado frontal del medio de cubierta en la dirección del líquido que se aplicó y del pocillo, tomando así con él el líquido con el que se está llenando el pocillo, y
- tras haber pasado el lado frontal del medio de cubierta el pocillo, el medio de cubierta se lleva a una tercera posición estacionaria con el fin de sellar el pocillo lleno de líquido.

Sorprendentemente, es posible empujar hacia delante un líquido que va a introducirse en un pocillo, para llenar los pocillos rápidamente y sellarlos. Todo esto se realiza en una única operación, que también es favorable para la aplicación opcional (semi)automatizada del método según la invención. La presente invención hace posible llevar a cabo un ensayo cuantitativo en una muestra, sin tener que pipetear exactamente el volumen de la muestra. Tras llenar y cubrir un pocillo según la invención, el pocillo contiene una cantidad conocida con precisión determinada por las dimensiones del pocillo. Apartándose de un volumen relativamente grande con una superficie relativamente pequeña, se reduce la evaporación. Inmediatamente

después del momento en que se llena el pocillo, se sella en ese momento mediante el medio de cubierta, de modo que esto también reduce el efecto de evaporación. Esto es claramente diferente al llenado de pocillos individuales con líquido de muestra por medio de una pipeta, electropulverización y similares. En la presente solicitud, se entiende que un pocillo es cualquier cavidad en el sustrato independientemente de su forma. Esta definición también incluye pocillos alargados, que también pueden denominarse como canal. En esencia, tales canales discurren paralelos a la superficie del sustrato.

Preferiblemente, se utiliza un medio de cubierta que tiene un espesor de al menos 0,5 mm, más preferiblemente de al menos 0,8 mm y lo más preferiblemente de al menos 1,2 mm.

Tal medio de cubierta garantiza que el líquido se empuja hacia delante de manera eficaz. Al mismo tiempo, la rigidez del medio de cubierta aumenta con el espesor creciente de modo que el medio de cubierta se adhiera mejor al sustrato.

Si el líquido es hidrófilo, se usa un medio de cubierta según una realización preferida, cuyo lado que da hacia fuera del sustrato cerca de la parte frontal del medio de cubierta es hidrófobo y viceversa.

Esto ayudará a evitar que parte del líquido se desplace sobre la parte superior del medio de cubierta en vez de empujarse hacia delante. Esta realización es especialmente eficaz si se está usando un medio de cubierta delgado.

Según una realización preferida, se usa entonces un medio de cubierta cuyo lado hidrófilo que da hacia el sustrato tiene en uno de sus extremos una superficie con una parte hidrófoba.

El efecto de tal parte de superficie en el extremo que antes del deslizamiento está más próximo al pocillo, es que es necesario menos líquido (acuoso) para llenar el pocillo.

Esta parte de superficie puede hacerse hidrófoba, por ejemplo, mediante silanización pero también aplicando una pasta hidrófoba tal como grasa de silicona. Tal grasa no se disuelve en el líquido acuoso y tiene la ventaja adicional de que puede contribuir a evitar la evaporación. Además, facilita el deslizamiento de un medio de cubierta sobre el sustrato.

Un problema adicional es que durante y tras el llenado del pocillo, se transfiere reactivo o analito de un pocillo a otro debido a flujo o difusión. Ventajosamente, el pocillo se llena y se sella tan rápidamente que los reactivos no pueden escapar del pocillo. Ventajosamente, se presiona el medio de cubierta al menos en una tercera posición contra el sustrato con una fuerza de al menos 1 kg/cm².

Esto reduce la transferencia de líquido o reactivos por flujo y/o difusión. También se demostró que era posible aplicar tal fuerza, e incluso una fuerza de 15 kg/cm² durante el movimiento desde la primera posición hasta la tercera posición. Esto ayuda adicionalmente a limitar la transferencia de líquido o reactivos por flujo y/o difusión.

Preferiblemente, el medio de cubierta usado es un medio de cubierta cuyo borde del lado que da hacia el sustrato y el lado frontal del medio de cubierta está redondeado en al menos una parte del mismo, y el líquido en contacto con este redondeamiento se mueve en la dirección del líquido aplicado y el pocillo, arrastrando el líquido con el que va a llenarse el pocillo.

Tal redondeamiento ayuda a arrastrar el líquido y

facilita el llenado del pocillo. Tal redondeamiento es particularmente adecuado para el medio de cubierta en el que el líquido está en contacto con la altura total (espesor) del medio de cubierta. El borde formado entre el lado que da hacia fuera del sustrato y el lado frontal es en tal caso preferiblemente liso de manera sustancial, es decir, forma un ángulo cerrado por el que, debido a los efectos de cohesión, no puede pasar fácilmente un líquido.

Ventajosamente, en un único sustrato, se llena un primer pocillo con un primer líquido y un segundo pocillo con un segundo líquido, se aplican el primer y segundo líquido en primeros sitios no solapantes respectivos, y se dota el medio de cubierta con una indentación entre los primeros sitios no solapantes.

En lugar de esto o además de lo mismo, se llena un primer pocillo en un único sustrato con un primer líquido y un segundo pocillo con un segundo líquido, aplicándose el primer líquido y el segundo líquido en primeros sitios no solapantes respectivos, y se dota al menos un órgano seleccionado de i) el lado superior del sustrato y ii) el lado inferior del medio de cubierta entre los primeros sitios no solapantes, con una barrera elevada mientras que el otro órgano en la misma posición tiene una hendidura complementaria en la que puede alojarse la barrera, de modo que cuando se llenan el primer y segundo pocillos, la barrera se desliza a través de la hendidura.

Ambos métodos permiten que se llenen los pocillos de un sustrato con diferentes líquidos.

Según una realización favorable, el medio de cubierta comprende al menos dos lados frontales, estando formado al menos un lado frontal por una pared de una hendidura provista en ángulos rectos con respecto a la dirección de movimiento en el lado inferior del sustrato, y llenándose un primer pocillo en un único sustrato con un primer líquido y un segundo pocillo con un segundo líquido, aplicándose el primer líquido y el segundo líquido en primeros sitios no solapantes respectivos, de tal manera que el pocillo del primer líquido y el pocillo del segundo líquido estén en el segundo primer sitio, tras lo cual se coloca el medio de cubierta sobre el sustrato y posteriormente se mueve sobre el sustrato con el fin de llenar el primer pocillo y el segundo pocillo.

De esta manera, los pocillos que están sustancialmente en la dirección extendida del otro, pueden llenarse simultáneamente con diferentes líquidos.

Con el fin de sellar eficazmente un pocillo tras haberse desplazado el medio de cubierta hasta la tercera posición, se prefiere tanto para el sustrato como para el medio de cubierta que se doten con grupos funcionales que pueden formar un enlace químico o físico con los grupos funcionales con los que están en contacto.

Por ejemplo, puede dotarse un componente con grupos amino y el otro con grupos epoxi. Pueden encontrarse diversos grupos funcionales bastante fácilmente en la bibliografía con respecto a la inmovilización de proteínas y otras moléculas en una superficie, por tanto, un experto habitual en la técnica no requiere una explicación adicional.

La invención también se refiere a un medio de cubierta para la aplicación del método según una de las reivindicaciones 11 a 14, así como a un sustrato para la aplicación del método según una de las reivindicaciones 11 a 14.

La presente invención se aclarará ahora con refe-

rencia a una realización explicativa y el dibujo, en el que

Las figuras 1a y 1b muestran respectivamente una vista lateral de un sustrato con un medio de cubierta según la invención, y una vista desde arriba del medio de cubierta y el sustrato;

las figuras 2a y b muestran una vista lateral en sección transversal de un sustrato con un medio de cubierta según la invención para la aplicación de diferentes líquidos en diferentes pocillos (antes y después); y

la figura 3 muestra una vista desde arriba de un sustrato con un medio de cubierta según la invención.

La figura 1 muestra un sustrato 1 dotado con dos series 2, 3, series 2, 3 que consisten en pocillos 4. El sustrato 1 también está dotado con hendiduras 5', 5'', que como los pocillos 4 se han dotado convenientemente en el sustrato 1 por medio de ataque químico. Según una posible realización de la invención, las hendiduras 5', 5'' son adecuadas para introducir el líquido A en los pocillos 4. En lugar de esto, o además de lo mismo, es posible, según una realización alternativa, proporcionar un recubrimiento lineal, por ejemplo un recubrimiento hidrófilo que tiene una afinidad superior por el líquido. En lugar de eso, este sitio puede estar delimitado por dos líneas de recubrimiento por las que el líquido tiene menos afinidad. En el caso de que se esté aplicando un líquido acuoso, es posible por ejemplo usar aerosol de Teflon. Esto puede realizarse bastante fácilmente protegiendo el sitio en el que va a aplicarse el líquido por medio de, por ejemplo, un trozo rectangular de papel. Tras haberse aplicado el líquido A, se desplaza un medio 6 de cubierta situado sobre el sustrato en la dirección de los pocillos. En la figura 1, los pocillos 4 de la serie 2 ya están llenos.

El lado del medio 6 de cubierta que da hacia el sustrato y el lado del sustrato 1 que da hacia el medio 6 de cubierta son completamente lisos de modo que una vez puesto sobre el sustrato, el medio 6 de cubierta puede moverse de manera equidistante con respecto al sustrato 1, y el líquido A de muestra puede empujarse desde la hendiduras 5', 5'' hacia los pocillos 4. Tras esto se sellan inmediatamente los pocillos 4 llenos mediante el medio 6 de cubierta. El líquido A sobrante puede eliminarse por soplado con la ayuda de una pistola de aire (presión de aproximadamente 4-5 bares). Antes de eso, y preferiblemente durante la eliminación del líquido sobrante, puede ejercerse una fuerza de sujeción si es necesario, que es adecuadamente de 2-3 kg/cm². La eliminación del líquido garantiza que cualquier fuerza de tensión superficial no producirá que este líquido se escape entre el medio 6 de cubierta y el sustrato 1, lo que aumentaría el espesor de la capa de líquido entre el medio 6 de cubierta y el sustrato 1. Una capa de líquido muy delgada garantiza que incluso sin una fuerza de sujeción, el medio de cubierta sellará los pocillos 4 por medio de adhesión durante un tiempo de medición de, por ejemplo, 5-10 minutos. Para la realización de las mediciones, los pocillos 4 pueden contener reactivos que pueden disolverse en el líquido A con el que se han llenado los pocillos. La presencia de una capa delgada de líquido minimiza el intercambio (por difusión) de cualquier reactivo presente posiblemente de un pocillo a un pocillo adyacente. Finalmente, se evita de manera eficaz la evaporación de un líquido durante la medición con el método descrito.

El medio 6 de cubierta y el sustrato 1 también están limpios (libres de polvo) y, en el caso de líquidos A acuosos A, preferiblemente al menos en los lados del sustrato 1 y el medio 6 de cubierta que dan el uno al otro, son hidrófilos. No obstante, en el caso de los líquidos A acuosos, el extremo del lado del medio 6 de cubierta que da hacia el sustrato 1 está, según una realización preferida, cerca de los pocillos 4 hidrófobos. De esta forma puede evitarse que se requiera relativamente mucha muestra A líquida para llenar los pocillos 4. Según una realización sencilla, el extremo del lado que da hacia el sustrato 1 se hace hidrófobo con la ayuda de grasa de silicona. La cantidad de grasa de silicona utilizada se mantiene en un mínimo (es decir, se aplica un recubrimiento muy delgado). El uso de una hendidura 5 no es un requisito esencial e incluso puede ser indeseable. El líquido A se aplica preferiblemente al lado frontal del medio 6 de cubierta, orientado hacia los pocillos 4. De esta forma todavía es posible esparcir el líquido A transversalmente. Dicho lado frontal es preferiblemente hidrófilo.

La velocidad a la que el medio 6 de cubierta va a moverse con relación al sustrato 1 depende de los materiales utilizados y del líquido A utilizado, así como los componentes, tales como tensioactivos, comprendidos en él. No obstante, un experto en la técnica puede determinar fácilmente una velocidad adecuada. Si el porcentaje de pocillos 4 que comprenden aire atrapado es superior al deseable, la velocidad debe reducirse o deben utilizarse pocillos con una pared redondeada o con menos pendiente (éstos se llenan más fácilmente). El sustrato 1 y el medio 6 de cubierta pueden fabricarse de cualquier material que sea esencialmente inerte (con relación al líquido A), tal como poliestireno, vidrio o materiales que puedan tratarse utilizándose técnicas conocidas de la industria de semiconductores.

Cerca del lado del sustrato en el extremo frontal, el medio 6 de cubierta tiene un borde 7, que preferiblemente está dotado con redondeamiento (indicado mediante la línea de puntos). Esto permite que los pocillos 4 se llenen eficazmente con líquido. Un método práctico de llenado de pocillos se realiza tal como sigue:

1) Un vidrio Pyrex (1 x 0,8 cm) que tiene un espesor de 1 mm se limpia tratándolo con un detergente y enjuagando bien con agua desmineralizada.

2) El vidrio Pyrex se coloca sobre un sustrato semiconductor. El sustrato semiconductor está dotado con una capa hidrófila de SiO₂ y preferiblemente de nitrato de silicio. El sustrato semiconductor está dotado con pocillos de 400 x 400 μm que tienen una profundidad de 50 μm.

3) Mediante la acción capilar se introducen de 0,1 a 0,2 μl de agua entre el cubreobjetos de Pyrex y el sustrato. La presencia de tal cantidad mínima de líquido hace que el cubreobjetos de Pyrex se adhiera al sustrato mediante succión. Es difícil de eliminar pero puede deslizarse.

4) Se pipetea un líquido de muestra (1 μl) delante de una fila de pocillos a una distancia del cubreobjetos de Pyrex.

5) El cubreobjetos de Pyrex se empuja hacia la dirección del líquido de muestra y los pocillos a una velocidad de 2-6 cm/s.

6) El cubreobjetos se presiona sobre el sustrato con una fuerza de 2-3 kg/cm² y un líquido de muestra sobrante se elimina por soplado con la ayuda de una

pistola de aire (presión de 4 bares).

7) El sustrato con el cubreobjetos se sitúa en un portaobjetos sobre una mesa X-Y-Z bajo una lente objetivo.

En un experimento, se llenó una serie de 5 x 5 pocillos de 400 x 400 x 50 μm (volumen total de 0,2 μl) utilizando sólo 0,5 μl de líquido.

Los experimentos (reacciones coloradas en las que los pocillos se recubrieron con una enzima) demostraron que el arrastre en una dirección transversal a la dirección de movimiento del medio de cubierta con relación al sustrato fue mínimo. Hubo algún arrastre detectable entre los pocillos sucesivos en la dirección de movimiento.

Se demostró que el método según la invención era adecuado para llenar pocillos con un disolvente volátil tal como etanol. Esto permite que el método según la invención se aplique para reacciones de química combinatoria y potencialmente peligrosas que son seguras de realizar a pequeña escala.

Para el experto habitual en la técnica será obvio que es posible variar el presente método de muchas formas sin apartarse del alcance de la invención. Por ejemplo, en particular si un pocillo es relativamente profundo, es ventajoso utilizar un medio 6 de cubierta que no sea recto, por ejemplo, uno dentado o estriado, en el que las cavidades dentadas o estriadas captan el líquido y el medio 6 de cubierta con las cavidades se empuja sobre el pocillo 4. Si tiene que llenarse una serie 2, la posición de las cavidades se elige de manera que coincidan sustancialmente con los centros de los pocillos. Si se desea, diferentes cavidades pueden contener diferentes líquidos de muestra, de modo que puedan someterse a ensayo simultáneamente diferentes líquidos de muestra.

Con el fin de aplicar una capa de pasta de sellado hidrófoba, tal como grasa de silicona de una manera definida y reproducible, puede hacerse uso de un esparcidor que, al menos en un sitio, está en contacto con el sustrato mientras que se mueve sobre el sustrato en una dirección de un exceso de pasta. El esparcidor deja una estrecha hendidura entre el sustrato y el esparcidor, hendidura estrecha que (y el ángulo en el que se mueve el esparcidor) determina el espesor de la capa. El esparcidor también puede estar dotado opcionalmente con un elemento de guía que descansa contra un lado del sustrato.

La figura 2a muestra un sustrato 1 dotado con varios pocillos 4. El medio 6 de cubierta está dotado con hendiduras 8, cada una de las cuales tiene una pared 9 frontal que empuja los diversos líquidos A, B, C, D hacia delante. Cuando el medio 6 de cubierta está en la tercera posición, los pocillos 4 se sellan. Los pocillos 4 pueden comprender diversos reactivos W, X, Y, Z.

La figura 3 muestra una vista desde arriba de las tres series 2, 3, 9 comprendidas por los pocillos 4', 4'' 4''', que van a llenarse con diferentes líquidos A, B, C. Con el fin de evitar que los líquidos, que durante el movimiento del medio de cubierta se están esparciendo a lo largo del borde frontal, entren en contacto entre sí, se proporcionan las cavidades 9, de manera que los líquidos prácticamente se someten a diferentes medios 6 de cubierta.

La aplicación de los líquidos y el movimiento de los líquidos están automatizados preferiblemente mediante dispensadores y accionadores.

REIVINDICACIONES

1. Método para llenar un pocillo con un líquido, en el que se aplica un líquido en un sustrato que comprende un pocillo en una posición que no coincide con el pocillo, y tras llenarse, el pocillo se sella con un medio de cubierta, **caracterizado** porque

- para llenar el pocillo, se aplica líquido a un primer sitio situado entre un segundo sitio en el que está situado un lado frontal del medio de cubierta aplicado sobre el sustrato y el pocillo no cubierto por el medio de cubierta,
- se mueve el lado frontal del medio de cubierta en la dirección del líquido que se aplicó y del pocillo, tomando así con él el líquido con el que se está llenando el pocillo, y
- tras haber pasado el lado frontal del medio de cubierta el pocillo, el medio de cubierta se lleva a una tercera posición estacionaria con el fin de sellar el pocillo lleno de líquido.

2. Método según la reivindicación 1, **caracterizado** porque se utiliza un medio de cubierta que tiene un espesor de al menos 0,5 mm, más preferiblemente de al menos 0,8 mm y lo más preferiblemente de al menos 1,2 mm.

3. Método según la reivindicación 1 ó 2, **caracterizado** porque si el líquido es hidrófilo, se usa un medio de cubierta, cuyo lado que da hacia fuera del sustrato cerca de la parte frontal del medio de cubierta es hidrófobo y viceversa.

4. Método según la reivindicación 3, **caracterizado** porque el medio de cubierta en el lado hidrófilo que da hacia el sustrato tiene en uno de sus extremos una superficie con una parte hidrófoba.

5. Método según la reivindicación 4, **caracterizado** porque la parte de superficie hidrófoba comprende una pasta hidrófoba.

6. Método según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque al menos en una tercera posición el medio de cubierta se presiona contra el sustrato con una fuerza de al menos 1 kg/cm².

7. Método según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque el sustrato comprende una serie de pocillos, se proporciona una hendidura en el sustrato estando una componente direccional principal en ángulos rectos con respecto a la dirección de movimiento del medio de cubierta, y se introduce el líquido en la hendidura antes de transferirse a la serie mediante el medio de cubierta que se mueve sobre la hendidura.

8. Método según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque cuando el medio de cubierta está en la tercera posición, se elimina el líquido

que rodea el medio de cubierta.

9. Método según la reivindicación 8, **caracterizado** porque la eliminación se produce mediante gas comprimido.

10. Método según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque el medio de cubierta utilizado es un medio de cubierta cuyo borde del lado que da hacia el sustrato y el lado frontal del medio de cubierta es redondeado en al menos una parte del mismo, y el líquido en contacto con este redondeamiento se mueve en la dirección del líquido aplicado y el pocillo, arrastrando el líquido con el que va a llenarse el pocillo.

11. Método según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque en un único sustrato, se llena un primer pocillo con un primer líquido y un segundo pocillo con un segundo líquido, aplicándose el primer líquido y el segundo líquido en los primeros sitios no solapantes respectivos, y el medio de cubierta está dotado con una indentación entre los primeros sitios no solapantes.

12. Método según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque se llena un primer pocillo en un único sustrato con un primer líquido y un segundo pocillo con un segundo líquido, aplicándose el primer líquido y el segundo líquido en los primeros sitios no solapantes respectivos, y al menos un órgano elegido de i) el lado superior del sustrato y ii) el lado inferior del medio de cubierta entre los primeros sitios no solapantes está dotado con una barrera elevada, mientras que el otro órgano en la misma posición tiene una hendidura complementaria en la que puede alojarse la barrera, de modo que cuando el primer y el segundo pocillos se llenan, la barrera se desliza a través de la hendidura.

13. Método según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque el medio de cubierta comprende al menos dos lados frontales, estando formado al menos un lado frontal por una pared de una hendidura proporcionada en ángulos rectos con respecto a la dirección de movimiento en el lado inferior del sustrato, y llenándose un primer pocillo en un único sustrato con un primer líquido y un segundo pocillo con un segundo líquido, aplicándose el primer líquido y el segundo líquido en los primeros sitios no solapantes respectivos, de tal manera que el pocillo del primer líquido y el pocillo del segundo líquido están en el segundo primer sitio, tras lo cual el medio de cubierta se coloca sobre el sustrato y posteriormente se mueve sobre el sustrato con el fin de llenar el primer pocillo y el segundo pocillo.

14. Método según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque tanto el sustrato como el medio de cubierta están dotados con grupos funcionales que pueden formar un enlace químico o físico con los grupos funcionales con los que están en contacto.

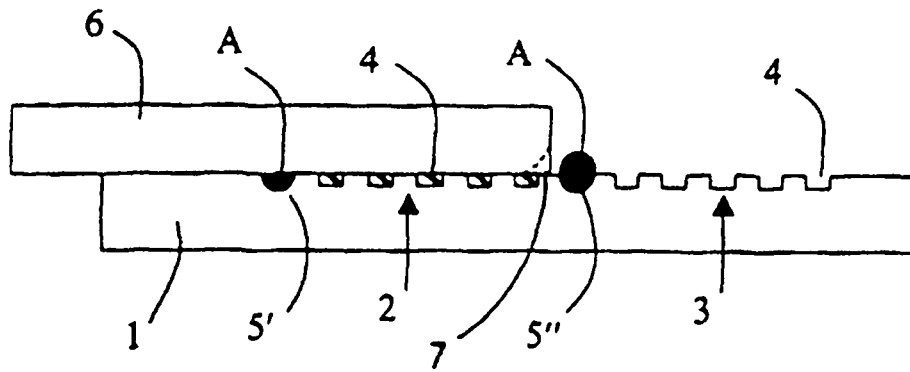


Fig. 1a

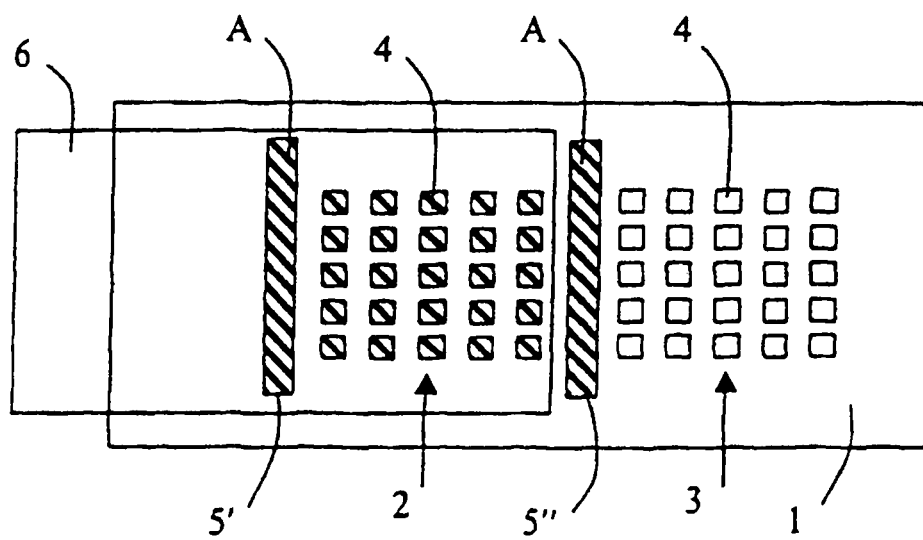


Fig. 1b

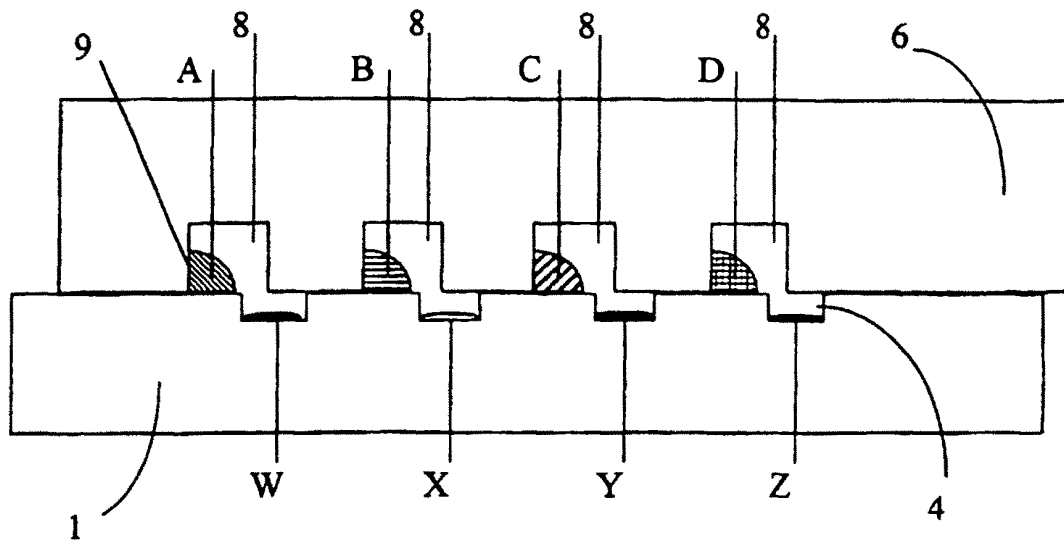


Fig. 2a

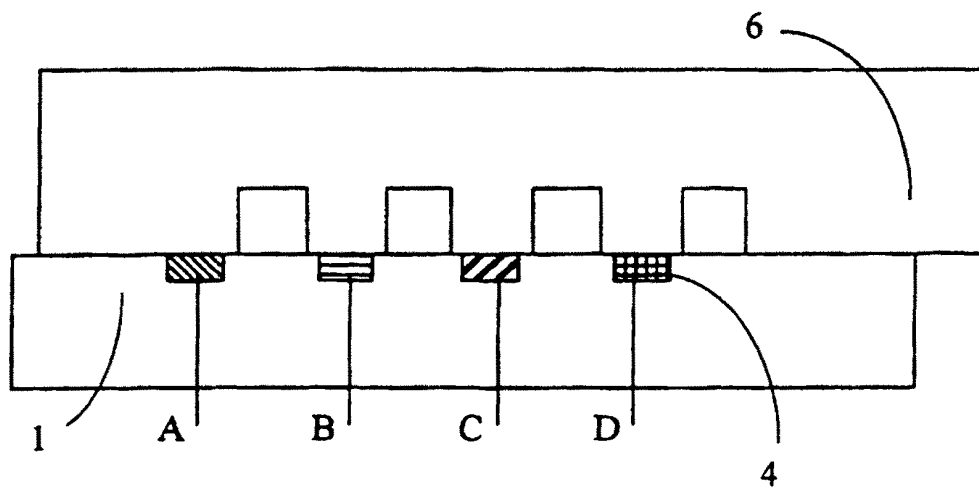


Fig. 2B

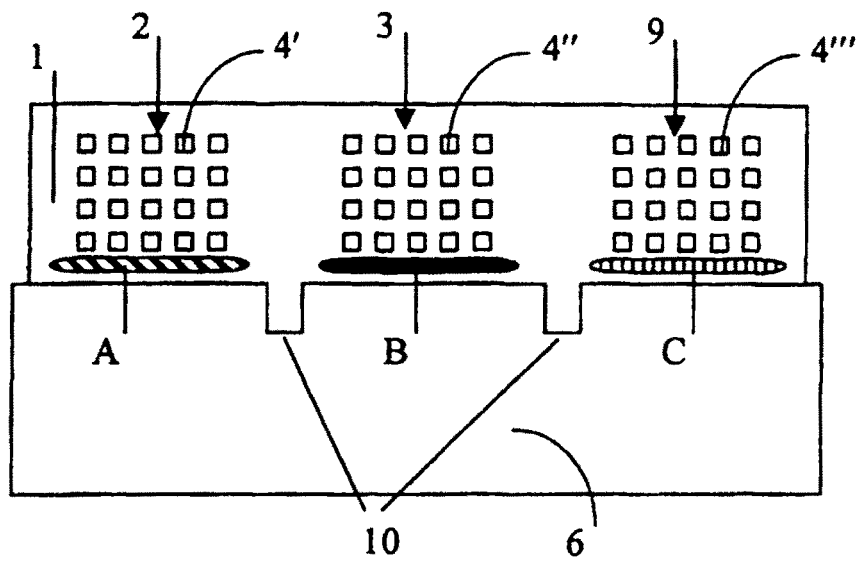


Fig. 3