

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 684 851**

21 Número de solicitud: 201830777

51 Int. Cl.:

**G01Q 70/18** (2010.01)

**G01Q 60/42** (2010.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**27.07.2018**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**04.10.2018**

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID  
(100.0%)**

**Avda. Ramiro de Maeztu, nº 7  
28040 MADRID ES**

72 Inventor/es:

**PEREZ RIGUEIRO, Jose;  
GUINEA TORTUERO, Gustavo Victor;  
DAZA GARCIA, Rafael y  
COLCHERO PAETZ, Luis**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

54 Título: **MÉTODO PARA OBTENER PUNTAS SENSORAS DE MICROSCOPIA DE FUERZA ATÓMICA FUNCIONALIZADAS MEDIANTE SILANIZACIÓN POR VAPOR ACTIVADO, Y LAS PUNTAS OBTENIDAS POR DICHO MÉTODO**

57 Resumen:

Método para obtener puntas sensoras de microscopia de fuerza atómica funcionalizadas mediante silanización por vapor activado, y las puntas obtenidas por dicho método.

Un método para obtener una punta sensora de microscopia de fuerza atómica funcionalizada, caracterizado porque la funcionalización tiene lugar mediante un proceso de silanización por vapor activado que comprende: a) evaporar un compuesto organometálico que contiene al menos un átomo de silicio y al menos un grupo funcional seleccionado entre amino, hidroxilo, carboxilo y sulfidrido; b) activar el vapor del compuesto organometálico de la etapa a) mediante calentamiento; y c) hacer incidir el vapor activado de la etapa b) en una punta sensora para microscopia de fuerza atómica para depositar una lámina del compuesto organometálico sobre dicha punta sensora; donde las etapas b) y c) tienen lugar de forma consecutiva. Así como la punta sensora funcionalizada obtenida por dicho método.

ES 2 684 851 A1

## DESCRIPCIÓN

Método para obtener puntas sensoras de microscopía de fuerza atómica funcionalizadas mediante silanización por vapor activado, y las puntas obtenidas por dicho método.

5

### CAMPO DE LA INVENCION

La invención se enmarca dentro del área de las microscopías de campo cercano y, de modo particular, de la microscopía de fuerza atómica y de la instrumentación requerida en esta  
10 área, al obtenerse una punta sensora de microscopía de fuerza atómica funcionalizada mediante silanización por vapor activado (activated vapour silanization, AVS).

La punta funcionalizada mediante AVS puede ser útil para el empleo de la microscopía de fuerza atómica como técnica de caracterización microestructural en Ciencia de Materiales o  
15 en Biología, entre otras aplicaciones.

### ESTADO DE LA TÉCNICA

La microscopía de fuerza atómica (MFA) es una técnica de caracterización microestructural  
20 extremadamente versátil que permite el estudio de un amplio rango de sistemas en diversas condiciones ambientales. La microscopía de fuerza atómica se enmarca dentro del grupo de microscopías de campo próximo en las que el elemento sensor se sitúa a muy poca distancia de la superficie que se desea observar. En el caso de la microscopía de fuerza atómica el elemento sensor es un voladizo (*cantilever*), generalmente dotado de una punta  
25 de dimensiones micrométricas en su extremo. El microscopio de fuerza atómica posee un sistema de posicionamiento en las tres direcciones del espacio: X, Y y Z, que permite variar la distancia entre la punta y la superficie de la muestra (convencionalmente identificada con la dirección Z) al mismo tiempo que barre la superficie de la muestra (convencionalmente identificada por las direcciones X e Y). Las interacciones que se establecen entre la punta y  
30 la superficie de la muestra flectan el voladizo, pudiéndose establecer una relación entre la flexión del voladizo y la fuerza a la que está sometida la punta debido a su interacción con la superficie en un instante dado. El barrido a lo largo de las direcciones X e Y, realizado desplazando el voladizo a lo largo del eje Z de manera que se mantenga un valor constante de la flexión del voladizo, permite obtener las líneas de isofuerza sobre la superficie. Cuando  
35 la interacción dominante es la interacción de contacto debida a la repulsión estérica entre la

punta y la superficie del material se considera que las líneas de isofuerza obtenidas corresponden a la topografía superficial de la muestra.

Los principios tan generales en los que se sustenta la microscopía de fuerza atómica hace que permita una gran versatilidad en comparación con otras técnicas microscópicas de campo próximo, de microscopía óptica y de microscopía electrónica. En particular, la MFA permite trabajar bajo una gran variedad de condiciones ambientales, incluyendo vacío, aire y diversos medios líquidos. En particular, la posibilidad de trabajar en medios líquidos supone una oportunidad única de observar sistemas biológicos en condiciones *in vivo*, que suelen estar fuera de las posibilidades de la mayoría de las otras técnicas microscópicas. Adicionalmente, la dependencia del sistema sensor de las interacciones establecidas entre la punta y la muestra ofrece un rango amplio de elementos que es posible caracterizar en dicha muestra si se consiguen controlar dichas interacciones.

La combinación de la capacidad de caracterizar sistemas biológicos *in vivo* dentro de un medio líquido adecuado, y la posibilidad de explorar dichos sistemas biológicos empleando sondas específicas, por ejemplo, anticuerpos que reconozcan una biomolécula determinada, ha conducido al desarrollado de la denominada microscopía de fuerza atómica química (C-MFA) o de afinidad. Teniendo en cuenta la discusión anterior se encuentra que el elemento crítico para poder caracterizar una muestra según los principios de la C-MFA es la disponibilidad de puntas de MFA que sean capaces de establecer interacciones específicas con los diversos elementos que pueden estar presentes en la muestra a analizar. La obtención de puntas de MFA que puedan ser utilizadas para C-MFA requiere convencionalmente de dos etapas: (1) una modificación de la superficie de la punta (funcionalización) de manera que se generen en su superficie grupos funcionales, y (2) una unión estable (en general, mediante un enlace covalente) entre los grupos funcionales de la superficie de la punta y la molécula que establece una interacción específica con determinados elementos de la superficie. La experiencia demuestra que la primera etapa, consistente en la modificación de la superficie de punta para generar grupos funcionales en la misma resulta ser la más complicada desde el punto de vista del desarrollo de tecnologías viables.

Las estrategias comúnmente empleadas para la funcionalización de las puntas de MFA se basan en dos procedimientos alternativos (R. Barattin y N. Voyer, Chemical modifications of AFM tips for the study of molecular recognition events, Chem. Commun. 13 (2008), 1513-

1532). Por un lado se ha descrito un procedimiento basado en la deposición de una lámina delgada de oro o similar, de manera que la unión posterior de la molécula de reconocimiento aproveche alguna interacción específica entre la lámina depositada y alguna región de la propia molécula. El ejemplo característico de este procedimiento lo constituye la fijación de moléculas que contienen un grupo tiol (también denominado grupo sulfidrilo, -SH) sobre una lámina delgada de oro, que aprovecha la elevada afinidad del grupo tiol por la superficie del metal. Un procedimiento alternativo lo constituye el empleo de una molécula organometálica con capacidad de unirse a grupos funcionales presentes de manera espontánea sobre la superficie de la punta. El ejemplo típico de este procedimiento lo constituye la unión de moléculas de 3-aminopropiltrietoxisilano (APTES) a grupos hidroxilo (-OH) presentes en la superficie de la punta o que se genera al exponer a la punta a un ambiente oxidante.

El desarrollo tecnológico de ambos procedimientos alternativos aparece desarrollado en una serie de documentos de patentes. Así, dentro de las tecnologías correspondientes al primer grupo se encuentra la solicitud de patente US2007/0082352 A1 (Peter Jonathan Cumpson, Microscopy tip) en la que se indica un procedimiento para unir moléculas de ácido desoxirribonucleico (ADN) a puntas de MFA. En el procedimiento descrito, las moléculas de ADN se modifican inicialmente mediante su unión con una molécula orgánica que contiene un grupo tiol (-SH). La punta MFA sobre la que se desea inmovilizar el ADN se modifica al depositarse sobre ella una lámina delgada de oro. La fijación de las moléculas de ADN sobre la punta es el resultado de la afinidad que muestran los grupos tiol por el oro en fase metálica.

Dentro de los documentos que describen tecnologías basadas en el segundo tipo de procedimientos se encuentra la solicitud de patente WO2007/109689 A2 (Gallardo-Moreno et al., A method for functionalizing an atomic force microscopy tip) en la que se deposita un recubrimiento de polilisina sobre una punta sin modificar. En este caso la funcionalización se consigue mediante una interacción de tipo inespecífico que se establece entre las moléculas de polilisina, que están cargadas positivamente, y la superficie de la punta sin modificar. Alternativamente se ha propuesto un procedimiento válido para puntas de nitruro de silicio o de óxido de silicio, de manera que primero se generan un número apreciable de grupos hidroxilo sobre la superficie de la punta, uniéndose posteriormente a dichos grupos hidroxilo moléculas de tipo dendrómero. Dicho procedimiento queda descrito en la solicitud de patente FR2965624 A1 (Dague Etienne, et al., Modified atomic force microscope tip comprises surface covalently grafted by phosphor dendrimers and having at their periphery,

several terminal functions allowing covalent fixing of dendrimers on surface and biomolecules on the dendrimers). También se basa en la generación inicial de una densidad apreciable de grupos hidroxilo en la punta MFA el procedimiento descrito en la solicitud de patente KR1020150071876 A (Shim Bong Chushim et al., Method for analyzing nucleic acid sequence using atomic force microscope). Los grupos hidroxilo se generan por exposición de la punta a una solución de ácido nítrico al 20%, formándose posteriormente una monocapa de moléculas de APTES sobre la superficie como consecuencia de la reacción de las moléculas organometálicas con los grupos hidroxilo previamente generados en la superficie. La unión de proteínas y/o ácidos nucleicos a la punta se realizaba bien directamente a través de los grupos amino presentes en las molécula de APTES o a través una molécula de dendrómero que se situaba entre la punta y la biomolécula (proteína y/o ácido nucleico).

Entre los procedimientos propuestos para la funcionalización de puntas de MFA se puede mencionar también la solicitud de patente WO2012/084994 A1 (Polesel-Maris, Jérôme, et al., Atomic force microscope probe, method for preparing same, and uses thereof) que tiene como principal característica que representa un procedimiento que comparte características de las dos familias de procedimientos básicos descritos anteriormente. En este caso se modifica la punta original para exponer una superficie de grafito sobre la misma. Posteriormente, la superficie de grafito se modifica químicamente para generar grupos –OH en la superficie y, en una última etapa, dicho grupos reaccionan con diversas moléculas orgánicas para exponer en la superficie diferentes grupos funcionales capaces de unir covalentemente biomoléculas.

Así, uno de los mayores inconvenientes de los procedimientos de funcionalización de puntas propuestos en estudios previos es la necesidad de desarrollar un procedimiento previo de activación de la superficie del material utilizado para fabricar la punta de MFA, siendo este procedimiento previo diferente en función del tipo de material utilizado. Además el procedimiento de funcionalización debe de ser compatible con la biomolécula que se desee inmovilizar posteriormente sobre la punta de MFA. Consecuentemente, existe la necesidad tecnológica de desarrollar nuevos procedimientos versátiles para la funcionalización de puntas de MFA, que sean lo más generales posibles, tanto en términos de los materiales de la puntas que es posible funcionalizar como de las biomoléculas con las que dichos procedimientos de funcionalización sean compatibles.

35

En este contexto, la presente invención proporciona una punta sensora de microscopia de fuerza atómica química (C-MFA), donde la funcionalización tiene lugar utilizando la técnica de silanización por vapor activado (SVA o por sus iniciales en inglés, AVS, *Activated Vapour Silanization*). Esta tecnología ya ha sido descrita anteriormente (R.J. Martín-Palma et al.,  
5 Surface biofunctionalization of materials by amine groups, J. Mater. Res. 19 (2004), 2415-2420), en aplicaciones centradas fundamentalmente en el campo de los biomateriales y materiales para uso médico (P. Rezvanian et al., Enhanced biological response of AVS-functionalized Ti-6Al-4V alloy through covalent immobilization of collagen, Scientific Reports 8 (2018), 3337), que tienen como característica general su empleo en muestras con una  
10 topografía superficial básicamente plana.

La tecnología SVA ha demostrado su capacidad de depositar una lámina delgada funcionalizada sobre sustratos planos a la que es posible unir covalentemente diversas biomoléculas, tales como proteínas de la matriz extracelular como el colágeno o la  
15 fibronectina. Sin embargo, en el presente documento se describe el procedimiento donde se utiliza la técnica de SVA para funcionalizar de manera eficiente puntas de MFA, con una topografía mucho más abrupta que los sustratos planos donde se ha aplicado la tecnología SVA hasta el momento, de manera que dichas puntas puedan actuar como elementos sensores en procedimientos de microscopía de fuerza atómica química (o de afinidad).

20

## **BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN**

La presente invención se basa en trabajos realizados en el campo de la deposición de láminas delgadas y en el campo de la microscopía de fuerza atómica. Los inventores han  
25 encontrado que la técnica de silanización por vapor activado permite obtener puntas de microscopía de fuerza atómica funcionalizadas, que exhiben una densidad elevada de grupos amino (-NH<sub>2</sub>), carboxilo (-COOH), sulfidrido (-SH) y/o hidroxilo (-OH) en su superficie. A continuación se presenta y se describe el procedimiento para la producción de puntas de MFA funcionalizadas mediante la técnica de SVA.

30

Así, la presente invención proporciona un método para obtener una punta sensora de microscopia de fuerza atómica (MFA) funcionalizada, caracterizado porque la funcionalización tiene lugar mediante un proceso de silanización por vapor activado que comprende:

35 a) evaporar un compuesto organometálico que contiene al menos un átomo de silicio y al

menos un grupo funcional seleccionado del grupo que consiste en amino (-NH<sub>2</sub>), carboxilo (-COOH), sulfidrido (-SH), hidroxilo (-OH) y una combinación de los anteriores;

b) activar el vapor del compuesto organometálico de la etapa a) mediante calentamiento a una temperatura entre 400 y 1000 °C; y

5 c) hacer incidir el vapor activado de la etapa b) en una punta sensora para microscopia de fuerza atómica para depositar el compuesto organometálico sobre dicha punta sensora;

donde las etapas b) y c) tienen lugar de forma consecutiva.

10 La obtención de las puntas funcionalizadas requiere en una primera etapa de la evaporación de un organometálico, cuya molécula contiene al menos un átomo de silicio y al menos un grupo amino (-NH<sub>2</sub>), carboxilo (-COOH), sulfidrido (-SH), hidroxilo (-OH) o una combinación de los anteriores. Posteriormente, el vapor se somete a una etapa de calentamiento y, a continuación, se hace incidir sobre la punta MFA a funcionalizar. Con objeto de evitar la  
15 degradación del compuesto organometálico activado, las etapas b) y c) se suceden sin interrupción, de forma que la etapa de activación tiene lugar inmediatamente antes de hacer incidir el vapor activado sobre la punta MFA.

En el método que se describe en este documento, las etapas de evaporación y activación  
20 pueden tener lugar en diferentes regiones de un mismo equipo, o incluso de equipos diferentes de una misma instalación. De ser así, el vapor obtenido en la región de evaporación se transporta en caliente, preferentemente a una temperatura superior a la temperatura de evaporación del compuesto organometálico en cuestión, hasta la región donde tendrá lugar la etapa b) de activación.

25 La presente invención también se refiere a las puntas de MFA funcionalizadas obtenidas por el método que se describe en este documento. Estas puntas se caracterizan por el material base de la punta, un espesor de la lámina funcional preferentemente situado en un rango entre 50 nm y 1 μm; y una elevada densidad de grupos amino, carboxilo, sulfidrido y/o  
30 hidroxilo en superficie. En particular, en el caso de utilizar un organometálico con grupos amino se puede alcanzar valores próximos a ocho grupos amino por nm<sup>2</sup>, que corresponde aproximadamente a la densidad superficial teórica de una monocapa de grupos amino sobre una superficie plana. Dicha densidad puede ser medida, atendiendo a su capacidad de unir covalentemente marcadores fluorescentes.

35

Así, a diferencia de otros procedimientos para funcionalizar puntas de MFA como, por ejemplo el descrito en la solicitud de patente KR1020150071876 A1, donde se crea una monocapa de moléculas organometálicas unidas a los grupos hidróxilos generados en la superficie del material de la punta, en el método de la presente invención se crea una lámina delgada, preferentemente entre 50 nm y 1  $\mu\text{m}$ , formada por la descomposición de las moléculas organometálicas, siendo la formación de esta lámina independiente de la química de la superficie del material de la punta a funcionalizar.

### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

10

La presente invención proporciona un método para obtener una punta sensora de microscopia de fuerza atómica (MFA) funcionalizada, caracterizado porque la funcionalización tiene lugar mediante un proceso de silanización por vapor activado que comprende:

15 a) evaporar un compuesto organometálico que contiene al menos un átomo de silicio y al menos un grupo funcional seleccionado del grupo que consiste en amino ( $-\text{NH}_2$ ), carboxilo ( $-\text{COOH}$ ), sulfidrilo ( $-\text{SH}$ ), hidroxilo ( $-\text{OH}$ ) y una combinación de los anteriores;

b) activar el vapor del compuesto organometálico de la etapa a) mediante calentamiento a una temperatura entre 400 y 1000  $^\circ\text{C}$ ; y

20 c) hacer incidir el vapor activado de la etapa b) en una punta sensora para microscopia de fuerza atómica para depositar el compuesto organometálico sobre dicha punta sensora;

donde las etapas b) y c) tienen lugar de forma consecutiva.

25 El método de funcionalización que aquí se describe parte de unas puntas sensoras de MFA, generalmente unidas en una estructura mayor denominada chip (ver figura 1), y comprende la funcionalización de estas puntas al entrar en contacto con el vapor activado de moléculas organometálicas. La interacción entre la punta de MFA y el vapor activado conduce a la formación de una lámina sobre la misma de manera que fragmentos de la molécula organometálica permanezcan activos y expuestos al medio exterior. Preferentemente, el  
30 espesor de la lámina se sitúa entre 50 nm y 1  $\mu\text{m}$ , ya que espesores mayores a 1  $\mu\text{m}$  podrían dar lugar a delaminación de la lámina depositada sobre la punta de MFA.

Las puntas de MFA que presentan fragmentos orgánicos activos en su superficie se  
35 denominan funcionalizadas y su principal propiedad es que la presencia de dichos

fragmentos orgánicos activos modifica la interacción de la punta con el medio. El empleo de las puntas de MFA funcionalizadas modifica la capacidad sensora de la técnica de MFA y el rango de medidas que se pueden obtener con esta técnica.

- 5 Sin estar ligado a ninguna teoría, los inventores consideran que la presencia de la lámina funcionalizada, preferentemente con un espesor entre 50 nm y 1  $\mu\text{m}$ , es el resultado de la descomposición parcial de la molécula de organometálico como consecuencia de su activación térmica. Las moléculas activadas que inciden sobre la superficie interactúan con esta y entre ellas resultando en una lámina sólida sobre la superficie, pero en la que se
- 10 mantienen algunos de los fragmentos orgánicos de la molécula organometálica original, manteniendo dichos fragmentos su actividad y quedando expuestos al exterior de la punta.

El elemento sensor en microscopía de fuerza atómica es una punta que se sitúa en la proximidad de la superficie a estudiar y que aparece en el extremo de un voladizo que flexa

15 como consecuencia de la interacción entre la punta y la superficie. El voladizo, a su vez, se encuentra en el extremo de una estructura más masiva, generalmente con geometría paralelepédica denominada convencionalmente chip (ver figura 1). Las dimensiones típicas de los chips en puntas comerciales están en el rango milimétrico, siendo los tamaños típicos de los voladizos del orden de decenas de micras en las direcciones perpendiculares a la

20 definida por la punta, y de unas pocas micras en esta última dirección. Por último, el tamaño de la punta puede variar desde decenas de nanómetros hasta una decena de micras. No existe limitación, en principio, sobre la composición de las puntas de MFA siempre que sean compatibles con la fabricación de elementos con la geometría indicada anteriormente. En la práctica, la mayor parte de las puntas de MFA comerciales se forman a partir de silicio (Si) o

25 de nitruro de silicio ( $\text{Si}_3\text{N}_4$ ). El procedimiento de funcionalización de la presente invención no implica ninguna restricción sobre la geometría de los chips, ni sobre su composición siempre que su tamaño permita la activación de la punta sensora en la región de activación.

Por otro lado, el organometálico utilizado en el método de la presente invención está

30 formado por moléculas que poseen una estructura común en la que un átomo de silicio se une a una o varias cadenas hidrocarbonadas, donde al menos una de estas cadenas comprende uno o varios grupos amino ( $-\text{NH}_2$ ), hidroxilo ( $-\text{OH}$ ), carboxilo ( $-\text{COOH}$ ) o sulfidriilo ( $-\text{SH}$ ).

En realizaciones preferidas de la presente invención, el compuesto organometálico comprende una o más cadenas hidrocarbonadas  $-(CH_2)_n-$ , donde n es un número entre 1 y 30, preferentemente entre 1 y 6; y al menos un grupo funcional seleccionado del grupo que consiste en hidroxilo (-OH), carboxilo (-COOH), sulfhidrilo (-SH), amino (-NH<sub>2</sub>) y una combinación de los anteriores.

Las cadenas hidrocarbonadas del compuesto organometálico que se utiliza en el método de la presente invención pueden comprender uno o varios enlaces dobles o triples entre átomos de carbono.

Como ejemplos de moléculas que pueden utilizarse como compuesto organometálico para el proceso de silanización por vapor activado que se describe en este documento se encuentran el 3-aminopropiltriatoxisilano (APTES) y el aminopropiltrimetoxisilano (APTMS), ambos conducentes a la formación de láminas que contienen grupos amino; el mercaptopropilmetoxisilano (MPTMS), con el que se producen láminas que contienen grupos sulfhidrilo; el ácido triatoxisililpropilmaleámico, con el que se producen láminas que contienen grupos carboxilo; y el óxido de N-triatoxisililpropil-O-polietileno, con el que se producen láminas que contienen grupos hidroxilo. Junto con la propia estructura de la molécula, una característica importante del organometálico es su punto de ebullición. En particular, se prefiere que la temperatura de ebullición de este compuesto se encuentre entre 100°C y 250 ° C.

La etapa a) de evaporación se puede llevar a cabo depositando un fluido organometálico en una cámara de evaporación situada dentro de un horno de evaporación, de manera que se pueda variar la temperatura del fluido organometálico. El aumento de la temperatura de la cámara de evaporación por encima del punto de ebullición del fluido organometálico conduce a la transición de fase líquido-vapor con la formación de vapor de organometálico dentro de la cámara de evaporación. Preferentemente, el rango de temperaturas al que se calienta el horno de evaporación se sitúa entre 50 °C y 400 °C, siendo aún más preferido que esta temperatura se encuentre entre 100 °C y 250 °C y, siendo especialmente preferido que la temperatura en la etapa a) de evaporación sea entre 130 °C y 200 °C. El rango de temperaturas de evaporación dependerá del organometálico concreto, fijándose como límite máximo de la temperatura de dicho rango aquella en la que produce la descomposición de la molécula organometálica.

35

Preferentemente, la etapa b) de activación puede tener lugar calentando a una temperatura entre 400 y 900 °C, más preferentemente entre 400 y 800 °C, ya que temperaturas demasiado elevadas favorecen la aparición de irregularidades e inhomogeneidades en las láminas depositadas.

5

La etapa de activación del vapor de organometálico puede llevarse a cabo en una instalación que comprende una cámara de deposición donde se sitúan las puntas MFA que se desea funcionalizar, y otra región, preferentemente en forma de tubo, inmediatamente anterior a la cámara de deposición y que conecta directamente con ella. Según estas realizaciones, la región de activación corresponde a la región del tubo inmediatamente anterior a la cámara de deposición y que conecta directamente con ella. Adicionalmente, un horno de activación se sitúa alrededor de la región de activación, definiendo su extensión y permitiendo un aumento controlado de temperatura en dicha región de activación. Así, en la región de activación, el vapor de organometálico evaporado en la cámara de evaporación atraviesa una región de temperatura elevada antes de entrar en la cámara de deposición e incidir sobre las puntas de MFA.

La eficiencia del método mejora al realizarse en vacío, evitando la reacción de la molécula de organometálico con los gases atmosféricos, fundamentalmente oxígeno. La necesidad de calentar el organometálico durante la etapa de evaporación y, posteriormente, durante la etapa de activación crea una situación favorable para la oxidación del organometálico con el oxígeno atmosférico. Dicha reacción puede descomponer el organometálico, impidiendo la funcionalización del sustrato. Así, llevar a cabo el método, en particular las etapas a), b) y c) descritas anteriormente, en un sistema de vacío que permita un vacío residual entre  $10^{-4}$  y  $10^{-1}$  mbar resulta ventajoso para evitar la descomposición mencionada anteriormente. Dicho vacío puede conseguirse con una bomba rotatoria acoplada a una trampa fría.

En el método que se describe en este documento, las etapas de evaporación y activación pueden tener lugar en diferentes regiones de una misma instalación y, en particular, en diferentes cámaras, de un mismo equipo o incluso de equipos diferentes. De ser así, el vapor obtenido en la región de evaporación se transporta en caliente, preferentemente a una temperatura superior a la temperatura de evaporación del compuesto organometálico en cuestión, hasta la región donde tendrá lugar la etapa de activación.

En aquellas realizaciones del método de la invención donde una o más de las etapas de evaporación, activación o deposición del organometálico sobre la punta sensora MFA a funcionalizar tienen lugar en diferentes regiones, se prefiere la utilización de un gas portador que facilite el tránsito del vapor de organometálico desde una región a otra, en particular, de la cámara de evaporación hasta la región de activación y, finalmente, hasta la cámara de deposición, donde el vapor activado puede incidir sobre la punta de MFA. Este gas portador ha de ser un gas inerte con respecto al organometálico, por lo que una posible elección es un gas noble como el argón, aunque eventualmente podría considerarse la utilización de nitrógeno molecular o de dióxido de carbono. La introducción del gas portador en el sistema conduce a un aumento de la presión en el mismo, encontrándose el rango de presiones de trabajo como consecuencia de la introducción del gas portador preferentemente entre  $10^{-2}$  y 100 mbar, más preferentemente entre  $5 \times 10^{-1}$  y 10 mbar.

Preferentemente, en el método para obtener una punta sensora de MFA funcionalizada que se describe en este documento, el periodo de incidencia del vapor de organometálico activado sobre la punta de MFA se encuentra entre 1 y 120 minutos.

Tal como se ha mencionado anteriormente, puede existir una separación entre la cámara de evaporación y la región de activación, unidas ambas zonas generalmente por un tubo de conexión. Esta separación implica el tránsito del vapor a lo largo de una extensión de tubo de conexión antes de entrar en la región de activación. Para evitar la condensación del vapor de organometálico durante dicho tránsito, es conveniente rodear los tubos de conexión entre la cámara de evaporación y la región de activación con un elemento calefactor, que puede ser una cinta calefactora. Dicha cinta calefactora debe mantener la temperatura de la conexiones a una temperatura igual o superior a la temperatura de evaporación de la etapa a) del método de la invención, con objeto de evitar la condensación del vapor de organometálico antes de que alcance la región de activación.

La cámara de deposición puede comprender un soporte para las puntas de MFA, que permite definir la posición de las puntas en la cámara de deposición y mantenerlas inmóviles durante todo el proceso. En realizaciones particulares de la invención, la geometría de la punta viene definida por la distancia de la punta con respecto a la salida del tubo de la región de activación ( $D_2$ ; Figura 3) y por el ángulo que forma la punta con respecto a la vertical a dicha salida en la dirección del flujo de vapor ( $\alpha$ ; Figura 3). En particular, en el método que aquí se describe, las puntas a funcionalizar están situadas de forma que, en la

etapa c), el vapor de organometálico activado incide sobre las puntas a funcionalizar con un ángulo entre  $0^\circ$  y  $60^\circ$ . En particular, cuando el método tiene lugar en el equipo que se describe en este documento (ver figura 2), el ángulo  $\alpha$  mencionado anteriormente corresponde al ángulo de la punta sensora a funcionalizar con el orificio de desembocadura de la región de activación en la cámara de deposición, orificio por donde se introduce el vapor de organometálico activado en la cámara de deposición. De esta forma se consigue un compromiso entre la densidad de flujo (número de moléculas/área/tiempo) y el área cubierta, teniendo en cuenta que el flujo de vapor toma una forma aproximada de cono al entrar en la cámara de deposición.

10

Adicionalmente, es posible realizar la funcionalización de la punta de MFA en dos orientaciones alternativas: voladizo de soporte de la punta orientado perpendicularmente a la dirección del flujo de vapor (figura 4A), o voladizo de soporte de la punta orientado paralelamente a la dirección del flujo de vapor (figura 4B). Con esta última orientación se consigue disminuir la masa de organometálico depositado en el fleje y en el resto del chip. En particular, la disminución de la masa de organometálico depositada en el fleje implica una disminución en el desplazamiento de la frecuencia de resonancia principal del fleje, con respecto al valor medido antes de la funcionalización.

15

Sin estar ligado a ninguna teoría se cree que la funcionalización de las puntas de MFA en realizaciones particulares de la presente invención es el resultado de los siguientes procesos: Formación del vapor de organometálico en la cámara de evaporación, arrastre del vapor de organometálico desde la cámara de evaporación hasta la región de activación, calentamiento de las moléculas de organometálico dentro de la región de activación, incidencia de la moléculas así activadas a la superficie de la punta de MFA resultando en la formación de una lámina, preferentemente con un espesor entre 50 nm y  $1\ \mu\text{m}$ , sobre la punta. El proceso de activación es suficiente como para inducir la interacción de la moléculas de organometálico entre sí y con el material de punta de manera que se deposite una lámina en la superficie del material de la punta MFA, pero manteniendo parte de los grupos orgánicos de la molécula antes del tratamiento.

25

30

La presente invención también se refiere a las puntas sensoras para MFA funcionalizadas tales que presentan una lámina depositada en su superficie, y dicha lámina comprende grupos reactivos seleccionados del grupo que consiste en amino ( $-\text{NH}_2$ ), carboxilo ( $-\text{COOH}$ ), sulfidrido ( $-\text{SH}$ ), hidroxilo ( $-\text{OH}$ ) y una combinación de los anteriores. Dichas puntas son

35

obtenidas por el método que se describe en este documento y se caracterizan porque el proceso de funcionalización resulta en la deposición de una lámina funcional, preferentemente con un espesor situado en un rango entre 50 nm y 1  $\mu\text{m}$ . En particular, las puntas funcionalizadas por el método de la presente invención pueden tener una densidad de grupos amino en superficie que puede alcanzar valores próximos a ocho grupos amino por  $\text{nm}^2$ , atendiendo a su capacidad de unir covalentemente marcadores fluorescentes.

Así, las puntas sensoras funcionalizadas de la presente invención pueden presentar en su superficie láminas funcionalizadas, tales que dichas láminas delgadas tengan un espesor dentro del rango situado entre 50 nm y 1  $\mu\text{m}$ , y que contengan grupos reactivos tales como amino ( $-\text{NH}_2$ ), hidroxilo ( $-\text{OH}$ ), carboxilo ( $-\text{COOH}$ ), sulfhidrilo ( $-\text{SH}$ ) o combinación de los anteriores, de manera que estos grupos funcionales queden expuestos hacia el exterior. Dichos grupos reactivos pueden estar unidos o no a cadenas hidrocarbonadas  $-(\text{CH}_2)_n-$ , donde n es un número entre 1 y 30.

Adicionalmente, la presente invención se refiere al uso de las puntas sensoras funcionalizadas que se describen en este documento en microscopia de fuerza atómica.

El método para obtener una punta funcionalizada de MFA que se describe en este documento puede llevarse a cabo en un equipo que comprende:

- Una cámara de evaporación,
- Un horno de evaporación configurado para calentar la cámara de evaporación,
- Una región de activación, preferentemente en forma de tubo, conectada a la cámara de evaporación,
- Un horno de activación configurado para calentar la región de activación, y
- Una cámara de deposición conectada a continuación de la región de activación.

En realizaciones particulares, la región de activación posee una longitud situada en el rango entre 100 mm y 300 mm, lo que permite alcanzar la temperatura de activación deseada en el vapor del organometálico a mayores presiones de trabajo o, equivalentemente, a mayores flujos de vapor.

En otras realizaciones particulares de la invención, la región de activación tiene un orificio de desembocadura a la cámara de deposición, y la punta a funcionalizar se sitúa a una distancia entre 1 mm y 50 mm respecto a dicho orificio. Como consecuencia de la dispersión

del flujo de vapor de organometálico al entrar en la cámara de deposición, este rango de valores de la distancia resulta de un compromiso entre valores de la densidad de flujo de vapor suficientemente elevados dentro de la cámara de deposición y una superficie de incidencia lo suficientemente amplia que permita la funcionalización homogénea de muestras de con un tamaño del orden de cm.

Preferentemente, el ángulo que forma la línea imaginaria que une la punta con el orificio de desembocadura de la región de activación en la cámara de deposición con la dirección del flujo del vapor organometálico está en el rango entre  $0^\circ$  y  $60^\circ$ . Como en el apartado anterior, este rango de valores del ángulo resulta del compromiso entre la densidad de flujo del vapor de organometálico dentro de la cámara de deposición y el área de incidencia barrida por dicho flujo.

En realizaciones particulares de la invención, el voladizo de soporte de la punta MFA está orientado perpendicularmente a la dirección del flujo de vapor de organometálico. Alternativamente, el voladizo de soporte de punta MFA está orientado paralelamente a la dirección del flujo de vapor de organometálico.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Para mejorar la descripción de la invención resulta útil referirse a las Figuras incluidas en el documento. Hay que enfatizar que, siguiendo la práctica común, los dibujos y esquemas de las figuras no están a escala. Al contrario, las dimensiones de los diferentes elementos se ha aumentado o reducido de manera arbitraria con la sola intención de facilitar la comprensión de los detalles indicados. Las Figuras incluidas en el documento de la solicitud de patente son:

Figura 1. Esquema de la sección transversal de la punta funcionalizada. (A) Corte transversal de una punta de MFA convencional con indicación de los elementos fundamentales: (1) Chip, (2) Voladizo (*Cantilever*) y (3) Punta (*Tip*). (B) Vista plana de una punta de MFA convencional con indicación de los elementos fundamentales. (C) Corte transversal de la punta/voladizo funcionalizada mediante AVS, donde se muestra la lámina funcionalizada (4). Se indica la presencia de grupos reactivos en superficie que en este caso se particularizan a grupos amino ( $\text{NH}_2$ ).

Figura 2. Esquema de los elementos esenciales de un equipo utilizado para la fabricación de puntas MFA funcionalizadas mediante realizaciones preferidas del método de la presente invención. (1) Entrada del gas portador. (2) Cámara de evaporación. (3) Horno de evaporación (4) Compuesto organometálico. (5) Horno de activación. (6) Región de activación. (7) Cámara de deposición. (8) Salida hacia el sistema de vacío.

Figura 3. Detalle del horno de activación y de la cámara de deposición con la definición de los parámetros geométricos principales.  $D_1$ : Longitud del horno de activación,  $D_2$ , distancia entre la salida del horno de activación y la punta de MFA, y  $\alpha$ , ángulo que forma la línea que une la salida del horno de activación y la punta de MFA con el eje de la región de activación.

Figura 4. Esquema de dos orientaciones posibles de la punta con respecto al flujo de vapor. (A) Voladizo de soporte de la punta orientado perpendicularmente a la dirección del flujo de vapor. (B) Voladizo de soporte de la punta orientado paralelamente a la dirección del flujo de vapor. La dirección del flujo de vapor activado a la entrada de la cámara de activación se indica mediante una flecha.

Figura 5. La existencia de la lámina delgada funcionalizada en la superficie del cantilever y de la punta se comprueba mediante el empleo de una molécula fluorescente (isotiocianato de fluoresceína) que reacciona covalentemente con grupos amino. (A) Muestra control sobre la que no se ha depositado la lámina delgada funcionalizada. (B) Sistema voladizo/punta funcionalizado siguiendo las condiciones de deposición del Ejemplo con un tiempo de deposición de 10 minutos. (C) Sistema voladizo/punta funcionalizado siguiendo las condiciones de deposición del Ejemplo con un tiempo de deposición de 20 minutos.

Figura 6. Modificación de la adhesión de las puntas MFA causada por la funcionalización y posterior unión covalente de una molécula orgánica. Curva F-z de una muestra sin funcionalizar (línea continua) y de una muestra funcionalizada a la que se ha unido covalentemente isotiocianato de fluoresceína (línea discontinua). Se observa un aumento de la fuerza de adhesión entre la punta y el sustrato de HOPG desde 2 nN en la punta sin funcionalizar, hasta 37 nN con la punta funcionalizada.

## EJEMPLOS

Los ejemplos que siguen se incluyen para facilitar a los expertos en el área una descripción completa de cómo realizar y aplicar la presente invención. No debe considerarse de ningún modo que limitan el alcance de lo que los inventores consideran como su invención, ni debe suponerse que constituyen una enumeración completa de todos los experimentos realizados. Salvo indicación de lo contrario, la temperatura se indica en grados centígrados y la presión en milibares.

**EJEMPLO 1:** La siguiente Tabla muestra el rango de los parámetros del proceso de funcionalización utilizados para la deposición de láminas funcionalizadas sobre puntas de MFA de nitruro de silicio ( $\text{Si}_3\text{N}_4$ ).

Parámetro	Valor o Rango de valores
Composición del organometálico	3-Amino propiltriétoxissilano (APTES)/ mercaptopropilmetoxissilano (MPTMS)
Gas portador	Argon/Nitrógeno molecular
Temperatura de evaporación (°C)	130-200
Presión de trabajo del sistema durante la deposición (mbar)	0,5-2
Temperatura de activación del vapor (°C)	650-800
Longitud de la región de activación, $D_1$ (mm)	150-200
Distancia de la punta a la salida de la región de activación, $D_2$ (mm)	1-10
Ángulo de la punta con la dirección del flujo de vapor a la salida de la región de activación, $\alpha$	0°-45°
Orientación de la punta respecto al flujo de vapor a la salida de la región de activación	Voladizo de soporte de la punta orientado perpendicularmente a la dirección del flujo de vapor (Figura 4A) / Voladizo de soporte de la punta orientado paralelamente a la dirección del flujo de vapor (Figura 4B)
Tiempo de deposición (min)	5-30

**EJEMPLO 1.1:** En particular, la siguiente implementación de la invención ha permitido la obtención de puntas de MFA funcionalizadas mediante AVS. Composición del organometálico: 3-aminopropiltriétoxissilano; gas portador: argón; temperatura de

evaporación: 170 °C; presión de trabajo del sistema: 1 mbar; temperatura de activación: 750 °C; longitud de la región de activación: 150 mm; distancia de la punta a la salida de la región de activación: 5 mm; ángulo de la punta con la dirección del flujo a la salida de la región de activación: 20°; orientación de la punta respecto al flujo de vapor a la salida de la región de activación: horizontal (Figure 4A); tiempo de deposición: 20 minutos.

### **ALGUNAS PROPIEDADES DE LAS PUNTAS DE MICROSCOPIA DE FUERZA ATÓMICA FUNCIONALIZADAS**

10 La posibilidad de funcionalizar puntas de MFA mediante el procedimiento descrito en el presente documento se validó experimentalmente. Siguiendo los detalles del Ejemplo 1.1 presentado en la Sección anterior, el organometálico empleado para la funcionalización fue 3-aminopropiltriethoxisilano. El uso de este organometálico conduce a la formación de una lámina cuyo espesor se encuentra entre 100-200 nm y en cuya superficie aparece una

15 densidad elevada de grupos amino (-NH<sub>2</sub>) en superficie. Para la comprobación de la existencia de grupos amino en la superficie de la punta MFA se eligió la molécula isotiocianato de fluoresceína. Dicha molécula presenta una región fluorescente que emite a una longitud de onda correspondiente al color verde y un grupo isotiocianato, que interacciona con grupos amino creando un enlace covalente. Las puntas MFA

20 funcionalizadas y puntas MFA control sin funcionalizar se incubaron con una solución de isotiocianato de fluoresceína, siendo posteriormente lavadas para eliminar los restos de moléculas fluorescentes que no estuviesen unidas covalentemente al material. Las puntas se observaron en un microscopio de fluorescencia y resultados representativos de las imágenes resultantes se muestran en la Figura 5. Todas las imágenes presentadas en la

25 Figura 5 se obtuvieron bajo las mismas condiciones de observación por lo que la intensidad de la fluorescencia observada es una medida semicuantitativa de la densidad de grupos amino en la superficie del voladizo MFA.

La Figura 5A corresponde al voladizo control sin funcionalizar, observándose una

30 fluorescencia muy reducida y prácticamente indistinguible de la fluorescencia del fondo que se observa fuera del contorno definido por el voladizo. En contraste, las Figuras 5B y 5C corresponden a puntas de MFA funcionalizadas en las condiciones indicadas en el Ejemplo anterior durante 10 minutos y 20 minutos respectivamente. El aumento de la fluorescencia con respecto a la muestra de control es evidente, mostrándose además cómo dicha

35 fluorescencia aparece distribuida de manera homogénea en toda la superficie del voladizo.

También se observa que la intensidad de la fluorescencia aumenta en este caso con el tiempo de deposición, siendo mayor en la muestra en la que la deposición ha tenido una duración de 20 minutos.

5 Adicionalmente se aprovecharon las puntas de MFA a las que se había unido covalentemente las moléculas de isotiocianato de fluoresceína para verificar que dicha unión se podía detectar a partir de la diferente interacción entre la punta y la muestra después de la unión de la molécula de fluoresceína a la misma. En particular, se obtuvieron curvas de fuerza sobre la punta frente a distancia entre un sustrato modelo de grafito (HOPG) y puntas  
10 funcionalizadas o puntas control (curvas F-z). Una curva F-z representativa de la interacción entre una punta control sin funcionalizar y un sustrato modelo de HOPG se muestra en la Figura 6. Una curva F-z representativa de la interacción de una punta funcionalizada a la que se ha unido covalentemente isotiocianato de fluoresceína y el mismo sustrato modelo de HOPG se muestra en la Figura 6B. La principal diferencia entre ambas curvas se  
15 concentra en la región de adhesión que corresponde a la separación de la punta respecto del sustrato. La fuerza de adhesión de la punta funcionalizada es mayor en un factor de entre 2 y 10 a la fuerza de adhesión de la punta control sin funcionalizar y el mismo sustrato. Sin estar ligado a ninguna teoría, se asume que dicho aumento en la fuerza de adhesión es el resultado de un incremento en la interacción punta-muestra debido a la presencia de los  
20 grupos orgánicos característicos de la molécula de fluoresceína.

## REIVINDICACIONES

1. Un método para obtener una punta sensora de microscopia de fuerza atómica funcionalizada, caracterizado porque la funcionalización tiene lugar mediante un proceso de silanización por vapor activado que comprende:
- 5 silanización por vapor activado que comprende:
- a) evaporar un compuesto organometálico que contiene al menos un átomo de silicio y al menos un grupo funcional seleccionado del grupo que consiste en amino (-NH<sub>2</sub>), carboxilo (-COOH), sulfhidrilo (-SH), hidroxilo (-OH) y una combinación de los anteriores;
  - b) activar el vapor del compuesto organometálico de la etapa a) mediante calentamiento a una temperatura entre 400 y 1000 °C; y
  - 10 c) hacer incidir el vapor activado de la etapa b) en una punta sensora para microscopia de fuerza atómica para depositar el compuesto organometálico sobre dicha punta sensora;
- donde las etapas b) y c) tienen lugar de forma consecutiva.
- 15
2. Método para obtener una punta funcionalizada según la reivindicación 1, donde la punta sensora a funcionalizar está compuesta por nitruro de silicio (Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub>) o silicio (Si).
3. Método para obtener una punta funcionalizada según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, donde el compuesto organometálico comprende una o más cadenas hidrocarbonadas -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-, donde n es un número entre 1 y 30; y al menos un grupo funcional seleccionado del grupo que consiste en hidroxilo (-OH), carboxilo (-COOH), sulfhidrilo (-SH), amino (-NH<sub>2</sub>) y una combinación de los anteriores.
- 20
4. Método para obtener una punta funcionalizada según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el compuesto organometálico se selecciona del grupo que consiste en 3-aminopropiltriétosisilano (APTES), aminopropiltrimetoxisilano (APTMS), mercaptopropilmetoxisilano (MPTMS), ácido triétosisililpropilmaleámico y óxido de N-trietosisililpropil-O-polietileno.
- 25
5. Método para obtener una punta funcionalizada según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el compuesto organometálico es 3-aminopropiltriétosisilano (APTES).
- 30

6. Método para obtener una punta funcionalizada según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde la etapa a) de evaporación se lleva a cabo mediante calentamiento en un rango de temperaturas situado entre 100 °C y 250 °C.
- 5 7. Método para obtener una punta funcionalizada según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde la etapa b) de activación tiene lugar calentando a una temperatura entre 400 °C y 900 °C.
8. Método para obtener una punta funcionalizada según una cualquiera de las  
10 reivindicaciones 1 a 7, donde las etapas de evaporación, activación y/o deposición tienen lugar en un vacío residual dentro del rango  $10^{-4}$  y  $10^{-1}$  mbar.
9. Método para obtener una punta funcionalizada según una cualquiera de las  
15 reivindicaciones 1 a 7, donde una o varias de las etapas de evaporación, activación o deposición del organometálico tienen lugar en diferentes regiones, y se utiliza un flujo de gas inerte para transportar el vapor de organometálico de una región a otra.
10. Método para obtener una punta funcionalizada según la reivindicación 9, donde el gas inerte es argón o nitrógeno molecular.
- 20 11. Método para obtener una punta funcionalizada según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 10, donde la presión del sistema se encuentra en el rango  $10^{-2}$  y 100 mbar.
- 25 12. Método para obtener una punta funcionalizada según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, donde el periodo de incidencia del vapor de organometálico activado sobre la punta de MFA se encuentra entre 1 y 120 minutos.
- 30 13. Método para obtener una punta funcionalizada según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, donde en la etapa c) el vapor de organometálico activado incide sobre las puntas a funcionalizar con un ángulo entre  $0^{\circ}$  y  $60^{\circ}$ .
- 35 14. Método para obtener una punta funcionalizada según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, donde las puntas están situadas en un voladizo (2), y éste está orientado perpendicularmente a la dirección del flujo de vapor de organometálico activado.

15. Método para obtener una punta funcionalizada según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, donde las puntas están situadas en un voladizo (2), y éste está orientado paralelamente a la dirección del flujo de vapor de organometálico activado.

5

16. Una punta sensora de microscopía de fuerza atómica funcionalizada, caracterizada porque comprende una lámina depositada en su superficie que comprende grupos reactivos seleccionados del grupo que consiste en amino (-NH<sub>2</sub>) hidroxilo (-OH), carboxilo (-COOH), sulfhidrilo (-SH) y combinación de los anteriores, y se obtiene por el método que se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15.

10

17.- Punta sensora según la reivindicación 16, donde la lámina depositada tiene un espesor entre 50 nm y 1 µm.

15

18.- Uso de una punta sensora según se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 16 o 17 en microscopía de fuerza atómica.



21 N.º solicitud: 201830777

22 Fecha de presentación de la solicitud: 27.07.2018

32 Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

51 Int. Cl.: **G01Q70/18** (2010.01)  
**G01Q60/42** (2010.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	56 Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	VOLCKE, C. et al., Plasma functionalization of AFM tips for measurement of chemical interactions, Journal of Colloid and Interface Science, 15/08/2010, Vol. 348, Nº 2, páginas 322 - 328, ISSN 0021-9797; resumen y apartado: Materials and Methods.	16-18
Y		1-15
Y	ARROYO-HERNÁNDEZ, M., et al., Optimization of functionalization conditions for protein analysis by AFM, Applied Surface Science, 20/08/2014, Vol. 317, páginas 462-468, ISSN 0169-4332, <DOI: doi:10.1016/j.apsusc.2014.07.201>; apartado: Materials and Methods.	1-15
A	LIN, C.-Y., et al., Detection of DNA hybridization using functionalized InN ISFETs, Materials Research Society Symposium Proceedings - III-Nitride Materials for Sensing, Energy Conversion and Controlled Light-Matter Interactions 2010, 30/11/2009, Vol. 1202, páginas 41-46, ISSN 0272-9172 (print) ISBN 978-1-60511-175-9; resumen.	1-18
A	JIANWEI, L., et al., Single molecule labeling of an atomic force microscope cantilever tip, Applied Physics Letters, 15/10/2012, Vol. 101, Nº 16, páginas 163705-163705-3, ISSN 0003-6951, <DOI: doi:10.1063/1.4760283>; resumen, fig.1.	1-18
A	CREASEY, R., et al., Atomic force microscopy-based antibody recognition imaging of proteins in the pathological deposits in Pseudoexfoliation Syndrome. Ultramicroscopy, 11/03/2011, Vol. 111, Nº 8, páginas 1055-1061, ISSN 0304-3991, <DOI: doi:10.1016/j.ultramic.2011.03.008>; apartado: Materials and Methods.	1-18
A	LÓPEZ-PAZ, J.L., et al., Direct and label-free monitoring oligonucleotide immobilization, non-specific binding and DNA biorecognition, Sensors and Actuators B: Chemical: international journal devoted to research and development of physical and chemical transducers, 01/03/2014, Vol. 192, páginas 221 - 228, ISSN 0925-4005, <DOI: doi:10.1016/j.snb.2013.10.110>; apartado: Materials and Methods.	1-18
A	OZKAN, A.D., et al., Probe microscopy methods and applications in imaging of biological materials, Seminars in Cell and Developmental Biology, 12/08/2017, Vol. 73, páginas 153-164, ISSN 1084-9521, <DOI: doi:10.1016/j.semcd.2017.08.018>. Todo el documento.	1-18

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
26.09.2018

Examinador  
M. d. García Poza

Página  
1/2

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

G01Q

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, NPL, XPESP, COMPENDEX