

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 856 843**

51 Int. Cl.:

G01N 33/487 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.12.2015 PCT/IB2015/059799**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.06.2016 WO16098080**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.12.2015 E 15869455 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.12.2020 EP 3234571**

54 Título: **Integración de sensores de nanoporos dentro de arreglos de canales de microfluidos mediante el uso de ruptura controlada**

30 Prioridad:

19.12.2014 US 201462094669 P

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

28.09.2021

73 Titular/es:

**THE UNIVERSITY OF OTTAWA (100.0%)
3042-800 King Edward
Ottawa, Ontario K1N 6N5, CA**

72 Inventor/es:

**TABARD-COSSA, VINCENT;
GODIN, MICHEL;
TAHVILDARI, RADIN y
BEAMISH, ERIC**

74 Agente/Representante:

SÁNCHEZ SILVA, Jesús Eladio

ES 2 856 843 T3

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

DESCRIPCIÓN

Integración de sensores de nanoporos dentro de arreglos de canales de microfluidos mediante el uso de ruptura controlada

5

Campo

La presente descripción se refiere a la fabricación de sensores de nanoporos dentro de canales de microfluidos mediante ruptura controlada (CBD) en membranas de estado sólido.

10

Antecedentes

Los nanoporos son ahora una clase bien establecida de sensores sin etiquetas capaces de detectar moléculas individuales eléctricamente. La técnica se basa en la aplicación de una tensión a través de una abertura de nanoescamas en una membrana delgada y aislante sumergida en una solución iónica. La modulación de la corriente iónica resultante puede asociarse con la translocación de biomoléculas cargadas individuales, tal como el ADN y las proteínas, que son impulsadas electroforéticamente a través del nanoporo. Estos cambios en la conductancia proporcionan información sobre la longitud, el tamaño, la carga y la forma de las moléculas en translocación. Una variedad de estudios de moléculas individuales, incluida la secuenciación de ADN, la detección y el desnaturalización de proteínas, la espectrometría de masas de una sola molécula y la espectroscopia de fuerza, hacen que esta tecnología sea particularmente atractiva.

15

20

25

30

35

40

Los nanoporos pueden formarse incorporando poros proteicos en membranas de bicapa lipídica o fabricarse en membranas delgadas de estado sólido. Los poros biológicos ofrecen propiedades de muy bajo ruido, pero la alta fragilidad de la membrana de bicapa lipídica usada convencionalmente como estructura de soporte limita su vida útil y las tensiones que pueden aplicarse, restringiendo así algunas aplicaciones. Por otro lado, los nanoporos de estado sólido presentan una mayor durabilidad en un intervalo más amplio de condiciones experimentales, tal como tensiones aplicadas, temperatura y pH, y su tamaño puede ajustarse in situ. En principio, los nanoporos de estado sólido ofrecen una mayor propensión a integrarse en dispositivos robustos de laboratorio en un chip como arreglos. De hecho, estudios recientes revelaron varias estrategias de integración que embeben estos nanoporos en redes de microfluidos. Los nanoporos usados en estas investigaciones se construyen típicamente en una membrana dieléctrica ultrafina (de 10-nm a 50-nm) (por ejemplo, SiN) mediante el uso de haces de iones o de electrones de alta energía. Sin embargo, el uso de FIB o TEM para fabricar nanoporos presenta desafíos de integración. La necesidad de un acceso directo a la línea de visión cuando se perfora con haces de partículas energéticas exige que los nanoporos se fabriquen antes de su integración dentro de los dispositivos de microfluidos. Esto impone requisitos estrictos de alineación durante la fabricación de nanoporos y el ensamble del dispositivo, lo que genera desafíos que limitan el rendimiento de los dispositivos funcionales, particularmente para la formación de arreglos en una sola membrana o cuando las dimensiones de los canales de microfluidos se reducen para minimizar el ruido eléctrico. De manera más general, estas técnicas de nanofabricación convencionales se basan en la producción de nanoporos en un entorno de vacío, lo que inevitablemente presenta riesgos de manipulación y problemas de humectación cuando se pasa a soluciones acuosas para experimentos de biosensores.

45

50

55

Recientemente se propuso un método alternativo para fabricar nanoporos de estado sólido de manera confiable mediante el uso de campos eléctricos elevados y se denomina en la presente descripción fabricación de nanoporos por ruptura controlada (CBD). In situ y en condiciones de detección biológica experimental típicas (por ejemplo, en 1 M de KCl), se induce un evento de ruptura dieléctrica en la membrana aislante intacta de soporte que da como resultado la formación de un solo nanoporo con un diámetro tan pequeño como 1 nm de tamaño pero ajustable para tamaños más grandes con precisión sub-nm. La simplicidad del método CBD se presta bien a la integración de sensores de nanoporos dentro de arquitecturas de microfluidos complejas y a posibles dispositivos de laboratorio en un chip. Se espera que la combinación de las capacidades avanzadas de procesamiento y de manipulación de muestras inherentes a los dispositivos de microfluidos con la fabricación de nanoporos in situ mitigue varios problemas de integración y amplíe la gama de aplicaciones de la plataforma de detección. Pueden encontrarse más detalles sobre esta técnica de fabricación en la Publicación de Patente de los Estados Unidos Núm. 2015/0108808 que se titula "Fabrication of Nanopores using High Electric Fields".

60

Kwok y otros ("Nanopore Fabrication by Controlled Dielectric Breakdown", PLOS ONE, vol. 9, núm. 3, marzo de 2014) describen técnicas para la fabricación de nanoporos en una membrana controlando la ruptura dieléctrica a nanoescala. El método se basa en la aplicación de una tensión a través de una membrana aislante para generar un campo eléctrico alto, mientras se monitorea la corriente de fuga inducida.

65

Esta sección proporciona información de antecedentes relacionada con la presente descripción, que no es necesariamente una técnica anterior.

65

Resumen

5 Esta sección proporciona un resumen general de la descripción, y no es una descripción completa de su alcance total o de todas sus características. La presente invención se define en las reivindicaciones independientes. Las modalidades preferidas y los desarrollos adicionales se definen en las reivindicaciones dependientes de las mismas.

10 Como se define en la reivindicación 1 se presenta un aparato para fabricar uno o más nanoporos en una membrana. En algunas modalidades, la magnitud del potencial eléctrico a través de la membrana da como resultado que el campo eléctrico tenga un valor superior a 0,1 voltios por nanómetro.

15 El aparato incluye además: un sensor de corriente acoplado eléctricamente a uno de los electrodos y operable para medir la corriente que fluye entre uno o más canales de microfluidos y el microcanal común; y un controlador interconectado con el sensor de corriente, en donde el controlador detecta un aumento abrupto en la corriente medida que indica la formación de un poro y, en respuesta a la detección del aumento abrupto en la corriente medida, elimina el potencial eléctrico aplicado a través de la membrana.

20 En una modalidad, los dos o más electrodos adicionales incluyen un primer electrodo dispuesto en uno o más canales de microfluidos aguas arriba de la membrana y un segundo electrodo dispuesto en uno o más canales de microfluidos aguas abajo de la membrana.

25 En algunas modalidades, se forma una pluralidad de canales de microfluidos en la superficie interior del segundo sustrato. Cada microcanal tiene un conjunto de electrodos asociado. De esta manera, puede fabricarse un arreglo de nanoporos (correspondiente al número de canales de microfluidos) en la membrana.

Otro aspecto de la invención es un aparato para fabricar uno o más nanoporos en una membrana como se define en la reivindicación 11. En algunas modalidades, la magnitud del potencial eléctrico a través de la membrana da como resultado que el campo eléctrico tenga un valor superior a 0,1 voltios por nanómetro.

30 El aparato incluye además: un sensor de corriente acoplado eléctricamente a uno de los electrodos y operable para medir la corriente que fluye entre uno o más canales de microfluidos y el microcanal común; y un controlador interconectado con el sensor de corriente, en donde el controlador detecta un aumento abrupto en la corriente medida que indica la formación de un poro y, en respuesta a la detección del aumento abrupto en la corriente medida, elimina el potencial eléctrico aplicado a través de la membrana.

35 De acuerdo con la invención, se forman una pluralidad de canales de microfluidos en la superficie interior del segundo sustrato. En algunas modalidades, cada microcanal tiene un conjunto asociado de electrodos. De esta manera, puede fabricarse un arreglo de nanoporos (correspondiente al número de canales de microfluidos) en la membrana.

40 En otro aspecto más de esta descripción, el uno o más canales de microfluidos se encaminan adyacentes a la membrana de una manera que crea un campo eléctrico que es uniforme a través del área de la membrana y por lo tanto reduce el número de electrodos requeridos. En una modalidad, el canal de microfluidos forma un lazo aguas abajo del electrodo dispuesto en el canal, donde una sección del lazo se encamina sobre la membrana.

45 En algunas modalidades, una o más válvulas de control están dispuestas en el canal de microfluidos y funcionan para controlar la cantidad de flujo a través del canal de microfluidos. La válvula de control puede implementarse por un polímero elastomérico acoplado en comunicación de fluidos y accionado por una fuente neumática.

50 En algunas modalidades, se forman una pluralidad de canales de microfluidos en la superficie interior del segundo sustrato. Cada microcanal tiene un conjunto de electrodos asociado. De esta manera, puede fabricarse un arreglo de nanoporos (correspondiente al número de canales de microfluidos) en la membrana. Además, cada canal de microfluidos en el arreglo de canales de microfluidos pasa sobre una porción de la membrana y tiene al menos dos válvulas de control dispuestas en el mismo, una válvula está dispuesta aguas arriba de la membrana y la otra válvula está dispuesta aguas abajo de la membrana. De esta manera, el valor del potencial eléctrico a través de la membrana se controla ajustando el flujo a través de las válvulas de control dispuestas en el arreglo de canales de microfluidos.

60 Otras áreas de aplicabilidad resultarán evidentes a partir de la descripción proporcionada en la presente descripción. La descripción y los ejemplos específicos de este resumen están destinados únicamente a fines ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la presente descripción.

Dibujos

65 Los dibujos descritos en la presente descripción son solo para fines ilustrativos de modalidades seleccionadas y no todas las implementaciones posibles, y no pretenden limitar el alcance de la presente descripción.

La Figura 1 es un esquema de un aparato para fabricar nanoporos con un solo electrodo insertado a cada lado de la membrana.

Las Figuras 2A y 2B son una vista en sección transversal de una modalidad ilustrativa del aparato que tiene cinco canales de microfluidos independientes; e imágenes ópticas reflejadas tomadas desde arriba del aparato con los cinco canales de microfluidos situados directamente sobre la membrana, respectivamente.

Las Figuras 3A-3C son esquemas que representan un método de ensamble ilustrativo para el aparato que se muestra en la Figura 2A;

Las Figuras 4A-4C son esquemas que representan diferentes disposiciones de electrodos, que pueden usarse para crear un campo eléctrico uniforme a través del área de la superficie de la membrana.

Las Figuras 5A y 5B son una vista en sección transversal de una segunda modalidad ilustrativa del aparato con una capa de microvía; e imágenes ópticas reflejadas tomadas desde arriba del aparato con cinco canales de microfluidos situados directamente sobre la membrana pero aislados de la membrana por una capa de microvía.

Las Figuras 6A y 6B son imágenes que muestran el modelado de elementos finitos del campo eléctrico en el aparato con y sin vía de microfluidos, respectivamente.

Las Figuras 6C y 6D están ampliadas en imágenes del campo eléctrico que rodea al nanoporo que se muestra en las Figuras 6A y 6B, respectivamente.

La Figura 6E es un gráfico que representa la magnitud del campo eléctrico medido a lo largo del plano a la mitad de la membrana de SiN de 20-nm de espesor cuando se aplica una diferencia de potencial de 10 V (como en la fabricación de nanoporos).

La Figura 6F es un gráfico que representa la magnitud del campo eléctrico para un aparato sin microvía.

Las Figuras 7A y 7B son gráficos que muestran (a) la corriente de fuga a través de la membrana de SiN unos segundos antes de la fabricación de nanoporos mediante CBD a 10 V; y (b) curvas de corriente-tensión (IV) usadas para inferir el diámetro de los nanoporos mediante el uso de un modelo en base a la conductancia para cinco nanoporos fabricados independientemente en un solo dispositivo de cinco canales.

Las Figuras 8A y 8B son gráficos que muestran (a) comparación del ruido de densidad espectral de potencia (PSD); y (b) trazas de corriente, respectivamente, en una celda macroscópica (negra), dispositivo de cinco canales (azul) y dispositivo de cinco canales con microvías (rojo). Todas las mediciones se realizaron en ausencia de nanoporos fabricados sin tensión aplicado, muestreados a 250 kHz y filtrados en paso bajo a 100 kHz mediante un filtro Bessel de 4 polos en 1 M de KCl pH 7,5.

Las Figuras 9A y 9B son diagramas de dispersión del bloqueo de corriente promedio normalizado (0% representa un poro completamente abierto y 100% un poro completamente bloqueado) contra la duración total del evento de (a) detección de α -trombina humana mediante el uso de un poro de 10,5-nm para una tensión aplicada de -200 mV, y (b) translocación de dcADN de 10-kb a través de un poro de 11,5-nm a -200 mV (cuadrados negros), -250 mV (triángulos rojos) y -300 mV (círculos azules), respectivamente. Cada punto de datos representa un solo evento. Los recuadros muestran bloqueos de corriente transitorios a medida que las biomoléculas interactúan con el nanoporo. Para mayor claridad, los datos se multiplicaron por -1 en los recuadros.

Las Figuras 10A y 10B son vistas en sección transversal de una válvula neumática micromecánica ilustrativa sin y con presión aplicada al canal de control, respectivamente.

La Figura 11 es una vista superior esquemática de un dispositivo de arreglo 5x1 con cinco pares de válvulas neumáticas y que emplea un solo par de electrodos.

La Figura 12 es una vista superior esquemática de un dispositivo de arreglo de 5x1 que emplea dos electrodos superiores.

La Figura 13 es una vista superior esquemática de un dispositivo de arreglo de 2x1 con dos pares de válvulas neumáticas y dos electrodos superiores.

Los números de referencia correspondientes indican partes correspondientes en las diversas vistas de los dibujos.

Descripción detallada

A continuación, se describirán más completamente modalidades ilustrativas con referencia a los dibujos adjuntos.

La Figura 1 muestra un aparato 10 para fabricar uno o más nanoporos en una membrana 12. El aparato 10 se compone generalmente de un (primer) sustrato inferior 15, un (segundo) sustrato superior 14 y una estructura de soporte 16 dispuesta entre los sustratos superior e inferior 14, 15. La estructura de soporte 16 se configura para alojar una membrana delgada dieléctrica 12 que define superficies planas opuestas. Con fines ilustrativos, se forma un único canal de microfluidos 4 en el sustrato superior 14 y se forma un canal de microfluidos 5 común más grande en el sustrato inferior 15. Un par de electrodos 17 acoplados eléctricamente a una fuente de tensión 18 se usan para generar un potencial eléctrico a través de la membrana; con un solo electrodo colocado en cada canal de microfluidos 4, 5. Como se describirá con más detalle a continuación, el aparato puede tener más canales de microfluidos con diferentes disposiciones de electrodos.

El aparato 10 incluye además un sensor de corriente (no se muestra) acoplado eléctricamente a uno de los electrodos y un controlador 19 interconectado con el sensor de corriente y la fuente de tensión 18. Durante el funcionamiento, el sensor de corriente mide las corrientes que fluyen a través de la membrana. El controlador 19 a su vez detecta un aumento abrupto de la corriente medida y, en respuesta a la detección del aumento abrupto de la corriente medida, elimina el potencial eléctrico aplicado a través de la membrana como se describirá más adelante.

Las Figuras 2A y 2B representan además una modalidad ilustrativa del aparato 10'. En esta modalidad ilustrativa, chips de silicio disponibles comercialmente (por ejemplo, tamaño de marco de 3-mm) que poseen una membrana expuesta de SiN de 500X500- μm^2 , 20-nm de espesor (SiMPore Inc. SN100-A20Q05) sirven como la estructura de soporte 16 y se montaron entre arreglos de microfluidos de canales de diferentes arquitecturas. Con referencia a la Figura 2A, el aparato 10' presentado en la presente descripción usó geometrías que contienen cinco canales de microfluidos direccionables independientemente 21 en un lado de la membrana 12, mientras que el otro lado de la membrana 12 fue accedido por un único microcanal común 22. Más específicamente, el aparato 10' incluía un arreglo de cinco canales de microfluidos independientes 21 que constan de canales anchos de 200- μm de ancho (50- μm de altura) que se estrechan sobre la membrana 12 hasta un ancho de 15- μm como se ve mejor en la Figura 2B. Cada uno de los cinco canales independientes 21 está separado entre sí por 25- μm . Aunque en esta modalidad se muestran cinco canales de microfluidos independientes, se comprende fácilmente que pueden formarse más o menos canales de microfluidos en otras modalidades.

En la modalidad ilustrativa, cada capa se fabricó mediante litografía blanda mediante el uso de PDMS de polidimetilsiloxano (Sylgard 184 de Dow Corning en una relación 7:1 (p/p)), modelada a partir de un molde maestro preparado mediante fotolitografía blanda. En todas las configuraciones, la capa inferior consistió en una capa de ~3-mm de espesor de PDMS que contenía un solo canal de microfluidos 22 de 250- μm de ancho por 100- μm de alto unido a un portaobjetos de vidrio (unión por plasma de oxígeno, AutoGlow Research). Con el fin de permitir el acceso fluido a los nanoporos, se perforó a mano un orificio de 2-mm a través de este microcanal inferior común 22 sobre el cual se asentaba el lado grabado del chip de silicio. A continuación, se revistió por centrifugación una capa fina (100 \pm 10- μm) de PDMS alrededor del chip 16 para compensar el espesor del chip de silicio y dejar una superficie lisa y sellada sobre la que podrían unirse los múltiples canales de microfluidos. Después del recubrimiento por centrifugación, esta fina capa de PDMS se curó en una placa caliente a 80°C durante 20 minutos.

Las Figuras 3A-3C ilustran además este proceso de fabricación. Los dispositivos presentados integran membranas de nitruro de silicio (SiN) disponibles comercialmente (SN100-A20Q05, SiMPore Inc.) dentro de dispositivos de microfluidos hechos de polidimetilsiloxano (PDMS). Las capas de PDMS se replicaron a partir de un molde maestro fabricado mediante litografía blanda y fabricado con resina fotosensible SU8-2050 (Microchem Inc.) en una oblea de silicio. Cada capa de microfluidos (vía de microfluidos, capas independientes y canal común) se fabricó mediante el uso de diferentes velocidades de centrifugado, tiempo y temperatura de calentado, exposición a los rayos UV y tiempos de revelado en dependencia del espesor (altura) final deseado de las características resultantes.

Después de la fabricación de cada molde maestro, las obleas se trataron primero con aminosilano para facilitar la eliminación de PDMS. Luego se vertió PDMS (base de 7:1 (p/p): agente de curado para todas las capas) sobre el molde maestro para cada capa del canal, seguido de desgasificación en una cámara de vacío durante 30 minutos y calentado a 80°C durante 2 horas. A continuación, el PDMS curado se despegó del molde para crear la estructura de microcanales. A continuación, se cortaron los componentes individuales del dispositivo y se perforaron orificios de acceso para la introducción de fluido y electrodos a través de los canales independientes (0,75 mm de diámetro exterior para los tubos de microfluidos y 1,25 mm de diámetro exterior para los electrodos). También se perforó a mano un orificio de 2,0 mm en el medio del microcanal común para permitir el acceso fluido a la parte inferior del chip. Con referencia a la Figura 3A, el chip de silicio (lado grabado) se unió luego a la capa del canal común encima del orificio perforado mediante el uso de plasma de oxígeno (Glow Research AutoGlow). Todas las etapas de unión con plasma se realizaron a 30 W durante 30 segundos.

Para compensar el espesor del chip de silicio y dejar una superficie lisa y nivelada para la unión de los canales independientes (superiores) en ambas configuraciones (con y sin capas de microfluidos), una capa delgada (-100 \pm 10 μm) de PDMS se hizo girar alrededor del chip (5 s @ 500 rpm seguido de 10 s @ 1000 rpm). Esta fina capa se curó directamente en una placa caliente a 80 °C durante 20 minutos.

Para permitir el acceso fluido y eléctrico a los canales de microfluidos, se perforaron orificios a través de cada uno de los canales comunes superiores e inferiores separados de manera fluida antes de la unión para acomodar el ajuste apretado de los electrodos de Ag/AgCl y la solución de electrolito (o iónico) que fluye de la tubería de PEEK. Al colocar los electrodos a ~5-mm del centro de la membrana, la resistencia del microcanal que conduce al nanoporo se limita a ~100 k Ω en una solución de electrolito de 1 M de KCl, menos del ~1 % de la resistencia eléctrica total de un dispositivo que contiene un nanoporo con un diámetro de 10-nm. Finalmente, el canal común se unió a un portaobjetos de vidrio limpio. Aunque se ha hecho referencia a una técnica de fabricación particular, se entiende que otras técnicas litográficas también caen dentro del alcance de esta descripción.

Inmediatamente antes de introducir la solución de electrolito en los canales de microfluidos, el dispositivo ensamblado se trató con plasma de oxígeno durante 5 minutos a 70 W para aumentar la hidrofiliidad del microcanal. Los canales de microfluidos se conectaron luego a viales de muestra con tubos de polietileno y se inició el flujo presurizando los viales mediante el uso de reguladores de presión de alta precisión. El sellado efectivo (> 10 G Ω) entre los canales de microfluidos se probó antes de la fabricación de nanoporos haciendo fluir una solución de 1 M de KCl (pH 7,5) e intentando medir la corriente iónica entre los canales de microfluidos bajo una tensión moderado aplicada (por ejemplo, 0,2 V - 1 V).

Para mejorar la funcionalidad del aparato, los contaminantes y los monómeros deben eliminarse del material de microfluidos usado para fabricar el aparato. En particular, las piezas de polidimetilsiloxano (PDMS) deben tratarse químicamente con solventes antes de ensamblar el dispositivo y pueden usarse tratamientos con plasma para eliminar contaminantes en la superficie de la membrana como resultado de la integración de microfluidos.

De acuerdo con un aspecto de esta descripción, la colocación de electrodos dentro de los canales de microfluidos debería dar como resultado un campo eléctrico uniforme sobre el área de la membrana aislante. Pueden usarse varias colocaciones de electrodos en dependencia de la arquitectura de microfluidos como se observa en las Figuras 4A-4D. En el caso de un solo microcanal colocado sobre la membrana delgada aislante, un solo par de electrodos colocados a cada lado de la membrana, en algún lugar a lo largo de los canales de microfluidos, producirá un campo eléctrico no uniforme a través de la superficie de la membrana. Sin embargo, colocar dos electrodos polarizados al mismo potencial eléctrico, en el mismo canal de microfluidos pero en ambos lados de la membrana (es decir, un electrodo aguas arriba de la membrana mientras que el otro electrodo está aguas abajo de la membrana), puede aumentar la uniformidad del campo eléctrico como mejor se observa en la Figura 4A. En este ejemplo, se usa un conjunto de electrodos 30 para generar un potencial eléctrico a través de la membrana 12. El conjunto de electrodos 30 incluye un electrodo 33 colocado debajo de la membrana y dos o más electrodos adicionales 32 colocados encima de la membrana. Más específicamente, los dos electrodos 32 se colocan en el canal de microfluidos del sustrato superior; mientras que el electrodo 33 se coloca en el canal de microfluidos común del sustrato inferior. Los dos electrodos adicionales 32 están dispuestos en relación con la membrana de manera que el campo eléctrico a través de la membrana sea uniforme. Por ejemplo, uno de los electrodos adicionales 32 puede disponerse aguas arriba de la membrana mientras que el otro de los electrodos adicionales 32 puede disponerse aguas abajo de la membrana. Esta descripción también contempla otras ubicaciones para los dos electrodos adicionales.

Con referencia a la Figura 2A, la parte inferior de la estructura de soporte 16 incluye un rebaje ahusado 13 que ayuda a dar forma al campo eléctrico de manera uniforme, de manera similar al papel que juega la vía, y por lo tanto permite el uso de un solo electrodo 33.

En algunas modalidades, la membrana 12 puede colocarse directamente sobre el sustrato inferior 15 y soportarlo sin el uso de una estructura de soporte 16. En estas modalidades, puede colocarse un segundo electrodo de referencia 33 en la parte inferior de la membrana como se observa en la Figura 4C. En particular, uno de los electrodos 33 está dispuesto aguas arriba de la membrana mientras que el otro de los dos electrodos 33 puede disponerse aguas abajo de la membrana. De esta manera, los dos electrodos 33 funcionan para dar forma al campo de electrodos próximo a la membrana de manera uniforme.

La Figura 4B muestra una disposición de electrodos alternativa. En esta disposición, un solo electrodo 35 se coloca dentro de un canal de microfluidos en lazo 36 que contiene una solución iónica para lograr un campo eléctrico uniforme similar a través de la superficie de la membrana. El canal de microfluidos 36 forma un lazo aguas abajo del electrodo 35 y una sección del lazo se encamina sobre la membrana. La válvula en un aparato de este tipo está presurizada, cerrando el canal de flujo inferior. Durante el proceso de fabricación de nanoporos, se liberará la presión de la válvula (se abre el canal de microfluidos). De esta manera, la presencia de la solución de electrolito a través del canal en lazo dará forma al campo eléctrico de manera uniforme. Esta configuración es escalable a varios canales de microfluidos mediante el uso de tecnología de microválvulas (por ejemplo, como se observa en la Figura 11). En esta disposición alternativa, se entiende que el único electrodo 33 puede colocarse debajo de la membrana como se describe en relación con la Figura 4A o e pueden usarse dos electrodos como se describe en relación con la Figura 4B.

Los microelectrodos también pueden modelarse dentro de los canales de microfluidos para lograr campos eléctricos igualmente uniformes. Estos electrodos con patrón de superficie, mantenidos al mismo potencial, pueden colocarse como se describió anteriormente para dar como resultado un campo eléctrico uniforme. Los electrodos circulares centrados alrededor de la membrana aislante también pueden garantizar la uniformidad del campo. Puede diseñarse un único microelectrodo con patrón directamente encima de la membrana aislante o dentro de cada canal de microfluidos individual. Tales electrodos con patrón de superficie serían particularmente beneficiosos en chips de diseño personalizado donde pueden formarse arreglos de nanoporos a gran escala. En esta descripción también se contemplan otras variantes de disposiciones de electrodos que dan como resultado un campo eléctrico uniforme.

En otro aspecto de esta descripción, pueden añadirse microvías al sistema de microfluidos para ayudar a dar forma al campo eléctrico dentro y alrededor de la vía. Las Figuras 5A y 5B representan una segunda modalidad ilustrativa del aparato 10". En esta modalidad, el aparato se compone de nuevo de un sustrato superior 14, un sustrato inferior 15 y una estructura de soporte 16 dispuesta entre los sustratos superior e inferior. La estructura de soporte 16 está igualmente configurada para albergar una membrana delgada dieléctrica 12 que define superficies planas opuestas 13. En esta modalidad, se forma una capa intermedia 19 sobre la estructura de soporte 16 y está dispuesta entre el sustrato superior 14 y la estructura de soporte 16. Pueden formarse una o más vías 51 en la capa intermedia 19 y configurarse para crear un campo eléctrico que sea uniforme dentro y alrededor de la vía.

Esta segunda configuración de microfluidos se diseñó para localizar la formación de nanoporos por CBD en cada microcanal en el centro de la membrana, y para reducir aún más el ruido eléctrico de alta frecuencia al minimizar el

área de la membrana expuesta a la solución iónica. En esta segunda configuración, se usó una capa de 200- μm de espesor de PDMS con un arreglo de aberturas rectangulares, que variaban en longitud de 40- μm a 120- μm con un ancho constante de 15- μm , para formar vías de microfluidos que unían los canales de microfluidos a un área bien definida sobre el centro de la membrana. Para fabricar microfluidos delgados (200 μm) mediante capas sobre las que podían unirse canales independientes, se centrifugó PDMS desgasificado en su molde maestro (5 s @ 500 rpm seguido de 10 s @ 800 rpm) y se curó directamente en una placa caliente a 80 °C por 30 minutos. Con el fin de situar con precisión las vías de microfluidos y las capas de canales independientes encima de la membrana de SiN, todas las etapas de alineación se realizaron mediante el uso de un alineador de máscara OAI DUJ/NUV (Modelo 206). Esta capa se unió luego a la matriz de cinco canales de microfluidos de PDMS independientes como en el diseño inicial. Excepto como se indicó anteriormente, la segunda modalidad del aparato 10" se fabricó de la misma manera que se describe en relación con las Figuras 3A-3C.

Para comprender los efectos de agregar una capa de microvía a la configuración de microfluidos, se exploró el modelado de elementos finitos del campo eléctrico en ambas geometrías del dispositivo (con y sin una vía de microfluidos). Las configuraciones de los dispositivos se generaron en 2D y los campos eléctricos se modelaron mediante el uso de un estudio estacionario dentro del módulo de Corrientes Eléctricas del Software de Modelado COMSOL Multiphysics. Ambas geometrías se examinaron primero con una membrana intacta (sin conexión acuosa a través de la membrana) y luego con un nanoporo (conducto de microfluidos de 20-nm a través de la membrana).

Las Figuras 6A y 6B muestran la geometría de un dispositivo con un microcanal independiente colocado directamente sobre la membrana; y un dispositivo que contiene una vía de microfluidos, respectivamente. Ambos dispositivos contienen un poro de 20-nm en el centro de la membrana. Un acercamiento del área que rodea al nanoporo en la Figura 6D muestra que el campo eléctrico en la vecindad inmediata del nanoporo en la configuración de vías de microfluidos es relativamente uniforme a través de la membrana y el poro. Esto se destaca por el hecho de que la intensidad del campo eléctrico decae uniformemente alejándose del nanoporo a cada lado de la membrana. Además, las líneas del campo eléctrico son simétricas de izquierda a derecha a pesar de que ambos electrodos se colocan 3 mm a la izquierda del nanoporo. Por el contrario, la Figura 6C muestra que las líneas del campo eléctrico son bastante no uniformes en las mismas condiciones en un dispositivo sin una vías de microfluidos. Tanto las líneas del campo eléctrico como la intensidad del campo difieren tanto a través de la membrana como de izquierda a derecha en el microcanal independiente (superior).

Una mayor investigación de la forma del campo eléctrico en estas configuraciones muestra que la fabricación de nanoporos mediante el uso de CBD también puede verse afectada por la colocación asimétrica de electrodos. La Figura 6E muestra la magnitud del campo eléctrico a través de una sección transversal horizontal de una membrana intacta en dispositivos con y sin vías de microfluidos. En este ejemplo, se aplicó una diferencia de potencial de 10 V a través de la membrana para simular las condiciones de fabricación de nanoporos usadas en la práctica. Mientras que el dispositivo que contiene unas vías de microfluidos exhibe un campo eléctrico uniforme a lo largo de la membrana expuesta, el dispositivo en el que el microcanal independiente (superior) se coloca directamente sobre la membrana exhibe un campo eléctrico más fuerte más cerca del lado donde se colocan los electrodos.

Para ambas modalidades ilustrativas, se fabricaron nanoporos individuales induciendo un evento de ruptura dieléctrica discreta en cada uno de los canales de microfluidos independientes integrados sobre la membrana. Brevemente, esto se hizo aplicando campos eléctricos altos mediante el uso de circuitos electrónicos personalizados. Se aplicó una diferencia de potencial que variaba de 10 V a 14 V a uno de los canales de microfluidos independientes con respecto al microcanal común conectado a tierra para fabricar un nanoporo en minutos o segundos. La magnitud del potencial eléctrico a través de la membrana da como resultado que el campo eléctrico tenga un valor superior a 0,1 voltios por nanómetro. Esta diferencia de potencial también indujo una corriente de fuga a través de la membrana de SiN, que se monitorea en tiempo real (ver Figura 7A). La formación de un solo nanoporo se detecta por el aumento repentino y abrupto de la corriente de fuga más allá de un umbral predefinido, por lo que la tensión aplicada se corta con un tiempo de respuesta de 0,1 s. Si bien la corriente de umbral y el tiempo de respuesta pueden variarse para lograr un tamaño de nanoporo resultante deseado después del evento de ruptura, los que se discuten en la presente descripción eran típicamente de menos de 2-nm de diámetro (condiciones de corte estrecho). Luego, este proceso se repite en cada microcanal superior separado mediante fluidos, lo que da como resultado nanoporos direccionables independientemente en una sola membrana pero ubicados en diferentes canales de microfluidos. Después de la fabricación de nanoporos, se realizaron mediciones sensibles para la caracterización eléctrica y la detección de una sola molécula mediante el uso de un amplificador de corriente de bajo ruido Axopatch 200B (Molecular Devices).

Con el fin de obtener nanoporos del tamaño deseado para la detección de biomoléculas específicas, cada nanoporo se fabricó como se describió anteriormente y luego se acondicionó mediante el uso de campos eléctricos elevados formados por la aplicación de pulsos alternos de -5 V y +5 V a través de la membrana. Este tratamiento se usó para optimizar las propiedades del ruido eléctrico y rejuvenecer los nanoporos obstruidos para nuevos experimentos con resultados comparables a los informados en estudios anteriores que usaron depósitos de microfluidos macroscópicos. Pueden encontrarse más detalles con respecto a esta técnica de acondicionamiento en la Publicación de Patente de los Estados Unidos Núm. 2015/0109008 que se titula "Method for Controlling the Size of Solid-State Nanopores".

Para inferir el diámetro de cada nanoporo fabricado por CBD, se midió directamente su conductancia G en solución monitoreando la corriente iónica que pasa a través de cada nanoporo mientras se barría una diferencia de potencial aplicada de -200 mV a +200 mV. Suponiendo una geometría cilíndrica y teniendo en cuenta la resistencia de acceso 30, el diámetro efectivo d , del nanoporo puede calcularse a partir de su conductancia mediante la siguiente relación:

$$G = \sigma \left(\frac{4L}{\pi d^2} + \frac{1}{d} \right)^{-1} \quad (1)$$

En la Ecuación 1, σ es la conductividad volumétrica del electrolito y L es la longitud efectiva del nanoporo, que se asume que es igual al espesor nominal de la membrana de SiN. Las curvas de corriente-tensión (I-V) en la Figura 2(c) muestran una respuesta óhmica en 1 M de KCl pH 7,5 ($\sigma = 10,1 \pm 0,1 \text{ Sm}^{-1}$) para cinco nanoporos formados independientemente que varían en tamaño de 3-nm a 10-nm en un solo dispositivo de cinco canales. El error incurrido al ignorar la contribución de la carga superficial en la ecuación 1 afecta la precisión del diámetro de nanoporo calculado efectivo en <0,5-nm para las altas concentraciones de sal usadas en la presente descripción, mientras que el error atribuido a los valores de la conductividad del electrolito y el espesor de la membrana afecta la incertidumbre del diámetro del nanoporo en -0,3-nm.

Para caracterizar aún más el rendimiento, se adquirieron gráficos de densidad espectral de potencia (PSD) de la corriente iónica para los nanoporos fabricados en cada una de las dos arquitecturas de microfluidos (ver Figura 8A). Mientras que el ruido de baja frecuencia (por debajo de 1 kHz) es típicamente del tipo $1/f$, el ruido de alta frecuencia se rige por las propiedades dieléctricas y la capacitancia del dispositivo que surge del área de superficie expuesta a la solución de electrolito. Por lo tanto, minimizar la superficie expuesta a la solución conduce a una reducción de este ruido de alta frecuencia, lo que mejora significativamente la relación señal/ruido durante la detección de biomoléculas en un ancho de banda elevado. Esto se ilustra en la Figura 8A, donde ambos dispositivos de 5 canales (con y sin microvías) se comparan con un chip de nanoporos montado entre depósitos de microfluidos en una celda de microfluidos estándar. En este intervalo de alta frecuencia, el dispositivo de microfluidos de 5 canales (sin la microvía) exhibe características de ruido comparables en comparación con las adquiridas en la celda macroscópica. Este resultado es consistente con el argumento de que el ruido en este régimen surge de la cantidad de área de membrana expuesta calculada en $\sim 3 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ para el depósito macroscópico y $\sim 2 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ para un microcanal en el dispositivo estándar de 5 canales. Sin embargo, cuando el área de la membrana expuesta se reduce 350 veces a $\sim 6 \times 10^2 \mu\text{m}^2$ mediante el uso de la microvía más pequeña ($40 \times 15 \mu\text{m}^2$) del dispositivo de 5 canales, el ruido de alta frecuencia se reduce significativamente. Esta reducción de ruido se destaca aún más por las trazas de corriente iónica de línea base de cada dispositivo mientras no se aplica tensión, como se muestra en la Figura 8B, donde el ruido de pico a pico a un ancho de banda de 100 kHz se reduce en un factor de 2 (5 a un ancho de banda de 10 kHz) en la configuración con microvías, mientras que el ruido RMS se reduce en un factor de 7 a 10 kHz y 2 a 100 kHz de ancho de banda.

Con referencia a las Figuras 9A y 9B, la funcionalidad de estos dispositivos se evaluó observando la translocación de biomoléculas. En cada caso, los nanoporos se fabricaron primero y se ampliaron hasta un diámetro deseado como se describió anteriormente. Después de la introducción de la muestra, el flujo se minimizó en los canales de microfluidos apagando los reguladores de presión. La Figura 9A muestra un diagrama de dispersión de los bloqueos de conductancia y las duraciones a medida que se detectan moléculas individuales de α -trombina humana (Haematological Technologies, Inc.) a una concentración de 250 μM mediante el uso de un nanoporo de 10,5 nm en un canal de microfluidos (sin vías) en 1 M de KCl pH 8,0. Aquí, las moléculas de proteína se cargaron en uno de los cinco canales de microfluidos superiores independientes, que estaba sesgado a -200 mV en relación con el canal inferior común conectado a tierra. En general, se observaron más de 5000 eventos individuales. La Figura 9B muestra un diagrama de dispersión similar de eventos de translocación de ADN a través de un nanoporo diferente de 11,5-nm, que se localizó dentro de un microcanal que incluía una microvía. Aquí, una solución 3 pM de dcADN de 10 kpb en 2 M de KCl pH 10 se agregó al microcanal superior mientras que se aplicaron sesgos de -200 mV, -250 mV y -300 mV en relación con el canal común, lo que resultó en más de 1500 eventos de translocación. Vale la pena señalar que las magnitudes de los bloqueos de conductancia obtenidos tanto para la proteína como para los eventos de dcADN de un solo nivel, están de acuerdo con los modelos y experimentos previamente informados que usan células macrofluidicas estándar.

El diseño de microfluidos debe considerarse cuidadosamente al integrar nanoporos mediante el uso de este enfoque. Mientras que los nanoporos integrados dentro de los canales de microfluidos colocados directamente sobre la membrana (sin una microvía) pudieron capturar y detectar muestras proteicas en el 30 % de los dispositivos probados (9 de 30), la eficiencia de captura y el rendimiento experimental de los dispositivos capaces de demostrar que la translocación de ácidos nucleicos se redujeron notablemente. Aquí, el criterio usado para definir el rendimiento experimental es un dispositivo capaz de detectar más de 1000 eventos de translocación biomolecular. Es importante señalar que la colocación de los electrodos dentro de los canales de microfluidos que conducen a la membrana introduce una falta de uniformidad en el campo eléctrico en la membrana y cerca del nanoporo cuando el microcanal superior contiene solo un electrodo. Es posible que esta asimetría dé como resultado la fabricación de un

nanoporo cerca del borde de la membrana (cerca del borde del chip de soporte de silicio), una región que puede estar más estresada al unirse a la capa de microcanal PDMS. En esta región, las características de carga superficial de la membrana en la vecindad del nanoporo pueden prevenir electrostáticamente la translocación de polímeros de ácidos nucleicos grandes y altamente cargados mientras permiten el paso de polipéptidos menos cargados. La introducción de una microvía, sin embargo, localiza la fabricación de nanoporos en una región deseada en el centro de la membrana o lejos de los bordes y asegura un campo eléctrico más simétrico, rendimiento para 3 de 4 dispositivos probados en pH 10. También es posible reducir esta asimetría en el campo eléctrico incorporando pares de electrodos polarizados al mismo potencial, en los canales superiores independientes a cada lado de la membrana como se describió anteriormente. En esta configuración, 5 de los 6 dispositivos probados en pH 8 tuvieron éxito en la detección de al menos 1000 eventos de translocación biomolecular.

En otro aspecto más de esta descripción, la tecnología de microválvulas puede desempeñar un papel en la consecución de la integración de microfluidos a gran escala. El desarrollo de microválvulas funcionalmente confiables es también un paso importante hacia la miniaturización y comercialización exitosa de sistemas de microfluidos totalmente automatizados. Las microválvulas se usan para controlar el flujo de fluido y encaminar la corriente eléctrica/iónica a través de la red de microfluidos. Pueden usarse varios enfoques, como válvulas de tornillo, neumáticas y solenoides, para integrar válvulas dentro de dispositivos de microfluidos.

La Figura 11 representa una modalidad ilustrativa del aparato 110 que emplea tecnología de microválvulas neumáticas. El aparato se compone generalmente de un sustrato superior, un sustrato inferior, una estructura de soporte dispuesta entre los sustratos superior e inferior, y también puede incluir una capa intermedia, como se describió en las modalidades expuestas anteriormente. En esta modalidad ilustrativa, se forman cinco canales de microfluidos 112 en el sustrato superior. De nuevo, pueden formarse más o menos canales de microfluidos en otras modalidades.

Los canales de microfluidos 112 se encaminan junto a la membrana de una manera que crea un campo eléctrico que es uniforme a través del área de la membrana. Por ejemplo, cada canal de microfluidos 112 forma un lazo aguas abajo de un electrodo 116 donde una sección del lazo se encamina sobre la membrana. Las diferentes disposiciones de lazo cerrado que traen las líneas de campo eléctrico desde dos lados opuestos de la membrana también caen dentro del alcance de esta descripción.

Las válvulas de control 114 también están dispuestas en los canales de microfluidos 112 y funcionan para controlar la vía eléctricamente conductora definida por las válvulas abiertas o cerradas dentro de los canales. En una modalidad ilustrativa, los canales de microfluidos 112 están embebidos dentro de un polímero elastomérico para conseguir microválvulas neumáticas. Estas válvulas se fabrican típicamente en dos capas mediante el uso de técnicas de litografía blanda. Con referencia a las Figuras 10A y 10B, la válvula se compone de dos capas, que están separadas por una capa muy fina de membrana como se indica en 108 en la Figura 10A. Una capa (capa de flujo) 106 tiene canales para hacer fluir los fluidos. La membrana delgada de separación se desvía hacia el canal de microfluidos cuando los canales de control (válvulas) en la otra capa (capa de control) 107 se presurizan con aire o agua como se observa en la Figura 10B. Esto detendrá el flujo de fluido (electrolito líquido) y, en consecuencia, puede obtenerse un sello. La cantidad por la que se cierra un canal de flujo está relacionada con la impedancia eléctrica que impondrá la válvula a la red eléctrica. Por ejemplo, un canal de flujo completamente cerrado puede tener una impedancia $> 10 \text{ G}\Omega$ (el valor preciso dependerá de la conductividad del electrolito y la geometría de la válvula), aislando efectivamente esta región de la red de microfluidos.

Volviendo a la Figura 11, cada uno de los cinco canales de microfluidos 112 tiene al menos dos válvulas 114 dispuestas en el mismo, donde una válvula está dispuesta a cada lado de la membrana. Además, cada válvula 114 está acoplada en comunicación de fluidos a y accionada por una fuente neumática (no se muestra). Controlando el grado en que cada grupo de válvulas cierra un canal de microfluidos 112, las válvulas 114 pueden actuar como resistencias variables en un divisor de tensión. De esta manera, las válvulas pueden usarse para encaminar el potencial eléctrico a través de canales de microfluidos seleccionados para producir un campo eléctrico que es uniforme a lo largo del área de la membrana.

La inclusión de microválvulas neumáticas es una forma práctica de lograr la integración de microfluidos a gran escala. Es un método robusto para controlar de forma independiente en el chip, el valor del potencial eléctrico a través de la membrana en cada microcanal con un número reducido de electrodos. Las microválvulas actúan como divisores de tensión (proporcionando sellos de resistencia $> 10 \text{ G}\Omega$ en un microcanal) que permiten el control preciso del campo eléctrico en varias regiones de la membrana. Este control es esencial para la escalabilidad y funcionalidad de los dispositivos porque: otorga la capacidad de abordar cualquier número de nanoporos para la fabricación, control de tamaño y detección con un solo par de electrodos colocados en algún lugar de los canales de fluidos a cada lado de la membrana; puede usarse para redirigir el potencial eléctrico para producir un campo eléctrico uniforme a lo largo de la membrana en un microcanal particular (una característica importante para la detección biomolecular) mediante el uso de un solo par de electrodos; es necesario para la fabricación de matrices y la detección en dispositivos que contienen un microcanal común (una característica necesaria para el sondeo en serie y en paralelo de una sola muestra mediante el uso de múltiples nanoporos); permite el intercambio rápido de soluciones que contienen varios disolventes, fuerzas iónicas, pH o analitos, lo que facilita la fabricación y la

detección; y resistencias eléctricas y fluidicas variables para la fabricación en chip y detección biomolecular. También se observa que la retención de la hidrofobicidad de la sección transversal de las válvulas y los canales es crítica para obtener un sellado de alta resistencia usado para controlar la magnitud y uniformidad del campo eléctrico a través de la membrana durante la fabricación y detección. Esto se logra tratando químicamente cada capa del dispositivo antes del ensamble, eliminando el requisito de tratamiento con plasma de la membrana para eliminar los contaminantes que dejarían la sección transversal de la válvula hidrófila.

El control de estas válvulas resistivas puede usarse para imponer condiciones de potencial eléctrico específicas en diferentes ubicaciones dentro de la red de microfluidos mediante el uso de un número reducido de electrodos. En esta modalidad, puede usarse un solo par de electrodos. Los electrodos 116 se colocan en los canales de microfluidos a cada lado de la membrana (solo se muestra el electrodo superior en la Figura 11, pero un electrodo inferior se coloca de manera similar debajo de la membrana). Excepto por la diferencia descrita anteriormente, el aparato 110 es similar al aparato descrito en relación con la Figura 2A.

Las Figuras 12 y 13 representan otras modalidades ilustrativas de aparatos que emplean tecnología de microválvulas neumáticas. En la Figura 12, el aparato 120 es similar al aparato 110 pero además incluye una válvula de encaminamiento 121 y un segundo electrodo superior 116. Durante el funcionamiento, la válvula de encaminamiento 121 permanece cerrada, de manera que la solución iónica fluye a través de los canales hacia la membrana 12 desde el lado derecho e izquierdo de la membrana como se observa en la Figura. La válvula de encaminamiento 121, en efecto, crea dos subsistemas de microfluidos. Un electrodo se coloca aguas arriba de donde el canal se divide en cinco canales de microfluidos separados en cada uno de los dos subsistemas de microfluidos.

La Figura 13 representa un aparato similar 130 pero que tiene solo dos canales de microfluidos 112. Asimismo, los dos electrodos superiores se colocan a cada lado de la membrana y los dos canales de microfluidos pasan sobre una porción de la membrana. Dos válvulas de control 114 están dispuestas en cada canal de microfluidos 112, una aguas arriba de la membrana y otra aguas abajo de la membrana. Excepto por la diferencia descrita anteriormente, estos dos aparatos 120, 130 son similares al aparato descrito en relación con la Figura 11.

La descripción anterior de las modalidades se ha proporcionado con fines de ilustración y descripción, mientras que la invención se describe en las reivindicaciones adjuntas. Los elementos o características individuales de una modalidad particular generalmente no se limitan a esa modalidad particular, sino que, cuando corresponda, son intercambiables y puede usarse en una modalidad seleccionada, incluso si no se muestra o describe específicamente.

Además, debe entenderse que la terminología usada en la presente descripción tiene el propósito de describir modalidades particulares solamente, y no pretende ser limitante. Como se usa en la presente descripción, las formas singulares "un", "una" y "el" pueden destinarse a incluir también las formas plurales, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Los términos "comprende", "que comprende", "que incluye" y "que tiene" son inclusivos y, por lo tanto, especifican la presencia de características, números enteros, etapas, operaciones, elementos y/o componentes declarados, pero no excluyen la presencia o adición de una o más características, números enteros, etapas, operaciones, elementos, componentes y/o grupos de los mismos. Las etapas, procesos y operaciones del método descritos en la presente descripción no deben interpretarse como que requieran necesariamente su ejecución en el orden particular discutido o ilustrado, a menos que se identifique específicamente como un orden de ejecución. También debe entenderse que pueden emplearse etapas adicionales o alternativas.

Cuando se dice que un elemento o capa está "sobre", "unido a", "conectado a" o "acoplado a" a otro elemento o capa, puede estar directamente sobre, unido, conectado o acoplado al otro elemento o capa, o elementos o capas intermedios pueden estar presentes. Por el contrario, cuando se hace referencia a un elemento como "directamente sobre", "directamente unido a", "directamente conectado a" o "directamente acoplado a" otro elemento o capa, puede que no haya elementos o capas intermedios presentes. Otras palabras usadas para describir la relación entre elementos deben interpretarse de manera similar (por ejemplo, "entre" contra a "directamente entre", "adyacente" contra a "directamente adyacente", etc.). Como se usa en la presente descripción, el término "y/o" incluye todas y cada una de las combinaciones de uno o más de los elementos enumerados asociados.

Aunque los términos primero, segundo, tercero, etc. pueden usarse en la presente descripción para describir varios elementos, componentes, regiones, capas y/o secciones, estos elementos, componentes, regiones, capas y/o secciones no deberían estar limitados por estos términos. Estos términos solo pueden usarse para distinguir un elemento, componente, región, capa o sección de otra región, capa o sección. Términos como "primero", "segundo" y otros términos numéricos cuando se usan en la presente descripción no implican una secuencia u orden a menos que se indique claramente en el contexto. Por tanto, un primer elemento, componente, región, capa o sección discutida a continuación podría denominarse un segundo elemento, componente, región, capa o sección sin apartarse de las enseñanzas de las modalidades ilustrativas.

Términos espacialmente relativos, como "interior", "exterior", "abajo", "debajo", "inferior", "arriba", "superior" y similares, pueden usarse en la presente descripción para facilitar la descripción para describir un elemento o la relación de la característica con otro(s) elemento(s) o característica(s) como se ilustra en las Figuras. Puede

5 pretenderse que los términos espacialmente relativos abarquen diferentes orientaciones del dispositivo en uso o funcionamiento además de la orientación representada en las Figuras. Por ejemplo, si el dispositivo de las Figuras se voltea, los elementos descritos como "abajo" o "debajo" de otros elementos o características se orientarían "arriba" de los otros elementos o características. Por tanto, el término de ejemplo "abajo" puede abarcar tanto una orientación de arriba como de abajo. El dispositivo puede estar orientado de otra manera (girado 90 grados o en otras orientaciones) y los descriptores espacialmente relativos usados en la presente descripción se interpretan en consecuencia.

REIVINDICACIONES

1. Un aparato (10'; 10") para fabricar uno o más nanoporos en una membrana (12), donde la membrana (12) define superficies planas opuestas y está compuesta por al menos una capa dieléctrica, que comprende:
- un primer sustrato (15) que tiene un microcanal común (22) formado en una superficie expuesta del primer sustrato (15);
 - una estructura de soporte (16) dispuesta sobre la superficie expuesta del primer sustrato (15) y configurada para alojar una membrana (12);
 - un segundo sustrato (14) que tiene uno o más canales de microfluidos (21) formados en una superficie interna del segundo sustrato (14), el segundo sustrato (14) está dispuesto sobre la estructura de soporte (16) con la superficie interna orientada hacia la estructura de soporte (16) de manera que uno o más canales de microfluidos (21) están separados mediante fluidos por la membrana (12) del microcanal común (22);
 - un conjunto de electrodos (30) que incluye un electrodo (33) colocado en un lado de la membrana (12) y dos o más electrodos adicionales (32) colocados en un lado opuesto de la membrana (12),
- caracterizado porque** el conjunto de electrodos (30) está configurado para generar un potencial eléctrico a través de la membrana (12) entre el electrodo (33) en un lado de la membrana (12) y los dos o más electrodos adicionales (32) en el lado opuesto de la membrana (12), en donde los dos o más electrodos adicionales (32) están dispuestos en relación con la membrana (12) de manera que un campo eléctrico creado por el potencial eléctrico a través de la membrana (12) es simétrico con respecto a un plano que es perpendicular a las superficies planas de la membrana (12).
2. El aparato de la reivindicación 1, que comprende medios adicionales para aplicar una magnitud del potencial eléctrico a través de la membrana (12) que da como resultado que el campo eléctrico tenga un valor superior a 0,1 voltios por nanómetro.
3. El aparato de la reivindicación 1, que comprende además:
- un sensor de corriente acoplado eléctricamente a uno de los electrodos y operable para medir la corriente que fluye entre uno o más canales de microfluidos (21) y el microcanal común (22); y
 - un controlador interconectado con el sensor de corriente, configurado de manera que si el controlador detecta un aumento abrupto en la corriente medida que indica la formación de un poro a través de la membrana (12) y, en respuesta a la detección del aumento abrupto en la corriente medida, el controlador elimina entonces el potencial eléctrico aplicado a través de la membrana (12).
4. El aparato de acuerdo con la reivindicación 1, en donde los dos o más electrodos adicionales (32) incluyen un primer electrodo dispuesto en uno o más canales de microfluidos (21) aguas arriba de la membrana (12) y un segundo electrodo dispuesto en uno o más canales de microfluidos (21) aguas abajo de la membrana (12).
5. El aparato de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el conjunto de electrodos (30) incluye dos electrodos (33) dispuestos en el microcanal común (22), de manera que uno de los electrodos (33) está aguas arriba de la membrana (12) y el otro electrodo está aguas abajo de la membrana (12).
6. El aparato de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la estructura de soporte (16) incluye además un rebaje ahusado (13) formado en un área adyacente a la membrana (12) y acoplado en comunicación de fluidos al microcanal común (22) en el primer sustrato (15).
7. El aparato de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además múltiples conjuntos de electrodos y una pluralidad de canales de microfluidos formados en la superficie interior del segundo sustrato, en donde cada microcanal en la pluralidad de canales de microfluidos tiene un conjunto asociado de electrodos.
8. El aparato de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además una capa intermedia (19) dispuesta directamente sobre la estructura de soporte (16) y dispuesta entre la estructura de soporte (16) y el segundo sustrato (14), la capa intermedia (19) tiene al menos una vía (51) formada en el mismo y configurada para crear un campo eléctrico uniforme próximo a la vía (51).
9. El aparato de acuerdo con la reivindicación 1, en donde uno o más canales de microfluidos (21) tienen una dimensión del orden de micras.
10. El aparato de acuerdo con la reivindicación 1, en donde uno o más canales de microfluidos (21) tienen una dimensión del orden de nanómetros.
11. Un aparato (10") para fabricar uno o más nanoporos en una membrana (12), donde la membrana (12) define superficies planas opuestas y está compuesta por al menos una capa dieléctrica, que comprende:

- un primer sustrato (15) que tiene un microcanal común (22) formado en una superficie expuesta del primer sustrato (15);
 - una estructura de soporte (16) dispuesta sobre la superficie expuesta del primer sustrato (15) y configurada para alojar una membrana (12);
 - una capa intermedia (19) dispuesta sobre la estructura de soporte (16) y que tiene al menos una vía (51) formada en ella;
 - un segundo sustrato (14) que tiene uno o más canales de microfluidos (21) formados en una superficie interna del segundo sustrato (14), el segundo sustrato (14) está dispuesto en la capa intermedia (19) con la superficie interna del segundo sustrato (14) orientado hacia la capa intermedia (19) de manera que uno o más canales de microfluidos (21) están separados mediante fluidos por la membrana (12) del microcanal común (22);
 - un par de electrodos (30) dispuestos en lados opuestos de la membrana (12), en donde el par de electrodos (30) está configurado para generar un potencial eléctrico a través de la membrana (12), en donde al menos una vía (51) en la capa intermedia (19) acopla en comunicación de fluidos el uno o más canales de microfluidos (21) con una superficie expuesta de la membrana (12) y está dispuesta de manera que un campo eléctrico creado por el potencial eléctrico sea uniforme en y alrededor de la vía (51),
- 20 **caracterizado porque** el segundo sustrato (14) tiene dos o más de los canales de microfluidos (21), en donde el par de electrodos (30) está dispuesto de manera que un electrodo (33) en el par de electrodos está dispuesto en el microcanal común (22) y el otro electrodo (32) en el par de electrodos está dispuesto en uno de los dos o más canales de microfluidos (21), en donde el par de electrodos está configurado para crear un campo eléctrico que es uniforme cuando alcanza a la membrana (12).
- 25 12. El aparato de acuerdo con la reivindicación 11, que comprende medios adicionales para aplicar una magnitud del potencial eléctrico a través de la membrana (12) que da como resultado que el campo eléctrico tenga un valor superior a 0,1 voltios por nanómetro.
- 30 13. El aparato de acuerdo con la reivindicación 11, que comprende, además:
- un sensor de corriente acoplado eléctricamente a uno de los electrodos y operable para medir la corriente que fluye entre uno de los dos o más canales de microfluidos (21) y el microcanal común (22); y
 - un controlador interconectado con el sensor de corriente, en donde el controlador está configurado de manera que si el controlador detecta un aumento abrupto en la corriente medida que indica la formación de un poro y, en respuesta a la detección del aumento abrupto en la corriente medida, el controlador elimina entonces el potencial eléctrico aplicado a través de la membrana (12)
- 35
- 40 14. El aparato de acuerdo con la reivindicación 11, en donde la profundidad de la al menos una vía (51) es mayor que el diámetro de la al menos una vía (51).
- 45 15. El aparato de acuerdo con la reivindicación 11, en donde el segundo sustrato (14) incluye un arreglo de canales de microfluidos (21) formados en la superficie interna del mismo y la capa intermedia (19) incluye una pluralidad de vías (51), de manera que cada vía (51) en la pluralidad de vías (51) se alinea con uno de los canales de microfluidos (21) en el arreglo de canales de microfluidos (21).

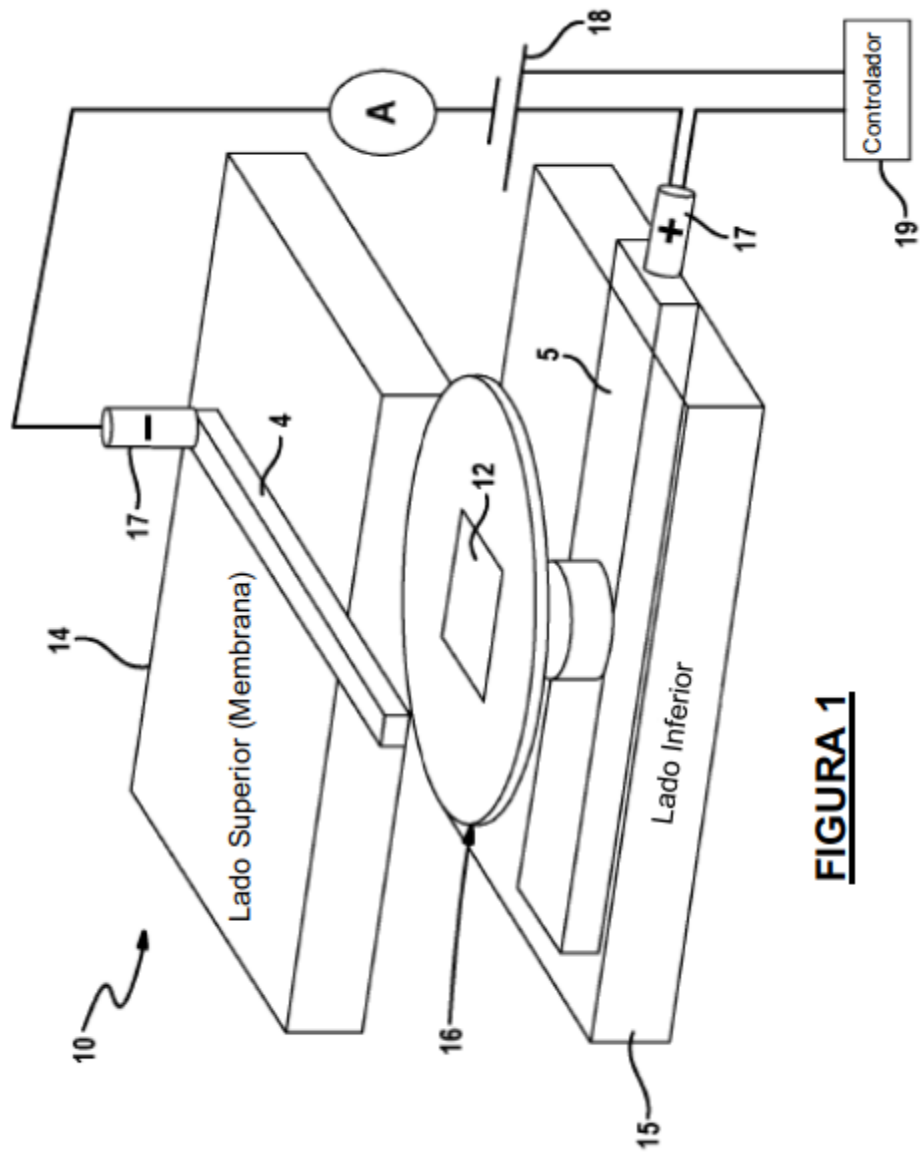


FIGURA 1

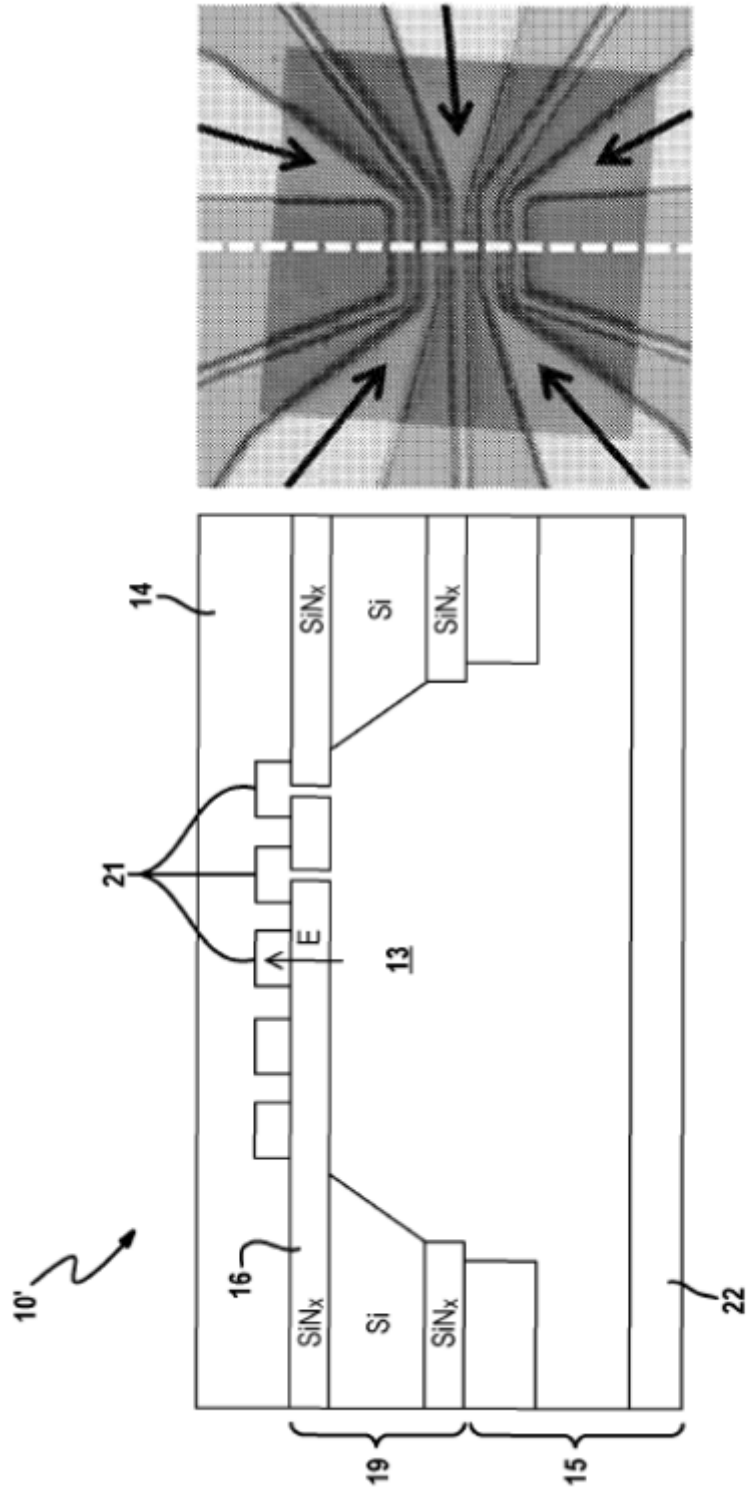


FIGURA 2B

FIGURA 2A

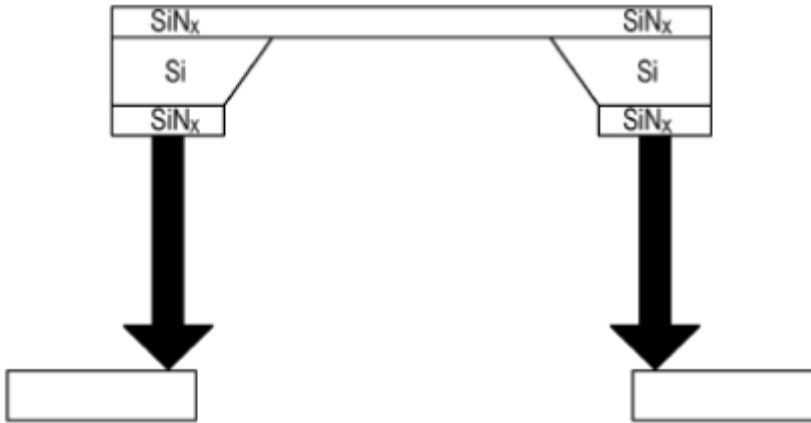


FIGURA 3A

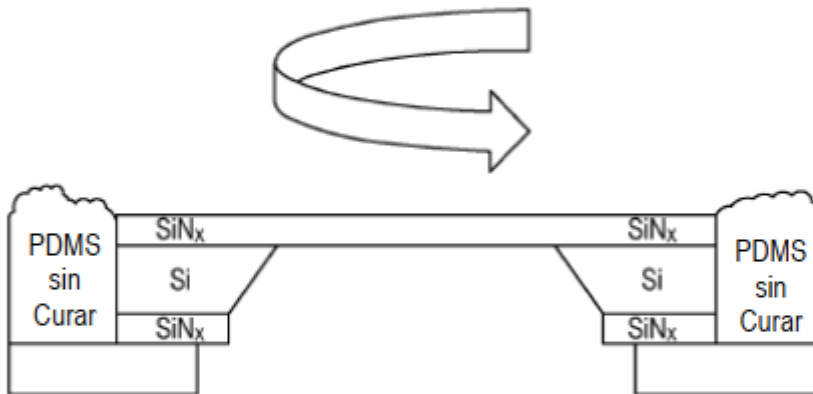


FIGURA 3B

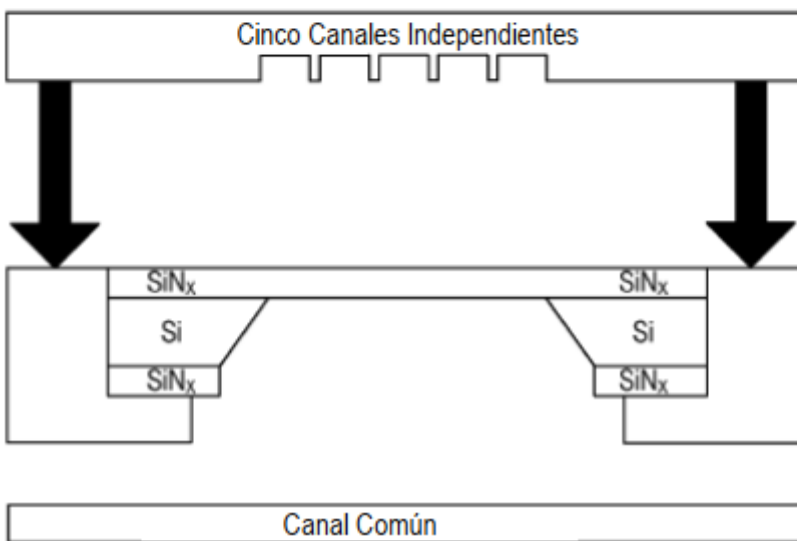
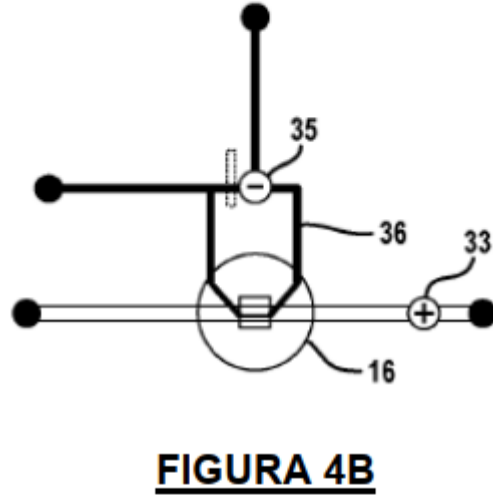
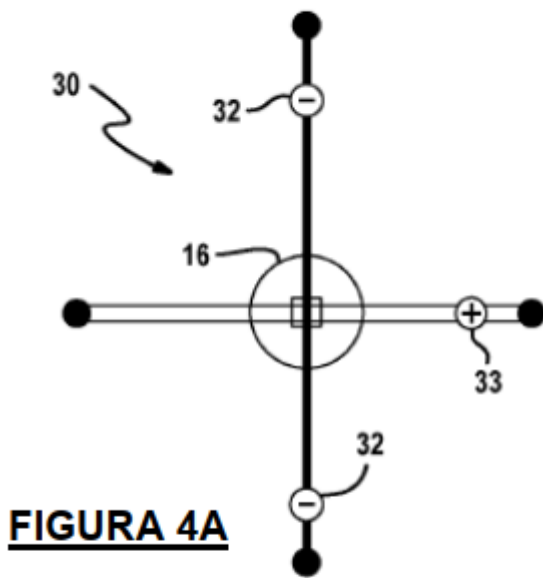
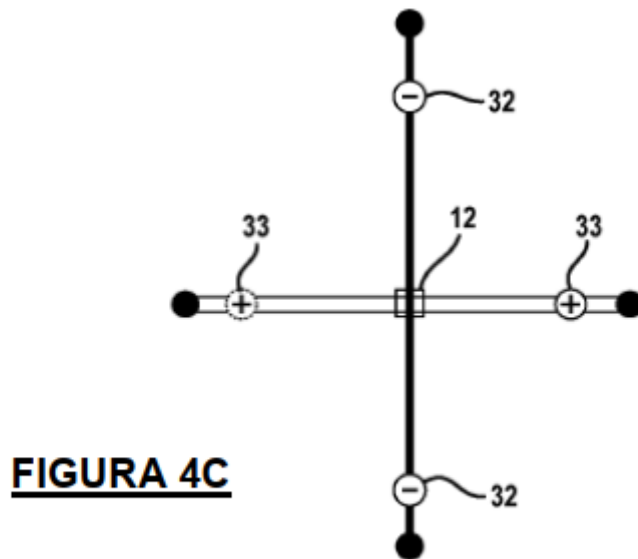


FIGURA 3C

- Puertos de Microfluidos — Canal de Flujo
- ⊖ Electrodo de Ánodo - - - - Canal de Control (Válvula)
- ⊕ Electrodo de Cátodo □ Ventana de Membrana SiNx



- Puertos de Microfluidos — Canal de Flujo
- ⊖ Electrodo de Ánodo - - - - Canal de Control (Válvula)
- ⊕ Electrodo de Cátodo □ Membrana de Nitruro de Silicio Independiente



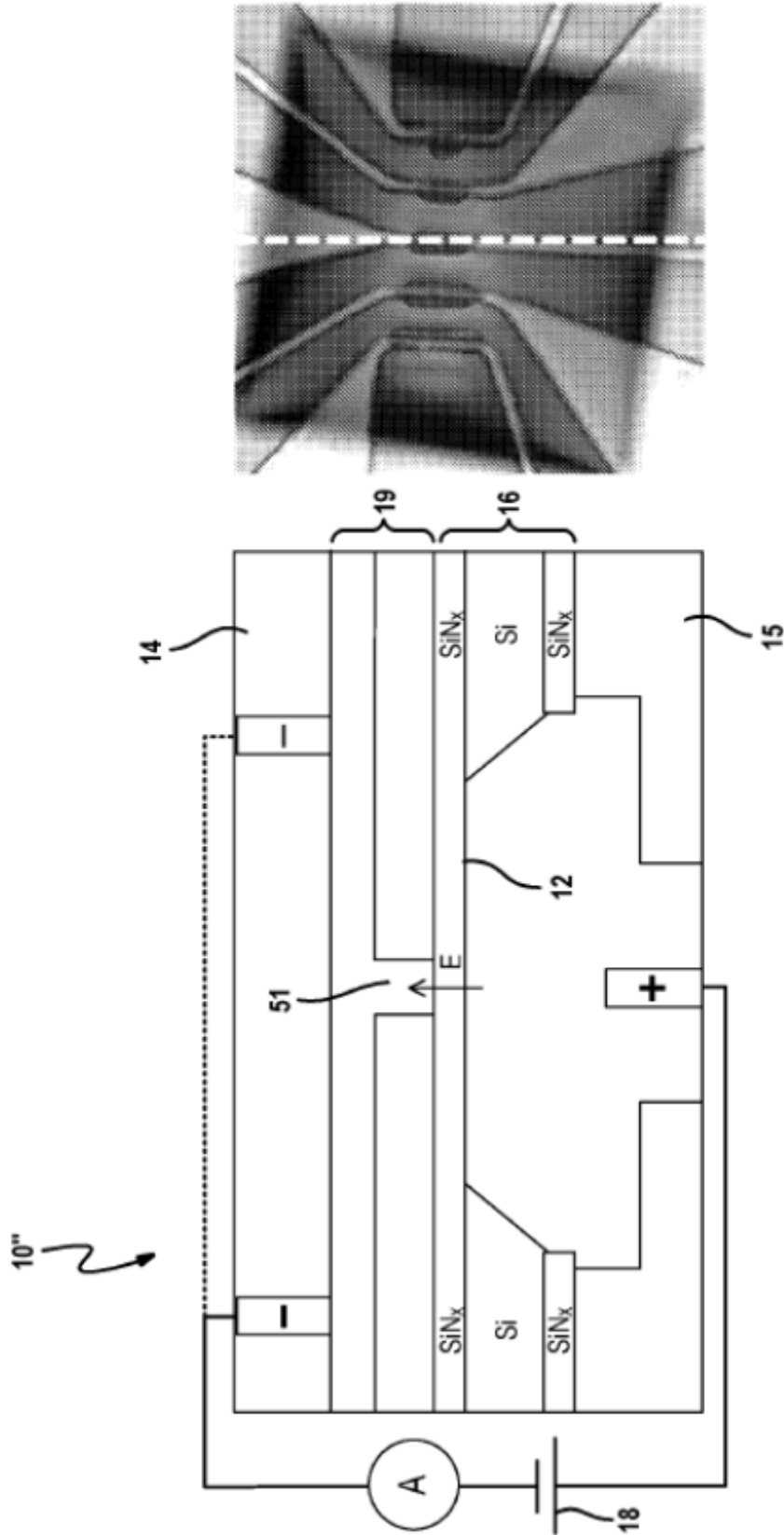


FIGURA 5A

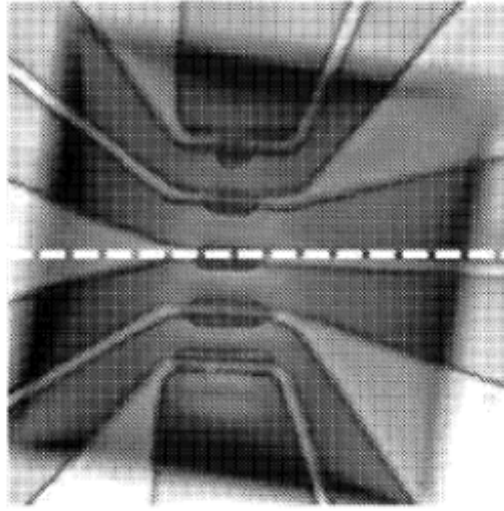


FIGURA 5B

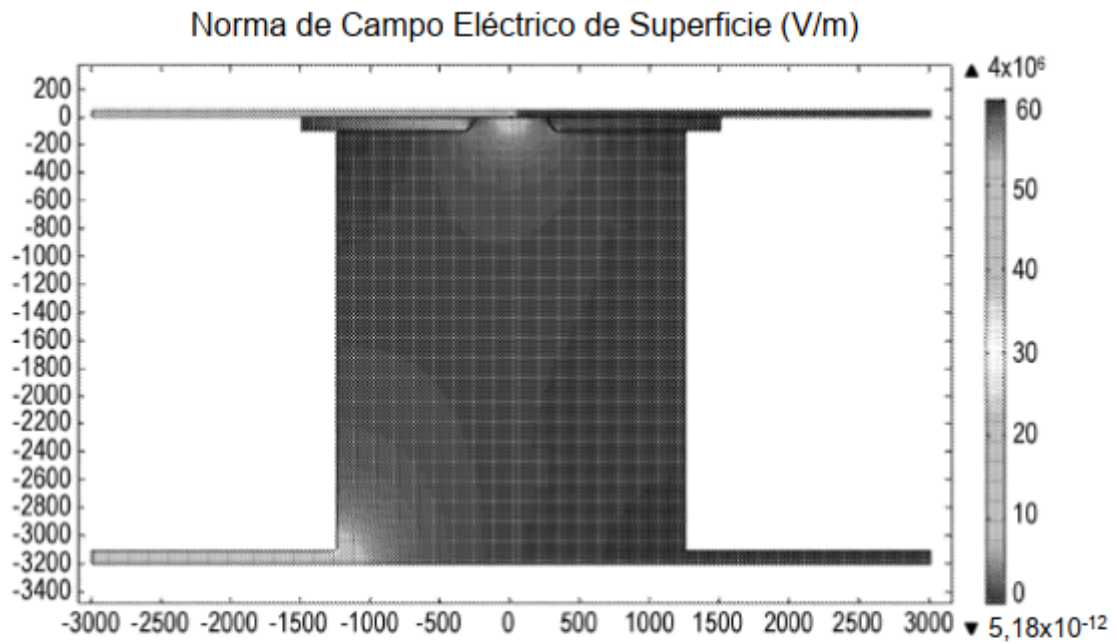


FIGURA 6A

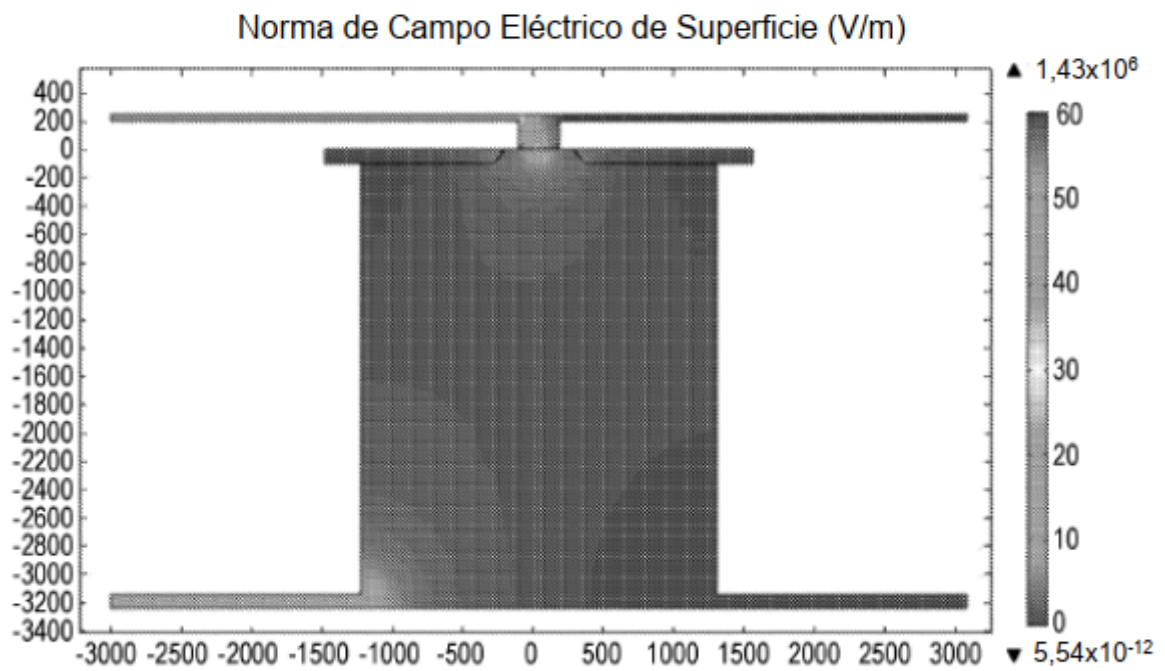


FIGURA 6B

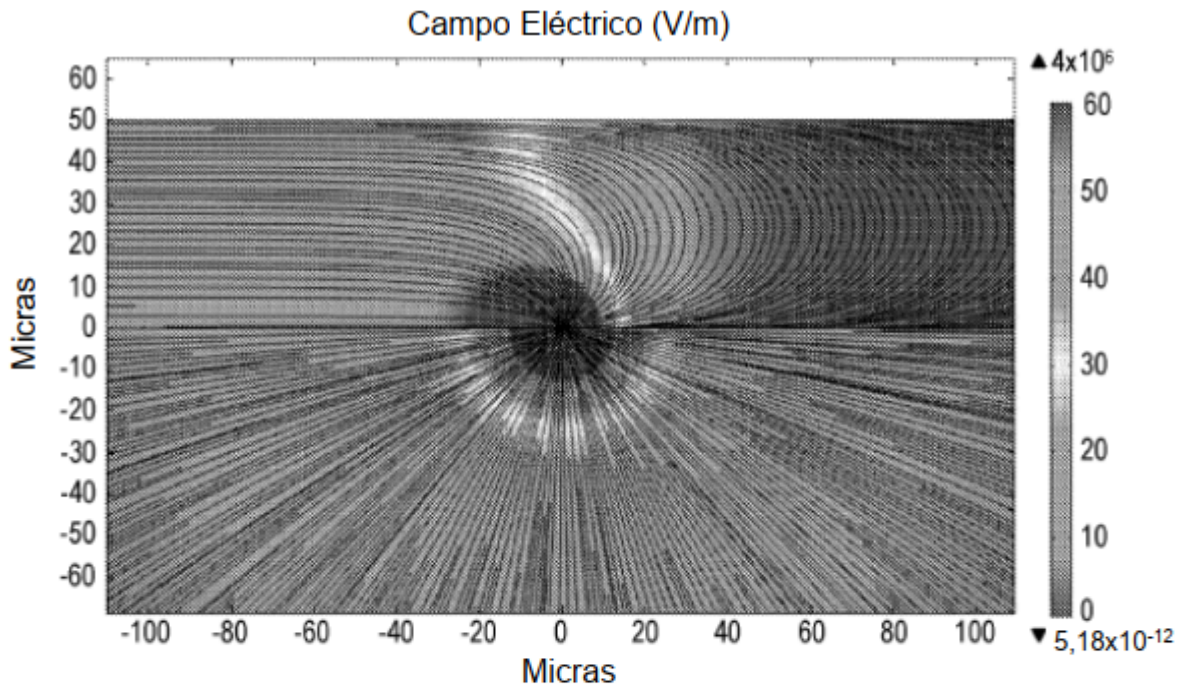


FIGURA 6C

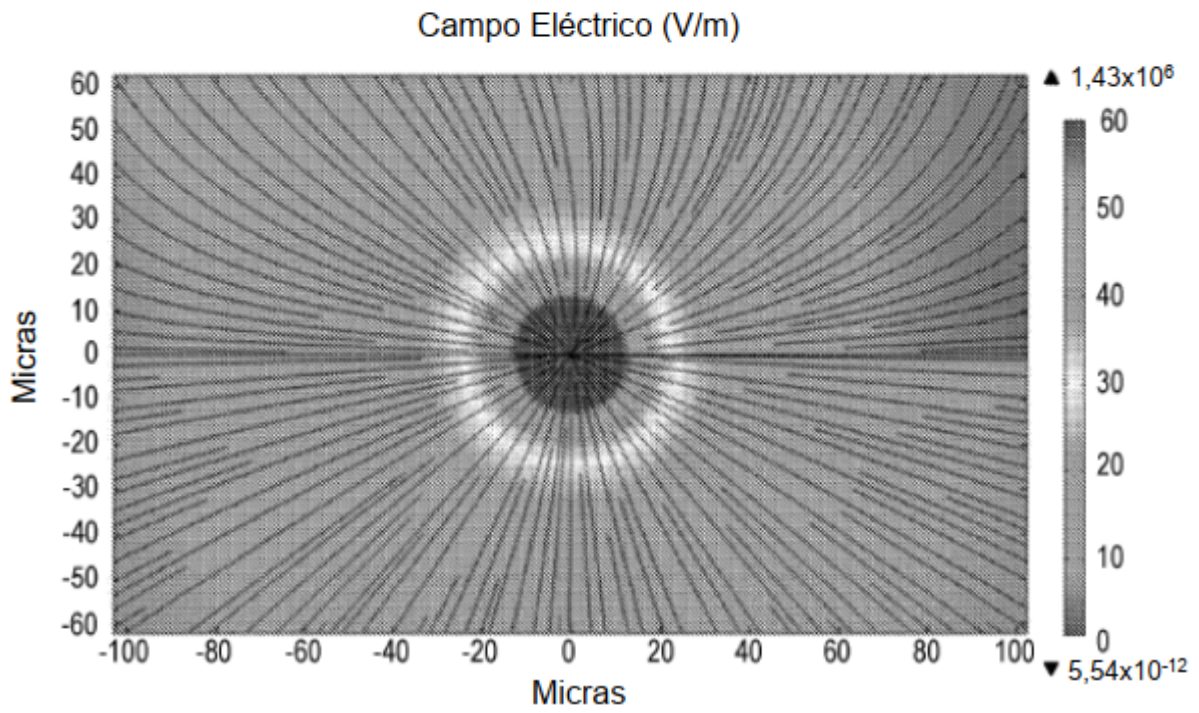


FIGURA 6D

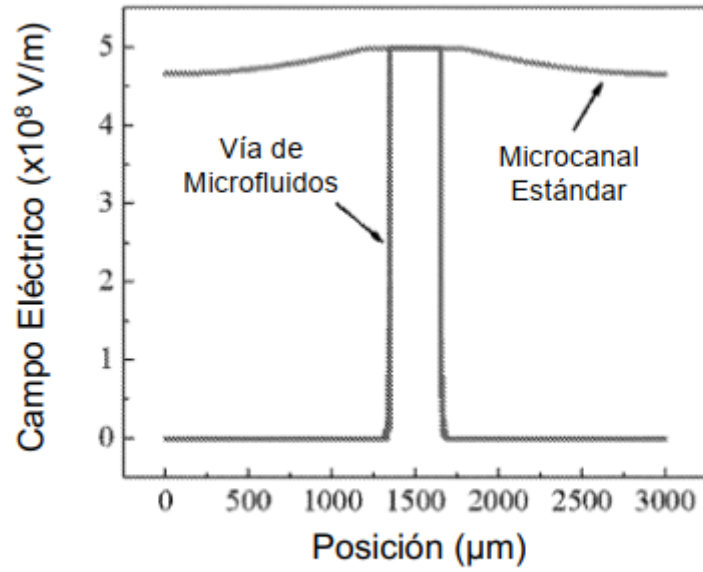


FIGURA 6E

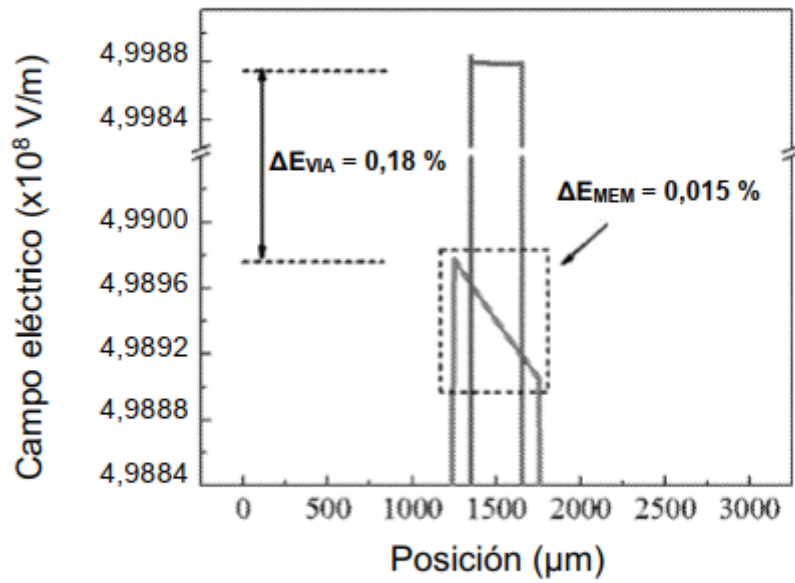


FIGURA 6F

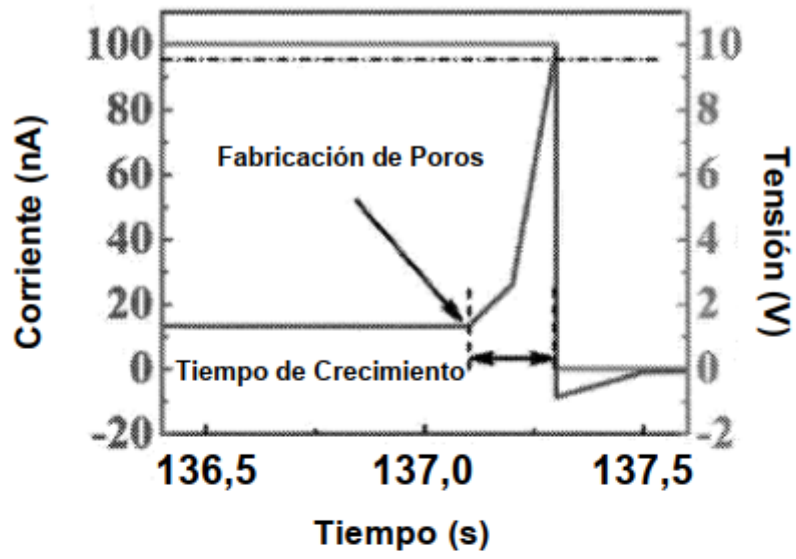


FIGURA 7A

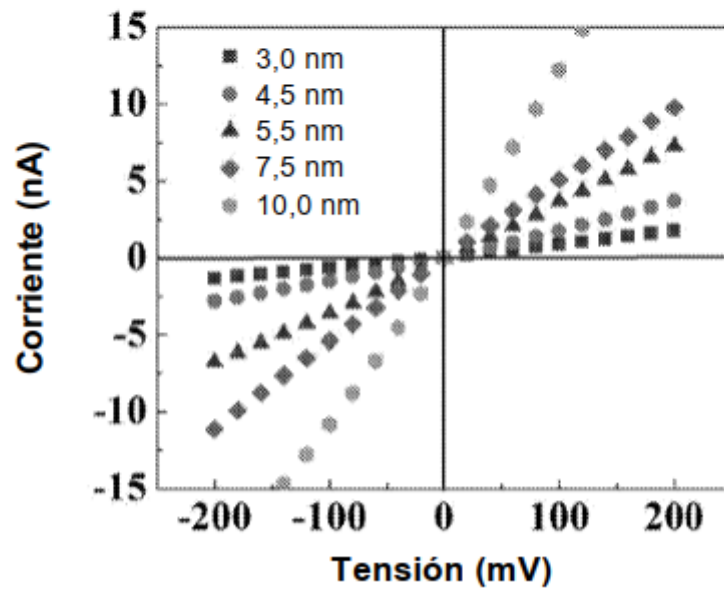


FIGURA 7B

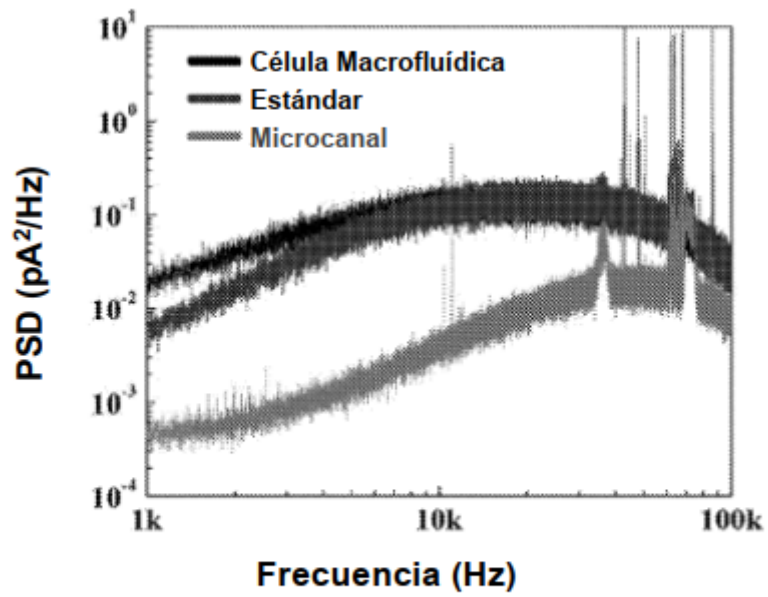


FIGURA 8A

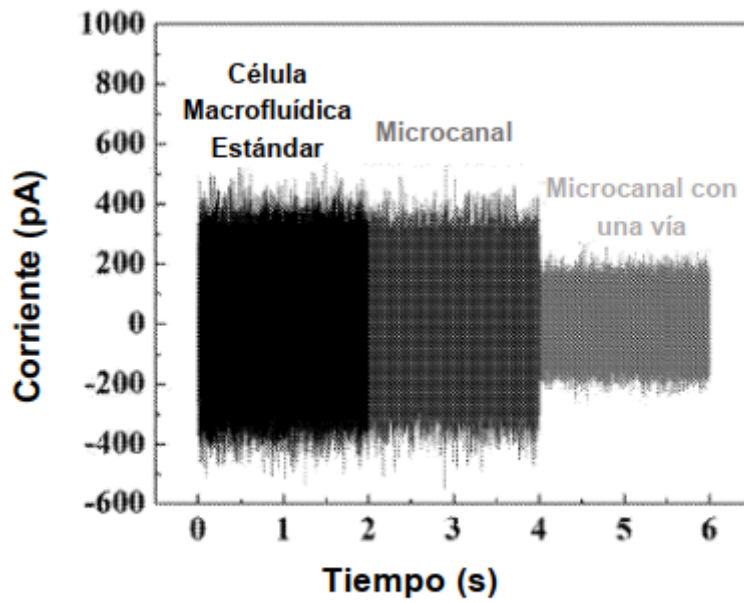


FIGURA 8B

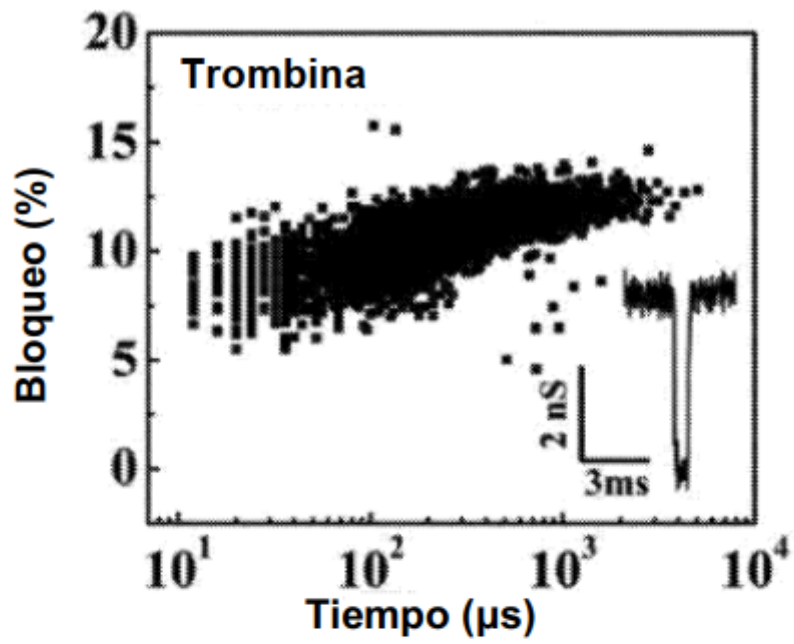


FIGURA 9A

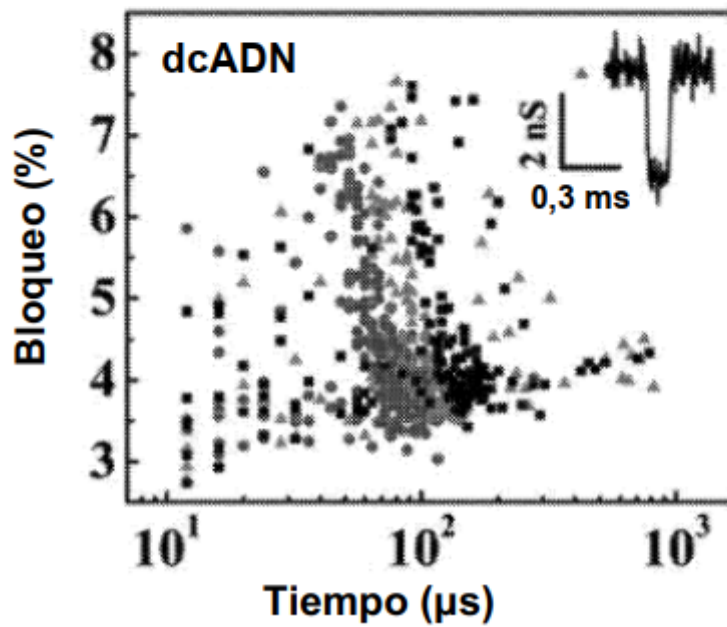


FIGURA 9B

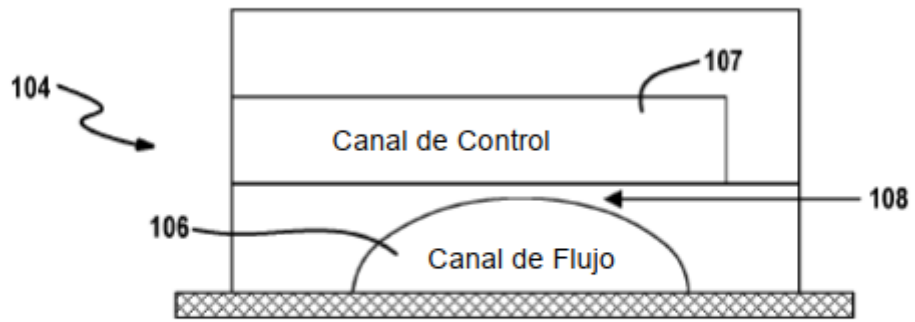


FIGURA 10A

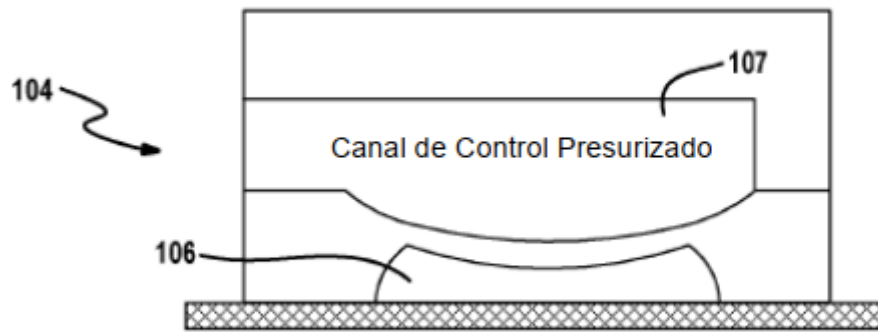


FIGURA 10B

- Puertos de Entrada y Salida
- ⊖ Un Electrodo que Alimenta Todos los Canales Superiores
- Canales de Microfluidos
- ⊐ Válvulas Neumáticas
- ⊠ Ventana de Membrana de Nitruro de Silicio

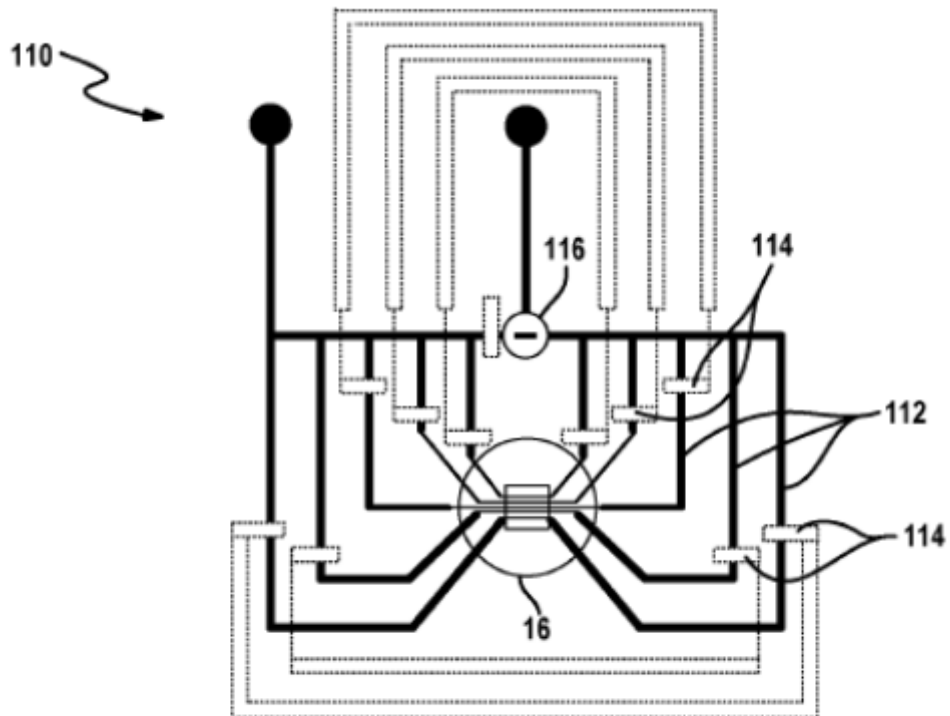


FIGURA 11

- Puertos de Entrada y Salida
- ⊖ Un Electrodo que Alimenta Todos los Canales Superiores
- Canales de Microfluidos
- ▭ Válvulas Neumáticas
- ▨ Válvula de Encaminamiento
- ⊠ Ventana de Membrana de Nitruro de Silicio

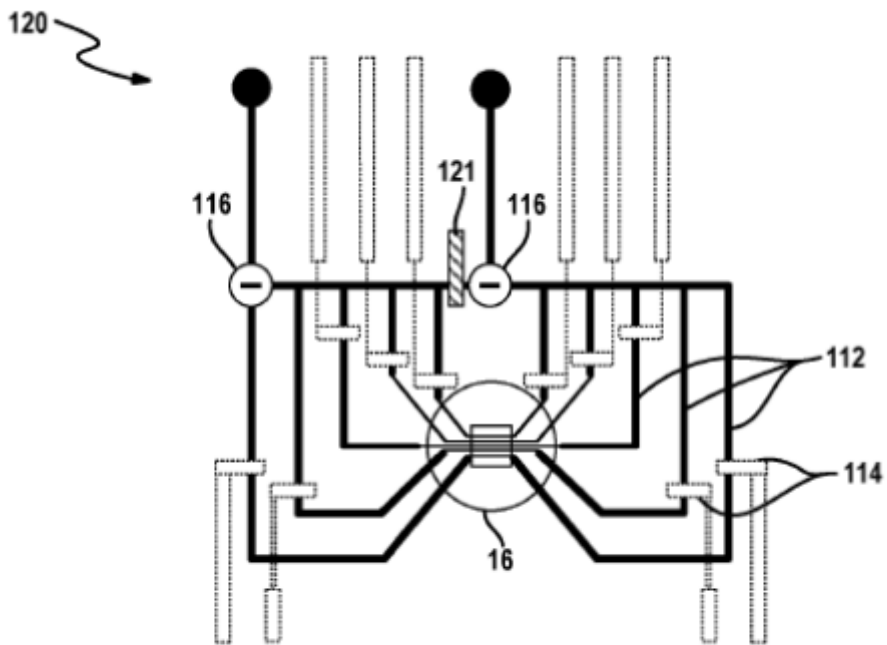


FIGURA 12

- Puertos de Microfluidos
- ⊖ Electrodo de Ánodo
- Canal de Flujo
- ⋮ Canal de Control (Válvula)
- ⊠ Ventana de Membrana de Nitruro de Silicona en un Chip de Soporte

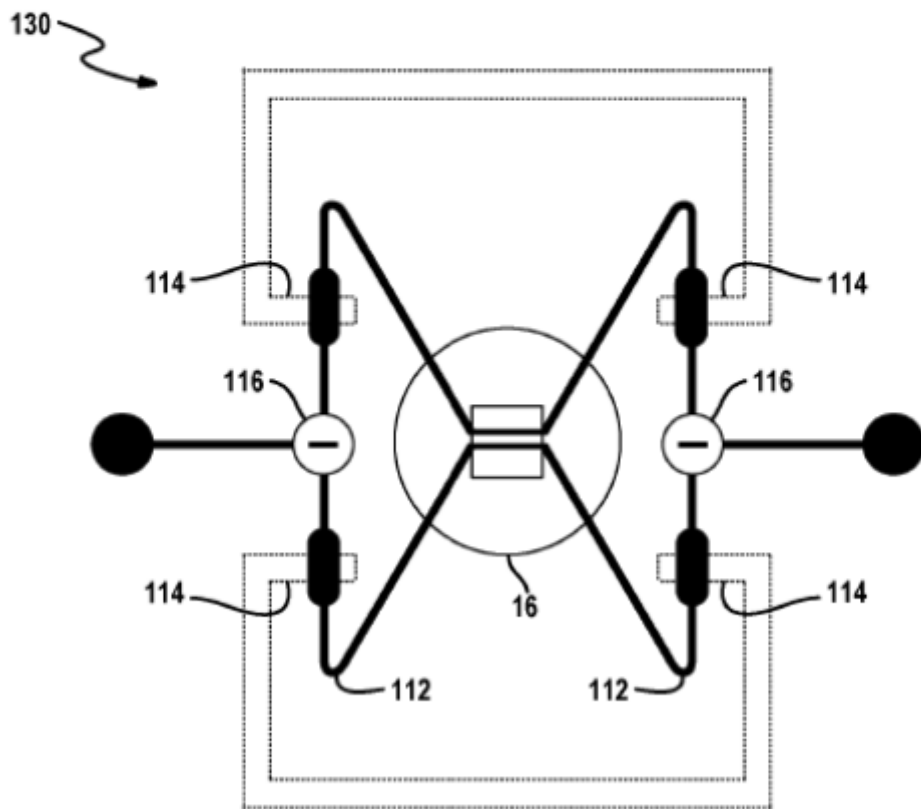


FIGURA 13