

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 630 064**

51 Int. Cl.:

C25F 3/14	(2006.01)	G01N 33/487	(2006.01)
B23B 41/14	(2006.01)		
B23H 9/14	(2006.01)		
B23K 9/013	(2006.01)		
B82Y 30/00	(2011.01)		
C25F 7/00	(2006.01)		
B81C 1/00	(2006.01)		
B01D 65/02	(2006.01)		
B01D 67/00	(2006.01)		
G01B 7/00	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.05.2013 PCT/IB2013/000891**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **14.11.2013 WO13167955**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.05.2013 E 13787530 (8)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.03.2017 EP 2847367**

54 Título: **Fabricación de nanoporos utilizando campos eléctricos potentes**

30 Prioridad:

07.05.2012 US 201261643651 P
14.03.2013 US 201361781081 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.08.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

KWOK, WING HEI;
TABARD-COSSA, VINCENT y
BRIGGS, KYLE, ALEXANDER, ZARKEL

74 Agente/Representante:

TORNER LASALLE, Elisabet

ES 2 630 064 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

Fabricación de nanoporos utilizando campos eléctricos potentes

La presente divulgación versa acerca de una técnica para fabricar un nanoporo utilizando campos eléctricos potentes.

5 Antecedentes

La nanotecnología se vale de nuestra capacidad para manipular la materia y fabricar una estructura de dispositivo a escala nanométrica. Los presentes procedimientos de fabricación en estado sólido que consiguen de forma reproducible un control dimensional a escala nanométrica a menudo son complejos e implican el uso de una infraestructura costosa, operada por personal muy cualificado. Por ejemplo, el problema de fabricar un agujero de escala molecular, o nanoporo, en una membrana aislante delgada de estado sólido requiere el uso de partículas concentradas de alta energía, bien producidas mediante una máquina dedicada de haz iónico (escultura con haz de iones) o un microscopio electrónico de transmisión (perforación mediante TEM). Aunque estos avances en la nanofabricación han puesto la fabricación de dispositivos de nanoescala con un control subnanométrico al alcance de laboratorios académicos, están deficientemente adaptados para producir en serie agujeros en una membrana para crear nanoporos. Esto representa una importante barrera para la comercialización de cualquier tecnología basada en nanoporos de estado sólido para aplicaciones de ciencias de la salud, incluyendo una secuenciación de ADN.

En el documento US 2010/0122907 A1 se proporcionan un procedimiento y un sistema de medición de la conductancia de un nanoporo. El sistema tiene reservorios de fluido conductor separados por una barrera resistiva, que está perforada por un único poro de escala nanométrica acorde en tamaño con una molécula de analito en al menos uno de los reservorios. El sistema está configurado para que se haga pasar una corriente iónica a través de los reservorios mediante un potencial aplicado y el poro puede ser tratado para que la superficie del poro pueda formar asociaciones con las moléculas de analito de interés para aumentar los tiempos de permanencia de la molécula de analito sobre o en el poro. El sistema también comprende un medio para medir la corriente iónica, corriente que puede ser bien directa o bien alterna en el tiempo, inducida por un potencial aplicado entre los electrodos en el campo conductor, en cada lado de la barrera. El sistema también comprende un medio para registrar la secuencia temporal de la corriente iónica como una serie temporal, que incluye periodos de tiempo cuando el poro se encuentra libre de obstrucciones y también periodos cuando las moléculas de analito provocan impulsos de menor conductancia. El procedimiento comprende procedimientos para delinear segmentos de la serie temporal de conductancia en regiones estadísticamente coherentes con el nivel de conductancia del poro libre de obstrucciones, e impulsos de conductancia reducida, y también segmentos estadísticamente estacionarios dentro de los impulsos individuales de conductancia reducida. El procedimiento también puede proporcionar etapas para interpretar el análisis estadístico para producir parámetros tales como tamaño, masa y/o concentración de al menos un tipo de analito en solución.

35 Esta sección proporciona información antecedente relacionada con la presente divulgación, que no es necesariamente la técnica anterior.

Sumario

La presente sección proporciona un sumario general de la divulgación, y no es una divulgación exhaustiva de su alcance total ni de todas sus características.

40 Se proporciona un procedimiento para fabricar un nanoporo en una membrana dieléctrica sumergida en una solución que contiene iones. El procedimiento incluye: aplicar un potencial eléctrico a través de la membrana, seleccionándose el valor del potencial eléctrico para inducir un campo eléctrico que provoca una corriente de fuga a través de la membrana por lo demás aislante; monitorizar el flujo de corriente a través de la membrana mientras se aplica el potencial eléctrico; detectar un aumento irreversible repentino en la corriente de fuga a través de la membrana; y eliminar el potencial eléctrico a través de la membrana en respuesta a la detección del aumento repentino en la corriente de fuga para detener la fabricación del nanoporo.

En un aspecto, se detecta un aumento abrupto en la corriente de fuga comparando un valor de la corriente monitorizada con un umbral y luego interrumpir la aplicación del potencial eléctrico cuando el valor de la corriente monitorizada supera el umbral.

50 En otro aspecto, la membrana está dispuesta entre dos reservorios llenos de un fluido y, de ese modo, evita que el fluido pase entre los dos reservorios.

También se proporciona un aparato para fabricar un nanoporo en una membrana. El aparato incluye: dos reservorios acoplados entre sí de forma fluida por medio de un paso; un par de electrodos conectados eléctricamente con una fuente de tensión, de forma que se disponga un electrodo en cada uno de los dos reservorios y el par de electrodos genere un potencial eléctrico a través de la membrana; un sensor de corriente acoplado eléctricamente con uno de

los electrodos y operable para medir la corriente que fluye entre los dos reservorios; y un controlador interconectado con el sensor de corriente, en el que el controlador detecta un aumento abrupto en la corriente medida y, en respuesta a la detección del aumento abrupto en la corriente medida, elimina la tensión a través de los electrodos.

5 Serán evidentes áreas adicionales de aplicabilidad a partir de la descripción proporcionada en la presente memoria. La descripción y los ejemplos específicos en el presente sumario únicamente están pensados con fines ilustrativos y no se pretende que limiten el alcance de la presente divulgación.

10 En otro aspecto, se proporciona un procedimiento para fabricar un único nanoporo, que comprende: disponer una membrana que comprende un material dieléctrico entre dos reservorios llenos de un líquido, de forma que la membrana separa los dos reservorios y evita que el fluido pase entre los dos reservorios; aplicar un potencial eléctrico a través de la membrana, seleccionándose el valor del potencial eléctrico para inducir un campo eléctrico que provoca una corriente de fuga a través de la membrana; monitorizar la corriente inducida de fuga entre los dos reservorios mientras se aplica el potencial eléctrico; determinar una tasa de cambio de la corriente monitorizada; comparar la tasa de cambio de la corriente monitorizada con un umbral; e interrumpir la aplicación del potencial eléctrico cuando la tasa de cambio de la corriente monitorizada supera el umbral, deteniendo, de ese modo, la fabricación. El procedimiento puede comprender seleccionar un potencial eléctrico que induzca un campo eléctrico que tiene un valor superior a 0,1 voltios por nanómetro. El procedimiento puede comprender seleccionar un potencial eléctrico que induce un campo eléctrico que tiene un valor en un intervalo de 0,1 a 1,0 voltios por nanómetro. Se puede definir un fluido como iones disueltos en un disolvente acuoso. Se puede definir un fluido como iones disueltos en un disolvente orgánico. Puede no ser preciso que un fluido tenga una acción de ataque químico específica hacia la membrana. El procedimiento puede comprender, además, controlar la ubicación del poro formado en la membrana localizando la fuerza del campo eléctrico o la resistencia dieléctrica próxima a una ubicación deseada para el poro. El procedimiento puede comprender controlar la ubicación del poro formado en la membrana reduciendo el grosor de la membrana en el área de una ubicación deseada para el poro. El procedimiento puede comprender controlar la rectificación del poro formado en la membrana en función de la acidez y de la conductividad del fluido.

Dibujos

La Figura 1 es un diagrama de flujo que muestra un procedimiento para fabricar un único nanoporo según la presente divulgación;

30 la Figura 2A es un diagrama que muestra una configuración ejemplar para fabricar un nanoporo;

la Figura 2B es un diagrama de una pila fluidica ejemplar;

35 la Figura 3 es un esquema de un circuito ejemplar amplificador de corriente que puede utilizarse para fabricar un nanoporo;

las Figuras 4A-4D son diagramas que ilustran la fabricación de un nanoporo en una membrana delgada mediante campos eléctricos potentes;

40 la Figura 5 es un gráfico que muestra la corriente de fuga en la pila en relación con el campo eléctrico aplicado;

las Figuras 6 y 7 son gráficos que muestran un evento de creación de poro en una membrana que tiene un grosor de 10 nm y de 30 nm, respectivamente;

45 la Figura 8 es un gráfico que muestra curvas de corriente en función de la tensión para tres nanoporos independientes fabricados en distintas membranas;

50 las Figuras 9A, 9B y 9C son gráficos que muestran el tiempo hasta la creación del poro como una función del potencial transmembrana para membranas que tienen un grosor de 30 nm, el tiempo hasta la creación del poro como una función del pH para membranas que tienen un grosor de 30 nm, y el tiempo hasta la creación del poro como una función del potencial transmembrana para membranas que tienen un grosor de 10 nm;

55 la Figura 10 es un diagrama de puntos del bloqueo medio de corriente normalizado en función del tiempo de translocación total de múltiples eventos de una única molécula;

la Figura 11 es un diagrama que ilustra una técnica para localizar la formación de un nanoporo; y

la Figura 12 es un diagrama que ilustra otra técnica para localizar la formación de un nanoporo.

60 Los dibujos descritos en la presente memoria tienen únicamente fines ilustrativos de realizaciones seleccionadas y no de todas las implementaciones posibles, y no se pretende que limiten el alcance de la presente divulgación. Los

números correspondientes de referencia indican partes correspondientes en la totalidad de las diferentes vistas de los dibujos.

Descripción detallada

5 La Figura 1 muestra un procedimiento sencillo y de bajo coste para fabricar un único nanoporo con una resolución subnanométrica (por ejemplo, 1-100 nanómetros) en una membrana delgada. El procedimiento depende de aplicar una tensión a través de la membrana delgada en 12 para generar un campo eléctrico suficientemente potente para inducir una corriente de fuga a través de la membrana. En algunas realizaciones, la membrana está dispuesta entre dos reservorios llenos de un fluido, de forma que la membrana separe los dos reservorios y evite el flujo de líquido entre los dos reservorios. Se monitoriza en 14 el flujo de corriente a través de la membrana mientras se aplica el campo eléctrico. La creación de un único nanoporo (es decir, un canal fluido que atraviesa la membrana) se indica mediante un aumento irreversible abrupto en la corriente de fuga. Para detectar la creación del nanoporo, se puede comparar en 16 la corriente monitorizada con un umbral predeterminado. Cuando la corriente monitorizada supera el umbral, se elimina en 18 la tensión aplicada. Por lo tanto, se puede configurar el tamaño inicial del nanoporo principalmente en función del valor del umbral de la corriente, aunque a continuación se describen adicionalmente otros factores que influyen en el tamaño del nanoporo. Aunque se hace referencia a la formación de un nanoporo, las técnicas descritas en la presente memoria son aplicables más en general a agujeros de diversos tamaños.

En las Figuras 2A y 2B se muestra el esquema de una configuración ejemplar para fabricar un nanoporo. La configuración comprende, en general, una pila fluidica 22; un par de electrodos 24 acoplados eléctricamente con un circuito amplificador 25 de corriente; y un controlador 26 interconectado con el circuito amplificador 25 de corriente. 20 La pila fluidica 22 está definida, además, por dos reservorios 33 acoplados entre sí fluidicamente por medio de un paso 34, según se puede ver de forma óptima en la Figura 2B. El circuito amplificador 25 de corriente opera para crear un potencial entre los electrodos y medir el flujo de corriente entre los dos reservorios 33. En algunas realizaciones, se puede implementar el controlador 26 mediante un circuito 28 de adquisición de datos acoplado con un ordenador personal 27 u otro tipo de dispositivo informático. Por lo tanto, la configuración es similar a la utilizada habitualmente para una detección biomolecular en el campo de detección de nanoporos. La pila fluidica 22 y/o todo el sistema pueden estar dispuestos en una jaula 23 de Faraday puesta a tierra para aislar el ruido eléctrico. La presente divulgación contempla otras configuraciones para fabricar un nanoporo.

En la configuración ejemplar, se utiliza un *chip* 31 de silicio para alojar una membrana 30. El *chip* 31 de silicio está intercalado entre dos juntas 32 de silicona y luego colocado entre los dos reservorios 33 de la pila fluidica 22. En algunas realizaciones, la pila fluidica 22 comprende politetrafluoroetileno (PTFE) aunque se contemplan otros materiales. Se aplica una presión reducida a las dos juntas 32 por medio de la pila fluidica 22 para cerrar el contacto de forma estanca. Los dos reservorios 33 están llenos de un fluido que contiene iones, y se insertan los dos electrodos 24 en los reservorios respectivos de la pila fluidica 22. Las configuraciones ejemplares pueden incluir, sin limitación soluciones salinas a base de cloruro con electrodos de Ag/AgCl o soluciones de sulfato de cobre con electrodos de cobre. El fluido también podría ser un disolvente no acuoso, tal como 1 M de LiCl en etanol. El fluido puede ser el mismo en ambos reservorios y no necesita poseer una acción activa de ataque químico contra el material de la membrana. También se conciben otros tipos de fluidos y de medios de colocación de la membrana entre los dos reservorios, tales como una encapsulación micro y nanofluidica.

En algunas realizaciones, se puede colocar uno de los electrodos en contacto directo con la superficie de la membrana. En otras realizaciones, uno de los electrodos puede ser un nanoelectrodo que está colocado para localizar el campo eléctrico en la membrana y localizar, de ese modo, la formación del poro en la membrana. También se comprende que se pueden utilizar más de dos electrodos. Por ejemplo, se puede colocar un electrodo en cada reservorio con un tercer electrodo colocado en contacto directo con la superficie de la membrana. También se contemplan en la presente divulgación otras disposiciones de electrodos.

45 En algunas implementaciones, la membrana 30 comprende un material dieléctrico tal como nitruro de silicio (SiN_x). Preferentemente, las membranas son delgadas con un grosor de 10 nm o 30 nm, aunque la presente divulgación contempla membranas que tienen distintos grosores. Las membranas comprendidas de otros materiales dieléctricos, tales como otros óxidos y nitruros, que son utilizados habitualmente como materiales de puerta para transistores, también se encuentran dentro del alcance de la presente divulgación. Asimismo, las membranas atómicamente delgadas también pueden estar comprendidas de otros materiales tales como grafeno, nitruro de boro y similares. También se contempla que las membranas puedan estar comprendidas de múltiples capas de materiales, incluyendo materiales dieléctricos y/o materiales conductores.

En una realización ejemplar, el circuito amplificador 25 de corriente depende de un circuito amplificador de operación sencilla para leer y controlar la tensión y la corriente, según se muestra en la Figura 3. Los amplificadores de operación están alimentados por una fuente de tensión de ±20 voltios. En operación, el circuito recibe una tensión de mando (V_{mando}) entre ±10 voltios procedente de una tarjeta de adquisición de datos controlada por un ordenador, que es amplificada a ±20 voltios, y establece el potencial a través de la membrana. También se puede medir el potencial aplicado (V_{salida}) por medio del circuito amplificador 25 de corriente. El flujo de corriente entre los dos electrodos es medido en uno o ambos electrodos con una sensibilidad de pA. Más específicamente, la corriente es medida con

una topología de amplificador de transimpedancia. La señal medida de corriente (I_{salida}) es digitalizada por el circuito de adquisición de datos y es suministrada continuamente al controlador. De esta forma, se monitoriza la corriente en tiempo real por medio del controlador, por ejemplo a una frecuencia de 10 Hz, aunque se puede utilizar una tasa de muestreo más rápida para un tiempo de respuesta más rápido, una vez que la corriente alcanza el umbral. Otras disposiciones de circuito para aplicar un potencial y medir una corriente se encuentran dentro del alcance de la presente divulgación.

En la realización ejemplar, se configura el umbral de corriente para que coincida con el aumento repentino en la corriente para configurar el tamaño mínimo del nanoporo en el orden de 1 nm. En otras realizaciones, sin embargo, se puede configurar mayor el tamaño del nanoporo, continuando la aplicación de un potencial a través de la membrana. Es decir, el tamaño del nanoporo continúa aumentando según continúa aumentando la corriente monitorizada. En vez de configurar el umbral de corriente para que coincida con el aumento repentino en la corriente de fuga, se puede configurar el valor del umbral de corriente a distintos valores para conseguir un nanoporo de distintos tamaños. Beamish y otros, describen adicionalmente una técnica ejemplar para una adaptación fina del tamaño de un nanoporo en "Precise Control of the Size and Noise of Solid-state Nanopores using High Electric Field" Nanotechnology 23 405301 (2012), que se incorpora en su totalidad en la presente memoria por referencia. También se contemplan en la presente divulgación otras técnicas y disposiciones para adaptar nanoporos.

En algunas realizaciones, se elimina el potencial eléctrico de la membrana antes del aumento abrupto en la corriente de fuga (es decir, antes de la formación del poro). Por ejemplo, se elimina el potencial eléctrico después de que la corriente monitorizada supera un umbral predefinido o después de una cantidad especificada de tiempo pero antes del aumento abrupto en la corriente de fuga. De esta forma, el poro puede ser perforado o formado parcialmente en la membrana. Entonces, se puede utilizar el mismo procedimiento, o uno distinto, en un momento subsiguiente para completar la formación del poro.

Las Figuras 4A-4D ilustran adicionalmente la técnica para fabricar un nanoporo en una membrana 41. Para fines ilustrativos, la membrana 41 comprende nitruro de silicio que tiene, por ejemplo, un grosor, t , de 10 nm o 30 nm. Más específicamente, se puede depositar SiN_x con bajo esfuerzo (<250 MPa) sobre un sustrato 42 de silicio con un grosor de 200 μm mediante una deposición química de vapor de baja presión (LPCVD). Se abre una ventana de 50 $\mu\text{m} \times 50 \mu\text{m}$ en el lado trasero de un sustrato mediante un ataque químico anisotrópico con KOH. Se deduce la ausencia de daños estructurales preexistentes (por ejemplo, picaduras, nanogrietas, etc.) por el hecho de que no se mide corriente (es decir, <10 pA) a través de una membrana con campos eléctricos bajos (por ejemplo, <0,1 V/nm) antes de la fabricación del nanoporo.

Se puede fabricar un único nanoporo aplicando un potencial constante, ΔV , a través de una membrana 41. Se selecciona el valor del potencial eléctrico (por ejemplo, 4 voltios) para inducir un campo eléctrico que provoca una corriente de fuga a través de la membrana. En este ejemplo, el potencial eléctrico produce un campo eléctrico, E , del orden de 0,5 V/nm, en la membrana, definiéndose el campo eléctrico como $E = \Delta V/t$, y aproximándose a la resistencia de ruptura dieléctrica del material. Para otras situaciones, se concibe que el campo eléctrico será mayor de 0,1 V/nm y probablemente en el intervalo de 0,2 - 1 V/nm. A estas fuerzas elevadas de campo eléctrico, se observa una corriente sostenible de fuga, I_{fuga} , a través de la membrana, que, por lo demás, permanece aislante como campos eléctricos bajos. La I_{fuga} aumenta rápidamente con la fuerza del campo eléctrico, pero normalmente se encuentra en el intervalo de decenas de nanoamperios para las condiciones operativas, según se muestra en la Figura 5. Se comprenderá que la magnitud del potencial eléctrico necesaria para la creación de poros puede variar dependiendo del material de la membrana, del grosor de la membrana, al igual que otros factores.

Con referencia a la Figura 4B, el mecanismo dominante de conducción en la membrana dieléctrica es atribuido a una forma de tunelización asistida por trampas de electrones suministrados por los iones en la solución, dado que la membrana es demasiado gruesa para una tunelización mecánica cuántica directa significativa y la migración de impurezas no puede producir corrientes duraderas. También es improbable la migración directa de iones de electrolitos, dado que, para una fuerza dada de campo eléctrico, se observan mayores corrientes de fuga para membranas más gruesas. Se pueden producir cargas libres (electrones o agujeros) mediante reacciones redox en la superficie o mediante ionización de campo de iones incorporados. El número de trampas cargadas disponibles (defectos estructurales) establece la magnitud de la corriente observada de fuga. La acumulación de trampas cargadas producida por la ruptura de enlaces inducida por el campo eléctrico o por portadores de cargas enérgicas de tunelización da lugar a una vía conductora muy localizada y un evento diferenciado de ruptura dieléctrica, según se muestra en la Figura 4C.

En la Figura 4D, se forma un nanoporo mediante la eliminación de material de la membrana en el punto de fuga. La creación de un único nanoporo (es decir, un canal fluido que atraviesa la membrana) está indicada por un aumento irreversible repentino en la corriente de fuga, que se atribuye al inicio de la corriente iónica. Se utiliza un mecanismo de control de la información de retorno para eliminar rápidamente el potencial aplicado cuando la corriente supera un umbral predeterminado, I_{corte} . En una realización ejemplar, el umbral puede ser un valor fijo (por ejemplo, 110 nA). En algunas realizaciones, el umbral puede variar, por ejemplo dependiendo de la magnitud de la corriente de fuga. Por ejemplo, se puede configurar el umbral a un multiplicador (por ejemplo, 1,5) de la corriente de fuga antes de que se forme un poro. En otras realizaciones, el umbral puede estar definido como una tasa a la que cambia la corriente

monitorizada (por ejemplo, ~10 nA/s para SiN_x). Se comprende rápidamente que el valor del umbral puede variar dependiendo del material de la membrana, del grosor de la membrana, al igual que de otros factores.

5 Las Figuras 6 y 7 muestran tal evento de creación de poro en una membrana de SiN_x que tiene un grosor de 10 nm y de 30 nm, respectivamente. Estos resultados indican que el valor de I_{corte} ayuda a limitar el tamaño inicial del nanoporos. Por lo tanto, un umbral estrecho produce nanoporos del orden de 2 nm en diámetro o menores. Después del evento de fabricación del nanoporos, se puede aumentar el tamaño del nanoporos con una precisión subnanométrica aplicando impulsos cuadrados de campo eléctrico moderado de CA en el intervalo de ±0,2-0,3 V/nm. Esto permite que se adapte con precisión el tamaño del nanoporos para una aplicación particular de detección.

10 Para deducir el tamaño del nanoporos tras la fabricación, se puede medir su conductancia iónica, G, y puede relacionarse con un diámetro eficaz, d, suponiendo una geometría cilíndrica y dando cuenta de una resistencia de

acceso, utilizando $G = \sigma \left[\frac{4t}{\pi d^2} + \frac{1}{d} \right]^{-1}$, en la que σ es la conductividad volumétrica de la solución. Este

procedimiento, práctico para nanoporos fabricados en líquidos, proporciona una estimación razonable del tamaño del poro, que sale muy favorecido de una comparación con dimensiones reales obtenidas a partir de imágenes de microscopio electrónico de transmisión (TEM), en particular para poros >5 nm.

15 Las curvas I-V se realizan en una ventana de ±1 V, en la que se puede ignorar sin problemas una corriente de fuga. La Figura 8 muestra una respuesta eléctrica óhmica. La mayoría de los nanoporos exhiben curvas I-V lineales y ruido bajo 1/f tras una fabricación en concentraciones muy salinas (por ejemplo, 1M de KCl). Los restantes nanoporos que muestran signos de mayor ruido o autocierre pueden ser acondicionados, aplicando impulsos moderados de campo eléctrico, para aumentarlos ligeramente hasta que se consiga un comportamiento óhmico en
20 concentraciones salinas elevadas y con pH neutros. Las características I-V mostradas en la Figura 8 implican un perfil de poro de potencial eléctrico interno relativamente simétrico, que soporta la geometría simétrica con una distribución uniforme de la carga superficial adoptada por el modelo de conductancia del poro, también confirmado por las imágenes de TEM.

25 También se puede extender el procedimiento descrito anteriormente para fabricar nanoporos rectificando con un grado variable de rectificación (es decir, se comportan como diodos que dejan pasar corriente en una polaridad, pero no en la otra). Por ejemplo, se puede rectificar un pequeño nanoporos (<3 nm) en soluciones muy ácidas (por ejemplo, 1 M de KCl con un pH de 2). Si el poro es ruidoso, también se debería realizar en una solución ácida una aplicación de impulsos cuadrados de campo eléctrico moderado de CA (por ejemplo, impulsos de baja frecuencia en el intervalo de 0,2 - 0,3 V/nm para nitruro de silicio con bajo esfuerzo) para acondicionar el poro. Esto mantiene las
30 propiedades de rectificación incluso cuando se aumenta el poro. Se puede aumentar el grado hasta el que se rectifica un poro reduciendo la conductividad de la solución mientras se mantiene el pH ácido, dado que la menor conductividad reduce el apantallado y hace más importantes los efectos superficiales. También se contemplan otras técnicas para conseguir la rectificación.

35 En cambio, aumentar la conductividad o pasar hacia un pH neutro reduce los efectos de la rectificación. Además, el poro conducirá mejor en la polarización opuesta a aquella en la que fue creado, mientras que la solución en el poro comparte el mismo pH que aquella con la que fue creado. Se ha demostrado que invertir la solución de ácida a básica o viceversa invierte la dirección de rectificación. Dadas estas observaciones, se pueden controlar la geometría del poro y las características de carga superficial regulando el pH de las soluciones y la polaridad de la tensión a través de la membrana.

40 Para caracterizar adicionalmente los nanoporos, se examinó el ruido en la corriente iónica llevando a cabo mediciones de densidad espectral de energía. De forma notable, el procedimiento de fabricación puede producir sistemáticamente nanoporos con niveles de ruido bajo-1/f, comparables con nanoporos completamente humectados perforados mediante TEM. Esto puede atribuirse al hecho de que los nanoporos se crean directamente en líquido en vez de en un vacío y, por lo tanto, nunca están expuestos al aire. Hasta ahora, se han fabricado cientos de
45 nanoporos individuales (por ejemplo, que varían en tamaño desde 1 hasta 10 nm) con características eléctricas comparables que son estables durante días. Se puede mantener la estabilidad de los poros almacenando los poros en una concentración elevada de sal (por ejemplo, >3M de LiCl en agua o en 1 M de LiCl en etanol).

50 Es fascinante que el procedimiento descrito anteriormente desencadene la fabricación de un único nanoporos, en particular en una solución acuosa de KCl, que no se conoce que ataque químicamente SiN_x con un pH neutro, y dado que se conoce que una oxidación anódica de semiconductores o metales produce conjuntos de nanoporos. Para esclarecer los mecanismos que dan lugar a la formación de un poro en una membrana dieléctrica, se investiga adicionalmente el procedimiento de fabricación como una función de la tensión aplicada, del grosor de la membrana, de la composición electrolítica, de la concentración y del pH.

55 Las Figuras 9A y 9B muestran el tiempo hasta la creación del poro como una función del potencial transmembrana para membranas con un grosor de 30 nm, en 1 M de KCl tamponado a diversos pH. Interesantemente, el tiempo de fabricación de un único nanoporos aumenta de escala de forma exponencial con la tensión aplicada, y puede ser de

solo algunos segundos de duración. Por ejemplo, al aumentar la tensión desde 11 voltios hasta 17 voltios a través de una membrana de SiN_x con un grosor de 30 nm, se puede reducir el tiempo de fabricación 100 veces. Al aumentar la tensión desde 4 voltios hasta 10 voltios en una membrana con un grosor de 10 nm, se puede reducir el tiempo de fabricación hasta 1000 veces. Por lo tanto, el aumento del potencial eléctrico aplicado reduce el tiempo de fabricación. Pasa lo mismo con el campo eléctrico aplicado.

La composición electrolítica también tiene un efecto drástico sobre el tiempo de fabricación. En 1 M de KCl en agua, se redujo 10 veces el tiempo de fabricación de una membrana de SiN_x con un grosor de 30 nm cuando se va de un pH de 7 hasta un pH de 13,5 y se redujo 1000 veces yendo de un pH 7 a un pH 2 para una tensión aplicada dada. En una membrana de SiN_x con un grosor de 10 nm, el efecto del pH es menos pronunciado, con un cambio, como mucho, de 10 veces. Condiciones asimétricas de pH entre los dos lados de la membrana también afectan muchísimo al tiempo de fabricación dependiendo de la polaridad de la tensión (es decir, se obtienen tiempos muy rápidos de fabricación para: cátodo/lado negativo con un pH elevado y ánodo/lado positivo con un pH bajo; y se obtienen tiempos muy lentos de fabricación para cátodo/lado negativo con un pH bajo y ánodo/lado positivo con un pH elevado).

La Figura 9C muestra el tiempo hasta la creación de poro como una función del potencial transmembrana para membranas de SiN_x con un grosor de 10 nm, tamponadas con un pH de 10 en diversas soluciones acuosas a base de 1M de Cl. De nuevo, el tiempo de fabricación está relacionado exponencialmente con el potencial transmembrana, pero el potencial requerido para formar un nanoporo se reduce ahora en $\sim 1/3$ en comparación con las membranas con un grosor de 30 nm, con independencia de los distintos catiónicos (K^+ , Na^+ , Li^+) sometidos a ensayo. Los niveles de concentración de la composición electrolítica también tuvieron un efecto sobre el tiempo de fabricación. Por ejemplo, en una membrana de SiN_x con un grosor de 30 nm, se aumentó significativamente (es decir, >100 veces) el tiempo de fabricación a bajas concentraciones (~ 10 mM de KCl en agua) en comparación con concentraciones elevadas de sal (1 M y 3M de KCl en agua).

No obstante, estas observaciones indican que el campo eléctrico aplicado, $E=\Delta V/t$, a través de la membrana es la fuerza motriz principal para iniciar la fabricación de un único nanoporo. Los campos en el intervalo de 0,4-1 V/nm están cerca de la resistencia de ruptura dieléctrica de películas con bajo esfuerzo de SiN_x , y son clave para intensificar la corriente de fuga que se piensa que provoca en última instancia la ruptura en las capas aislantes delgadas. La dependencia exponencial del tiempo hasta la creación del poro del potencial implica la misma dependencia del campo, lo que es reminiscente del tiempo hasta la ruptura dieléctrica en la dieléctrica de puertas. En consecuencia, los mecanismos de ruptura dieléctrica siguen: (i) una acumulación de trampas de carga (es decir, defectos estructurales) por una rotura de enlaces inducida por el campo eléctrico o generada por la inyección de carga desde el ánodo o el cátodo, (ii) aumentar hasta una densidad crítica la formación de una vía conductora muy localizada, y (iii) provocar daños físicos debidos a una disipación sustancial de energía y al calentamiento resultante. El procedimiento mediante el que se fabrica un único nanoporo en una solución es similar, aunque se controlan los daños a nanoescala al limitar la corriente localizada de fuga, en el inicio del primer evento diferenciado de ruptura. En último término, se crea un único nanoporo dado que, para un potencial transmembrana fijo, la vía de formación de un nanoporo experimenta una mayor fuerza del campo eléctrico durante el crecimiento, lo que refuerza localmente la tasa de generación de defectos. Sigue sin estar claro el procedimiento mediante el cual se elimina material de la membrana, pero se podrían disolver químicamente enlaces rotos por medio del electrolito, o después de una conversión a óxidos o hidruros. Se puede explicar la dependencia del pH sobre el tiempo de fabricación por el hecho de que se amplifica la ruptura con un pH reducido al producir la ionización por colisión una avalancha electrónica, debido a la mayor probabilidad de inyecciones de agujeros, o a la incorporación de H^+ , del ánodo, lo que aumenta la tasa de formación de defectos estructurales.

Se llevan a cabo experimentos de translocación de ADN para demostrar que estos nanoporos pueden ser aprovechados para el beneficio de la detección de una única molécula. Se prevé que el paso efectuado electroforéticamente de una molécula de ADN a través de una membrana bloquee transitoriamente el flujo de iones de forma que refleje la longitud, el tamaño, la carga y la forma de la molécula. En la Figura 10 se muestran los resultados utilizando un poro con un diámetro de 5 nm en una membrana de SiN_x con un grosor de 10 nm. El diagrama de puntos muestra la duración del evento y el bloqueo medio de corriente de más de 2.400 eventos de translocación de una única molécula de 5kb ADNbc. La caída de tensión es indicativa del diámetro ($\sim 2,2$ nm) de la molécula mientras que la duración representa el tiempo tomado por una molécula para translocarse completamente a través del poro. La forma característica de los eventos es indistinguible de datos obtenidos en nanoporos perforados mediante TEM. Los bloqueos cuantificados de corriente observados soportan decididamente la presencia de un único nanoporo que atraviesa la membrana. Utilizando ADNbc (con un diámetro de $\sim 2,2$ nm) como regla de tamaño molecular, el valor de los eventos de bloqueo de un único nivel $\Delta G=7,4 \pm 0,4$ nS, proporciona un diámetro eficaz del poro coherente con el tamaño extraído del modelo de conductancia del poro.

La fabricación del nanoporo mediante una ruptura dieléctrica controlada en una solución representa un paso adelante importante con respecto a los actuales procedimientos de fabricación, y podría proporcionar una vía hacia la comercialización de tecnología de nanoporo permitiendo la fabricación en serie de bajo coste de dispositivos. Aunque se sospecha que el procedimiento de creación de nanoporos es una propiedad intrínseca de la membrana dieléctrica, de modo que el nanoporo puede formarse en cualquier lugar sobre la superficie de la membrana, la

comprensión actual sugiere decididamente que se puede controlar la posición del poro controlando localmente la fuerza del campo eléctrico o la resistencia dieléctrica del material. Por ejemplo, esto podría conseguirse rebajando localmente la membrana, según se indica en 110 de la Figura 11. El campo eléctrico a través de la membrana puede estimarse como $E = V/L$, en la que V es la tensión aplicada y L es el grosor de la membrana. Por lo tanto, la tensión umbral para la ruptura dieléctrica es tres veces menor para la región rebajada —garantizando que sea más probable que se cree el nanoporo en esta región, dado que el tiempo de fabricación está relacionado exponencialmente con la fuerza del campo—.

En otro ejemplo, el campo eléctrico puede estar limitado a áreas específicas en la membrana, por ejemplo utilizando una encapsulación de canales nano o microfluídicos. Con referencia a la Figura 12, los canales nano o microfluídicos 120 están definidos en el lado superior de la membrana 41. Cada canal es direccionable independientemente tanto fluidicamente como eléctricamente. Se utilizarían cuatro electrodos en el lado superior; mientras que solo se necesita un único electrodo en el lado inferior. Se puede fabricar un nanoporo en cada canal independientemente y cuando sea necesario debido a que el campo eléctrico está limitado a las regiones en el interior del canal. Este enfoque también permitiría la integración sencilla de nanoporos direccionables independientemente en un formato matricial en un único *chip*. Se concibe que se pueden emplear otras técnicas para concentrar el campo eléctrico en áreas particulares, tales como la colocación de electrodos directamente en contacto con la superficie de la membrana.

Se ha proporcionado la anterior descripción de las realizaciones con fines ilustrativos y descriptivos. No se concibe que sea exhaustivo ni que limite la divulgación. Los elementos o características individuales de una realización particular no están limitados, en general, a esa realización particular, pero, cuando sea aplicable, son intercambiables y pueden ser utilizados en una realización seleccionada, aunque no se muestre ni describa específicamente. También se puede variar la misma de muchas formas. No se deben considerar tales variaciones como un alejamiento de la divulgación, y se concibe que todas las modificaciones de ese tipo estén incluidas en el alcance de la divulgación.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para fabricar un único nanoporo en una membrana, que comprende:
- seleccionar un potencial eléctrico que induce un campo eléctrico en la membrana, teniendo el campo eléctrico un valor superior a 0,1 voltios por nanómetro;
 - aplicar el potencial eléctrico a través de una membrana que comprende un material dieléctrico, estando sumergida la membrana en una solución que contiene iones;
 - monitorizar la corriente de fuga a través de la membrana mientras que se aplica el potencial eléctrico a través de la membrana;
 - detectar un aumento abrupto en la corriente de fuga a través de la membrana mientras se aplica el potencial eléctrico a través de la membrana; y
 - eliminar el potencial eléctrico a través de la membrana en respuesta a la detección del aumento abrupto en la corriente de fuga para detener la fabricación del poro.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende, además, seleccionar un potencial eléctrico que se aproxime a la resistencia dieléctrica del material de la membrana.
3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la detección de un aumento abrupto en la corriente de fuga comprende, además, determinar una tasa de cambio de la corriente monitorizada y comparar la tasa de cambio con un umbral.
4. El procedimiento de la reivindicación 3, que comprende, además, eliminar el potencial eléctrico cuando la tasa de cambio de la corriente monitorizada supera el umbral, deteniendo, de ese modo, la fabricación.
5. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la detección de un aumento abrupto en la corriente de fuga comprende, además, comparar un valor de la corriente monitorizada con un umbral y eliminar el potencial eléctrico cuando el valor de la corriente monitorizada supera un umbral, deteniendo, de ese modo, la fabricación.
6. El procedimiento de la reivindicación 1 que comprende, además:
- disponer la membrana entre dos reservorios llenos de un fluido que contiene iones, de forma que la membrana separa los dos reservorios y evita que el fluido pase entre los dos reservorios;
 - colocar un electrodo en cada uno de los dos reservorios; y
 - generar el potencial eléctrico utilizando los electrodos.
7. El procedimiento de la reivindicación 6, que comprende, además, colocar uno de los dos electrodos en contacto directo con la membrana.
8. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende, además, aumentar el potencial eléctrico aplicado para reducir el tiempo de fabricación.
9. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende, además, aumentar el campo eléctrico en la membrana para reducir el tiempo de fabricación.
10. El procedimiento de la reivindicación 6, que comprende, además, aumentar la concentración de iones en el fluido para reducir el tiempo de fabricación.
11. El procedimiento de la reivindicación 6, que comprende, además, aumentar la acidez del fluido para reducir el tiempo de fabricación.
12. El procedimiento de la reivindicación 6, que comprende, además, aumentar la alcalinidad del fluido para reducir el tiempo de fabricación.
13. El procedimiento de la reivindicación 6, que comprende, además, cambiar la acidez del fluido en un reservorio con respecto al fluido en el otro reservorio para cambiar el tiempo de fabricación.
14. El procedimiento de la reivindicación 6, que comprende, además, regular la acidez del fluido en cada lado de la membrana para controlar la geometría y la característica de carga superficial del poro.
15. El procedimiento de la reivindicación 6, que comprende, además, regular la polaridad del potencial eléctrico en la membrana para controlar la geometría y la característica de carga superficial del poro.

16. Un aparato para fabricar un único nanoporo en una membrana, que comprende:

- dos reservorios acoplados de forma fluida entre sí por medio de un paso, estando configurado el paso para recibir una membrana que evita que el líquido pase entre los dos reservorios, comprendiendo la membrana un material dieléctrico;

5 - al menos dos electrodos conectados eléctricamente con una fuente de tensión y operables para generar un potencial eléctrico a través de la membrana, estando dispuesto en cada uno de los dos reservorios un electrodo de los al menos dos electrodos; y

10 - un sensor de la corriente acoplado eléctricamente con uno de los electrodos y operable para medir la corriente que fluye entre los dos reservorios;

caracterizado porque hay interconectado un controlador con el sensor de la corriente, detectando el controlador un aumento abrupto en la corriente medida y, en respuesta a la detección del aumento abrupto en la corriente medida, elimina el potencial eléctrico a través de la membrana.

15 17. El aparato de la reivindicación 16, en el que uno de los reservorios está separado de forma fluida en dos o más microcanales, teniendo cada microcanal un electrodo dispuesto en el mismo.

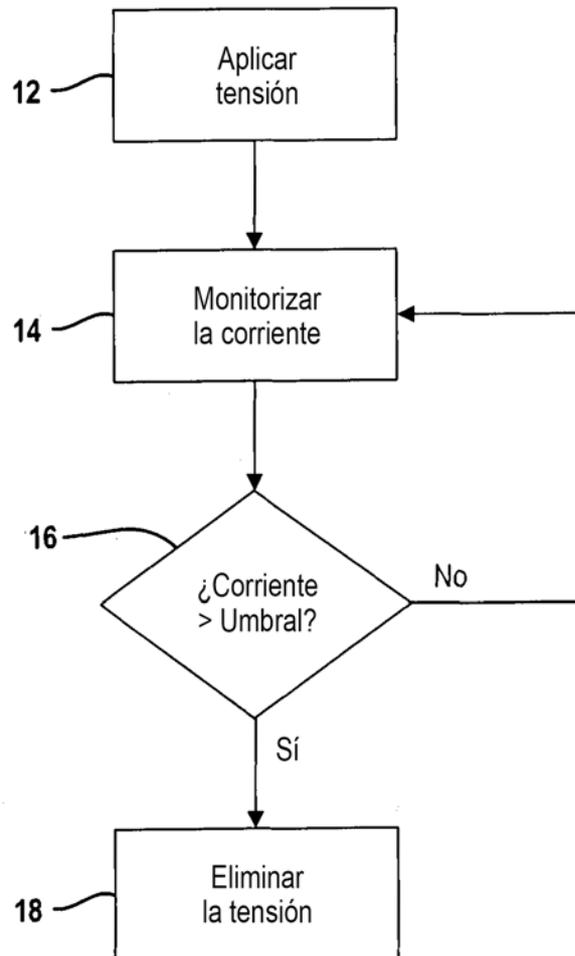
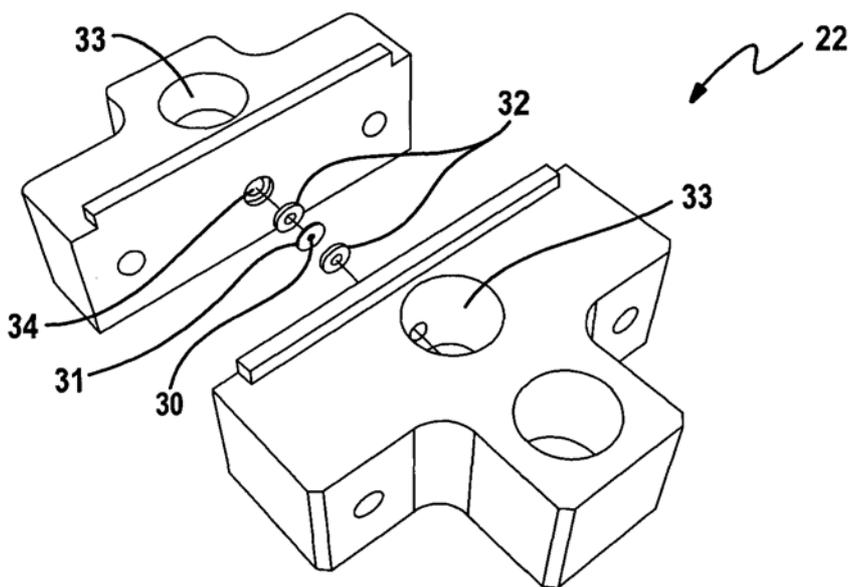
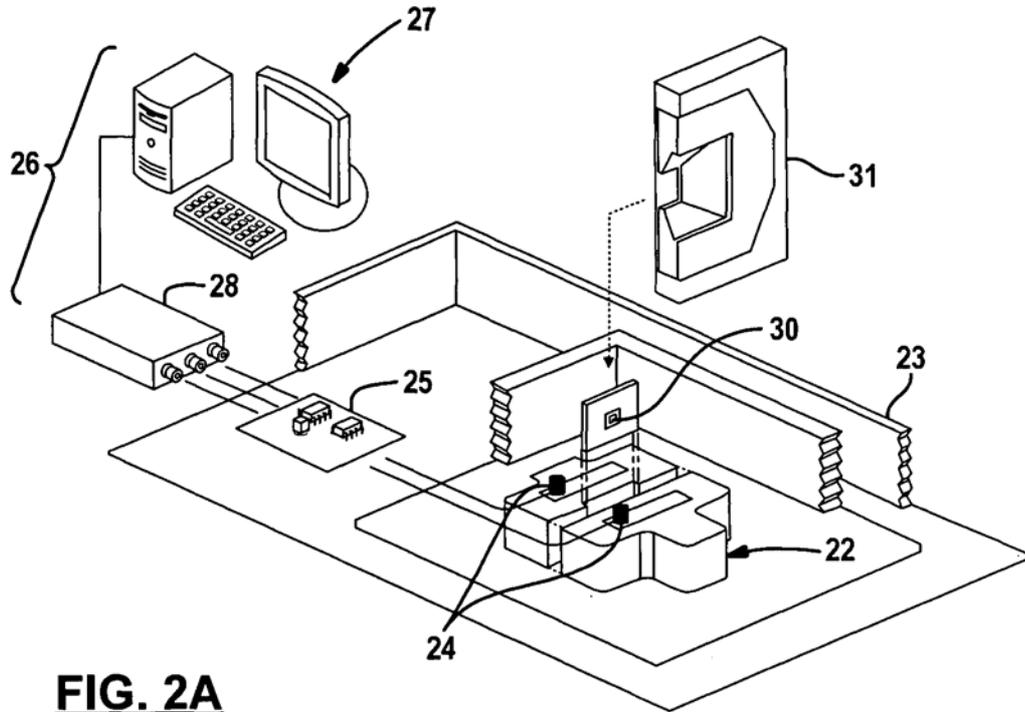


FIG. 1



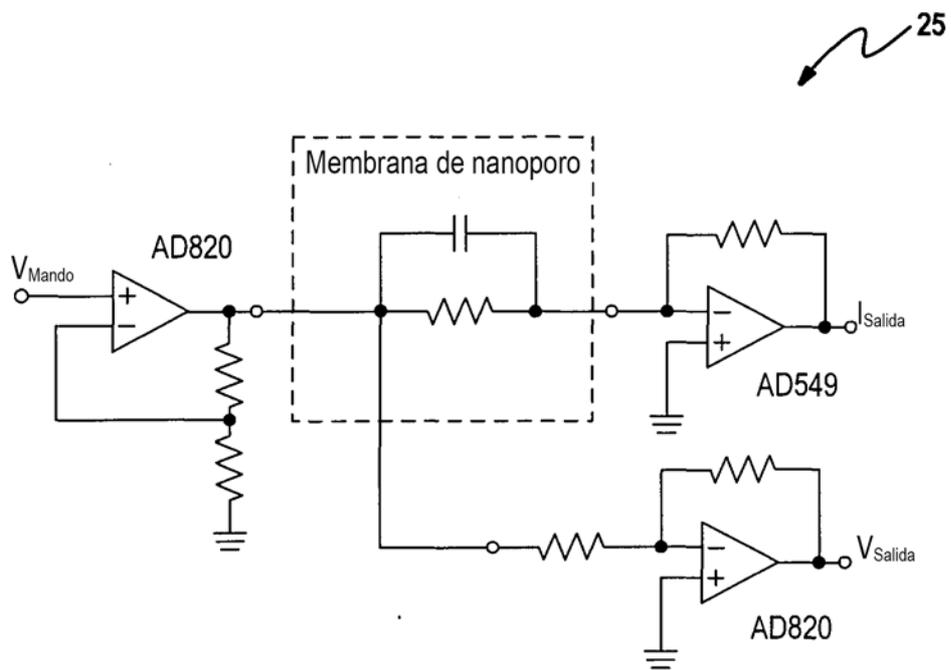


FIG. 3

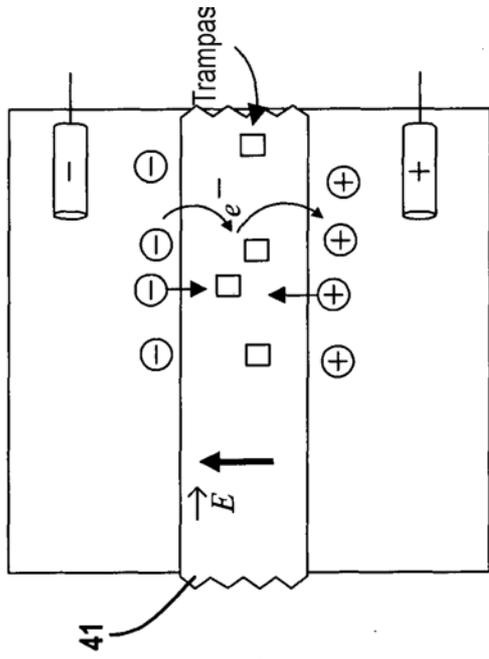


FIG. 4B

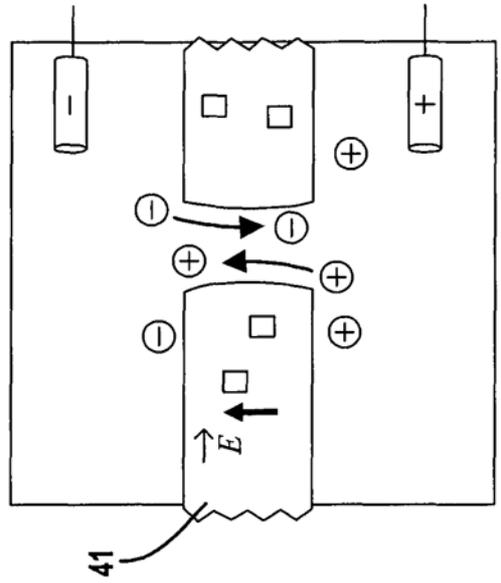


FIG. 4D

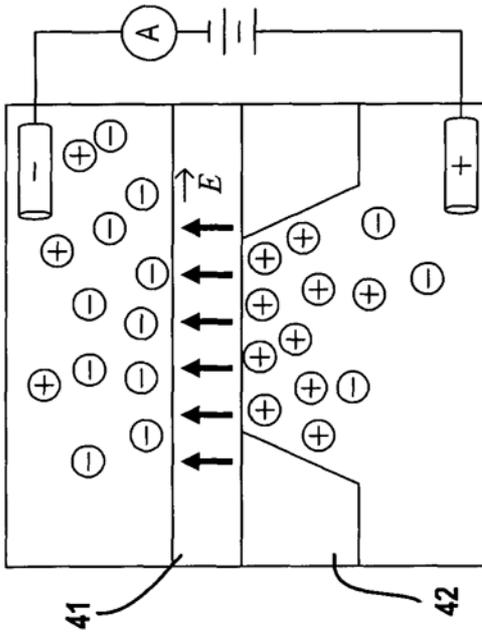


FIG. 4A

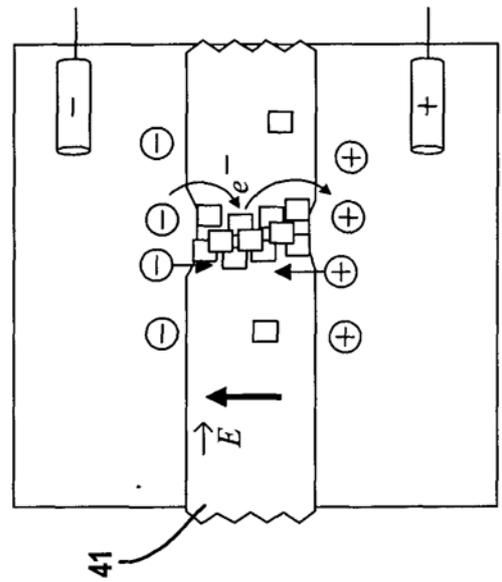


FIG. 4C

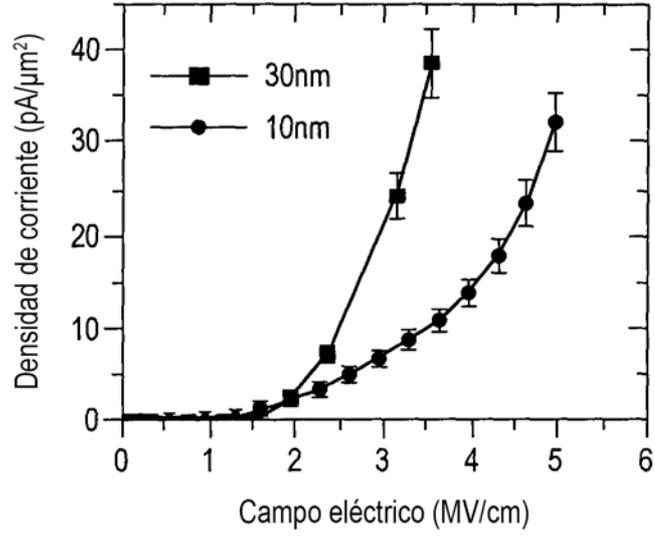


FIG. 5

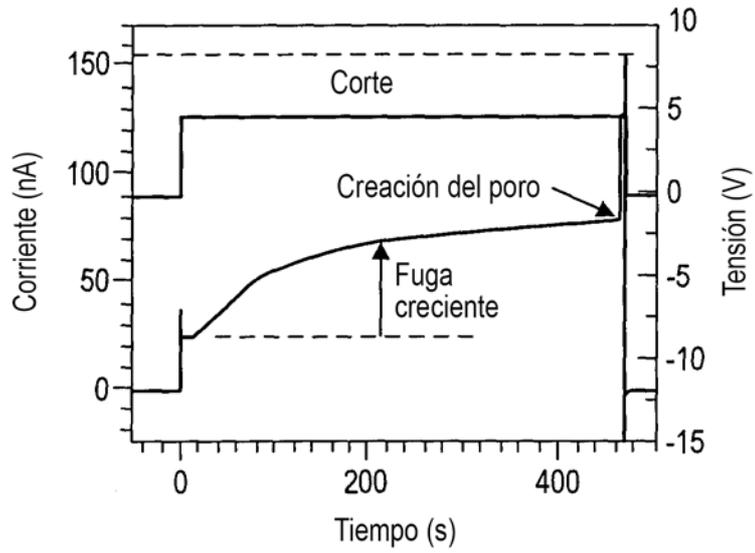


FIG. 6

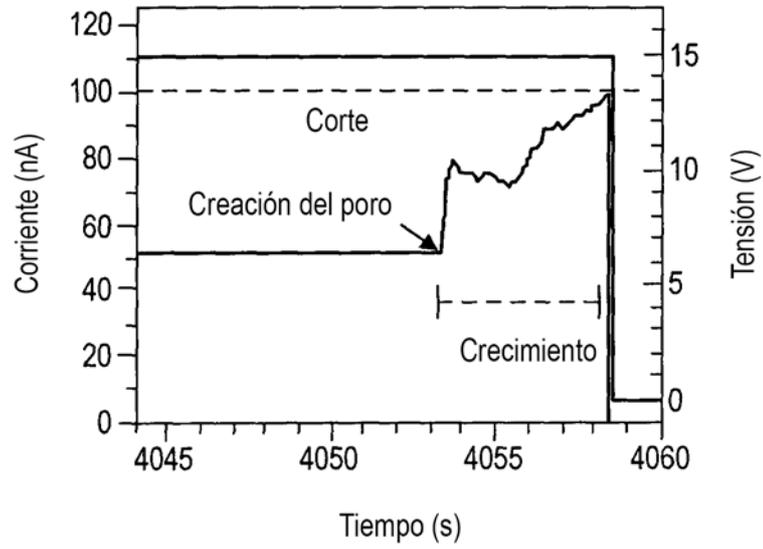


FIG. 7

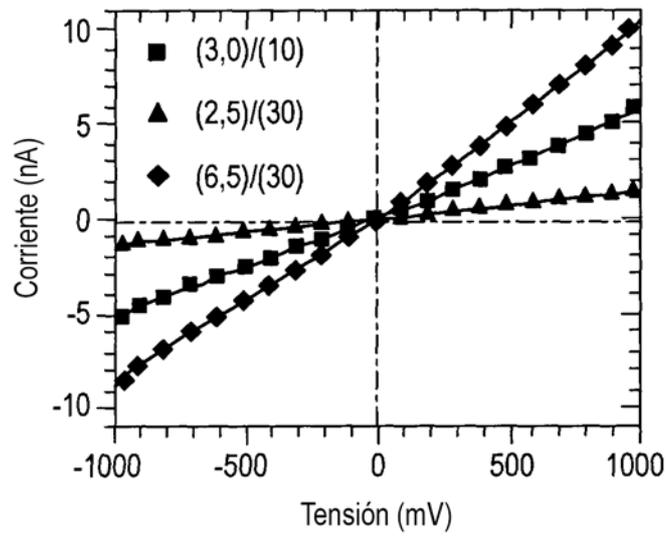


FIG. 8

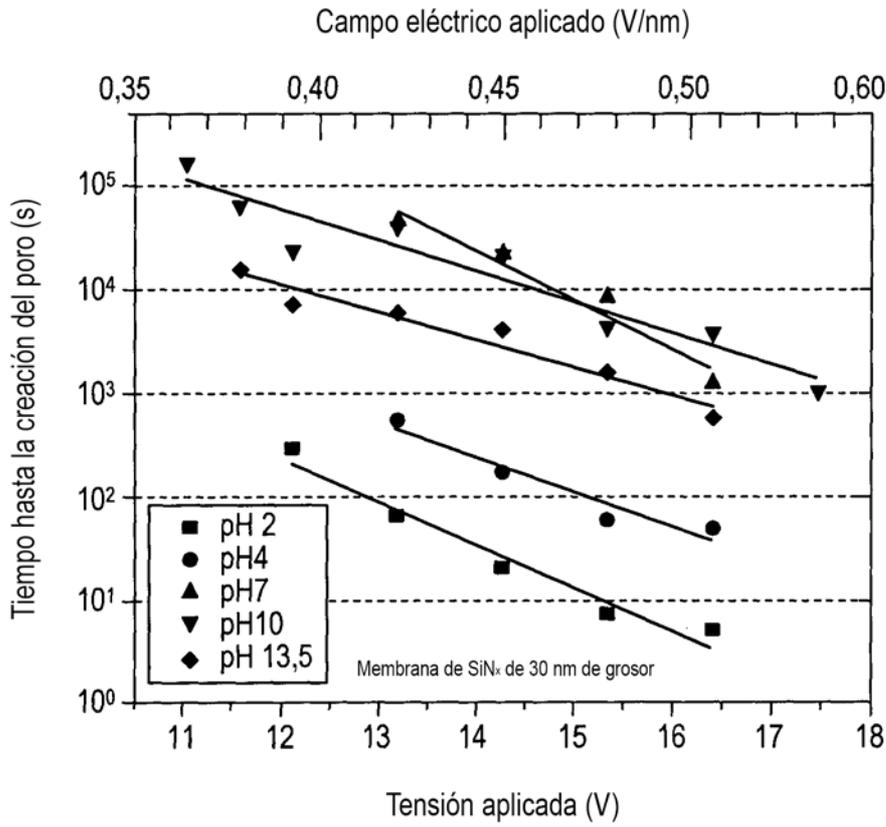


FIG. 9A

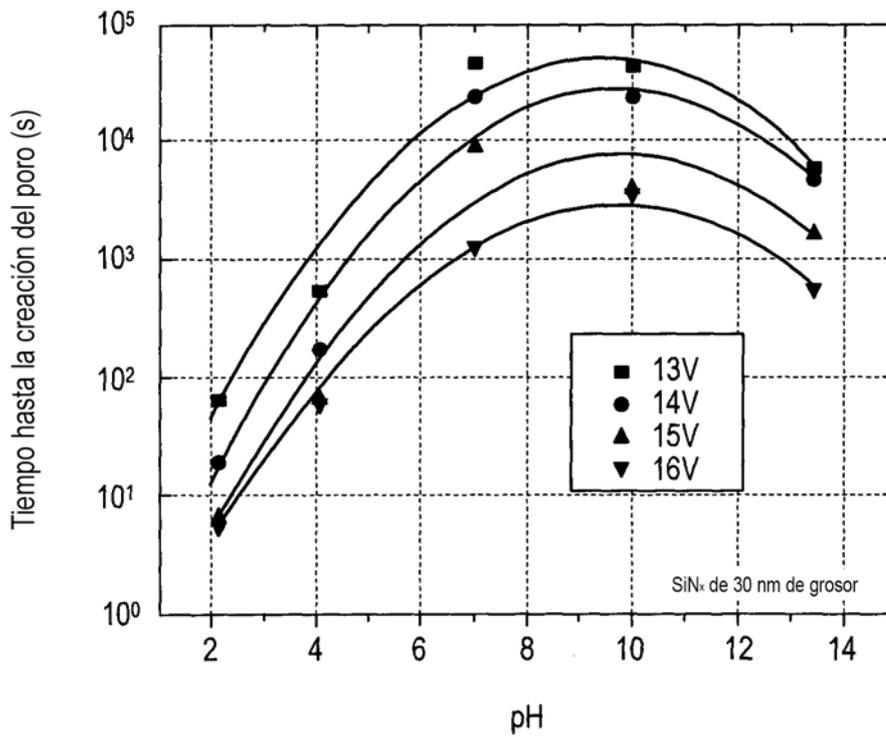


FIG. 9B

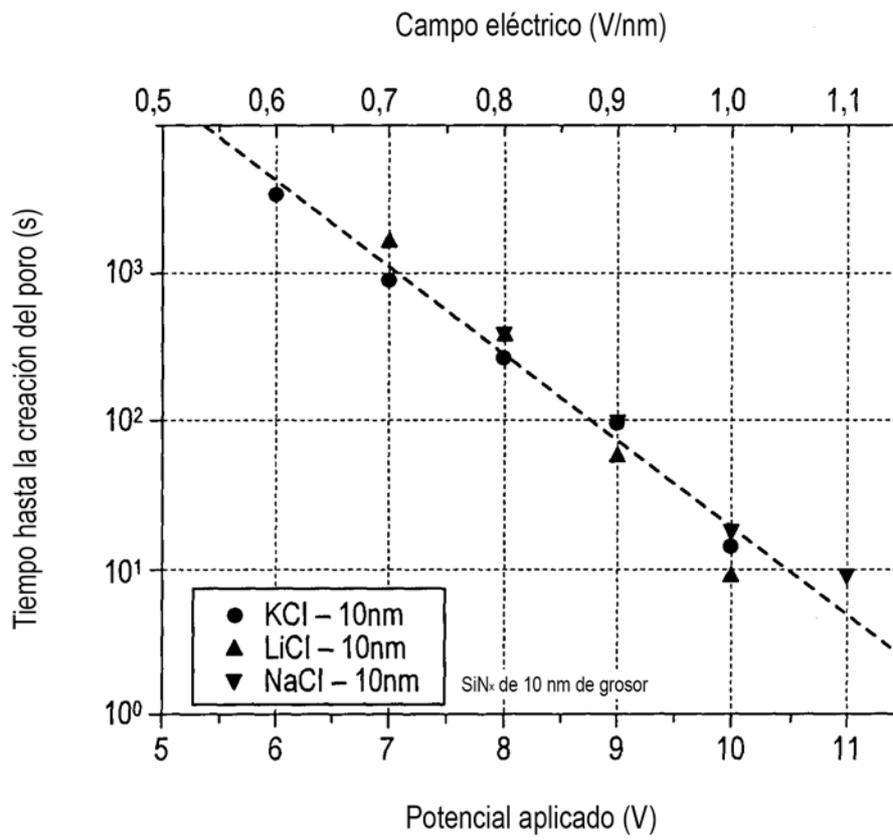


FIG. 9C

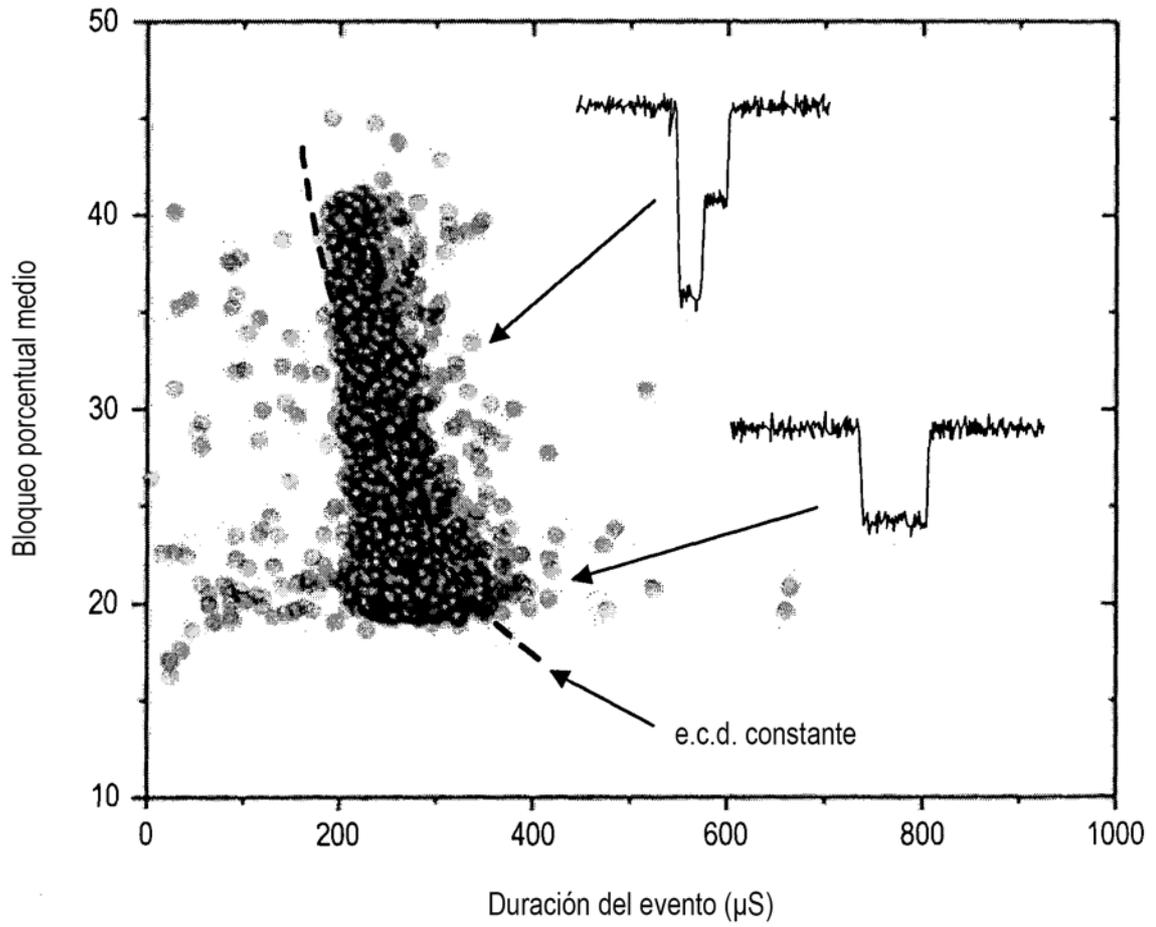


FIG. 10

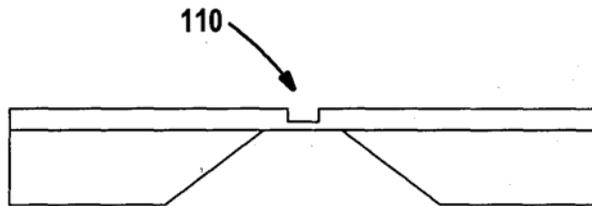


FIG. 11

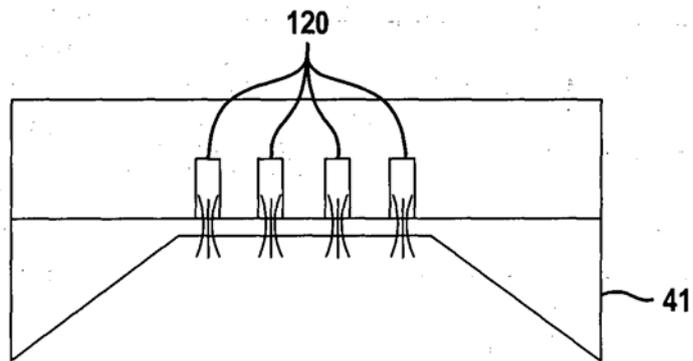


FIG. 12