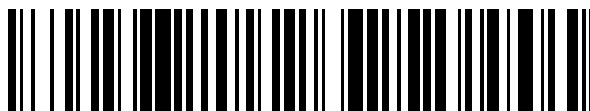


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 644 764**

51 Int. Cl.:

B01L 3/00 (2006.01)

G01N 1/40 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.03.2010 PCT/FR2010/000263**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.10.2010 WO10112699**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.03.2010 E 10713496 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.07.2017 EP 2414099**

54 Título: **Procedimiento de detección y cuantificación de analitos de interés en un líquido y dispositivo de aplicación**

30 Prioridad:

31.03.2009 FR 0901573

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

30.11.2017

73 Titular/es:

**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (50.0%)
3, rue Michel-Ange
75016 Paris, FR y
INSTITUT CURIE (50.0%)**

72 Inventor/es:

**PEYRADE, JEAN-PIERRE;
PEYRADE, DAVID;
VIEU, CHRISTOPHE y
MALAQUIN, LAURENT**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 644 764 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).

DESCRIPCION

Procedimiento de detección y cuantificación de analitos de interés en un líquido y dispositivo de aplicación

La invención se refiere a un procedimiento de detección y cuantificación de analitos de interés en un líquido y a un dispositivo de aplicación.

5 Más adelante en la presente descripción, se denominará "objetivos" a los analitos de interés buscados.

El procedimiento según la invención permite alcanzar límites de resolución que van hasta cinco nanoobjetos por mililitro o inferiores a una concentración de moléculas atto-molar. El líquido puede ser complejo, es decir, que puede comprender varios tipos de analitos, de los cuales solamente interesa detectar una parte.

10 Numerosos trabajos muestran que la creciente utilización de pesticidas (fungicidas, insecticidas, herbicidas), raticidas, antibabosas, abonos, detergentes, hormonas y medicamentos, dispersa las moléculas que se introducen en su composición en el medio ambiente y, así, en las plantas y los alimentos.

Del mismo modo, las reacciones de combustión de carburantes emiten a la atmósfera numerosas nanopartículas, plomo y grafito.

15 Las aplicaciones programadas de nanopartículas funcionales plantean también el problema de su dispersión en la naturaleza.

Evaluar los riesgos de estas moléculas y nanopartículas para el medio ambiente y para el ser humano requiere detectarlos, comprender su movilidad, su reactividad, su ecotoxicidad y su persistencia. Los parámetros importantes que hay que dominar son, sobre todo, la detección de su presencia y el seguimiento de la evolución de esta presencia a lo largo del tiempo.

20 De hecho, poder detectar y analizar los analitos presentes en el agua, el aire, el suelo, las plantas o los alimentos es un reto medioambiental importante.

25 Se trata igualmente de un reto médico. Poder obtener rápidamente la composición de muestras humanas de tipo suero, sangre u órganos, capturar hebras de ADN, proteínas y biomarcadores circulantes, (los biomarcadores circulantes son los precursores de reincidencias metastásicas de tumores malignos), capturar bacterias o virus, detectar esporas, a un nivel de concentración muy bajo, es esencial para establecer el diagnóstico médico y es la base del tratamiento precoz de las enfermedades. La vigilancia permanente de su evolución es indispensable para medir la eficacia de los tratamientos médicos y modificarlos si es necesario y evolucionar así hacia una medicina individualizada.

30 El acceso al análisis de las secuencias de ADN se hace necesario para iniciar el desarrollo del "pronóstico" (término que se refiere a la identificación de anomalías genéticas que hacen probable el desarrollo a largo plazo de una enfermedad).

Así, la detección por ejemplo de un número reducido de copias de secuencias de ácidos nucleicos en suero, sin recurrir a la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa, por sus siglas en inglés) para multiplicar su número, es también un reto principal para el análisis médico o la virología, para reducir el tiempo de análisis.

35 Es pues esencial disponer de técnicas de medición específicas y muy sensibles que permitan detectar de manera simple, rápida, rutinaria, *in situ* y con bajo coste, la presencia de trazas de una multitud de analitos (moléculas específicas, nano o micropartículas, bacterias, virus, proteínas, biomarcadores circulantes, ADN, esporas...) dispersados en un medio que puede ser complejo. Estos analitos son, por ejemplo, las 33 sustancias peligrosas enunciadas en la ley del agua (Directivas 76/464/CEE y 200/60/CEE) donde el 50% son para eliminar prioritariamente.

40 Esta directiva marco sobre la política de aguas ha impulsado el desarrollo del sector del análisis de trazas en los laboratorios, pero se proponen pocas técnicas a nivel industrial.

45 Un estudio publicado por la Agencia Francesa de Seguridad Sanitaria del Medio ambiente y del Trabajo (AFSSET, por sus siglas en francés) (2006) titulado « les nano-matériaux: effets sur la santé de l'homme y sur l'environnement » evalúa el estado de la técnica en materia de técnicas y límites de detección de nanopartículas en aerosoles (gases de escape, humos) en el aire, el agua y los suelos.

50 Una primera categoría está constituida por técnicas de detección no específicas (es decir, caracterizan globalmente el conjunto de las partículas) y que se llevan a cabo sin concentración de los analitos previamente al análisis. Se trata de técnicas denominadas "Contadores de Núcleos de Condensación" (CNC) comercializadas por la compañía americana TSI y por la compañía alemana GRIMM. Consisten en detectar ópticamente una serie de partículas por segundo. Las partículas pueden tener un tamaño comprendido entre 5 nm y 1 µm y una concentración comprendida entre 0,1 y 10⁶ partículas/ml. Se aplican sobre todo en el caso de aire y aerosoles.

La segunda categoría está constituida por técnicas de detección no específicas, pero que se llevan a cabo por concentración o acumulación de los analitos previamente al análisis. Son baterías de difusión en las que el paso del aerosol a través de una sucesión de rejillas clasifica los analitos por tamaño. Un acoplamiento con un contador de partículas permite el recuento de la proporción de cada granulometría de analitos cuyo tamaño está comprendido entre 2 y 200 nm. La técnica ELPI (Impactador Eléctrico de Baja Presión, por sus siglas en inglés) selecciona partículas cargadas previamente, por inercia, cuyo tamaño está comprendido entre 7 nm y 10 μm , después los detecta eléctricamente. Su concentración debe ser bastante elevada (entre 1.000 y 10.000 partículas por ml). El análisis de movilidad eléctrica (Separador de Barrido de las Partículas por Movilidad o SMPS, por sus siglas en inglés) permite detectar partículas de 3 a 50 nm de diámetro con un analizador de movilidad diferencial (DMA, por sus siglas en inglés) y un contador de partículas.

Otra categoría está constituida por técnicas de detección específicas, que se llevan a cabo generalmente por concentración previa al análisis. Las partículas atmosféricas o de suelo, cuyo tamaño está comprendido entre 30 y 300 nm, se ponen en disolución, después se analizan, por cromatografía iónica o por espectrometría de masas. Otra técnica utiliza la fluorescencia inducida por láser (LIBS). Por último, la fijación previa de nanotrazadores que reconocen la superficie activa de ciertas nanopartículas permite detectarlas de manera específica.

Se pueden citar, en el caso de disoluciones acuosas de partículas orgánicas, las técnicas que se llevan a cabo por recuento de los analitos por métodos de microscopio (microscopio electrónico o de fuerza atómica), por separación por tamaño (ultrafiltración, centrifugación, fraccionamiento de flujo), cromatografía, acoplamiento del fraccionamiento con la técnica de detección denominada Espectrometría de Masas con Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP-MS), y por detección láser.

También se pueden citar, en el caso de nanopartículas inorgánicas, técnicas de observación al microscopio de barrido electrónico (MBE), de difusión de la luz, de difusión de rayos X o de neutrones, de "Fraccionamiento en Flujo mediante Campo de Flujo" (FFFF), cromatografía hidrodinámica (HDC), electrospray y movilidad eléctrica, potencial zeta (o medida de la carga superficial), absorción atómica y análisis de elementos ligeros C-H-N-S.

Sin embargo, estas técnicas no se adaptan más que a análisis de tamaños, formas, estado de agregación, carga superficial y composición química en elementos ligeros. Cuando son específicas, sus límites de detección, después de concentración, son malas y se extienden de 1 g/l a 10 ng/l (o 10^8 a 10^9 nanopartículas/ml).

Son difícilmente cuantitativas, insuficientemente sensibles (es decir, que su concentración del límite de detección no es suficientemente baja) y sobre todo insuficientemente específicas para las partículas que se desea detectar generalmente en un medio complejo. Son también demasiado costosas, no son móviles en el terreno, son impracticables de manera rutinaria y requieren operadores altamente especializados en los laboratorios.

Las publicaciones relativas a la detección de moléculas procedentes de seres vivos (o biodiagnóstico) proporcionan un límite de detección mucho más exhaustivo. Por ejemplo, en « Nanostructures in biondiagnostics » (N Chem. Rev.105 (2005) 1547-1562), una primera tabla proporciona los límites de detección alcanzados para el ácido nucleico. Fluctúan entre nanomolar (nM o 10^{-9} moles por litro) y femtomolar (fM o 10^{-15} moles por litro), siguiendo la técnica utilizada. Un solo método que utiliza los productos de una reacción PCR permite alcanzar 0,1 fM. Pero este método es largo en base al tiempo necesario para multiplicar las cadenas de nucleótidos. Una segunda tabla proporciona los límites de detección de proteínas, que fluctúan también entre nM y fM. Sólo la técnica de multiplicación por código de barra permite alcanzar 0,030 fM (30 aM) pero es compleja de aplicar.

Este examen demuestra que existe una gran diversidad de técnicas de detección y de análisis de disoluciones. Las "más sensibles" se desarrollan en laboratorio, son costosas, lentas, poco móviles y a menudo no son específicas. Para ser verosímiles en los planes de la contaminación del medio ambiente y del biodiagnóstico, cualquier técnica de detección de trazas debe ser de bajo coste, rápida, móvil, selectiva, con suficiente resolución para permitir alcanzar, y si es posible estar por debajo de, el umbral de detección de 10^5 a 10^6 nanoobjetos por mililitro o si los analitos son moléculas, femtomolar.

Las patentes de EE. UU. 2005/0079517, 5334837, 2004/0203175 y 20060105453 muestran ejemplos de preparación de muestras por evaporación controlada.

El objetivo general de la presente invención es proporcionar un método de detección y cuantificación de analitos presentes en una disolución compleja, móvil, rápido y selectivo, que puede utilizarse con numerosos tipos de analitos, económico y que permite alcanzar, incluso supera, un umbral de detección de $6 \cdot 10^5$ nano o microobjetos por mililitro o, si los analitos son moléculas, del orden de femtomolar.

Más en particular, la invención tiene por objetivo permitir la detección de analitos en forma de nano- o micropartículas, analitos moleculares específicos y nucleótidos en una disolución simple o compleja. La invención tiene por objetivo igualmente permitir la detección de analitos de tipo esporas, virus o bacterias, en una disolución simple o compleja. La disolución compleja puede ser preacondicionada para representar los analitos presentes en el aire, el agua, el suelo, los alimentos, los organismos vivos, etc.

La presente invención propone un procedimiento de detección de analitos objeto de interés, presentes o puestos en

disolución, combinando una fase de concentración natural de los analitos de interés objetivo en la muestra y una fase de captura de los analitos de interés por un ensamblaje convectivo y capilar dirigido sobre una superficie provista de sondas y comprendiendo una fase de análisis de la superficie estructurada. Estas sondas son motivos topográficos, químicos, biológicos, electrostáticos o magnéticos.

5 Con este fin, la invención tiene por objeto un procedimiento tal como se define en la reivindicación 1.

Por convenio, las etapas del procedimiento precedente se hacen por orden alfabético.

10 Para alcanzar una gran sensibilidad, es decir, la posibilidad de detectar una concentración muy baja de analitos objetivo, la invención propone utilizar la combinación de una técnica, eficaz y reproducible, de concentración natural de la disolución madre, con una retención específica de los analitos objeto de interés en sitios organizados, denominados «sondas», dispuestos en la superficie de un sustrato, lo que permite un análisis automatizado de la superficie del sustrato.

15 Así, la evaporación controlada de la muestra en los alrededores de la línea triple genera corrientes de convección que concentran los analitos en su proximidad. Además, cuando se desplaza la línea triple, a medida que el líquido se evapora a la atmósfera, en la superficie estructurada del sustrato, los analitos objetivo se fijan por fuerzas capilares a la superficie estructurada, después son capturados (inmovilizados) por fuerzas específicas ejercidas por las sondas.

Según otros modos de realización:

- la etapa d) puede aplicarse contando los analitos capturados en la etapa c) por la superficie micro- o nanoestructurada del sustrato y comparando el número de analitos objetivo, capturados, en una tabla de conversión, para obtener la concentración de analitos en la disolución madre;

20 - la etapa d) puede aplicarse contando los analitos capturados en la etapa c), comprendiendo estos analitos los analitos de referencia cuya concentración es conocida y los analitos de interés cuya concentración es desconocida pero proporcional a la de los analitos de referencia y comparando las proporciones de los analitos de referencia y los analitos de interés;

25 - la etapa b) puede comprender, además, el depósito de una placa en contacto con la muestra líquida, para encerrarlo entre el sustrato y la placa;

- la placa y el sustrato pueden desplazarse uno con respecto al otro según una dirección de traslación casi paralela al sustrato, durante la evaporación controlada de la muestra;

- el sustrato y la muestra pueden confinarse en un recinto con atmósfera controlada;

- durante la etapa c), se puede regular la presión parcial de los componentes del líquido en atmósfera controlada;

30 - la etapa c) puede aplicarse aportando una cantidad de energía suficiente para provocar y controlar la evaporación del líquido al nivel de la línea triple;

- el procedimiento puede comprender una etapa a) de acondicionamiento de la disolución madre;

35 - el acondicionamiento de la disolución madre puede consistir en eliminar de la disolución madre los analitos inútiles, añadir nuevos analitos objetivo y/o añadir disolventes o nuevas moléculas que favorezcan el ensamblaje convectivo y capilar sobre la superficie estructurada;

40 - el procedimiento puede comprender una etapa previa de preparación de la superficie estructurada que consiste en depositar una gota de líquido que comprende moléculas de sondas, específicas de los analitos objetivo, en la superficie del sustrato, para que la gota recubra al menos parcialmente la superficie del sustrato, para provocar después una evaporación controlada de la gota en los alrededores de una línea triple gota/sustrato/atmósfera, de tal manera que esta línea triple se desplace, a una velocidad controlada, sobre la superficie estructurada del sustrato, a medida que se evapora el líquido a la atmósfera, y que las moléculas sonda se fijen sobre la superficie del sustrato para crear una red de sondas estructurando la superficie del sustrato;

- el procedimiento puede comprender una etapa intermedia entre la etapa c) y la etapa d), de fijación de fluoróforos en los analitos objetivo, capturados, para permitir un recuento por fluorimetría durante la etapa d);

45 - el procedimiento puede comprender, además, entre la etapa c) y la etapa d), al menos una etapa de diferenciación específica de los analitos retenidos en la etapa c), aplicando el sustrato obtenido al término de la etapa c) en una o varias superficies de captura funcionalizadas;

- durante la etapa c), la evaporación puede controlarse de tal manera que la línea triple se desplace a velocidad constante;

50 - durante la etapa c), la evaporación puede controlarse de tal manera que la línea triple se desplace a velocidad

variable;

- las sondas de la superficie pueden definir, cada una, una red que presente un espectro óptico, aplicándose la etapa d) analizando el espectro óptico de cada red después de la captura de los analitos en la etapa c) y/o

5 - las sondas de la superficie pueden ser cavidades de diferentes tamaños, terminando la etapa c) en la captura de los analitos objetivo en micro o nanogotas de diferentes tamaños, retenidas en las cavidades de diferentes tamaños, y aplicándose la etapa d) midiendo variaciones de intensidad de al menos una propiedad física o química de cada micro o nanogota, determinando el volumen de la micro o nanogota « límite » que no comprende ningún analito, siendo la concentración del analito en la disolución madre igual a 1 dividido por el volumen de micro o nanogota límite.

10 La invención se refiere igualmente a un sistema de detección tal como se define en la reivindicación 17.

Según otros modos de realización:

- el medio de análisis puede ser apto para contar los analitos retenidos por la superficie estructurada del sustrato y comparar el número de analitos obtenido precedentemente en una tabla de conversión, para obtener la concentración de analitos en la disolución madre;

15 - el sistema de detección comprende, además, una placa destinada a ponerse en contacto con la muestra de disolución para encerrarlo entre el sustrato y la placa;

- el sustrato y la placa pueden montarse móviles y casi paralelos uno con respecto al otro según una dirección de traslación;

20 - el sustrato y la placa pueden montarse móviles uno con respecto al otro según una dirección de traslación, estando la placa inclinada respecto al sustrato para aplicar la muestra de disolución sobre el sustrato estructurado;

- la placa puede ser flexible;

- la placa está funcionalizada y/o estructurada;

- el sistema de detección puede comprender, además, un recinto con atmósfera controlada rodeando el sustrato y la muestra;

25 - el recinto comprende un regulador de la presión parcial de los componentes del líquido en la atmósfera;

- el sistema de detección puede comprender, además, canales de bombeo y/o inyección de un flujo de gas o mezcla gaseosa;

- el sistema de detección puede comprender, además, un dispositivo de suministro de energía, térmica y/o electromagnética;

30 - el medio de control se acopla a al menos un dispositivo de observación de la línea triple para adaptar el control de la evaporación y ajustar la velocidad de desplazamiento de la línea triple, a al menos un valor deseado, sobre la superficie estructurada del sustrato;

- el regulador de la presión parcial puede acoplarse a al menos un dispositivo de observación de la línea triple para adaptar las presiones parciales de los componentes del líquido en la atmósfera y ajustar la velocidad de desplazamiento de la línea triple, a al menos un valor deseado;

35 - la superficie del sustrato puede comprender una estructura adoptada entre estructuras topográficas, biológicas, químicas, electrostáticas, magnéticas o una combinación de estas estructuras;

- la disolución madre puede ser una disolución coloidal, una disolución preacondicionada, una disolución prefiltrada, una disolución que comprenda tensioactivos y objetivos de calibración, una disolución que integre objetivos marcados por el color, por fluorescencia o por un código de barras integrado o una disolución que integre acoplamientos objetivos-sondas ya realizados en disoluciones y/o

40 - la disolución madre y/o la muestra puede/pueden comprender varios tipos de disolventes.

Otras características de la invención se enunciarán en la descripción detallada a continuación hecha con referencia a las figuras adjuntas que representan, respectivamente:

45 - figura 1, vista esquemática del perfil de una muestra dispuesta sobre un sustrato y que experimenta evaporación natural;

- figura 2, vista esquemática del perfil de un primer modo de realización de un dispositivo según la invención, que comprende un medio de control de la evaporación en los alrededores de la línea triple;

- figura 3, vista esquemática del perfil de un segundo modo de realización de un dispositivo según la invención, que comprende una placa superior de confinamiento de la muestra;

- figura 4, vista esquemática del perfil de una variante del modo de realización de la figura 3, que comprende una placa superior de confinamiento de la muestra menos humectante que el sustrato;

5 - figura 5, vista esquemática del perfil de un tercer modo de realización de un dispositivo según la invención, que comprende una placa superior móvil de confinamiento de la muestra;

- figura 6, vista esquemática del perfil de un cuarto modo de realización de un dispositivo según la invención, que comprende un recinto con atmósfera controlada;

10 - figuras 7a a 7f, vistas esquemáticas de un modo de realización ventajoso del procedimiento según la invención, que comprende dos etapas de diferenciación específica de los analitos retenidos en la superficie de un sustrato de un dispositivo según la invención y

- figura 8, vista en perspectiva de un sustrato de detección de analitos después de aplicar el procedimiento según la invención.

15 En la descripción a continuación, los analitos pueden ser microobjetos (células, bacterias...), nanoobjetos (nanopartículas, moléculas específicas (medicamentos, pesticidas...)), biomoléculas (ADN, proteínas...) o incluso virus, esporas, etc.

20 La presente invención combina técnicas de microelectrónica y funcionalización de superficies con técnicas de ensamblaje convectivo y capilar para retener los analitos objetivo, buscados, en sitios funcionales y específicos, o sondas, implantados y organizados en una superficie. Esta retención organizada permite una etapa simple de detección de zonas de acoplamiento sonda/objetivo y, así, una etapa simple de análisis.

Se lleva a cabo, de manera general, en tres fases:

1) funcionalización de una superficie con sitios sondas predefinidos, densificados y organizados por técnicas de microelectrónica. Estas sondas ejercen fuerzas específicas de inmovilización para permitir una muestra específica de objetivos.

25 2) ensamblaje convectivo y capilar de una disolución coloidal, eventualmente preacondicionada, que contiene los analitos objetivo, que concentra naturalmente la disolución, sobre la superficie del sustrato.

3) detección de la proporción de sitios sondas ocupados por los objetivos, que proporciona, promediando una calibración previa, la concentración de analitos objetivo en la disolución ensayada.

30 La superficie funcionalizada que comprende los sitios sondas se representa esquemáticamente por las cavidades 21 en la figura 1.

35 Más en particular, el principio del procedimiento según la invención consiste en tomar una muestra, es decir, extraer al azar una muestra calibrada de líquido en la disolución madre que se tiene que analizar. Esta disolución madre presenta una concentración desconocida de nanoobjetos para determinar. Después, el procedimiento según la invención consiste en concentrar y capturar los analitos sobre un sustrato estructurado y contar el número de analitos capturados. A continuación, el análisis estadístico de una o varias de estas capturas permite deducir, con un cierto intervalo de confianza, la concentración de la disolución inicial. A cantidad extraída fijada, la captura contiene tantos más analitos buscados como esté concentrada la disolución madre. Por otra parte, cuanto más importante sea el número de sitios de captura presentados más representativo será el análisis de la composición de la disolución madre.

40 La invención se basa en el control de la evaporación de la muestra en una zona particular denominada línea triple. Esta línea es la interfase entre el líquido de la muestra, la atmósfera en la que el líquido es adecuado para evaporarse en determinadas condiciones de evaporación (presión parcial, temperatura, humectabilidad del sustrato) y el sustrato sólido sobre el que se deposita la muestra. Este control permite dominar el desplazamiento de la línea triple por la superficie estructurada del sustrato (véanse las figuras 2 a 5).

45 Así, el procedimiento según la invención comprende una etapa b) de depósito de la muestra sobre un sustrato de retención de los analitos, donde al menos una parte de la superficie es micro o nanoestructurada. De esta manera, la muestra líquida recubre al menos parcialmente la superficie estructurada del sustrato.

50 Esta superficie puede ser estructurada topográficamente, es decir que comprende relieves 22 entre los que se inmovilizan los analitos. Pero igualmente puede ser estructurada de manera funcional. Dicho de otro modo, puede comprender sitios de retención química, biológica, electrostática, eléctrica o magnética. Estos sitios se obtienen, respectivamente, por sondas químicas o biológicas fijadas en la superficie o por la presencia de electrodos que proporcionan un campo electrostático, eléctrico o magnético de retención de los analitos de interés. La superficie puede ser estructurada igualmente por diferentes zonas de humectabilidad (o capacidad para disolver) en

comparación con la disolución que se tiene que ensayar.

Preferiblemente, la estructura de la superficie se organiza según un motivo ordenado y no aleatorio, para facilitar el análisis automático posterior del sustrato.

5 Después, el procedimiento según la invención comprende una etapa c) de evaporación controlada del líquido (o disolvente) de la muestra, casi al nivel de la línea triple líquido/sustrato/atmósfera, de tal manera que esta línea triple se desplaza de manera continua sobre el sustrato, a medida que el líquido (o disolvente) se evapora a la atmósfera.

10 Este control localiza la evaporación del líquido (o disolvente) casi al nivel de la línea triple. Por el contrario, con una evaporación natural, por lo tanto, no controlada (simbolizada por las flechas onduladas discontinuas 3 en la figura 1), toda la superficie S de líquido en contacto con la atmósfera, y no solamente la zona de la línea triple líquido/sustrato/atmósfera, está sujeta a evaporación.

Por supuesto, en la práctica, el control de la evaporación se hace lo más próximo posible a la línea triple, en una zona de los alrededores V_T más grande que la línea triple. Lo que cuenta, es que el fenómeno de evaporación del líquido (o disolvente) sea predominante en los alrededores V_T y sobre todo en la línea triple T, con respecto al resto de la superficie S de la muestra 1 expuesta a la atmósfera.

15 El procedimiento según la invención concentra de manera natural, y muy eficazmente, los analitos presentes en la muestra al nivel de la línea triple gracias a corrientes de convección en el seno de la muestra líquida. Estas corrientes de convección aparecen de manera natural puesto que la evaporación que es predominante a partir de la línea triple requiere un aporte de calor latente, lo que genera intercambios térmicos importantes. Estas corrientes de convección transportan y por lo tanto concentran enormemente, los analitos hacia los alrededores V_T de la línea triple T.

20 Después, el procedimiento según la invención captura los analitos de interés, concentrados a nivel de los alrededores V_T de la línea triple, sobre el sustrato que comprende una superficie micro o nanoestructurada de manera topográfica, química, biológica, electrostática, eléctrica o magnética.

25 La retención se hace durante el desplazamiento, continuo y controlado, del frente de evaporación (o línea triple) del disolvente que contiene los analitos en la superficie nanoestructurada. Las fuerzas capilares, presentes al nivel de esta línea triple, dirigen estos analitos durante el desplazamiento de la línea triple durante la evaporación, hacia puntos precisos del sustrato (las sondas) definidos por la estructura. Las sondas seleccionan e inmovilizan, gracias a fuerzas específicas, los analitos objetivo buscados. En otras palabras, la línea triple reacciona como el extremo de un rascador o cepillo natural que concentra los analitos y los extiende reteniéndolos en las estructuras de la superficie 20 del sustrato.

La superficie del sustrato se trata, preferiblemente, para que sea mayoritariamente no humectante (hidrófoba si el líquido es agua, solvófoba si el líquido es un disolvente). Eso favorece el confinamiento de los analitos por las fuerzas de capilaridad hacia estructuras de la superficie del sustrato.

35 El número de estructuras de retención de los analitos, en la superficie del sustrato, condiciona la resolución y la sensibilidad del procedimiento. Como este número puede ser muy elevado, el procedimiento es muy sensible. La determinación de las dimensiones de los sitios y/o su funcionalización permite considerar analitos selectivos por forma, carga o función química, biológica o magnética. Es posible, por ejemplo, crear más de un millón de sitios en 2 mm cuadrados, lo que permite extraer un número importante de analitos de la muestra sobre el sustrato, estando este número directamente relacionado con la concentración de objetivo de la disolución inicial.

40 Así, el procedimiento según la invención realiza una captura organizada que facilita la automatización de su recuento.

45 Este procedimiento permite, durante la etapa d), analizar la superficie estructurada. Este análisis puede ser una detección binaria (de tipo 0 o 1) rápida, y por lo tanto una medida estadística de la concentración en la muestra. La detección de capturas puede hacerse por óptica (reflexión, contraste de fase, campo oscuro, fluorescencia, epifluorescencia, fluorescencia para casos inducidos (LIBS), difracción de haz láser, plasmones de superficie (SPR), utilización de nanotrazadores) o por campo electrostático, eléctrico o magnético. También se puede considerar fijar, sobre los objetivos retenidos, partículas fluorescentes después de analizar la superficie gracias a escáneres clásicos de análisis.

50 La detección de capturas de un analito puede obtenerse también estructurando de manera individual los motivos sonda (por ejemplo, en redes de difracción o en combinaciones de di o trinanopartículas) cuyo espectro óptico se modifica por la retención.

Así, las sondas de la superficie micro o nanoestructurada definen, cada una, una red de difracción que presenta un espectro óptico. La etapa d) se aplica entonces analizando el espectro óptico de cada red de difracción después de la captura de los analitos en la etapa c).

La concentración de analitos en la disolución madre se deduce del número de analitos detectados en el sustrato, gracias a una tabla de conversión. Esta tabla asocia, para un número determinado de estructuras en la superficie del sustrato, el número de sitios ocupados por los analitos en la concentración inicial en la disolución madre.

También son posibles diversas variantes para deducir esta concentración.

5 Por ejemplo, la concentración de un analito en la disolución madre puede obtenerse de manera relativa, con respecto a la concentración conocida de otro analito, que puede añadirse en la disolución madre y que es perceptible por su color, por la lectura de un código de barras óptico definido por cajas cuánticas integradas o por su fluorescencia. Su proporción en la superficie funcionalizada del sustrato proporciona directamente la concentración del analito buscado.

10 La concentración de un analito en la disolución madre puede obtenerse igualmente calibrando el método de muestra en las mismas condiciones de evaporación a partir de diferentes disoluciones calibradas de analitos objetivo, idénticos.

15 La concentración de un analito en la disolución madre puede obtenerse también buscando, previamente y en las mismas condiciones experimentales, la concentración umbral de analito de una disolución patrón a partir de la que aparecen los primeros fallos de relleno de los sitios de recepción de los objetivos.

La concentración de un analito en la disolución madre puede obtenerse igualmente determinando, previamente, las condiciones experimentales de retención de los objetivos, a partir de las disoluciones calibradas que minimizan la concentración límite terminando en un relleno de todos los sitios. Estas condiciones se adaptarán para un análisis ultrasensible.

20 La concentración de un analito en la disolución madre puede obtenerse también por una medida de la intensidad suministrada por cada retención.

25 Se puede, para ello, capturar los analitos con motivos sonda diferentes (en tamaño, por ejemplo). Se capturan entonces varios analitos objetivo por motivo retenido, por ejemplo, gotas calibradas de líquido (eventualmente de diferentes volúmenes) en motivos hidrófilos o solvófilos, separados por intervalos hidrófobos o solvófobos, por un desplazamiento rápido de la línea triple sobre ellos. La evaporación de los disolventes crea igualmente, en este último caso, ensamblajes de analitos.

30 Más precisamente, la superficie micro o nanoestructurada presenta, preferiblemente, cavidades de tamaños diferentes. El barrido rápido de esta superficie por la línea triple deja micro o nanogotas de volúmenes diferentes en estas cavidades de tamaños diferentes. Así, cuanto más reducido el volumen de la micro o nanogota, menos probabilidad estadística habrá de encontrar un analito.

Se miden entonces variaciones de la intensidad de al menos una propiedad física o química de cada micro o nanogota. Por ejemplo, se miden variaciones de intensidad de propiedades ópticas de cada cavidad después de la evaporación de micro o nanogotas y se traza la curva representativa de la intensidad en función del volumen de la micro o nanogota.

35 Esta curva permite determinar el volumen de la micro o nanogota denominada "límite" que no comprende analito. La concentración de analito en la disolución madre es pues igual a 1 dividido por el volumen de micro o nanogota límite.

La concentración de un analito en la disolución madre puede obtenerse finalmente conociendo el rendimiento de diferentes fases de retención.

40 Preferiblemente, el procedimiento según la invención comprende una etapa de aclarado previa a la etapa c) para eliminar los parásitos unidos.

Un ejemplo de cálculo descrito a continuación permite evaluar los rendimientos del procedimiento según la invención.

45 Se realiza un sustrato 10 con una superficie de 2 mm x 2 mm que presenta una estructura topográfica de dimensiones adaptadas a la retención de nanopartículas de 100 nm de diámetro. Por ejemplo, la superficie 20 presenta cavidades 21 de 100 nm de diámetro, distantes 2 µm. Este sustrato 10 consta pues de 10^6 sondas en forma de cavidades de retención 21.

Se deposita una muestra en esta superficie con un espesor casi igual al diámetro de las nanopartículas que contiene. Comprendiendo la muestra una concentración conocida de 10^{11} nanopartículas objetivo por ml. El diámetro de cada nanopartícula es de 100 nm.

50 El volumen de muestra depositada representa pues $4 \cdot 10^{-7}$ cm³ o ml ($10^{-5} \times 4 \cdot 10^{-2}$) y consta de $10^{11} \times 4 \cdot 10^{-7} = 40.000$ nanopartículas.

Con una evaporación natural no controlada del líquido (como la que se ilustra en la figura 1), estas nanopartículas,

supuestas inmóviles, no deberían llenar, estadísticamente, más que las cavidades para las que están perfectamente colocadas. Dicha muestra al azar en 10^6 cavidades retiene un volumen de $10^6 \times 10^{-5} \times 10^{-5} \times 10^{-5}$ ml sobre los $4 \cdot 10^{-7}$ ml de la capa, o una nanopartícula sobre 400, es decir, 100 nanopartículas (40.000/400) en la muestra.

5 Con una evaporación controlada según la invención, se observa experimentalmente que, con una muestra idéntica, todas las nanopartículas son retenidas por las cavidades del sustrato. Así, las corrientes de convección en los alrededores de la línea triple mejoran la retención de las nanopartículas. Así, es posible retener con dicho sustrato, hasta 10^6 nanopartículas si la concentración de la muestra lo permite. El procedimiento según la invención presenta pues una eficacia hasta 10.000 ($10^6/100$) veces superior a una evaporación natural no controlada.

10 Se realiza entonces una calibración con concentraciones diferentes de disolución madre. Por ejemplo, las concentraciones pueden ser cada vez más reducidas. Se puede constituir entonces una tabla de conversión entre el número de sitios ocupados por los analitos y la concentración inicial.

El procedimiento según la invención tiene por tanto una gran sensibilidad.

15 Para alcanzar el límite de detección de $6 \cdot 10^5$ nanopartículas por mililitro (o femtomolar), basta entonces con poder detectar $(10^6/10^{11}) \times (6 \cdot 10^5)$ ensamblajes, o 6 nanoobjetos unidos entre 10^6 motivos. Este número crece a 600, si una concentración de partida de la muestra de 10^9 bastara para llenar todos los motivos. Así, se ha determinado experimentalmente que una concentración de $5 \cdot 10^8$ nanopartículas por mililitro permite salvar el sistema de 10^6 motivos topográficos. Una sola captura sobre los 10^6 correspondería a una concentración de analito menor que $5 \times 10^8 / 10^6 = 500$ nanoobjetos por ml o, si los nanoobjetos son moléculas, $(500 / 6,02 \cdot 10^{23}) \times 10^3 = 8 \cdot 10^{-19}$ Moles/l = 0,8 attomolar.

20 Con 10^8 sitios de captura repartidos sobre 4 cm^2 el límite de detección pasaría a ser 5 nanoobjetos por ml o 0,01 attomolar.

25 Este cálculo demuestra que el procedimiento según la invención permite sobrepasar los límites de detección de las técnicas clásicas, de manera simple, económica y utilizando superficies muy pequeñas de sensor, por lo tanto volúmenes reducidos de muestra. Permite alcanzar límites de detección de 500 nanoobjetos por ml o attomolar con 10^6 sitios de captura repartidos sobre 4 mm^2 y 100 veces más bajos (5 nanoobjetos por ml o 0,01 attomolar) con 10^8 estructuras repartidas sobre 4 cm^2 .

El procedimiento según la invención permite la detección/el análisis de analitos situados en un entorno líquido de gran complejidad (agua, sueros, etc.) pero también en aire, suelo, alimentos, después de poner en suspensión los analitos en una disolución madre.

30 Este procedimiento es simple de poner en práctica, rápido, económico, móvil y muy sensible. Abre un gran campo de aplicaciones que se extiende desde la nanotoxicología, el biodiagnóstico, la nanobiomedicina, la farmacología hasta la nanoseguridad.

Los sistemas de detección de analitos, para la aplicación del procedimiento según la invención, se ilustran en las figuras 2 a 5.

35 El modo de realización de la figura 2 es el más simple. Una muestra 1, o gota, que comprende los analitos de interés 2, se deposita sobre un sustrato 10 que presenta una superficie 20 micro o nanoestructurada (o sondas) de retención de los analitos objetivo.

Se puede favorecer la evaporación de la gota 1 al nivel de la línea triple creando un gradiente de temperatura en el sustrato.

40 Se puede así integrar en este sistema un medio de control 30 de la evaporación de la muestra, dispuesto para provocar una evaporación controlada (simbolizada por las flechas onduladas discontinuas 5) de la muestra, casi en los alrededores V_T de la línea triple T. Dicho de otro modo, el medio de control favorece una evaporación en los alrededores V_T de la línea triple T que predomina con respecto al fenómeno de evaporación natural (simbolizada por las flechas onduladas discontinuas 3) que pueden aparecer al nivel del resto de la superficie de la muestra expuesta a la atmósfera Atm.

45 El medio de control 30 puede emitir, por ejemplo, una radiación R, adaptada y calibrada para aportar una cantidad de energía suficiente para vaporizar el líquido en los alrededores V_T de la línea triple T. El medio de control 30 puede ser, alternativamente, un flujo gaseoso que evacúa rápidamente la capa límite de líquido.

50 A medida que el líquido se evapora en la atmósfera, la línea triple T se desplaza sobre el sustrato. En la figura 2, la línea triple se desplaza de izquierda a derecha.

Para mantener el fenómeno de la evaporación en los alrededores V_T de la línea triple T, el medio de control 30 puede montarse móvil respecto a la traslación o sobre un pivote.

El medio de control 30 puede acoplarse igualmente a al menos un dispositivo de observación (no ilustrado) de la

línea triple T para adaptar el control de la evaporación por el medio de control 30 y/o la radiación emitida y regular, así la velocidad de desplazamiento de la línea triple, a un valor deseado, en la superficie estructurada del sustrato. Esto permite controlar la velocidad de depósito de los analitos objetivo sobre las sondas.

5 Sin embargo, el control de la evaporación al nivel de la línea triple puede resultar delicado en esta configuración, puesto que la muestra está en un medio abierto, es decir, que presenta una gran superficie de contacto con la atmósfera. De hecho, los fenómenos de evaporación natural pueden desempeñar, en función de las condiciones atmosféricas, una función suficientemente importante para reducir el fenómeno de la concentración y por tanto de retención de los analitos. Además, la evaporación se efectúa siguiendo la línea circular de la gota.

10 Según un segundo modo de realización ilustrado en la figura 3, después de haber depositado la muestra sobre el sustrato y antes de provocar la evaporación controlada de la muestra, el procedimiento según la invención comprende una etapa de depósito de una placa 40 en contacto con la muestra líquida 1 para encerrar éste entre el sustrato 10 y la placa 40. Se cubre, así, la parte de la superficie del líquido que está expuesta a la atmósfera en el dispositivo precedente. La placa es, preferiblemente, transparente para poder observar el desplazamiento de la línea triple y controlar la evaporación en sus alrededores. Por ejemplo, puede ser de vidrio cuando el disolvente de la muestra sea agua.

Este sistema forma una célula microfluídica que permite una evaporación en medio confinado. Dicho de otro modo, sólo los alrededores V_T de la línea triple T se exponen a la atmósfera Atm . Este sistema permite un mejor control de la evaporación, lo que conduce a una mayor reproducibilidad del relleno de los sitios sonda de captura.

20 El medio de control 30 provoca una evaporación que forma un menisco en la muestra 1, entre la placa 40 y el sustrato 10 y en los alrededores V_T de la línea triple T. El retroceso de este menisco, hacia la derecha de la figura 3, conforme a la evaporación, provoca un desplazamiento de la línea triple T, igualmente hacia la derecha de la figura 3. En este sistema, existe igualmente una línea triple entre la muestra, la atmósfera y la placa 40. Sin embargo, esta placa 40 no está estructurada, de manera que los analitos no se fijan sobre la placa 40. Puede estar también estructurada para evitar que los analitos se fijen en ella. Gracias a las corrientes de convección F1, los analitos se concentran hacia la superficie estructurada del sustrato 10.

Se trata el sustrato 10 para que no esté más que parcialmente humedecido y reunir los analitos hacia los motivos utilizando fuerzas capilares. Los motivos seleccionan los objetivos fijándolos bajo la acción de sus fuerzas específicas.

30 En el modo de realización ilustrado en la figura 4, la placa 40 ha recibido tratamiento superficial que la hace menos humectante que el sustrato. Se obtiene entonces la línea triple, hacia la derecha de la figura 4, conforme a la evaporación, y dirige el desplazamiento de la línea triple sobre el sustrato 10. El ensamblaje se efectúa de manera cuasiestática.

35 Este equilibrio entre la humectabilidad del sustrato y la de la placa superior es sutil. El sustrato no debe ser demasiado hidrófilo para evitar el ensamblaje compacto por convección pura entre las estructuras. En caso de dificultades, una doble funcionalización del sustrato (atracción en los motivos y repulsión fuera de los motivos) será una variante eficaz. Otra solución es estructurar la placa.

40 Una variante a la célula microfluídica precedente, ilustrada en la figura 5, añade una traslación controlada de la placa superior 40 en el sentido de la flecha F2a. La dirección de traslación (flecha F2a) es casi paralela al plano del sustrato 10. Esta traslación presenta la ventaja de controlar la expansión del menisco próximo a la línea triple y por tanto la retención de los analitos en las estructuras de la superficie 20. Alternativamente o en combinación, la traslación controlada puede ser la del sustrato 10, en el sentido de la flecha F2b. Lo que es importante, en este modo de realización, es que se aplique un movimiento relativo entre el sustrato 10 y la hoja 40.

Se puede prever igualmente un dispositivo de ajuste de la distancia entre la hoja superior 40 y el sustrato 10 para regular la altura del menisco.

45 La hoja superior 40 puede estar ligeramente inclinada y ser de material flexible y estar desplazada, según la dirección de traslación F2a, de manera que desempeñe la función de un raspador (o un cepillo) que aplique una disolución coloidal sobre el sustrato estructurado.

La inclinación de la placa 40 puede ser regulable.

50 Los sistemas de detección representados en las figuras 2 a 5 pueden situarse en un recinto con atmósfera controlada, isoterma o con gradiente de temperatura, de manera que se controle la velocidad de desplazamiento de la línea triple.

55 Un ejemplo de modo de realización, ilustrado en la figura 6, combina la célula microfluídica con la placa superior móvil 40 (y/o con sustrato 10 móvil), ilustrado en la figura 5, con un recinto 50 rodeando el sustrato 10, la placa 40 y la muestra 1. El recinto 50 permite controlar la atmósfera y no solamente confinarla, como con la célula microfluídica sola.

En un modo de realización más simple (no ilustrado), la placa superior no es móvil. Puede ser entonces inútil si el recinto asegura la misma función comprendiendo una cubierta 51 adecuada para entrar en contacto con la muestra 1.

5 El recinto está asociado, preferiblemente, a un regulador 60 de presión parcial de los componentes del líquido de la muestra (disolventes y solutos) en la atmósfera.

Por ejemplo, si el disolvente de la muestra es agua, cuando la muestra se vaporiza en los alrededores de la línea triple, la presión parcial en agua en la atmósfera aumenta. La cinética del cambio de fase se modifica por lo tanto, puesto que se hace más difícil que se evapore el disolvente.

10 El regulador 60 puede mantener la presión parcial por debajo del valor umbral de la presión de vapor de saturación del agua. Requiere entonces una evacuación de una parte del agua en forma de vapor (según la flecha F3) para que la muestra pueda continuar evaporándose. La línea triple T se desplaza entonces de manera controlada, por esta evacuación, sobre la superficie 20 del sustrato 10.

15 El regulador 60 puede mantener igualmente la presión parcial por debajo del valor umbral precedente. Se bloquea entonces la evacuación de agua en forma de vapor, lo que detiene la evaporación de la muestra. La elección de la presión parcial del agua en el recinto regula por tanto la velocidad de desplazamiento de la línea triple T sobre la superficie 20 del sustrato 10. En el caso de una disolución que comprenda varios disolventes se puede bloquear, por este mecanismo, la evaporación de uno de ellos.

20 El regulador 60 puede acoplarse igualmente a un dispositivo de observación (no ilustrado) de la línea triple T para ajustar la velocidad de desplazamiento de la línea triple al valor deseado sobre la superficie estructurada del sustrato, por la elección de la presión parcial.

Así, regulando la presión parcial de la atmósfera, es posible actuar sobre la velocidad de desplazamiento de la línea triple sobre el sustrato. Al hacerlo, se optimiza la retención de los analitos por la superficie estructurada 20 del sustrato 10.

El regulador 60 puede controlar igualmente la temperatura de la atmósfera o crear un gradiente sobre el sustrato.

25 Un dispositivo de aspiración o de insuflado de gas, integrado en la placa también puede controlar la velocidad de desplazamiento de la línea triple por evacuación más rápida de la capa límite de evaporación (evacuación de las moléculas de disolvente vaporizadas).

30 Así es posible forzar, por capilaridad y acción de fuerzas específicas, la captura de microobjetos (células, bacterias...), de nanoobjetos (nanopartículas, moléculas específicas tales como medicamentos o pesticidas), biomoléculas (ADN, proteínas...) o incluso virus, esporas, etc.

35 El procedimiento según la invención puede comprender, previamente a la etapa c) de análisis de la superficie, una o varias etapas suplementarias de diferenciación específica de los analitos retenidos, aplicando el sustrato obtenido al término de la etapa b) sobre una o varias superficies prefuncionalizadas. Es posible entonces extraer del sustrato los analitos objetivo, específicos, de la superficie prefuncionalizada utilizada. Después, la superficie así obtenida se analiza conforme a la etapa c) precitada. Esta etapa de diferenciación específica de los analitos retenidos se ilustra en las figuras 7a a 7f.

La figura 7a ilustra un sustrato 10 obtenido al término de la etapa b). Se han capturado tres tipos de analitos 2a, 2b y 2c por la superficie funcionalizada 20 del sustrato 10.

40 La superficie 20 del sustrato 10 se aplica, en el sentido de la flecha F4, contra un sustrato 10a, provisto de una superficie funcionalizada 20a susceptible de fijar específicamente los analitos 2a (figuras 7b y 7c).

Después, se retira el sustrato 10 del sustrato 10a, en el sentido de la flecha F5. El sustrato 10a retira pues los analitos 2a de la superficie 20 del sustrato 10 (figura 7d).

La operación se renueva con un sustrato 10b, provisto de una superficie funcionalizada 20b susceptible de fijar específicamente los analitos 2b.

45 La superficie 20 del sustrato 10, obtenido al término de la etapa de diferenciación específica ilustrada en las figuras 7b a 7d, se aplica contra el sustrato 10b (figura 7e).

Después, se retira el sustrato 10 del sustrato 10b en el sentido de la flecha F5. El sustrato 10b retira pues los analitos 2b de la superficie 20 del sustrato 10 que no comprende más que los analitos 2c.

Finalmente, la superficie de los sustratos 10, 10a y 10b así obtenidos se analiza conforme a la etapa c) precitada.

50 La funcionalización de las superficies 20a-20b debe adaptarse para que la fuerza de transferencia, es decir, de atracción de la superficie 20a-20b sea superior a la de la retención de los analitos 2a-2b en los motivos de la

superficie 20 del sustrato 10. Ventajosamente, se utilizan, para el sustrato 10, sustratos con energía de superficie más reducida, como PDMS, que las superficies 20a y 20b.

Esta etapa o etapas suplementarias de diferenciación específica de los analitos retenidos permiten un análisis automático y específico de cada tipo de analitos.

- 5 La figura 8 representa la superficie estructurada del sustrato de detección de analitos después de la aplicación del procedimiento según la invención. Sobre esta figura, las nanopartículas 2, de 100 nm de diámetro, son retenidas en cavidades espaciadas 2 μm sobre la superficie estructurada 20 de un sustrato 10, transferidas después sobre un sustrato 10a de vidrio.

El procedimiento según la invención puede aplicarse a numerosos sectores industriales. Más en particular:

- 10 - nano-toxicología (es decir, la detección de nanoobjetos generados artificialmente por el hombre y que dispersa en el medio ambiente): detección de moléculas específicas (pesticidas, medicamentos, detergentes...), nanopartículas o productos de combustión (cenizas, dioxinas ...); permite estudiar, eventualmente, sus efectos perjudiciales.

- 15 - nanobiomedicina, es decir, análisis médico, desarrollo de micro y nanotécnicas adaptadas a la detección cada vez más precoz de anomalías biológicas (ADN, proteínas, etc.), detección de virus o bacterias, utilización de nanopartículas como "vector" de análisis, estudio de medios favorables o desfavorables para la multiplicación de virus y bacterias, etc.

- farmacología para el cribado de medicamentos.

- nanoseguridad por detección ultrasensible de esporas, virus, bacterias, etc.

- tratamiento de superficies y en particular la recuperación de sus defectos superficiales.

- 20 Según otros modos de realización:

• La funcionalización de la superficie del sustrato puede comprender:

- funcionalización global de la superficie muy hidrófila, denominada "ensamblaje convectivo", para obtener un ensamblaje compacto de los analitos sobre la superficie;

- 25 - La fabricación de motivos topográficos de diferentes diámetros (para clasificar los nanoobjetos por tamaño), de diferentes alturas (para permitir recuperar los objetivos interesantes por amortiguación sobre otro sustrato), de diferentes pasos y geometrías de configuración (para densificar y/o aprovechar mejor las técnicas de lectura global);

30 - La fabricación de motivos sonda por contrastes químicos favoreciendo interacciones con objetivos de tipo enlace covalente (tipo tiol) y/o hidrógeno y o de Van Der Waals (radical carbonado), enlace amino, enlace iónico por interacción dipolo/dipolo y/o desfavoreciendo, en los intervalos entre motivos, estas interacciones (por contrastes químicos de tipo octadeciltrimetoxisilano (OTS), aminopropiltrimetoxisilano (APTES), etc., por contrastes hidrófilos/hidrófobos-solvófilos/solvófobos);

- La fabricación de motivos sonda por contrastes biológicos de tipo biotina, estreptavidina, polietilenglicol, etc.;

- La utilización de una química de superficie pasivante (como OTS, PEG - Polietilenglicol - o BSA - Albúmina de Suero Bovino -, etc.) de ciertas zonas para impedir la retención de anticuerpos, péptidos y ADN entre motivos;

- 35 - La inyección localizada de cargas positivas o negativas para retener analitos polarizados o polarizables;

- La utilización de trampas magnéticas como nanopartículas esféricas de bastoncillos, cintas, toros y o sus apilamientos;

- La combinación de dos o varios de los procedimientos precedentes;

- 40 - La utilización de sustratos de objetivos de materiales diferentes como vidrio, silicio, óxido de silicio, PDMS (polidimetilsiloxano), ITO - óxido de indio y titanio - una fuerte o una débil energía superficial cuyas propiedades ópticas como la reflectividad preparan el recuento;

- La utilización de sustratos con una superficie diferente de 4 mm^2 y que comprenden un número de sitios de retención diferente de 10^6 .

• La disolución madre puede elegirse entre:

- 45 - Disoluciones coloidales naturales de objetivos;

- Disoluciones a base de agua;

- Disoluciones a base de disolventes de diferente naturaleza: orgánica, éter, acetona, cloroformo, octano, heptano, nonano, decano, tricloretileno;
 - Muestras de sueros, sangre, órganos biológicos;
 - Disoluciones de sólidos en un disolvente adecuado;
- 5
- Recuperaciones y preconcentraciones, por acumulación en un disolvente adaptado, de analitos presentes en el aire, en aerosoles o en cualquier medio complejo,
 - Disoluciones en las que la retención objetivo/sonda buscada ya se ha efectuado, pudiendo estar soportadas las sondas (hechas sustrato previamente) por nanopartículas con código de barras integrado (definido por cajas cuánticas) definido por el color, la fluorescencia, etc.;
- 10
- Objetivos marcados por marcadores fluorescentes;
 - Disolución compleja.
 - Disoluciones preacondicionadas por filtración, por eliminación de objetivos inútiles.
 - La introducción de tensioactivos en la disolución madre (tritón X, etc.) y disolventes (lo que también es un preacondicionamiento) para facilitar el ensamblaje;
- 15
- La introducción, en la disolución madre, de un objetivo de calibración con concentración y comportamiento conocidos para permitir determinar concentraciones relativas.
 - El depósito de la muestra de disolución madre sobre el sustrato puede aprovechar:
- 20
- o el carácter humectante (hidrófilo para el agua, solvófilo para un disolvente) del sustrato para expandir la gota depositada, o al contrario un carácter humectante/deshumectante intermedio (parcialmente hidrófobo para el agua) para limitar su expansión fuera de la zona estructurada sobre el sustrato.
 - El depósito de una placa superior sobre la gota que tiene como objetivo definir una capa de líquido de espesor controlado e impedir la evaporación de disolvente fuera de la línea triple.
 - Esta placa superior puede ser funcionalizada no humectante (más hidrófoba para el agua que el sustrato) con el fin de forzar (obtener) de manera natural el desplazamiento de la línea triple;
- 25
- Esta placa puede estar ligeramente inclinada para definir una línea triple de evaporación casi rectilínea, para formar un menisco bien definido en su extremidad y minimizar la superficie de contacto con el aire.
 - Esta placa superior puede ser estructurada
 - La etapa b) de evaporación controlada puede aprovechar:
- 30
- una evaporación natural más eficaz en el nivel de la línea triple que en el resto del volumen de la gota, y que concentra, gracias a corrientes de convección, los analitos en esta línea; esta evaporación natural puede ser controlada aplicando un gradiente de temperatura entre la línea triple y el resto de la gota;
 - evaporación forzada del disolvente en los alrededores de esta línea triple por una reducción local de la presión parcial del disolvente (bombeo), una evacuación más rápida de la capa límite evaporada (por un flujo gaseoso) o aspiración, calentamiento, iluminación láser, calentamiento de la parte correspondiente del sustrato que crea un gradiente de temperatura sobre el sustrato, etc.;
- 35
- depósito de una placa en contacto con la gota de líquido que encierra éste entre el sustrato y la placa, lo que limita y confina la evaporación en la región próxima a la línea triple;
 - La etapa b) de evaporación controlada puede utilizarse para:
 - primero unir las sondas, renovadas después para unir los objetivos sobre estas sondas;
- 40
- extraer micro o nanogotas de disolución por desplazamiento rápido de la línea triple y retener así las configuraciones de los analitos o realizar micronanomuestreos o micronanolaboratorios
 - un dispositivo de seguimiento del desplazamiento de la línea triple puede integrarse para permitir automatizar el depósito de la muestra líquida sobre el sustrato, gracias a una electrónica de contrarreacción acoplada a un análisis de imagen;
- 45
- el sustrato puede ser de un primer material y estar recubierto, totalmente o parcialmente, de capas estructuradas

de captura de materiales diferentes.

- el sistema de detección de analitos puede comprender, además, canales de bombeo y/o de inyección de un flujo de gas. En particular, en los modos de realización ilustrados en las figuras 3 a 6, la placa 40 puede soportar estos canales de bombeo y/o de inyección de un flujo de gas;

5 • la disolución madre puede ser una disolución coloidal, una disolución que integre tensioactivos y objetivos de calibración, una disolución que integre los objetivos marcados por fluorescencia o una disolución que integre acoplamiento objetivos-sondas ya realizados en disolución. En este último caso, la superficie estructurada del sustrato 10 puede elegirse para fijar preferentemente o sucesivamente la sonda, el objetivo o el conjunto;

- la disolución madre y/o la muestra pueden comprender varios disolventes.

10 Una de las características prominentes de esta invención es controlar la evaporación de un disolvente en los alrededores de la línea triple que concentra de manera natural los analitos objetivo, buscados, sobre esta línea en una organización compacta. Este fenómeno de concentración procede de la generación de corrientes de convección en el líquido que se evapora, cuya función es aportar energía térmica (o calor latente) necesario para la vaporización. La utilización de una evaporación controlada de la muestra, depositada sobre una superficie
15 estructurada, permite análisis por tamaño o por propiedades químicas, biológicas, electrostáticas, eléctricas y/o magnéticas de los analitos.

Otra característica prominente consiste en alcanzar un límite de detección muy bajo efectuando el muestreo sobre un gran número de sitios sonda de recepción de funciones o selectivos ocupando una superficie muy pequeña. La invención se adapta por tanto al análisis de muestras de unas centésimas de microlitro.

20 Además, la organización de sondas permite aprovechar técnicas de detección automatizadas de la unión sonda-objetivo. La invención permite obtener así un motivo definido de los sitios ocupados y no ocupados por los analitos buscados y un recuento simple y automatizable.

La invención propone por tanto un laboratorio sobre microchip que acelera y reduce los costes de los análisis y que permite numerosos análisis en paralelo.

25

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento de detección y cuantificación de analitos objeto de interés (2) en una muestra (1) de líquido obtenida a partir de una disolución madre, teniendo dicha disolución madre una concentración desconocida de analitos para determinar, siendo el líquido adecuado para evaporarse en una atmósfera (Atm) en condiciones determinadas de evaporación, comprendiendo el procedimiento las etapas siguientes:
- b1) depositar la muestra (1) sobre un sustrato (10) que presente una superficie (20) micro o nanoestructurada definiendo sondas de captura de analitos, para que la muestra líquida recubra al menos parcialmente la superficie estructurada del sustrato;
- 10 b2) depositar una placa (40) funcionalizada y/o estructurada en contacto con la muestra líquida (1), para encerrarlo entre el sustrato (10) y la placa 40.
- 15 c) provocar una evaporación controlada (5) de la muestra en los alrededores (V_T) de una línea triple (T) líquido/sustrato/atmósfera, constituida por la interfase entre el líquido de la muestra, la atmósfera y el sustrato, de tal manera que esta línea triple se desplace, a una velocidad controlada, sobre la superficie estructurada del sustrato, a medida que el líquido se evapora a la atmósfera, y que los analitos objetivo sean capturados, por ensamblaje convectivo y capilar dirigido hacia las sondas;
- d) analizar la superficie estructurada del sustrato obtenido al término de la etapa c).
2. Procedimiento de detección y cuantificación de analitos según la reivindicación 1, en el que la etapa d) se aplica contando los analitos capturados en la etapa c) por la superficie micro o nanoestructurada del sustrato y comparando el número de analitos objetivo, capturados, en una tabla de conversión, para obtener la concentración de analitos en la disolución madre.
- 20 3. Procedimiento de detección y cuantificación de analitos, relativo, según la reivindicación 1, en el que la etapa d) se aplica contando los analitos capturados en la etapa c), comprendiendo estos analitos los analitos de referencia cuya concentración es conocida y los analitos de interés cuya concentración es desconocida pero proporcional a la de los analitos de referencia y comparando las proporciones de los analitos de referencia y de los analitos de interés.
- 25 4. Procedimiento de detección y cuantificación de analitos según una de las reivindicaciones precedentes, en el que la placa (40) y el sustrato (10) se desplazan uno con respecto al otro según una dirección de traslación (F2a-F2b) casi paralela al sustrato, durante la evaporación controlada de la muestra.
5. Procedimiento de detección y cuantificación de analitos según una de las reivindicaciones precedentes, en el que el sustrato y la muestra son confinados en un recinto (50) con atmósfera controlada.
- 30 6. Procedimiento de detección y cuantificación de analitos según la reivindicación 5, en el que durante la etapa c), se regula la presión parcial de los componentes del líquido en atmósfera controlada.
7. Procedimiento de detección y cuantificación de analitos según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la etapa c) se aplica aportando una cantidad de energía suficiente para provocar y controlar la evaporación del líquido al nivel de la línea triple.
- 35 8. Procedimiento de detección y cuantificación de analitos según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende una etapa a) de preconditionamiento de la disolución madre.
9. Procedimiento de detección y cuantificación de analitos según la reivindicación 8, en el que el preconditionamiento de la disolución madre consiste en eliminar de la disolución madre los analitos inútiles, añadir nuevos analitos objetivo y/o añadir disolventes o nuevas moléculas que favorezcan el ensamblaje convectivo y capilar sobre la superficie estructurada.
- 40 10. Procedimiento de detección y cuantificación de analitos según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende una etapa previa de preparación de la superficie estructurada que consiste en depositar una gota de líquido que comprende moléculas sonda, específicas de los analitos objetivo, sobre la superficie (20) del sustrato (10), para que la gota recubra al menos parcialmente la superficie del sustrato, para provocar después una evaporación controlada de la gota en los alrededores (V_T) de una línea triple (T) gota/sustrato/atmósfera, de tal manera que esta línea triple se desplace, a una velocidad controlada, sobre la superficie estructurada del sustrato, a medida que el líquido se evapora a la atmósfera y que las moléculas sonda se fijen sobre la superficie del sustrato para crear una red de sondas que estructure la superficie del sustrato.
- 45 11. Procedimiento de detección y cuantificación de analitos según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende una etapa intermedia entre la etapa c) y la etapa d), de fijación de fluoróforos sobre los analitos objetivo, capturados, para permitir un recuento por fluorimetría durante la etapa d);
- 50 12. Procedimiento de detección y cuantificación según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende, además, entre la etapa c) y la etapa d), al menos una etapa de diferenciación específica de los analitos

- retenidos (2a, 2b) en la etapa c), aplicando el sustrato (10) obtenido al término de la etapa c) en una o varias superficies (20a, 20b) de captura funcionalizadas.
- 5 13. Procedimiento de detección y cuantificación según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que, durante la etapa c), la evaporación se controla de tal manera que la línea triple (T) se desplace a velocidad constante.
14. Procedimiento de detección y cuantificación según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que, durante la etapa c), la evaporación se controla de tal manera que la línea triple (T) se desplace a velocidad variable.
- 10 15. Procedimiento de detección y cuantificación según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que las sondas de la superficie (20) definen, cada una, una red que presenta un espectro óptico, aplicándose la etapa d) analizando el espectro óptico de cada red después de la captura de los analitos en la etapa c).
- 15 16. Procedimiento de detección y cuantificación según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que las sondas de la superficie (20) son cavidades de diferentes tamaños, terminando la etapa c) en la captura de los analitos objetivo en micro o nanogotas de diferentes tamaños, retenidas en las cavidades de diferentes tamaños y aplicándose la etapa d) midiendo variaciones de intensidad de al menos una propiedad física o química de cada micro o nanogota, determinando el volumen de la micro o nanogota « límite » que no comprende ningún analito, siendo la concentración del analito en la disolución madre igual a 1 dividido por el volumen de micro o nanogota límite.
- 20 17. Sistema de detección y cuantificación de analitos para la aplicación del procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, que comprende:
- 25 - un sustrato (10) que presenta una superficie estructurada destinada a recibir una muestra de disolución madre que contiene los analitos de interés;
- un medio de control (30) de la evaporación de la disolución en los alrededores (V_T) de una línea triple (T) líquido/sustrato/atmósfera;
- 25 - una placa (40) destinada a ponerse en contacto con la muestra de disolución para encerrar éste entre el sustrato y la placa;
- un medio de análisis de la superficie micro o nanoestructurada del sustrato, caracterizado por que dicha placa está funcionalizada y/o estructurada.
- 30 18. Sistema de detección y cuantificación de analitos según la reivindicación 17, caracterizado por que la placa (40) es más hidrófoba que el sustrato (10).
- 30 19. Sistema de detección y cuantificación de analitos según una de las reivindicaciones 17 o 18, caracterizado por que consta además de uno o varios sustratos (10a, 10b) comprendiendo, cada uno, una superficie funcionalizada (20a, 20b) susceptible de fijar específicamente los analitos de interés (2a, 2b).
20. Sistema de detección y cuantificación de analitos según una de las reivindicaciones 17 a 19, en el que el medio de análisis es adecuado para contar los analitos retenidos por la superficie estructurada del sustrato.
- 35 21. Sistema de detección y cuantificación de analitos según una de las reivindicaciones 17 a 20, en el que el medio de análisis es adecuado para comparar el número de analitos obtenido precedentemente en una tabla de conversión, para obtener la concentración de analitos en la disolución madre.
- 40 22. Sistema de detección y cuantificación de analitos según una de las reivindicaciones 17 a 21, en el que el sustrato (10) y la placa (40) se montan móviles y casi paralelos uno con respecto al otro según una dirección de traslación (F2a-F2b).
23. Sistema de detección y cuantificación de analitos según una de las reivindicaciones 17 a 21, en el que el sustrato (10) y la placa (40) se montan móviles uno con respecto al otro según una dirección de traslación (F2a-F2b), estando montada la placa (40) inclinada con respecto al sustrato (10) de manera que se aplique la muestra de disolución sobre el sustrato estructurado.
- 45 24. Sistema de detección y cuantificación de analitos según una de las reivindicaciones 17 a 23, en el que la placa (40) es flexible.
25. Sistema de detección y cuantificación de analitos según una de las reivindicaciones 17 a 24, que comprende, además, un recinto (50) con atmósfera controlada rodeando el sustrato y la muestra.
- 50 26. Sistema de detección y cuantificación de analitos según la reivindicación 25, en el que el recinto comprende un regulador (60) de presión parcial de los componentes del líquido en la atmósfera.

27. Sistema de detección y cuantificación de analitos según una de las reivindicaciones 25 o 26, que comprende, además, canales de bombeo y/o de inyección de un flujo de gas o mezcla gaseosa.
28. Sistema de detección y cuantificación de analitos según una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 27, que comprende, además, un dispositivo de aporte de energía, térmica y/o electromagnética.
- 5 29. Sistema de detección y cuantificación de analitos según una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 28, en el que el medio de control (30) se acopla a al menos un dispositivo de observación de la línea triple (T) para adaptar el control de la evaporación y ajustar la velocidad de desplazamiento de la línea triple, a al menos un valor deseado, sobre la superficie estructurada del sustrato.
- 10 30. Sistema de detección y cuantificación de analitos según una de las reivindicaciones 26 a 29, en el que el regulador de presión parcial (60) se acopla a al menos un dispositivo de observación de la línea triple (T) para adaptar las presiones parciales de los componentes del líquido en la atmósfera y ajustar la velocidad de desplazamiento de la línea triple (T), a al menos un valor deseado.
- 15 31. Sistema de detección y cuantificación de analitos según una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 30, en el que la superficie del sustrato comprende una estructura adoptada entre estructuras topográficas, biológicas, químicas, electrostáticas, magnéticas o una combinación de estas estructuras.
- 20 32. Sistema de detección y cuantificación de analitos según una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 31, en el que la disolución madre es una disolución coloidal, una disolución preacondicionada, una disolución prefiltrada, una disolución que comprende tensioactivos y objetivos de calibración, una disolución que integra los objetivos marcados por el color, por fluorescencia o por un código de barras integrado o una disolución que integra acoplamientos objetivos-sondas ya realizados en las disoluciones.

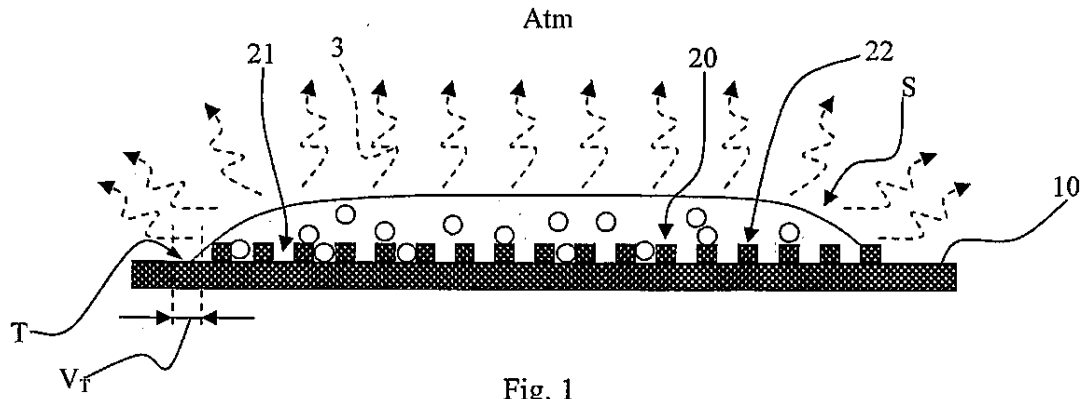


Fig. 1

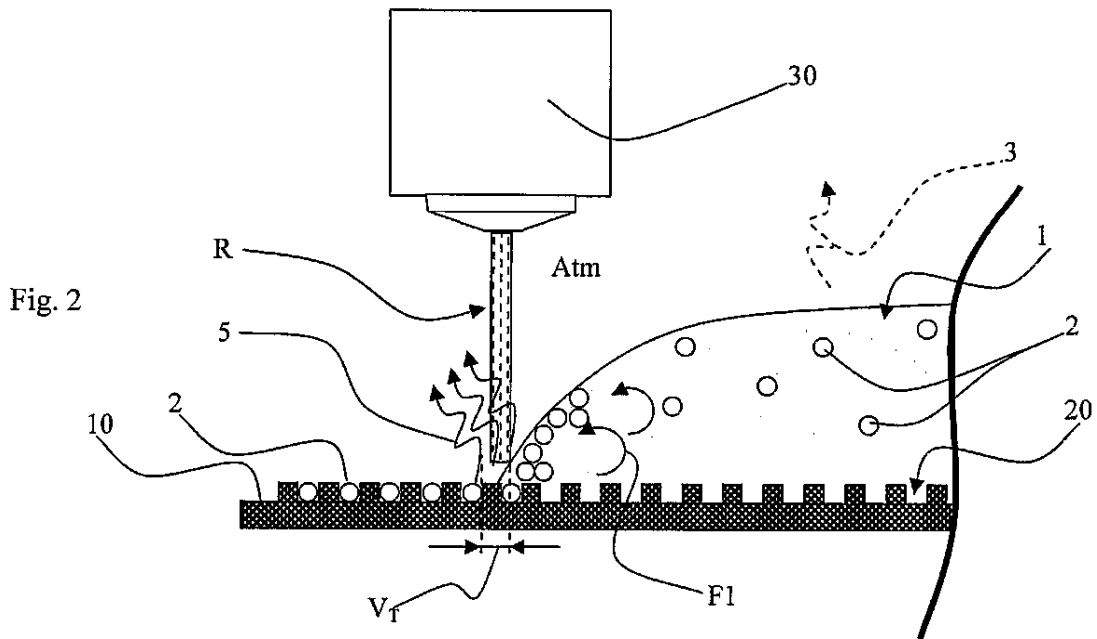


Fig. 2

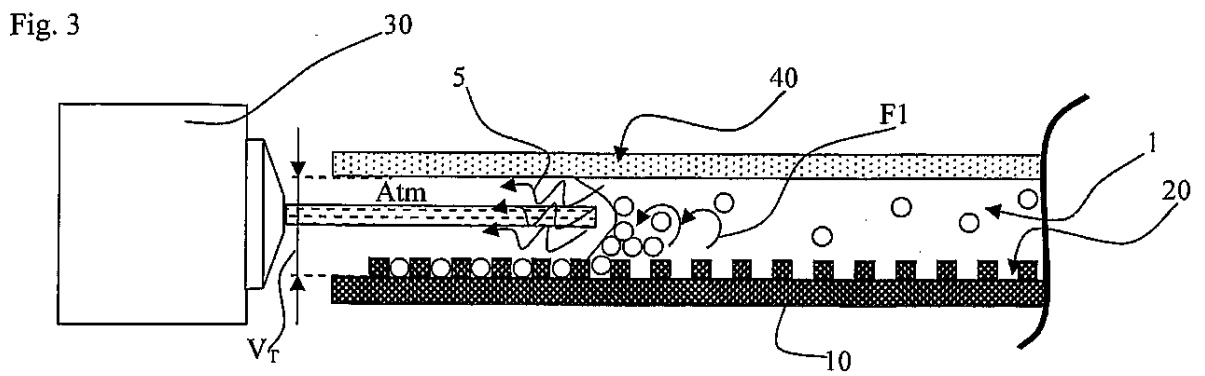


Fig. 3

Fig. 4

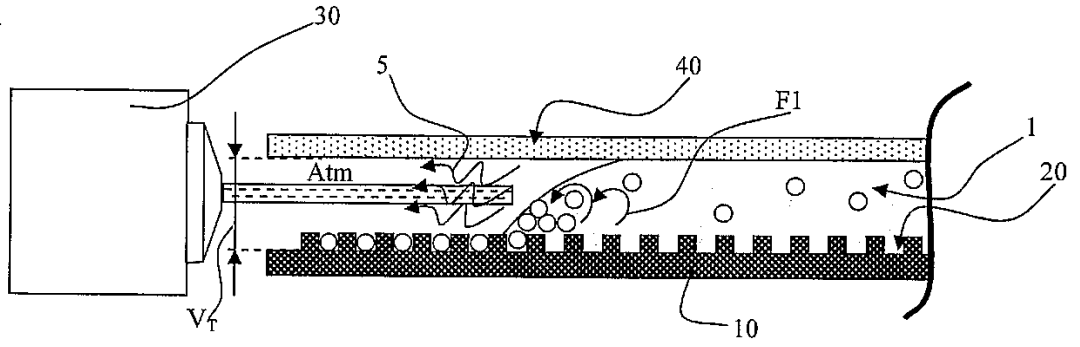


Fig. 5

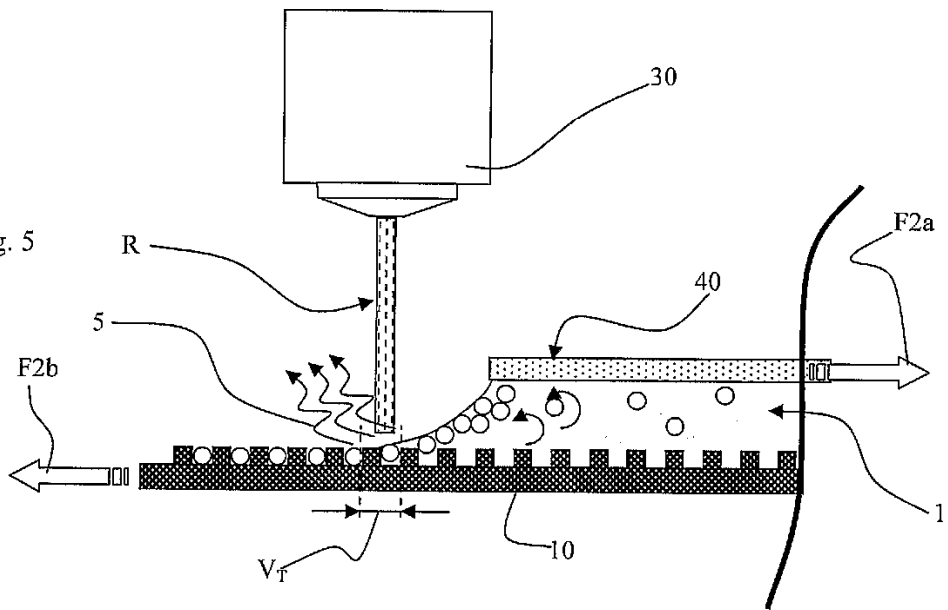
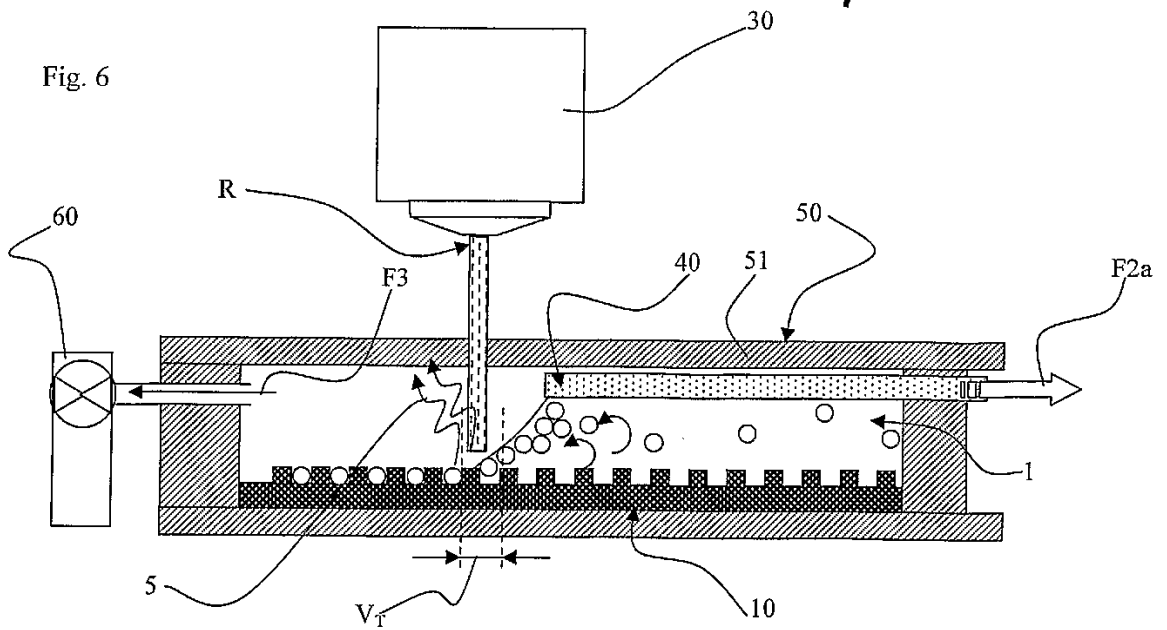


Fig. 6



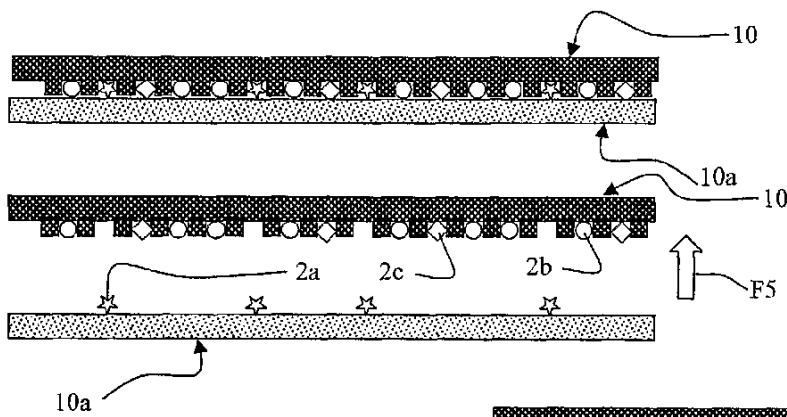
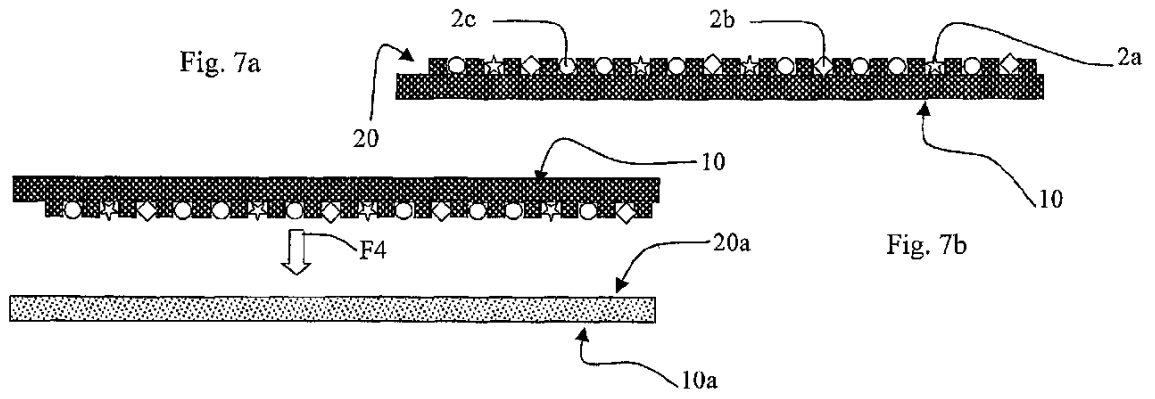


Fig. 7e

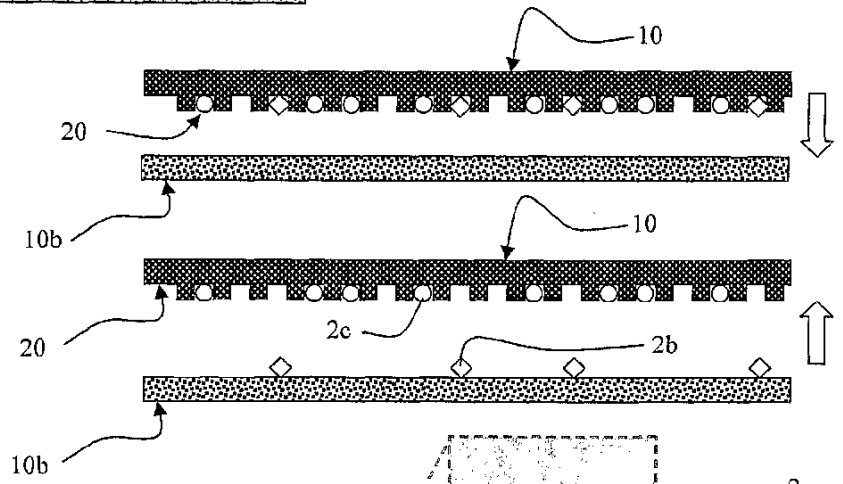


Fig. 8

