

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11) Número de publicación: **2 688 518**

51) Int. Cl.:

B05D 5/08 (2006.01)

B05D 1/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.05.2015** E 15001332 (4)

97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.07.2018** EP 2952267

54) Título: **Superficies superhidrófobas reactivas, superficies superhidrófobas pautadas, métodos para producirlas y uso de las superficies superhidrófobas pautadas**

30) Prioridad:

03.06.2014 DE 102014008118

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

05.11.2018

73) Titular/es:

**KARLSRUHER INSTITUT FÜR TECHNOLOGIE
(100.0%)
Kaiserstrasse 12
76131 Karlsruhe, DE**

72) Inventor/es:

**LINXIAN, LI;
JUNSHENG, LI;
PAVEL, LEVKIN;
XIN, DU y
WENQIAN, FENG**

74) Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 688 518 T3

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

DESCRIPCIÓN

Superficies superhidrófobas reactivas, superficies superhidrófobas pautadas, métodos para producirlas y uso de las superficies superhidrófobas pautadas

La invención presente se refiere en general a métodos para modificar y/o producir superficies superhidrófobas. En particular, la invención presente se refiere a superficies superhidrófobas reactivas que pueden ser modificadas para producir superficies superhidrófobas que tienen pautas de funcionalidades químicas o propiedades físicas diferentes tales como micropautas superhidrófilas-superhidrófobas, y usos de estas superficies superhidrófobas pautadas como revestimientos autolimpiantes, revestimientos antiincrustación, o revestimientos resbaladizos, o para aplicaciones químicas, biológicas y de diagnóstico, así como métodos para producirlas.

En general, según las propiedades superficiales pueden ser clasificadas en superficies hidrófobas e hidrófilas dependiendo del valor del ángulo de humectancia, o de contacto con el agua, (WCA). Una superficie que tiene un WCA mayor de 90° se denomina hidrófoba, mientras que con un WCA menor de 90° se denomina hidrófila. El ángulo de humectancia máximo del agua en una superficie lisa es de aproximadamente 120° . En la práctica, se usan dos tipos de valores del WCA: estático y dinámico. Los ángulos de humectancia estáticos (Θ_{st}) son obtenidos mediante mediciones de gota sésiles, donde se deposita una gota en la superficie y el valor se obtiene mediante un goniómetro o un software especializado. Los ángulos de humectancia dinámicos son ángulos de contacto de desequilibrio y se miden durante el crecimiento (WCA avanzado Θ_{adv}) y la contracción (WCA retrocedido Θ_{rec}) de una gota de agua. La diferencia entre Θ_{adv} y Θ_{rec} se define como histéresis del ángulo de contacto (CAH).

Las superficies superhidrófobas se caracterizan por una extrema repelencia al agua con WCA superiores a 150° y una CAH de menos de 10° . Por el contrario, el agua se extiende inmediatamente por las superficies superhidrófilas lo que conduce a un WCA menor de 10° . Tanto la superhidrofobicidad como la superhidrofilicidad son el resultado de una combinación de alta rugosidad superficial con material hidrófobo o hidrófilo, respectivamente. La combinación de estas dos propiedades extremas en la misma superficie de micropautas bidimensionales precisas abre nuevas funcionalidades y posibilidades a una amplia variedad de aplicaciones de células,^[1-3] gotas,^[2,4] e hidrogel de micromatrices^[2,5] para la detección de canales microfluídicos confinados por tensión superficial para dispositivos de separación y diagnóstico.^[6]

Además, los revestimientos superhidrófobos continuos son de gran importancia para diferentes aplicaciones industriales que varían desde revestimientos autolimpiantes, anticongelantes o anticorrosión hasta membranas para la separación del aceite-agua o revestimientos para prendas de vestir. La mayoría de estos revestimientos superhidrófobos deben ser aplicados a zonas extensas y no necesitan ser funcionalizados adicionalmente. Sin embargo, por ejemplo, las aplicaciones biotecnológicas y biomédicas requieren comúnmente revestimientos superhidrófobos que pueden ser modificados adicionalmente para crear desde nano hasta micropautas de funcionalidades químicas o propiedades físicas diferentes, tales como las micropautas superhidrófobas-superhidrófilas mencionadas anteriormente. Por ejemplo, en la patentes de los EE. UU. US 2007/0135007 A1 y en el documento WO 2004/113456 A2, se describen métodos para producir revestimientos superhidrófobos empleando alquilo silanos para fabricar los revestimientos respectivos. Sin embargo, si están presentes los alquilo silanos en la superficie, la funcionalización posterior de la superficie revestida no es fácil de conseguir ya que la superficie revestida con alquilo silano es estable, por lo que se necesitan condiciones muy severas para modificar la superficie posteriormente.

Se han descrito varios métodos para fabricar micropautas superhidrófobas-superhidrófilas en la última década. Por ejemplo, se ha informado de métodos basados en la descomposición inducida por UV de revestimientos hidrófobos en diferentes sustratos, tales como alúmina, película de TiO_2 o de SiO_2 .^[7] Han sido descritas la modificación fotoinducida de nanotubos de carbono con azidas hidrófilas,^[8] el tratamiento con plasma,^[9] la microimpresión,^[10] o la deposición de dopamina mimética con el mejillón cebrá en combinación con una litografía blanda^[11]. Recientemente, se ha descrito un método basado en fotoinjertos iniciados por UV para producir micropautas superhidrófobas-superhidrófilas en películas poliméricas porosas^[1,12], así como también ha sido descrito en la patente europea EP 2 481 794 A1. Además, se ha informado de que una superficie superhidrófoba reactiva de amina permite la fabricación posterior mediante moléculas funcionalizadas con aminas.^[13]

Además, el documento WO 2014/076682 A1 describe un método para conferir propiedades modificadas a una superficie de sustrato metálico, la superficie está formada al menos parcialmente por óxidos metálicos, el método comprende al menos dos pasos que consisten en (i) un primer paso que comprende al menos exponer dicha superficie del sustrato a una molécula de anclaje heterobifuncional que lleva al menos un grupo silano y al menos un grupo A, dicho grupo A es introducido opcionalmente dentro de dicha molécula de anclaje por medio de un paso de funcionalización preliminar, y (ii) un segundo paso de exposición de la superficie del sustrato a un polímero que tiene al menos tres grupos A_2 capaces de reaccionar con A en una reacción de tiol-eno, siendo el peso molecular medio de dicho polímero superior a 1000 g/mol. C. Wang y otros, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2013, 110, 105-112 describen la glicosilación de una superficie de membrana de polipropileno por medio de química click de tiol-ino para la adsorción de lectina.

La mayoría de los métodos descritos, sin embargo, actúan lentamente ya que, por ejemplo, se requiere un tiempo de radiación de 30 minutos en el caso del enfoque de fotoinjerto iniciado por UV descrito en la patente europea EP 2 481 794 A1. Además, los métodos anteriormente mencionados carecen de la capacidad de adaptar o de modificar fácilmente las propiedades mediante diferentes grupos funcionales objeto, o requieren condiciones severas (por ejemplo, tratamiento con plasma o descomposición inducida por UV), disolventes orgánicos (es decir, incompatibles con condiciones acuosas) y, por tanto, no es posible aplicarlos directamente para formar pautas de biomoléculas. Estas limitaciones restringen el intervalo y el número de aplicaciones prácticas posibles de las micropautas superhidrófobas-superhidrófilas producidas.

Además, los métodos basados en la fisisorción o adsorción física de compuestos químicos hidrófilos en superficies superhidrófobas para crear pautas hidrófilas sufren usualmente de una estabilidad de corto plazo en dichos revestimientos. Otro enfoque para conseguir una funcionalización controlable y fácil de una superficie superhidrófoba es introducir grupos funcionales reactivos en el revestimiento superhidrófobo. Sin embargo, la presencia de grupos funcionales reactivos conduce con frecuencia al aumento de la energía superficial, lo que da como resultado la pérdida de superhidrofobicidad.

Principalmente, además de cumplir con varios requisitos, tales como tener una transparencia suficiente y una topografía plana, otro criterio importante para las micromatrices y los conjuntos celulares, respectivamente, es que la densidad de puntos debe ser lo suficientemente elevada. Sin embargo, al aumentar la densidad de puntos para proporcionar, por ejemplo, una matriz celular de un genoma en un chip, siguen existiendo todavía varios desafíos. En primer lugar, al aumentar la densidad de puntos y, por tanto, al disminuir la distancia entre los puntos, la contaminación cruzada se convierte en un problema grave. En segundo lugar, el agrupamiento de alta densidad de los puntos requiere una geometría no circular (por ejemplo, cuadrada) de los puntos, lo que establece restricciones adicionales sobre la capacidad para controlar la química superficial. El tamaño del punto depende, entre otras cosas, de la tensión superficial de las soluciones de puntos que pueden diferir de una sonda de cóctel molecular a otra. Esto puede conducir a la variación del tamaño del punto y, por tanto, limita la distancia mínima entre los puntos. Otro problema grave, que surge de la gran proximidad de los puntos en una matriz celular de alta densidad, es la migración de células transfectadas entre puntos adyacentes que causa crecientes errores sistemáticos con una menor distancia entre un punto y otro punto. Desarrollar un método universal que sea fácil, versátil, y que proporcione buenas propiedades superficiales ópticas y químicas sigue siendo un gran desafío.

Por tanto, el problema que subyace en la invención presente es proporcionar un método con el que las superficies superhidrófobas pueden ser modificadas y/o producidas fácilmente, al tiempo que se superan los inconvenientes mencionados anteriormente de las técnicas conocidas de este campo. En particular, el problema subyacente de la invención presente es proporcionar superficies superhidrófobas reactivas que pueden ser modificadas fácilmente para producir superficies superhidrófobas que tienen pautas de funcionalidades químicas o propiedades físicas diferentes tales como micropautas superhidrófilas-superhidrófobas, que pueden ser usadas por un lado como revestimientos específicos y, por otro lado, en aplicaciones químicas, biológicas y de diagnóstico, por ejemplo, en micromatrices de gotas, micromatrices de hidrogel, micromatrices de productos químicos o micromatrices celulares, así como un proceso de fabricación respectivo de las superficies.

Además, el revestimiento superficial superhidrófobo reactivo debe ser mecánicamente estable, opcionalmente biocompatible, y no debe degradarse dentro de un lapso de tiempo razonable, a la vez que es producido de manera eficiente, particularmente en poco tiempo y que permite controlar con precisión el tamaño y la densidad de la pauta. Además, en el caso de una micropauta para, por ejemplo, micromatrices de gotas, micromatrices de hidrogel, micromatrices de productos químicos o micromatrices celulares, el revestimiento de la superficie superhidrófoba modificada debe exhibir propiedades mejoradas, tales como ser capaz de evitar la contaminación cruzada entre puntos adyacentes y ser capaz de eliminar, por ejemplo, una migración celular entre puntos adyacentes, a la vez que permite una alta calidad de datos y de investigación con técnicas de cribado comunes.

La solución al problema técnico anterior se consigue mediante las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones. En particular, la invención presente proporciona un método para modificar una superficie de un sustrato poroso o una superficie de un sustrato con una rugosidad superficial específica creada en un paso de funcionalización para formar una superficie superhidrófoba al menos en partes del sustrato, que comprende un paso de funcionalización para funcionalizar al menos la superficie del sustrato uniendo covalentemente un compuesto que contiene un grupo alquino o alqueno para formar un sustrato poroso funcionalizado con alquino o con alqueno, en donde el compuesto que contiene un grupo alquino o alqueno representa una fracción monomérica, un primer paso de la modificación para modificar la superficie funcionalizada con alquino o con alqueno haciendo reaccionar los grupos alquino o alqueno con al menos un primer compuesto, seleccionado del grupo que consiste en tioles y disulfuros, en donde el primer paso de la modificación es llevado a cabo al menos en partes de la superficie del sustrato y con radiación UV, un segundo paso de la modificación de zonas no modificadas de la superficie funcionalizada con alquino o con alqueno haciendo reaccionar grupos alquino o alqueno sin reaccionar con al menos un segundo compuesto, seleccionado del grupo que consiste en tioles y disulfuros, en donde el segundo paso de la modificación es llevado a cabo con radiación UV en partes de la superficie del sustrato no modificadas en el primer paso de la modificación, en donde las zonas superhidrófobas en la superficie son formadas en el paso de funcionalización y/o en el primer paso de la modificación o en el segundo paso de la modificación, en donde:

- el primer paso de la modificación para modificar la superficie funcionalizada con alquino o con alqueno es llevado a cabo haciendo reaccionar los grupos alquino o alqueno con el primer compuesto representado por las fórmulas generales R^1-SH o $R^1-S-S-R_x$ usando una fotomáscara, creando así una pauta de zonas superhidrófilas en la superficie, y

el segundo paso de la modificación para modificar las zonas no modificadas de la superficie funcionalizada con alquino o con alqueno es llevado a cabo haciendo reaccionar los grupos alquino o alqueno sin reaccionar con el segundo compuesto representado por las fórmulas generales R^2-SH o $R^2-S-S-R_x$, creando así zonas superhidrófobas en la superficie, o

- el primer paso de la modificación para modificar la superficie funcionalizada con alquino o con alqueno es llevado a cabo haciendo reaccionar los grupos alquino o alqueno con el primer compuesto representado por las fórmulas generales R^1-SH o $R^1-S-S-R_x$ usando una fotomáscara, creando así una pauta de zonas superhidrófobas en la superficie, y

el segundo paso de la modificación para modificar de las zonas no modificadas de alquino o de alqueno es llevado a cabo haciendo reaccionar los grupos alquino o alqueno sin reaccionar con el segundo compuesto representado por las fórmulas generales R^2-SH o $R^2-S-S-R_x$, creando así zonas superhidrófilas en la superficie,

en donde R^1 , R^2 y R_x representan residuos hidrófilos o hidrófobos, en donde los residuos hidrófilos representados por R^1 y R^2 son al menos un miembro representado por la fórmula general Q-X, en donde Q representa un grupo alquilo C_1-C_6 sustituido o no sustituido, que puede contener uno o más heteroátomos seleccionados entre O, N, P y S, y X representa un grupo (poli)hidroxilo, un grupo (poli)amina, un grupo (poli)amida, un grupo (poli)carboxilo o una fracción de azúcar, y en donde las fracciones hidrófobos representados por R^1 y R^2 son al menos un miembro de un grupo alquilo C_6-C_{30} ramificado o cíclico, lineal, polifluorado o no fluorado, sustituido o no sustituido; un grupo alqueno C_6-C_{30} ramificado o cíclico, lineal, polifluorado o no fluorado, sustituido o no sustituido; un grupo arilo C_6-C_{30} polifluorado o no fluorado, sustituido o no sustituido, en donde el ángulo de contacto con el agua estático (WCA) (Θ_{st}) de las zonas superhidrófobas en la superficie es 150° o más, y la histéresis del ángulo de contacto es 10° o menos; y el WCA estático (Θ_{st}) de las zonas superhidrófilas en la superficie es 10° o menos.

Según la invención presente, la superficie del sustrato funcionalizado con grupos alquino o alqueno puede ser modificada fácilmente con radiación UV basada en reacciones de tiol-eno o tiol fotoinducidas, o reacciones de disulfuro-eno o disulfuro-eno, respectivamente, que a continuación, se denominan simplemente "reacción(es) click fotoinducida(s)". Dicho tipo de reacción es conocido también como química "click"^[14], que hasta ahora ha sido usada, por ejemplo, para modificar cepillos de polímero que contienen alquino o alqueno^[15], y para inmovilizar nanopartículas de oro específicamente en un sitio de una superficie de polímero^[16]. En el artículo mencionado anteriormente que se refiere a la modificación de cepillos de polímero que contienen alquino o alqueno (R.M. Hensarling, V.A. Doughty, J. W. Chan, D.L. Patton, J. Am. Chem. Soc. 2009, 131, 14673), se describe que la hidrofobicidad puede ser manipulada modificando los cepillos de polímero unidos a la superficie de los sustratos de silicio. Dichos cepillos de polímero actúan como "mangos" reactivos compuestos de poli(metacrilato de propargilo) y presentan una pluralidad de grupos funcionales que aumentan significativamente la densidad de dichos grupos funcionales en la superficie. Mediante el uso de dicho enfoque de modificación de cepillos de polímero, se ha informado de que se pueden obtener superficies hidrófobas o hidrófilas.

Según la invención presente, sin embargo, el paso de funcionalización para funcionalizar al menos la superficie del sustrato uniendo covalentemente un compuesto que contiene un grupo alquino o alqueno excluye la formación de cepillos de polímero. Esto significa, según la invención presente, que el paso de funcionalización para funcionalizar al menos la superficie del sustrato uniendo covalentemente un compuesto que contiene un grupo alquino o alqueno excluye la polimerización de la fracción unida a la superficie del sustrato. El "compuesto que contiene grupos alquino o alqueno" no se refiere a cepillos poliméricos ni a ningún precursor a ser polimerizado, para proporcionar un cepillo de polímero, sino que representa una fracción monomérica. Por tanto, según la invención presente, la reacción click del paso de modificación tiene lugar directamente sobre la superficie del sustrato sin emplear "mangos" reactivos que tienen cada uno de ellos una pluralidad de grupos funcionales. Sorprendentemente, a pesar de la ausencia de una pluralidad de grupos funcionales alquinos o alquenos, es posible producir una superficie superhidrófoba con la forma de un revestimiento sobre un sustrato.

Por consiguiente, la invención presente proporciona un método sencillo y fácil de modificar, así como de producir una superficie superhidrófoba con la forma de un revestimiento sobre un sustrato. En particular, la invención presente proporciona superficies superhidrófobas reactivas y, por tanto, fáciles de pautar, que son de preferencia transparentes. Según la invención presente, se pueden introducir fácilmente diferentes funcionalidades en la superficie superhidrófoba reactiva usando la química click mencionada anteriormente, por lo que se puede obtener una pauta deseada de diferentes moléculas, tales como fluoróforos, lubricantes, biomoléculas, tales como péptidos y polímeros. Además, dependiendo de la naturaleza de los compuestos usados en el paso de modificación, es posible proporcionar una pauta superhidrófila-superhidrófoba en la superficie.

Según la invención presente, la expresión "superhidrófobo" se entiende en términos de que el WCA estático (Θ_{st}) de la superficie es 150° o superior, y el CAH del mismo es 10° o menos. La expresión "superhidrófilo" se entiende en

términos de que el WCA de la superficie es 10° o menos. En una realización preferida de la invención presente, las zonas superhidrófobas de la superficie modificada tienen un WCA de 160° o más, más preferentemente de 165° o más, y lo más preferentemente de 168° o más, expresado en términos del WCA estático (Θ_{st}). Además, según una realización preferida de la invención presente, las zonas superhidrófilas de una superficie pautada tienen un WCA de 8° o menos, más preferentemente de 6° o menos, y lo más preferentemente de 5° o menos, expresado en términos del WCA estático (Θ_{st}).

El WCA estático (Θ_{st}) tal según se usa dentro del alcance de la invención presente se mide haciendo mediciones de gota sésiles, en las que se deposita una gota sobre la superficie y el valor se obtiene usando un goniómetro de ángulo de contacto que emplea una cámara de alta resolución (una cámara digital UK 1115 de EHD imaging (Alemania)) y software (Image J) para capturar y analizar el ángulo de contacto. La histéresis del ángulo de contacto (CAH) se obtiene por la diferencia entre Θ_{adv} y Θ_{rec} .

La superhidrofobicidad de la superficie modificada de la invención presente es el resultado de la combinación de la porosidad del sustrato o de la alta rugosidad superficial del sustrato con residuos hidrófobos incorporados en el paso de funcionalización y/o en el paso de modificación. Según la invención presente, las zonas superhidrófobas de la superficie pueden ser formadas en el paso de funcionalización y/o en el primer paso de modificación. Esto significa que, en el método según la invención presente, se puede generar una superficie superhidrófoba en el paso de funcionalización, que puede ser modificada aún más en el primer paso de la modificación posterior usando la reacción click fotoinducida. Además, según la invención presente, la superficie superhidrófoba puede ser generada también en el primer paso de la modificación. En tal caso, las zonas superficiales del sustrato que han experimentado el paso de funcionalización, por lo que un compuesto que contiene un grupo alquino o alqueno está covalentemente unido a la superficie, no tienen necesariamente que exhibir propiedades superhidrófobas.

Según se ha mencionado anteriormente, la superficie modificada, que también puede ser denominada "revestimiento superficial modificado", obtenida por el método según la invención presente tiene de preferencia una alta transparencia al menos en las zonas superhidrófobas. En particular, según la invención presente, el revestimiento superficial modificado tiene de preferencia una transmitancia del 70% o más, más preferentemente del 80% o más, y lo más preferentemente del 85% o más dentro de un intervalo de longitud de onda de 300 nm a 1000 nm.

El sustrato no está específicamente limitado e incluye sustratos bidimensionales así como sustratos tridimensionales que pueden ser funcionalizados ya que un grupo alquino o alqueno que contiene el compuesto puede estar covalentemente unido a ellos. A este respecto, en la invención presente, la unión covalente del compuesto que contiene grupos alquino o alqueno al sustrato debe entenderse que los grupos alquino y alqueno están todavía presentes después del paso de funcionalización, es decir, la unión del compuesto que contiene al grupo alquino o alqueno al sustrato no ocurre por medio del doble enlace carbono-carbono ($C=C$) y del triple enlace carbono-carbono ($C\equiv C$), respectivamente.

El sustrato puede estar hecho de cualquier material orgánico o inorgánico, que incluye capas porosas o películas hechas de un material polimérico, material de cristal, material metálico y similares (con exclusión de los cepillos poliméricos). En particular, el material poroso puede ser una capa de polímero microporosa o nanoporosa, que puede ser proporcionada sobre un material de base adecuado, tal como una placa de cristal que soporta la capa de polímero. Además, el sustrato puede estar compuesto de papel, microfibras de cristal y gel de sílice. Además, el sustrato está hecho de preferencia de cualquier material, tal como polímeros o cristal, cuya superficie puede ser activada con un plasma de oxígeno (O_2).

Por consiguiente, la superficie del sustrato a ser modificada puede ser porosa por sí misma, o se puede crear una rugosidad superficial específica en el sustrato en el paso de funcionalización, tal como la formación de nanofilamentos. En cualquier caso, a continuación, ambas alternativas se denominan simplemente "sustrato poroso funcionalizado con alquino o con alqueno".

Según se ha mencionado anteriormente, los métodos convencionales para preparar, por ejemplo, las micropautas superhidrófilas-superhidrófobas consumen mucho tiempo y, por ejemplo, en la patente europea EP 2 481 794 A1, se proponen 30 minutos para el tiempo de radiación requerido en el paso de fotoinducción. En general, los tiempos de radiación UV largos pueden conducir a la oxidación y degradación del sustrato así como causar daño a las biomoléculas usadas para la funcionalización. La mayoría de las técnicas existentes basadas en la radiación UV para la formación de pautas superhidrófobas-superhidrófilas requieren tiempos de radiación que van desde varios minutos hasta varias horas, lo que limita las posibles aplicaciones de tales métodos.^[7,12]

Según la invención presente, la modificación de la superficie del sustrato poroso funcionalizado con alquino o con alqueno usando la reacción click fotoinducida se consigue en muy poco tiempo. De preferencia, según la invención presente, la modificación usando radiación UV dura de preferencia de 0,25 s a 30 min, más preferentemente de 15 min, 5 min, 2 min o 1 min o menos, e incluso más preferentemente 40 s o menos en el primer paso de la modificación. En particular, en una realización preferida, la radiación UV es llevada a cabo durante 0,25 a 25 s, más preferentemente de 0,5 a 20 s. Un tiempo de radiación de 1 a 15 s es particularmente preferido. Los tiempos de

radiación antes mencionados se aplican a cada paso de la modificación para modificar la superficie del sustrato poroso funcionalizado con alquino o con alqueno.

5 Según una realización preferida de la invención presente, las zonas superhidrófobas de la superficie son formadas al menos en el paso de funcionalización usando un compuesto que contiene un grupo alqueno. Aquí, el al menos un primer compuesto, seleccionado del grupo que consiste en tioles y disulfuros (a continuación denominados simplemente "compuestos foto clickables"), usado en el primer paso de la modificación contiene al menos una fracción funcional diferente del compuesto que contiene el grupo alqueno, creando así una pauta de zonas superhidrófobas en la superficie. Para el primer paso de la modificación, se usa una fotomáscara para controlar con
10 precisión la pauta a ser generada. Según dicha realización, es posible usar compuestos foto clickables que tienen cualquier fracción funcional deseada fijada, tales como fluoróforos, biomoléculas, tales como péptidos y polímeros. Además, según la invención presente, además de usar una fotomáscara, es posible crear pautas de alta resolución, de preferencia nanopautas, en la superficie superhidrófoba fotoclickable mediante escritura directa usando, por ejemplo, detección capilar o Dip-Pen Nanolithography (DPN) que permite la deposición directa de materiales en el
15 sustrato a una nanoescala de una manera flexible. Basándose en esto, se puede conseguir una resolución del pautado que llega hasta una escala submicro en la superficie superhidrófoba.

Según la invención presente, se prefiere usar particularmente un compuesto que contiene silicio que tenga al menos un grupo vinilo como el compuesto que contiene un grupo alqueno en el paso de funcionalización. Según la
20 invención presente, cuando se usa un compuesto que contiene silicio que tiene al menos un grupo vinilo, tal como triclorovinil silano, es posible proporcionar una superficie superhidrófoba transparente sobre el sustrato, tal como se ilustra esquemáticamente en la Figura 1. La modificación de la superficie transparente con los compuestos fotoclickables puede ser conseguida fácilmente de esta manera.

Según la invención presente, el método para modificar la superficie del sustrato comprende además un segundo paso de la modificación para modificar zonas no modificadas de la superficie funcionalizada con alquino o con alqueno haciendo reaccionar grupos alquino o alqueno sin reaccionar con al menos un segundo compuesto, seleccionado del grupo que consiste en tioles y disulfuros, en donde el segundo paso de la modificación es llevado a cabo con radiación UV sobre partes de la superficie del sustrato no modificadas en el primer paso de la modificación.
25 Por tanto, el método según la invención presente comprende un primer paso de modificación y un segundo paso de modificación, en donde el primer paso de modificación es llevado a cabo usando una fotomáscara. Basado en esto, es posible modificar fácilmente (funcionalizar posteriormente) superficies superhidrófobas para proporcionar una superficie pautada.

En particular, según la invención presente, el primer paso de la modificación para modificar la superficie funcionalizada con alquino o con alqueno es llevado a cabo haciendo reaccionar los grupos alquino o alqueno con el primer compuesto representado por las fórmulas generales R^1-SH o $R^1-S-S-R_x$ usando una fotomáscara, creando así una pauta de zonas superhidrófilas en la superficie, y el segundo paso de la modificación para modificar las zonas no modificadas de la superficie funcionalizada con alquino o con alqueno es llevado a cabo haciendo reaccionar los grupos alquino o alqueno sin reaccionar con el segundo compuesto representado por las fórmulas generales R^2-SH o $R^2-S-S-R_x$, creando así zonas superhidrófobas en la superficie, en donde R^1 , R^2 y R_x representan residuos hidrófilos o hidrófobos.
30

Alternativamente, el primer paso de la modificación para modificar la superficie funcionalizada con alquino o con alqueno puede ser realizado haciendo reaccionar los grupos alquino o alqueno con el primer compuesto representado por las fórmulas generales R^1-SH o $R^1-S-S-R_x$ usando una fotomáscara, creando así una pauta de zonas superhidrófobas en la superficie, y el segundo paso de la modificación para modificar las zonas no modificadas de la superficie funcionalizada con alquino o con alqueno es llevado a cabo haciendo reaccionar los grupos alquino o alqueno sin reaccionar con el segundo compuesto representado por las fórmulas generales R^2-SH o $R^2-S-S-R_x$, creando así zonas superhidrófilas en la superficie, en donde R^1 , R^2 y R_x representan residuos hidrófilos o hidrófobos. Según esto, es posible producir superficies superhidrófilas-superhidrófobas que tienen una pauta específica.
40

Por tanto, según la invención presente, la superficie del sustrato poroso funcionalizado con alquino o con alqueno que tiene grupos alquino o alqueno terminales o no terminales puede ser fácilmente transformada en una superficie superhidrófoba o superhidrófila con radiación UV basándose en reacciones click fotoinducidas. En particular, se pueden formar pautas superhidrófobas-superhidrófilas, tales como micropautas, por ejemplo mediante la reacción de grupos alquino o alqueno terminales o no terminales contenidos en el sustrato, que es, por ejemplo, una capa de polímero poroso, con compuestos de tiol representados por las fórmulas generales R^1-SH y R^2-SH usando radiación UV, tal según se muestra esquemáticamente en la Figura 2 para grupos alquino terminales.
50

Según la invención presente, la superficie del sustrato poroso funcionalizado con alquino o con alqueno es modificada en un primer paso de la modificación haciendo reaccionar los grupos alquino o alqueno terminales o no terminales contenidos en el sustrato poroso con un primer compuesto fotoclickable R^1-SH o $R^1-S-S-R_x$ usando radiación UV a través de una fotomáscara, sobre la que se crea una pauta de zonas superhidrófilas o superhidrófobas en la superficie del sustrato poroso. A continuación, en un segundo paso, los grupos terminales o
60

no terminales alquino o alqueno sin reaccionar de las zonas no modificadas de la superficie del sustrato poroso alquino o alqueno funcionalizadas son hechos reaccionar con un segundo compuesto fotoclickable R^2 -SH o R^2 -S-S- R_x diferente del primer compuesto fotoclickable que usa radiación UV (a continuación denominado también "segundo paso de la modificación"). Basándose en esto, mediante el segundo paso de la modificación, se crea una pauta de zonas superhidrófilas y superhidrófobas en la superficie del sustrato poroso ya que el segundo compuesto fotoclickable proporciona una modificación superficial inversa en comparación con el primer compuesto fotoclickable.

Esto significa, según la invención presente, que la superficie del sustrato poroso funcionalizado con alquino o con alqueno es modificada con dos pasos secuenciales lo que permite que una pauta inversa de zonas superhidrófilas y superhidrófobas puede ser obtenida cambiando simplemente el orden de los compuestos fotoclickables. En particular, en el primer paso de la modificación, es posible modificar la superficie del sustrato poroso funcionalizado con alquino o con alqueno haciendo reaccionar los grupos alquino o alqueno terminales preferibles presentes en la superficie con un primer compuesto fotoclickable que tiene un residuo hidrófilo R^1 usando radiación UV a través de una fotomáscara, creando así una pauta de zonas superhidrófilas. A continuación, en el segundo paso de la modificación, los grupos alquino o alqueno terminales sin reaccionar preferidos en las zonas no modificadas de la superficie del sustrato poroso funcionalizado con alquino o con alqueno, que han sido protegidos por la fotomáscara durante el primer paso de la modificación, pueden reaccionar con un segundo compuesto fotoclickable que tiene un residuo hidrófobo R^2 usando radiación UV, creando de esta manera zonas superhidrófobas en las zonas de la superficie del polímero poroso que no han sido modificadas en el primer paso de la modificación.

Según se ha mencionado anteriormente, alternativamente, en el primer paso de la modificación, es posible modificar la superficie del sustrato poroso funcionalizado con alquino o con alqueno haciendo reaccionar los grupos alquino o alqueno terminales preferibles presentes en la superficie con un primer compuesto fotoclickable que tiene un residuo hidrófobo R^1 usando radiación UV a través de una fotomáscara, creando así una pauta de zonas superhidrófobas. A continuación, en el segundo paso de la modificación, los grupos alquino o alqueno terminales sin reaccionar preferibles de las zonas no modificadas de la superficie del sustrato poroso funcionalizado con alquino o con alqueno, que han sido protegidos por la fotomáscara durante el primer paso de la modificación, pueden ser hechos reaccionar con un segundo compuesto fotoclickable que tiene un residuo hidrófilo R^2 que usa radiación UV, creando de esta manera zonas superhidrófilas en las zonas de la superficie del polímero poroso que no han sido modificadas en el primer paso de la modificación. El uso de métodos fotoquímicos permite controlar con precisión la geometría, el tamaño y la distancia entre las zonas superhidrófilas y superhidrófobas mediante el diseño de la fotomáscara.

Una ventaja del uso de la superficie reactiva de alquino o de alqueno para pautar es que las zonas no radiadas permanecen reactivas después del primer paso de creación de pautas y pueden ser modificadas posteriormente para crear pautas de una funcionalidad secundaria. De manera importante, el segundo paso de la modificación no requiere una fotomáscara ya que se mantiene y genera una pauta reactiva de alquino o de alqueno, respectivamente, durante el primer paso de la modificación de la radiación a través de la fotomáscara.

En las fórmulas mencionadas anteriormente de compuestos fotoclickables que son disulfuros, es decir, R^1 -S-S- R_x y R^2 -S-S- R_x , la fracción R_x no está específicamente limitada con tal de que se pueda obtener la modificación superficial deseada. Por tanto, R_x es de preferencia una fracción similar a R^1 y R^2 , respectivamente, lo que significa que R_x es una fracción hidrófila si R^1 o R^2 es hidrófila, o R_x es una fracción hidrófoba si R^1 o R^2 es hidrófoba. En consecuencia, R_x puede ser igual o diferente a los residuos R^1 y R^2 .

Según la invención presente, las condiciones para llevar a cabo las reacciones click fotoinducidas para modificar la propiedad superficial no están específicamente limitadas y se puede aplicar cualquier condición conocida en la técnica. Por ejemplo, como procedimiento general, la superficie del sustrato poroso funcionalizado con alquino o con alqueno es puesta en contacto con el compuesto fotoclickable respectivo y es irradiada con una radiación UV adecuada para unir covalentemente la fracción -S- R^1 y -S- R^2 , respectivamente, del compuesto de tiol y del compuesto de disulfuro al enlace triple o doble carbono-carbono. Poner en contacto los compuestos respectivos con la superficie del sustrato poroso funcionalizado con alquino o con alqueno puede ser llevado a cabo, por ejemplo, humedeciendo dicho sustrato poroso con una solución que contiene los compuestos fotoclickables.

Las fuentes de radiación UV adecuadas son bien conocidas en la técnica, y como ejemplo no limitador se puede mencionar la radiación con luz UV de 200 a 400 nm con intensidades que varían de 0,5 a 16 $mW \bullet cm^{-2}$. Según la invención presente, las reacciones click fotoinducidas pueden ser llevadas a cabo también usando luz solar, es decir, no es necesario que se emplee una fuente de radiación UV específica.

La temperatura de reacción de las reacciones click fotoinducidas no está específicamente limitada. De preferencia, las reacciones click fotoinducidas se realizan a una temperatura entre 0 y 60° C, más preferentemente entre 15 y 35° C, y lo más preferentemente a temperatura ambiente (temperatura de la sala)

Según la invención presente, el tiempo de radiación para la modificación superficial del sustrato poroso funcionalizado con alquino o con alqueno usando las reacciones click fotoinducidas es de preferencia de 0,25 s a 30 min, más preferentemente de 15 min, 5 min, 2 min o 1 min o menos, e incluso más preferentemente 40 segundos o menos para cada paso de la modificación. En particular, en una realización preferida, la radiación UV es llevada a

cabo durante 0,25 a 25 s, más preferentemente 0,5 a 20 s, para cada paso de modificación para la modificación de la superficie de la capa de polímero poroso funcionalizado con alquino o con alqueno. Se prefiere particularmente un tiempo de radiación de 1 a 15 s.

5 Según la invención presente, el paso de modificación de la superficie del sustrato poroso funcionalizado con alquino o con alqueno puede ser realizado en presencia de un fotoiniciador. Se pueden usar diversos fotoiniciadores (iniciadores UV) conocidos en la técnica. Los ejemplos no limitadores de fotoiniciadores que pueden ser usados incluyen benzofenona, dimetoxiacetofenona, xantona, tioxantona, canforquinona, sus derivados y mezclas de ellos. Un fotoiniciador particularmente preferido es la 2,2-dimetoxi-2-fenilacetofenona (DMPAP). El fotoiniciador específico
10 seleccionado y su concentración pueden ser elegidos por una persona experta en la técnica. En general, la concentración del fotoiniciador debe ser del 0,2 al 10% en peso basada en el peso total de la solución que contiene los compuestos foto clickables.

15 De preferencia, el paso de modificar la superficie del sustrato poroso funcionalizado con alquino o con alqueno puede ser realizado también sin el uso de un fotoiniciador. En tal caso, el tiempo de radiación es de preferencia de 5 a 20 segundos o más, tal como 30 segundos, 60 segundos, 120 segundos o 300 segundos.

20 Según la invención presente, los compuestos de tiol usados para modificar la superficie del sustrato poroso funcionalizado con alquino o con alqueno están representados por las fórmulas generales R^1 -SH y R^2 -SH, respectivamente, en donde R^1 y R^2 representan residuos hidrófilos o hidrófobos. Se aplican consideraciones similares para los compuestos de disulfuro. Los residuos hidrófilos representados por R^1 y R^2 son al menos un miembro representado por la fórmula general Q-X, en donde Q representa un grupo alquilo C_1 - C_6 sustituido o no sustituido y X representa un grupo (poli)hidroxilo, un grupo (poli)amina, un grupo (poli)amida o un grupo (poli)carboxilo o una fracción de azúcar. Los sustituyentes del grupo alquilo C_1 - C_6 no están específicamente
25 limitados siempre que no se modifique el carácter hidrófilo del residuo, incluyendo, por ejemplo, átomos de halógeno tales como flúor, cloro y yodo.

30 Q incluye de preferencia al menos un miembro seleccionado del grupo que consiste en un grupo alquilo C_1 - C_6 , de preferencia un grupo alquilo C_1 - C_4 , que puede contener uno o más heteroátomos seleccionados entre O, N, P y S. Compuestos de tiol particularmente preferidos que tienen un residuo hidrófilo son cisteamina, ácido 3-mercaptopropiónico y 2-mercaptoetanol.

35 Además, las fracciones hidrófobas representadas por R^1 y R^2 son al menos un miembro de un grupo alquilo C_6 - C_{30} ramificado o cíclico, lineal, polifluorado o no fluorado, sustituido o no sustituido; un grupo alqueno C_6 - C_{30} ramificado o cíclico, lineal, polifluorado o no fluorado, sustituido o no sustituido; un grupo arilo C_6 - C_{30} polifluorado o no fluorado, sustituido o no sustituido. De preferencia, las fracciones hidrófobas representadas por R^1 y R^2 son seleccionadas de un grupo alquilo C_8 - C_{16} tal como, polifluorado o no fluorado, sustituido o no sustituido, que puede contener uno o más heteroátomos como se ha mencionado anteriormente. Los sustituyentes mencionados anteriormente no están específicamente limitados siempre que no se modifique el carácter hidrófobo del residuo. Como ejemplos no
40 limitadores, dichos sustituyentes son seleccionados del grupo que consiste en átomos de halógeno tales como flúor, cloro y yodo. Compuestos de tiol particularmente preferidos que tienen un residuo hidrófobo son alquilos C_8 - C_{16} polifluorados. Los compuestos de tiol más preferidos son 1H,1H,2H,2H-perfluorodecanotiol y 1-dodecanotiol polifluorado. Los disulfuros más preferidos son disulfuro de dibutilo y disulfuro de didodecilo polifluorado.

45 La modificación de la superficie del sustrato poroso funcionalizado con alquino o con alqueno mediante el uso de las reacciones click fotoinducidas puede ser realizada con diversos disolventes, incluida el agua, que permiten pautar las biomoléculas. La capacidad de realizar la funcionalización de la superficie con disolventes diferentes, tanto polares como no polares, incluida el agua, aumenta el número de reactivos aplicables a la funcionalización.

50 Según una realización preferida, el disolvente usado para las reacciones click fotoinducidas comprende agua. El agua es especialmente interesante desde el punto de vista de su impacto ambiental, bajo costo y la compatibilidad con biomoléculas que contienen tiol, tales como proteínas o péptidos. Una realización particularmente preferida de la invención presente es usar agua o una mezcla de agua y un disolvente polar, de preferencia disolvente prótico polar, como disolvente para el paso de modificación con el que la superficie del sustrato poroso funcionalizado con alquino o alqueno es modificada dando lugar a una superficie superhidrófila.
55

60 Por otra parte, en el paso de la modificación en donde se modifica la superficie del sustrato poroso funcionalizada con alquino o con alqueno en una superficie superhidrófoba, se usa preferentemente un disolvente no polar y/o polar que incluye agua en donde se puede disolver el respectivo compuesto fotoclickable. Como ejemplos no limitadores, además de agua, alcoholes tales como alcoholes que contienen de uno a seis átomos de carbono, éteres, alcanos o cetonas, y en particular, se pueden mencionar metanol, etanol, acetona, acetato de etilo, pentano, diclorometano (DCM), dimetilformamida (DMF), dimetilsulfóxido (DMSO), acetonitrilo o mezclas de éstos.

65 Según se ha mencionado anteriormente, una ventaja del método según la invención presente es que las zonas no radiadas permanecen reactivas después del primer paso de la modificación y pueden ser modificadas posteriormente para crear pautas de una funcionalidad secundaria, según esto, el segundo paso de la modificación

no requiere necesariamente una fotomáscara. Según la invención presente, incluso cuando en el segundo paso de la modificación no se usa una fotomáscara, los WCA de las zonas superhidrófobas o superhidrófilas creados en el primer paso de la modificación no cambian significativamente después del segundo paso de la modificación.

5 Según una realización preferida, por ejemplo en el caso de que las zonas superhidrófobas son tratadas sobre la superficie en el primer paso de la modificación, en el segundo paso de la modificación, el compuesto fotoclickable que tiene un residuo hidrófilo R^2 es disuelto en un disolvente que tiene un ángulo de contacto (Θ_{st}) en las zonas no modificadas de los grupos alquino o alqueno residuales de 30° o menos, de preferencia, 20° o menos, y más preferentemente menos de 10° e incluso más preferentemente de cerca de 0° , mientras que tienen un alto ángulo de contacto (Θ_{st}) de al menos 90° , de preferencia al menos 110° , más preferentemente al menos 120° , y lo más preferentemente al menos 130° , en las zonas modificadas.

15 Según la invención presente, el sustrato puede ser una capa de polímero poroso que no está específicamente limitada con tal de que la capa de polímero sea porosa o rugosa, respectivamente, de preferencia de microporosa a nanoporosa (con diámetros de poros y glóbulos dentro del intervalo de 20 a 2000 nm), y contiene grupos alquino o alqueno terminales o no terminales después del paso de funcionalización, mientras que se excluyen los cepillos de polímero. La capa de polímero poroso funcionalizado con alquino o con alqueno puede ser preparada a partir de cualquier estructura polimérica reticulada porosa que tenga grupos funcionales que permitan la introducción de grupos alquino o alqueno terminales o no terminales. En particular, como grupos funcionales no limitadores adecuados, se pueden mencionar las fracciones hidroxilo presentes en la estructura polimérica porosa que pueden hacerse reaccionar, por ejemplo, en una esterificación, eterificación o tioeterificación, sililación, alquilación, amidación o reacción de acilación, con el objeto de incorporar grupos alquino o alqueno terminales o no terminales en la estructura polimérica porosa. Estas reacciones pueden ser usadas de manera similar con cualquier otro material que constituya el sustrato poroso.

25 En tal caso, por ejemplo, es posible usar cualquier ácido o un derivado adecuado de ellos que tenga un grupo alquino o alqueno terminal o no terminal como agente de reacción. Por ejemplo, la esterificación puede ser llevada a cabo entre los grupos hidroxilo de la estructura polimérica porosa y un agente de reacción adecuado, tal como ácidos, cloruros de ácido o anhídridos de ácido. Las condiciones de reacción para estas reacciones son bien conocidas para las personas expertas en la técnica y pueden ajustarse a los componentes respectivos usados. Los agentes reaccionantes preferidos a ser usados para incorporar el grupo alquino o alqueno terminal o no terminal en la estructura polimérica porosa son seleccionados del grupo que consiste en ácidos que tienen un grupo alquino o alqueno terminal o no terminal tal como ácido propiónico, ácido 3-butírico, ácido 4-pentanoico, ácido 5-hexanoico, ácido 6-heptanoico, ácido 7-octanoico, ácido 8-nonanoico, ácido 9-decanoico, ácido 10-undecanoico, ácido 3-butenoico, ácido 4-pentenoico, ácido 5-hexenoico, y derivados respectivos de éstos.

35 Además, los agentes de reacción usados para incorporar el grupo alquino o alqueno terminal o no terminal al sustrato poroso son seleccionados de preferencia del grupo que consiste en silanos que tienen un grupo alquino o alqueno terminal o no terminal tal como cloro (dimetil)vinilsilano, diclorometilvinilsilano o triclorovinilsilano.

40 Dependiendo de los agentes de reacción seleccionados, una persona experta en la técnica puede seleccionar condiciones de reacción adecuadas, tales como temperatura y tiempo de reacción, catalizadores y opcionalmente reactivos de acoplamiento, para las respectivas reacciones de acoplamiento. En este contexto, debe observarse que dentro del alcance de la invención presente, la modificación que incorpora grupos alquino o alqueno terminales o no terminales al sustrato poroso, tal como la estructura polimérica, debe proceder completamente a través del espesor del material poroso específico

45 Además, Según se ha mencionado anteriormente, la estructura polimérica porosa que tiene grupos funcionales que permiten la introducción de grupos alquino o alqueno terminales o no terminales no está específicamente limitada, y puede ser cualquier estructura de material polimérico natural que tenga grupos funcionales que permitan la introducción de grupos alquino o alqueno terminales o no terminales (por ejemplo, grupos hidroxilo), tales como materiales basados en polisacáridos que incluyen, por ejemplo, celulosa, hemicelulosa y almidón, u obtenidos por polimerización.

55 Por ejemplo, la estructura polimérica porosa que tiene grupos funcionales que permiten la introducción de grupos alquinos o alquenos terminales o no terminales que muestran propiedades ya sea hidrófobas o hidrófilas pueden comprender un monómero polivinílico reticulado, en donde el monómero polivinílico es uno o más monómeros seleccionados del grupo que consiste en diacrilatos de alqueno, diacrilatos o dimetacrilatos de oligoetileno, dimetacrilatos de alqueno, tetraacrilato de pentaeritritol, tetrametacrilato de pentaeritritol, triacrilato de trimetilolpropano, trimetacrilato de trimetilolpropano, diacrilato de pentaeritritol, triacrilato de pentaeritritol, dimetacrilato de pentaeritritol, trimetacrilato de pentaeritritol, diacrilamidas de alqueno, dimetacrilamidas de alqueno, diacrilatos de hidroxialqueno, dimetacrilatos de hidroxialqueno, en donde el grupo alqueno consiste de 1 a 4 átomos de carbono, diacrilatos de oligoetileno glicol, ésteres vinílicos de ácidos policarboxílicos, divinilbenceno sustituido, y divinilnaftaleno sustituido. En una realización particularmente preferida, el monómero de polivinilo es seleccionado del grupo que consiste en dimetacrilato de etileno y metileno-bis-acrilamida.

Dicha estructura polimérica porosa hidrófoba o hidrófila puede comprender además un monómero monovinílico, en donde el monómero monovinílico es seleccionado del grupo que consiste de acrilatos de alquilo, metacrilatos de alquilo; acrilatos de arilo, metacrilatos de arilo, acrilatos de arilalquilo, metacrilatos de aril alquilo, acrilatos de alquilo fluorados, metacrilatos de alquilo fluorados, estireno, vinilnaftaleno, vinilantraceno y derivados de éstos, en donde el grupo alquilo de cada uno de los monómeros de alquilo tiene de 1 - 18 átomos de carbono, vinilacetato, vinilpirrolidona, ácido acrílico, ácido metacrílico, metacrilamida, acrilamida, derivados de alquilo de metacrilamida, derivados de alquilo de acrilamida, en donde el grupo de alquilo consiste de 1 - 4 átomos de carbono, acrilatos de hidroxialquilo y acrilamidas, hidroxialquilo metacrilatos y metacrilamidas, acrilatos de oligoetileno glicol y metacrilatos de oligoetileno glicol, acrilato de 3-sulfopropilo de potasio, metacrilato de 3-sulfopropil de potasio, ácido 2-acryloamido-2-methy1-1-propano-sulfónico, ácido 2-acrilamidoglicólico, cloruro de [2-(metacrililoiloxi)etil] trimetilamonio y N-[3- (dimetilamino) propil] metacrilamida.

En una realización preferida, el monómero monovinílico es seleccionado del grupo que consiste en metacrilato de metilo, metacrilato de butilo, metacrilato de bencilo, estireno, metacrilato de 2-hidroxietilo, metacrilato de decaetilenglicol, N-isopropilacrilamida y acrilamida. El anterior monómero de polivinilo se copolimeriza con el monómero monovinílico que proporciona la estructura polimérica porosa.

En una realización particularmente preferida de la invención presente, la estructura polimérica porosa comprende al menos un miembro seleccionado del grupo que consiste de poli(2-hidroxietilo metacrilato-co-etilendimetacrilato) (HEMA-EDMA) poroso y (trimetilolpropano triacrilato-co-etilendimetacrilato) (TMPTA-EDMA) poroso.

La estructura polimérica porosa que tiene grupos funcionales que permiten la introducción de grupos alquino o alqueno terminales o no terminales puede ser proporcionada sobre un sustrato adecuado que soporta el material polimérico tal como una placa de cristal.

Según la invención presente, el espesor del sustrato poroso funcionalizado con alquino o con alqueno no está específicamente limitado y puede ser ajustado dependiendo del uso previsto. Sin embargo, en cuanto a las propiedades de transparencia o de reducción de los costes de fabricación, se prefiere un sustrato delgado poroso. En particular, el espesor del sustrato poroso funcionalizado con alquino o con alqueno es de preferencia de 1 μm a 100 μm , más preferentemente de 5 μm a 50 μm y lo más preferentemente de 10 a 15 μm . Según dicha realización, se prefiere que el sustrato poroso funcionalizado con alquino o con alqueno sea soportado sobre un soporte adecuado, tal como una placa de cristal.

El soporte, sin embargo, no está limitado a un sustrato de cristal y, generalmente, se puede usar cualquier soporte sólido que sea sólido, de preferencia a una temperatura dentro del intervalo de -30°C a 130°C , más preferentemente dentro del intervalo de 0°C a 40°C , y lo más preferentemente a temperatura ambiente. Según la invención presente, el soporte sólido puede ser seleccionado del grupo que consiste en cristal, metal, tal como una placa de acero inoxidable, o una lámina de aluminio, plástico, hormigón, madera y mampostería. En una realización preferida de la invención presente, el soporte sólido es transparente, y en una realización particularmente preferida de la invención presente, el soporte sólido es un soporte sólido de cristal. Dicho soporte sólido de cristal puede ser activado y/o modificado antes de ser usado.

El espesor del sustrato poroso funcionalizado con alquino o con alqueno puede ser aumentado también en comparación con los valores anteriormente mencionados para que la capa de polímero poroso pueda ser autosostenible. En tal caso, el espesor del sustrato poroso funcionalizado con alquino o con alqueno es de preferencia de 10 μm a 1,5 mm, más preferentemente de 125 μm a 1 mm.

Además, Según se ha mencionado anteriormente, el sustrato poroso funcionalizado con alquino o con alqueno tiene de preferencia una estructura nanoporosa. Dentro del alcance de la invención presente, la expresión "nanoporosa" se refiere a poros que tienen un tamaño medio del poro de 1500 nm o menos medido por microscopio electrónico de barrido (SEM), que incluye materiales microporosos que tienen un tamaño medio del poro de 0,2 a 2 nm, materiales mesoporosos que tienen un tamaño medio del poro de 2 a 50 nm y materiales macroporosos que tienen un tamaño medio del poro de 50 a 1000 nm. De preferencia, el tamaño medio del poro del sustrato poroso funcionalizado con alquino o con alqueno cae dentro del intervalo de materiales mesoporosos y macroporosos, siendo aún más preferido un tamaño medio del poro de 30 nm a 500 nm.

Por ejemplo, la porosidad de la capa de polímero poroso funcionalizado con alquino o con alqueno obtenida a partir de la relación de porógenos a monómeros en la mezcla de polimerización es de preferencia del 10% al 80%, más preferentemente del 25% al 70%, lo más preferentemente del 40% al 60%.

De manera importante, como se ha mencionado anteriormente, según la invención presente, la modificación de la superficie mediante la que los grupos alquino o alqueno son incorporados al sustrato poroso, tal como el material polimérico (capa), en todo el material, no cambia significativamente la morfología del sustrato poroso, como se demuestra en las imágenes del SEM mostradas en la Figura 3. La estructura porosa de, por ejemplo, la capa de polímero poroso funcionalizado con alquino o con alqueno juega un papel importante en la fabricación de superficies superhidrófobas o superhidrófilas.

- Además, según se ha mencionado anteriormente, el sustrato puede estar hecho también de un material cuya superficie puede ser activada mediante plasma de O₂. En particular, el sustrato poroso funcionalizado con alquino o con alqueno es de preferencia un sustrato de cristal cuya superficie ha sido activada con plasma de O₂ y funcionalizada con uno de los compuestos de silano anteriormente mencionados, en la que se forman nanofilamentos de sílice sobre la superficie.
- Además, la invención presente se refiere a una superficie modificada obtenible mediante el método según la invención presente, que comprende una pauta de zonas superhidrófilas y superhidrófobas. De preferencia, la pauta de zonas superhidrófilas y superhidrófobas es una micropauta. Dentro del alcance de la invención presente, la expresión "micropauta" se entiende como cualquier pauta con características superiores a 5 micrómetros e inferiores a 5000 micrómetros. El método para la fabricación de pautas superhidrófobas-superhidrófilas no está relacionado con las micropautas y puede ser aplicado a pautas mayores también.
- El revestimiento superficial modificado por la pauta según la invención presente, comprende de preferencia una capa porosa funcionalizada con alquino o con alqueno que tienen grupos alquino o alqueno terminales o no terminales, en donde la superficie de la capa de polímero poroso comprende una pauta de zonas superhidrófilas y superhidrófobas.
- Según se ha mencionado anteriormente, la superficie pautada modificada según la invención presente comprende una capa de polímero poroso funcionalizado con alquino o con alqueno que tiene grupos alquino o alqueno terminales o no terminales que tiene de preferencia una estructura nanoporosa.
- La Figura 4 muestra los espectros Raman de una capa de polímero poroso funcionalizado con alquino no modificado, así como varias capas de polímero poroso funcionalizado con alquino modificadas con diferentes compuestos de tiol según la invención presente. La disminución de las relaciones de banda de aproximadamente 2940 cm⁻¹ (vibraciones libres de C-H-alquino) a 2120 cm⁻¹ (estiramiento de triple enlace carbono-carbono) ilustra que los grupos alquino reaccionan con los compuestos de tiol. Sin embargo, dado que la modificación de la capa de polímero poroso funcionalizado con alquino es llevada a cabo en la superficie, los grupos alquino dentro de la capa de polímero poroso que no son accesibles a la reacción de tiol-ino permanecen sin reaccionar, según se demuestra por la señal de alquino a aproximadamente 2120 cm⁻¹, que no desaparece incluso después de una radiación UV prolongada.
- La Figura 5 muestra los espectros Raman de una capa de polímero poroso funcionalizado con alqueno (parte inferior), así como las capas de polímero poroso funcionalizado con alqueno modificadas con hidrocloreuro de cisteamina (parte superior) según la invención presente. La disminución de la banda a 1600 cm⁻¹ (estiramiento de doble enlace de carbono-carbono) ilustra que los grupos alqueno reaccionan con los compuestos de tiol. Sin embargo, dado que la modificación de la capa de polímero poroso funcionalizado con alqueno es llevada a cabo en la superficie, los grupos alqueno dentro de la capa de polímero poroso que no son accesibles para la reacción de tiol-eno permanecen sin reaccionar, como se demuestra por la señal de alqueno a aproximadamente 1600 cm⁻¹, que no desaparece incluso después de una radiación UV prolongada.
- Según la invención presente, la superficie pautada modificada comprende una pauta de zonas superhidrófilas y superhidrófobas, que también pueden ser denominadas de puntos, canales y barreras, respectivamente, dependiendo de la pauta formada. En particular, en una realización preferida de la invención presente, las zonas superhidrófilas están separadas por las zonas superhidrófobas con el objeto de formar una matriz.
- En otra realización preferida, las zonas superhidrófilas están separadas por zonas superhidrófobas con el objeto de formar canales superhidrófilos, que pueden ser usados para aplicaciones de microfluidos. En particular, según se muestra en la Figura 6, se pueden crear varios tamaños y geometrías de zonas superhidrófobas y superhidrófilas. Además, las micromatrices de gotas pueden ser formadas sumergiendo en agua la micropauta superhidrófoba-superhidrófila con diferentes geometrías, según se muestra en la Figura 7. Debido a la reducida dispersión de luz, la capa de polímero poroso superhidrófilo se vuelve transparente cuando se humedece con agua, permitiendo una discriminación más fácil de puntos y facilitando el uso de microscopios invertidos (véase la Figura 8).
- Además, según la invención presente, las zonas superhidrófilas pueden estar separadas por las zonas superhidrófobas con barreras, para que las zonas superhidrófilas tengan de preferencia una forma específica que permite un empaquetamiento denso, tal como una forma cuadrada, rectangular, triangular o hexagonal, según se muestra en la Figura 7. Particularmente preferida es una forma cuadrada que permite el empaquetamiento denso de las zonas y facilita la lectura. Sin embargo, las micropautas no están limitadas a ningún formato de matricial, sino que representan un enfoque más general y novedoso que permite el pautado y, por ejemplo, el cultivo de células en un orden espacial y/o una pauta espacial prediseñados. La expresión "pauta espacial" según se usa en la memoria presente no está particularmente limitada y puede abarcar cualquier pauta deseada.
- En una realización de la invención presente, la densidad de zona de las zonas superhidrófilas es de al menos 1 por cm² y hasta 500 por cm² de la micropauta, más preferentemente al menos 100 por cm² de la micropauta, incluso

más preferentemente al menos 200 por cm^2 de la micropauta. En una realización particularmente preferida de la invención presente, la cantidad de zonas superhidrófilas es de al menos 300 por cm^2 de la micropauta.

5 Por ejemplo, si la micropauta superhidrófila-superhidrófoba según la invención presente es usada en aplicaciones de cribado biológico y/o de diagnóstico, de preferencia, la micropauta de la invención presente tiene un tamaño que se ajusta a una placa escalada de microtitulación estándar (12 x 8 cm), de preferencia un tamaño de aproximadamente 11 x 7 cm con al menos 40000, de preferencia al menos 50000 zonas superhidrófilas separadas por barreras superhidrófobas.

10 De preferencia, el número total de zonas en un solo chip aumenta significativamente. Cuando se usa como una micromatriz celular, el área mínima de una sola zona de la micropauta está limitada por la cantidad de células necesarias en cada zona para obtener datos estadísticamente válidos.^[17] En una realización particularmente preferida de la invención presente, el área de cada una de las zonas superhidrófilas es 0.5 mm^2 o menos, más preferentemente 0,2 mm^2 o menos, y lo más preferentemente 0,15 mm^2 o menos. En el caso en que las zonas superhidrófilas tengan una forma cuadrada, cada una de las zonas superhidrófilas tiene de preferencia una longitud lateral de 700 μm o menos, más preferentemente 450 μm o menos, y lo más preferentemente 335 μm o menos. En otra realización preferida de la invención presente, el tamaño de las zonas superhidrófilas es lo suficientemente grande para alojar al menos 100 células, de preferencia 200 células, más preferentemente al menos 300 células.

20 En una realización preferida de la invención presente, las barreras superhidrófobas tienen un ancho de 500 μm o menos, de preferencia de 200 μm o menos, más preferentemente de 100 μm o menos y aún más preferentemente de 50 μm o menos. Según la invención presente, se pueden producir pautas multicomponentes con tamaños de características tan pequeños como 10 μm (véase la Figura 9). Una ventaja significativa de la micropauta según la invención presente es que las barreras superhidrófobas previenen completamente la contaminación cruzada entre las zonas, a pesar de la anchura reducida de las barreras.

25 Además, según se ha mencionado anteriormente, el espesor del sustrato poroso funcionalizado con alquino o con alqueno es de preferencia de 1 μm a 100 μm , más preferentemente de 5 μm a 50 μm y lo más preferentemente de 10 μm a 15 μm . Según dicha realización, se prefiere que el sustrato poroso funcionalizado con alquino o con alqueno sea soportado por un soporte adecuado, tal como una placa de cristal.

30 Según la invención presente, las superficies superhidrófobas y superhidrófilas según la invención presente son estables bajo varias condiciones. En particular, las zonas superhidrófobas de la superficie son estables en el aire así como en diferentes soluciones acuosas, tales como, por ejemplo, tanto en ambientes neutros como acéticos ($\text{pH} \leq 6$) y básicos ($\text{pH} \geq 8$). Esto significa, según la invención presente, que la superhidrofobicidad de las superficies puede ser mantenida durante tiempos de incubación prolongados, tales como 10 horas (h) o más, de preferencia 50 h o más, y más preferentemente 100 h o más.

40 Según una realización preferida, la superficie pautada modificada tiene una superficie plana, y de preferencia no tiene barreras físicas entre las zonas. Por consiguiente, la superficie pautada según la invención presente puede ser usada para formar una matriz de microgotas fluidas homogéneas separadas o microesponjas de hidrogel de una forma y tamaño deseados en una pauta espacial deseada, permitiendo la aplicación de un fluido acuoso a una multitud de zonas superhidrófilas al mismo tiempo. La expresión "fluido acuoso" según se usa en la memoria presente no está particularmente limitada y se refiere a cualquier fluido acuoso que pueda ser de interés para la formación de una matriz de microgotas respectiva. En particular, el fluido acuoso puede ser seleccionado del grupo que consiste en agua, soluciones acuosas y medios acuosos. En una realización específica, el fluido acuoso es una solución acuosa que puede formar un hidrogel tras la reticulación, por ejemplo, una solución que contiene uno o más compuestos que polimerizan al contacto con un agente de reticulación adecuado, o tras la polimerización iniciada por UV. En esta realización específica, las microgotas de fluido acuoso forman microesponjas de hidrogel tras la reticulación.

50 En otra realización, el fluido acuoso puede contener especímenes biológicos. Estos especímenes biológicos pueden ser seleccionados del grupo que consiste en células, bacterias, virus y organismos multicelulares. De preferencia, dichos especímenes biológicos no se adhieren y/o crecen en las superficies. La expresión "célula" según se usa en este contexto no está particularmente limitada y abarca cualquier tipo de células procariontas y eucariotas que puedan ser de interés. La expresión "organismo multicelular" según se usa en este contexto no está particularmente limitada y abarca cualquier organismo multicelular en cualquier etapa de desarrollo que pueda ser de interés, con la condición de que el organismo multicelular no sea demasiado grande y no quepa en las microgotas formadas. Los organismos multicelulares que son de particular interés en el contexto de la invención presente son *Danio rerio*, es decir, pez cebra, por ejemplo, huevos de pez cebra o embriones de pez cebra, y el nematodo *Caenorhabditis elegans*.

60 La expresión "microgota" según se usa en la memoria presente se refiere a las gotas formadas en la micropauta de la invención presente. Las pautas que confinan las microgotas pueden tener cualquier forma deseada, por ejemplo, una forma circular o hexagonal, y pueden tener también geometrías con bordes afilados, como formas triangulares. Las microgotas pueden tener volúmenes de 100 μl a 30 μl . El número de microgotas formadas en las micropautas de

la invención presente no está particularmente limitado y depende del tamaño de la micropauta y del número de zonas superhidrófilas formadas en ella. Como ejemplo, se pueden formar matrices, en particular matrices de alta densidad, de miles de microgotas. Las microgotas son de preferencia homogéneas, es decir, todas tienen el mismo tamaño y forma, y están separadas, es decir, están separadas entre sí por las zonas superhidrófobas que separan las zonas superhidrófilas en las que se forman las microgotas. De esta manera, las microgotas individuales están completamente aisladas. Una matriz de microgotas formadas también puede ser denominada "DropletArray", o matriz de gotas.

Según se ha mencionado anteriormente, la expresión "pauta espacial" según se usa en la memoria presente no está particularmente limitada y puede abarcar cualquier pauta deseada de, por ejemplo, microgotas. De preferencia, la pauta se elige de manera que se maximiza la densidad de las microgotas por zona.

Según se ha mencionado anteriormente, la micropauta puede tener una superficie plana, y más preferentemente sin barreras físicas entre las zonas, lo que permite la siembra celular paralela que es muy importante para conseguir una alta calidad de datos.^[18] La ausencia de barreras físicas elimina también los problemas ópticos que ocurren con la miniaturización adicional de las placas de micropocillos. La alta densidad de los micropuntos puede acelerar y simplificar la adquisición de datos. Según la invención presente, otra ventaja importante es que se requieren cantidades mucho más pequeñas de moléculas-sonda para experimentos de transfección únicos, lo que hace que el método sea significativamente menos costoso que el análogo de fase líquida. El costo es un factor importante en muchos cribados ya que las grandes bibliotecas biomoleculares, igual que las bibliotecas de ARNi, son muy costosas.

Por otro lado, la muy buena propiedad de humectación de las zonas superhidrófilas garantiza una distribución fácil y homogénea de las soluciones dentro de las zonas independientemente de su geometría. En una realización preferida de la invención presente, cada zona superhidrófila individual es llenada con una solución acuosa de biomoléculas que son requeridas para diferentes experimentos celulares, de preferencia seleccionados del grupo, que consiste en componentes de cribado de ARNi, ADN, proteínas, fármacos o candidatos a fármacos, péptidos, proteínas recombinantes y otras bibliotecas de pequeñas moléculas y de macromoléculas.

Además, las barreras superhidrófobas evitan que las células migren entre las zonas adyacentes. Por tanto, el grave problema de la migración celular entre las zonas conocidas de las matrices celulares de la técnica anterior puede ser resuelto usando la micropauta según la invención presente. En particular, las zonas superhidrófobas (de barrera) de las micropautas según la invención presente muestran excelentes propiedades repelentes de células superiores a las producidas por la técnica de fotoinjerto descrita anteriormente en la patente europea EP 2 481 794 A1. En particular, según la invención presente, se prefiere que el 2% o menos, más preferentemente el 1% de las células ocupen las zonas superhidrófobas que separan las zonas superhidrófilas después de, por ejemplo, 2 días de cultivo celular. Esto se demuestra con el siguiente ejemplo. En él, se sembraron células Hela-GFP en una matriz de puntos superhidrófilos y barreras superhidrófobas y se incubaron durante 2 días. Las Figuras 10 a 11 muestran que las células se adhieren bien a los micropuntos superhidrófilos, demostrando la biocompatibilidad y la no toxicidad de la superficie. Sin embargo, menos del 1% de las células ocupa las regiones superhidrófobas que separan las zonas de micropuntos después de 2 días de cultivo.

Además, debido al método según la invención presente que emplea reacciones click fotoinducidas para la modificación de la superficie, la resolución de las micropautas obtenidas puede ser sorprendentemente aumentada en comparación con las técnicas convencionales conocidas en este campo, particularmente en comparación con las pautas producidas por la técnica previa de fotoinjerto descrita en la patente europea EP 2 481 794 A1.

Según se ha indicado anteriormente, la superficie modificada según la invención presente puede ser usada en varios campos técnicos. En particular, la superficie modificada según la invención presente puede ser usada como una micromatriz de gotas para síntesis química así como para aplicaciones de cribado químico y biológico. Las gotas pueden contener cualquier sustancia disuelta o suspendida en agua, y el secado de las gotas ofrece como resultado la deposición homogénea de la sustancia dentro de la estructura porosa de los puntos superhidrófilos. Este método de deposición puede ser usado también para preimprimir una matriz completa con un agente de reticulación para formar un hidrogel, compuesto por un polímero reticulable, que encapsula, por ejemplo, una suspensión celular. Por tanto, las células no adherentes u otras especies biológicas pueden ser inmovilizadas fácilmente en una matriz de alta densidad y ser usadas para cribados biológicos. En combinación con técnicas de impresión automatizadas, este método permite el cribado de alto rendimiento de muchas clases de compuestos biológicamente activos con respecto a su influencia en una amplia variedad de especímenes vivos.

Además, Según se ha mencionado anteriormente, debido a la posibilidad de controlar con precisión la geometría, el tamaño y la densidad de los puntos, es posible formar microcanales, que pueden ser usados, por ejemplo, para la separación de péptidos y en aplicaciones de diagnóstico. Además, la superficie modificada de la invención presente puede ser usada para una impresión offset. Además, las superficies modificadas pueden ser usadas para aplicaciones MALDI-MS, pautas celulares o de bacterias, cribados químicos e investigación de interacciones entre célula y célula, así como para aplicaciones de ingeniería tisular.

La superficie modificada obtenida mediante el método según la invención presente puede ser usada además para cultivar células ya sea en la superficie del mismo medio o en microgotas separadas (formato DropletMicroarray). Dicho método para cultivar células comprende los pasos de:

- 5 (I) proporcionar la superficie pautaada modificada según la invención presente;
- (II) sembrar células a ser cultivadas al menos en una zona superhidrófila de la superficie pautaada modificada;
- y
- (III) cultivar las células sembradas.

10 Dentro del alcance de la invención, la expresión "células" es una expresión genérica y abarca el cultivo de células individuales, tejidos, órganos, células eucariotas incluyendo células fúngicas tales como levaduras y mohos, células vegetales, protistas, células animales incluyendo células de insectos, células de aves, células de mamíferos y células procariotas que incluyen células bacterianas y células arqueas. La expresión células incluye también células primarias, líneas celulares continuas, células madre y/o células modificadas genéticamente, tales como células recombinaantes que expresan un polipéptido o proteína heterólogos. Las células recombinaantes incluyen, por ejemplo, células que expresan polipéptidos o proteínas heterólogos, tales como un factor de crecimiento o un factor sanguíneo.

20 Las células de mamífero adecuadas para el cultivo en el método de la invención presente incluyen las de origen humano, que pueden ser células primarias derivadas de una muestra de tejido, cepas de células diploides, células transformadas o líneas celulares establecidas. Las células de mamífero pueden incluir células humanas y no humanas por igual. Las células de mamífero de origen no humano pueden ser células de riñón de mono, células de riñón bovino, células de riñón de perro, células de riñón de cerdo, células de riñón de conejo, células de riñón de ratón, células de riñón de rata, células de riñón de oveja, células de riñón de hámster, células de ovario de hámster chino o una célula animal derivada de cualquier tejido. En particular, las células de mamífero que pueden ser cultivadas en el método según la invención presente pueden ser células BSC-1, células LLC-MK, células CV-1, células COS, células COS-1, células COS-3, células COS- 7, células VERO, células MDBK, células MDCK, células CRFK, células RAF, células RK, células TCMK-1, células LLC-PK, células PK15, células LLC-RK, células MDOK, células BHK-21, células CHO, células HeLa, células NS-1 células MRC-5, células WI-38, células BHK, células 293, células de carcinoma de mama de ratón, células de carcinoma de mama de rata, células HEK, células HEPA y células RK. En una realización preferida de la invención presente, las células cultivadas son seleccionadas del grupo que consiste en células de carcinoma de mama de ratón, células de carcinoma de mama de rata, células HEK, células HEPA y células HeLa.

35 Las células pueden ser cultivadas en cualquier medio adecuado conocido en la técnica en cualquier condición adecuada, por ejemplo, con contenido de CO₂, temperatura o pH conocidos en la técnica. El medio usado para el cultivo de las células puede ser un medio sintético, como DMEM, HAM's F12, Medio 199 o RPMI, o combinaciones de éstos, y otros que son conocidos en la bibliografía o están comercialmente disponibles, que pueden ser complementados con proteínas animales, por ejemplo, complementándolos con suero de ternera fetal o suero bovino. El medio basal puede comprender una serie de ingredientes, que incluyen aminoácidos, vitaminas, sales orgánicas e inorgánicas, fuentes de hidratos de carbono, cada ingrediente está presente en una cantidad que favorece el cultivo de una célula in vitro. Por ejemplo, se puede usar el medio DMEM/HAM's F12 (1: 1) como medio basal. El medio puede contener sustancias auxiliares, tales como sustancias amortiguadoras como bicarbonato de sodio, estabilizadores de oxidación, estabilizadores para contrarrestar el estrés mecánico o inhibidores de la proteasa.

50 La expresión "cultivo", en sus diversas formas gramaticales, se refiere al mantenimiento de las células in vitro en condiciones que permiten el crecimiento y la viabilidad continuada. Las células de mamífero se cultivan típicamente en una incubadora de células aproximadamente a 37° C, el medio de cultivo tiene un pH óptimo dentro del intervalo de aproximadamente 6,8 a 7,6, de preferencia entre 7,0 y 7,3. A las células se les puede realizar un cambio de medio completo aproximadamente cada 2 o 3 días, o más o menos frecuentemente, si es necesario. Los enfoques de cultivo pueden incluir, dependiendo del contexto y la necesidad, el subcultivo, el paso y la propagación de las células.

55 En una realización preferida de la invención presente, al menos una zona superhidrófila de la superficie pautaada modificada proporcionada en el paso (I) del método para cultivar células según se define en la memoria presente contiene al menos un agente biológicamente activo. La expresión "agente biológicamente activo" según se define en la memoria presente se refiere a cualquier sustancia que no impide ninguna prueba biológica llevada a cabo en las zonas superhidrófilas. El agente biológicamente activo puede ser un agente seleccionado del grupo que consiste en moléculas de ácido nucleico, como plásmidos; ADN; ARN; ARNi; moléculas pequeñas; macromoléculas; fármacos; proteínas; péptidos; muestras de tejidos; polímeros; hidrogeles; partículas; nanopartículas tales como nanopartículas metálicas; puntos cuánticos semiconductores; nanotubos metálicos, de carbono o de polímero y combinaciones de éstos. En otra realización, un agente biológicamente activo según se define en esta memoria puede ser una sustancia adecuada para unir una biomolécula o una célula a la zona superhidrófila, como por ejemplo un anticuerpo o un fragmento de él o un ligando o una biomolécula. En una realización particularmente preferida de la invención

presente, el agente biológicamente activo es un anticuerpo o un fragmento de él o una unión de un ligando a una molécula superficial de una célula según se define en esta memoria.

5 En una realización más preferida de la invención presente, un agente biológicamente activo es una molécula de ácido nucleico, más preferentemente, una molécula de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en agentes de ADN, ARN y ARNi. En una realización particularmente preferida de la invención presente, el agente biológicamente activo es un ácido nucleico y al menos una célula según se define en esta memoria es transfectada con el ácido nucleico después del paso de siembra (II) y antes del paso de cultivo (III), es decir, antes del cultivo en la zona superhidrófila. En una realización más preferida, el ácido nucleico codifica un producto génico que
10 proporciona la célula que está siendo transfectada con el ácido nucleico con una característica detectable tras la expresión por la célula. En otra realización preferida de la invención presente, el ácido nucleico es un agente de ARNi y la expresión del producto génico objeto del agente de ARNi disminuye significativamente después de la transfección de la célula con el agente de ARNi.

15 En otra realización preferida adicional de la invención presente, el método para cultivar células comprende además un paso (IV) de detectar células transfectadas con al menos un agente de ARNi. En una realización de la invención presente, las células cultivadas son detectadas antes del paso de siembra (II), antes del paso de cultivo (III), durante el paso de cultivo (III) y/o después del paso de cultivo (III) del método para cultivar células según se define en esta memoria. La detección puede llevarse a cabo, por ejemplo, detectando un péptido y/o ácido nucleico que señale la
20 célula. El péptido y/o el ácido nucleico pueden ser expresados por la célula. En una realización preferida de la invención presente, el péptido y/o el ácido nucleico usan una unión de un compuesto al péptido y/o ácido nucleico que tiene un marcador detectable. En una realización de la invención presente, el compuesto que tiene un marcador detectable es un ácido nucleico con agentes biológicamente activos que se unen específicamente a un ácido nucleico aislado de una célula cultivada. En otra realización preferida de la invención presente, el compuesto que
25 tiene un marcador detectable es un anticuerpo o fragmento de un anticuerpo que se une específicamente a un péptido aislado de o presentado en la superficie de una célula cultivada.

En una realización de la invención presente, la detección de la célula cultivada es llevada a cabo antes del paso de cultivo (III) y la detección permite el recuento de las células. Usando la información obtenida contando las células, se
30 siembra un número predeterminado de células en las zonas superhidrófilas.

La expresión "marcador detectable" no presenta ninguna limitación particular y el marcador puede ser seleccionado del grupo que consiste en marcadores radiactivos, colorantes fluorescentes, copolímeros que tienen actividad
35 enzimática, marcadores magnéticos, antígenos y compuestos que tienen una alta afinidad de unión con un marcador detectable. Por ejemplo, un compuesto marcado radioactiva o fluorescentemente puede ser usado para detectar ácidos nucleicos o péptidos aislados o siendo presentados en las células cultivadas, por ejemplo, después de la electroforesis. Los colorantes fluorescentes ligados a una sonda pueden servir como un marcador de detección para ácidos nucleicos, por ejemplo, en una PCR en tiempo real. Una sustancia que tiene una reactividad enzimática tal como la enzima luciferasa que produce una señal luminosa al contacto con el sustrato respectivo puede ser usada
40 también como un marcador detectable que puede ser ligado covalentemente a dicho compuesto que tiene un marcador detectable. Marcar el compuesto de la invención presente con perlas magnéticas permite una extracción selectiva de ácidos nucleicos o péptidos aislados de o siendo presentados en las células cultivadas. El acoplamiento de un compuesto que tiene un marcador detectable con un antígeno permite la detección del compuesto mediante un complejo anticuerpo/enzimático (la enzima es, por ejemplo, fosfatasa) que cataliza una reacción de color detectable cuando se usa un sustrato adecuado. Una sustancia con una alta afinidad de unión con un marcador detectable diferente tal como biotina que se une a un marcador detectable ligado covalentemente a, por ejemplo, estreptavidina, es una posibilidad adicional para formar un compuesto detectable de la invención presente.

45 El paso (IV) de detección del método definido anteriormente puede comprender uno o más métodos de detección seleccionados del grupo que consiste en inmunoblotting, inmunoprecipitación, inmunocaptura, inmovilización de anticuerpos monoclonales de antígenos plaquetarios o ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). citometría de flujo, tecnología de matrices de proteínas, espectroscopia, espectrometría de masas, cromatografía, resonancia plasmónica superficial, extinción de fluorescencia y/o transferencia de energía de fluorescencia. El método de detección puede, por ejemplo, ser seleccionado del grupo que consiste en un ensayo enzimático, un
50 ensayo cromogénico, un ensayo luminoso, un ensayo fluorogénico y un ensayo radioinmune. Las condiciones de reacción para realizar la detección del marcador detectable dependen del método de detección seleccionado. Entra dentro del conocimiento de los expertos en la técnica elegir los parámetros óptimos, tales como el sistema amortiguador, la temperatura y el pH del sistema de detección respectivo a ser usado.

60 En una realización preferida de la invención presente, el método para cultivar células según se define en esta memoria comprende el paso de poner la célula en contacto con un agente biológicamente activo, de preferencia una sustancia farmacéuticamente efectiva durante el o antes del paso de siembra (II) y/o durante el paso de cultivo (III) y la detección de la influencia de un tratamiento con un agente biológicamente activo en las células cultivadas en el paso de cultivo (III). El compuesto de agente biológicamente activo según la invención presente puede ser cualquier
65 agente biológicamente activo conocido en la técnica. En una realización preferida de la invención presente, el agente biológicamente activo es depositado en zonas superhidrófilas de la superficie pautada modificada de la invención

- 5 presente antes del paso de siembra (II) y las células son puestas en contacto con el agente biológicamente activo durante el paso de siembra (II). En otra realización preferida de la invención presente, las células son puestas en contacto con el agente biológicamente activo durante el paso de cultivo (III). La influencia de un tratamiento con un agente biológicamente activo en las células puede ser detectada mediante la detección de alteraciones del cultivo celular, de preferencia alteraciones en la morfología de las células, comportamiento de las células, tales como motilidad, división, proliferación, adhesión, diferenciación, expresión de péptidos y/o ácidos nucleicos usando los métodos de detección definidos anteriormente. En una realización preferida las alteraciones del cultivo celular son detectadas usando la microscopía.
- 10 En una realización particularmente preferida de la invención presente, la influencia de un tratamiento con el agente biológicamente activo sobre las células es detectada midiendo las diferencias del perfil de expresión génica de las células. La expresión "perfil de expresión génica" según se usa en la memoria presente se refiere a la expresión relativa de una pluralidad de transcripciones o de nivel de transcripción de ARNm que incluyen cantidades de proteína y modificaciones postraslacionales. Un perfil de expresión génica de una célula refleja la cantidad de cada transcripción de ARNm y/o el nivel de postranscripción de la muestra de partida. Los métodos para analizar el perfil de expresión génica de una célula son conocidos en la técnica. En una realización preferida de la invención presente, los perfiles de expresión génica de las células son obtenidos usando, por ejemplo, técnicas de micromatrices, PCR, microscopía o análisis Northern. En una realización particularmente preferida de la invención presente, el agente biológicamente activo es un agente de ARNi.
- 15 20 En una realización preferida de la invención presente, la siembra de células a ser cultivadas en al menos una zona superhidrófila de la superficie pautada modificada en el paso (II) es una siembra de células para ser cultivadas sobre toda la superficie.
- 25 En otra realización preferida del método para cultivar células según se define en esta memoria, el al menos un agente biológicamente activo es una molécula de ácido nucleico, de preferencia seleccionada del grupo que consiste en ARNi, plásmidos, ADN, y el método comprende además el paso de (IV) detectar células transfectadas con al menos una molécula de ácido nucleico.
- 30 En una realización preferida de la invención presente, la superficie pautada modificada es usada para pautar conjuntos celulares de alta densidad estandarizados. Éstos pueden ser usados para las pantallas ARNi (CHT) de alto rendimiento combinatorio o para cualquier otro experimento de cribado de células que involucre grandes bibliotecas biomoleculares.
- 35 La transfección de grupos celulares sobre una matriz puede ser, por ejemplo, una transfección inversa. En una realización particularmente preferida de la invención presente, la superficie pautada modificada es preimpresa con reactivos de transfección antes del paso de siembra del método descrito anteriormente para cultivar células.
- 40 El método según la invención presente representa así un método extremadamente rápido, opcionalmente libre de iniciadores para modificar superficies superhidrófobas. Las superficies reactivas superhidrófobas pueden ser modificadas fácilmente tras reacciones click fotoinducidas para producir superficies superhidrófobas que tienen pautas de diferentes funcionalidades químicas o propiedades físicas. Éstas pueden ser usadas como revestimientos autolimpiantes, revestimientos antiincrustación o revestimientos resbaladizos.
- 45 El método puede ser aplicado a una variedad de moléculas funcionales diferentes, según las cuales pueden crear pautas funcionales y/o reactivas superhidrófobas y superhidrófilas en muy poco tiempo, incluso en condiciones acuosas, lo que hace que este método sea particularmente útil para aplicaciones biológicas, donde una transformación rápida y unas condiciones acuosas benignas son cruciales.
- 50 Además, la superficie modificada según la invención presente puede ser usada para preparar de forma fácil y conveniente micromatrices de gotas, micromatrices de hidrogel y micromatrices celulares, en las que la contaminación cruzada así como la migración celular entre puntos adyacentes pueden ser sorprendentemente minimizadas, al tiempo que permiten datos de alta calidad y una investigación con técnicas de detección comunes. Además, la superficie modificada según la invención presente es mecánicamente estable y no se degrada en un lapso de tiempo razonable, a la vez que es producida de manera eficiente, particularmente en poco tiempo y permitiendo que la geometría, el tamaño y la densidad del punto sean controlados con precisión.
- 55

Las Figuras muestran:

- 60 **Figura 1:** Propiedades de transparencia y reactivas del revestimiento superhidrófobo funcionalizado usando triclorovinilsilano (sustrato VCTS) de (A) gotas de agua sobre la superficie que tiene grupos vinílicos unidos a ella (sustrato VCTS); (B) espectros de transmitancia UV-Vis de un sustrato de cristal puro (a), sustrato de VCTS (b), una superficie HEMA-EDMA fotoinijertada superhidrófoba (c), y una superficie BMA-EDMA (d) (todas las superficies de polímero fueron preparadas sobre sustratos de cristal); (C) una representación esquemática que muestra el grupo clickable en la superficie VCTS; (D) una representación esquemática de las reacciones click fotoinducidas por medio de una reacción de tiol-eno (izquierda) y reacción de disulfuro-eno (derecha).
- 65

Figura 2: Representación esquemática de las reacciones click fotoinducidas por medio de una reacción de fotoclick de tiol-ino para crear pautas superhidrófobas-superhidrófilas usando una capa de polímero poroso modificado con alquino como sustrato.

Figura 3: Gotas de agua sobre varias capas de polímero y las imágenes del SEM correspondientes: HEMA-EDMA, HEMA-EDMA funcionalizadas con alquino, así como superficies de alquino modificadas con 1-dodecanotiol, 1H,1H, 2H,2H-perfluorodecanotiol, 2 -mercaptoetanol, cisteamina y ácido 3-mercaptopropiónico. Los WCA estáticos son 4,2°, 124°, 169°, 170°, 5,2°, 4,4° y 5,0° respectivamente. Las barras de la escala son de 1 µm.

Figura 4: Los espectros Raman de una superficie de alquino no modificada, así como las superficies de alquino modificadas con 1-dodecanotiol, 1H,1H,2H,2H-perfluorodecanotiol, cisteamina, ácido 3-mercaptopropiónico y 2-mercaptoetanol. La disminución de las relaciones de banda de ~2940 cm⁻¹ (vibraciones libres de alquilo C-H) a ~2120 cm⁻¹ (estiramiento de triple enlace C≡C) ilustra que los grupos alquino reaccionan con varios tipos de tioles. Algunos grupos de alquinos están encerrados dentro del polímero y no son accesibles, por tanto la señal del alquino (~2120 cm⁻¹) no desaparece incluso después de una radiación UV prolongada.

Figura 5: Los espectros Raman de una capa de polímero poroso funcionalizado con alqueno (parte inferior), así como las capas de polímero poroso funcionalizado con alqueno modificado con hidrocloreto de cisteamina (parte superior). La disminución de la banda 1600 cm⁻¹ (estiramiento de doble enlace C=C) ilustra que los grupos alqueno reaccionan con los compuestos de tiol. Sin embargo, dado que la modificación de la capa de polímero poroso funcionalizado con alqueno es llevada a cabo en la superficie, los grupos alqueno dentro de la capa de polímero poroso que no son accesibles para la reacción de tiol-eno permanecen sin reaccionar, según se ha demostrado por la señal del alqueno! a aproximadamente 1600 cm⁻¹, que no desaparece incluso después de una radiación UV prolongada.

Figura 6: imágenes ópticas de (A) pautas superhidrófilas superhidrófobas llenas de soluciones de agua de colorante; (B) el espacio superhidrófobo entre los dos anillos es 100 µm.

Figura 7: DropletMicroarrays formadas sumergiendo en agua las matrices superhidrófobas-superhidrófilas con diferentes geometrías. Las partes húmedas se vuelven transparentes (oscuras). Las barras de escala son de 1 mm.

Figura 8: Espectros de transmitancia UV-Vis-NIR de HEMA-EDMA poroso húmedo y seco.

Figura 9: Regiones superhidrófilas (zonas claras) separadas por espacios superhidrófobos (zonas oscuras) de diferentes anchuras.

Figura 10: Imágenes de microscopio de fluorescencia de células Hela-GFP después de crecer durante 48 h en una matriz superhidrófoba-superhidrófila, que muestran la adherencia preferencial de las células sobre puntos superhidrófilos (barra derecha del gráfico) y menos del 1% de ocupación sobre las barreras superhidrófobas (barra izquierda en el gráfico). La barra de escala es de 1 mm.

Figura 11: Imágenes de microscopio de fluorescencia de células Hela-GFP después de crecer durante 48 h en una matriz pausada superhidrófoba-superhidrófila. Menos del 1% del número total de células ocuparon las barreras superhidrófobas. El gráfico muestra el perfil de intensidad de la fluorescencia verde contra la distancia. La barra de escala es de 1 mm.

Figura 12: (A) Imágenes de microscopio de fluorescencia confocal con láser que muestran las pautas superhidrófobas superhidrófilas inversas llenas con una solución acuosa de colorante Rhodamine B. Los lados de las casillas son de 300 µm. (B) Una solución de hexadecano de colorante Oil Red O hidrófobo que humedece las zonas superhidrófilas y superhidrófobas (izquierda); la misma superficie cubierta con la solución de hexadecano del colorante Oil Red O después de humedecer las barreras superhidrófilas con agua. La capa de agua protege las regiones superhidrófilas contra la impregnación con la solución de hexadecano (derecha). Las barras de escala son de 1 mm.

Figura 13: (A) El progreso de la esterificación se caracterizó midiendo el WCA estático sobre la capa de polímero durante la esterificación. El gráfico muestra el aumento del WCA estático en la capa de polímero poroso en función del tiempo de reacción. El WCA estático sobre la superficie sigue siendo alrededor de 124° después de 24 h del tiempo de reacción. (B) Para caracterizar la esterificación dentro del polímero poroso, la capa superficial de la superficie fue eliminada aplicando una cinta sensible a la presión convencional (cinta Scotch) a la capa de polímero y a continuación se peló capa por capa. Después de eliminar cada capa con la cinta, se midió el WCA estático en el mismo punto de la película de polímero (esterificación durante 4 h). El punto aislado a la derecha muestra el WCA estático de un sustrato de cristal desnudo. Después de despegar la cinta 11 veces, la capa de polímero muestra los mismos WCA estáticos que un sustrato de cristal desnudo, lo que indica que la reacción de esterificación se produce en todo el espesor de la capa de polímero. Se midieron cinco puntos diferentes que muestran la misma tendencia.

Figura 14: El progreso de modificación de alqueno se caracterizó midiendo el WCA estático en la capa de polímero. La línea (♦) muestra el aumento del WCA estático en la capa porosa de polímero en función del tiempo de reacción. La línea (□) Muestra el aumento del WCA estático en la capa de polímero poroso después de una segunda modificación por 1H,1H,2H,2H-perfluorodecanotiol.

Figura 15: Espectros Raman de la superficie del polímero HEMA-EDMA (parte superior) y una superficie de polímero de alquino funcionalizada con ácido 4-pentinoico (parte inferior). La banda intensa a ~2120 cm⁻¹ da soporte a la presencia de unidades -C≡H en la superficie del alquino.

Figura 16: Espectros Raman de la superficie del polímero HEMA-EDMA (parte inferior) y una superficie de polímero de alqueno funcionalizada con cloro(dimetil) vinilsilano (parte superior). La banda intensa a 1600 cm^{-1} da apoyo a la presencia de unidades $\text{-C}=\text{CH}_2$ en la superficie del alqueno.

Figura 17: (A, B) Cinética de la modificación de la superficie de alquino usando la química click de tiol-ino. El Θ_{st} de la capa de polímero poroso funcionalizado con alquino modificado usando: (A) cisteamina con (★) o sin (■) fotoiniciador 2,2-dimetoxi-2-fenilacetofenona (DMPAP) y con DMPAP pero sin radiación UV (●); (B) cisteamina (■) 3-ácido mercaptopropiónico (●), 2-mercaptoetanol (◆), 1H,1H,2H,2H-perfluorodecanotiol (▼), y 1-dodecanotiol (▲) sin DMPAP tras la radiación UV; (C) Los espectros Raman de las superficies de alquino modificado con cisteamina a diferentes tiempos de radiación UV. La relación de bandas de $\sim 2940\text{ cm}^{-1}$ (vibraciones libres de alquilo C-H) a $\sim 2120\text{ cm}^{-1}$ (estiramiento de triple enlace $\text{C}\equiv\text{C}$) sigue siendo la misma, lo que ilustra que 15 s es suficiente para la funcionalización completa del alquino de los grupos alquino con tioles.

Figura 18: Cinética de la modificación de la superficie del alqueno usando la química click de tiol-eno. El Θ_{st} de la capa de polímero poroso funcionalizado con alqueno fue modificado usando cisteamina (○) y 1H,1H,2H,2H-perfluorodecanotiol (●).

Figura 19: Θ_{st} de las superficies de alquino funcionalizadas usando ácido 3-mercaptopropiónico disuelto en diferentes disolventes; sin fotoiniciador; 5 s de radiación UV; medida a partir de 3 muestras diferentes de cada dos medidas en cada muestra.

Figura 20: micropauta superhidrófoba, con cuadrados funcionalizados con alquino y barreras superhidrófobas modificadas con 1H,1H,2H,2H-perfluorodecanotiol. Los puntos de alquino son humedecidos con una solución de etanol y agua que contiene Rhodamine B. La solución de colorante sólo puede humedecer los puntos de alquino y es repelida por la barrera superhidrófoba. No se produce ninguna fuga aparte del único punto que contiene la solución de colorante. Se inserta: una gota de solución de agua-etanol 1:1 en una superficie superhidrófoba modificada 1H,1H,2H,2H-perfluorodecanotiol. El ángulo de contacto con el agua estático es de 135° . La barra de escala es de 1 mm.

Figura 21: (A) gráficos 2D ToF-SIMS de CF^+ -ion positivo y la suma de ion CH_4N^+ -ion y $\text{C}_2\text{H}_6\text{N}^+$ -ion, que muestran la pauta de 1H,1H,2H,2H-perfluorodecanotiol y cisteamina, respectivamente. (B) Imágenes de microscopio de fluorescencia que muestran las pautas superhidrófobas-superhidrófilas inversas llenas de solución acuosa de Rhodamine B; (C) Las regiones superhidrófilas de las pautas superhidrófobas-superhidrófilas inversas llenas de agua. Pautas inversas producidas usando la misma fotomáscara cambiando el orden en que se crearon las regiones hidrófobas e hidrófilas. Las barras de escala son $100\text{ }\mu\text{m}$ (A), $300\text{ }\mu\text{m}$ (B) y 1 mm (C).

Figura 22: Imagen de microscopio de fluorescencia de una pauta de péptido de fluoresceína- β -Ala-GGGGC preparada mediante la reacción de tiol-ino en la superficie porosa de alquino llevada a cabo en solución acuosa. La barra de escala es de $500\text{ }\mu\text{m}$.

Figura 23: La prueba de estabilidad de superficies superhidrófobas en el aire (■), amortiguador PBS (●), Solución DMEM con 10% FBS (◆) (usado con frecuencia en el cultivo celular) y soluciones de agua ácida (▲) y básica (▼) con entornos (pH = 5 y 10) durante 120 h. A) WCA estáticos de superficies superhidrófobas en función del tiempo de incubación en diferentes ambientes. Los WCA estáticos de las superficies al aire, el amortiguador PBS y las soluciones de agua ácidas y básicas (pH = 5 y 10) permanecieron por encima de 160° después de 120 h de incubación. Debido a la adsorción de proteínas, decreció el WCA de la superficie en la solución DMEM + FBS. B) Los WCA avanzados (■) y retrocedidos (●) de las superficies después de la incubación durante 120 h en diferentes entornos. Los WCA avanzados se mantuvieron casi iguales después de la incubación. Los WCA de la superficie en el amortiguador los PBS, las soluciones ácidas y las básicas de agua decrecientes disminuyeron ligeramente.

Figura 24: (A) espectro ToFSIMS de la superficie VCTS de 1H,1H,2H,2H-perfluorodecanotiol (izquierda) y dibutil ditiol (derecha) superhidrófoba modificada. (B) Imágenes de ToFSIMS de la superficie VCTS de 1H,1H,2H,2H-perfluorodecanotiol (izquierda) y dibutil ditiol (derecha) superhidrófobo modificada.

Figura 25: (A) Representación esquemática de diferentes métodos de pautado de superficies: (i) radiación UV a través de una fotomáscara; (ii) impresión de microcontacto; (iii) detección capilar; (iv) nanolitografía dip-pen (DPN); (B) Imágenes de microscopio fluorescente de: (i) FITC (parte superior) y Rhodamine B (parte inferior) confinadas en un punto hidrófilo de una micropauta VTCS superhidrófoba-superhidrófila; (ii) Pauta de Rhodamine B-SH impresa en la superficie del VTCS mediante impresión de microcontacto; (iii) pauta FITC-SH en la superficie VTCS creada por detección capilar; (iv) Pautas de Rhodamine-SH y FITC-SH generadas usando DPN multiplexada sobre la superficie VTCS; (C) (i) una imagen de microscopio de una micropauta superhidrófoba-superhidrófila sumergida en agua; (ii) una imagen que muestra la matriz de gotas de agua sobre una micropauta superhidrófoba-superhidrófila; (iii) células HEK 293 pautadas con una micropauta superhidrófoba-superhidrófila (las imágenes se tomaron 24 horas después de la siembra de células); (iv) Mapa químico de ToFSIMS de una micropauta superhidrófoba-superhidrófila "doblemente clickada" (brillo: señal de NH_2 , oscuro: señal de CF_3).

Figura 26: Micrografías superficiales y de sección transversal y del SEM de la superficie superhidrófoba reactiva (barra de escala $1\text{ }\mu\text{m}$ en la imagen, 200 nm en el recuadro)

Figura 27: Espectros de transmitancia UV-Vis de un sustrato de cristal puro (a) y superficie superhidrófoba reactiva antes y después de la modificación de tiol-eno ((e) superficie SL, (f) superficie oleofóbica, (g) superficie SH reactiva).

A continuación se ilustra la invención presente adicionalmente respecto a los siguientes datos experimentales adicionales sin estar limitados a ellos.

EJEMPLOS

5

Materiales y métodos

El metacrilato de 2-hidroxietilo (HEMA) y el dimetacrilato de etileno (EDMA) fueron comprados a Sigma-Aldrich (Alemania) y fueron purificados usando una columna corta llena de óxido de aluminio básico para eliminar los inhibidores. Los colorantes alimentarios usados en las Figuras 5 se obtuvieron de August Thomsen Corp. (EE. UU.).
 10 Todos los demás productos químicos fueron comprados a Sigma-Aldrich (Alemania) y fueron usados sin ser purificados adicionalmente. Las células HeLa-GFP fueron compradas a Biocat (Alemania). El grupo tiol que contiene el péptido GFP (fluoresceína- β -Ala-GGGGC) fue obtenido de la Dra. Cornelia Lee-Thedieck en el Institute of Functional Interfaces en el Karlsruhe Institute of Technology. Las placas de cristal transparentes Nexterion B UV de Schott (Alemania) fueron usadas como sustratos para capas de polímeros. Las polimerizaciones y el fotoinjerto se
 15 llevaron a cabo con una fuente de luz colimada UV ultravioleta OAI Modelo 30 (San José, CA) equipada con una lámpara de Hg-xenón USHIO 500 W (Japón).

Caracterización

Las imágenes del SEM fueron obtenidas usando el microscopio electrónico de barrido LEO 1530 Gemini (Zeiss, Alemania) en el Instituto de Nanotecnología (INT), KIT. El voltaje de aceleración para la medición fue de 5 kV. Antes de la medición del SEM, las muestras fueron sometidas a un bombardeo iónico de una capa de oro de 30 nm usando un dispositivo de revestimiento automático por pulverización Cressington 108 "auto sputter coater" (INT, KIT). Los espectros Raman fueron obtenidos mediante un microscopio Raman confocal Bruker Senterra (Bruker Optics, Ettlingen, Alemania) en el Institute of Functional Interfaces (IFG), KIT que proporciona un láser NdYAG de frecuencia doble de $\lambda = 532$ nm, $P = 20$ mW como fuente de excitación. Las distribuciones de fragmentos de
 25 cisteamina y fragmentos perfluorados en la superficie fueron confirmadas mediante el tiempo de vuelo con espectrometría de masas de iones secundarios (ToF-SIMS) (ION TOF Inc., Münster, Alemania), IFG, KIT. Las pautas inversas llenas de solución de colorante de Rhodamine fueron obtenidas con un microscopio de espectroscopia Leica Confocal SPE. La pauta de fluoresceína-péptido y las células HeLa-GFP fueron visualizadas con un microscopio fluorescente Keyence BZ-9000 (Japón).

Los ángulos de humectancia fueron medidos usando el método de gota sésil con un dispositivo de fabricación casera de medición de ángulos. El ángulo de humectancia estático y los ángulos de humectancia dinámicos fueron medidos (el ángulo de contacto con el agua avanzado y ángulo de contacto con el agua retrocedido) en las superficies. Para la medición del ángulo de contacto con el agua estático, fueron usados 3 μ L de agua desionizada. Para las mediciones de los ángulos de contacto con el agua avanzado y retrocedido, la velocidad creciente o decreciente del volumen de agua fue controlada con una bomba de jeringa (Microliter Flow Modular Pump Component; Harvard Apparatus, Inc. EE. UU.) y se ajustó a 12 μ L/min. Las imágenes de las gotas de agua de la superficie fueron tomadas con una cámara digital UK 1115 de EHD image (Alemania). El software Image J con el conector Dropsnake fue usado para analizar las imágenes. Los valores informados del ángulo de humectancia son la media de al menos tres valores WCA de experimentos individuales. Se usó el software Image J con un conector 3D Viewer para crear imágenes en 3D a partir de los datos del Confocal Microscope SPE.

Preparación de películas de HEMA-EDMA porosas de un espesor de 12,5 μ m

Se empleó el procedimiento para fabricar capas de polímero nanoporoso HEMA-EDMA según se publicó en la Referencia [1]. Brevemente, se colocaron dos tiras de un espesor de 12,5 μ m de película de teflón (American Durafilm Co.) en los bordes de una placa de cristal modificada con metacrilato de un 3-(trimetoxisilil) propilo de (25x75x1mm, anchura x longitud x espesor) y fue aplicado un portaobjetos de cristal fluorado encima de ella. 70 μ L de mezcla de polimerización de HEMA (24% en peso), dimetacrilato de etileno (EDMA) (16% en peso), se inyectó en el molde 1-decanol (12% en peso), ciclohexanol (48% en peso) y 2,2-dimetoxi-2-fenilacetofenona (DMPAP) (fotoiniciador, 1% en peso respecto a los monómeros) entre los portaobjetos de cristal y se irradió durante 15 minutos con 12,0 mW \cdot cm⁻² 260 nm de luz UV. El molde fue abierto cuidadosamente con un bisturí a continuación. La superficie superficial no porosa resultante fue eliminada aplicando y retirando rápidamente la película adhesiva ("cinta Scotch") después de separar las placas mientras la capa estaba todavía húmeda. Se formó una superficie porosa homogénea. La placa fue lavada extensamente con etanol y se mantuvo en etanol durante algunos minutos.

La capa de polímero HEMA-EDMA resultante tiene una gran rugosidad superficial (porosidad del 50% y poros de 80 a 250 nm basados en el SEM, (Figura 3) y es altamente humectable con WCAs (Θ_{st}) estático, (Θ_{adv}) avanzado y (Θ_{rec}) retrocedido cercanos a $\sim 4,2^\circ$, $7,1^\circ$ y 0° , respectivamente

60

Preparación de películas de HEMA-EDMA no porosas de un espesor de 12,5 μ m

Se colocaron dos tiras de un espesor de 12,5 μ m de película de teflón (American Durafilm Co.) en los bordes de una placa de cristal modificada con metacrilato de 3-(trimetoxisilil) propilo (25x75x1 mm, ancho x longitud x espesor) y fue aplicado un portaobjetos de cristal fluorado en su parte superior. Se inyectaron 70 μ L de mezcla de polimerización de HEMA (60% en peso), EDMA (40% en peso) y 2,2-dimetoxi-2-fenilacetofenona (DMPAP) (fotoiniciador, 1% en peso con respecto a los monómeros) en el molde entre los portaobjetos de cristal y fueron

65

irradiadas durante 15 minutos con $12,0 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$ 260 nm de luz UV. El molde fue abierto cuidadosamente a continuación con un bisturí. La superficie no porosa resultante fue lavada extensamente con etanol y se mantuvo en etanol durante algunos minutos.

5 Preparación de HEMA-EDMA modificada con alquino

5 Dos placas de cristal recubiertas con una capa de HEMA-EDMA fueron sumergidas en 50 mL de solución de diclorometano que contenía ácido 4-pentinoico (111,6 mg, 1,14 mmol) y catalizador 4-(dimetilamino) piridina (DMAP) (56 mg, 0,46 mmol). A continuación, se añadió el reactivo de acoplamiento N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIC) (176,5 μL , 1,14 mmol) a la solución enfriada a aproximadamente 0°C , seguido de agitación de la solución a temperatura de la sala durante 4 horas. Las placas fueron lavadas extensamente a continuación con acetona y fueron mantenidas en etanol durante varios minutos, y fueron secadas seguidamente.

15 El análisis de la variación del WCA a lo largo del tiempo y dentro de la profundidad de la película de polímero verifica que la modificación prosigue completamente a través del espesor de la capa de polímero después de 4 horas de tiempo de reacción, según se muestra en la Figura 13. El Θ_{st} de la superficie de polímero aumenta de $4,2^\circ$ a 124° después de la esterificación. El intenso pico a 2120 cm^{-1} en el espectro Raman (Figura 15) confirma también la presencia de grupos alquino terminales en la superficie del polímero. Después de la modificación de la superficie, la capa de polímero mantiene su estructura nanoporosa y no se puede detectar ningún cambio significativo de la morfología, como lo demuestran las imágenes del SEM mostradas en la Figura 3. Debido al pequeño tamaño de los poros, la dispersión de la luz sobre la capa de polímero humedecido se reduce, lo que conduce a una transmitancia de la luz visible de más del 90%, según se muestra en la Figura 8.

25 Preparación de la HEMA-EDMA modificada con alqueno

25 Dos placas de cristal cubiertas con una capa de HEMA-EDMA fueron sumergidas en 50 mL de solución de diclorometano que contenía cloro(dimetil)vinilsilano (0,2 mL), trietilamina (1 ml) y el catalizador 4-(dimetilamino)piridina (DMAP) (56 mg, 0,46 mmol). A continuación, la mezcla fue agitada a la temperatura de la sala durante 30 s. Las placas fueron lavadas extensamente con acetona a continuación y fueron mantenidas en etanol durante varios minutos, siendo seguidamente secadas.

30 Reacciones "click" de tiol-ina y tiol-eno sobre la capa de polímero porosa

30 Según la solubilidad de un tiol, 1-dodecanotiol (5% en volumen) y 1H,1H,2H,2H-perfluorodecanotiol (5% en volumen) fueron disueltos en acetona, mientras que 2-mercaptoetanol (15% en volumen), hidrocloreto de cisteamina (15% en peso) y ácido 3-mercaptopropiónico (15% en volumen) fueron disueltos en etanol. Estas soluciones de tiol no fueron desgasificadas antes de ser usadas.

35 La capa de polímero de alquino poroso fue humedecida con la solución de tiol respectiva y se cubrió con un portaobjetos de cuarzo fluorado (25x75x1 mm, ancho x largo x espesor). Todas las fabricaciones de capas superhidrófobas o superhidrófilas que usan reacciones de tiol-ino o tiol-eno fueron realizadas por radiación de UV ($12,0 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$, 260 nm) sin fotoiniciador en condiciones ambientales de laboratorio. Después de las reacciones, las muestras fueron lavadas extensivamente con acetona y secadas con una pistola de nitrógeno.

45 Para estudiar la cinética de las reacciones de tiol-ino o de tiol-eno en la capa de polímero de alquino o de alqueno, las capas de polímero fueron humedecidas con una solución de tiol respectiva, fueron cubiertas con un portaobjetos de cuarzo fluorado y se irradiaron con luz UV durante diferentes tiempos. Los tiempos de exposición a la luz de UV fueron controlados por un controlador de tiempo (OAI 150 Exposure Timer). El tiempo de exposición mínimo es 0,1 s. Después de la reacción, las muestras fueron lavadas extensivamente con acetona y se secaron con una pistola de nitrógeno. A continuación se midieron los WCA estáticos de las superficies de polímero.

50 En las Figuras 17a, 17b y 17c se muestran varios estudios cinéticos, en donde se ofrecen las modificaciones superficiales de la capa de polímero poroso funcionalizado con alquino usando las reacciones de tiolinas fotoinducidas. Los WCA estáticos (Θ_{st}) de la capa de polímero se analizan con la modificación usando: (en la Figura 17a) cisteamina con (★) o sin (■) fotoiniciador DMPAP y con DMPAP pero sin radiación UV (●); (en la Figura 17b) cisteamina (■), 3-ácido mercaptopropiónico (●), 2-mercaptoetanol (◆), 1H,1H,2H,2H-perfluorodecanotiol (▼) y 1-dodecanotiol (▲) sin DMPAP tras la radiación UV.

55 Según se puede deducir de estos resultados, la misma reacción sin el fotoiniciador requiere solo 5 s para la modificación de la superficie de la capa de polímero poroso funcionalizado con alquino y no se produce reacción sin luz UV. Sin la radiación UV, los WCA de la superficie no cambian en absoluto, incluso en presencia del fotoiniciador, lo que indica que no hay fisisorción de los tioles en la superficie. La Figura 17b muestra la cinética rápida del método según la cual se puede llevar a cabo una modificación de la superficie sin iniciador. Además, la capacidad de usar diferentes tioles para crear superficies superhidrófobas o superhidrófilas está demostrada mediante los resultados que se ilustran en la Figura 17b.

65 Además, la modificación de la superficie con 1-dodecanotiol hidrófobo o 1H,1H,2H,2 H-perfluorodecanotiol dota a la superficie porosa con superhidrofobicidad (Θ_{adv} , Θ_{st} y Θ_{rec} llegan a alcanzar los 171° , 169° y 162° , o 173° , 170° y 164° , respectivamente). En los espectros Raman, se observa una fuerte disminución de las bandas de alquino a

aproximadamente 2120 cm^{-1} , según se muestra en la Figura 4. No hay señal de la especie de sulfuro de vinilo, lo que da como resultado que una señal a aproximadamente 1657 cm^{-1} es detectada, según se muestra en la Figura 17c, que indica la conversión completa de los grupos alquino al aducto 1,2-ditioéter.

5 Para probar la capacidad de uso de la funcionalización de la superficie basada en tiol-ino en diferentes disolventes, la superficie de la capa de polímero poroso funcionalizado con alquino fue modificada usando ácido 3-mercaptopropiónico disuelto en varios disolventes comunes, según se muestra en la Figura 19. Basándose en las mediciones del ángulo de contacto con el agua, la reacción prosiguió dentro de 5 s en etanol, acetona, acetato de etilo, DCM, THF y agua. La capa de polímero poroso modificado inicialmente con alquino hidrófobo ha sido modificada en la superficie superhidrófila después de sólo 5 s de radiación UV sin usar un fotoiniciador. La reacción en DMF y en DMSO requiere 15 s de la radiación UV para hacer que la superficie sea superhidrófila.

10 Con el fin de mostrar el efecto de la porosidad sobre la fabricación de las superficies superhidrófilas y superhidrófobas, usando la reacción de tiol-ino en las mismas condiciones que se describen en los estudios cinéticos mostrados en las Figuras 17, la funcionalización de una superficie HEMA-EDMA no porosa modificada con alquino con cisteamina conduce a una disminución del Θ_{st} de 63° a 44° y la funcionalización con 1H,1H,2H,2H-perfluorodecanotiol conduce a un aumento del Θ_{st} de 63° a 110° después de 5 s de radiación UV.

15 Preparación de micropautas superhidrófobas-superhidrófilas por medio de fotopautado click
Se presenta un ejemplo típico para la preparación de micropautas superhidrófobas-superhidrófilas usando reacciones de tiol-ino subsiguientes. Primero, la capa de polímero de alquino poroso fue humedecida con una solución de acetona que contenía un 5% en volumen de 1H,1H,2H,2H-perfluorodecanotiol, cubierta con un portaobjetos de cuarzo fluorado, y fue irradiada con luz UV a través de una fotomáscara durante 15 segundos. Después de retirar la fotomáscara, de lavarla con acetona y de secarla, la capa de polímero fue humedecida con una solución de etanol que contenía hidrocloreuro de cisteamina al 15% en peso y fue irradiada con luz UV durante otros 15 s. Finalmente, la placa fue lavada extensivamente con acetona y se secó con una pistola de nitrógeno.

20 Después de la primera reacción, la superficie fluorada expuesta mostró una superhidrofobicidad con Θ_{st} , Θ_{adv} y Θ_{rec} que llegaron a alcanzar los 170° , 173° y 164° , respectivamente, mientras que los Θ_{st} de las zonas funcionalizadas con alquino no expuestas se mantuvieron a 124° . Después de la segunda reacción con cisteamina, los Θ_{st} de las zonas de alquino se redujeron a $4,4^\circ$. En cuanto a las zonas fluoradas, el WCA retrocedido disminuyó sólo un 2° , mientras que el WCA avanzado no cambió en absoluto y la superficie mantuvo la superhidrofobicidad, lo que confirma la casi totalidad de la reacción del primer paso.

25 Para mejorar aún más este método y evitar la posible modificación de los grupos alquino residuales que permanecen después del primer paso de la modificación, se usó una solución de etanol-agua (1: 1) en lugar de etanol puro para disolver la cisteamina. En este caso, el ángulo de contacto (Θ_{st}) de la solución etanol-agua en las superficies funcionalizadas con alquino y fluoradas (= superhidrófobas) fue 0° y $135 \pm 3^\circ$, respectivamente. Por tanto, la solución de cisteamina solo puede humedecer las zonas funcionalizadas con alquino que tienen $\Theta_{st} = 0^\circ$, mientras que las zonas fluoradas permanecen secas, según se muestra en la Figura 20. Este método simple impide completamente la inmovilización del compuesto de tiol en las zonas superhidrófobas durante el segundo paso de la modificación, como también se confirma mediante el tiempo de vuelo con espectrometría de masas de iones secundarios (ToF-SIMS) (véase la Figura 21A)

30 Preparación de pautas inversas
Se crearon pautas con puntos superhidrófobos y barreras superhidrófilas cambiando el orden de los tioles usados para la funcionalización y usando el mismo método y la misma fotomáscara (véanse las Figuras 21B y 21C).

35 Uso del método de pautado con tiol-ino para crear pautas de péptidos
La capa porosa de alquino HEMA-EDMA fue humedecida en primer lugar con una solución de agua/etanol 9/1. A continuación, la placa fue lavada extensivamente con agua pura para reemplazar la solución de etanol-agua con agua. El exceso de agua fue retirado de la superficie y $10\ \mu\text{L}$ de la solución de péptido acuosa (fluoresceína- β -Ala-GGGGC, $0,25\text{ mg/ml}$) fueron depositados sobre la superficie. El sustrato fue cubierto con una lámina de cuarzo fluorado y una fotomáscara. La capa de polímero fue irradiada a continuación con luz ultravioleta a través de una fotomáscara durante 15 s (6 mW/cm^2 , 260 nm). A continuación, la placa fue lavada extensivamente con etanol y se secó con una pistola de nitrógeno (véase la Figura 22).

40 Micromatriz celular
Se cultivaron células Hela-GFP en DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) que contenía 10% de suero fetal bovino (FBS). Se obtuvo una suspensión de células tripsinizando un cultivo confluyente (monocapa al 80%) cultivado en una placa Petri en una incubadora (37° C , 5% de CO_2) durante 2 - 3 días. Para la esterilización, el sustrato de cristal con una pauta superhidrófoba-superhidrófila se mantuvo en etanol durante 20 minutos, se secó al aire y se dispuso en una placa Petri de 10 mL. A continuación, se agregaron 5 mL de suspensión celular para que la placa estuviera completamente cubierta (densidad de siembra: $12100\text{ células}\cdot\text{cm}^{-2}$). La matriz sembrada fue cultivada en la incubadora durante 2 días.

Ensayo de estabilidad

Para probar la estabilidad de las superficies superhidrófobas y superhidrófilas de la micropauta, varias condiciones han sido examinadas. En la Figura 23, el resultado de los ensayos de estabilidad de superficies superhidrófobas en aire, amortiguador PBS, solución DMEM con 10% de FBS, que con frecuencia se usa en los cultivos celulares, y se usan entornos de soluciones de agua ácida (pH = 5) y básica (pH = 10) durante 120 horas. En la Figura 23A, se muestran los WCA estáticos de superficies superhidrófobas en función del tiempo de incubación en diferentes entornos, lo que indica que los WCA estáticos de las superficies en el aire, el amortiguador PBS y las soluciones de agua ácidas y básicas permanecen por encima de 160° después de 120 horas de incubación. Debido a la adsorción de proteínas, el WCA estático de la superficie en la solución DMEM + FBS disminuye. Además, en la Figura 23B, se muestran los WCA avanzado y retrocedido de las superficies después de la incubación durante 120 horas en diferentes entornos. Los WCA avanzados permanecen casi iguales después de la incubación. Los WCA retrocedidos de la superficie en un amortiguador PBS, en soluciones ácidas y básicas de agua decrecen ligeramente.

Migración celular

Se sembraron células Hela-GFP en una matriz de puntos superhidrófilas y barreras superhidrófobas y se incubaron durante 2 días. Las Figuras 10 a 11 muestran que las células se adhieren bien a los micropuntos superhidrófilos, lo que demuestra la biocompatibilidad y la no toxicidad de la superficie. Sin embargo, menos del 1% de las células ocupa las regiones superhidrófobas que separan las zonas de micropuntos después de 2 días de cultivo.

Preparación de la superficie fotoclickable y superhidrófoba, transparente

Los sustratos activados con plasma de oxígeno fueron sumergidos en una solución de revestimiento que consistía en tolueno, viniltriclorosilano (~1000 ppm) y trazas de agua (~200 ppm). Tras la inmersión, el viniltriclorosilano experimenta un proceso de policondensación que conduce a la formación de nanofilamentos 3D injertados en la superficie sobre los sustratos.

Lista de referencias:

- [1] F. L. Geyer, E. Ueda, U. Liebel, N. Grau, P. A. Levkin, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2011, 50, 8424.
- [2] E. Ueda, F. L. Geyer, V. Nedashkivska, P. A. Levkin, *Lab. Chip* 2012, 12, 5218.
- [3] a) J. Ziauddin, D. M. Sabatini, *Nature* 2001, 411, 107; b) E. Ueda, P. A. Levkin, *Adv. Healthcare Mater.* 2013, DOI: 10.1002/adhm.201300073.
- [4] a) V. Jokinen, R. Kostianen, T. Sikanen, *Adv. Mater.* 2012, 24, 6240; b) S. P. R. Kobaku, A. K. Kota, D. H. Lee, J. M. Mabry, A. Tuteja, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2012, 51, 10109; c) H. Mertaniemi, V. Jokinen, L. Sainiemi, S. Franssila, A. Marmur, O. Ikkala, R. H. A. Ras, *Adv. Mat* 2011, 23, 2911.
- [5] W. Song, A. C. Lima, J. F. Mano, *Soft Matter* 2010, 6, 5868.
- [6] a) S. Xing, R. S. Harake, T. Pan, *Lab Chip* 2011, 11, 3642; b) Y. Han, P. Levkin, I. Abarientos, H. Liu, F. Svec, J. M. J. Freüchet, *Anal. Chem.* 2010, 82, 2520; c) E. Ueda, P. A. Levkin, *Adv. Mater.* 2013, 25, 1234.
- [7] a) K. Tadanaga, J. Morinaga, A. Matsuda, T. Minami, *Chem. Mater.* 2000, 12, 590; b) X. Zhang, H. Kono, Z. Liu, S. Nishimoto, D. A. Tryk, T. Murakami, H. Sakai, M. Abe, A. Fujishima, *Chem. Commun.* 2007, 46, 4949; c) G. Kwak, M. Lee, K. Yong, *Langmuir*, 2010, 26, 9964; d) X. Zhang, M. Jin, Z. Liu, D. A. Tryk, S. Nishimoto, T. Murakami, A. Fujishima, *J. Phys Chem C* 2007, 111, 14521; e) Y. Lai, J. Huang, J. Gong, Y. Huang, C. Wang, Z. Chen, C. Lin, *J. Electrochem Soc* 2009, 156, D480; f) S. Nishimoto, H. Sekine, X. Zhang, Z. Liu, K. Nakata, T. Murakami, Y. Koide, A. Fujishima, *Langmuir* 2009, 25, 7226; g) Y. Lai, C. Lin, H. Wang, J. Huang, H. Zhuang, L. Sun, *Electrochem. Commun* 2008, 10, 387; h) S. Nishimoto, A. Kubo, K. Nohara, X. Zhang, N. Taneichi, T. Okui, Z. Liu, K. Nakata, H. Sakai, T. Murakami, M. Abe, T. Komine, A. Fujishima, *Appl. Surf. Sci.* 2009, 255, 6221; i) K. Nakata, S. Nishimoto, Y. Yuda, T. Ochiai, T. Murakami, A. Fujishima, *Langmuir*, 2010, 26, 11628; j) T. Ishizaki, N. Salto, O. Takai, *Langmuir*, 2010, 26, 8147
- [8] S. J. Pastine, D. Okawa, B. Kessler, M. Rolandi, M. Llorente, A. Zettl, J. M. J. Frechet, *J. Am. Chem. Soc.* 2008, 130, 4238.
- [9] a) L. Sainiemi, V. Jokinen, A. Shah, M. Shpak, S. Aura, P. Suvanto, S. Franssila, *Adv. Mater.* 2011, 23, 122; b) V. Jokinen, L. Sainiemi, S. Franssila, *Adv. Mater.* 2008, 20, 3453; c) R. P. Garrod, L. G. Harris, W. C. E. Schofield, J. McGettrick, L. J. Ward, D. O. H. Teare, J. P. S. Badyal, *Langmuir* 2007, 23, 689.
- [10] a) L. Zhai, M. C. Berg, F. C. Cebeci, Y. Kim, J. M. Milwid, M. F. Rubner, R. E. Cohen, *Nano Lett.* 2006, 6, 1213; b) J. S. Li, E. Ueda, A. Nallapaneni, L. X. Li, P. A. Levkin, *Langmuir* 2012, 28, 8286; c) Y. Lai, F. Pan, C. Xu, H. Fuchs, L. Chi, *Adv. Mater.* 2013, 25, 1682.
- [11] S. M. Kang, I. You, W. K. Cho, H. K. Shon, T. G. Lee, I. S. Choi, J. M. Karp, H. Lee, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2010, 49, 9401.
- [12] D. Zahner, J. Abagat, F. Svec, J. M. J. Fréchet, P. A. Levkin, *Adv. Mater.* 2011, 23, 3030.
- [13] U. Manna; A. H. Broderick, D. M. Lynn, *Adv. Mater.* 2012, 24, 4291.
- [14] a) R. Hoogenboom, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2010, 49, 3415; b) B. D. Fairbanks, T. F. Scott, C. J. Kloxin, K. S. Anseth, C. N. Bowman, *Macromolecules* 2008, 42, 211; c) N. S. Bhairamadgi, S. Gangarapu, M. A. Caipa Campos, J. M. J. Paulusse, C. J. M. van Rijn, H. Zuilhof, *Langmuir*, 2013, 29, 4535.
- [15] a) R. M. Hensarling, V. A. Doughty, J. W. Chan, D. L. Patton, *J. Am. Chem. Soc.* 2009, 131, 14673; b) A. Massi, D. Nanni, *Org. Biomol. Chem.* 2012, 10, 3791.
- [16] M. Guerrouache, S. Mahouche-Chergui, M. M. Chehimi, B. Carbonnier, *Chem. Commun.* 2012, 48, 7486.
- [17] a) B. Neumann, T. Walter, JK Heriche, J. Bulkescher, H. Erfle, C. Conrad, P. Rogers, I. Poser, M. Held, U. Liebel, C. Cetin, F. Sieckmann, G. Pau, R. Kabbe, A. Wunsche, V. Satagopam, M.H.A. Schmitz, C. Chapuis,

DW Gerlich, R. Schneider, R. Eils, W. Huber, JM Peters, AA Hyman, R. Durbin, R. Pepperkok, J. Ellenberg, Nature 2010, 464, 721-727; b) H. Erfle, B. Neumann, P. Rogers, J. Bulkescher, J. Ellenberg, R. Pepperkok, J. Biomol. Screen. 2008, 13,575-580.

5 [18] H. Erfle, B. Neumann, U. Liebel, P. Rogers, M. Held, T. Walter, J. Ellenberg, R. Pepperkok, Nature Protocols 2007, 2, 392-399.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para modificar una superficie de un sustrato poroso o una superficie de un sustrato con una rugosidad superficial específica creada en un paso de funcionalización para formar una superficie superhidrófoba al menos en partes del sustrato, comprendiendo:
- 10 un paso de funcionalización para funcionalizar al menos la superficie del sustrato uniendo covalentemente un compuesto que contiene un grupo alquino o alqueno a ella para formar un sustrato poroso funcionalizado con alquino o con alqueno, en donde el compuesto que contiene el grupo alquino o el alqueno representa una fracción monomérica,
- 15 un primer paso de la modificación para modificar la superficie funcionalizada con alquino o con alqueno haciendo reaccionar los grupos alquino o alqueno con al menos un primer compuesto, seleccionado del grupo que consiste en tioles y disulfuros, en donde el primer paso de la modificación es llevado a cabo al menos en partes de la superficie, del sustrato y con radiación UV,
- 20 un segundo paso de la modificación de zonas sin modificar de la superficie funcionalizada con alquino o con alqueno haciendo reaccionar grupos alquino o alqueno sin reaccionar con al menos un segundo compuesto, seleccionado del grupo que consiste en tioles y disulfuros, en donde el segundo paso de la modificación es llevado a cabo con radiación UV en partes de la superficie del sustrato no modificadas en el primer paso de la modificación, en donde se forman zonas superhidrófobas en la superficie en el paso de funcionalización y/o en el primer paso de la modificación o en el segundo paso de la modificación, en donde
- 25 - el primer paso de la modificación para modificar la superficie funcionalizada con alquino o con alqueno es llevado a cabo haciendo reaccionar los grupos alquino o alqueno con el primer compuesto representado por las fórmulas generales R^1 -SH o R^1 -S-S- R_x usando una fotomáscara, creando de esta manera una pauta de zonas superhidrófilas en la superficie, y
- 30 el segundo paso de la modificación para modificar las zonas sin modificar de la superficie funcionalizada con alquino o con alqueno es llevado a cabo haciendo reaccionar los grupos alquino o alqueno sin reaccionar con el segundo compuesto representado por las fórmulas generales R^2 -SH o R^2 -S-S- R_x , creando de esta manera zonas superhidrófobas en la superficie, o
- 35 - el primer paso de la modificación para modificar la superficie funcionalizada con alquino o con alqueno es llevado a cabo haciendo reaccionar los grupos alquino o alqueno con el primer compuesto representado por las fórmulas generales R^1 -SH o R^1 -S-S- R_x usando una fotomáscara, creando de esta manera una pauta de zonas superhidrófobas en la superficie, y
- 40 el segundo paso de la modificación para modificar las zonas sin modificar de la superficie funcionalizada con alquino o con alqueno es llevado a cabo haciendo reaccionar los grupos alquino o alqueno sin reaccionar con el segundo compuesto representado por las fórmulas generales R^2 -SH o R^2 -S-S- R_x , creando de esta manera zonas superhidrófilas en la superficie, en donde R^1 , R^2 y R_x representan residuos hidrófilos o hidrófobos,
- 45 en donde los residuos hidrófilos representados por R^1 y R^2 son al menos un miembro representado por la fórmula general Q-X, en donde Q representa un grupo alquilo C_1 - C_6 sustituido o no sustituido, que puede contener uno o más heteroátomos seleccionados de O, N, P y S, y X representa un grupo (poli)hidroxilo, un grupo (poli)amina, un grupo (poli)amida, un grupo (poli)carboxilo o una fracción de azúcar, y
- 50 en donde los residuos hidrófobos representados por R^1 y R^2 son al menos un miembro de un grupo alquilo C_6 - C_{30} ramificado o cíclico, lineal, polifluorado o no fluorado, sustituido o no sustituido; un grupo alqueno C_6 - C_{30} ramificado o cíclico, lineal, polifluorado o no fluorado, sustituido o no sustituido; un grupo arilo C_6 - C_{30} , polifluorado o no fluorado, sustituido o no sustituido;
- 55 en donde el ángulo de contacto con el agua estático (WCA) (Θ_{st}) de las zonas superhidrófobas en la superficie es 150° o más, y la histéresis del ángulo de contacto (CAH) es 10° o menos; y el WCA estático (Θ_{st}) de las zonas superhidrófilas en la superficie es 10° o menos.
- 60 2. El método según la reivindicación 1, en donde la radiación UV es llevada a cabo desde 0,25 s a menos de 30 minutos.
- 65 3. El método según la reivindicación 1 o 2, en donde las zonas superhidrófobas de la superficie son formadas al menos en el paso de funcionalización usando un compuesto que contiene un grupo alqueno, y en donde el al menos un primer compuesto, seleccionado del grupo que consiste en tioles y disulfuros, usado en el primer paso de la modificación contiene al menos una fracción funcional diferente del compuesto que contiene el grupo alqueno, creando de esta manera una pauta de zonas superhidrófobas en la superficie.
4. El método según la reivindicación 3, en donde el compuesto que contiene el grupo alqueno es un compuesto que contiene silicio que tiene al menos un grupo vinilo.

5. Una superficie modificada que se puede obtener mediante el método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, comprendiendo una pauta de zonas superhidrófilas y superhidrófobas.
6. El uso de la superficie modificada según la reivindicación 5 como un revestimiento autolimpiante, un revestimiento antiincrustación, un revestimiento resbaladizo, o para aplicaciones químicas, biológicas y de diagnóstico.

Fig. 1

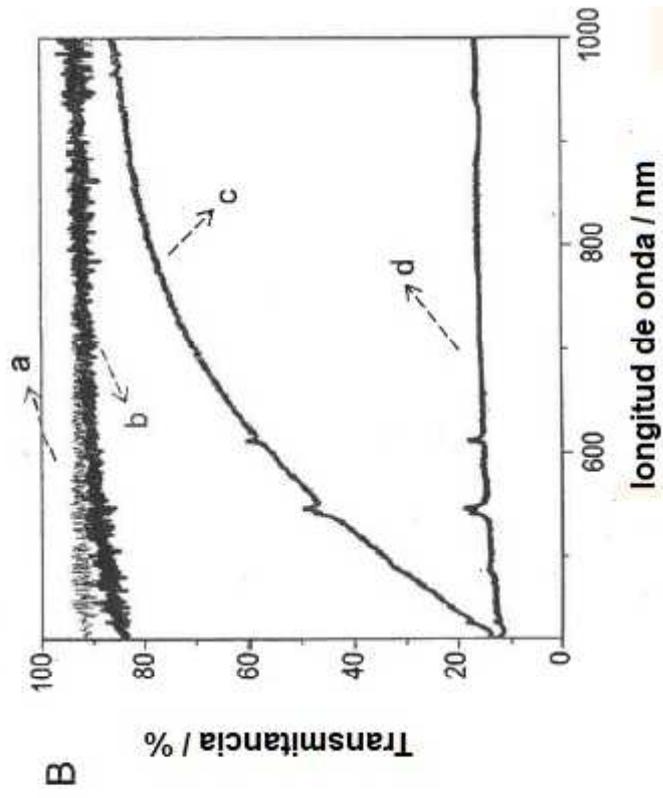


Fig. 1



- 1) HS-R
2) 2h ν
- 1) R-S-S-R
2) h ν

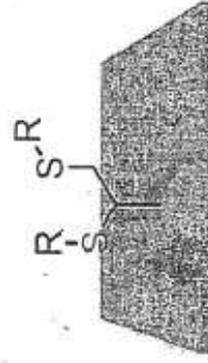
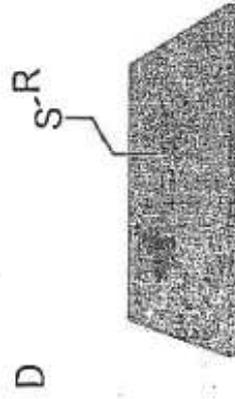


Fig. 2

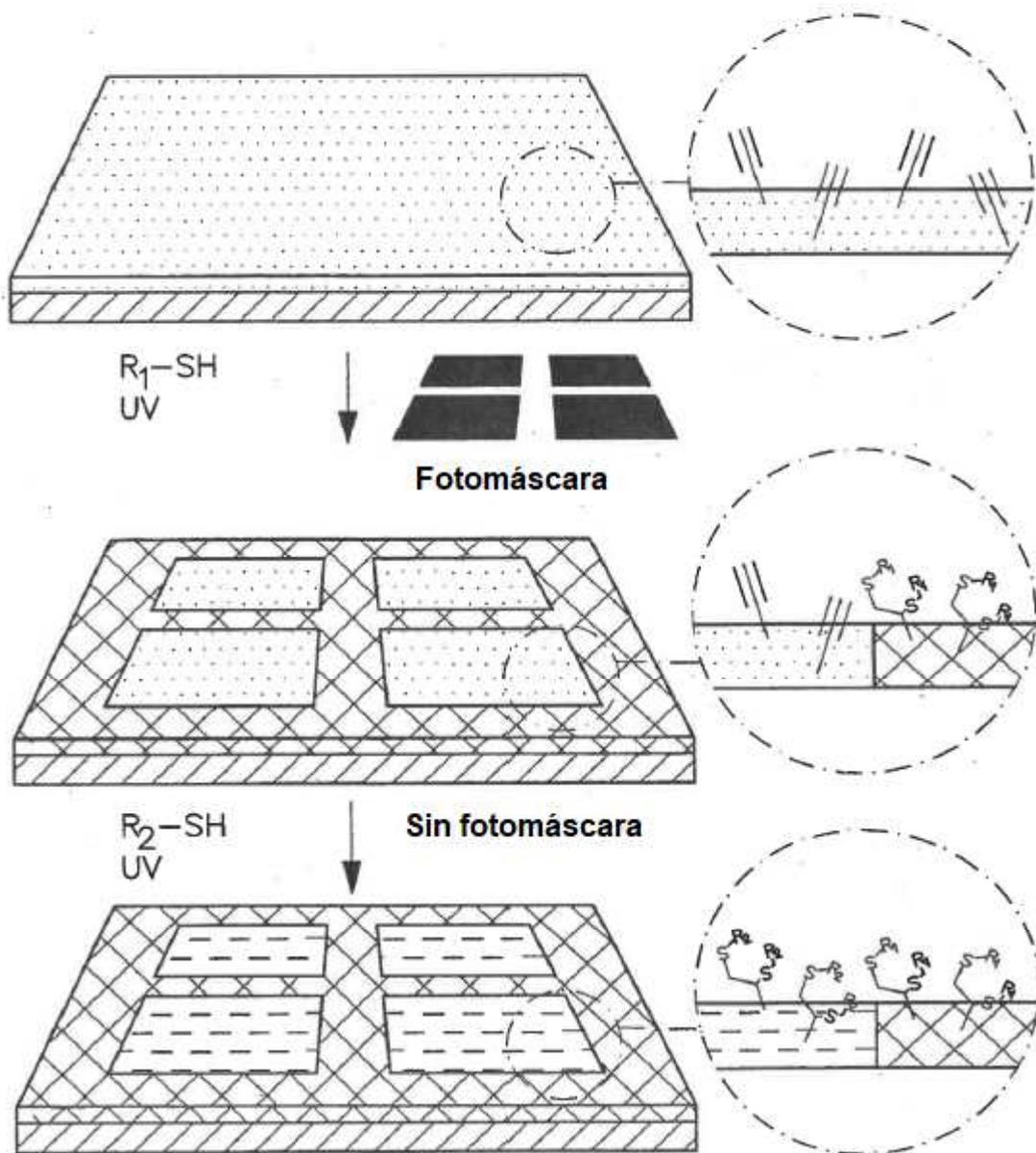
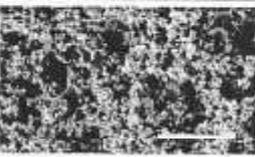
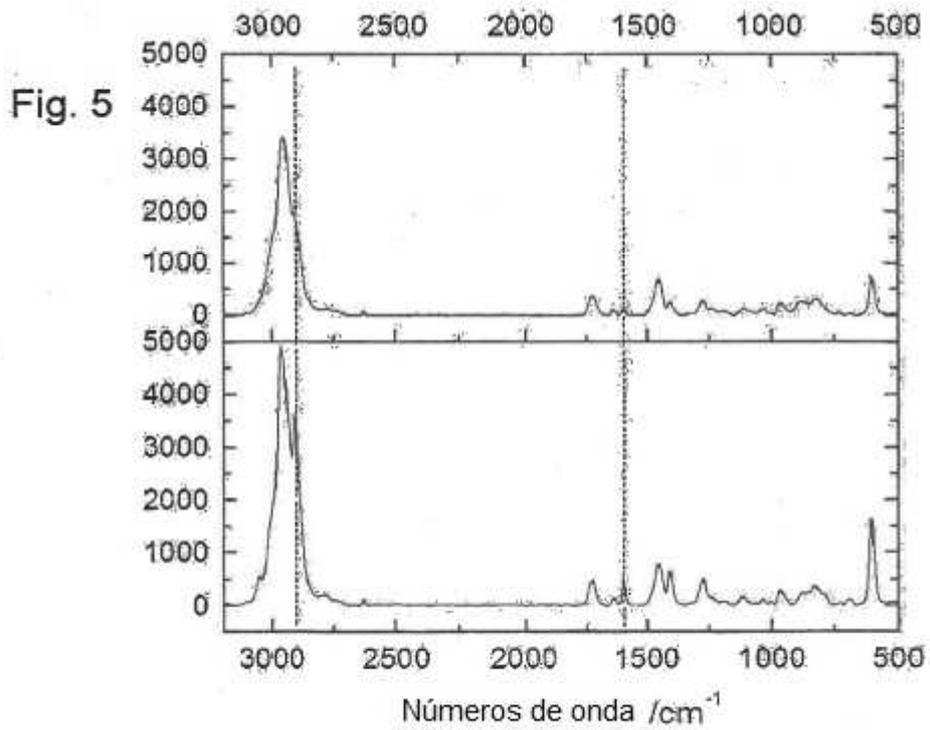
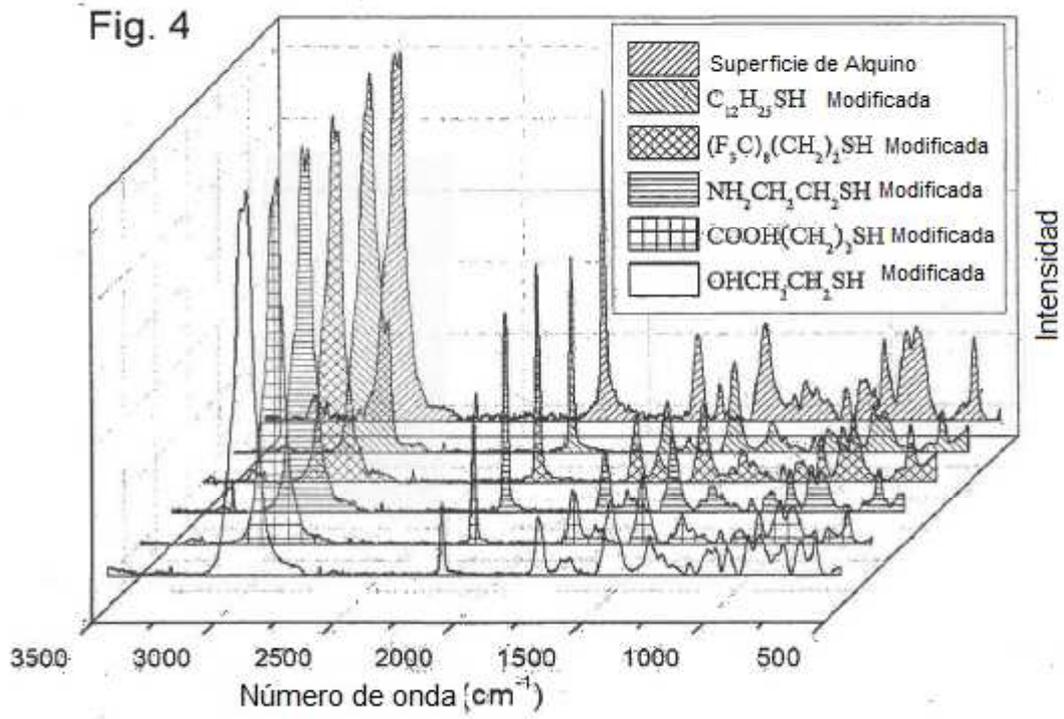


Fig. 3

HEMA-EDMA	$\Theta_{st}=4.2^\circ$ 	
Superficie de alquino	$\Theta_{st}=124^\circ$ 	
HS-(CH ₂) ₁₀ CH ₃	$\Theta_{st}=169^\circ$ 	
HS-(CH ₂) ₇ CF ₃	$\Theta_{st}=170^\circ$ 	
HS-CH ₂ -CH ₂ -OH	$\Theta_{st}=5.2^\circ$ 	
HS-CH ₂ -CH ₂ -NH ₂	$\Theta_{st}=4.4^\circ$ 	
HS-CH ₂ -CH ₂ -COOH	$\Theta_{st}=5.0^\circ$ 	



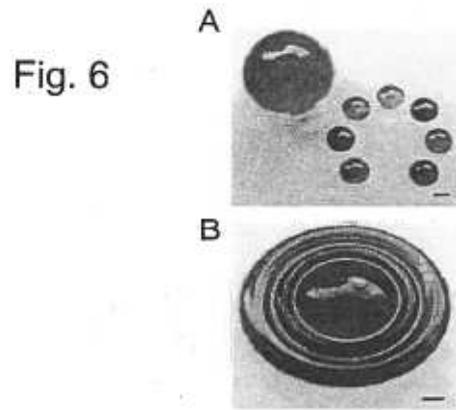


Fig. 7

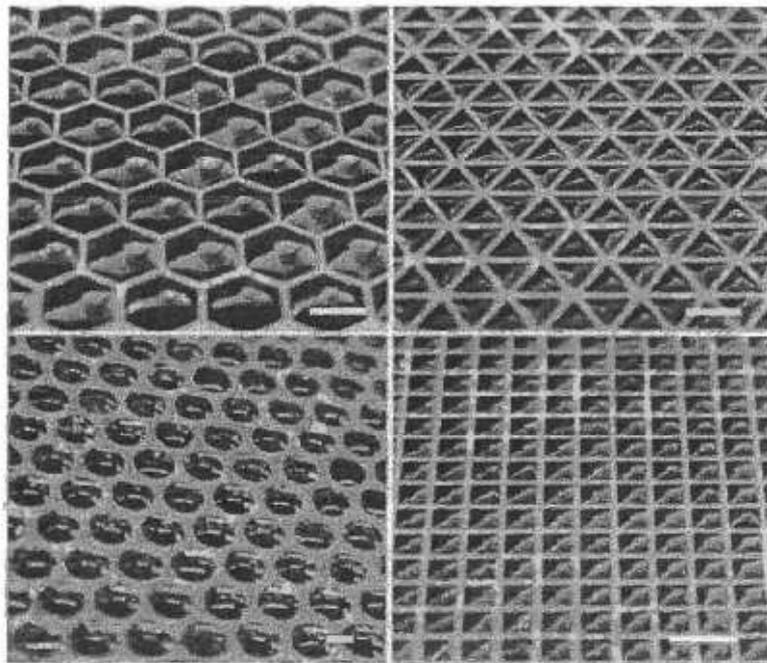


Fig. 8

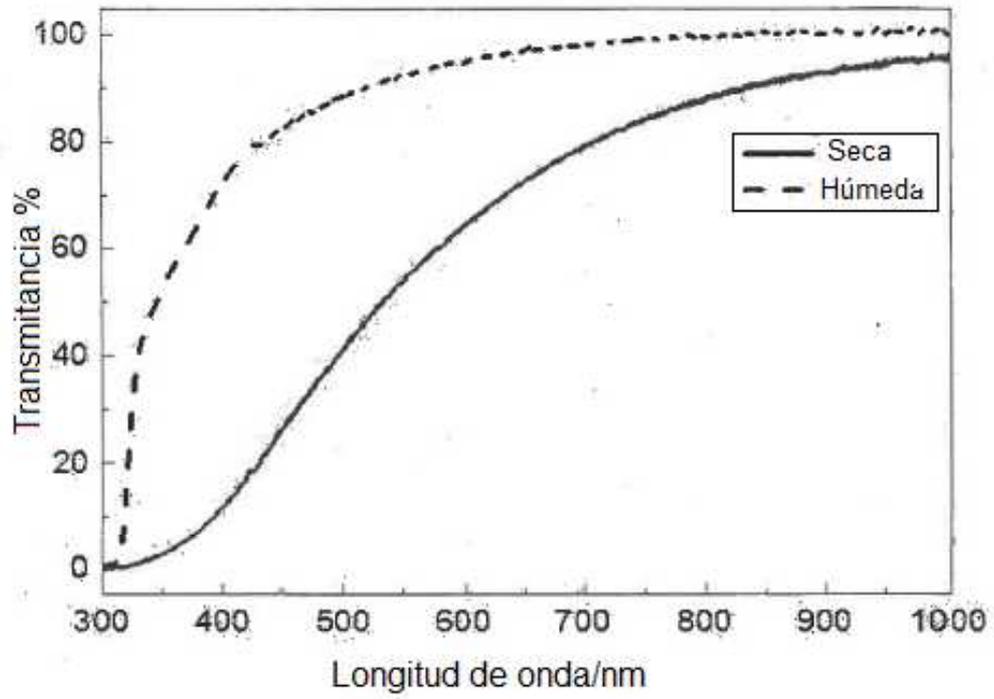


Fig. 9

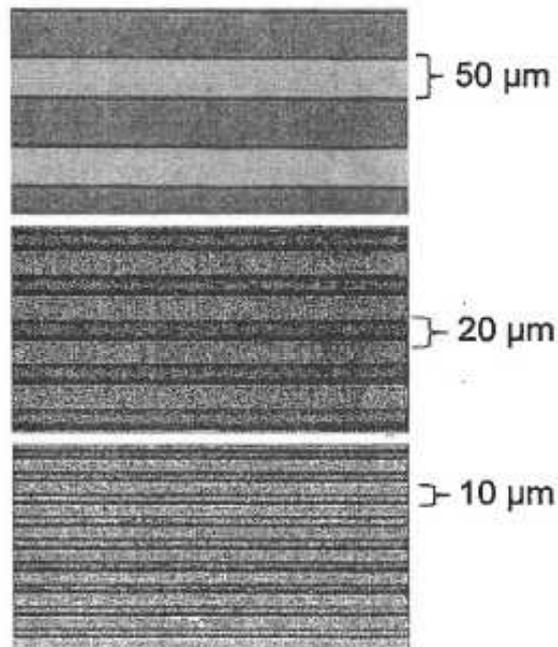


Fig. 10

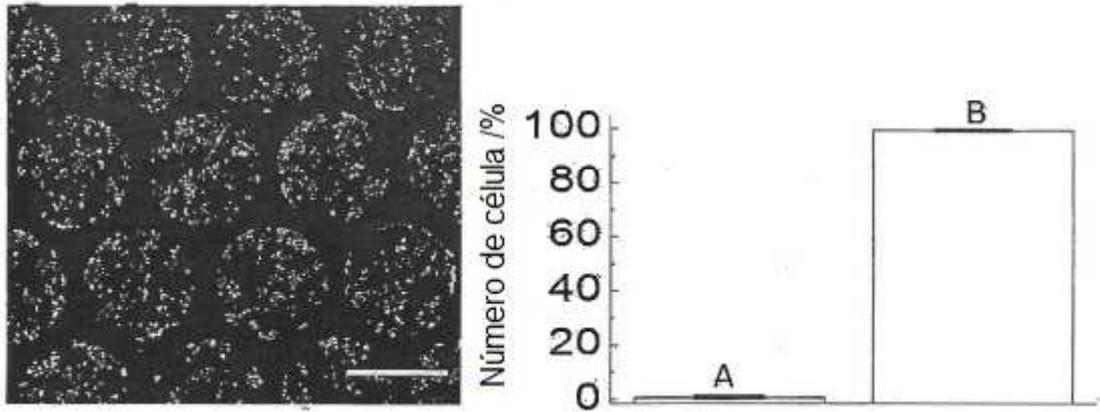


Fig. 11

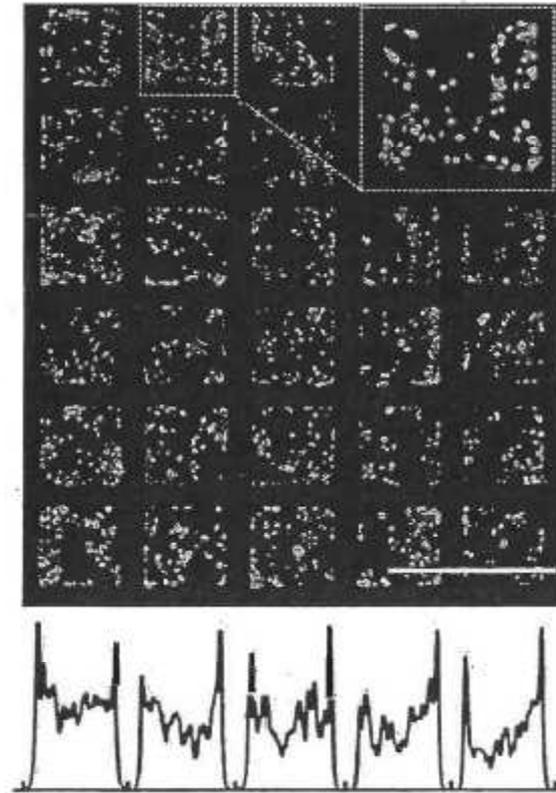


Fig. 12

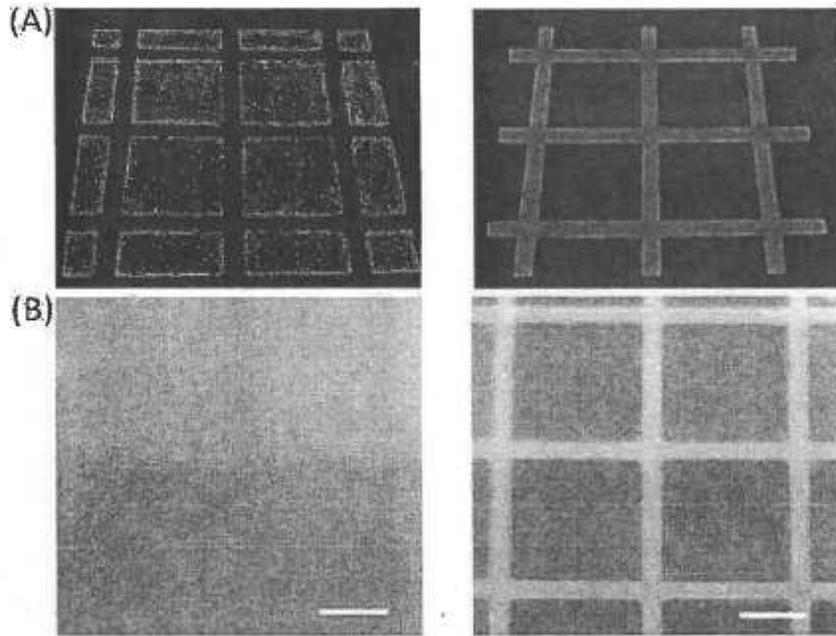
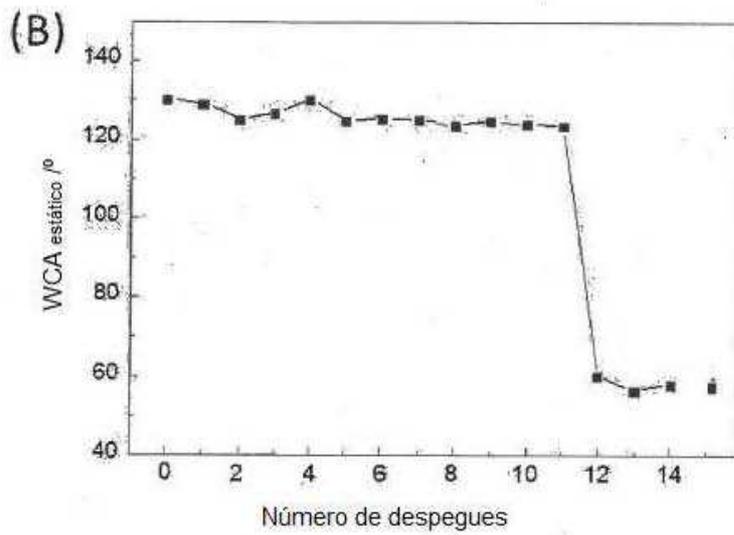
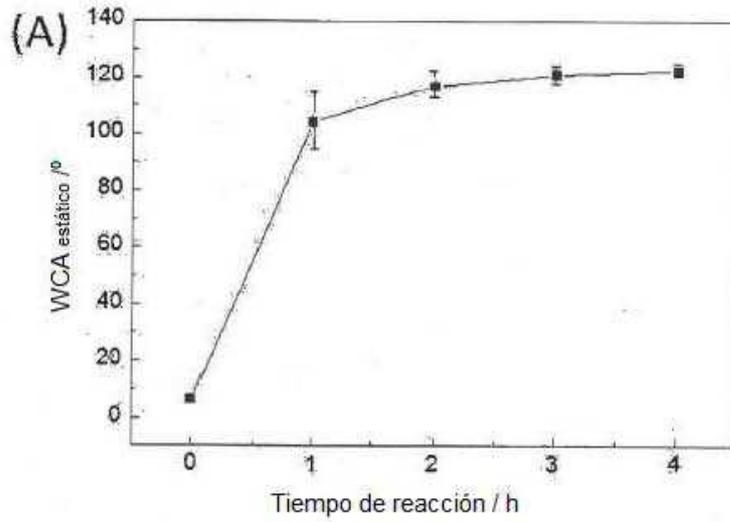


Fig. 13



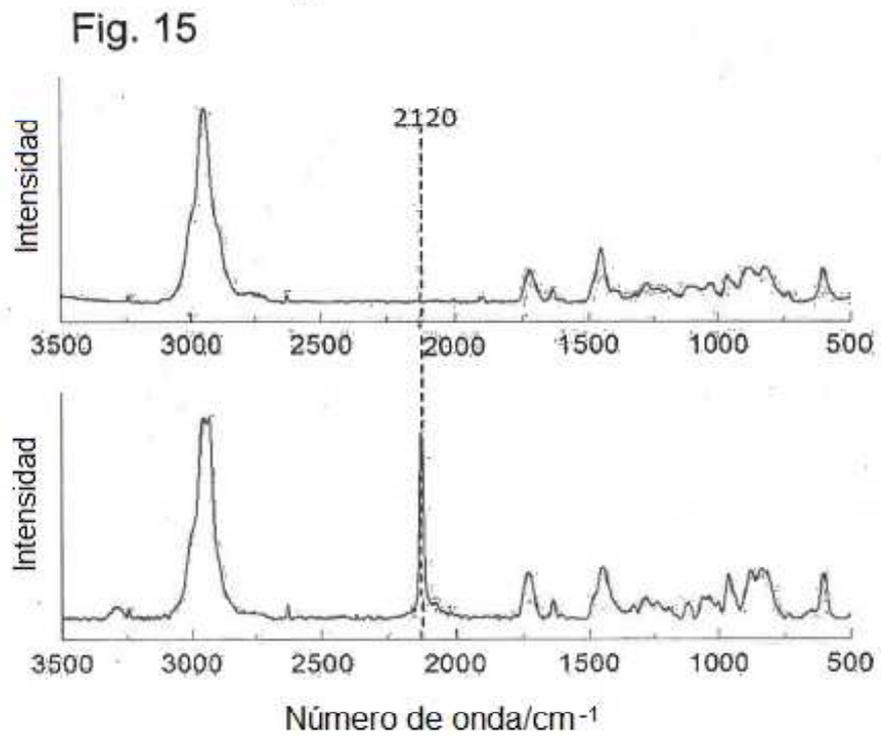
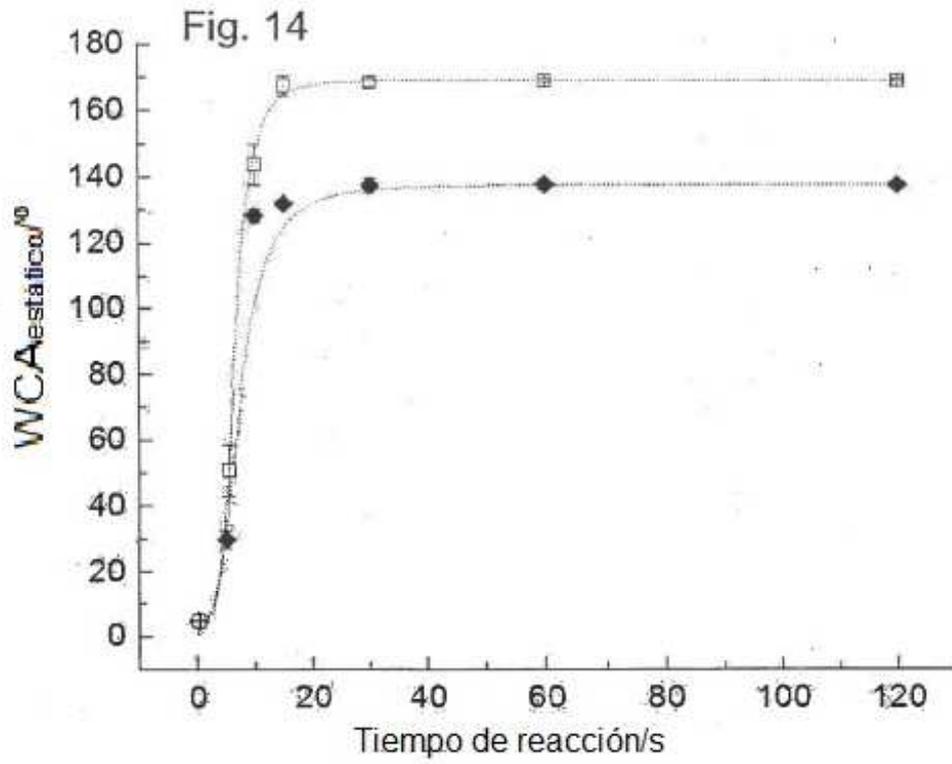


Fig. 16

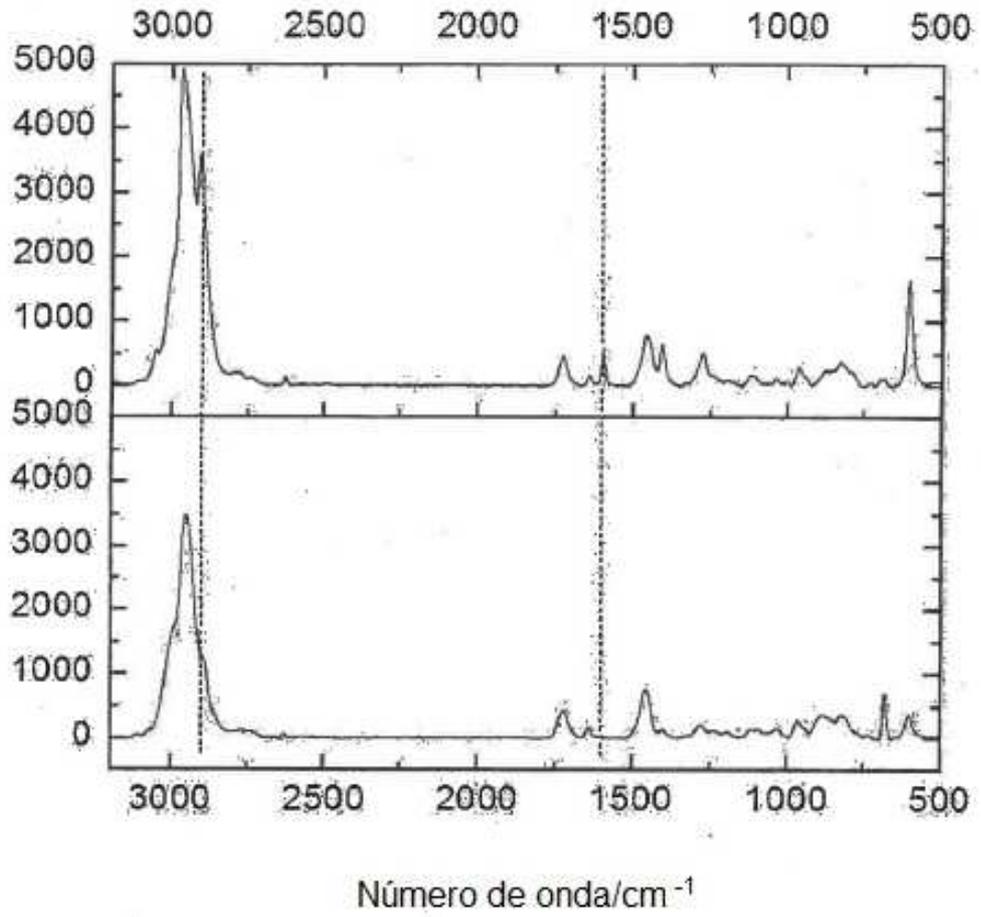


Fig. 17

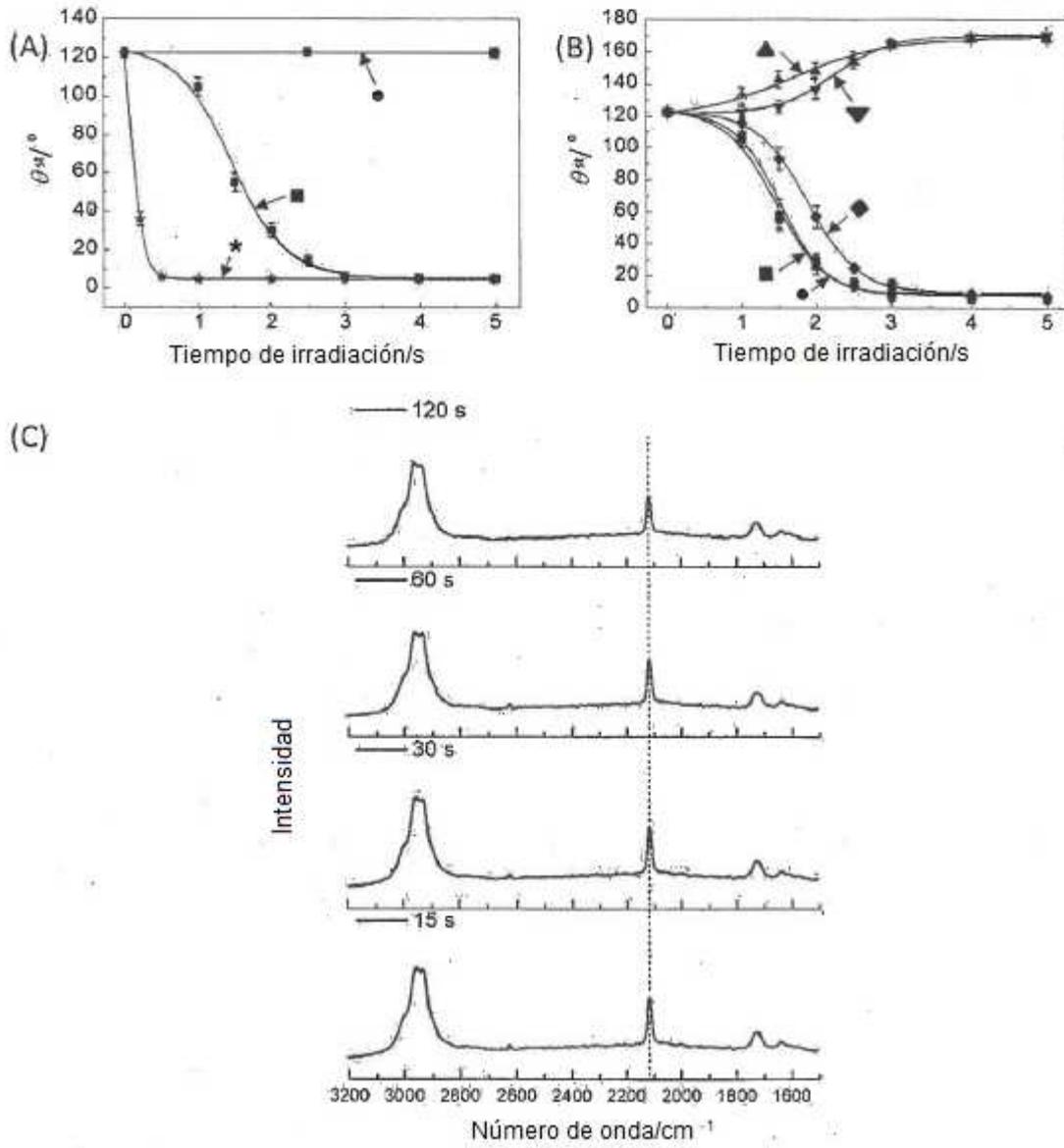


Fig. 18

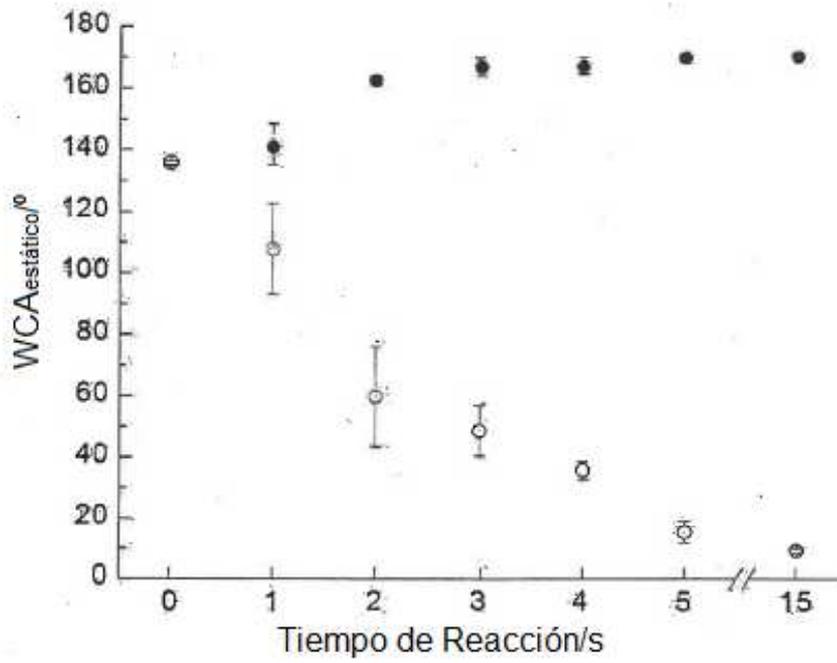


Fig. 19

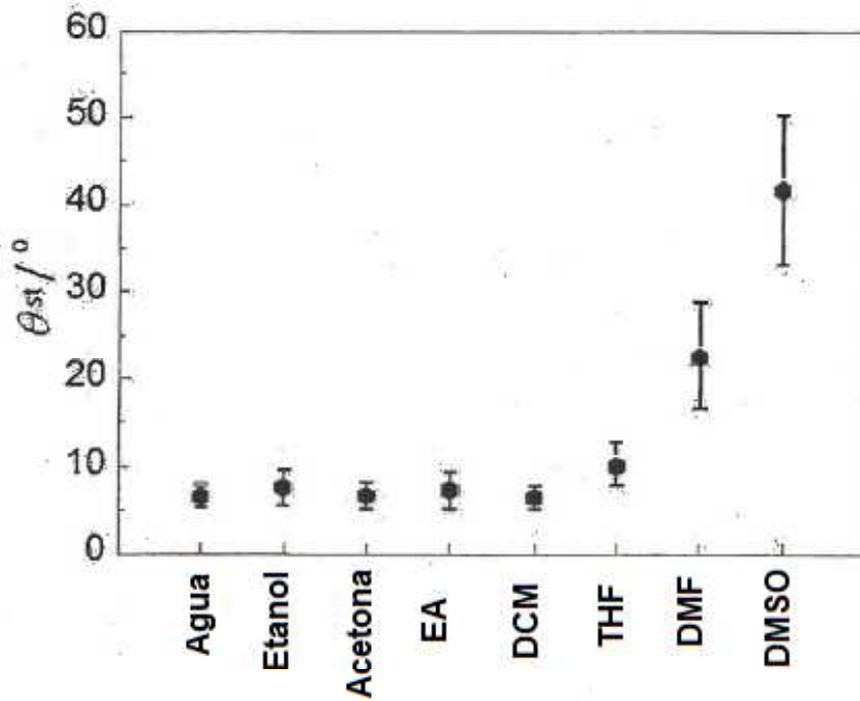


Fig. 20

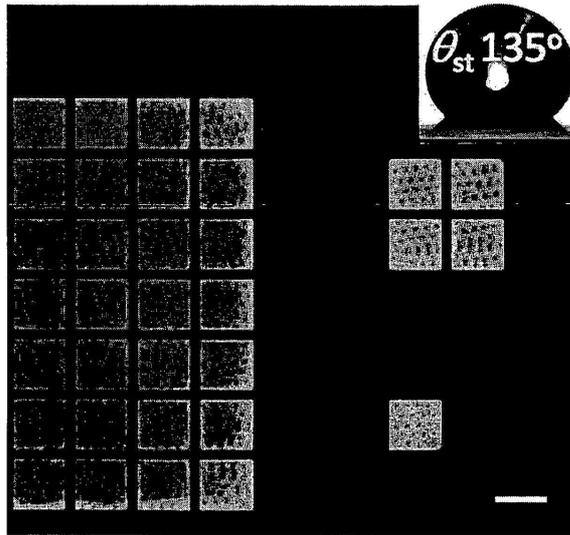


Fig. 21

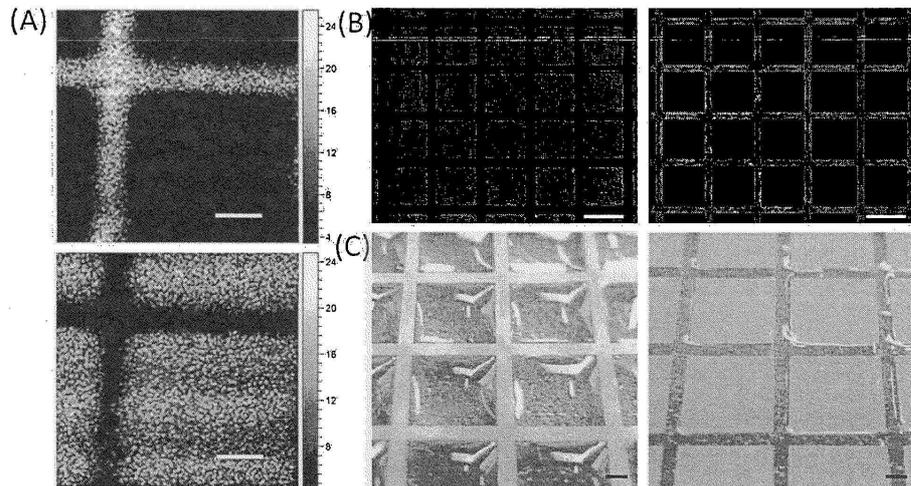


Fig. 22

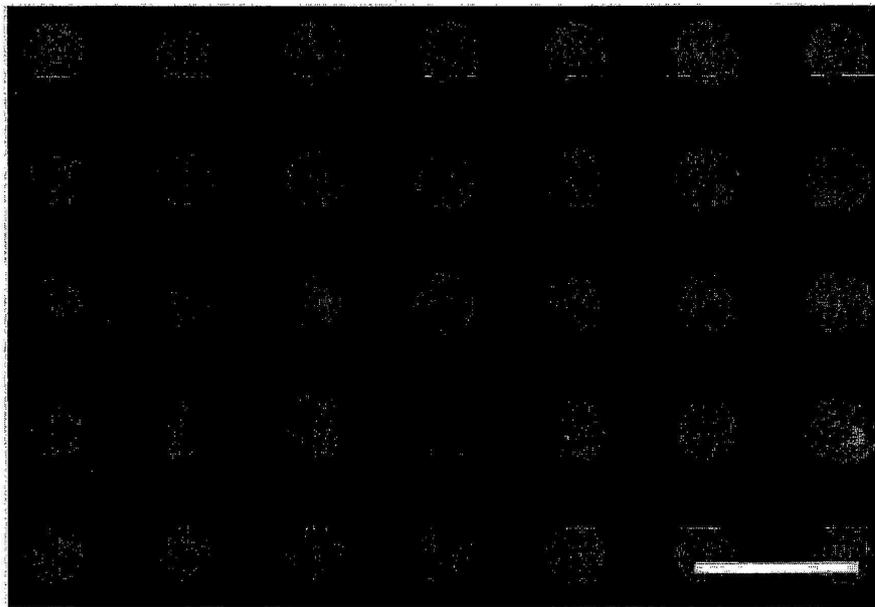


Fig. 23

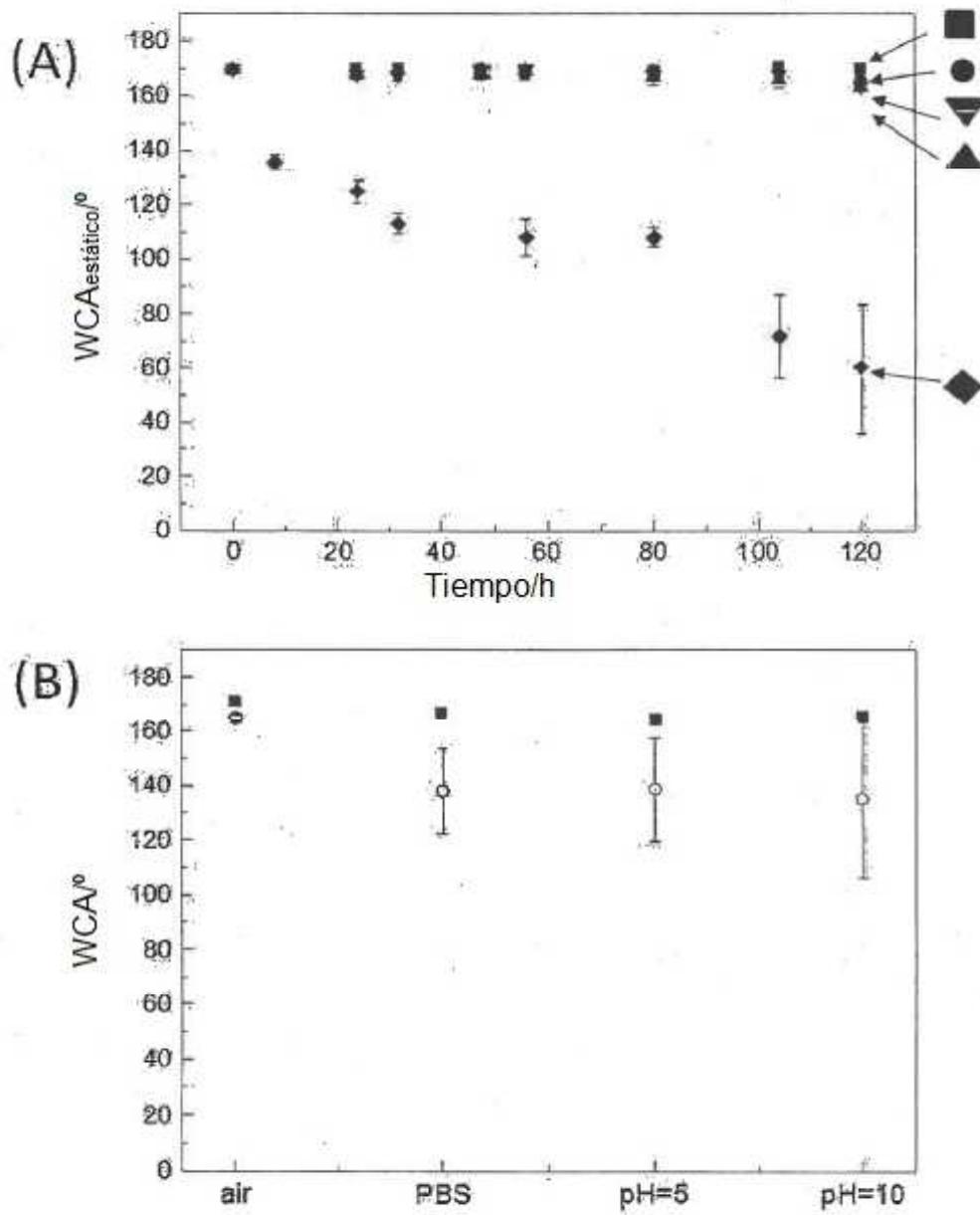
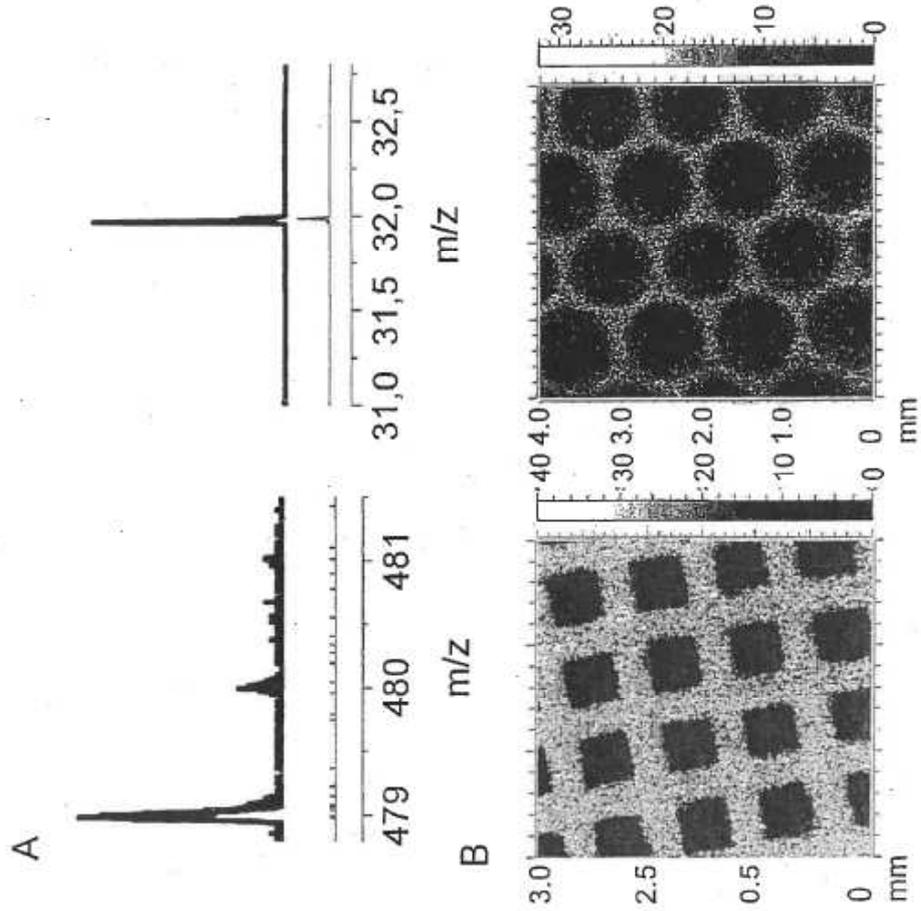
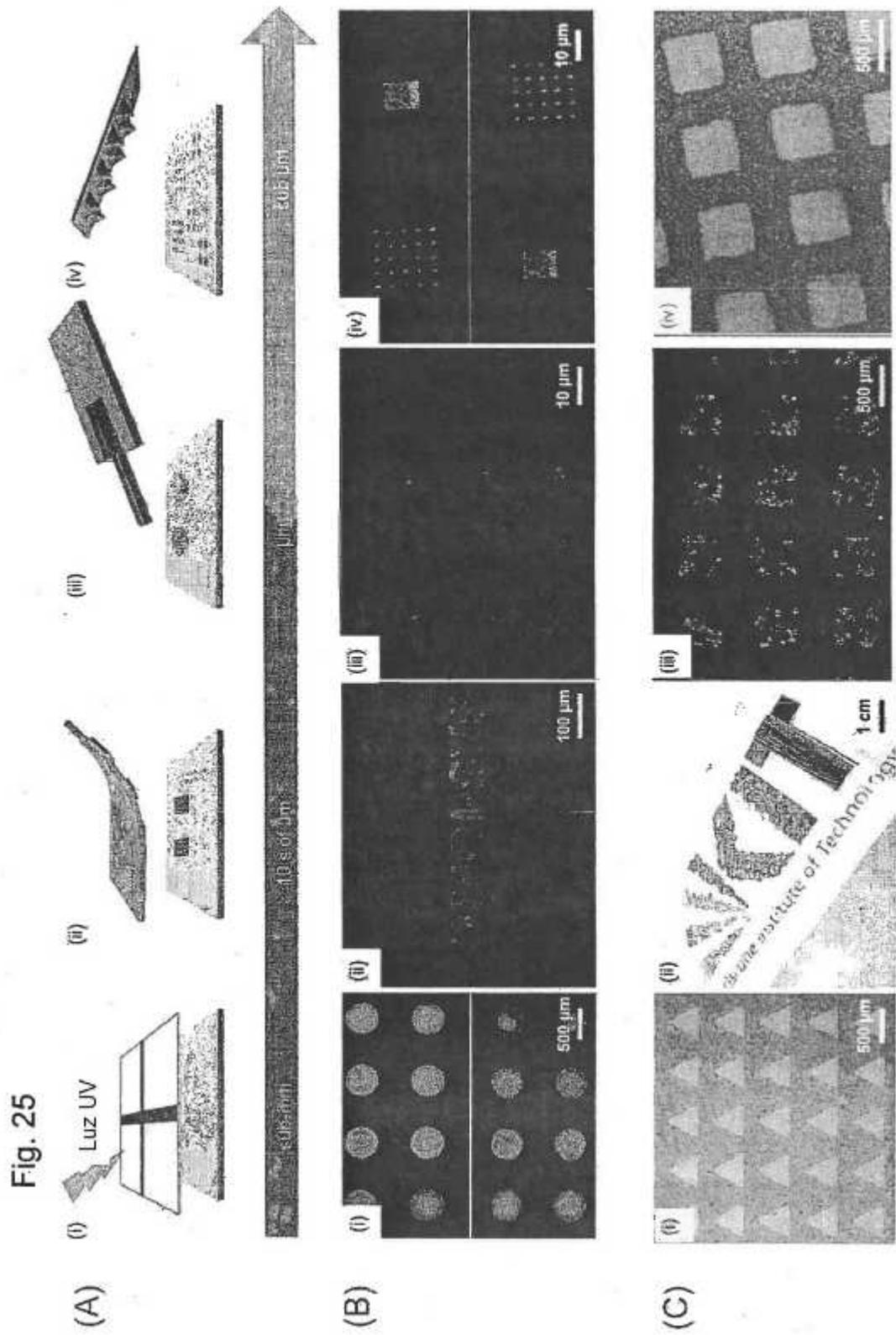


Fig. 24





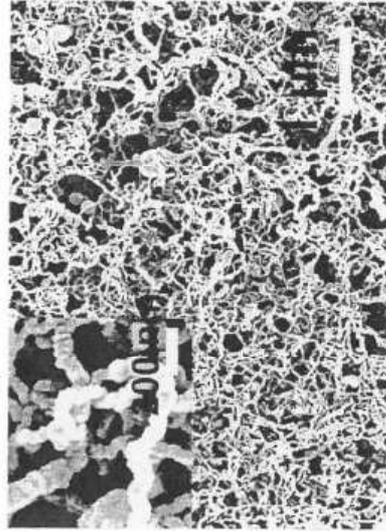
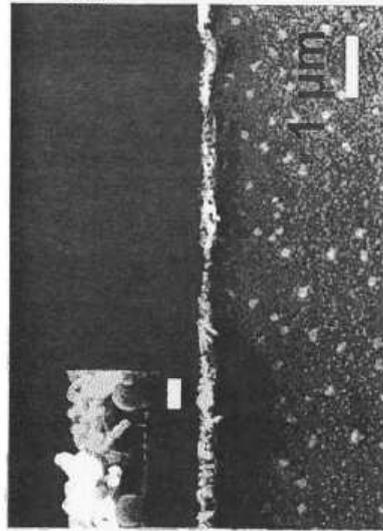


Fig. 26

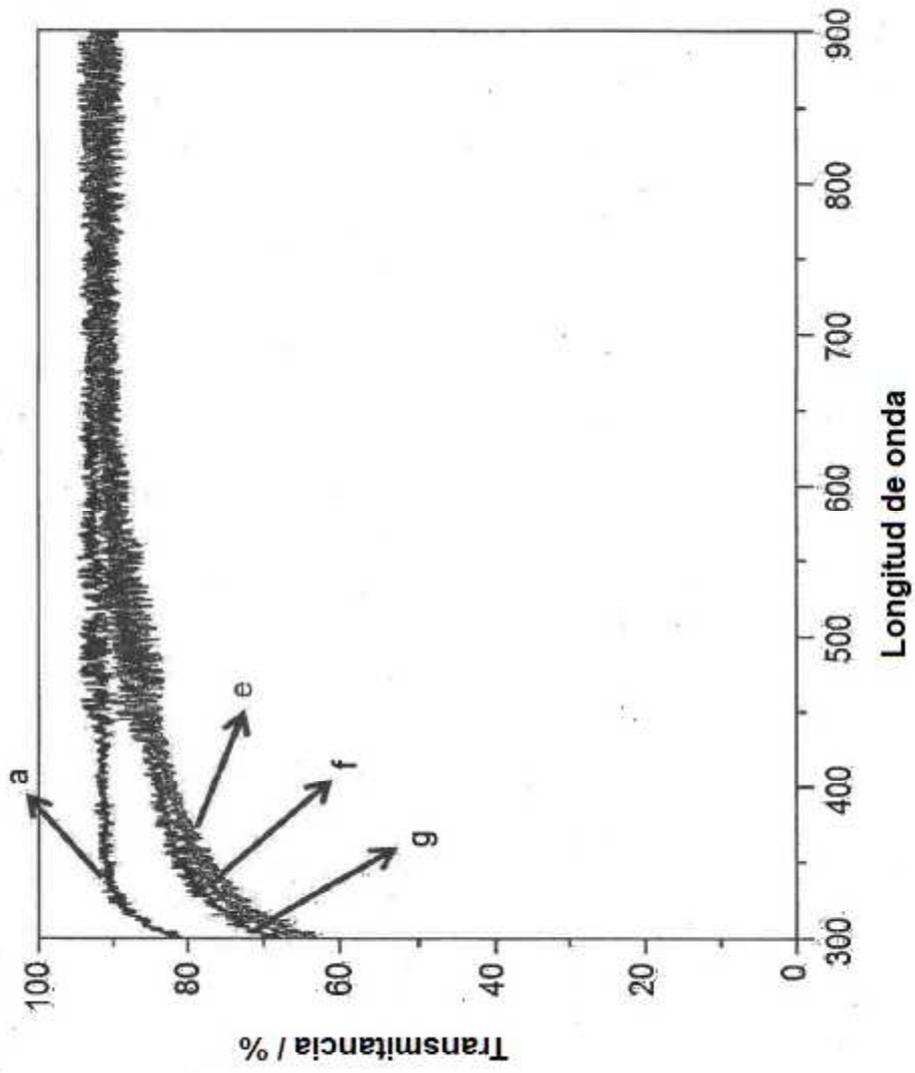


Fig. 27