(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 949 297**

(51) Int. CI.:

G01N 21/64 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.06.2014 PCT/EP2014/063491**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **31.12.2014 WO14207089**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.06.2014 E 14733176 (3)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.06.2023 EP 3014250**

(54) Título: **Estructura de guía de ondas**

(30) Prioridad:

28.06.2013 SE 1350790

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.09.2023

(73) Titular/es:

NANOLYZE AB (100.0%)
BioVentureHub Pepparedsleden 1
431 83 Mölndal, SE

(72) Inventor/es:

HÖÖK, FREDRIK;
AGNARSSON, BJÖRN;
LUNDGREN, ANDERS;
GUNNARSSON, ANDERS;
BALLY, MARTA y
SIMONSSON NYSTRÖM, LISA

(74) Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

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

Estructura de guía de ondas

Campo técnico

Estructuras de guías de onda, especialmente para microscopía y/o espectroscopía de ondas evanescentes, y métodos para fabricar dichas estructuras de guías de ondas. También se describen sistemas de medición que comprenden dichas estructuras de guías de ondas.

Antecedentes

La microscopía de fluorescencia de reflexión interna Total (TIRF) es una tecnología disponible comercialmente para la detección y monitorización visual de objetos nano- y microscópicos marcados con fluorescencia, tales como células, nanopartículas, vesículas lipídicas, moléculas, etc., en las proximidades cercanas de o en las superficies.

En biología celular y molecular, se han estudiado diferentes eventos moleculares que ocurren en o cerca de las superficies celulares tales como adhesión celular, unión a células de hormonas, secreción de neurotransmisores, dinámica de membrana e interacción celular con superficies inorgánicas con microscopios fluorescentes convencionales. Sin embargo, los fluoróforos que se unen a la muestra y aquellos en el medio circundante a menudo existen en un estado de equilibrio. Cuando estas moléculas se excitan y detectan con un microscopio de fluorescencia convencional, la fluorescencia resultante de esos fluoróforos unidos a la superficie celular y/o inorgánica a menudo se supera por la fluorescencia de fondo debido al número mucho mayor de moléculas no unidas.

El concepto de uso de reflexión interna total para iluminar las células u otros objetos marcados con fluorescencia a pequeña escala en contacto con la superficie de un material transparente tal como, por ejemplo, vidrio se ha conocido durante varias décadas. Un microscopio de TIRF usa una onda evanescente para iluminar y excitar selectivamente los fluoróforos en una región restringida de la muestra inmediatamente adyacente a una interfaz de vidrio-agua. La onda evanescente se genera solo cuando la luz incidente se refleja internamente en la interfaz de vidrio-agua. El campo electromagnético evanescente disminuye exponencialmente de la interfaz y, por lo tanto, penetra a una profundidad de solo aproximadamente 100 nm en el medio de muestra. Por lo tanto, el microscopio TIRF permite una visualización selectiva de regiones superficiales tales como la membrana plasmática basal (que tiene aproximadamente 7,5 nm de espesor) de células. La TIRF se puede usar también para observar la fluorescencia de objetos a nanoescala fluorescentes individuales, así como moléculas individuales, lo que lo hace una herramienta importante para la biofísica y biología cuantitativa.

Ejemplos de técnicas relacionadas con TIRF se dan en los documentos US6753188 y WO2007/077218.

Un inconveniente potencial con la tecnología TIRF es que normalmente requiere etiquetado de moléculas en investigación, lo que puede afectar al material, por ejemplo, células o nanopartículas vivas, que se van a estudiar. Asimismo, desde un punto 15 de vista práctico, el etiquetado de fluorescencia no siempre es sencillo de implementar.

Por tanto, es interesante proporcionar una técnica que pueda hacer en principio la misma cosa que la TIRF pero que no requiera etiquetado. También es de interés proporcionar una técnica que sea más sensible que la TIRF, sin ser demasiado complicada y costosa.

BJÖRN AGNARSSON Y COL.: "Evanescent-wave fluorescence microscopy using symmetric planar waveguides", OPTICS EXPRESS, vol. 17, n.° 7, 30 de marzo de 2009 (2009-03-30), páginas 5075-5082 describe una guía de ondas óptica plana que consiste en un núcleo de guía de ondas de polimetilmetacrilato (PMMA) intercalado entre una muestra en una solución acuosa y un polímero con un índice de refracción correspondiente, formando una estructura de revestimiento orgánico simétrico con un pocillo de muestra en el revestimiento superior. El documento US 2011/306143 A1 describe una estructura plana de guía de ondas óptica que comprende una capa central intercalada entre primera y segunda capas de revestimiento, en donde una nanopocillo está formado en la primera capa de revestimiento, la capa central está hecha de $Si_xTi_{1_x}O_2$, TiO_2, Ta_2O_5, Nb_2O_5, HfO_2, Al_2O_3, ZrO_2, ZnS, SiN_x, AlN_X, TiN_x, PC, PMMA, o Su8; la primera capa de revestimiento está hecha de SiO_2, MgF_2, CaF_2, Al_2O_3, PMMA, Su8, o policarbonato; y la segunda capa de revestimiento está hecha de SiO_2, MgF_2, CaF_2, Al_2O_3, PMMA, Su8, o policarbonato.

JENNIFER HALLDORSSON Y COL.: "High index contrast polymer waveguide platform for integrated biophotonics", OPTICS EXPRESS, vol. 18, n.° 15, 2010, páginas 16217-16226 describe una plataforma de guía de ondas óptica de polímero con un contraste de índice relativamente grande adecuado para su operación en el intervalo de longitud de onda visible, en donde el índice de refracción del material de revestimiento coincide estrechamente con el agua que comprende un núcleo de guía de ondas de polimetacrilato de polimetilo (PMMA) intercalado entre revestimientos de polímero óptico de Cytop fluorados para la detección de ondas biológicas de muestras biológicas.

El documento WO 2010/062627 A2 describe una estructura plana de guía de ondas que comprende un sensor de anillo que tiene un revestimiento inferior formado a partir de un óxido enterrado de una oblea de silicio sobre aislante, una guía de ondas de silicio recubierta con una fina capa de dióxido de silicio y un revestimiento superior hecho de un polímero, un polímero de flúor o un polímero perfluoro, por ejemplo, CYTOP.

SHARMA N Y COL.: "Control of birefringence using polymer as cladding layer in optical planar waveguides", OPTIK, WISSENSCHAFTLICHE VERLAG GMBH, DE, vol. 121, n.° 17, septiembre 2010 (2010-09), páginas 1610-1613 describe una investigación teórica de estrés térmicamente inducido, en particular guías de onda ópticas planas a base de sílice en un sustrato de silicio que se usa para circuitos de onda óptica de luz pasiva y para la integración híbrida de dispositivos multifuncionales para comunicaciones e interconexiones ópticas, en donde las capas de polímero se usan como capas de revestimiento para las guías de ondas ópticas planas a base de sílice en un sustrato de silicio para reducir la birrefringencia.

Sumario

La presente invención se define en la reivindicación 1, que está dirigida a una estructura de guía de ondas para la microscopía y/o espectroscopía de ondas evanescentes. La estructura de guía de ondas comprende una capa central ópticamente transparente, una primera capa de revestimiento dieléctrico inferior y una segunda capa de revestimiento dieléctrico superior dispuesta en lados opuestos de la capa central. La capa central tiene un índice de refracción superior a los índices de refracción de las capas de revestimiento.

Se dispone un pocillo de muestra en una superficie superior de la capa central formado por una cavidad en la segunda capa de revestimiento. El pocillo de muestra se adapta para contener una muestra que comprende un medio de muestra con uno o más objetos de muestra.

Así, cuando se usa en una configuración de medición, por ejemplo como se describe a continuación, la región de inacoplamiento de luz puede separarse de la solución de muestra. Así, puede minimizarse la luz parásita en el líquido. La capa de revestimiento superior puede proteger también las partes de la guía de ondas no utilizadas para la excitación de la contaminación. Dicha contaminación podría dar como resultado una distribución desigual de la luz dentro de la capa central.

La segunda capa de revestimiento superior está hecha de un material orgánico.

La segunda capa de revestimiento se selecciona de modo que tenga un índice de refracción que coincida estrechamente con el índice de refracción del medio de muestra de la muestra destinada a ser sondeado.

Se pueden usar varios medios diferentes como medio de muestra. Por ejemplo, se usa comúnmente agua, especialmente cuando se estudian muestras biológicas. Otros ejemplos pueden ser emulsiones, aceite, líquidos iónicos, etanol o metanol.

Al hacer coincidir el índice de refracción de la parte de revestimiento orgánico de la estructura con la del medio de muestra, se puede lograr una alta relación de señal a fondo, cuando se detectan señales de dispersión. Cuando la luz entra en el pocillo de la estructura de guía de ondas, la dispersión de luz dispersa que se origina en la interfaz de revestimiento a pocillo se reduce considerablemente mediante el índice que coincide con la capa de revestimiento superior con la del medio de muestra. Reducir la dispersión de luz parásita permite controlar las nanopartículas sin la necesidad de etiquetado de fluorescencia.

La capa central está hecha de un primer material inorgánico dieléctrico. Una capa central inorgánico puede ser ventajosa, ya que puede aumentar la posibilidad de funcionalización superficial. Una capa central inorgánico es especialmente ventajosa en el campo de la biología celular y la biología molecular descritas anteriormente. Sin embargo, debido a, por ejemplo, las dificultades de fabricación de las guías de onda, las estructuras de guías de ondas para las mediciones de evanescencia con revestimiento orgánico han sido previamente todas las estructuras orgánicas. Sin embargo, se ha demostrado que algunos materiales orgánicos usados convencionalmente como capa central son desventajosos cuando se estudian muestras biológicas, como se describirá a continuación.

Cuando la luz es guiada hacia la estructura de guía de ondas, se forma una onda evanescente en los límites exteriores de la capa central. La profundidad de penetración de la onda evanescente en la muestra se puede definir de manera moderada, por las propiedades de material específicas y los espesores de las diferentes capas. Los objetos de muestra ubicados dentro de la profundidad de penetración de la onda evanescente interactuarán con la luz confinada y pueden absorber, absorber y volver a emitir, o dispersar la luz. Dicha dispersión y/o absorbancia puede dar como resultado, por ejemplo, la fluorescencia o emitancia de radiación óptica que puede detectarse y usarse para estudios microscópicos y/o espectroscópicos de los objetos de muestra. Por lo tanto, la estructura de guía de ondas puede usarse mediciones de microscopía y/o espectroscopía de ondas evanescentes de una muestra colocada dentro del pocillo de muestra. Si los objetos de muestra bajo examen son fluorescentes, la fluorescencia y la dispersión de luz evanescente pueden ocurrir más o menos simultáneamente dentro de la muestra. A continuación se describen sistemas de medición para la medición simultánea de señales de luz de fluorescencia y señales de luz de dispersión.

La segunda capa de revestimiento puede estar hecha de un polímero fluorado.

También, la primera capa de revestimiento inferior está hecha de un material orgánico, preferiblemente un polímero fluorado.

La rugosidad media cuadrática de la superficie superior de la capa central puede configurarse de tal forma que no exceda de 1 nm.

La segunda capa de revestimiento puede tener un índice de refracción dentro del intervalo 1,30-1,36. Así, el índice de refracción de la segunda capa de revestimiento puede adaptarse a la del agua, que puede usarse como medio de muestra cuando se miden muestras biológicas.

La primera capa de revestimiento puede tener un índice de refracción menor o igual que el índice de refracción de la segunda capa de revestimiento. Esto puede influir tanto en el inacoplamiento de luz como en la profundidad de penetración de la parte evanescente del modo fundamental soportado por la estructura de guía de ondas, en una manera que puede ser ventajosa en ciertas situaciones. Como alternativa, la primera capa de revestimiento puede tener un índice de refracción superior a la segunda capa de revestimiento.

Las propiedades de la primera y segunda capas de revestimiento pueden ser similares, tales como para definir un entorno de revestimiento simétrico para la capa central. Una estructura de guía de ondas simétrica puede simplificar el inacoplamiento la luz y aumentar la profundidad de penetración del campo evanescente.

La capa central está hecha de vidrio de silicato. En otras estructuras de guías de ondas, que no son según la presente invención, la capa central puede estar hecha de otros materiales ópticamente transparentes. La capa central se forma de tal manera que la estructura de guía de ondas soporta una única o múltiples longitudes de onda dentro de, o en toda, un espectro de longitud de onda que varía de UV, a través de visible y a la región de IR cercano.

La capa central puede haber sido recubierta por centrifugación sobre la primera capa de revestimiento. Por ejemplo, la capa central puede formarse mediante un vidrio de espín. El vidrio de espín puede basarse en silicato inorgánico o polisiloxiano orgánico. Cuando se basa en polisiloxiano orgánico, las nanopartículas de SiO_2 pueden mezclarse en una solución orgánica que contiene grupos metilo, etilo o fenilo. Como alternativa o adicionalmente, la solución orgánica puede contener grupos hidroxilo unidos a polímeros.

Como alternativa, la capa central puede haberse depositado sobre la primera capa de revestimiento. La deposición debe realizarse a una temperatura por debajo de una temperatura de transición vítrea del material de la primera capa de revestimiento. Así, puede evitarse la delaminación de las capas y/o las formaciones de grietas dentro de una o ambas capas.

La primera capa de revestimiento puede disponerse sobre un sustrato que soporta la estructura de guía de ondas. Preferiblemente, el sustrato puede ser vidrio o una oblea de Si, o un polímero, tal como oblea de poliimida. Como alternativa, se usa un espejo o una estera metálica como sustrato.

La guía de ondas puede ser una estructura de guía de ondas monomodo.

La superficie de la capa central dentro del pocillo de muestra puede recubrirse con una película eléctricamente conductora que tenga una transparencia óptica. Ejemplos de tales películas son grafeno, polímeros conductores, óxido de estaño e indio o una capa metálica fina. Así, puede ser posible realizar también mediciones electroquímicas de la muestra. Preferiblemente, las mediciones electroquímicas pueden realizarse simultáneamente con mediciones microscópicas y/o espectroscópicas. La superficie de la capa central dentro del pocillo de muestra también puede recubrirse con una lámina fina de capa metálica ya sea continua o estructurada para inducir efectos plasmónicos.

Un método de fabricación de una estructura de guía de ondas según la presente invención se define en la reivindicación 6, y comprende:

- una capa central ópticamente transparente hecha de un primer material inorgánico dieléctrico,

- una primera capa de revestimiento dieléctrico inferior y una segunda capa de revestimiento dieléctrico superior dispuesta en lados opuestos de la capa central,

en donde la capa central tiene un índice de refracción superior a los índices de refracción de las capas de revestimiento, y en donde cada una de la primera y segunda capas de revestimiento está hecha de un material orgánico,

- un pocillo de muestra dispuesto sobre una superficie superior de la capa central formado por una cavidad recortada/abierta en la segunda capa de revestimiento, estando el pocillo de muestra adaptado para contener una

muestra que comprende un medio de muestra con uno o más objetos de muestra. Especialmente, se fabrica por el método una estructura de guía de ondas para mediciones de microscopía y/o espectroscopía evanescentes.

Por ejemplo, las estructuras de guías de ondas según cualquiera de los ejemplos descritos anteriormente pueden fabricarse mediante el método.

El método comprende las etapas de:

i) aplicar la primera capa de revestimiento sobre un sustrato;

ii) aplicar la capa central sobre la primera capa de revestimiento a una temperatura que es menor que una temperatura de transición vítrea del material de la primera capa de revestimiento; y

iii) aplicar el segundo material de revestimiento sobre la capa central a una temperatura que es menor que una temperatura de transición vítrea del material tanto de la primera capa de revestimiento como de la segunda capa de revestimiento;

iv) formar un pocillo de muestra sobre una superficie superior de la capa central eliminando material de la segunda capa de revestimiento y formando una cavidad abierta en su interior.

Al aplicar el segundo material de revestimiento a la capa central a una temperatura inferior a la temperatura de transición del material de la primera y segunda capas de revestimiento, se pueden evitar defectos inducidos térmicamente en la estructura de guía de ondas o al menos minimizarse. Especialmente, se pueden evitar grietas en las capas de revestimiento, así como la deformación de las diferentes capas y separación de las diferentes capas entre sí.

El método puede comprender además una o varias de las siguientes etapas:

- cebar una superficie superior del sustrato para mejorar las propiedades de adhesión antes de aplicar la primera capa de revestimiento;

- recubrir por centrifugación la primera capa de revestimiento sobre el sustrato;

- curar o endurecer la primera capa de revestimiento después de la aplicación sobre el sustrato;

- disminuir la hidrofobicidad de una superficie superior de la primera capa de revestimiento antes de aplicar la capa central, preferiblemente mediante la aplicación y posteriormente retirada, de una capa metálica fina sobre la primera capa de revestimiento;

- usar un polímero fluorado como material que forma la primera capa de revestimiento;

- recubrir por centrifugación la capa central sobre la primera capa de revestimiento;

- recubrir por centrifugación la segunda capa de revestimiento sobre la capa central;

- usar un polímero fluorado como material que forma la segunda capa de revestimiento;

- curar o endurecer la segunda capa de revestimiento después de la aplicación sobre la capa central a una temperatura que es menor que la temperatura a la que se había pasado la primera capa de revestimiento;

- disminuir la hidrofobicidad de una superficie superior de la segunda capa de revestimiento antes de formar una máscara de grabado sobre la misma, preferiblemente mediante la aplicación y posteriormente retirada, de una capa metálica fina sobre la segunda capa de revestimiento;

- formar una máscara de grabado sobre la segunda capa de revestimiento, definiendo la máscara de grabado el tamaño del pocillo de muestra;

- grabar a través de una parte expuesta de la segunda capa de revestimiento para formar el pocillo de muestra;

- grabar a través de una parte expuesta de la segunda capa de revestimiento para formar el pocillo de muestra, por lo que la capa central funciona como una capa de detención de grabado, de tal forma que no se usa una capa de detención de grabado adicional; y/o

- recubrir la superficie de la capa central dentro del pocillo de muestra con una película eléctricamente conductora que tiene una transparencia óptica.

Por ejemplo, la superficie de la capa central dentro del pocillo de muestra puede recubrirse con una fina capa de, por ejemplo, grafeno, polímeros conductores, óxido de estaño e indio o con una capa metálica fina.

La capa central puede aplicarse mediante recubrimiento por centrifugación de un vidrio de espín (SOG) sobre la primera capa de revestimiento y curando o endureciendo la capa de SOG a una temperatura que no supera la temperatura de transición vítrea de la primera capa de revestimiento durante un tiempo de al menos aproximadamente 24 horas. Preferiblemente, el curado puede tener lugar a una temperatura sustancialmente igual a la temperatura de transición vítrea de la primera capa de revestimiento durante un tiempo igual o superior a 24 horas, para formar de este modo una capa central de SiO_2.

La capa central puede formarse mediante cualquier tipo de técnica de deposición o mediante recubrimiento por centrifugación de materiales sol-gel sobre la primera capa de revestimiento. Los materiales de sol-gel son materiales sólidos disueltos en una solución, que puede recubrirse por centrifugación sobre una superficie tal como para formar películas sólidas u otras formas de material sólido. El proceso de recubrimiento por centrifugación o deposición debe realizarse a una temperatura por debajo de la temperatura de transición vítrea de la primera capa de revestimiento. Así, puede evitarse la delaminación de las capas y/o las formaciones de grietas dentro de una o ambas capas.

Se describe un sistema de medición. El sistema de medición puede comprender:

- una estructura de guía de ondas como se define en la reivindicación 1,

- al menos una fuente de luz configurada para dirigir la luz en la capa central de la estructura de guía de ondas hacia el pocillo de muestra, y

- una disposición de detector configurada para detectar luz emitida desde una muestra que comprende uno o más objetos de muestra en un medio de muestra colocado en el pocillo de muestra.

La muestra se puede adaptar para alojar la muestra que se va a analizar mediante el sistema de medición. El pocillo de muestra puede configurarse para contener un medio de muestra que comprende uno o más objetos de muestra. El índice de refracción de la segunda capa de revestimiento superior puede elegirse de modo que se desvíe del índice de refracción del medio de muestra en 0,03 o menos.

La al menos una fuente de luz puede estar acoplada a la capa central de la estructura de guía de ondas.

La al menos una fuente de luz puede ser un láser o cualquier otra fuente de luz en modo transversal individual.

La disposición de detector puede comprender un primer detector dispuesto para medir señales de fluorescencia que emanan de los objetos de muestra y un segundo detector dispuesto para medir señales de dispersión de los objetos de muestra. La disposición de detector puede adaptarse de tal forma que las señales de fluorescencia y las señales de dispersión puedan detectarse simultáneamente.

Puede disponerse un primer filtro para filtrar señales de dispersión de modo que solo las señales de fluorescencia alcancen el primer detector. Puede disponerse un segundo filtro para filtrar señales de fluorescencia de modo que solo las señales de dispersión alcancen el segundo detector.

Un primer objetivo puede disponerse entre la estructura de guía de ondas y en el primer filtro. Un segundo objetivo puede disponerse entre la estructura de guía de ondas y en el segundo filtro.

Se puede disponer un espejo dicroico entre la estructura de guía de ondas y el primer y segundo detectores. El espejo dicroico se puede disponer para separar señales de fluorescencia y señales de dispersión que emanan de los objetos de muestra, tales como dirigir señales de fluorescencia hacia el primer detector y las señales de dispersión hacia el segundo detector. Un primer objetivo puede disponerse entre la estructura de guía de ondas y el espejo dicroico.

El uso de un sistema de medición como se define en la reivindicación 10 para detectar la adsorción de nanopartículas de metal, dieléctricas o marcadas con fluorescencia en la capa central de la estructura de guía de ondas se describe.

La estructura de guía de ondas puede basarse en una estructura de guía de ondas plana de guía de ondas plana-orgánica híbrida dieléctrica. Una guía de ondas simétrica es una forma de guía de ondas donde la capa central se coloca entre capas de revestimiento superior e inferior con puntales ópticos similares, es decir, índices de refracción iguales o similares. En una guía de ondas plana, la mayor parte de la luz se limita a la capa central de la estructura. Sin embargo, una pequeña parte de la luz confinada se extiende en las capas de revestimiento circundantes como una onda evanescente, que tiene una profundidad de penetración finita. Si un objeto se coloca dentro de la profundidad de penetración de la onda evanescente en el revestimiento, interactuará con la luz confinada y absorberá, absorberá y reemitirá, o dispersará la luz. La luz emitida o dispersada puede detectarse utilizando un dispositivo sensible a la luz, por ejemplo, una cámara o un espectrómetro. Este principio es similar al usado en la microscopía de TIRF y

garantiza una alta relación de señal a fondo ya que solo los objetos dentro del alcance del campo evanescente, y no fuera del mismo, se verán afectados.

La simetría preferida de la estructura (esencialmente idénticas propiedades ópticas de las capas de revestimiento superior e inferior) asegura un inacoplamiento efectivo de luz usando un método simple de acoplamiento a tope que elimina la necesidad de esquemas sofisticados de acoplamiento tipo rejilla o en prisma. La simetría asegura también que la capa central no tenga ningún espesor límite para el modo fundamental soportado por la estructura de guía de ondas, lo que significa que la estructura siempre puede soportar los modos fundamentales de luz en un amplio espectro de longitud de onda. La misma estructura de guía de ondas puede soportar por tanto una única longitud de onda así como una luz de longitud de onda múltiple. La estructura de guía de ondas puede soportar la longitud de onda en la región visible del espectro, y/o en la parte UV y/o la parte de IR cercano del espectro. Preferiblemente, la estructura de guía de ondas puede adaptarse para soportar los modos fundamentales de luz en un espectro de longitud de onda que abarca desde la región UV hasta la región de IR cercano.

La capa central de la guía de ondas está formada por vidrio de silicato inorgánico. SiO_2 es el material preferido de elección para llevar a cabo experimentos de detección y detección bioanalítica basados en superficie.

Las estructuras de guías de ondas como se describen en la presente memoria permiten una simple iluminación tipo TIR que puede usarse junto con cualquier microscopio estándar (invertido o vertical).

En comparación con los microscopios de TIRF, la estructura de guía de ondas según la presente descripción tiene los beneficios que se permite para: a) tanto áreas de iluminación microscópicas como macroscópicas, b) excitación multicolor simple, c) adaptar las profundidades de penetración variando el espesor de la capa central o el índice de refracción de la capa central, y d) observaciones simultáneas de señales de dispersión y/o emitidas, tales como señales de fluorescencia o infrarrojos, de las mismas o diferentes regiones del sustrato.

Las estructuras y sistemas de guía de ondas descritos en la presente descripción proporcionan detección y monitorización sin etiqueta de objetos nano- y microscópicos en superficies, tales como partículas dieléctricas (por ejemplo, vesículas lipídicas, células biológicas, bacterias o virus o polímeros), metálicas (por ejemplo, Au o Ag) o de óxido metálico (por ejemplo, TiO_2 o SiO_2) o semiconductoras (por ejemplo, puntos cuánticos) o magnéticas. La posibilidad de monitorizar objetos a nanoescala en superficies se puede usar también para la detección química con sensibilidad de una sola molécula.

Se aseguran altas relaciones de señal a fondo gracias a la excitación evanescente basada en la guía de ondas en un pequeño volumen adyacente a la interfaz de la parte de sondeo de la guía de ondas.

Gracias a la coincidencia del índice de refracción de la capa de revestimiento superior a la del medio de muestra y debido a la elección del material del núcleo y el revestimiento respectivamente, se obtiene una sensibilidad mejorada en comparación con los diseños de guía de ondas convencionales. Esto se describe adicionalmente a continuación.

Una ventaja adicional de la invención es que proporciona una forma simple y sensible de medir señales dispersas de objetos micro- y nanoscópicos. El concepto descrito en la presente memoria no requiere ningún dispositivo sofisticado, es compatible con los microscopios estándar y puede ensamblarse en una unidad independiente. La simplicidad es un factor clave aquí, ya que se convierte en un bajo precio de producción.

La plataforma de guía de ondas orgánica-inorgánica híbrida

Las guías de onda son convencionalmente o bien todas inorgánicas (aisladores, materiales semiconductores y/o metales) o todas orgánicas (polímeros, polímeros conductores y/o sustancias biológicamente producidas). Existen varias buenas razones para fabricar guías de onda usando materiales orgánicos, por ejemplo polímeros, en lugar de los materiales inorgánicos más convencionales. Uno es que los polímeros generalmente tienen un intervalo más amplio de propiedades del material en comparación con sus homólogos inorgánicos. Esto incluye una gama más amplia de posibles índices de refracción, coeficientes térmicos, coeficientes elásticos, procedimientos de grabado, espesores de capa fácilmente producidos, propiedades eléctricas, etc. Esto hace que la adaptación de las propiedades ópticas y estructurales a las necesidades específicas sea más fácil que para los materiales inorgánicos. Los polímeros pueden recubrirse además directamente entre sí haciendo que sea innecesario la necesidad de una maquinaria de deposición sofisticada. Por otro lado, los materiales inorgánicos ofrecen también ciertas ventajas en comparación con los materiales orgánicos. Por ejemplo, pueden fabricarse convencionalmente en una manera más controlada, con una mayor pureza material y estructural que los materiales orgánicos. También tienden a ser más estructuralmente robustos y químicamente inertes. Normalmente también es más fácil modificar químicamente sus propiedades de superficie, que a menudo ofrecen ventajas en contextos bioanalíticos. Los métodos y dispositivos utilizados en la industria de semiconductores cada vez más se pueden aplicar directamente para fabricar estructuras de guías de ondas inorgánicas. En algunos casos, los materiales inorgánicos pueden mezclarse en soluciones de materiales orgánicos y recubrirse por centrifugación sobre un sustrato de manera similar a los polímeros. Este es el caso del vidrio de espín (SOG), que es un disolvente orgánico mezclado con nanopartículas de SiO_2. Al calentar los compuestos

orgánicos se evaporan, dejando solo las partículas de SiO_2 detrás para formar la película inorgánica con propiedades similares al SiO_2 evaporado, depositado por pulverización catódica o vapor químico.

Las estructuras de guía de ondas orgánicas-inorgánicas híbridas como se describen en la presente memoria combinan "lo mejor de ambas palabras". Sin embargo, la fabricación de dicha estructura no sencilla debido a diferencias inherentes de las propiedades del material entre los dos tipos de materiales. Por ejemplo, la diferencia en el coeficiente de expansión térmica entre polímeros y materiales sólidos inorgánicos es generalmente grande, lo que significa que las estructuras en capas que contienen ambos tipos de materiales tienden a formar grietas durante el procesamiento. En el método descrito, las temperaturas de procesamiento se mantienen por debajo de las temperaturas de transición vítrea de las capas orgánicas dentro de la estructura. Asimismo, la acumulación en el plano en el plano se puede relajar con el tiempo, lo que significa que se pueden obtener capas de sándwich libres de grietas que contienen capas inorgánicas y orgánicas. Otro punto importante es asegurar una adhesión adecuada entre las diferentes capas de la estructura inorgánica orgánica. Esto puede ser difícil de lograr en algunos casos, pero con el uso de promotores de adhesión y/o tratamientos superficiales especialmente diseñados, como se describe en la presente memoria, este problema puede superarse.

El vidrio de espín (SOG) puede usarse para hacer la capa central inorgánica de la estructura de guía de ondas. Esto es adecuado porque el recubrimiento por centrifugación proporciona superficies adecuadamente lisas en comparación con el SiO_2 evaporado o pulverizado o por ejemplo, Si_xN_y, y debido a un punto de vista de la fabricación, el SOG hace que la estructura sea órdenes de magnitud más barata y más simple de construir en comparación con las películas fabricadas usando técnicas estándar de deposición en salas limpias. Sin embargo, estos métodos se pueden usar también si se prefiere.

Todas las capas que comprenden la estructura tendrán preferiblemente una rugosidad superficial suficientemente baja (rugosidad cuadrática media < 1 nm). Este es un criterio general para todas las guías de onda para minimizar la atenuación de la luz guiada. La baja rugosidad superficial es además importante para la presente invención porque las superficies lisas son importantes para obtener una baja dispersión de fondo y, por lo tanto, una alta señal a ruido para los objetos que se dispersan débilmente. Las superficies con baja rugosidad similar se pueden lograr si el núcleo está hecho de un polímero, pero las capas centrales hechas de polímeros ofrecen menos posibilidades que los materiales inorgánicos cuando se trata de la funcionalización superficial y, en algunos casos, tal como PMMA, las capas orgánicas no son químicamente inertes (es decir, no pueden usarse junto con determinadas soluciones tales como metanol, etanol, etc.).

El SOG viene en diferentes formas y en diferentes disolventes, pero generalmente las etapas de endurecimiento implican horneado a temperaturas superiores a 400 ℃. Dichas altas temperaturas no pueden aplicarse para la presente estructura de guía de ondas híbrida debido a las diferencias inherentes de las propiedades del material (véase anteriormente). Sin embargo, se ha realizado que al hornear la capa de SOG a temperaturas más bajas durante tiempos prolongados, las películas de SOG con características muy similares a las películas de SOG curadas durante poco tiempo a altas temperaturas.

El uso de SiO_2 inorgánico como capa central en lugar de polímero es particularmente beneficioso en al menos tres aspectos. En primer lugar, la superficie SiO_2 es muy buena desde un punto de vista de la química superficial. Un ejemplo es la formación de bicapas lipídicas soportadas, que normalmente es difícil de formar en otros sustratos diferentes al SiO_2. Una segunda razón es que el SiO_2 es convencionalmente más químicamente robusto/inerte que la mayoría de los polímeros, lo que significa que los disolventes orgánicos pueden usarse para limpiar la superficie de la guía de ondas y/o para preparar muestras biológicas que se van a medir. La tercera razón se debe a su rigidez física y química: El SiO_2 puede formar una capa de detención de grabado natural, haciendo medidas de protección especiales durante el procesamiento de fabricación para proteger la capa central, por ejemplo, durante el grabado, innecesario, lo que reduce el tiempo y la complejidad de procesamiento.

Una característica principal de la estructura de guía de ondas descrita en la presente memoria es que combina un núcleo inorgánico con un entorno de revestimiento orgánico. Esta estructura, y su método de producción, se desarrolló para (i) hacer que la química superficial del núcleo inorgánico sea compatible con, por ejemplo, la formación de bicapa lipídica, la química basada en silano, las modificaciones superficiales basadas en atracción electrostática, tales como derivados de polilisina, etc., (ii) usar el revestimiento orgánico para que coincida con el índice de refracción del medio de muestra, (iii) permitir que una guía de ondas ópticamente simétrica (que se ha encontrado ser una ventaja para el acoplamiento en luz y para eliminar las condiciones límites para el modo fundamental) y (iv) para asegurar una baja dispersión a medida que el campo evanescente pasa la capa de revestimiento y entra en el depósito del medio/líquido de muestra, es decir, el pocillo de muestra dispuesto sobre el núcleo inorgánico en la estructura de guía de ondas (lo que no habido sido considerado previamente como un aspecto crítico y, por tanto, una ventaja con respecto a una alta señal a ruido si el sistema de detección/medición funciona en modo de dispersión).

Las capas de revestimiento

La estructura de guía de ondas puede comprender dos tipos de materiales dieléctricos que forman una estructura de tres capas. Un material de índice de refracción alto inorgánico forma la capa central de la estructura mientras que un

polímero orgánico con un índice de refracción inferior al de la capa central forma la capa de revestimiento superior, y también inferior. Así, puede definir un entorno de revestimiento simétrico para la capa central. Un revestimiento simétrico hace que la luz se acople a través del acoplamiento de la culata (debido a una superposición de alto rendimiento) y asegura que al menos el modo fundamental esté siempre soportado por la estructura para todas las longitudes de onda (elimina un espesor límite para la capa central para mantener el modo fundamental). Las guías de onda simétricas no tienen ningún límite para el modo fundamental de la guía de ondas. El índice de refracción del polímero que forma la capa de revestimiento superior, que forma las paredes alrededor del pocillo de muestra, debe ser tan próximo al del medio de muestreo como sea posible. Para el caso de agua como medio de muestreo (n = 1,33), la diferencia entre el índice de refracción de la capa de revestimiento y el índice de refracción del agua no debe ser preferiblemente superior a aproximadamente 0,03 (es decir, $1,30 \leq n_{revestimiento} \leq 1,36$). Esta estrecha coincidencia de índice entre el medio de muestreo y el revestimiento superior asegura una baja dispersión de luz parásita en la muestra. Este es un punto importante si la estructura de guía de ondas se va a usar para monitorizar la intensidad de dispersión pero no tan importante si se va a usar para monitorizar solo la señal de fluorescencia. No muchos materiales tienen un índice de refracción que coincide estrechamente con el del agua. Solo existen algunos, tales como teflón o polímeros de tipo teflón con índices de refracción de aproximadamente n=1,35. Un ejemplo es CYTOP, un polímero fluorado de AGO Asahi Glass con n = 1,34 en λ = 532 nm. Otro ejemplo es MY-133 MC de My Polymers Inc. con un índice de refracción cercano a 1,33 en λ = 589 nm. Además de tener los índices de refracción apropiados, ambos polímeros muestran una fuerte resistencia química, ambos tienen altos números de Abbe y baja autofluorescencia. En muchos casos, estos polímeros en forma de teflón son extremadamente hidrófobos, lo que dificulta fabricar estructuras en capas con los mismos. Sin embargo, este problema de adhesión se puede resolver depositando una fina capa de aluminio sobre la superficie de polímero hidrófoba y posteriormente retirándola por grabado húmedo en una solución básica tal como hidróxido de sodio. Este tratamiento hace que el polímero sea suficientemente hidrófilo para asegurar una buena adhesión entre el mismo y un material (inorgánico u orgánico) moldeado o depositado posteriormente.

La capa central

En principio, la capa central de las estructuras de guías de ondas, que no es según la presente invención, puede estar hecha de cualquier material de elección ópticamente transparente, siempre que su índice de refracción sea mayor que el de las capas de revestimiento. La profundidad de penetración del campo evanescente del modo guiado se determinará por las propiedades de la capa de la guía de ondas, tales como los ves y los índices de refracción. Al adaptar estos parámetros, la profundidad de penetración puede ajustarse desde aproximadamente 100 nm hasta más de 2-3 micrómetros o incluso más. La capa central puede hacerse tan fina como se desee, pero su v debería ser preferiblemente más pequeño que el espesor límite para los modos de orden superior, ya que se prefiere un comportamiento monomodo. Una guía de ondas monomodo es una estructura de guía de ondas que solo soporta un único modo fundamental para una determinada longitud de onda. Se prefiere una guía de ondas monomodo, ya que a) asegura una superposición de alto rendimiento entre el modo fundamental de la guía de ondas y la fuente de excitación (la fibra acoplada a la culata), b) asegura un perfil de iluminación uniforme y controlado dentro de la cavidad de la muestra, c) asegura un mejor control de la profundidad de penetración del campo evanescente, d) garantiza una alta densidad óptica dentro de la guía de ondas, lo que es importante para obtener una señal de dispersión suficientemente alta para ser detectada por una cámara estándar (microscopio u otro) o fotodetector.

Una capa central según la presente invención hecha de vidrio (SiO_2) tal como SOG es preferible cuando se trabaja con sistemas biológicos ya que la mayoría de las químicas superficiales utilizadas están diseñadas para tales superficies. Con el fin de reducir la dispersión de luz parásita y la atenuación de la guía de ondas, la capa central tiene que ser lo más plana posible, mientras más plana mejor. La rugosidad cuadrada media que preferiblemente no supere 1 nm. SiO_2 inorgánico es ideal para la superficie que lleva a cabo diversos esquemas de funcionalización.

Breve descripción de los dibujos

En la descripción de la invención dada a continuación se hace referencia a la siguiente figura, en donde:

Figuras 1a-j muestran un ejemplo del método para fabricar una estructura de guía de ondas,

Figura 2 muestra la profundidad de penetración del campo evanescente como una función del espesor de la capa central de SOG para algunas longitudes de onda comúnmente usadas y dos polarizaciones,

Figura 3 muestra una visión general esquemática de un primer ejemplo de un sistema de medición que comprende la estructura de guía de ondas,

Figura 4 muestra una visión general esquemática de un segundo ejemplo de un sistema de medición que comprende la estructura de guía de ondas,

Figura 5 muestra la intensidad de dispersión obtenida en el campo brillante de nanopartículas de oro de 30 nm adsorbidas en una capa central de SOG de la estructura de guía de ondas. El recuadro muestra un perfil de intensidad normal de una sola nanopartícula de oro de 30 nm,

Figura 6 muestra la distribución del tamaño de las nanopartículas de oro de 30 nm adsorbidas de la Figura 5, y

Figura 7 muestra la dispersión detectada y la intensidad de emisión de fluorescencia frente al tiempo para vesículas lipídicas adsorbidas con un diámetro de aproximadamente 100 nm que se modifica con el 1 % de lípidos etiquetados con rodamina.

Descripción detallada

La estructura de guía de ondas, el método de fabricación de dicha estructura de guía de ondas y los sistemas de medición que comprenden dicha estructura de guía de ondas se describirán con referencia a los dibujos adjuntos, en donde se muestran ejemplos. Sin embargo, la estructura de guía de ondas, los métodos de fabricación y los sistemas de medición no están limitados por los ejemplos descritos a continuación e ilustrados por las figuras.

Las Figuras 1a-1j muestran esquemáticamente un ejemplo del método para fabricar una estructura 1 de guía de ondas. El proceso de fabricación, es decir, el método para fabricar la estructura 1 de guía de ondas, se debe llevar a cabo en una instalación de sala de limpieza, preferiblemente clase ISO 100-1000. La estructura 1 de guía de ondas comprende tres capas intercaladas 3, 4, 5 fabricadas y estampadas en un sustrato 2 - una capa de elección de soporte ópticamente plana, tal como obleas de vidrio o de Si. En principio, cualquier material puede usarse como sustrato 2 siempre que pueda asegurarse suficiente adhesión entre el mismo y la estructura 1 de guía de ondas. El proceso de fabricación comprende en este ejemplo nueve etapas como se describe en la figura 1a — 1i:

1a) Preparación del sustrato 2.

1b) Giro de la capa 4 de revestimiento inferior y deposición y eliminación de la primera capa 31 de aluminio.

1c) deposición de la capa central 3.

1d) Giro de la capa 5 de revestimiento superior.

1e) Deposición y eliminación de la segunda capa 32 de aluminio.

1f) Giro de una máscara 33 de grabado.

1g) Litografía.

1h) Grabado de un pocillo 6 de muestra.

1i) Rebanado y eliminación de la máscara 33 de grabado.

Mediante este método, una o varias estructuras de guías de ondas pueden fabricarse simultáneamente en una oblea de Si. Las estructuras resultantes pueden separarse posteriormente en estructuras individuales de guía de ondas mediante del rebanado de obleas.

La Figura 1j muestra una plataforma de guía de ondas completa con un objeto 9 de muestra, por ejemplo, una muestra biológica, en un medio 7 de muestra, por ejemplo, agua, colocado en el pocillo 6 de muestra de la estructura 1 de guía de ondas.

Sustrato

Un sustrato 2 en la forma de una superficie de soporte plana homogénea ayuda a minimizar las pérdidas en la guía de ondas, ya que es probable que cualquier irregularidad de superficie, contaminación o residuos causen defectos estructurales en la estructura final que pueden afectar el rendimiento de la estructura 1 de guía de ondas. La limpieza del sustrato, tal como la lixiviación por plasma, puede ser necesaria para ayudar a eliminar la superficie de la contaminación antes del hilado de la capa 4 de revestimiento inferior. Asimismo, el horneado de placa caliente a 200 °C durante unos minutos puede ayudar a eliminar el agua de la superficie de la obleas que puede ayudar a mejorar la adhesión entre la superficie del sustrato 2 de soporte y la estructura 1 de guía de ondas. Los promotores de adhesión también se pueden usar para mejorar las propiedades de adhesión. En el caso de que se use una oblea de Si(100) pulida de 10,16 cm (4 pulgadas) como capa de soporte y CYTOP como capa 4, 5 de revestimiento, se debe usar un promotor de adhesión para asegurar una adhesión adecuada al sustrato 2. En este caso, se pueden usar cebadores AP3000 y SIGMA-ALDRICH (3-aminopropil) trietoxisilano como agente de acoplamiento para promover la adhesión de CYTOP al silicio. El cebador AP3000 está diseñado para ser utilizado con el polímero BBC pero funciona bien con CYTOP. Sin embargo, si la estructura 1 de guía de ondas se va a fabricar sobre un sustrato 2 de vidrio se debe usar un promotor de adhesión diferente. El promotor se recubre por centrifugación a aproximadamente de 4000 rpm durante 30 segundos y se deja secar en aire a 60 °C durante un minuto.

Capa de revestimiento inferior

Después del cebado, una capa 3 de revestimiento inferior se recubre por centrifugación sobre el sustrato 2 en el espesor deseado como se muestra en la figura 1b. La capa 4 de revestimiento inferior tiene que ser lo suficientemente gruesa como para que el modo guiado de la guía de ondas no interactúe con el sustrato 2 subyacente. En principio, no hay límite superior para cuánto grueso puede ser la capa 4 de revestimiento inferior. Después del recubrimiento por centrifugación, la capa 4 de revestimiento inferior debe curarse o endurecerse según las especificaciones del fabricante. En caso de que la capa 4 de revestimiento inferior esté hecha de CYTOP, se debe usar un horno de convección para endurecer el polímero en un proceso de horneado de tres etapas. Primero, CYTOP se lleva a un horno a 50 °C y se prehornea a esa temperatura durante una hora para eliminar el gas y las burbujas en la resina. Después de una hora, la temperatura debe aumentarse a 80 °C a una velocidad en ascenso de 8 °C/5 min y se mantiene a 80 °C durante una hora. La finalidad de esta etapa es eliminar los disolventes de la capa. El secado se produce a partir de la superficie de la resina. Después de una hora, la temperatura debe elevarse a 250 °C a una velocidad en ascenso de 8 °C/5 min y mantenerse a esa temperatura durante aproximadamente dos horas. La finalidad de esta etapa es mejorar la adhesión con el material de soporte. Diferentes materiales de capa de revestimiento pueden requerir diferentes procedimientos de horneado/endurecimiento. Durante el horneado, se debe colocar una cubierta de vidrio sobre la oblea para aumentar la planicidad de la película y ayudar a evitar la contaminación de partículas durante el proceso de horneado extendido.

CYTOP es naturalmente hidrófoba, lo que hace difícil o incluso imposible el recubrimiento de película posterior. Para superar este problema, se debe depositar una primera capa 31 de aluminio fina (o una capa de algún otro metal adecuado) tal como una película sobre la capa de CYTOP endurecida y posteriormente retirarla usando una solución de hidróxido de sodio (o ma-D331, revelador fotorresistente de Micro Romst Technology GmbH). La primera capa 31 de aluminio podría reemplazarse por una capa de cualquier otro metal adecuado u otro material. Después de retirar la primera capa 31 de aluminio, la oblea debe enjuagarse a fondo en agua desionizada y posteriormente secarse por soplado usando nitrógeno filtrado. Este tratamiento deja la superficie de CYTOP menos hidrófoba, lo que hace que la capa central 3 posterior se adhiera mejor a la misma.

Capa central

La capa central 3 está hecha de un material ópticamente transparente con un índice de refracción superior al de las capas 4, 5 de revestimiento circundantes. Sin embargo, la fabricación de la capa central 3 no puede implicar calentar a temperaturas por encima de la temperatura de transición vítrea de las capas 4, 5 de revestimiento. En el caso de CYTOP, esta temperatura es de aproximadamente 120 °C. La capa central 3 puede depositarse con deposición química de vapor, pulverización catódica, evaporación térmica (resistiva o por haz de electrones) o cualquier otro método de deposición estándar en sala limpia. También puede recubrirse simplemente por centrifugación en la parte superior de la capa 4 de revestimiento inferior y endurecerse apropiadamente. En el caso en conde CYTOP se usa como la capa 4 de revestimiento inferior y SOG como capa central 3, la película de SOG está preferiblemente recubierta por centrifugación en la parte superior de la capa 4 de revestimiento inferior en el espesor deseado y se endurece en un horno de conducción de vacío a 120 °C durante un tiempo superior a 24 horas. La capa central 3 que se ha aplicado sobre la capa 4 de revestimiento inferior que se muestra en la Figura 1c. El horneado en horno de vacío asegura una fuerte evaporación de disolvente y da como resultado una superficie muy plana, que es necesaria para que la estructura 1 de guía de ondas resultante tenga buenas características ópticas, por ejemplo, una baja dispersión de luz dispersa (dispersión de fondo) y atenuación. Al variar el espesor de la capa central 3, es posible adaptar la profundidad de penetración del campo evanescente de la plataforma de guía de ondas. La Figura 2 muestra un gráfico de la profundidad de penetración calculada d del campo evanescente como una función del espesor t de una capa central 3 de SOG con capas 4, 5 de revestimiento de CYTOP para algunas longitudes de onda comúnmente usadas para la luz en los estados polarizados eléctrico transversal TE y magnético transversal TM.

Capa de revestimiento superior

La última capa estructural de la estructura de guía de ondas es la capa 5 de revestimiento superior. A continuación, se tendrá que realizar un pocillo 6 de muestra en esta capa para exponer la capa central 3 a los medios que se van a analizar. En este ejemplo, la capa 5 de revestimiento superior se recubre por centrifugación directamente sobre la capa central 3 (Figura 1d) y se procesa en consecuencia, pero no de una manera que implica calentar a temperaturas que superen la temperatura de transición vítrea del material de revestimiento. En el caso en donde se usa CYTOP como las capas 4, 5, de revestimiento, se usa preferiblemente un horno de conducción térmica al vacío para endurecer el CYTOP. La oblea se coloca preferiblemente en el horno a 50 °C y se mantiene a esa temperatura durante 30 minutos para eliminar el gas y las burbujas de la resina. Después de 30 minutos, la temperatura debe aumentarse a 80 °C a una velocidad en ascenso de 8 °C/5 min y dejarse a esa temperatura durante 30 minutos. Esta etapa es para eliminar disolventes de la capa 5 de revestimiento superior. Después de 30 minutos, la temperatura se aumenta adicionalmente a 100 °C a una velocidad en ascenso de 8 °C/5 min y se mantiene a esa temperatura durante una hora antes de permitir que se enfríe de manera natural hasta la temperatura ambiente dentro del horno de vacío.

Segunda capa de aluminio

Para definir un pocillo 6 de muestra en la capa 5 de revestimiento superior, se coloca una capa de resistencia (por ejemplo, fotorresistente, resistente al haz de electrones) en la capa 5 de revestimiento superior y se modela en consecuencia. En el caso en donde CYTOP se usa como la capa 5 de revestimiento superior, primero debe hacerse hidrófilo para asegurar una buena adhesión de la capa resistente. Para esto, una segunda capa 32 de aluminio de 20-30 nm de espesor se deposita sobre la superficie de la capa 5 de revestimiento superior, véase figura 1e, usando por ejemplo evaporación de haz de electrones y posteriormente se retira colocando la oblea en un revelador ma-D331 rico en hidróxido de sodio durante 2 minutos, y posteriormente en agua desionizada durante aproximadamente 1 minuto antes de secarse por soplado usando nitrógeno. La segunda capa 32 de aluminio podría reemplazarse por una capa de cualquier otro metal adecuado u otro material que transforma CYTOP de hidrófobo a hidrófilo.

Grabado

La siguiente etapa es formar una máscara 33 de grabado en la capa 5 de revestimiento superior, véase la figura 1f. La forma de la máscara 33 de grabado puede ser de cualquier tamaño y forma y estar hecha ya sea de un fotorresistente estándar, resistente al haz de electrones o de metal. La capa de la máscara 33 de grabado tiene que ser lo suficientemente gruesa como para poder proteger la capa 5 de revestimiento superior subyacente contra el grabado.

En el caso en donde CYTOP se usa como la capa 5 de revestimiento superior, una fina capa de fotorresistencia puede recubrirse por centrifugación sobre CYTOP después de que se haya hecho hidrófilo. Para crear un orificio 34 en la capa de máscara 33 de grabado fotorresistente, se coloca una máscara de litografía que define el orificio 34 encima de la capa de máscara 33 de grabado antes de exponer la máscara 33 de grabado a luz ultravioleta. Después, la oblea se coloca en un revelador apropiado y se enjuaga después en agua desionizada y finalmente se seca por soplado usando nitrógeno. Esto deja la capa superior de CYTOP parcialmente expuesta como se indica en la figura 1g. El orificio 34 en la máscara 33 de grabado definirá el tamaño y la forma del pocillo 6 de muestra de la estructura de guía de ondas. El pocillo 6 de muestra se puede diseñar de cualquier manera deseada. El grabado de iones reactivos (RIE) se aplica después al grabado a través de la capa de CYTOP expuesta para formar el pocillo 6 de muestra de la guía de ondas (figura 1h) como un recorte en la capa 5 de revestimiento superior. El pocillo de muestra se puede formar de la siguiente manera. Primero se usa un plasma de O_2 limpio para grabar el primer micrómetro o así del CYTOP. Después de eso, se usa una mezcla 50/50 de Ar/O_2 para grabar los siguientes tres micrómetros o así. El argón es químicamente inerte, lo que significa que su plasma pulveriza catódicamente lejos fragmentos y materiales inorgánicos no deseados que se pueden encontrar dentro del pocillo 6 de muestra durante el grabado. El micrómetro final del CYTOP se graba a continuación usando un plasma de O_2 limpio para proteger mejor la capa central 3 de SOG, en el pocillo 6 de muestra. Con el fin de lograr un grabado anisotrópico como sea posible, la presión de cámara debe mantenerse mínima. Puesto que las velocidades de grabado varían entre diferentes sistemas de grabado, se debe realizar una calibración exhaustiva de grabado para obtener las velocidades de grabado para la capa de revestimiento y la resistencia o metal usado como capa de máscara 33 de grabado. En el caso ilustrado, el grabado se llevó a cabo a 100 W durante aproximadamente 2 + 8 + 2 minutos a 30 mTorr con oxígeno y argón a 40 ccsm(centímetros cúbicos estándar por minuto). Después de RIE, la superficie de la oblea, especialmente la capa central 3 expuesta, es altamente reactiva. Para neutralizar la superficie, la oblea debe colocarse en agua desionizada durante unos minutos, antes desecarse por soplado usando nitrógeno filtrado. Así, el pocillo 6 de muestra se dispone en el lado superior de la capa central 3 y se define parcialmente por las paredes de revestimiento de la capa de revestimiento superior.

Antes de rebanar la oblea, se puede centrifugar algo de material fotorresistente u otro material adecuado de elección sobre la oblea para proteger la estructura de los restos del rebanado. El rebanado se puede llevar a cabo usando máquinas de rebanado de oblea estándar. Las facetas de los chips resultantes tendrán que tener una calidad suficientemente alta para que su acoplamiento terminal a la capa central 3 sea eficiente. El resultado dependerá del tipo de cuchilla de rebanado utilizada, velocidad de centrifugación y velocidad de alimentación.

Después de rebanar la oblea, la capa protectora y la capa de máscara se eliminan utilizando métodos apropiados, tales como bañeras en soluciones de eliminación de material refractario y/o soluciones metálicas de grabado en húmedo (véase figura 1i).

Las Figuras 3 y 4 muestran ejemplos de sistemas de medición, por ejemplo, detección sin etiqueta de objetos nano- y microscópicos. Ambos sistemas de medición comprenden una estructura 1 de guía de ondas, que puede haberse fabricado utilizando el método descrito con referencia a las figuras 1a-1j. Todas las señales ópticas que se originan a partir de objetos de muestra bajo examen pueden detectarse simultáneamente usando diversas configuraciones, cuyos ejemplos se dan en las figuras 3 y 4.

El sistema de medición de la figura 3 comprende una estructura 1 de guía de ondas. La estructura 1 de guía de ondas comprende una capa central 3, una capa 4 de revestimiento inferior y una capa de revestimiento superior 5 sobre un sustrato 2. La estructura de guía de ondas, especialmente la capa central 3 y las capas 4, 5 de revestimiento, puede comprender una o más de las características descritas en la sección del sumario anterior. La estructura de guía de ondas puede ser una estructura de guía de ondas fabricada como se ha descrito anteriormente con referencia a las Figuras 1a-1j. Los objetos 9, 10 de muestra tales como vesículas lipídicas, partículas metálicas, células biológicas, bacterias, virus o moléculas pueden colocarse en un medio 7 de muestra, tal como agua u otro líquido, en el pocillo 6

de muestra dispuesto en el lado superior de la capa central 3 de la estructura 1 de guía de ondas. El medio 7 de muestra puede mantenerse en su lugar mediante una placa 8 ópticamente transparente sellada a la estructura 1 de guía de ondas en una configuración de tipo microfluídica. La luz de entrada procedente de una fuente de luz, tal como un láser, se alimenta desde el lado a la capa central 3, preferiblemente a través de una fibra óptica 11 acoplada a tope. Cuando la luz de entrada es guiada hacia la estructura 1 de guía de ondas, se forma una onda evanescente en los límites exteriores de la capa central 3. La profundidad de penetración de la onda evanescente en el pocillo 6 de muestra está bien definida y, por lo tanto, la onda evanescente interactúa solo con los objetos 9 de muestra dentro de su alcance mientras que los objetos 10 de muestra más distantes no se ven afectados, lo que da como resultado una alta relación de señal a fondo. Los objetos 9 de muestra colocados dentro de la profundidad de penetración de la onda evanescente interactúan con la luz confinada y o bien dispersan la luz o absorben la luz, lo que puede dar como resultado, por ejemplo, la fluorescencia o emitancia de radiación infrarroja que se puede detectar fácilmente. En el caso de que los objetos 9 de muestra bajo examen sean fluorescentes, tanto señales 12 de fluorescencia como señales 13 de dispersión se producen más o menos simultáneamente. En dirección ascendente, las señales 12, 13 que emanan de la estructura de guía de ondas pueden ser recogidas por un primer objetivo 14. Las señales 13 de dispersión pueden filtrarse por un primer filtro 15, de modo que solo las señales 12 de fluorescencia alcanzan y son detectadas por un primer detector 16. En dirección hacia abajo, las señales 12, 13 que emanan de los objetos 9 de muestra debido a la interacción con la onda de evanescente de la estructura 1 de guía de ondas pueden ser recogidas por un segundo objetivo 17. Las señales 12 de fluorescencia pueden filtrarse por un segundo filtro 18, de modo que solo las señales 13 de dispersión alcanzan y se detectan mediante un segundo detector 19. Dicha disposición permite medir simultáneamente tanto las señales 12, 13 de fluorescencia como de dispersión.

La Figura 4 muestra también un ejemplo de un sistema de medición que puede detectar señales 12 de fluorescencia y señales 13 de dispersión simultáneamente. La estructura 1 de guía de ondas y la entrada de luz de este sistema de medición son similares a las de la figura 3. La diferencia se encuentra en la separación de las señales 12, 13 de fluorescencia y de dispersión. El sistema de medición mostrado en la figura 4 usa solo un primer objetivo 14 para recoger señales que emanan de la estructura de guía de ondas. Las señales 12 de fluorescencia y las señales 13 de dispersión se separan entonces mediante un espejo dicroico 20 antes de ser detectado por un primer detector 16 y un segundo detector 19 respectivamente. Los detectores 16, 19 pueden estar dispuestos con filtros que filtran las señales 13, 12 de dispersión o fluorescencia respectivamente.

La fuente de luz de entrada y los detectores 16, 19 de los sistemas de medición en las figuras 3 y 4 pueden controlarse mediante una unidad de control tal como un ordenador.

Las Figuras 5, 6 y 7 muestran el uso de la estructura de guía de ondas para detectar la adsorción de nanopartículas metálicas, dieléctricas y marcadas con fluorescencia a la capa central de la guía de ondas. Los ejemplos sirven para describir más completamente la manera de usar la estructura de guía de ondas y establecer los mejores modos contemplados para llevar a cabo diversos aspectos de la descripción. Se entiende que estos ejemplos de ninguna manera limitan el alcance de esta descripción, que se define en las reivindicaciones adjuntas, sino que se presentan con fines ilustrativos.

La Figura 5 muestra una imagen de campo brillante de 200 x 200 pm^2 de nanopartículas de oro de 30 nm absorbidas en la capa central de SOG de la estructura de guía de ondas. La imagen se obtiene usando un objetivo de 40X, N.A.=0,75 y una cámara EM-CCD ajustada a una exposición de 10 ms y ganancia = 100 (Andor Luca EMCCD). Se usó un láser de 532 nm acoplado a fibras (NANO 250 Qloptimq, 532 nm) para acoplar una luz polarizada TE en la guía de ondas. La potencia del láser se ajustó a 10 mW, pero solo una fracción de esa potencia se acopló realmente a la guía de ondas. El recuadro muestra un perfil de intensidad normal de una única partícula de oro de 30 nm obtenida usando la guía de ondas que indica una alta relación de señal a fondo y señal a ruido.

La Figura 6 muestra cómo la intensidad de múltiples partículas de oro de una o múltiples imágenes, tal como la Figura 5, puede combinarse y usarse para estimar la distribución de tamaño de las partículas adsorbidas. El histograma muestra la distribución de tamaño medida de >3000 nanopartículas de oro con un diámetro medio de 30 nm en la guía de ondas. La línea continua muestra la distribución de tamaños correspondiente obtenida con un análisis convencional de rastreo de nanopartículas (NTA) del mismo lote de partículas en solución.

La Figura 7 muestra la dispersión detectada y la intensidad de emisión de fluorescencia frente al tiempo para vesículas lipídicas adsorbidas con un diámetro de aproximadamente 100 nm que se modifica con el 1 % de lípidos etiquetados con rodamina. Se usó un láser de 532 nm acoplado a fibras (NANO 250 Qloptimq, 532 nm) para acoplar una luz polarizada TE en la guía de ondas. La imagen de dispersión se obtiene usando un filtro de FITC que filtra la luz de fluorescencia. La imagen fluorescente se obtiene usando un filtro TRITC que filtra la luz dispersada.

Ejemplos adicionales (no mostrados en ninguna figura) de mediciones que pueden realizarse usando un sistema de medición como se ha descrito anteriormente incluyen:

(i) Detección de cambios resuelta en el tiempo en la intensidad de dispersión y/o combinación de intensidad de dispersión y emisión de fluorescencia tras la unión a la superficie de la capa central de nanopartículas metálicas, vesículas lipídicas u otros objetos de tamaño micrométrico o micrométrico, tales como puntos cuánticos, polímeros,

partículas de virus, exosomas, plaquetas, células vivas, etc., que llevan o que se modifican con una primera molécula de sonda que o bien

a) se une específicamente a una molécula objetivo que también se une específicamente a una segunda molécula de sonda unida a la superficie de la capa central de la guía de ondas o

b) se une específicamente a una molécula objetivo unida a la superficie de la capa central de la guía de ondas.

(ii) Detección de cambios resueltos en el tiempo en la intensidad de dispersión y/o combinación de intensidad de dispersión y emisión de fluorescencia de nanopartículas metálicas adsorbidas, vesículas lipídicas u otras partículas de tamaño micrométrico o micrométrico inducidas tras su interacción con biomoléculas (ADN, péptidos, proteínas, por ejemplo, enzimas, etc.), nanopartículas metálicas, vesículas lipídicas u otras partículas de tamaño nano- y micrométrico.

(iii) Detección de cambios resueltos en el tiempo en la posición e intensidad de dispersión de objetos de dispersión y/o fluorescentes individuales en respuesta a su movimiento dentro del campo evanescente de la guía de ondas, y en particular, en la movilidad de nanopartículas metálicas unidas a la membrana bicapa lipídica fluida de vesículas lipídicas unidas superficialmente, bicapas lipídicas soportadas, exosomas, partículas de virus, plaquetas, células vivas, etc.

(iv) Detección de cambios resueltos en el tiempo en la intensidad de dispersión y/o combinación de intensidad de dispersión y emisión de fluorescencia tras cambios estructurales de objetos de tamaño nano- o micrométrico unidos a la superficie tales como polímeros, vesículas lipídicas, partículas de virus, exosomas, plaquetas, células vivas, etc., por ejemplo, fluctuaciones de tamaño de vesículas lipídicas en respuesta a una presión osmótica variada de la solución.

La estructura de guía de ondas, el método de fabricación de la estructura de guía de ondas y el sistema de medición no están limitados por las realizaciones y ejemplos descritos anteriormente, sino que pueden modificarse de diversas maneras dentro del alcance de las reivindicaciones. Por ejemplo:

Inacoplamiento

Incluso aunque la simetría de la estructura de guía de ondas hace que el inacoplamiento de la luz directamente mediante el acoplamiento a tope sea una opción muy factible, el mismo efecto puede obtenerse por otros medios de inacoplamiento, tales como el inacoplamiento de prisma o inacoplamiento de tipo rejilla. Estos métodos por lo general no se consideran tan sencillos y fáciles de aplicar como el esquema de acoplamiento a tope.

El inacoplamiento puede llevarse a cabo desde más de un lugar simultáneamente (inacoplamiento de más de un lado) para asegurar un esquema de iluminación más homogéneo.

Materiales

La capa central está hecha de vidrio de silicato, que puede depositarse utilizando métodos de deposición estándar o recubiertos por centrifugación. Esto puede ser útil para lograr diferentes profundidades de penetración o funcionalizaciones superficiales. Una guía de ondas construida completamente de materiales orgánicos o materiales inorgánicos solo no tendrá las mismas propiedades ventajosas que la versión híbrida cuando se refiere a la biocomposición (capa central de SiO_2) o a reducir la dispersión de luz dispersa (capa de revestimiento con índice de refracción coincidente con el del medio de muestreo/sondeo).

Simetría frente a asimetría

Aunque la simetría de la estructura de guía de ondas garantiza que no haya ningún límite para el modo fundamental y hace posible un inacoplamiento simple mediante el acoplamiento a tope posible, como alternativa, la guía de ondas puede ser asimétrica en la manera en que la capa de revestimiento inferior tiene un índice de refracción inferior al de la capa central y al de la capa de revestimiento superior. Sin embargo, el revestimiento superior aún debe ser tan próximo al medio de muestreo/sondeo como sea posible, especialmente si la estructura está destinada a usarse con señales de dispersión. Esta configuración asimétrica introducirá un espesor limite por debajo del que no se soportará ningún modo por la estructura de guía de ondas. Esto también dará como resultado una superposición menos modal entre el modo soportado de la estructura de guía de ondas y el haz con forma gaussiana de la luz inacoplada, lo que hace el inacoplamiento menos eficiente. Sin embargo, esta configuración aumentará la profundidad de penetración de la parte evanescente del modo fundamental soportado de la guía de ondas, lo que puede ser beneficioso en algunas aplicaciones.

Fuente de luz

Preferiblemente, se debe usar una única fuente de luz en modo transversal (tal como un láser), para el inacoplamiento más efectivo. Sin embargo, en principio se puede utilizar cualquier otra fuente de luz, tal como LED, halógeno luminoso blanco, mercurio, etc. Pueden usarse múltiples longitudes de onda simultáneamente (especialmente en la configuración de inacoplamiento a tope) y la fuente de luz puede incluso incorporarse directamente en la plataforma de guía de ondas para una configuración de la fuente de luz en chip.

Complementos

La estructura de guía de ondas y/o el sistema de medición pueden comprender además cualquier tipo de sistema microfluídico para facilitar la transferencia de fluidos a y desde la excitación del pocillo de muestra de la estructura de guía de ondas.

La estructura de guía de ondas puede diseñarse para funcionar en combinación con una subunidad de plasmón-polaritón.

La estructura de guía de ondas puede diseñarse para funcionar en combinación con iluminación estructurada, permitiendo así microscopía de superresolución.

La estructura de guía de ondas puede diseñarse para funcionar como o en combinación con pinzas ópticas usando el campo evanescente para proporcionar una fuerza atractiva o repulsiva para los objetos dentro de la profundidad de penetración.

La estructura de guía de ondas puede diseñarse para tener pocillos de detección individuales o múltiples de diversas formas y tamaños que permitan posibilidades de lectura paralelas en múltiples pocillos.

La estructura de guía de ondas puede diseñarse para funcionar como un sensor sin etiqueta para detectar cambios en los índices de refracción dentro de la profundidad de penetración de la onda de evanescente realizados debido a eventos de unión superficiales en una configuración de tipo Mach-Zehnder. El interferómetro Mach-Zehnder es bien conocido por un experto en la materia y, por ende, no se describirá adicionalmente aquí.

La región de detección de la guía de ondas, es decir, la superficie del núcleo 3 que está expuesta dentro de la muestra de la muestra, puede recubrirse con una película eléctricamente conductora suficientemente transparente, tal como un polímero conductor, grafeno, óxido de indio y estaño, etc., para permitir el análisis electroquímico combinado.

REIVINDICACIONES

1. Estructura (1) de guía de onda para microscopía y/o espectroscopía de ondas evanescentes sin etiqueta sobre un espectro de longitud de onda que abarca desde una región UV hasta una región de IR cercano, que comprende

- una capa central (3) ópticamente transparente,
- una primera capa (4) de revestimiento dieléctrico inferior y una segunda capa (5) de revestimiento dieléctrico superior dispuesta en lados opuestos de la capa central (3),
en donde la capa central (3) tiene un índice de refracción superior a los índices de refracción de las capas (4, 5) de revestimiento,
- en donde la segunda capa (5) de revestimiento superior está hecha de un material orgánico,
- un pocillo (6) de muestra dispuesto en una superficie superior de la capa central (3) formada por una cavidad en la segunda capa (5) de revestimiento superior, estando el pocillo (6) de muestra adaptado para contener la muestra que comprende el medio (7) de muestra con uno o más objetos (9, 10) de muestra no etiquetados,

en donde la capa central (3) está hecha de un primer material inorgánico dieléctrico,
en donde la primera capa (4) de revestimiento inferior está hecha de un material orgánico, y en donde el primer material inorgánico dieléctrico de la capa central (3) es vidrio de silicato.

2. Estructura (1) de guía de onda según la reivindicación 1, en donde el vidrio de silicato de la capa central (3) es un vidrio de espín, SOG.

3. Estructura (1) de guía de onda según la reivindicación 1 o 2,
caracterizada por que

la primera capa (4) de revestimiento inferior está hecha de un polímero fluorado, y/o
la segunda capa (5) de revestimiento está hecha de un polímero fluorado, y/o
la segunda capa (5) de revestimiento tiene un índice de refracción dentro del intervalo 1,30-1,36, y/o
la primera capa (4) de revestimiento tiene un índice de refracción menor o igual que el índice de refracción de la segunda capa (5) de revestimiento, y/o
que las propiedades de la primera y segunda capas (4, 5) de revestimiento son similares, tales como para definir un entorno de revestimiento simétrico para la capa central (3).

4. Estructura (1) de guía de onda según cualquiera de las reivindicaciones 1-3,
caracterizada por que

la rugosidad cuadrática media de la superficie superior de la capa central (3) no supera 1 nm, y/o
que la capa central (3) está recubierta por centrifugación sobre la primera capa (4) de revestimiento, y/o
que la primera capa (4) de revestimiento está dispuesta sobre un sustrato (2) que soporta la estructura de la guía de ondas, por lo que preferiblemente el sustrato (2) es vidrio o una oblea de Si, un polímero, por ejemplo, oblea de poliimida, un espejo o un metal, y/o
que la superficie de la capa central (3) dentro del pocillo (6) de muestra está recubierta con una película eléctricamente conductora que tiene una transparencia óptica, tal como una película metálica, grafeno, óxido de estaño e indio o polímero conductor.

5. Estructura (1) de guía de onda según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores,
caracterizada por que
es una estructura de guía de ondas monomodo.

6. Método de fabricación de una estructura (1) de guía de ondas según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que comprende:

- una capa central (3) ópticamente transparente hecha de un primer material inorgánico dieléctrico, en donde el primer material inorgánico dieléctrico es vidrio de silicato,
- una primera capa (4) de revestimiento dieléctrico inferior y una segunda capa (5) de revestimiento dieléctrico superior dispuesta en lados opuestos de la capa central (3),
en donde la capa central (3) tiene un índice de refracción superior a los índices de refracción de las capas (4, 5) de revestimiento, y en donde cada una de la primera y segunda capas (4, 5) de revestimiento está hecha de un material orgánico,

- un pocillo (6) de muestra dispuesto en una superficie superior de la capa central (3) formado por una cavidad en la segunda capa (5) de revestimiento, estando el pocillo (6) de muestra adaptado para contener una muestra que comprende un medio (7) de muestra con uno o más objetos (9, 10) de muestra no etiquetados,

comprendiendo dicho método las etapas de:

i) aplicar la primera capa (4) de revestimiento sobre un sustrato (2);
ii) aplicar la capa central (3) sobre la primera capa (4) de revestimiento a una temperatura que es menor que una temperatura de transición vítrea del material de la primera capa (4) de revestimiento;
iii) aplicar el segundo material (5) de revestimiento sobre la capa central (3) a una temperatura que es menor que una temperatura de transición vítrea del material tanto de la primera capa (4) de revestimiento como de la segunda capa (5) de revestimiento, y
iv) formar un pocillo (6) de muestra en una superficie superior de la capa central (3) eliminando material de la segunda capa (5) de revestimiento y formando una cavidad abierta en su interior.

7. Método según la reivindicación 6, en donde el método comprende una o varias de las siguientes etapas:

- cebar una superficie superior del sustrato (2) para mejorar las propiedades de adhesión antes de aplicar la primera capa (4) de revestimiento;
- recubrir por centrifugación la primera capa (4) de revestimiento sobre el sustrato (2);
- curar o endurecer la primera capa (4) de revestimiento después de la aplicación sobre el sustrato (2);
- disminuir la hidrofobicidad de una superficie superior de la primera capa (4) de revestimiento antes de aplicar la capa central (3), preferiblemente mediante la aplicación y posteriormente retirada, de una capa metálica fina (31) sobre la primera capa (4) de revestimiento;
- usar un polímero fluorado como material que forma la primera capa (4) de revestimiento;
- recubrir por centrifugación la capa central (3) sobre la primera capa (4) de revestimiento;
- recubrir por centrifugación la segunda capa (5) de revestimiento sobre la capa central (3);
- usar un polímero fluorado como material que forma la segunda capa (5) de revestimiento;
- curar o endurecer la segunda capa (5) de revestimiento después de la aplicación sobre la capa central (3) a una temperatura que es menor que la temperatura a la que se había curado la primera capa (4) de revestimiento;
- disminuir la hidrofobicidad de una superficie superior de la segunda capa (5) de revestimiento antes de formar una máscara (33) de grabado sobre la misma, preferiblemente mediante la aplicación y posteriormente retirada de una capa metálica fina (32) sobre la segunda capa (5) de revestimiento;
- formar una máscara (33) de grabado sobre la segunda capa (5) de revestimiento, definiendo dicha máscara (33) de grabado el tamaño del pocillo (6) de muestra;
- grabar a través de una parte expuesta de la segunda capa (5) de revestimiento para formar el pocillo (6) de muestra;
- grabar a través de una parte expuesta de la segunda capa (5) de revestimiento para formar el pocillo (6) de muestra, por lo que la capa central (3) funciona como una capa de detención de grabado, de tal forma que no se usa una capa de detención de grabado adicional; y/o
- recubrir la superficie de la capa central (3) dentro del pocillo (6) de muestra con una película eléctricamente conductora que tiene una transparencia óptica.

8. Método según la reivindicación 6 o 7, en donde la capa central (3) se aplica mediante recubrimiento por centrifugación de un vidrio de espín (SOG) sobre la primera capa (4) de revestimiento y el curado o endurecimiento de la capa de SOG a una temperatura que no supera la temperatura de transición vítrea de la primera capa (4) de revestimiento durante un tiempo de al menos aproximadamente 24 horas, preferiblemente el curado a una temperatura sustancialmente igual a la temperatura de transición vítrea de la primera capa (4) de revestimiento durante un tiempo igual o superior a 24 horas, para formar de este modo una capa central (3) de SiO_2.

9. Método según la reivindicación 6 o 7, en donde la capa central (3) se forma mediante deposición o recubrimiento por centrifugación de un material sol-gel sobre la primera capa (4) de revestimiento.

10. Sistema de medición, comprendiendo dicho sistema:

- una estructura (1) de guía de ondas según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5,
- al menos una fuente (11) de luz configurada para dirigir la luz al interior de la capa central (3) de la estructura (1) de guía de ondas hacia el pocillo (6) de muestra, y

- un dispositivo detector configurado para detectar la luz (12, 13) emitida desde una muestra que comprende uno o más objetos (9, 10) de muestra en un medio de muestra (7) colocado en el pocillo (6) de muestra.

11. Sistema de medición según la reivindicación 10,

caracterizado por que la al menos una fuente (11) de luz se acopla a la capa central (3) de la estructura (1) de guía de ondas, y/o
que la al menos una fuente (11) de luz es un láser o cualquier otra fuente de luz de modo transversal individual.

12. Sistema de medición según una cualquiera de las reivindicaciones 10-11,
caracterizado por que el dispositivo detector comprende un primer detector (16) dispuesto para medir señales (12) de fluorescencia que emanan de los objetos (9, 10) de muestra y un segundo detector (19) dispuesto para medir señales (13) de dispersión desde los objetos (9,10) de muestra, de tal forma que las señales (12) de fluorescencia y las señales (13) de dispersión se pueden detectar simultáneamente.

13. Sistema de medición según la reivindicación 12,
caracterizado por que un primer filtro (15) está dispuesto para filtrar las señales (13) de dispersión de tal forma que solo las señales (12) de fluorescencia alcanzan el primer detector (16), y un segundo filtro (18), dispuesto para filtrar las señales (12) de fluorescencia de tal forma que solo las señales (13) de dispersión alcanzan el segundo detector (19).

14. Sistema de medición según la reivindicación 13, en donde un primer objetivo (14) está dispuesto entre la estructura (1) de guía de ondas y el primer filtro (15) y un segundo objetivo (17) está dispuesto entre la estructura (1) de guía de ondas y el segundo filtro (18).

15. Sistema de medición según la reivindicación 12 o 13, en donde un espejo dicroico (20) está dispuesto entre la estructura (1) de guía de ondas y el primer y segundo detectores (16, 19), en donde el espejo dicroico (20) está dispuesto para separar señales (12) de fluorescencia y señales (13) de dispersión que emanan de los objetos (9, 10) de muestra tal como para dirigir señales (12) de fluorescencia hacia el primer detector (16) y señales (13) de dispersión hacia el segundo detector (19),
y
en donde preferiblemente un primer objetivo (14) está dispuesto entre la estructura (1) de guía de ondas y el espejo dicroico (20).

16. Uso de un sistema de medición según una cualquiera de las reivindicaciones 10-15 para detectar la absorción de nanopartículas de metal, dieléctricas o marcadas con fluorescencia en la capa central (3) de la estructura (1) de guía de ondas.

Figura 1a

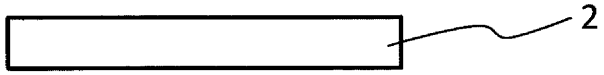


Figura 1b

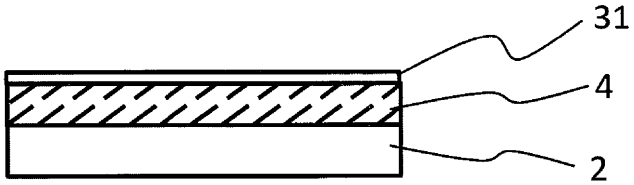


Figura 1c

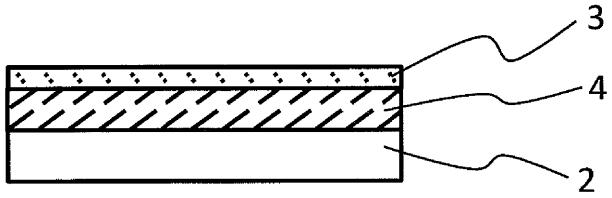


Figura 1d

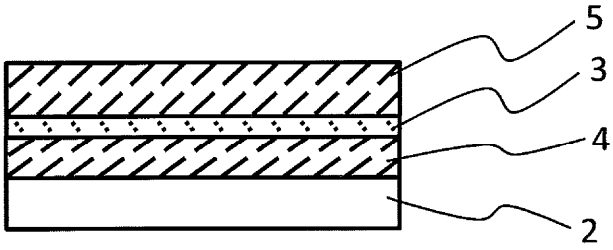


Figura 1e

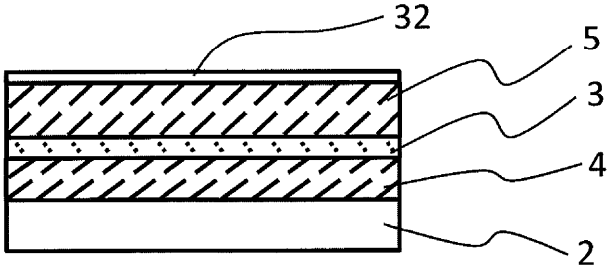


Figura 1f

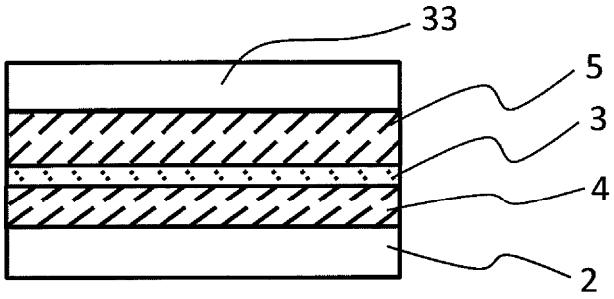


Figura 1g

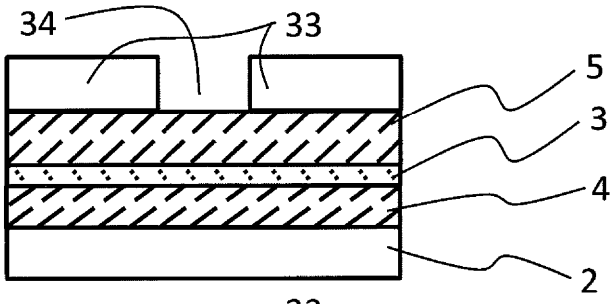


Figura 1h

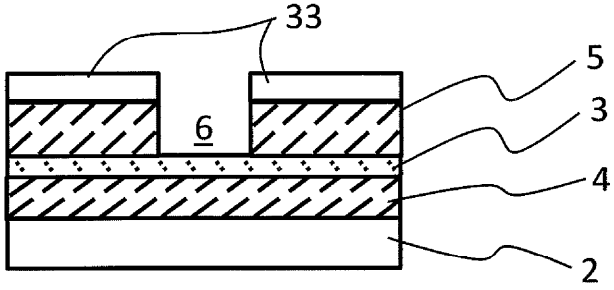


Figura 1i

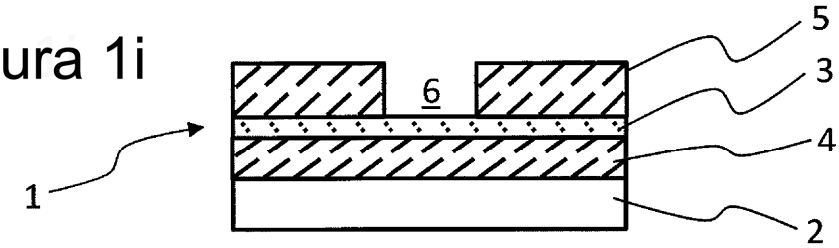
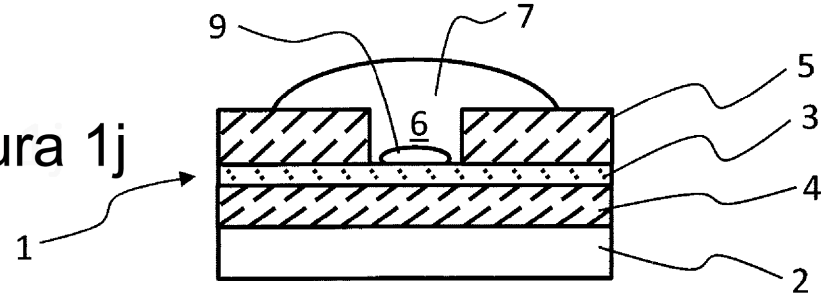


Figura 1j



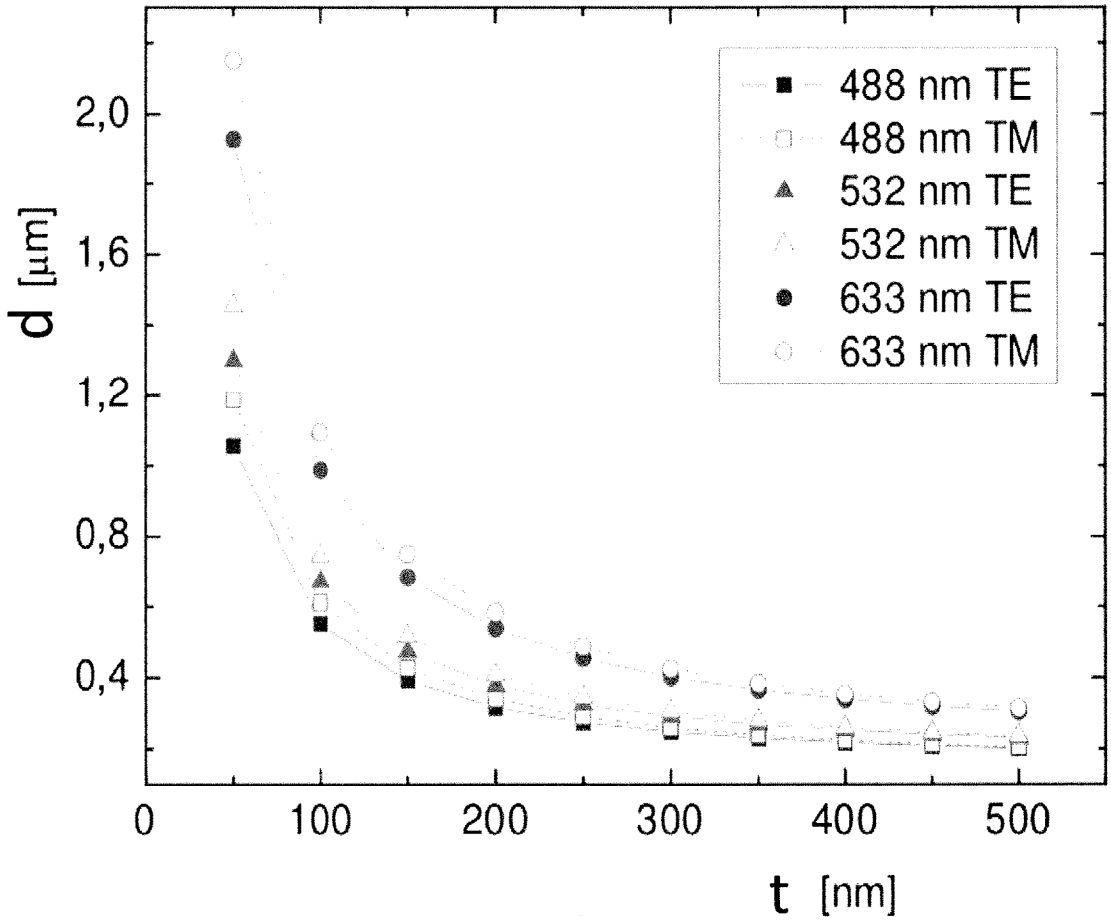

488 nm TE
488 nm TM
532 nm TE
532 nm TM
633 nm TE
633 nm TM
d [µm]
2,0
1,6
1,2
0,8
0,4
0
100
200
300
400
500
t [nm]

Figura 2

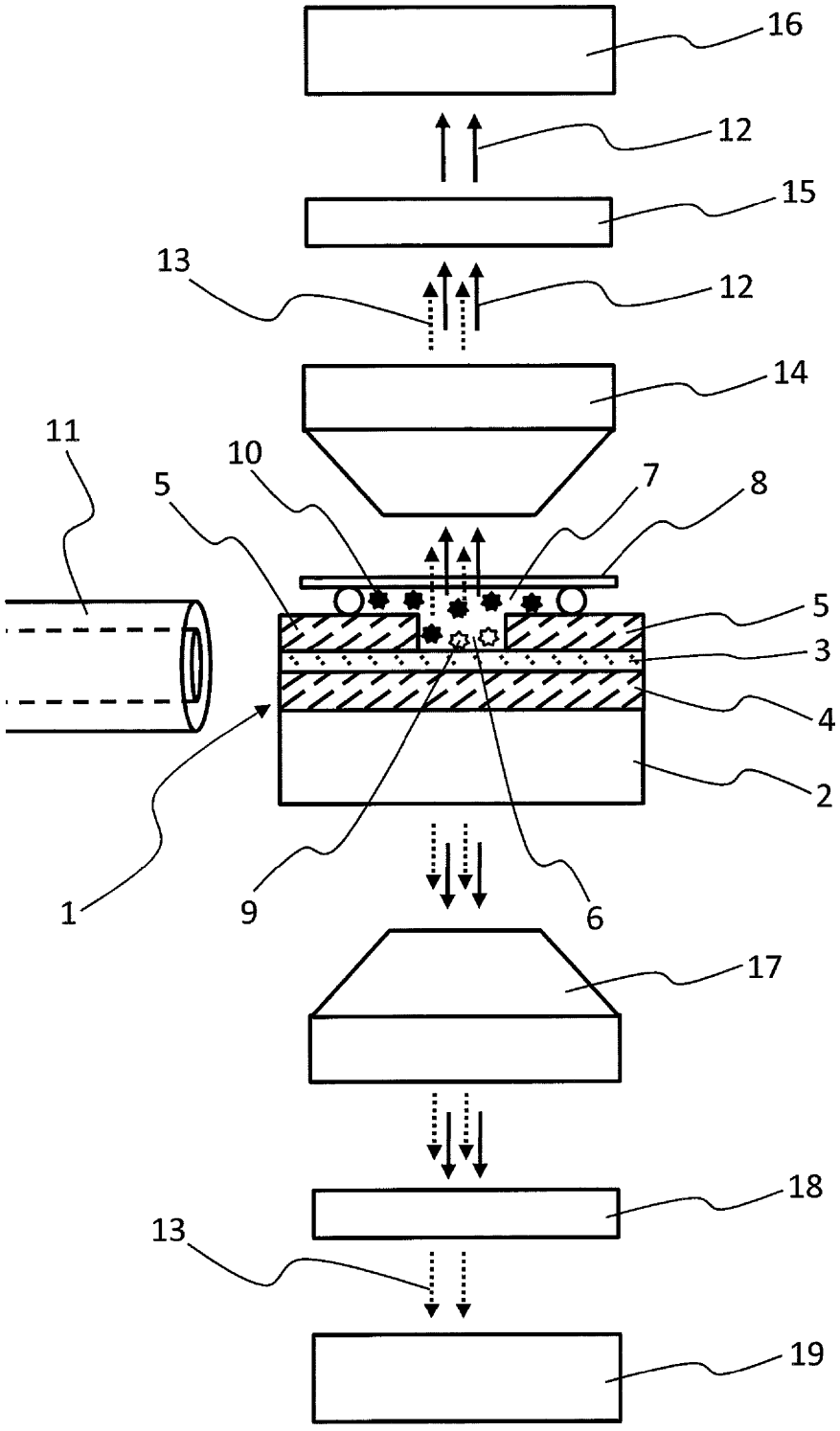


Figura 3

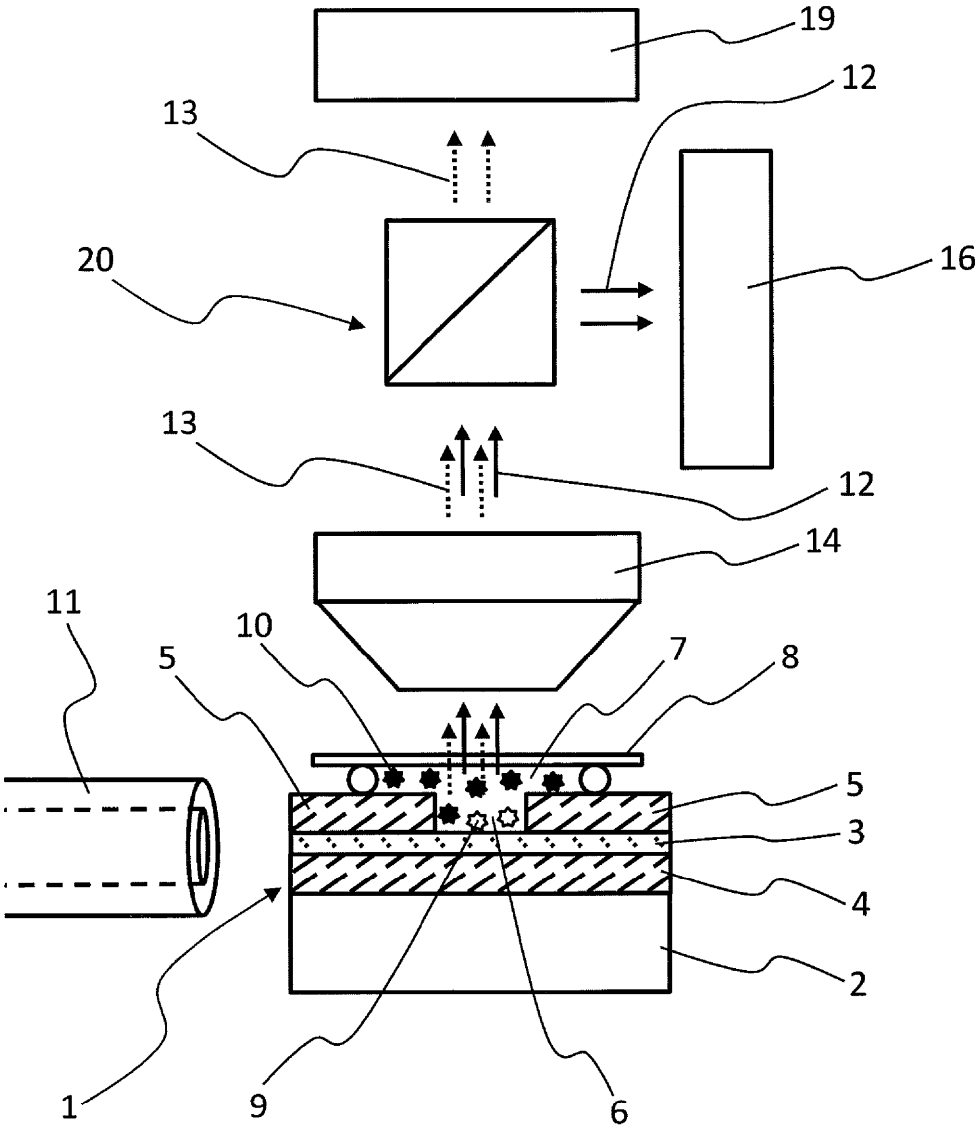


Figura 4

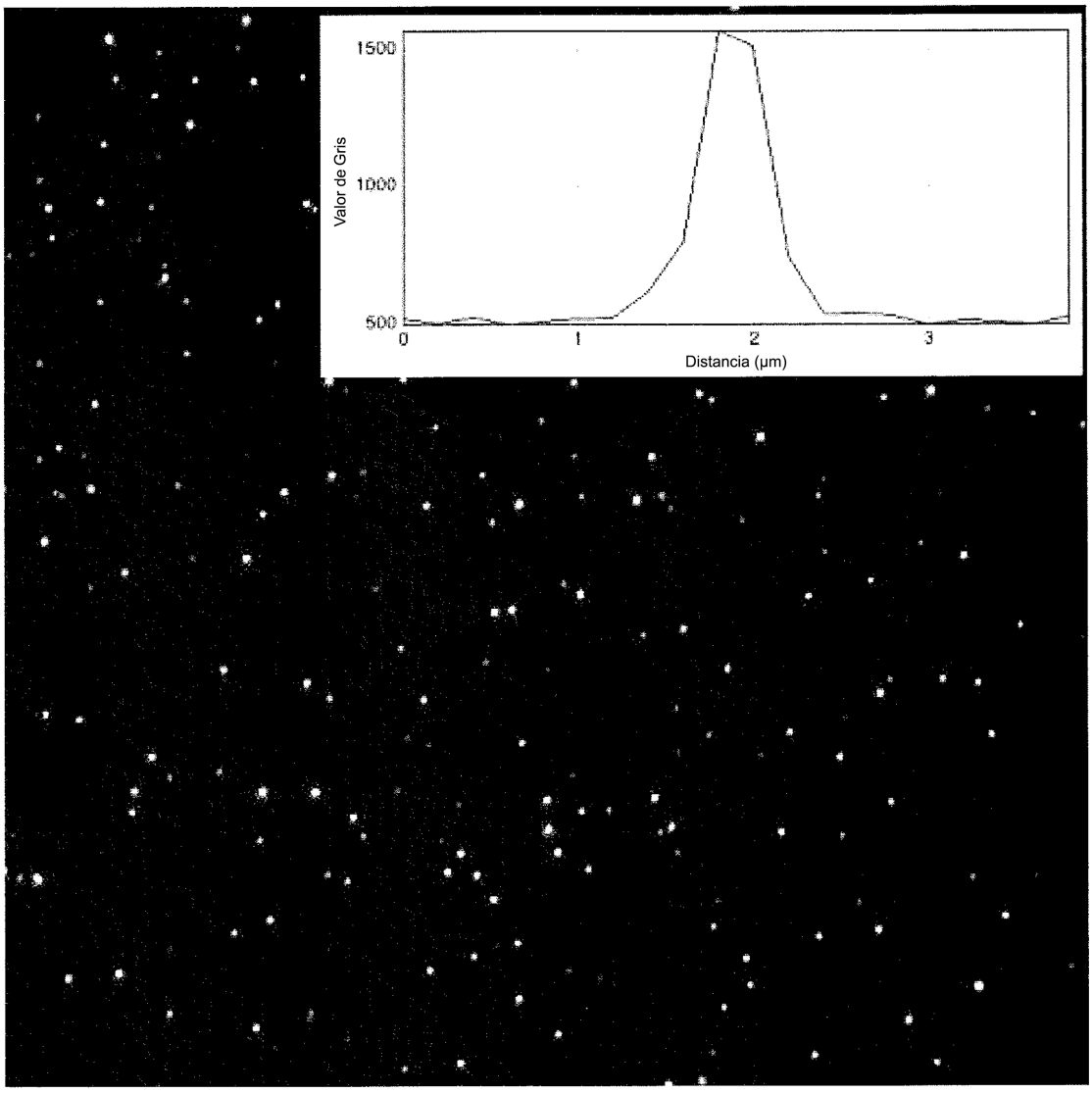


Figura 5

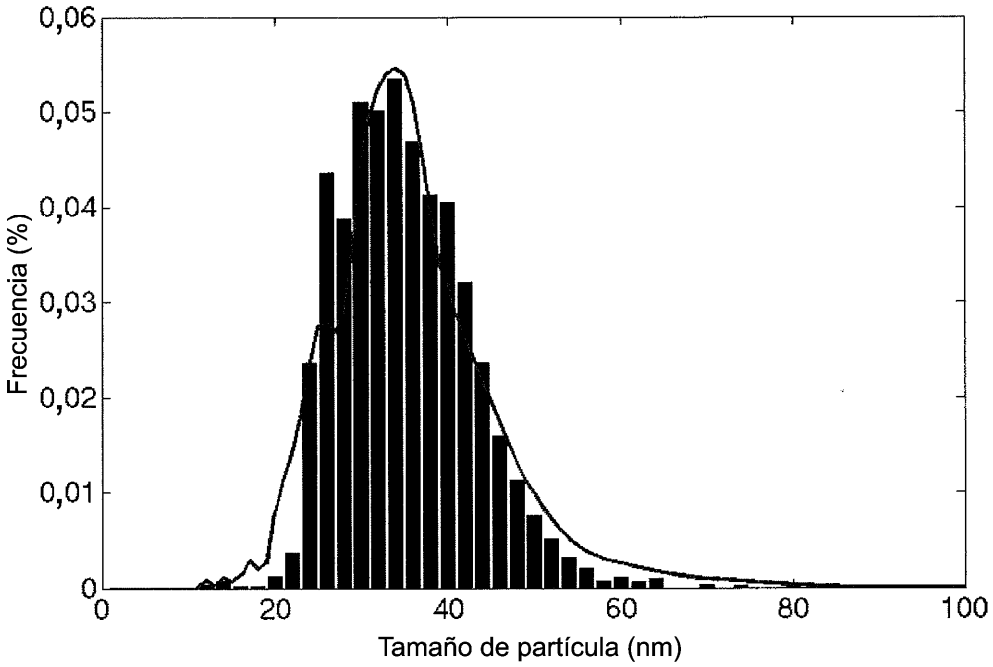

0,06
0,05
0,04
0,03
0,02
0,01
0
Frecuencia (%)
0
20
40
60
80
100
Tamaño de partícula (nm)

Figura 6

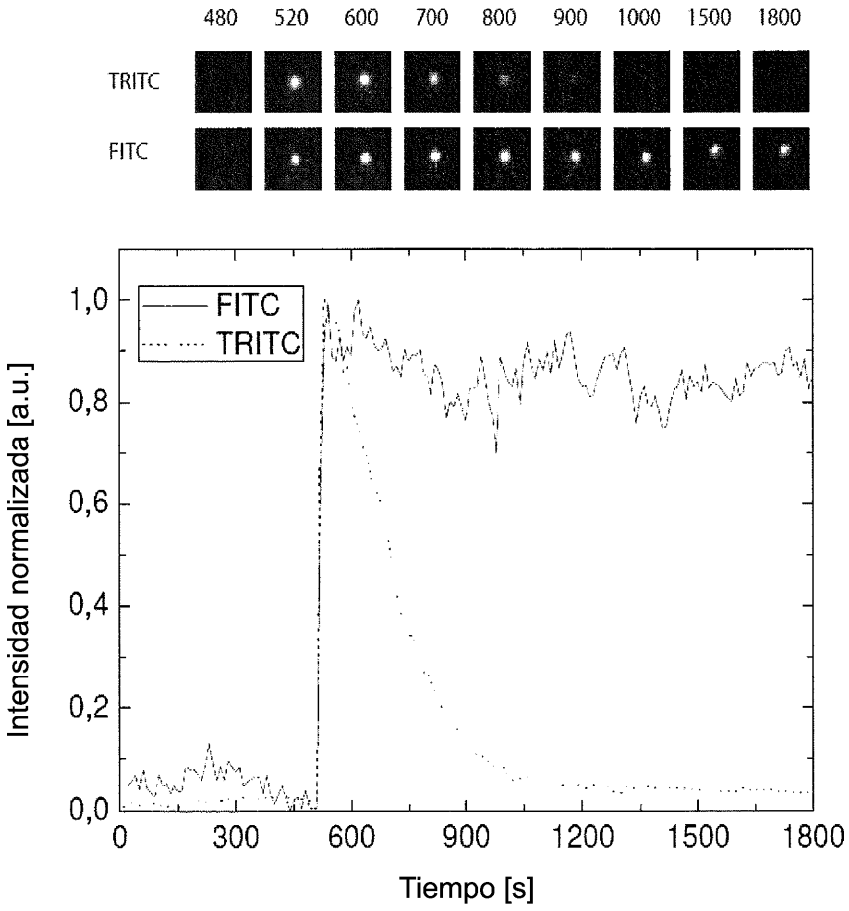

480
520
600
700
800
900
1000
1500
1800
TRITC
FITC
FITC
TRITC
Intensidad normalizada [a.u.]
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
0
300
600
900
1200
1500
1800
Tiempo [s]

Figura 7